UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FÍSICA E MATEMÁTICA

AILTON MASSAITI WATANABE

**Admitância/Impedância Eletroacústica Aplicada ao Estudo da Formação
de Monocamadas Automontadas e da Afinidade Proteínas/Carboidratos**

Ribeirão Preto

2006

AILTON MASSAITI WATANABE

**Admitância/Impedância Eletroacústica Aplicada ao Estudo da Formação
de Monocamadas Automontadas e da Afinidade Proteínas/Carboidratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto para a obtenção do título de Mestre
em Física Aplicada à Medicina e Biologia.

Área de Concentração: Biossensores
Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno

Ribeirão Preto

2006

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

WATANABE, AILTON MASSAITI

Admitância/Impedância Eletroacústica Aplicada ao Estudo da Formação de Monocamadas Automontadas e da Afinidade Proteínas/Carboidratos / Ailton Massaiti Watanabe; Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno. - - Ribeirão Preto, 2006.

98 f.: il.; 30 cm

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto para a obtenção do título de Mestre em Física Aplicada à Medicina e Biologia.

1. Biossensores, 2. Proteínas, 3. SAM 4. Admitância Eletroacústica

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ailton Massaiti Watanabe

Admitância/Impedância Eletroacústica Aplicada ao Estudo da Formação de Monocamadas Automontadas e da Afinidade Proteínas/Carboidratos

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto para a obtenção do título de Mestre em Física Aplicada à Medicina e Biologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Durante o desenvolvimento desta dissertação foram apresentados e publicados os seguintes trabalhos:

Admitância Eletroacústica aplicada à caracterização de biossensores

Ailton M. Watanabe, Mariele M. Pedroso, Ronaldo C. Faria e Paulo R. Bueno

13º Encontro Nacional de Química Analítica, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ. Setembro/ 2005.

Estudo da interação lectina-carboidrato e lectina-glicoconjugado por meio da técnica de QCM no desenvolvimento de biossensores

Mariele M. Pedroso, Ailton M. Watanabe, Paulo R. Bueno, Maria C. Roque-Barreira e Ronaldo C. Faria

13º Encontro Nacional de Química Analítica, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ. Setembro/ 2005.

Admitância Eletroacústica aplicada ao estudo da formação de monocamadas automontadas e imobilização de proteína

Ailton M. Watanabe, Mariele M. Pedroso, Ronaldo C. Faria e Paulo R. Bueno

XXIX Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada, São Lourenço, MG. Maio/ 2006.

Artigos em fase de redação:

M. M. Pedroso, A. M. Watanabe, M. C. Roque-Barreiro, P. R. Bueno, R. C. Faria, **“Quartz Crystal Microbalance Monitoring of Lectin-Carbohydrate Binding”, Biosensor and Bioelectronics, 2006.**

A. M. Watanabe, M. M. Pedroso, R. C. Faria P. R. Bueno, **“Electroacoustic Admittance Study of Cistamine Self-Assembly Monolayer”, Biosensor and Bioelectronics 2006.**

**Aos meus pais Yassumassa e Maria
Fátima e à minha irmã Heleni pelo
amor, apoio e incentivo durante
todos os momentos da minha vida.**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno pela orientação e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria pelas discussões e pela amizade.

À Adriana, pelo amor, compreensão e ao apoio.

Aos meus amigos: Alan, Rafael “Zad”, Fabiano “Coluto”, Ana, Priscila, Lara, César “Alemão”, Pedro Schio, Helder “Willber”, Rafael “Birigui”, Wagner “Rondônia”, Jefferson, Alexandre Cacheffo, pelo apoio, incentivo e discussão.

Ao pessoal do LABiE: Mariele, Juliana, Elen, Andrea, Paulo, Grazielle, Jovino, Luiza e Estela pela amizade e colaboração.

A todos os amigos da FAMB.

Ao pessoal do LIEC - São Carlos e do LIEC - Araraquara pelo empréstimo dos equipamentos e pela amizade.

A CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

A técnica de Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM) tem sido utilizada para a aplicação em biossensores. Esta técnica consiste no monitoramento da frequência de oscilação do cristal de quartzo e a variação de frequência está relacionada com a variação de massa na superfície do cristal por meio da equação de Sauerbrey. Porém, sabe-se que há discrepância entre a massa calculada pela equação de Sauerbrey e a massa real aderida na superfície do cristal de quartzo, sendo tal discrepância causada por fatores tais como a viscoelasticidade, o que é especialmente observado para macromoléculas e sistemas biológicos. Com a técnica de Admitância Eletroacústica (AE) é possível analisar a massa real devido à análise em separado dos parâmetros que compõem o circuito equivalente do cristal de quartzo e também inferir informações sobre a estrutura das monocamadas montadas sobre a superfície do cristal de quartzo. Neste trabalho foi utilizada técnica de AE para se potencializar e detalhar o estudo da formação de monocamadas automontadas e interações entre diferentes proteínas e carboidratos. Em muitos casos verificou-se que durante a formação de determinadas monocamadas, grande parte da variação de massa estava relacionada a interações fracas e não-específicas. Também durante a formação das monocamadas de tióis de cistamina, verificou-se que a estrutura da monocamada é extremamente dependente das concentrações iniciais de cistamina utilizadas para formar a monocamada.

As interações entre proteínas e carboidratos foram realizadas após formação de multicamadas nas quais as proteínas eram imobilizadas para depois estudar-se, então, sua interação com carboidratos específicos. No caso da Jacalina, um tipo de lectina, observou-se interações bastante específicas com a fetuína e interações fracas com a α -lactose. A atividade da enzima GumH também foi testada com sucesso utilizando a técnica de AE.

Palavras-chave: 1. Biossensores, 2. Proteínas, 3. SAM 4. Admitância Eletroacústica

ABSTRACT

The Quartz Crystal Microbalance (QCM) has been largely used for biosensor applications. This technique consists on monitoring quartz crystal oscillation frequency. The relationship of quartz crystal frequency variation with mass deposited on the crystal surface is described by Sauerbrey's equation. However, the relationship is not directly inferred and discrepancy exists caused mainly by viscoelasticity features of mass adsorbed on the quartz crystal surface. The viscoelastic influence is very common to be observed especially for macro-molecules and biological systems. By using Electroacoustic Admittance (EA) technique it is possible to calculate and separate the real mass deposited over the quartz crystal from other contributions. Therefore, the EA was used to infer about self-assembly monolayer structure being deposited over the quartz crystal. In this work EA technique was used to study details of self-assembled monolayer formation and specific interactions between different proteins and carbohydrate molecules. It was observed that during monolayer formation the majority of mass variation was related to non-specific interactions. For instance, regarding cystamine monolayer formation it was observed that the monolayer structure is dependent on the cystamine concentrations in the liquid medium. The study of interactions between proteins and carbohydrates was conducted by means of multilayers approach in which the proteins are immobilized previously to study the interaction between its active sites and carbohydrates. In the specific case of Jacalin, a type of lectin, it was observed a large formation of specific bonding between this protein and α -lactose or fetuin. The GumH enzyme activity was also tested successfully by using of EA technique.

Keywords: 1. Biosensors, 2. Proteins, 3. SAM, 4. Electroacoustic Admittance

SUMÁRIO

1. - INTRODUÇÃO	1
1.1. – BIOSSENSORES	4
1.2. – PROTEÍNAS E BIOSSENSORES	7
1.2.1. – Lectinas	7
1.3. – FILMES AUTOMONTADOS E BIOSSENSORES	9
1.4. – IMOBILIZAÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO	11
1.4.1. – Método de oclusão em matriz polimérica	12
1.4.2. – Microencapsulação	13
1.4.3. – Adsorção Física	13
1.4.4. – Ligação Covalente em Suporte	14
1.4.5. – Ligação Covalente Cruzada Intermolecular	14
1.5. – NANO(MICRO)BALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO, QCN (M)	15
1.5.1. – Piezeletricidade e cristal de quartzo	15
1.5.2. – Circuito equivalente para um transdutor piezelétrico	18
1.5.3. – Princípio de funcionamento da nano(micro)balança de cristal de quartzo	19
1.5.4. – QCM-D (Microbalança de cristal de quartzo com monitoramento da dissipação)	22
1.5.5. – Impedância / Admitância Eletroaústica	23
 2. - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	 33
2.1 – INSTRUMENTAÇÃO	34
2.1.1 – Cristais de Quartzo	34
2.1.2 – Microbalança de Cisttal de Quartzo	34
2.1.3. – Admitância / Impedância Eletroacústica	35
2.2. – MATERIAIS: REAGENTES E SOLUÇÕES	36
2.3. – ESTRATÉGIA DE IMOBILIZAÇÃO DA JACALINA	37
2.3.1. – Formação das monocamadas automontadas de cistamina	38
2.3.1.1. – Estudo da cistamina com diversas concentrações	38
2.3.2. – Imobilização da jacalina	39

2.3.3. – Estudo da afinidade jacalina-carboidrato	39
2.4. - TESTE DA ATIVIDADE DA ENZIMA GumH	40
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
3.1. – CONSTRUÇÃO DAS CAMADAS AUTOMONTADAS	42
3.2. – CONCENTRAÇÃO ÓTIMA PARA A CISTAMINA	49
3.2.1. – Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM)	49
3.2.2. – Admitância Eletroacústica	51
3.3. – EFEITO DO TEMPO DE ESTABILIZAÇÃO NA CONSTRUÇÃO DAS MONOCAMADAS	55
3.4. – EFEITO DO TEMPO DE IMOBILIZAÇÃO NA FORMAÇÃO DAS CAMADAS AUTOMONTADAS	58
3.5. – IMOBILIZAÇÃO DA JACALINA	62
3.6. – ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE A JACALINA E CARBOIDRATOS	66
3.7 – ESTUDO DA ATIVIDADE DA ENZIMA GUMH	69
4. – CONCLUSÕES	83
5 – REFERÊNCIAS	85

INTRODUÇÃO

Biossensores têm representado grande importância na análise de substâncias nocivas à saúde humana, diagnósticos de doença, estudos de processos bioquímicos (estudo de proteínas, ácidos nucleicos, etc), descobrimento de novas drogas, entre outras aplicações (1). O primeiro biossensor descrito na literatura é datado de 1962, quando Clark e Lyons (2) desenvolveram um biossensor amperométrico utilizando glicose oxidase imobilizada fisicamente em uma membrana de cuprofano (celulose recuperada) acoplada a um eletrodo de oxigênio. Este sistema foi melhorado posteriormente por Updike e Hicks (3) pela imobilização da mesma enzima em gelatina. Posteriormente Guilbault e Montalvo (4) construíram o primeiro biossensor potenciométrico para a uréia imobilizando a urease em uma matriz de poliacrilamida sobre um eletrodo de vidro seletivo para íons amônio. A partir disto, muitos outros sensores foram projetados e empregados na análise química de diversas substâncias nas áreas biológicas, clínica e industrial, além de poderem ser empregados no monitoramento e controle de alguns poluentes ambientais, tais como pesticidas e fertilizantes entre outros (5).

Mais recentemente, Narang e colaboradores (6) descreveram um biossensor para a detecção de ricina, uma proteína potencialmente tóxica para mamíferos encontrada em sementes de mamona. Neste estudo, eles imobilizaram a anti-ricina IgG (anticorpo) na superfície de uma fibra óptica de dois modos distintos: a) cobriram diretamente uma superfície silanizada com o anticorpo utilizando uma ligação cruzada, b) a fibra óptica coberta com avidina foi incubada com a anti-ricina IgG biotinizada para imobilizar o anticorpo fazendo o uso da ligação avidina-biotina. A ricina acoplada com anticorpos tem sido desenvolvida para atacar células tumorosas (7).

Liu G. e Lin Y. (8) descreveram um biossensor amperométrico utilizando nanotubos de carbono como substrato para glicose oxidase automontada eletrostaticamente. Neste estudo foi feito um “sanduíche” da enzima formando primeiramente uma camada automontada de

PDDA –cloreto de poli(dimetildialilamônio) catiônico, sobre esta camada foi imobilizada a enzima e novamente o PDDA. O sanduíche é feito para proteger a enzima quando esta for submetida a um fluxo.

Tombelli S. e colaboradores (9) construíram um biossensor baseado num transdutor piezelétrico pré-tratado para a imobilização de DNA, sendo um biossensor específico para a detecção de um gene (mec A) do *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). O MRSA é responsável por várias infecções em seres humanos, tais como meningite, pneumonia e endocardite. Foram descritos dois processos para a imobilização: através da interação estreptavidina-biotina e da imobilização direta sobre um tiol.

Serra B. *et al.* (10) desenvolveram um biossensor amperométrico composto de tirosinase para a análise de coliformes fecais em água potável. A tirosinase é utilizada para aumentar a detecção amperométrica da atividade da β -galactosidase, pois o método utilizado foi a análise de fenol após a hidrólise da β -galactopiranosídeo em β -galactosidase.

Okumura S. *et al.* (11) relataram sobre um biossensor óptico utilizando a técnica de SPR (Surface Plasmon Resonance) para a determinação de proteínas biotiniladas como um índice de purificação da membrana plasmática de células animais.

Este breve histórico acima descrito demonstra, de maneira breve, que existe uma infinidade de possibilidade de se projetar e desenvolver biossensores. A seguir, será realizada ainda uma breve descrição sobre os conceitos envolvidos no desenvolvimento de biossensores e sua definição, de forma a enfatizar a detecção das moléculas de interesse por técnicas físicas baseadas em transdutor piezoelétrico. Depois disso, descrever-se-á os princípios e as vantagens de se utilizar e estudar a resposta de admitância/impedância do transdutor aplicado como biossensor.

1.1. BIOSSENSORES

Biossensores podem ser considerados como um subgrupo de sensores químicos com definição e classificação próprias (12). Um sensor químico é um dispositivo que transforma uma informação química originada de uma reação ou de uma propriedade química de interesse em um sinal analítico útil. Há duas unidades funcionais básicas em um sensor químico, o receptor (também conhecido como reconhecedor) e o transdutor.

O receptor é o responsável pelo reconhecimento do analito de interesse, sendo que o reconhecimento se dá através de eventos de naturezas distintas. Entende-se aqui por analito, a substância alvo de estudo. A natureza dos eventos envolvida no reconhecimento do analito pode ser física, química ou bioquímica. Estes eventos transformam energia que é convertida em uma forma mensurável por um transdutor. Em outras palavras, um transdutor pode ser considerado como um dispositivo capaz de transformar a energia que contém a informação química da amostra em um sinal analítico útil.

O biossensor é um sensor químico que possui como receptor um componente biologicamente ativo e um processo bioquímico como fonte do sinal analítico. Deste modo, um biossensor possui uma alta seletividade com relação a um determinado analito (12, 13). Segundo as divisões de Química Analítica e Físico-Química da IUPAC (“International Union of Pure and Applied Chemistry”), a definição para um biossensor é “um dispositivo capaz de fornecer informação analítica específica, quantitativa ou semi-quantitativa usando um elemento de reconhecimento biológico como receptor bioquímico que está em contato direto com um elemento de transdução” (14).

O componente biológico faz o reconhecimento do analito por meio de uma reação química gerando um sinal resultante que pode ser causado, por exemplo, por uma variação da concentração de prótons, liberação de gases, emissão ou absorção de luz, emissão de calor, variação de massa, mudança no estado de oxidação, entre outros. O transdutor converte este

sinal em corrente, potencial, diferença de temperatura, mudança no estado de oxidação, deslocamento da frequência, etc (15). Deste modo, o funcionamento de um biossensor pode ser resumido na seguinte forma: um material biológico faz o reconhecimento do analito que posteriormente é convertido em um sinal captado por um transdutor e finalmente é medido por algum equipamento (Figura 1.1.1).

Figura 1.1.1 - Esquema de funcionamento de um biossensor.

O reconhecimento molecular pode dar-se de diversas maneiras, como por exemplo, complexação, associação, adição, equilíbrio, absorção, adsorção, cinético ou por afinidade e os componentes biológicos que podem ser utilizados para o reconhecimento molecular podem ser: filmes sólidos, metais, óxidos metálicos, cristais, polímeros, polímeros condutores, organismos, microorganismos, tecidos de plantas ou animais, células, organelas, membranas,

enzimas, receptores, anticorpos, ácidos nucleicos, macromoléculas orgânicas, moléculas inorgânicas e micelas.

Há várias características desejáveis em biossensores, assim como diferentes fatores que influenciam estas características (Tabela 1.1.I).

Tabela 1.1.I. Características desejáveis em um biossensor e os fatores que as influenciam.

Características desejáveis	Fatores que influenciam
Estabilidade	Tipo de imobilização Quantidade e pureza do analito Condições operacionais Estabilidade do transdutor
Tempo de resposta	Velocidade de agitação da solução Concentração de analito pH Temperatura
Sensibilidade	Sensibilidade do transdutor Concentração de analito Tipo de imobilização
Seletividade	Componente biológico Tipo de imobilização Transdutor utilizado

Biossensores podem ser aplicados para análise de fármacos e drogas, microbiologia, análise de bactérias e vírus, análises clínicas, produção e controle em indústrias de alimentos e bebidas, controle de efluente industrial, monitoramento de gases tóxicos, diagnósticos clínicos, análise em medicina veterinária, controle de processo industrial e fermentação, entre outros (1). Uma outra aplicação para biossensores é a sua utilização para a detecção de

explosivos, TNT – trinitrotolueno. Neste estudo realizado por Larsson A. e colaboradores (16) um “biochip” é feito utilizando um substrato de ouro modificado com tiol automontado. Este tiol possui terminações com grupos hidroxila e um análogo do TNT (2,4 – dinitrobenzeno). Sobre o tiol automontado é imobilizado o ABTNT, um anticorpo monoclonal (uma classe de proteína) que se liga com o TNT. Quando o TNT é adicionado sobre o sistema ouro-tiol-ABTNT provoca uma dissociação, pois a interação ABTNT-TNT é mais forte que a interação entre ABTNT e o análogo do TNT (tiol utilizado para a formação da monocamada automontada).

1.2. PROTEÍNAS E BIOSSENSORES

Como foi visto anteriormente, um biossensor é formado por duas partes importantes: o receptor e o transdutor. O que caracteriza um biossensor é o fato deste utilizar um material biológico como receptor. Estes materiais podem ser proteínas (anticorpos, enzimas, lectinas, entre outros), organismos, tecidos animal e vegetal, células, organelas entre outros. De acordo com o alvo de estudo, pode-se por exemplo, utilizar enzimas para detectar substratos, anticorpos para antígenos, lectinas para açúcares (carboidratos) ou mesmo ácidos nucleicos para uma sequência complementar (13, 17). Neste trabalho foram utilizadas proteínas (jacalina, uma lectina e a gumH, uma enzima) como receptores para estudar a afinidade proteína-carboidrato. O sinal do transdutor foi estudado via uma resposta *ac*, que foi capaz de fornecer maiores informações do sistema físico-químico.

1.2.1. LECTINAS

Lectina é uma das diversas classes de proteínas, cuja característica é a sua capacidade de se ligar a monossacarídeos e oligossacarídeos com alta afinidade e especificidade. A utilização de lectinas viabiliza a mediação de eventos biológicos, tais como o reconhecimento

de moléculas presentes em membranas e matriz extracelular (18). Também pode ser utilizada para a investigação da dinâmica de carboidratos na superfície celular durante sua divisão, diferenciação e malignidade, bem como ainda ser utilizada no isolamento e caracterização de glicoconjugados.

Segundo Pewmans e Van Damme (19), lectinas podem ser classificadas em quatro tipos: Merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas. As merolectinas são proteínas de cadeia única que apresentam um único sítio responsável pela ligação com carboidratos, são monovalentes, ou seja, desprovidas de atividades hemoaglutinantes e incapazes de precipitar glicoconjugados. Hololectinas apresentam dois ou mais sítios ligantes idênticos ou similares e compreendem a maioria das lectinas, sendo por definição divalentes ou multivalentes (20). Além disso, aglutinam células e precipitam glicoconjugados. As quimerolectinas além de possuírem sítios ligantes a carboidratos possuem um outro sítio com atividade catalítica ou biológica diferente que reagem independentemente do domínio ligante a açúcares.

As lectinas podem ser encontradas em organismos vivos, desde vírus e plantas até seres humanos e sua classificação é feita de acordo com a especificidade da ligação com monossacarídeos (19).

A jacalina, uma lectina extraída das sementes da jaca, é uma lectina específica para a galactose (Gal), além de haver relatos de que a jacalina possui uma forte afinidade pelo dissacarídeo $\text{Gal}\beta 1\text{-3GalNAc}\alpha\text{O}$ (GalNAc: N-Acetil Galactosamina) que é o antígeno Thomsen-Friedenreich, um antígeno associado a um tumor de origem oncofetal (21).

A jacalina é uma importante ferramenta biotecnológica devido à sua capacidade para reconhecer especificamente a IgA_1 (Imunoglobulina A, cuja função é compor a defesa do organismo) de soro humano e do leite (18) e também por sua interação com regiões específicas do CD4^+ , um receptor do tipo 1 do vírus da imunodeficiência adquirida causando

a inibição da infecção do HIV *in vitro*. CD4⁺ é um subtipo de linfócito T, responsável pelo controle da resposta de todos os outros tipos celulares no sistema imunológico (22).

A jacalina é uma lectina tetramérica com peso molecular em torno de 66 kDa, sendo que cada subunidade consiste de 2 cadeias: uma “grande-heavy” com 133 aminoácidos e uma “pequena-light” com 20 resíduos e sua estrutura cristalográfica mostra um enovelamento particular do tipo β -prisma triplamente simétrico (Figura 1.2.1) (23). Além disso, ela demonstra ser formada por um sítio primário e dois sítios secundários, cujo modo de interação depende da configuração do ligante. Como citado anteriormente, esta lectina foi uma das proteínas cuja interação com açúcares (carboidratos) foi estudada neste trabalho mediante análise do sinal de admitância/impedância eletroacústica.

Figura 1.2.1 - Estrutura da jacalina tetramérica (23).

1.3. FILMES AUTOMONTADOS E BIOSSENSORES

As áreas que envolvem desenvolvimento de filmes ou camadas automontadas com propriedades específicas (funcionalizadas) apresentam grande demanda de estudo, sendo que o interesse no estudo destes sistemas tem apresentado crescimento contínuo nos últimos anos,

sobretudo pela importância tecnológica no desenvolvimento de biossensores e dispositivos similares (24). Uma destas áreas é aquela que envolve o desenvolvimento de filmes automontados para aplicação na área de biomedicina, como uma interface entre uma superfície metálica e uma solução ou vapor (25).

Camadas automontadas são compostas por moléculas ordenadamente montadas, as quais são formadas espontaneamente por adsorção de um surfactante (substância tensoativa) com uma afinidade específica do seu grupo principal com o substrato. Sua maior importância está no uso para monocamadas funcionalizadas aplicadas para a imobilização de componentes biológicos incluindo nucleotídeos (oligonucleotídeos), proteínas, anticorpos, receptores e também polímeros.

Biomacromoléculas (anticorpos, enzimas, ácidos nucleicos) ou sistemas biológicos (receptores, células) fornecem uma alta seletividade. Isto pode ser explorado para a produção de biossensores, usando um elemento de sensor biológico integrado com um transdutor piezelétrico, óptico ou eletroquímico (Turner¹, 1987 *apud* Wink 1997 (25)). Mais freqüentemente, o componente biológico é imobilizado na superfície do transdutor ou nas proximidades deste. Uma consequência importante da imobilização de biomoléculas por este método é a preservação das atividades biológicas (25). No reconhecimento biológico, isto é, quando ocorre uma ligação entre a molécula imobilizada e o seu ligante ou analito, é gerado um sinal que é proporcional à concentração ou a quantidade de analito presente na amostra.

Quase todas as superfícies podem ser modificadas com monocamadas funcionalizadas que possuem uma especificidade, podendo ser elétrica, óptica ou então química (25).

Um dos tipos de formação de monocamadas mais exploradas para a aplicação em biossensores é a utilização da interação entre uma superfície de ouro com um tiol (R-SH) (25), devido à forte interação entre o ouro e o enxofre. Um dos tióis que podem ser utilizados

¹ Turner, A. F. P., in *Biosensors: Fundamentals and Applications*, ed. Turner, A. F. P., Karube, I., and Wilson, G. S., Oxford University Press, 1987, pp. V–VIII.

é a cistamina, uma molécula que possui dois enxofres em sua cadeia e terminações com grupo amina (Figura 1.3.1), sendo que foram estudadas em detalhes as formações da monocamada de tiol sobre uma superfície de Au aderida a um cristal de quartzo o qual foi utilizado como transdutor.

Figura 1.3.1 – Formação das monocamadas através da formação de uma ligação do tipo base de Schiff, ligação entre a superfície de ouro, cistamina e glutaraldeído.

1.4. IMOBILIZAÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO

Há diversas maneiras para imobilizar um material biológico que serão descritos a seguir (9, 26-34), porém o processo de imobilização não deve desnaturar o centro ativo do material utilizado em biossensores, ou seja, a imobilização deve se dar através de grupos que não possuam atividades catalíticas. Normalmente estas imobilizações ocorrem entre um suporte e certos grupos amino de aminoácidos, grupos fenólicos da tirosina, hidroxila da serina, hidrogenossulfato da cisteína e imidazol da histidina, os quais não possuem atividade enzimática e geralmente são utilizados com sucesso.

Os métodos de imobilização podem ser divididos em algumas categorias, tais como:

- (a) oclusão em matrizes poliméricas, (b) microencapsulação, (c) adsorção física e/ou química, (d) ligação química covalente e (e) ligação química cruzada (Figura 1.4.1) (13).

Figura 1.4.1 – Métodos de imobilização de materiais biológicos: (a) oclusão em gel, (b) Microencapsulação, (c) adsorção física, (d) ligação química covalente e (e) ligação química covalente cruzada.

1.4.1. MÉTODO DE OCLUSÃO EM MATRIZ POLIMÉRICA

Neste método é realizado um aprisionamento da enzima entre os espaços formados pelas ligações covalentes cruzadas de polímeros insolúveis (ágar-ágar, álcool polivinílico, poliacrilamida, amido, borracha de silicone, entre outros). No processo de imobilização por este método, o monômero, o catalisador de polimerização e a enzima são misturados em uma solução tampão. Quando o polímero é formado, há o aprisionamento da enzima na estrutura do polímero formam-se pequenos espaços intersticiais, os quais não permitem a difusão de moléculas grandes, isto é, a enzima. Porém as moléculas menores do substrato (monômeros) podem se difundir livremente.

A vantagem deste método é que na reação entre a enzima e o substrato não ocorre nenhuma modificação, pois a imobilização da enzima não causa alterações estruturais notáveis. Porém há a desvantagem de diminuir o tempo de vida útil do biossensor, devido à perda de parte da enzima imobilizada causada pela variação dos espaços intersticiais da estrutura do polímero.

1.4.2. MICROENCAPSULAÇÃO

Neste método as enzimas são confinadas em microcápsulas, esferas de membranas semipermeáveis, cujos poros variam entre 5 e 300 μm , os quais permitem o movimento livre de substratos e produtos da reação enzimática. Este método difere do método de Oclusão em Matrizes Poliméricas (35), pois o método de Microencapsulação permite o aprisionamento de um volume ou quantidade de moléculas maiores e permite uma interação enzimática intermolecular.

As vantagens deste método são: o alto grau de recobrimento da atividade da enzima e a imobilização simultânea de várias enzimas em apenas uma etapa. Porém, a necessidade de alta concentração de proteínas para a microencapsulação, a restrição de passagem de substrato de baixo peso molecular através dos poros da membrana e dificuldades na fixação das microcápsulas na base de sensores têm dificultado a aplicação deste método na construção de biossensores.

1.4.3. ADSORÇÃO FÍSICA

A interação de enzimas com suportes insolúveis geralmente resultam em interações iônicas, polares, ligação de hidrogênio, ou hidrofóbicas. Normalmente estes suportes possuem uma superfície ativa e funcionam como bons adsorventes, tais como a alumina, resinas de troca iônica, bentonita, grafite, vidro, nitrato de celulose, ágar-ágar, sefadex, sílica-gel, entre

outros. As vantagens deste método incluem a simplicidade e a grande variedade de substratos disponíveis para serem utilizados. Por outro lado, a desvantagem é que a proteína adsorvida é muito dependente de fatores como o pH, solvente, substrato e também da temperatura. Além disso, dependendo do substrato utilizado a adsorção é muito intensa e causa uma deformação na estrutura terciária da proteína e conseqüentemente, esta acaba perdendo a atividade.

1.4.4. LIGAÇÃO COVALENTE EM SUPORTE

Este tipo de imobilização é realizado por meio de uma ligação covalente entre grupos não funcionais da enzima (grupos que não são essenciais para sua atividade catalítica) e grupos reativos (hidroxila, carbonila, amino, fenólico, imidazólico, tiol) ligados na superfície sólida do suporte insolúvel (Figura 1.4.1 - D).

Há vários suportes insolúveis utilizados, tais como polímeros sintéticos (por exemplo, celulose, ágar-ágar, serafose, colágeno, amido, dextrana, etc) e materiais inorgânicos (óxidos metálicos e pérolas de vidro com porosidade controlada).

1.4.5. LIGAÇÃO COVALENTE CRUZADA INTERMOLECULAR

O método de ligação covalente cruzada intermolecular consiste na utilização de reagentes bifuncionais (heterofuncionais ou homofuncionais) para a imobilização de proteínas. Pelo uso desta abordagem são formadas partículas macroscópicas em decorrência da formação das ligações covalentes cruzadas entre as moléculas de enzima e/ou moléculas de suporte inerte com reagentes funcionais. Os reagentes homofuncionais mais utilizados são glutaraldeído, ácido bisdiazobendizina - 2,2 dissulfônico 4,4-difluor-3,3 dinitrodifenilssulfona; já os heterofuncionais incluem o tricloro-o-triazina, 3-metoxidifenilmetano-4,4 diisocianato entre outros.

A imobilização com glutaraldeído (Figura 1.4.2) foi um método muito empregado, pois o fato da enzima ser mantida num ambiente semelhante ao encontrado na natureza, o que a torna mais estável diante de variações pH, força iônica, solventes e temperatura.

Figura 1.4.2 – Imobilização de material biológico utilizando ligação covalente cruzada com o glutaraldeído.

1.5. NANO(MICRO)BALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO, QCN(M)

1.5.1. PIEZELETRICIDADE E CRISTAL DE QUARTZO

Em 1880 os irmãos Jacques e Pierre Curie observaram que ao aplicar uma pressão mecânica na superfície de alguns cristais, estes geravam um potencial elétrico nas faces opostas à deformação, proporcional à força aplicada (36). A este fenômeno foi dado o nome de piezeletricidade, onde piezo é um termo grego e significa pressão e deste modo, pode-se dizer que piezeletricidade significa eletricidade por pressão. Esta propriedade é conhecida como piezeletricidade direta e o efeito oposto, ou seja, a ocorrência de uma deformação mecânica através da aplicação de um potencial elétrico é conhecida como piezeletricidade inversa (Figura 1.5.1). A piezeletricidade inversa é a base do funcionamento de um dispositivo transdutor piezelétrico os quais podem ser aplicados como sensores de onda acústica e na detecção de moléculas de interesse (analito) desde que o receptor do analito seja imobilizado na superfície do cristal de quartzo. Este dispositivo é a base da nano(micro)balança de cristal de quartzo, como será detalhado adiante.

Figura 1.5.1 (a) Piezeletricidade direta - um potencial elétrico E é gerado após a aplicação de uma pressão e (b) piezeletricidade inversa – aplicação de um potencial V causa uma deformação.

A condição necessária para que um cristal seja piezelétrico é que não exista um centro de simetria em sua estrutura cristalina, fazendo com que haja a formação de dipolos elétricos no interior do cristal causada pela orientação dos átomos na rede cristalina (Buttry, 1991² *apud* Faria, 2000, p. 4(37)). Quando o cristal é submetido a uma diferença de potencial ele provoca uma reorientação dos dipolos elétricos, promovendo uma alteração na rede cristalina e conseqüentemente uma deformação mecânica do cristal (Figura 1.5.2).

Figura 1.5.2 – Efeito da aplicação de uma diferença de potencial entre as faces de um cristal de quartzo.

O cristal de quartzo é um importante elemento de referência ou de sincronismo em circuitos eletrônicos como relógios, transmissores e receptores, equipamentos de medição, computadores, equipamentos de navegação, entre outros (18), sendo que a principal aplicação

² BUTTRY, D.A., in *Electroanalytical Chemistry: A series of advances*, A.J. BARD, Editor. 1991, Marcel Dekker: New York. p. 1-85

do cristal de quartzo é na construção de circuitos osciladores. Para a obtenção de uma frequência ressonante estabilizada pode ser utilizada a vibração mecânica do quartzo.

As características anisotrópicas do cristal fazem com que pequenas lâminas obtidas com cortes realizados em diferentes ângulos com relação aos eixos cristalográficos tenham diferentes propriedades físicas (Nota técnica HP, 1999³ apud Faria, 2000, p. 5 (37)). O ângulo do corte estabelece o modo de vibração preferencial e o coeficiente de temperatura em função da frequência de oscilação fundamental. Há vários tipos de cortes como: AB, BT, CT, DT, AT, SC entre outros, sendo que os principais são: AT, BT e SC. O corte AT tem o cisalhamento como modo de oscilação preferencial, é o que possui menor variação de frequência com a temperatura, é muito utilizado atualmente para frequências maiores que 1 MHz.

A frequência de trabalho do cristal de quartzo é determinada pelo tipo de corte, espessura da lâmina de quartzo e a massa dos eletrodos depositados. A deposição dos eletrodos se faz necessária para a aplicação de uma diferença de potencial (DDP) na superfície do cristal. Quanto menor a espessura do cristal, maior é a frequência fundamental e conseqüentemente maior a sensibilidade do sensor (Eq. 1). Deste modo, há um limite na espessura do cristal e conseqüentemente a máxima frequência obtida, sendo que a maior frequência obtida é em torno de 27 MHz, porém quando utilizados outros harmônicos (ou sobretons) é possível atingir valores da ordem de 100 MHz.

Mais recentemente tem sido utilizado o termo ressonador em modo de cisalhamento de espessura (TSM, “thickness shear mode”). Segundo Yang e Thompson (35) há diferenças na variação de frequência na utilização de um cristal de quartzo polido e um não-polido quando inserido em meio líquido. Através de uma micrografia utilizando STM (“Scanning Tunneling Microscopy”, Microscopia de Varredura de Tunelamento) foi relatado que um

³ Fundamentals of Quartz Oscillators. Nota técnica 200-2 – Hewlett-Packard, 1999

crystal não polido contém irregularidades da ordem de 1 a 3 μm (35), enquanto que num cristal polido essas irregularidades são da ordem de 0,01 a 0,02 μm . Devido à rugosidade do cristal podem ocorrer vários efeitos além do aprisionamento (ou adsorção) de massa sobre a superfície do cristal de quartzo. Eles propuseram que a variação total de frequência engloba vários efeitos:

$$\Delta f_s = \Delta f_d + \Delta f_m + \Delta f_a + \Delta f_x,$$

sendo que Δf_d , Δf_m , Δf_a , Δf_x são as mudanças de frequência causadas por: amortecimento viscoso, ou seja, perdas de energia por acoplamento de cisalhamento; aprisionamento de massa rígida; tensão superficial; e dissipação de energia por acoplamento de não-cisalhamento (35).

1.5.2. CIRCUITO EQUIVALENTE PARA UM TRANSDUTOR PIEZELÉTRICO

A resposta de transdutores piezelétricos baseados em cristais de quartzo pode ser monitorada pela análise do circuito equivalente. Em frequências muito próximas da frequência de ressonância, o cristal de quartzo pode ser representado por um circuito equivalente (Figura 1.5.3). Este circuito é constituído de dois ramos: o ramo dinâmico e o ramo estático.

No ramo dinâmico há um resistor, R ; um capacitor, C e um indutor, L . Este ramo está diretamente relacionado com as propriedades físicas do ressonador e o meio em que está em contato. De um ponto de vista físico, C está relacionado à elasticidade do sistema; R corresponde à perda total de energia mecânica, por exemplo, devido à viscosidade do líquido ou a propriedades viscosas da camada que está em contato ou aderida à superfície; L pode estar ligado à adição de massa acoplada.

No ramo estático encontramos um capacitor em C_0 que está relacionado com a capacitância estática, devido aos eletrodos depositados em ambas as faces do cristal de

quartzo. Neste caso, o cristal de quartzo é o dielétrico e os eletrodos, duas placas paralelas, e assim o conjunto pode ser considerado um capacitor com propriedades adicionais.

Figura 1.5.3. A) Circuito equivalente representando o cristal de quartzo, dividido em ramo dinâmico e ramo estático. Os parâmetros C_1 , L , R e C_0 representam as propriedades viscoelásticas, massa rígida aderida, perdas mecânicas e a capacitância do cristal, respectivamente. B) Analogia entre o ramo dinâmico do circuito equivalente e as propriedades mecânicas de um oscilador constituído de mola, massa e um amortecedor.

1.5.3. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DA NANO(MICRO)BALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO

Finalmente podemos descrever os princípios de operação da microbalança de cristal de quartzo. É preciso tomar cuidado com o nome, pois na verdade o que se pode medir é variação de massa na ordem de nanogramas e, portanto, na literatura ainda se tem alguns problemas quanto a definição do nome da técnica. A microbalança de cristal de quartzo (ou QCM, do inglês: Quartz Crystal Microbalance) é uma técnica eletrogravimétrica utilizada para o monitoramento das mudanças ocorridas na superfície de um transdutor piezelétrico, que após a imobilização de um material biológico, com o objetivo de se estudar afinidades biológicas e outros fenômenos, pode ser considerado um dispositivo biossensor ou sensor. A técnica de microbalança de cristal de quartzo foi pioneiramente descrita por Sauerbrey (38)

que propôs um modelo para a relação entre a variação de frequência do transdutor de quartzo e a massa depositada sobre o mesmo (Eq. 1):

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2 \Delta m_f}{A\sqrt{\mu_q \rho_q}} = -C_f \Delta m_f, \quad (1)$$

em que Δf é a variação de frequência; f_0 é a frequência fundamental de oscilação do cristal de quartzo, Δm_f é a variação de massa; A é a área ativa do cristal de quartzo; μ_q o modo de cisalhamento do quartzo e ρ_q a densidade de massa do quartzo. A Eq. 1 mostra que todos os parâmetros descritos podem ser considerados constantes (C_f) e, portanto, há uma relação direta entre Δf e uma quantidade de massa Δm_f aderida ao cristal de quartzo. O sinal negativo é devido ao fato de que um decréscimo na frequência está relacionado com uma variação na massa, devido ao aumento da espessura do cristal. Esta equação é válida dentro de alguns limites específicos, tais como, o filme depositado ou a massa aderida seja rígido e não haja efeitos de viscoelasticidade presentes. Este é um inconveniente muito grande quando se deseja trabalhar com materiais biológicos, pois a massa depositada, devido à própria natureza das moléculas, dificilmente é rígida.

O princípio de funcionamento de uma QCM consiste no monitoramento da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função da massa aderida (rígida ou viscosa). Quando há deposição de massa sobre o cristal ou quando mudamos o meio onde ele se encontra, ocorre uma variação na frequência de oscilação do cristal de quartzo (Buttry⁴, 1991 *apud* Faria, 2000, p. 14 (37)). Desta forma, de fundamental importância para o funcionamento de uma QCM é o sistema que irá promover a oscilação do cristal. Há três formas distintas de se promover a oscilação de um cristal de quartzo: excitação transiente, por meio de um circuito

⁴ BUTTRY, D.A., in *Electroanalytical Chemistry: A series of advances*, A.J. BARD, Editor. 1991, Marcel Dekker: New York. p. 1-85

oscilador e análise de resposta de admitância ou impedância do sinal gerado no transdutor (37).

A excitação por pulso transiente consiste em aplicar um pulso de frequência idêntica à oscilação do cristal de quartzo. O pulso faz com que o cristal oscile devido apenas às propriedades mecânicas de ressonância do quartzo. Deste modo, após a excitação a amplitude da frequência decai até cessar a oscilação e o sinal ou onda decrescente é analisada. A vantagem é que não há perturbação da fonte de emissão do pulso sobre a oscilação do cristal de quartzo, por outro lado, este método apresenta algumas desvantagens: na prática é muito difícil de se conseguir um pulso de excitação ideal, além de que o decaimento da frequência é muito acentuado quando a adesão da massa é demasiadamente elástica e rígida sobre o cristal de quartzo, dificultando a medida da variação de frequência e sua interpretação.

Na abordagem de circuito oscilador utiliza-se um circuito eletrônico que faz o cristal de quartzo oscilar na frequência fundamental. Neste método o cristal de quartzo é um componente ativo no sistema, pois ele é o responsável pela frequência de oscilação do circuito. É o método mais usual devido ao seu baixo custo. A maioria das QCMs são baseadas neste princípio de funcionamento e geralmente a informação é analisada qualitativamente, pois os problemas inerentes a viscoelasticidade não podem ser removidos. Geralmente as informações geradas podem ser utilizadas quantitativamente desde que a espessura da camada aderida possa ser assegurada como sendo rígida, fina e no vácuo (37).

Na análise da resposta de admitância ou impedância aplica-se ao cristal um potencial alternado com um determinado intervalo de frequência e avalia-se a resposta da admitância ou impedância do sistema. Com este método, podem ser extraídas informações sobre as alterações de vários parâmetros elétricos do cristal de quartzo (é uma das análises mais completas). É um método que fornece o maior número de informações, permitindo a separação da contribuição viscosa e sua separação da massa rígida ou real (37). Porém, este

método não é muito utilizado devido ao seu alto custo e dificuldade de uma análise direta, sendo necessária uma cuidadosa análise dos parâmetros para se extrair as informações desejadas.

1.5.4. QCM-D (MICROBALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO COM MONITORAMENTO DA DISSIPACÃO)

Uma abordagem bastante útil tem sido aquela baseada na combinação das técnicas transientes e circuito oscilador, permitindo a obtenção de mais informações sobre o sistema. Esta modalidade de QCM tem sido conhecida como QCM-D. A QCM-D permite um estudo da variação da massa na superfície do cristal por meio tradicional, assim como um estudo da contribuição da viscoelasticidade por meio do monitoramento do fator D (39). Esta técnica tem sido aplicada no estudo da formação de filmes finos, tais como polímeros (40), proteínas (41) e células, em meio líquido (39). O fator D é dado por:

$$D = \frac{2}{\omega\tau}, \quad \omega = 2\pi f \quad (2)$$

Onde f é a frequência de oscilação do cristal e τ é o fator de amortecimento da equação da diferença de potencial do circuito equivalente do cristal de quartzo (Eq. 3):

$$V(t) = Ae^{-\frac{t}{\tau}} \cos(\omega t + \phi); \quad \tau = \frac{2L}{R}. \quad (3)$$

Deste modo, o fator D em função dos parâmetros do circuito equivalente é dado por:

$$D = \frac{2}{\frac{1}{\sqrt{LC}} \frac{2L}{R}} = R\sqrt{\frac{C}{L}}. \quad (4)$$

Analisando-se a Eq. (4) vê-se que é uma medida das contribuições ou razão das perdas mecânicas (R) e viscosas do sistema (C) em função da massa rígida ou armazenamento (L).

1.5.5. IMPEDÂNCIA / ADMITÂNCIA ELETROACÚSTICA

Como já comentado, freqüentemente tem sido observada uma discrepância entre a massa estimada do desvio de freqüência da QCM através da equação de Saurbrey (Eq. 1) e a massa medida real depositada (42, 43) . Para entender melhor as respostas na detecção de biomoléculas, alguns autores têm proposto o uso de medidas de admitância eletroacústica da massa depositada no cristal de quartzo (44), visto que a técnica de admitância ou impedância eletroacústica fornece a possibilidade de um estudo mais detalhado, podendo-se extrair informações mais relevantes dos parâmetros físicos do circuito equivalente do cristal de quartzo, de maneira a separar as diferentes contribuições. Devido a este estudo minucioso promovido pela técnica de Admitância Eletroacústica (AE) é possível verificar a contribuição da massa real para a variação de freqüência mesmo quando estão presentes outros efeitos, por exemplo, grande contribuição viscoelástica e perda mecânica.

A análise dos parâmetros físicos é feita através do cálculo da admitância do circuito equivalente (Figura 1.5.3.A). Para calcularmos a admitância do circuito equivalente, define-se as impedâncias ou a admitância (que é o inverso da impedância) de cada um dos elementos, conforme descrição abaixo:

$$Z_R = R, \quad (5)$$

$$Z_C = \frac{1}{i\omega C}, \quad (6)$$

$$Z_L = i\omega L, \quad (7)$$

$$Z_{C_0} = \frac{1}{i\omega C_0}. \quad (8)$$

Nestas equações Z_R , Z_C , Z_L e Z_{C_0} são as impedâncias do resistor, do capacitor, do indutor e da capacitância paralela do circuito equivalente, respectivamente.

Como a admitância é o inverso da impedância, podemos calcular a admitância pela seguinte relação:

$$Y = \frac{1}{Z_{eq}} = \frac{1}{Z_R + Z_C + Z_L} + \frac{1}{Z_{C_0}}. \quad (9)$$

Em que na Eq. 9 Z_{eq} representa a impedância equivalente de todo o ramo dinâmico e estático do sistema.

Substituindo as Eqs. 5, 6, 7 e 8 na Eq. 9 e efetuando-se a álgebra necessária, obtém-se:

$$Y = \frac{1}{R + i\omega L + \frac{1}{i\omega C}} + i\omega C_0. \quad (10)$$

Separando a Eq. 10 em suas respectivas partes real e parte imaginária, obtém-se a condutância, G , e a susceptância, B , do circuito equivalente:

$$G = \text{Re}(Y) = \frac{R}{R^2 + \left(\omega L - \frac{1}{\omega C}\right)^2}, \quad (11)$$

$$B = \text{Im}(Y) = \omega C_0 - \frac{\left(\omega L - \frac{1}{\omega C}\right)}{R^2 + \left(\omega L - \frac{1}{\omega C}\right)^2}. \quad (12)$$

Rearranjando-se as Eqs. 11 e 12 e elevando ao quadrado, obtém-se,

$$G^2 = \frac{R^2}{\left(R^2 + \left(\omega L - \frac{1}{\omega C}\right)^2\right)^2}, \quad (13)$$

$$(B - \omega C_0)^2 = \frac{\left(\omega L - \frac{1}{\omega C}\right)^2}{\left(R^2 + \left(\omega L - \frac{1}{\omega C}\right)^2\right)^2}. \quad (14)$$

A soma das Eqs. 13 e 14 conduz a:

$$G^2 + (B - \omega C_0)^2 = \frac{R^2}{\left(R^2 + \left(\omega L - \frac{1}{\omega C}\right)^2\right)^2} + \frac{\left(\omega L - \frac{1}{\omega C}\right)^2}{\left(R^2 + \left(\omega L - \frac{1}{\omega C}\right)^2\right)^2}, \quad (15)$$

$$G^2 + (B - \omega C_0)^2 = \frac{1}{R^2 + \left(\omega L - \frac{1}{\omega C}\right)^2}. \quad (16)$$

Da Eq. 11 concluir-se que

$$\frac{G}{R} = \frac{1}{R^2 + \left(\omega L - \frac{1}{\omega C}\right)^2}. \quad (17)$$

Substituindo a Eq. 17 na Eq. 16 obtém-se

$$(B - \omega C_0)^2 + G^2 - \frac{G}{R} = 0, \quad (18)$$

e finalmente:

$$(B - \omega C_0)^2 + G^2 - \frac{G}{R} + \left(\frac{1}{2R}\right)^2 - \left(\frac{1}{2R}\right)^2 = 0, \quad (19)$$

$$(B - \omega_s C_0)^2 + \left(G - \frac{1}{2R}\right)^2 = \left(\frac{1}{2R}\right)^2. \quad (20)$$

Pode-se representar a Eq. 20 no plano cartesiano como uma circunferência de raio $\left(\frac{1}{2R}\right)$, centrada no ponto $\left(\frac{1}{2R}, \omega_s C_0\right)$, em que ω_s é a frequência de ressonância do cristal de quartzo. Pode-se ainda observar que conforme a frequência ω aumenta, a circunferência é traçada no sentido horário; se a capacitância em paralelo C_0 é alterada, o centro da circunferência é deslocado sobre a ordenada e uma alteração em R causa um deslocamento sobre o eixo real. Analisando-se a Eq. (19), pode-se observar que a circunferência é tangente ao eixo imaginário.

O valor máximo para a condutância $\left(G = \frac{1}{R}\right)$, ocorre quando $L\omega = \frac{1}{\omega C}$, ou seja, quando $\omega = \frac{1}{\sqrt{LC}} = 2\pi f$ que é justamente a frequência em série. Na frequência de ressonância $B = \omega_s C_0$ (Eq. 20).

A influência dos parâmetros R , L , C e C_0 na curva de admitância é ilustrada com simulações em que varia-se cada um destes parâmetros individualmente ou em pares. Desta forma, pode-se verificar que um aumento no parâmetro R (resistência) faz com que o pico da curva de condutância seja menor e as diferenças entre os picos (positivo e negativo) da susceptância também seja menor (Figura 1.5.4). Os parâmetros iniciais utilizados em todos os gráficos são: $R = 1480 \Omega$; $L = 0,2533 \text{ H}$; $C = 1,0 \cdot 10^{-17} \text{ F}$ e $C_0 = 9.7 \cdot 10^{-13} \text{ F}$.

Figura 1.5.4. Comparação entre as curvas de admitância quando o parâmetro R é aumentado para 2000Ω .

Quando varia-se o parâmetro L ou C , ocorre um deslocamento das curvas de admitância e susceptância (Figuras 1.5.5 e 1.5.6). Já uma a variação de R juntamente com uma variação de L ou C provoca um deslocamento de frequência e uma diminuição do pico de admitância. Neste caso, observa-se também uma menor diferença entre o máximo e mínimo da curva de susceptância, ou seja, como se os efeitos de cada parâmetro fossem somados. Porém a inclinação entre o máximo e o mínimo da susceptância é maior quando há variação de R com L (Figuras 1.5.7 e 1.5.8). Pode-se perceber também que uma variação em L ou em C provoca um deslocamento maior na frequência quando comparado com a variação em apenas um dos parâmetros, pois ambos os fatores afetam o deslocamento de frequência.

Figura 1.5.5. Comparação entre as curvas de admitância quando o parâmetro L é aumentado para 0,2534 H.

Figura 1.5.6. Comparação entre as curvas de admitância quando o parâmetro C é aumentado para $1,0 \cdot 10^{-15}$ F.

Figura 1.5.7. Comparação entre as curvas de admitância quando os parâmetros R e L são aumentados para $2000\ \Omega$ e $0,2534\ \text{H}$, respectivamente.

Figura 1.5.8. Comparação entre as curvas de admitância quando os parâmetros R e C são aumentados para $2000\ \Omega$ e $1,0\ 10^{-15}\ \text{F}$, respectivamente.

Figura 1.5.9. Comparação entre as curvas de admitância quando o parâmetro C é aumentado para $3,167 \cdot 10^{-15}$ e o parâmetro L sofre um decréscimo para $0,08$ H.

É interessante realizar o caminho inverso ao descrito acima, ou seja, partir dos gráficos de admitância para extrair os parâmetros do circuito equivalente por meio de cálculos e ajustes. Da Eq. 11 pode-se verificar que na frequência de oscilação do cristal de quartzo pode-se obter:

$$R = \frac{1}{G_r} \quad (21)$$

onde o índice r caracteriza a frequência de oscilação, e também o valor de pico da condutância.

Na frequência de oscilação do cristal de quartzo nota-se que a partir da Eq. 12 é possível extrair o parâmetro C_0 :

$$C_0 = \left| \frac{B_r}{\omega_r} \right|. \quad (22)$$

O parâmetro L pode ser extraído utilizando-se um ponto da curva de admitância, exceto o ponto onde ocorre a frequência de ressonância. Deste modo, a indutância pode ser encontrada a partir da seguinte relação:

$$L = \frac{\omega_Q}{|\omega_Q - \omega_r|} \sqrt{\frac{R}{G_Q} - R^2} \quad (23)$$

Finalmente, o parâmetro C pode ser encontrado utilizando a seguinte equação:

$$C = \frac{1}{L\omega_r^2} \quad (24)$$

Estes parâmetros calculados podem ser utilizados como valores iniciais (“chute”) para realizar um ajuste pelo método de Levenberg-Marquardt do programa Mathcad 12.0 , visando uma maior precisão no cálculo dos parâmetros.

Uma vez que se encontram todos os parâmetros para a curva de admitância, é possível calcular outros parâmetros importantes para o estudo do filme formado sobre a superfície do cristal de quartzo, tais como a frequência de oscilação do cristal e o fator D . Ou seja, de fato a técnica se mostra a mais completa entre todas as utilizadas para monitorar variação de massa a partir da resposta de frequência de um transdutor piezelétrico. O fator D é aquele obtido pela técnica de QCM-D. Com a técnica de admitância eletroacústica é possível extrair o fator D de um modo um pouco distinto daquele utilizado na técnica de QCM-D. Pelo uso da técnica de AE utiliza-se a análise de energia e sua relação com os parâmetros do circuito. Ou seja, a relação entre a energia dissipada (E_d) e a energia armazenada (E_a) e os parâmetros do circuito são dados pela Eq. 25:

$$D = \frac{E_d}{2\pi E_a} = \frac{R}{\omega L} = R \sqrt{\frac{C}{L}} \quad (25)$$

A técnica de AE pode ser aplicada para se estudar os parâmetros obtidos pela QCM-D, com a vantagem de poder analisar qual o parâmetro que está influenciando o fator D separadamente.

Assim, este trabalho tem como objetivo utilizar a técnica de Admitância Eletroacústica (AE) para o estudo de formação de monocamadas automontadas, multicamadas com proteína imobilizada e a interação da proteína imobilizada com açúcares.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.1. INSTRUMENTAÇÃO

2.1.1. CRISTAIS DE QUARTZO

Os cristais de quartzo utilizados neste trabalho foram os de corte AT com frequência fundamental de 10 MHz, diâmetro de 16 mm, e 290 μm de espessura, contendo eletrodos de ouro concêntricos de 5 mm de diâmetro em ambos os lados. Para promover a oscilação do cristal de quartzo os eletrodos de Au foram presos mecanicamente em contatos metálicos tal como ilustrado na Figura 2.1.1.

Figura 2.1.1 – Foto ilustrativa do cristal de quartzo de 10 MHz com contatos metálicos.

Após esta etapa, o conjunto, suporte com contato e cristal de quartzo foram inseridos em uma célula de medida confeccionada em TEFLON[®], sendo utilizados anéis (“O-Rings”) de silicone em ambos os lados para a vedação. Detalhes são mostrados na Figura 2.1.2.

Figura 2.1.2 – A) Cristal de quartzo e a célula de TEFLON[®] e B) cristal inserido na célula.

2.1.2. MICROBALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO

Alguns estudos foram realizados pela utilização de uma microbalança de cristal de quartzo utilizando um circuito oscilador. A QCM utilizada é totalmente caseira e para tanto

foram utilizados um freqüencímetro de marca Hewlett-Packard modelo 53131 A para o monitoramento da freqüência de oscilação do cristal, um circuito oscilador que foi desenvolvido pelo Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria do grupo de pesquisa do Laboratório de Química Analítica da Universidade Federal de São Carlos (37) e um computador para a aquisição de dados. O conjunto está descrito na Figura 2.1.3. Porém, em alguns casos específicos utilizou-se uma microbalança comercial: Elchema modelo 601.

Figura 2.1.3 – Foto ilustrativa da Microbalança de Cristal de Quartzo.

2.1.3. ADMITÂNCIA/IMPEDÂNCIA ELETROACÚSTICA

As medidas de admitância eletroacústica foram realizadas em um analisador de resposta em freqüência de precisão da Agilent modelo 4294 A. Este equipamento é um analisador de resposta em freqüência com capacidade de varredura em freqüência de 40 Hz a 110 MHz e precisão na impedância de $\pm 0,8 \%$ e 1 mHz na freqüência. (Figura 2.1.4).

O analisador de resposta em freqüência (ou impedância) para os estudos realizados foi ajustado da seguinte maneira: medida de $G-B$ (condutância e susceptância que são as partes real e imaginária da admitância, respectivamente); 801 pontos de aquisição que é justamente o máximo de pontos fornecidos pelo equipamento e desta forma alcança-se uma maior precisão na medida; calibrações para subtrair a impedância/ admitância do sistema (contato e cabos), sendo que esta calibração é feita da seguinte maneira: com o circuito aberto e em curto. Após

esses ajustes media-se a admitância do cristal inserido no contato metálico e o conjunto inserido na célula para encontrar a frequência de oscilação do cristal com o objetivo de escolher o melhor intervalo de frequência a ser estudado. Após isso, ajustava-se a frequência de oscilação do cristal como centro e utilizou-se 20 kHz como diferença entre o mínimo e o máximo de frequência que seria varrido pelo equipamento.

Figura 2.1.4 – Analisador de impedância de precisão Agilent modelo 4294 A.

2.2. MATERIAIS: REAGENTES E SOLUÇÕES

Para a construção das monocamadas foi utilizada uma solução estoque de cistamina (Sigma Chemical Co., EUA) com concentração de 0,5 M e solução de glutaraldeído adquirido da Merck, Alemanha com concentração de 25% v/v.

A jacalina (*Artocarpus integrifolia*), uma das proteínas estudada neste trabalho, foi fornecida pelo Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto coordenado pela Profa. Dra. Maria Cristina Roque-Barreira. Os analitos utilizados para o

estudo da interação com a jacalina foram a α -lactose (carboidrato) e a fetuína, um glicoconjugado, ambos da Sigma Chemical Co., USA.

Para o estudo da atividade da enzima GumH, tanto a enzima como o poliprenol foram fornecidos pela Cláudia Alves, aluna de doutorado do Grupo de Cristalografia do Departamento de Física de Informática do Instituto de Física de São Carlos – USP. O 1-undecanotiol utilizado para a modificação do cristal de quartzo, foi adquirido da Sigma-Aldrich, EUA.

Em todos os casos, para a limpeza dos eletrodos do cristal de quartzo foi utilizada uma solução “piranha” ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$; 7:3) recém-preparada, cujos componentes (H_2SO_4 e H_2O_2) foram adquiridas da Labsynth, Brasil.

2.3. ESTRATÉGIA DE IMOBILIZAÇÃO DA JACALINA

O processo de limpeza consistiu em limpar as superfícies dos cristais de quartzo e o eletrodo de Au, em especial, com uma solução “piranha” recém-preparada. Depois se procedia com lavagens com água destilada e secagem ao ar. Depois que o cristal era limpo e seco era inserido mecanicamente nos contatos metálicos e então o cristal juntamente com o contato metálico era inserido na célula de TEFLON[®], de modo que uma das faces do cristal ficava exposta ao ar, enquanto a outra ficava exposta ao meio de estudo, geralmente uma solução aquosa onde os experimentos eram efetivamente realizados. No processo de imobilização da jacalina, antes era formada uma bicamada composta por cistamina e glutaraldeído. A jacalina era imobilizada em solução tampão fosfato pH 7,0 e posterior estudo da sua afinidade com analitos específicos.

2.3.1. FORMAÇÃO DAS MONOCAMADAS AUTOMONTADAS DE CISTAMINA

Para a formação da monocamada de cistamina eram adicionados 2 mL de água destilada ou deionizada e esperava-se cerca de 30 min para a estabilização do sistema cristal –

solução aquosa e então adicionava-se 60 μL da solução estoque de cistamina, fazendo com que a concentração de cistamina na célula fosse de 15 mM. Nesta etapa o tempo esperado para a formação da monocamada foi de aproximadamente 30 min. Após a formação do filme de cistamina, a célula era lavada com água para eliminar os excesso de cistamina na célula e com isto evitar que tais moléculas se ligassem ao glutaraldeído a ser adicionado na etapa seguinte.

O passo seguinte da preparação da superfície do cristal de quartzo é a formação da monocamada de glutaraldeído que funciona como um espaçador entre a cistamina e a lectina (jacalina), formando uma bicamada. Novamente adicionava-se 2 mL de água na célula, esperava-se os mesmos 30 min para a estabilização e adicionava-se 500 μL da solução de glutaraldeído, fazendo-se com que a concentração de glutaraldeído na célula fosse de 5% v/v.

2.3.1.1. ESTUDO DA CISTAMINA COM DIVERSAS CONCENTRAÇÕES

Foram utilizadas diversas concentrações, variando de 1 a 20 mM (concentração final na célula com água) de cistamina. Foi utilizado o mesmo cristal para essas concentrações (1 mM; 2,5 mM; 5 mM; 7,5 mM; 10 mM; 12,5 mM; 15 mM; 17,5 mM e 20 mM), sendo que após cada procedimento, como descrito no item 2.3.1, o cristal era lavado com solução “piranha” para eliminar toda a monocamada de cistamina. Esta etapa teve por finalidade estudar em detalhes a formação da monocamada de cistamina.

2.3.2. IMOBILIZAÇÃO DA JACALINA

Sobre o cristal de quartzo modificado pela bicamada formada pela cistamina e pelo glutaraldeído foi imobilizada a jacalina, pois se sabe que o glutaraldeído, que aqui foi utilizado como um espaçador entre a monocamada de cistamina e a lectina, realiza uma ligação covalente cruzada, entre os grupos aldeído e amina por meio de uma ligação do tipo

base de Schiff, onde é formada uma imina. Em outras palavras, o glutaraldeído é capaz de se ligar com a cistamina.

Para a imobilização da jacalina foram adicionados 2 mL de solução tampão fosfato pH 7,0 na célula de TEFLON[®] sobre o sistema ouro-cistamina-glutaraldeído. Após isso, esperou-se a estabilização do sistema e então uma alíquota de jacalina foi adicionada na célula e o tempo esperado foi de pelo menos uma hora para se assegurar a imobilização da mesma. Na imobilização da jacalina é formada outra imina, devido à ligação do grupo aldeído do glutaraldeído e o grupo amida da jacalina (Figura 2.3.1).

Figura 2.3.1. – Imobilização da jacalina (proteína) por meio de ligações do tipo base de Schiff entre os grupos aldeído (do glutaraldeído) e amina (da cistamina e da jacalina), onde são formadas duas iminas.

2.3.3. ESTUDO DA AFINIDADE JACALINA-CARBOIDRATO

Com a jacalina imobilizada sobre o cristal modificado foram adicionados 2 mL de solução tampão fosfato de pH 7,0 na célula. Novamente foi aguardado o tempo de estabilização para adicionar a alíquota de glicoconjugado α -lactose ou de fetuína. O tempo esperado para o estudo da afinidade foi superior à uma hora, como no caso da imobilização da jacalina.

2.4. TESTE DA ATIVIDADE DA ENZIMA GumH

No caso do teste de afinidade da enzima GumH, o tiol utilizado para a modificação do eletrodo de cristal de quartzo foi o undecanotiol. Este tiol foi imobilizado durante aproximadamente 10 horas, em um béquer contendo água e clorofórmio. O béquer foi lacrado

com parafilme e colocado na geladeira para evitar a evaporação do clorofórmio. No dia seguinte o cristal foi lavado com água e inserido na célula de TEFLON[®]. Após isso foi adicionado 2 mL de água e 100 µL de clorofórmio. Esperou-se a estabilização do sistema e adicionou-se o prenol. O prenol foi imobilizado durante um tempo superior a 16 horas. Após a imobilização do prenol o cristal foi lavado com solução tampão. A seguir foram adicionados 2 mL de solução tampão na célula, esperando-se um tempo de estabilização para se adicionar a GumH. Após 30 min, sem lavar a célula e o cristal, foi adicionado o complexo GDP-manose. Depois de 30 minutos foi adicionado o sal MgCl₂ (cloreto de magnésio), pois a GumH é uma metaloenzima (metaloproteína), ou seja, é necessário a presença de íons metálicos que a GumH seja ativa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. CONSTRUÇÃO DAS CAMADAS AUTOMONTADAS

O estudo utilizando a técnica de AE é feito através de medidas em estado estacionário e de maneira comparativa, ou seja, para analisar a ocorrência de uma reação e/ou mudanças ocorridas na superfície do cristal de quartzo deve-se medir a admitância do cristal antes e depois de adicionarmos alguma substância ou mesmo quando se altera o meio onde o cristal se encontra. Deste modo, a primeira medida de admitância que realizamos foi a do cristal seco inserido na célula de TEFLON[®] de forma que uma face do cristal se encontrasse em meio aquoso enquanto a outra face devia estar em contato com o ar (Figura 3.1.1). Na Figura. 3.1.1 estão representadas as curvas de admitância obtida experimentalmente e a curva obtida pelo ajuste mediante o uso do algoritmo de Levenberg-Marquardt (44, 45) para circuito equivalente representativo tradicional do cristal de quartzo (Introdução, Figura 1.5.3A). Os valores para os parâmetros do cristal de quartzo encontrados foram comparados com o estudo relatado por Calvo utilizando um cristal de quartzo seco inserido no compartimento da célula ((45), Tabela 3.1.I).

Tabela 3.1.I – Comparação dos parâmetros obtidos por este estudo e por Calvo (45) para o cristal de quartzo seco medido na célula.

	R (Ω)	L (mH)	C (fF)	C_o (pF)
Este estudo	40	7,7	33	6,1
Calvo	40	8,5	30	5,0

Vê-se que os valores obtidos neste estudo e aqueles encontrados no trabalho de Calvo são bastante similares e as diferenças são esperadas dentro do erro experimental e das diferenças mecânicas entre nossa célula e aquela utilizada por Calvo. É importante mencionar que a montagem do cristal na célula pode influenciar os valores principalmente se influenciarem o movimento de cisalhamento. Em outras palavras, o ajuste do cristal à célula

pode ser a razão das diferenças observadas na Tabela 3.1.I. No entanto, de maneira geral, as diferenças são aceitáveis.

Figura 3.1.1 – Curva de admitância para o cristal de quartzo de 10 MHz seco e inserido na célula de TEFLON[®]. Os dados experimentais são representados por traços (□) e o ajuste utilizando o método de Levenberg-Marquardt pela linha contínua.

Com o cristal montado na célula foram, adicionados 2 mL de água destilada e extraída a curva de admitância eletroacústica após essa inserção. Antes de se adicionar a cistamina para a formação da monocamada resultante da interação da superfície de ouro com tal substância, esperou-se 10 minutos para a estabilização da frequência do cristal. Acredita-se que o tempo de estabilização é o tempo necessário para que as moléculas de água cubram toda a superfície do cristal, incluindo o preenchimento das rugosidades (46) e também para que a frequência do mesmo entre, então, em equilíbrio. Com o sistema estabilizado adicionou-se a cistamina de modo que a concentração da mesma na célula fosse de 15 mM e então, esperou-se o tempo necessário para a ocorrência da reação entre as moléculas de cistamina e o eletrodo ouro que se encontra na superfície do cristal. Após isso adquiriu-se a curva de admitância eletroacústica (Figura 3.1.2) e realizou-se a análise da resposta.

Figura 3.1.2 – Curvas de admitância eletroacústica para célula contendo água, 20 min após a adição de cistamina e depois da lavagem da célula.

As curvas foram submetidas a ajustes com o intuito de extrair os parâmetros do circuito equivalente (Tabela 3.1.II), lembrando que os principais parâmetros a serem estudados são aqueles que compõem o ramo dinâmico, ou seja, R , L e C em série. Estes parâmetros são importantes, pois mediante eles é possível calcular outros parâmetros igualmente importantes como a frequência em série, que depende somente dos parâmetros L e C , cuja relação é $f_{série} = \frac{1}{2\pi\sqrt{LC}}$ e o fator D que pode ser comparado com resultados obtidos por outra técnica conhecida como QCM-D (ver introdução), sendo que a importância do fator D está no fato de fornecer um estudo da viscoelasticidade do filme montado (ou imobilizado) sobre a superfície do cristal de quartzo.

Na Tabela 3.1.II pode-se observar uma variação em todos os parâmetros, R , L , C , fator D e $f_{série}$, sendo que a variação na frequência indica que houve uma reação, enquanto os outros parâmetros fornecem informações detalhadas sobre a monocamada. A monocamada automontada de cistamina mostrou-se viscoelástica, devido ao acréscimo nos parâmetros C e

R e o decréscimo no parâmetro L , o que leva a um aumento no fator D . Supõe-se que o aumento no parâmetro C indica a ocorrência de uma deposição de “massa elástica” ou com perda viscosa, enquanto o aumento no parâmetro L indica um aumento na deposição de massa rígida (pelo modelo de Sauerbrey a variação em L seria a variação de massa do quartzo ou o valor de massa real depositada). Esta suposição se apóia no fato do ramo dinâmico do circuito equivalente possuir um análogo ao sistema mecânico (Introdução, Figura 1.5.3B), em que a indutância L , a capacitância C e a resistência R estão relacionadas respectivamente com a massa, a mola e o amortecedor.

Tabela 3.1.II – Parâmetros do circuito equivalente extraídos da curva de admitância para o cristal inserido na célula contendo água e após a formação da monocamada de cistamina.

	R (Ω)	L (mH)	C (fF)	Fator D (10^{-4})	$\Delta f_{\text{série}}$ (Hz)
Cristal com água	392	13,50	18,85	4,63	0
Cistamina	408	13,28	19,17	4,90	-190
Após lavagem	394	13,49	18,86	4,66	-30

Após a imobilização da cistamina o cristal é lavado dentro da própria célula com água destilada; o conteúdo da célula é descartado e em seguida esta é enxaguada duas vezes. Este procedimento é necessário para a retirada do possível excesso de cistamina e para evitar que o glutaraldeído adicionado em seguida não interaja com a cistamina que não foi imobilizada ou ligada ao eletrodo. Observa-se na Tabela 3.1.II que há um aumento substancial do parâmetro D após a adição da cistamina. Contudo, após lavagem o valor do parâmetro D volta a diminuir para níveis similares aos iniciais. Isso significa que há uma massa adsorvida antes da lavagem que não se liga diretamente ao Au e causa um aumento da perda. Poderia-se dizer que a parte da cistamina aderida neste caso estaria sofrendo interação eletrostática somente, sem formação de ligação covalente específica. Após a lavagem, somente a monocamada

automontada de cistamina que realiza ligação covalente contribui para a variação da frequência, neste caso, com um valor ao redor de 30 Hz. Como o fator de perda é pequeno neste caso, poderíamos dizer ainda que há uma variação de massa de mais ou menos 26,2 ng, de acordo com a equação de Sauerbrey (Eq. 1).

Novamente adicionou-se 2 mL de água na célula e esperou-se até que o sistema entrasse novamente em equilíbrio. Após a estabilização foram adicionados 500 μ L de glutaraldeído (solução estoque 25% v/v) de modo que a concentração na célula fosse de 5%. Depois de um determinado tempo foi notado através de medidas de AE que houve a reação entre a cistamina e o glutaraldeído. Sabe-se que na reação entre estas substâncias ocorre uma ligação do tipo base de Schiff, devido à interação entre os grupos amina da cistamina e o aldeído do glutaraldeído (47).

Figura 3.1.3 – Curvas de admitância eletroacústica para o estudo da imobilização da monocamada de glutaraldeído sobre o cristal de quartzo modificado com a monocamada automontada de cistamina.

Os dados da Figura 3.1.3 foram submetidos a ajustes dos quais puderam ser obtidos os parâmetros do circuito equivalente (Tabela 3.1.III).

Tabela 3.1.III – Parâmetros do circuito equivalente extraídos da curva de admitância para o cristal de quartzo modificado com cistamina para o estudo da formação da monocamada de glutaraldeído.

	$R (\Omega)$	$L (\text{mH})$	$C (\text{fF})$	Fator $D (10^{-4})$	$\Delta f_{\text{série}} (\text{Hz})$
Água	240	7,14	35,65	5,36	0
Glutaraldeído	314	7,18	35,46	6,98	-820
Após lavagem	246	7,12	35,73	5,51	-240

De acordo com os resultados obtidos, a monocamada de glutaraldeído também se mostrou viscoelástica, porém esta monocamada apresenta uma menor queda no valor da indutância. A discussão realizada anteriormente para a cistamina aplica-se também a imobilização do glutaraldeído. Além disso, pode-se observar que a adição de glutaraldeído causa um grande deslocamento na frequência de oscilação do cristal de quartzo, 820 Hz, porém, após a lavagem do cristal o decréscimo na frequência é menor, 240 Hz, indicando que apenas uma parte do glutaraldeído adicionado se liga devido à interação química com a cistamina. Enquanto isso, o restante se liga fracamente, provavelmente por interações físicas (eletrostática) sendo eliminado após a lavagem. Comparativamente ao que se observa para a formação da cistamina, pode-se notar que há um aumento do fator D mesmo após lavagem. Isso significa que há uma perda ainda grande por viscoelasticidade e isso se deve ao fato do glutaraldeído ser uma molécula muito maior que a molécula de cistamina. Físico-quimicamente pode-se dizer que os resultados são coerentes.

Além disso, durante o estudo da formação da monocamada (formação da monocamada de glutaraldeído sobre a superfície de ouro modificado com cistamina) utilizando a microbalança de cristal de quartzo foi notado que a adição do glutaraldeído provoca um grande deslocamento na frequência de oscilação, mas após alguns segundos a variação de

freqüência diminui, estabilizando um pouco acima da freqüência apresentada após a adição do glutaraldeído (Figura 3.1.4).

Figura 3.1.4 – Estudo da formação da bicamada, imobilização do glutaraldeído sobre o eletrodo de ouro modificado com cistamina, utilizando a microbalança de cristal de quartzo.

O decréscimo na freqüência de oscilação do cristal causado pela adição do glutaraldeído, como pode ser visto na Figura 3.1.4, foi em torno de 1300 Hz. Contudo, após cinco minutos da adição do glutaraldeído a diferença diminui para aproximadamente 600 Hz. Baseado nestas informações foi realizado um estudo para analisar o comportamento do fator D na região em destaque na Figura 3.1.4. A adição do glutaraldeído faz com que o fator D aumente e passados 5 min da adição desta molécula o fator D e a freqüência se estabilizam, de modo que a freqüência alcança um patamar maior enquanto o fator D sofre um decréscimo (Figura 3.1.5).

Figura 3.1.5 – Estudo da variação da frequência e do fator D (dissipação) utilizando a técnica de admitância eletroacústica para a formação da monocamada de glutaraldeído.

Pode-se observar que durante os 5 min após a adição de glutaraldeído o fator D diminui, indicando que a viscoelasticidade da bicamada diminui e conseqüentemente ocorre um maior “arranjo” entre as moléculas fazendo com que o filme se torne mais compacto, ou seja, rígido. Aqui fica demonstrado a capacidade da técnica de monitorar a formação e o rearranjo de camadas moleculares sobre superfície de ouro ou outros tipos de superfície.

3.2. CONCENTRAÇÃO ÓTIMA PARA A CISTAMINA

3.2.1. MICROBALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO (QCM)

No estudo para definir a melhor concentração para ser trabalhada com a cistamina foram realizadas três medidas para cada concentração utilizando o mesmo cristal, sendo que após cada medida o cristal foi lavado com uma solução “piranha”, tal como descrito anteriormente na seção de procedimento experimental (seção 2). Para este estudo foi utilizada a microbalança de cristal de quartzo e um cristal de quartzo não-polido. A cistamina foi

adicionada em alíquotas determinadas e para cada ponto, concentração, observou-se a formação da monocamada mediante a variação de frequência do transdutor. Para cada concentração, a variação de massa foi avaliada em separado, ou seja, a superfície de ouro do cristal era totalmente limpa e a monocamada de cistamina formada era totalmente eliminada. A concentração que apresentou o maior deslocamento de frequência e maior reprodutibilidade foi à concentração de 15 mM (Figura 3.2.1).

Apesar de outras medidas terem reprodutibilidade até maior que a de 15 mM esta foi a que apresentou maior deslocamento de frequência, ou seja, há mais massa depositada sobre a superfície do cristal e conseqüentemente deve ser a que atinge um maior recobrimento. A importância de estudar a melhor concentração para a formação da monocamada de cistamina se deve ao fato da melhor concentração recobrir mais completamente a superfície do cristal e conseqüentemente servirem de sítios para a formação da camada de glutaraldeído.

Figura 3.2.1 – Concentração ótima para a cistamina utilizando a técnica de microbalança de cristal de quartzo.

3.2.2. ADMITÂNCIA ELETROACÚSTICA

O mesmo procedimento anterior foi aqui realizado utilizando-se a AE. Desta forma, foram utilizadas diversas concentrações de cistamina visando estudar o que ocorre com a melhor concentração para a formação da monocamada automontada. Para cada concentração o cristal de quartzo foi limpo com solução “piranha” e água destilada.

Para cada medida foram adicionados 2 mL de água destilada na célula e então foram esperados 25 min para a estabilização da oscilação do cristal de quartzo e em seguida foi adicionada uma alíquota de cistamina de modo que a concentração final na célula fosse de: 1 mM; 2,5 mM; 5 mM; 7,5 mM; 10 mM; 12,5 mM; 15 mM; 17,5 mM e 20 mM.

As curvas de admitância eletroacústica obtidas para: a) célula contendo água; b) após 25 minutos da adição de cistamina e c) depois que a célula foi lavada com água foram submetidas a ajustes com o intuito de se extrair os valores dos parâmetros do circuito equivalente do cristal de quartzo mais especificamente do ramo dinâmico, tais como a frequência (Figura 3.2.2 A), a resistência (Figura 3.2.2 B), a indutância (Figura 3.2.2 C) e a capacitância (Figura 3.2.2 D). Depois de se obter todos estes parâmetros para os procedimentos a), b) e c) eles foram comparados utilizando a variação ($\Delta = x_a - x_i$), onde x_a é o valor do parâmetro x no procedimento a) e x_i é o mesmo parâmetro x para o procedimento b) ou c).

Para a frequência pode-se notar que a concentração que apresentou maior queda na frequência, 190 Hz, foi à concentração de 20 mM, porém a concentração de 15 mM causou uma queda próxima àquela obtida para a concentração de 20 mM com apenas 10 Hz a menos (Figura 3.2.2 (A)). Analisando o parâmetro R pode-se notar que a concentração de 15 mM apresentou a maior perda de energia mecânica. Para concentrações mais baixas, 1 e 2,5 mM, as perdas energéticas diminuem, o que pode indicar a formação de um filme mais rígido (Figura 3.2.2 (B)), porém as quedas de frequência foram menores quando comparadas às

outras, indicando que a superfície não foi totalmente coberta com a monocamada de cistamina. Ao analisar as variações de massa rígida denotado pelo parâmetro L e viscosa (parâmetro C) nota-se que a concentração de 15 mM foi a que mostrou uma menor variação em ambos os parâmetros, sendo que L diminuiu e C aumentou. Já a concentração em que se obteve maiores variações nos parâmetros L e C foi à concentração de 7,5 mM, sendo que o parâmetro L aumentou enquanto que o parâmetro C diminuiu (Figuras 3.2.2 C e D).

Figura 3.2.2 – Variação dos parâmetros do ramo dinâmico do circuito equivalente do cristal de quartzo em função da concentração de cistamina utilizando a técnica de admitância eletroacústica e cristal de quartzo polido. (A) frequência, (B) resistência R , (C) indutância L e (D) capacitância C e (E) fator D . Onde Δ é a diferença entre o valor obtido para a célula contendo água e o valor obtido após imobilização da cistamina.

Depois que as medidas de admitância foram realizadas, o cristal foi lavado com água destilada para eliminar o possível excesso de cistamina. Após este procedimento, a concentração de 15 mM de cistamina apresentou uma queda de 30 Hz, sendo este o maior deslocamento observado em frequência. Outra concentração que apresentou um deslocamento próximo deste valor foi a de 17,5 mM com um deslocamento de 20 Hz (Figura 3.2.3 (A)). As concentrações de 1 mM e 12,5 mM não foram submetidas a este estudo.

Quando é feita uma análise sobre a variação do parâmetro R , as concentrações de 5 e 7,5 mM apresentaram um decréscimo neste parâmetro, enquanto a concentração de 10 mM apresentou a maior perda de energia, ou seja um aumento no parâmetro R (Figura 3.2.3 B). Conseqüentemente a concentração de 10 mM obteve uma maior variação no fator D , indicando que a concentração de 10 mM possui uma maior contribuição de massa viscoelástica.

Figura 3.2.3 – Variação dos parâmetros do ramo dinâmico do circuito equivalente do cristal de quartzo em função da concentração de cistamina utilizando a técnica de admitância eletroacústica e cristal de quartzo polido. (A) frequência, (B) resistência R , (C) indutância L , (D) capacitância C e (E) fator D . Onde Δ é a diferença entre o valor obtido para a célula contendo água e o valor obtido para os parâmetros após 25 minutos da adição da cistamina.

Analisando todo o conjunto de dados apresentados, as concentrações de 15 mM e 17,5 mM apresentaram melhores resultados, visto que após a lavagem foram as que sofreram um maior decréscimo na frequência e também um pequeno aumento na viscoelasticidade, sendo

que para a concentração de 15 mM a viscoelasticidade foi maior devido a um maior recobrimento da superfície, denunciada por uma variação maior na frequência de oscilação.

3.3. EFEITO DO TEMPO DE ESTABILIZAÇÃO NA CONSTRUÇÃO DAS MONOCAMADAS

Durante o estudo realizado para formação das monocamadas foi notado que o tempo de estabilização do cristal após a adição de água parecia influenciar no comportamento da curva de admitância eletroacústica e com o objetivo de verificar se realmente o tempo de estabilização exercia alguma influência sobre a formação da monocamada de cistamina foi realizado este estudo. Inicialmente, o tempo utilizado para a estabilização foi de 5 a 10 min, devido a alguns estudos realizados com a microbalança de cristal de quartzo (Figura 3.3.1).

Figura 3.3.1 – Estudo da formação de monocamada de cistamina através da microbalança de cristal de quartzo. Em destaque, o tempo de estabilização da oscilação do cristal de quartzo.

Na Figura 3.3.1 pode-se notar uma variação ($f_{\max} - f_{\min}$) de 13 Hz (destaque) durante o tempo de estabilização. Esta variação pode ser considerada pequena, pois a adição de cistamina provoca um decréscimo muito maior na frequência, superior a 600 Hz como pode ser visto na Figura 3.3.1 (gráfico maior). Nesta figura o tempo para a estabilização foi de 10 min, mas pode-se observar que após 300 segundos a variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo é pequena. Deste modo foram realizados estudos comparando o tempo de estabilização de 5 min (Figura 3.3.2) e um tempo bem maior, 100 min (Figura 3.3.3).

Figura 3.3.2 – Estudo da formação da monocamada de cistamina com tempo de estabilização de 5 min e concentração de 15 mM.

Para um estudo mais comparativo, as curvas de admitância da Figura 3.3.2 e da Figura 3.3.3 foram submetidas a ajustes para a análise da variação dos parâmetros do circuito equivalente (Tabelas 3.3.I e 3.3.II, respectivamente).

Tabela 3.3.I – Parâmetros do circuito equivalente para a formação da monocamada de cistamina para o tempo de estabilização de 5 min

	R (Ω)	L (mH)	C (fF)	Fator D (10^{-4})	$\Delta f_{\text{série}}$ (Hz)
Adição de Água	198	7,306	34,894	4,327	0
Água – 5 min	198	7,299	34,925	4,331	-80
Cistamina	204	7,117	35,820	4,577	-230

Figura 3.3.3 - Estudo da formação da monocamada de cistamina com tempo de estabilização de 100 min e concentração de 15 mM.

Tabela 3.3.II – Parâmetros do circuito equivalente para a formação da monocamada de cistamina para o tempo de estabilização de 100 min.

	R (Ω)	L (mH)	C (fF)	Fator D (10^{-4})	$\Delta f_{\text{série}}$ (Hz)
Adição de Água	314	6,94	36,41	7,19	0
Água – 1h 40 min	326	6,94	36,36	7,46	-40
Cistamina	325	6,89	36,68	7,50	-220

Analisando as Tabelas 3.3.I e 3.3.II pode-se observar que utilizando um tempo maior para a estabilização da oscilação do cristal de quartzo há poucas mudanças no que se refere à variação da frequência após adição de cistamina. No entanto, há um efeito nos demais parâmetros o que indica uma mesma deposição de massa, porém com estruturas distintas. A principal mudança observada é que as variações nos parâmetros R e fator D são maiores quando o tempo de estabilização é maior, o que reflete em um aumento relativo do fator D , indicando que para um tempo maior de estabilização do cristal em água há a formação de uma monocamada distinta. Notadamente é o parâmetro R o que mais contribui para a variação do fator D . Como R é um parâmetro relacionado diretamente com o amortecedor, pode-se dizer que o deve estar amortecendo mais o sistema é a água que passa a ocupar regiões rugosas da superfície do eletrodo de Au e do cristal, o que precisamente ocorreria para maiores tempos de estabilização. A variação de frequência final é similar e indica uma variação de massa ou depósito similar para um caso e outro.

3.4. EFEITO DO TEMPO DE IMOBILIZAÇÃO NA FORMAÇÃO DAS CAMADAS AUTOMONTADAS

Há vários relatos na literatura com relação ao tempo de formação da monocamada de cistamina, mas não são apresentados estudos detalhados e não há um consenso quando se trata do tempo de imobilização, variam desde 2 h (48) até 24 h (11). Outros relatam simplesmente uma imobilização durante a noite inteira (“overnight”), ou seja, aproximadamente 12 h (49).

Como pode ser visto na Figura 3.3.1, onde é demonstrado o estudo da formação da monocamada de cistamina utilizando a QCM, a reação da cistamina com o ouro sobre a superfície do cristal de quartzo demonstrou ser rápida, visto que após a adição da cistamina há um decréscimo na frequência de oscilação do cristal e rapidamente ocorre à estabilização de frequência neste novo patamar. Baseado nesta informação foi realizado um estudo para verificar se há diferenças nas medidas de admitância sobre o tempo de imobilização da

monocamada de cistamina com concentração de 15 mM fazendo um estudo com um tempo de imobilização de 30 min (Figura 3.4.1) e de 4 h (Figura 3.4.2). Estas curvas foram ajustadas para retirar os parâmetros do circuito equivalente, sendo os mesmos apresentados na Tabela 3.4.I e Tabela 3.4.II.

Figura 3.4.1 – Curvas de admitância eletroacústica para o cristal inserido na célula (linha contínua), a cistamina imobilizada por um período de 30 min (linha pontilhada) e após a lavagem da célula (pontos).

Figura 3.4.2 – Curvas de admitância eletroacústica para o cristal inserido na célula (linha contínua), a cistamina imobilizada por um período de 4 h (linha pontilhada) e após a lavagem da célula (pontos).

Tabela 3.4.I - Parâmetros do circuito equivalente para a formação da monocamada de cistamina para um tempo de imobilização de 30 min.

	R (Ω)	L (mH)	C (fF)	Fator D (10^{-4})	$\Delta f_{\text{série}}$ (Hz)
Água	392	13,497	18,852	4,633	0
Cistamina 30 min	408	13,275	19,167	4,903	-190
Após Lavagem	394	13,393	18,857	4,675	-30

Tabela 3.4.II – Parâmetros do circuito equivalente para as curvas de admitância eletroacústica para o estudo da formação da monocamada de cistamina durante um período de 4 h.

	R (Ω)	L (mH)	C (fF)	Fator D (10^{-4})	$\Delta f_{\text{série}}$ (Hz)
Água	234	7,283	34,947	5,126	0
Cistamina 4 h	241	7,026	36,225	5,472	-160
Após Lavagem	240	7,140	35,650	5,363	-110

A diferença mais notável entre os tempos de imobilização está na variação de frequência entre a medida com a célula contendo apenas água e após a lavagem da célula, depois da formação da monocamada de cistamina. A variação para um tempo menor de imobilização foi de 30 Hz, enquanto para um tempo de imobilização maior esta variação aumenta para 110 Hz. Nota-se também que após a lavagem a variação relativa do fator D (quando comparado com o valor anterior à adição da cistamina) é menor para um tempo maior de imobilização, o que indica uma rigidez maior (ou uma menor viscoelasticidade).

Sobre a monocamada de cistamina foram adicionados 500 μL de glutaraldeído na célula contendo 2 mL de água, o que leva a uma concentração de 5% v/v na célula. Foram utilizados tempos de imobilização distintos: 25 min e 4 h; e para ambos os casos foram extraídos as medidas de admitância eletroacústica após a lavagem do cristal contendo cistamina, após o tempo de imobilização e finalmente após a lavagem da célula para retirar o

excesso de glutaraldeído que a célula poderia conter (Figuras 3.4.3 (A) e (B)) e os parâmetros do ajuste feito sobre estas curvas (Tabela 3.4.III).

Figura 3.4.3 – Curva de admitância eletroacústica para o estudo da formação da monocamada de glutaraldeído utilizando tempos de imobilização de (A) 25 min e (B) 4 h, ambos sobre o cristal modificado com a monocamada de cistamina 15 mM.

Tabela 3.4.III – Parâmetros do circuito equivalente para as curvas de admitância eletroacústica para o estudo da imobilização do glutaraldeído durante um período de 25 min e 4 h sobre o cristal contendo a monocamada de cistamina.

	$R (\Omega)$	L (mH)	C (fF)	Fator D (10^{-4})	$\Delta f_{\text{série}}$ (Hz)
Cistamina	228	7,33	34,73	4,96	0
Glutaraldeído 25 min	270	7,25	35,09	5,94	-500
Após Lavagem	229	7,20	35,36	5,08	-130
Cistamina	240	7,14	35,65	5,36	0
Glutaraldeído 4 h	313	7,18	35,46	6,96	-720
Após Lavagem	246	7,12	35,73	5,51	-160

A monocamada de glutaraldeído promove um maior deslocamento na frequência quando comparado com a monocamada de cistamina. Nota-se uma diferença causada pelo tempo de imobilização, o parâmetro L aumenta após 4 h de imobilização, enquanto que com um tempo de 25 min este parâmetro diminui. Já para parâmetro C acontece o contrário, este diminui para um tempo de 4 h e aumenta para um tempo de 25 min, porém em ambos casos a viscoelasticidade aumenta, indicado principalmente pelo aumento no fator D . Após a lavagem da célula o comportamento é o mesmo para ambos os tempos de imobilização, o aumento no fator D é maior para um tempo de imobilização maior, indicando uma viscoelasticidade maior ou mesmo a formação de polímeros.

3.5. IMOBILIZAÇÃO DA JACALINA

A preparação do cristal para a imobilização da jacalina consiste na formação da bicamada anteriormente discutida: monocamada de cistamina e imobilização de glutaraldeído. A formação da bicamada como já foi descrita anteriormente em detalhes, consiste na formação da monocamada de cistamina sobre a superfície de ouro e sobre a monocamada de

cistamina imobiliza-se o glutaraldeído. Neste sistema o glutaraldeído atua como um espaçador entre a cistamina e a jacalina, se ligando com os grupos amina da cistamina e da jacalina através do grupo funcional aldeído.

Sobre a superfície do cristal de quartzo modificado com a bicamada foi imobilizada a jacalina. Após a imobilização de glutaraldeído a célula com o cristal de quartzo inserido é lavada com água deionizada duas vezes e uma vez com solução tampão fosfato de pH aproximadamente 7 e em seguida é adicionado 2 mL da mesma solução tampão. Esperou-se a estabilização do cristal e em seguida adicionou-se a jacalina em alíquota e esperou-se 1 h para a imobilização desta lectina e novamente a célula foi lavada com solução tampão (Figura 3.5.1).

Figura 3.5.1 – Curvas de admitância eletroacústica para o estudo imobilização da jacalina sobre o cristal de quartzo modificado pela bicamada formada por cistamina e glutaraldeído.

Como pode ser observado na Figura 3.5.1 a adição de jacalina provoca um decréscimo na frequência de oscilação do cristal de quartzo caracterizada por um deslocamento à esquerda na curva de admitância. Essas curvas foram ajustadas para extrair os parâmetros do cristal de quartzo para analisá-los separadamente (Tabela 3.5.I).

Tabela 3.5.I – Parâmetros do circuito equivalente para as curvas de admitância eletroacústica para o estudo da imobilização da jacalina sobre a bicamada formada por cistamina e glutaraldeído.

	R (Ω)	L (mH)	C (fF)	Fator D (10^{-4})	$\Delta f_{\text{série}}$ (Hz)
Tampão	472	12,84	19,69	5,845	0
Jacalina 1 h	476	12,83	19,69	5,896	-30
Após Lavagem	469	12,85	19,673	5,803	-20

Como foi citado anteriormente a jacalina foi imobilizada sobre a bicamada, cistamina-glutaraldeído, provocando um deslocamento de 30 Hz e após a lavagem o deslocamento foi de 20 Hz. Após a lavagem notou-se uma queda no fator D , indicando que a viscoelasticidade do sistema ouro-cistamina-glutaraldeído-jacalina diminui. O principal parâmetro responsável por esta queda na viscoelasticidade foi o parâmetro R (Tabela 3.5.I). Essa pequena queda observada após lavagem indica que há muitas moléculas de jacalina ligada ao glutaraldeído.

O mesmo procedimento foi utilizado para outro lote de jacalina. Este lote de jacalina possuía uma concentração maior e apresentou um comportamento distinto para a medida da admitância eletroacústica (Figura 3.5.2). Primeiramente pode-se observar pela Figura 3.5.2 que o deslocamento de frequência para este lote de jacalina foi bem maior quando comparado com o apresentado na Figura 3.5.1.

Figura 3.5.2 – Curva de admitância eletroacústica para o estudo da imobilização da jacalina durante 2 h sobre o cristal de quartzo modificado pela bicamada formada por cistamina e glutaraldeído.

Tabela 3.5.II – Parâmetros do circuito equivalente para as curvas de admitância eletroacústica para o estudo da imobilização da jacalina sobre a bicamada formada por cistamina e glutaraldeído extraídos das curvas da Figura 3.5.2.

	$R (\Omega)$	$L (mH)$	$C (fF)$	Fator $D (10^{-4})$	$\Delta f_{série} (Hz)$
Tampão	217	6,68	38,08	5,18	0
Jacalina 2 horas	258	6,67	38,19	6,17	-4650
Após Lavagem	249	6,72	37,92	5,92	-4840

Analisando a Tabela 3.5.III verifica-se uma queda de quase 5 kHz na frequência de oscilação do cristal de quartzo, cuja causa está relacionada ao aumento de massa viscoelástica, visto que após o período de imobilização houve acréscimos nos parâmetros R e C e decréscimo no parâmetro L , o que fez com que o fator D aumentasse. Após a lavagem a frequência também diminuiu, mostrando que a proteína foi imobilizada e o parâmetro L aumentou, fazendo com que o fator D sofresse um pequeno decréscimo (quando comparado com o valor antes da lavagem).

3.6. ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE A JACALINA E CARBOIDRATOS

Com a jacalina imobilizada sobre a bicamada formada por cistamina e glutaraldeído, estudou-se a interação desta lectina com a fetuína, um glicoconjugado extraído do feto de camundongo, onde o termo glicoconjugado refere-se a uma proteína com agrupamento glicosídico. Dentre os carboidratos que compõem a fetuína está a Gal β 1-3GlcNAc (Galactose β 1-3 N-Acetilglicosamina), um açúcar que sabe-se tem afinidade pela jacalina. Foram tiradas medidas de admitância (Figura 3.6.1) e destas foram extraídos os parâmetros do circuito equivalente (Tabela 3.6.I). Analisando a Figura 3.6.1 pode-se verificar um decréscimo na frequência de oscilação do cristal após a imobilização da fetuína durante 1 hora.

Figura 3.6.1 – Curvas de admitância eletroacústica para o estudo da interação entre a jacalina e a fetuína.

Tabela 3.6.I – Parâmetros do circuito equivalente para as curvas de admitância eletroacústica para o estudo da interação jacalina-fetuína.

	R (Ω)	L (mH)	C (fF)	Fator D (10^{-4})	$\Delta f_{\text{série}}$ (Hz)
Jacalina em Tampão	426	6,525	38,732	10,379	0
Fetuína	437	6,628	38,133	10,482	-210

O decréscimo na frequência foi de 210 Hz, sendo causada por um aumento no parâmetro L . Isto talvez se deve ao fato da fetuína interagir com a jacalina através de interações intermoleculares. A adição de fetuína também causou um aumento na perda de energia mecânica, avaliado pelo valor do fator D . Sobre o lote de jacalina descrito anteriormente foi imobilizado a fetuína (Figura 3.6.2) e a α -lactose (Figura 3.6.3).

Figura 3.6.2 – Curvas de admitância eletroacústica para o estudo da interação entre a jacalina e a fetuína.

Tabela 3.6.II – Parâmetros do circuito equivalente para as curvas de admitância eletroacústica para o estudo da interação jacalina-fetuína.

	R (Ω)	L (mH)	C (fF)	Fator D (10^{-4})	$\Delta f_{\text{série}}$ (Hz)
Jacalina em Tampão	319	6,91	36,43	7,33	0
Fetuína	331	6,90	36,70	7,64	-180

A fetuína apresentou uma queda de 180 Hz (Tabela 3.6.II), ou seja, 30 Hz a menos quando comparado com outros lotes de jacalina. Os parâmetros C e R aumentaram enquanto que o parâmetro L diminuiu, diferente do resultado apresentado por outros lotes de jacalina, onde os parâmetros L e R aumentaram e o parâmetro C diminuiu, porém o decréscimo na frequência indica que em ambos os casos houve interação entre a fetuína e a jacalina.

Outro estudo foi realizado utilizando-se a α -lactose para o estudo da interação entre este carboidrato com a jacalina (Figura 3.6.3).

Figura 3.6.3 – Curvas de admitância eletroacústica para o estudo da interação entre a jacalina e a α -lactose.

Pode-se notar um deslocamento na frequência de oscilação do cristal de quartzo de aproximadamente 90 Hz. Além disso, os parâmetros C e R aumentaram e o parâmetro L

diminuiu, indicando que a adição da α -lactose aumentou a viscoelasticidade na superfície do cristal de quartzo, como pode ser confirmado com o aumento acentuado do fator D (Tabela 3.6.III). A variação no fator D é alto principalmente quando comparado com a imobilização da fetuína e, conseqüentemente, esta interação pode ser fraca e totalmente desfeita após a lavagem da célula indicando a não ocorrência de interação específica.

Tabela 3.6.III – Parâmetros do circuito equivalente para as curvas de admitância eletroacústica para o estudo da interação jacalina - α -lactose.

	R (Ω)	L (mH)	C (fF)	Fator D (10^{-4})	$\Delta f_{\text{série}}$ (Hz)
Jacalina em Tampão	249	6,72	37,92	5,92	0
α - Lactose	297	6,57	38,56	7,19	-90

3.7 - ESTUDO DA ATIVIDADE DA ENZIMA GUMH

Este estudo conduzido em parceria com o Grupo de Cristalografia do Departamento de Física e Informática – IFSC-USP teve por objetivo realizar um teste de atividade da GumH através da avaliação da sua afinidade com a GDP-manose. A GumH é uma enzima extraída da *Xylella fastidiosa* que é responsável pela catálise da reação de transferência da manose da GDP-manose para o poliprenol.

A estratégia adotada neste estudo visou à imobilização do poliprenol, pois era sobre este que haveria uma imobilização. Para a imobilização do poliprenol foi utilizado um tiol de cadeia longa, o 1-undecanotiol, pois ele possui um grupo tiol que interage com o eletrodo de ouro da superfície do cristal de quartzo e no outro extremo um grupo CH_3 que interage com o poliprenol. O tiol foi imobilizado durante a noite toda (“overnight”, aproximadamente 10 horas) em um béquer lacrado com parafilme (filme de parafina) e colocado na geladeira. Este procedimento foi necessário devido à solubilidade deste tiol em reagentes orgânicos,

entre eles, o clorofórmio que é uma substância volátil, impossibilitando o uso de técnicas como a QCM ou a admitância eletroacústica para acompanhamento da formação deste tiol.

No dia seguinte, o cristal foi lavado com água destilada, secado ao ar livre e inserido na célula de TEFLON[®]. Com a célula montada, adicionou-se água, clorofórmio e o poliprenol. A imobilização deu-se durante a noite toda, mas desta vez os dados puderam ser adquiridos, visto que a concentração de clorofórmio era pequena; apenas para a ativação do tiol (Figura 3.7.1).

Figuras 3.7.1 – Curvas de admitância eletroacústica para o estudo da imobilização do poliprenol sobre o tiol (1-undecanotiol) ligado ao eletrodo de ouro.

A Figura 3.7.1 mostra um indicativo da reação entre o tiol e o poliprenol devido ao deslocamento à esquerda da curva de admitância depois da adição do poliprenol. Pode-se observar também que após 16 h a mudança no perfil da curva é maior, indicando que houve a reação esperada. Para uma análise mais detalhada extraiu-se os parâmetros do circuito equivalente utilizando os dados da Figura 3.7.1 (Tabela 3.7.I).

Tabela 3.7.I – Parâmetros do circuito equivalente do cristal de quartzo extraídos dos dados da Figura 3.7.I visando o estudo da imobilização do poliprenol sobre a superfície de ouro modificado por 1-undecanotiol.

	R (Ω)	L (mH)	C (fF)	Fator D (10^{-4})	$\Delta f_{\text{série}}$ (Hz)
Água e clorofórmio	402	13,49	18,87	4,75	0
Poliprenol 3 min	395	13,43	18,95	4,69	40
Poliprenol 16 h 20 min	417	13,50	18,86	4,93	-150

Analisando a Tabela 3.7.I verifica-se que há uma interação devido ao aumento nos parâmetro L e conseqüentemente, um decréscimo da frequência em série já evidenciada mediante a análise da Figura 3.7.I, onde é possível visualizar um deslocamento à esquerda no pico da curva de admitância.

As medidas de admitância eletroacústica para o estudo da interação entre o 1-undecanotiol e o poliprenol estenderam-se durante todo o processo de imobilização com o objetivo de obter o desenvolvimento temporal da reação. Após a adição do poliprenol, foram realizadas 10 medidas com intervalo de tempo de 1 min, e depois deste tempo as medidas foram tomadas com intervalo de tempo maior, 30 min. Os dados obtidos foram submetidos a ajustes para extrair os parâmetros do circuito equivalente e, desta forma, analisar o comportamento destes parâmetros separadamente em função do tempo (Figuras 3.7.2 A, B, C, D e E).

Figura 3.7.2 – Parâmetros do ramo dinâmico do circuito equivalente em função do tempo para o estudo da imobilização do poliprenol. (A) Resistência – perdas por energia mecânica, (B) Indutância – variação de massa rígida, (C) Capacitância – variação de massa elástica, (D) freqüência – variação de massa e (E) Variação do fator D (dissipação).

Após a adição do poliprenol, a indutância do circuito equivalente apresentou um grande aumento. No entanto, o decréscimo na capacitância foi maior e fez com que a

freqüência em série aumentasse. Analisando estas variações acredita-se que após a adição de poliprenol houve uma adsorção do poliprenol e apenas uma parte do que foi adicionado se ligou quimicamente com o eletrodo modificado com 1-undecanotiol. Depois de aproximadamente 30 min o filme de poliprenol demonstrou ser um filme viscoelástico, devido a um decréscimo na indutância junto com um acréscimo na resistência, na capacitância e conseqüentemente no fator D . Deste modo, pôde-se observar que o poliprenol foi imobilizado sobre a monocamada de 1-undecanotiol e que o filme formado alterou a viscoelasticidade na superfície o cristal de quartzo.

Como a imobilização do poliprenol deu-se durante toda noite (“overnight”), entre 10 e 12 horas, no dia seguinte o cristal foi lavado primeiramente com água deionizada para descartar o excesso do proliprenol e depois lavado com solução tampão fosfato. Então, foram adicionados dois mililitros de solução tampão na célula e esperou-se 50 min para a estabilização do cristal de quartzo. Foi adicionada a GumH e coletada várias curvas de admitância para o estudo dos parâmetros do circuito equivalente em função do tempo, das quais as principais curvas (aquelas em que o cristal têm sua freqüência estabilizada) estão representadas na Figura 3.7.3. Os dados das curvas sofreram o mesmo ajuste citado anteriormente para que os parâmetros do circuito equivalente fossem extraídos e pudessem ser comparados para analisar quaisquer mudanças que ocorreram na superfície do cristal de quartzo (Tabela 3.7.II).

Todas as curvas extraídas no estudo da adição da GumH tiveram seus dados submetidos ao mesmo procedimento descrito anteriormente para a avaliação do comportamento dos parâmetros do circuito equivalente em função do tempo. (Figuras 3.7.4A, B, C, D e E).

Figura 3.7.3 – Curvas de admitância eletroacústica para o estudo da adição da GumH sobre o eletrodo de ouro coberto por 1-undecanotiol e poliprenol imobilizado.

Tabela 3.7.II – Parâmetros do circuito equivalente do cristal de quartzo extraídos dos dados da Figura 3.7.3 visando o estudo da adição da GumH sobre o poliprenol.

	R (Ω)	L (mH)	C (fF)	Fator D (10^{-4})	$\Delta f_{\text{série}}$ (Hz)
Poliprenol e Tampão	403	13,26	19,21	4,85	0
GumH 30 s	450	13,29	19,16	5,40	-260
GumH 36 min	428	13,27	19,19	5,15	-130

Quanto se analisa a Figura 3.7.3 pode-se observar que houve uma interação entre o poliprenol e a GumH e quando se observa a Tabela 3.7.II esta interação é confirmada devido a um deslocamento de aproximadamente 130 Hz entre a medida com tampão e após 36 min da adição da GumH. Vê-se que esta variação foi provocada por um aumento no parâmetro C .

Figura 3.7.4 - Parâmetros do ramo dinâmico do circuito equivalente em função do tempo visando o estudo da adição da enzima GumH. (A) Resistência – perdas por energia mecânica, (B) Indutância – variação de massa rígida, (C) Capacitância – variação de massa elástica e (D) frequência – variação de massa.

Como foi comentado anteriormente, a adição de GumH em um primeiro instante causa um decréscimo na frequência. Além disso, causa mudanças em outros parâmetros, tais como o acréscimo na resistência, o que indica uma maior perda de energia mecânica. Também há uma

diminuição no valor da capacitância que é o parâmetro responsável pela massa de natureza elástica e o aumento na indutância o que indica um aumento de massa rígida na superfície do cristal. Porém, com o decorrer do experimento as curvas se modificam alterando a variação da frequência, que após a adição de GumH era próximo de 230 Hz, enquanto que após 35 min da adição da mesma a variação de frequência diminui para 130 Hz.

Depois da adição da GumH adicionou-se a GDP-manose sem a lavagem do cristal, pois a GumH é uma glicosiltransferase e conseqüentemente ela seria a responsável por transferir a manose da GDP-manose para o poliprenol imobilizado sobre a superfície de ouro modificado. Nesta etapa foram realizadas medidas de admitância durante aproximadamente 30 min. Nota-se que houve pouca diferença entre estas curvas (Figura 3.7.5; Tabela 3.7.III). O desenvolvimento temporal dos parâmetros do circuito equivalente também foram estudados (Figuras 3.7.6 A, B, C, D e E)

Figura 3.7.5 - Curvas de admitância eletroacústica para o estudo da interação entre a GDP-manose e a GumH.

Tabela 3.7.III – Parâmetros do circuito equivalente do cristal de quartzo para o estudo da adição da manose.

	$R\ (\Omega)$	$L\ (\text{mH})$	$C\ (\text{fF})$	Fator $D\ (10^{-4})$	$\Delta f_{\text{série}}\ (\text{Hz})$
GumH	431	13,25	19,22	5,19	0
GDP-manose 50 s	426	13,25	19,22	5,13	30
GDP-manose 27 min	427	13,26	19,20	5,14	40

Como citado acima, os valores de alguns parâmetros estão muito próximos, por exemplo, a variação da frequência em serie entre a GDP-manose após 27 min e antes da adição desta (somente GumH) foi de apenas 30 Hz indicando que a GumH está transferindo a manose da GDP-manose para o poliprenol e depois desta transferência, a GumH se desprende do poliprenol, provocando este aumento de 30 e depois 40 Hz na frequência.

Figura 3.7.6 - Parâmetros do ramo dinâmico do circuito equivalente em função do tempo visando o estudo da adição da GDP-manose. (A) Resistência – perdas por energia mecânica, (B) Indutância – variação de massa rígida, (C) Capacitância – variação de massa elástica, (D) frequência – variação de massa e (E) Variação do fator D (dissipação).

Exceto para a indutância, as variações para os parâmetros foram muito sutis e indicam que houve uma pequena variação no parâmetro L e perdas de viscoelasticidade denunciadas pelo aumento no fator D . Também pode ser notado que o decréscimo na massa elástica acabou se sobressaindo sobre o acréscimo de massa rígida devido ao aumento na frequência depois de 36 min da adição de GDP-manose.

Algumas enzimas necessitam de íons para serem ativadas e no caso da GumH o sal utilizado foi o cloreto de magnésio ($MgCl_2$). Deste modo, tal sal foi adicionado e obtiveram-se os dados da admitância do cristal de quartzo (Figura 3.7.7).

Figura 3.7.7 - Curvas de admitância eletroacústica para o estudo da adição de cloreto de magnésio na célula contendo GumH, GDP-manose e o cristal de quartzo tendo seu eletrodo de ouro modificado 1-undecanotiol e sobre este sistema, o poliprenol imobilizado.

Após uma análise da Figura 3.7.7 é possível observar que a adição de cloreto de magnésio fez com que a frequência se deslocasse para a esquerda ao mesmo tempo em que a perda de energia mecânica aumentou; este último é possível ser observado devido aos decréscimos do pico de condutância e nos extremos (verticais) do gráfico da susceptância. Sobre estas curvas foram feitos os ajustes e deste modo foi possível extrair os parâmetros do circuito equivalente do cristal de quartzo (Tabela 3.7.IV). Porém, como a frequência de ressonância para as curvas formada por quadrados ($\square$) e a preta contínua estão muito próximas, ambas quase se igualam, a diferença só é perceptível após uma análise dos parâmetros em separado (Tabela 3.7.IV).

Tabela 3.7.IV – Parâmetros do circuito equivalente do cristal de quartzo para o estudo da adição de cloreto de magnésio.

	R (Ω)	L (mH)	C (fF)	Fator D (10^{-4})	$\Delta f_{\text{série}}$ (Hz)
GDP-manose	434	13,24	19,23	5,23	0
MgCl_2 30 s	467	13,28	19,18	5,61	-60
MgCl_2 1h 15	432	13,27	19,19	5,20	30
Após Lavagem	398	13,26	19,18	4,79	70

Pela Tabela 3.7.IV vê-se uma diferença razoável entre os parâmetros da curva antes da adição do cloreto de magnésio e após 1 h e 15 min da adição da mesma. Pela Figura 3.7.7 esta diferença não era tão perceptível, mas a variação de frequência é de 30 Hz. Após a lavagem há uma perda de massa rígida, mas esta é pequena quando comparada com a perda de massa viscoelástica avaliadas pelos decréscimos nos parâmetros C e R .

Figura 3.7.8 - Parâmetros do ramo dinâmico do circuito equivalente em função do tempo visando o estudo da adição de cloreto de magnésio. (A) Resistência – perdas por energia mecânica, (B) Indutância – variação de massa rígida, (C) Capacitância – variação de massa elástica, (D) frequência – variação de massa e (E) fator D – dissipação.

Nota-se que a adição de cloreto de magnésio provoca mudanças em todos os parâmetros, entre eles deve-se destacar a queda de 30 Hz na frequência. Também aumenta o fator D indicando que a massa adicionada é viscoelástica ou que houve modificações no filme de modo a torná-lo mais viscoelástico. Após a lavagem do cristal a frequência aumenta aproximadamente até 50 Hz quando comparado com o valor da mesma antes da adição do sal indicando que houve uma perda de massa que é justamente a GumH que se desprende do poliprenol. Porém, o maior interesse neste estudo é verificar a variação dos parâmetros entre as medidas onde há somente o poliprenol imobilizado e após a lavagem do cristal depois da adição da GumH, da GDP-manose e do cloreto de magnésio (Tabela 3.7.V)

Tabela 3.7.V – Parâmetros do circuito equivalente do cristal de quartzo para a comparação entre as medidas do cristal contendo apenas o poliprenol imobilizado e após a lavagem depois das adições de: GumH, GDP-manose e cloreto de magnésio.

	R (Ω)	L (mH)	C (fF)	Fator D (10^{-4})	$\Delta f_{\text{série}}$ (Hz)
Prenol e Tampão	403	13,259	19,206	4,850	0
Após Lavagem	398	13,266	19,202	4,778	-30

Pode-se observar que houve um decréscimo de 30 Hz na frequência provocado principalmente por um aumento no parâmetro L . Com isso, pode-se dizer que a hipótese inicial era correta, pois houve a transferência de uma pequena massa ao poliprenol, de onde se suspeita que seja a manose clivada pela GumH da GDP-manose e que a GumH somente é ativa na presença de metais, ou seja, a GumH é uma metaloproteína ou metaloenzima.

CONCLUSÕES

No estudo da formação da monocamada de cistamina nota-se que antes do procedimento de lavagem somente parte desta substância é ligada ao ouro enquanto a restante faz interação físicas (interações fracas) que contribuem para a variação frequência devido viscoelasticidade identificada desta camada formada sobre da superfície do cristal, denunciada principalmente pelo fator D . Quando o tempo esperado é maior para a formação desta monocamada há um maior recobrimento da superfície, já que uma parte maior pode entrar em contato com o ouro e, conseqüentemente, se ligar quimicamente. Além disso, a melhor concentração para a formação da monocamada foi a de 15 mM devido ao melhor recobrimento da superfície do cristal de quartzo.

Na formação da bicamada o glutaraldeído observou-se um comportamento parecido aquele apresentado para formação da monocamada de cistamina, ou seja, somente parte do glutaraldeído adicionado se liga quimicamente com a cistamina enquanto que a outra parte das moléculas realiza interações não-específicas, contribuindo para as perdas viscoelásticas. Após lavagem, o efeito é eliminado, pois as moléculas que não realizam ligações específicas se desorvem da superfície. Contudo, ao contrário do se observou para a cistamina, o tempo de imobilização não influencia a formação da camada de glutaraldeído.

No caso do estudo da interação entre a Jacalina e carboidratos, realizada mediante a imobilização da Jacalina sobre gluraldeído, observou-se que as interações na maioria específicas. A técnica de Admitância Eletroacústica (AE) se mostrou de grande utilidade quando aplicada ao estudo da atividade da enzima GumH. Além disso, a AE também se mostrou útil no fornecimento de maiores informações no que se refere aos detalhes físico-químicos envolvidos nos processos aqui estudados.

REFERÊNCIAS

1. MARX, K.A., *Quartz Crystal Microbalance: A Useful Tool for Studying Thin Polymer Films and Complex Biomolecular Systems at the Solution-Surface Interface*. Biomacromolecules, 2003. **4**(5): p. 1099-1120.
2. CLARK, L. and LYONS, C., *Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1962. **102**: p. 29.
3. UPDIKE, S.J. and HICKS, G.P., *Enzyme electrode*. Nature, 1967. **214**: p. 985.
4. GUILBAULT, G.G. and MONTALVO, J. G., *A urea-specific enzyme electrode*. Journal of American Chemical Society, 1969. **91**: p. 2164.
5. MACHOLÁN, L., *Biocatalytic membrane electrodes*. Bioinstrumentation and Biosensors, 1991: p. 366-367.
6. NARANG, U., et al., *Fiber optic-based biosensor for ricin*. Biosensors & Bioelectronics, 1997. **12**(9-10): p. 937-945.
7. UCKUN, F.M. and FRANKEL, A., *The current status of immunotoxins: an overview of experimental and clinical studies as presented at the Third International Symposium on Immunotoxins*. Leukemia, 1993. **7**: p. 341-48.
8. LIU, G. and LIN, Y., *Amperometric glucose biosensor based on self-assembling glucose oxidase on carbon nanotubes*. Electrochemistry Communications, 2006. **8**: p. 251-256.
9. TOMBELLI, S., et al., *A DNA-based biosensor: Strategies for coupling nucleic acids to piezoelectric devices*. Talanta, 2006. **69**: p. 806-812.
10. SERRA, B., et al., *In-a-day electrochemical detection of coliforms in drinking water using a Tyrosinase composite biosensor*. Analytical Chemistry, 2005. **77**(24): p. 8115-8121.
11. OKUMURA, S., et al., *Determination of biotinylated proteins as an index for purification of plasma membrane using surface plasmon resonance-based optical biosensor*. Cytotechnology, 2005. **47**: p. 59-67.
12. HULANICKI, A., GLAB, S. and INGMAN, F., *Chemical sensors: definition and classification*. Pure Appl. Chem, 1991. **63**: p. 1247.
13. FATIBELLO-FILHO, O. and CAPELATO, M.O., *Biossensores*. Química Nova, 1992. **15**: p. 28.
14. THEVENOT, D.R., et al., *Electrochemical biosensors: proposed definitions and classification - synopsis of the report*. Sensors and Actuators B, 1996. **30**: p. 81.
15. MULCHANDANI, A. and BASSI, A.S. *Principles and applications of biosensors for bioprocess monitoring and control*, Crit. Rev. Biotechnol., 1995. **15**: p. 105.
16. ANGBRAT, A.L.J., et al., *A novel biochip technology for detection of explosives - TNT: Synthesis, characterisation and application*. Sensors and Actuators B, 2006. **113**: p. 730-748.
17. COULET, P.R., *What is a Biosensor?*, in *Biosensor: Principles and Applications*, L.J. BLUM and P.R. COULET, Editors. 1991, Marcel Dekker: New York.
18. SILVA-LUCCA, R.A., et al., *Structural and thermodynamic studies of KM⁺, a D-mannose binding lectin from Artocarpus integrifolia seeds*. Biophysical Chemistry, 1999. **79**: p. 81-93.

19. PEWMANS, W.J. and VAN DAMME, E.J.M., *Lectins and plant defence proteins*. Plant Physiology, 1995. **109**: p. 347-352.
20. PEWMANS, W.J. and VAN DAMME, E.J.M., *Prevalence, Biological Activity and Genetic Manipulation of Lectins in Foods*. Trends in Food Science & Technology, 1996. **7**: p. 132-138.
21. MAHANTA, S.K., SASTRY, M.V.K. and SUROLIA, A., *Topography of the Combining Region of the Thomsen-Friedenrich antigen-specific jacalin (Artocarpus integrifolia agglutinin)*. Biochemical Journal, 1990. **265**: p. 831-840.
22. CORBEAU, P., PASQUALI, J.L. and DEVAUX, C., *Jacalin, a lectin interacting with O-linked sugars and mediating protection of CD4⁺ cells against HIV-1, binds to the external envelope glycoprotein gp120*. Immunology Letters, 1995. **47**: p. 141-143.
23. JEYAPRAKASH, A.A., et al., *Structural Basis of the Carbohydrate Specificities of Jacalin: An X-Ray and Modeling Study*. Journal of Molecular Biology, 2003. **332**: p. 217-228.
24. FREIRE, R.S., PESSOA, C.A. and KUBOTA, L.T., *Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos*. Química Nova, 2003. **26**(3): p. 381-389.
25. WINK, T., ZUILEN, S.J.V. and BENNEKOM, W.P.V. *Self-assembled monolayers for biosensors*. The Analyst, 1997. **222**: p. 43R-50R.
26. GUILBAULT, G.G. and OLIVEIRA-NETO, G., *Enzyme, Microbial and Immunochemical Electrode Probes*, in *Enzymes and Immobilized Cells in Biotechnology*, A.I. LASKIN, Editor. 1985, Benjamin/ Cummings Publ. Comp.: California. p. 227.
27. GUILBAULT, G.G. and LUONG, J.H., in *Selective Electrode Review*. 1989. p. 3.
28. CAMPANELLA, L. and TOMASSETTI, M., in *Selective Electrode Review*. 1989. p. 191.
29. GUILBAULT, G.G. and LUONG, J.H., in *Chimia*. 1988. p. 267.
30. GUILBAULT, G.G. and KAUFFMANN, J.M., *Biotechnol. and Applied Biochem.*, 1987. **9**: p. 95.
31. GUILBAULT, G.G., *Analytical Uses of Immobilized Enzymes*. 1984, New York: Marcel Dekker.
32. BARKER, S.A., *Immobilization of the Biological Component of Biosensors*, in *Fundamentals and Applications*, A.P.F. TURNER, I. KARUBE, and G. WILSON, Editors. 1987, Oxford University Press: Oxford. p. 85.
33. LUONG, J.H.T. and GUILBAULT, G.G., *Analytical Applications of Piezoelectric Crystal Biosensors*. Biosensor: Principles and Applications, 1991.
34. HANSEN, E.H., in *Analytica Chimica Acta*. 1989. p. 257.
35. YANG, M. and THOMPSON, M., *Surface Morphology and the Response of the Thickness-Shear Mode Acoustic Wave Sensor in Liquids*. Langmuir, 1993. **9**: p. 1990-1994.
36. VIG, J.R., *Quartz crystal resonators and oscillators for frequency control and timing applications*. A. Tutorial. Nota técnica U.S. Army Communications, 2000.

37. FARIA, R.C., *Desenvolvimento de instrumentação em microbalança de cristal de quartzo*, Departamento de Química. 2000, Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos: São Carlos. p. 174.
38. SAUERBREY, G., *Verwendung von schwingquarzen zur wägung dünner schichten und zur mikrowägung*. Zeitschrift für Physik, 1959. **155**: p. 206.
39. Q-SENSE, QCM-D technology, 2005, Disponível em: <http://www.q-sense.com/viewArticle.asp?ID=32>, Acesso em: 31-07-2006.
40. NOTLEY, S.M., ERIKSSON, M. and WÄGBERG, L., *Visco-elastic and adhesive properties of adsorbed polyelectrolyte multilayers determined in situ with QCM-D and AFM measurements*. Journal of Colloid and Interface Science, 2005. 292 p. 29–37.
41. HALTHUR, T.J., BJÖRKLUND, A. and ELOFSSON, U.M., *Self-Assembly/Aggregation Behavior and Adsorption of Enamel Matrix Derivate Protein to Silica Surfaces*. Langmuir, 2006. 22: p. 2227-2234.
42. GEDDES, N.J., et al., *Piezoelectric crystal for the detection of immunoreactions in buffer solutions*. Sensors and Actuators B, 1994. 17: p. 125-131.
43. MURATSUGU, M., et al., *Quartz crystal microbalance for the detection of microgram quantities of human serum albumin: Relationship between the frequency change and the mass of protein absorbed*. Analytical Chemistry, 1993. 65(20): p. 2933-2937.
44. BIZET, K., et al., *Validation of antibody-based recognition by piezoelectric transducers through electroacoustic admittance analysis*. Biosensors & Bioelectronics, 1998. 13: p. 259-269.
45. CALVO, E.J., FORZANI, E.S. and OTERO, M., *Study of Layer-by-Layer Self-Assembled Viscoelastic Films on Thickness-Shear Mode Resonator Surfaces*. Analytical Chemistry, 2002. 74(14): p. 3281-3289.
46. SCHUMACHER, R., *The Quartz Microbalance: A Novel Approach to the In-Situ Investigation of Interfacial Phenomena at the Solid/Liquid Junction*. Angewandte Chemie International Edition in English, 1990. 29(4): p. 329-438.
47. LEE, Y.-G. and CHANG, K. S., *Application of a flow type quartz crystal microbalance immunosensor for real time determination of cattle bovine ephemeral fever virus in liquid*. Talanta, 2005. 65: p. 1335-1342.
48. VIDAL, J.C., ESPUELAS, J. and CASTILLO, J.R., *Amperometric cholesterol biosensor based on in situ reconstituted cholesterol oxidase on an immobilized monolayer of flavin adenine dinucleotide cofactor*. Analytical Biochemistry, 2004. 333 p. 88–98.
49. TSAI, W.-C. and LIN, I. C., *Development of a piezoelectric immunosensor for the detection of alpha-fetoprotein*. Sensors and Actuators B, 2005. 106: p. 455-560.