

Figura 2. Espectro no infravermelho para o filme Qui/PEDOT:PSS com 7 bicamadas.

4 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi utilizada a técnica de LbL para crescimento de filmes nanoestruturados contendo quitosana. O crescimento dos filmes Qui/PEDOT:PSS e Qui/Ft, monitorado através do aumento na absorbância pelo número de bicamadas, apresentou comportamento linear. O espectro na região do infravermelho confirmou, através das bandas de transmissão características, a presença dos materiais no filme. Esses filmes serão utilizados como plataforma na imobilização de enzimas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a EMBRAPA e a FAPESP - processo: 2013/26712-7, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

DECHER, G.; HONG J. D.; SCHMITT, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films*, v. 210, n.1, p. 831-835, 1992.

KIM, S. K.; RAJAPAKSE, N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydrate Polymers*, v. 62, p. 357-368, 2005.

DESENVOLVIMENTO DE ARQUITETURAS NANOESTRUTURADAS PARA BIOCENSORES ELETROQUÍMICOS UTILIZANDO A TÉCNICA DE AUTOMONTAGEM

***Stanley E.R. Bilatto^{1,2}, Flávio M. Shimizu^{2,3}, Osvaldo N. Oliveira Jr.³, Odilio B.G.de Assis², Luiz H.C. Mattoso^{1,2}, Daniel S. Correa^{1,2}**

¹Departamento de Química, UFSCar, São Carlos, SP. ²Lab Nacional de Nanotec para o Agronegócio, Embrapa Instrumentação, São Carlos, SP. ³Instituto de Física de São Carlos, USP, São Carlos, SP.

*stanleyebr@yahoo.com.br

Classificação: Sensores e Biossensores.

Resumo

O presente estudo visou o desenvolvimento de filmes com arquiteturas nanoestruturadas para utilização em biossensores. Foram depositados filmes nanoestruturados através da técnica de automontagem

(layer-by-layer technique - LbL) utilizando as enzimas: lisozima, pepsina e tripsina e os polímeros hidrocloreto de polialilamina (PAH) como policátion e Poliestireno-sulfonato (PSS) como poliânion. O crescimento dos filmes foi caracterizado pela técnica espectroscópica na região do UV-Vis e a análise morfológica pela técnica de Microscopia de Força Atômica. Obtiveram-se filmes uniformes e com bom recobrimento superficial.

Palavras-chave: Biossensor; Layer-by-Layer; Polímeros, Enzimas.

DEVELOPMENT OF NANOSTRUCTURED ARCHITECTURES TO ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS USING SELF-ASSEMBLY TECHNIQUE

Abstract

The present work aims at developing films with nanostructured architectures to use in biosensors. Layer-by-layer nanostructured films were obtained with the following enzymes: lysozyme, pepsin and trypsin and the polymers: polyallylamine hydrochloride (PAH) and polystyrene sulfonate (PSS) which are the polycation and polyanion, respectively. The film growth was characterized by UV-Vis spectroscopic technique and the morphological analysis by Atomic Force Microscopy. Uniforms films with good surface coverage were observed.

Keywords: Biosensor; Layer-by-Layer; Polymer; Enzyme.

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de sensores e biossensores produzidos com materiais nanoestruturados se tornaram uma ferramenta imprescindível na avaliação de insumos e na detecção de contaminantes. Na agroindústria, contudo, a aplicação de biossensores encontra-se ainda incipiente e com largo espaço para exploração.

Biossensores são geralmente definidos como dispositivos que utilizam um bioreceptor seletivo com afinidade para uma amostra ou um analito de interesse. O bioreceptor (geralmente uma espécie bioquímica como anticorpos, oligonucleotídeos ou enzimas) é acoplado a um transdutor que utiliza um típico mecanismo bioquímico de reconhecimento e converte o resultado de interação em um sinal mensurável. O uso de uma enzima associada a um eletrodo é uma das mais simples e eficientes classes de biossensores. Esta aproximação combina a especificidade de uma reação enzimática com a força analítica de uma detecção eletroquímica. A enzima é normalmente imobilizada sobre um transdutor condutor e o sinal elétrico obtido é correlacionado com a espécie ou concentração do substrato a ser detectado (CORREA, 2014).

Neste trabalho será apresentada a preparação e caracterização de arquiteturas enzimáticas-polímericas nanoestruturadas para a detecção de patogênicos, para futura utilização em biossensores.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os reagentes empregados neste trabalho foram adquiridos da Sigma Aldrich: Lisozima, código L6876; Tripsina, código T8003 e Pepsina, código P6887, assim como os polímeros utilizados para o crescimento dos filmes: hidrocloreto de polialilamina (PAH) (policátion) e poliestireno-sulfonato (PSS) (poliânion).

Para preparo das enzimas foram utilizadas as soluções: Lisozima: pH = 6.2 tampão fosfato; Tripsina: pH = 8.3 tampão trizma; Pepsina: pH = 1.6 tampão fosfato.

Os filmes automontados foram depositados sobre lâminas de quartzo utilizando a técnica de LbL (DECHER, 1997). Antes do crescimento das bicamadas com as enzimas, depositaram-se 2 camadas poliméricas de PAH/PSS para favorecer o crescimento dos filmes enzimáticos. Foram estudados três arranjos de filmes: PAH/Pepsina, PAH/Lisozima e PAH/Tripsina, com distintas bicamadas (0 a 7).

O crescimento dos filmes automontados foi acompanhado utilizando-se a técnica de espectroscopia UV-Vis (Perkin Elmer – Lambda 25) e a caracterização morfológica pela técnica de Microscopia de Força Atômica com o equipamento Dimension V (Veeco), utilizando pontas de silício anexadas a um microcantilever de constante de mola 42,0 N/m e frequência de ressonância de 285,0 KHz. Todas as imagens foram obtidas em modo tappingTM com velocidade de varredura de 1,0 Hz. A raiz quadrada da média da rugosidade (Rms) e a espessura foram calculadas usando o software Gwyddion (Versão 2.18, Novembro 2008).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudou-se a formação de filmes automontados com as enzimas tripsina, tripsina e lisozima em lâminas de quartzo, sendo acompanhado a cinética de crescimento dos filmes, ou seja, a variação na concentração de material adsorvido na superfície do quartzo em função do incremento da absorbância observado em 220 nm. Foram depositadas bicamadas PSS/enzima, variando-se a concentração das enzimas.

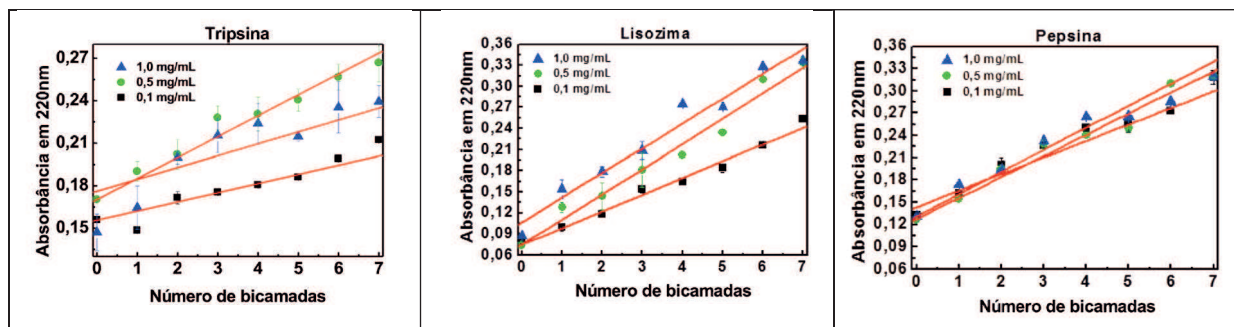


Figura 1. Gráfico da absorbância de diferentes bicamadas de enzimas (Tripsina, Lisozima e Pepsina, respectivamente) sobre quartzo variando-se a concentração enzimática.

Pode-se observar um crescimento constante e linear em todos os casos analisados. O crescimento nos valores de absorbância comprovaram que a deposição por LbL resulta na adsorção das bicamadas polímero/enzima.

Segundo estudos (JIN, 1995), a dependência da resposta do eletrodo com o número de camadas enzimáticas é alcançada com a deposição de até 6-7 camadas, onde observou a transição da dependência cinética para a difusional, obtendo uma resposta elétrica constante. Para o nosso estudo, determinou-se a utilização de no máximo 7 camadas enzimáticas. Pode-se também observar a variação do crescimento dos filmes com as diferentes concentrações, das quais optou-se por utilizar a concentração de 0.5 mg/mL, por ser uma concentração média e apresentar um caráter otimizado frente a maiores concentrações.

Na Figura 2, estão apresentadas as micrografias de força atômica comparando “substrato de quartzo/camada colchão” com “substrato de quartzo/camada colchão/1 camada enzimática”. Os valores de rugosidade estão indicados abaixo de cada imagem.

Substrato + camada colchão	1 camada enzimática
Tripsina	
<p style="text-align: center;">$r_q = 2,38 \text{ nm}$</p>	<p style="text-align: center;">$r_q = 1,55 \text{ nm}$</p>
Pepsina	
<p style="text-align: center;">$r_q = 3,65 \text{ nm}$</p>	<p style="text-align: center;">$r_q = 1,7 \text{ nm}$</p>

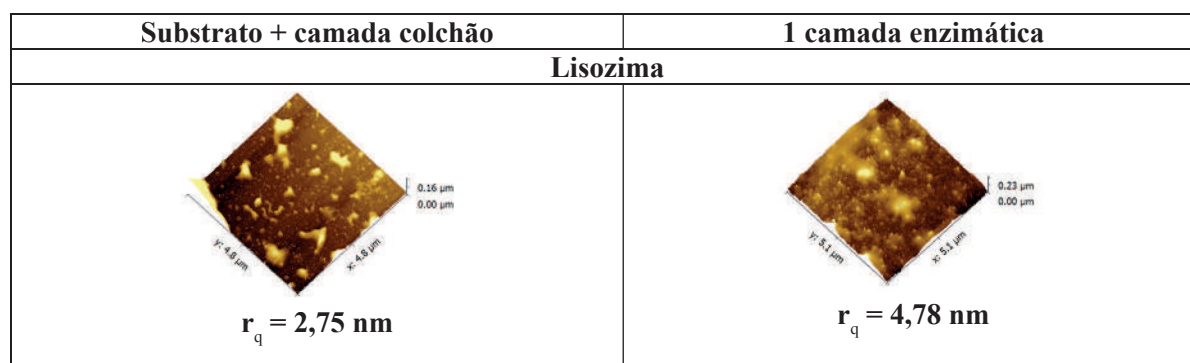


Figura 2. Micrografias de força atômica.

Pode-se observar que a deposição da camada colchão recobriu totalmente o substrato, porém de forma irregular. A deposição de tripsina e pepsina diminuiram o valor da rugosidade dos filmes auto-montados, enquanto a lisozima teve efeito contrário, aumentando a rugosidade.

4 CONCLUSÃO

O estudo realizado determinou os parâmetros para o crescimento de filmes poliméricos/enzimáticos utilizando a técnica de LbL, assim como a concentração das enzimas a serem utilizadas. Estudos por AFM demonstraram a eficiência de recobrimento da arquitetura proposta. Novos estudos e caracterizações físico-químicas estão em andamento para aplicação destes filmes em biossensores.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, Finep, FAPESP, Capes e Projeto MP1 Rede Agronano – Embrapa.

REFERÊNCIAS

CORREA, D.S., MEDEIROS, E.S., OLIVEIRA, J.E., PATERNO, L.G. AND MATTOSO, L.H.C. Nanostructured Conjugated Polymers in Chemical Sensors: Synthesis, Properties and Applications. *J. Nanosci. Nanotechnology*, v. 14, n. 9, p. 6509-6527, 2014.

DECHER, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* 277, p. 1232, 1997.

JIN, W., BIER, F., WOLLENBERGER, U., SCHELLER, F. Construction and characterization of multi-layer-enzyme electrode-Covalent binding of quinoprotein glucose dehydrogenase onto gold electrodes. *Biosensors Bioelec*, 10, p. 823–829, 1995.

MICRO- E NANOFIBRAS DE POLIMETILMETACRILATO CONTENDO O POLÍMERO LUMINESCENTE MEH-PPV

Aline P. Roque,¹ Luiza A. Mercante,¹ Vanessa P. Scagion,^{1,2} Juliano E. Oliveira,³ Luiz H. C. Mattoso,¹ Leonardo De Boni,⁴ Cleber R. Mendonca,⁴ Daniel S. Correa,^{1,2}

¹Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio (LNNA), Embrapa Instrumentação, São Carlos, SP. ²Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP. ³Departamento de Engenharia de Materiais (DEMAT), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, PB.

⁴Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, SP.

*alineperoque@gmail.com

Classificação: Sensores e Biossensores.