



## DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSOR BASEADO EM MICROCANTILEVER PARA DETECÇÃO DE ETANOLA.

Margarido<sup>1,2</sup>, F.M. Araujo-Moreira<sup>1</sup>, L.A. Colnago<sup>2</sup>, P.S.P. Herrmann<sup>3</sup>

(1) Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, 13565-905, São Carlos, SP,  
alexandre\_margarido@yahoo.com.br, faraujo@df.ufscar.br

(2) Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro, 1452, 13560-970, São Carlos SP, luiz.colnago@embrapa.br

(3) Embrapa LABEX Europa, Forschungszentrum Jülich, IBG-2 Plant Sciences, Jülich, Alemenha,  
p.herrmann@fz-juelich.de

**Resumo:** No presente trabalho é apresentado o desenvolvimento de biossensores de microcantilever funcionalizado com a enzima álcool desidrogenase para detecção de moléculas de etanol. Para o experimento três diferentes tipos de biolinkers foram utilizados para revestir a superfície do microcantilever e monitorar a atividade da enzima com a microscopia de força atômica (AFM), no modo dinâmico. Observou-se diferentes respostas, a técnica de funcionalização utilizando glutaraldeído apresentou um ganho muito significativo na detecção seletiva do substrato e facilidade de preparo, enquanto que com a utilização de tióis, constatou-se uma funcionalização mais uniforme porém com menor sensibilidade, alto custo e tempo de preparo.

**Palavras-chave:** microcantilever, biossensor, AFM, álcool desidrogenase, etanol.

### *DEVELOPMENT BASED ON MICROCANTILVER BIOSENSOR FOR DETECTION OF ETHANOL*

**Abstract:** Development of functionalized microcantilever biosensors for ethanol molecules detection was performed using alcohol dehydrogenase enzyme. In this study, three different biolinkers were used to modify the microcantilever and monitor enzyme activity with Atomic Microscopy Force (AFM) in dynamic mode. Different responses was observed, the functionalization technique using glutaraldehyde showed a very significant gain in the selective detection of the substrate and ease of preparation, while using the thiol, there was a more uniform functionalisation but with lower sensitivity, high cost and long preparation time.

**Keywords:** microcantilever, biossensor, AFM, álcool dehydrogenase, ethanol.

### 1. Introdução

O etanol é um composto importante na medicina, biotecnologia, indústria de alimentos, etc., entretanto, deve ser regularmente monitorado devido a seu efeito toxicológico e psicológico (CAI et al., 2007).

Biossensores de microcantilever ( $\mu\text{C}$ ) oferecem vantagens comparativas, que estão relacionadas, a resposta dinâmica, com tamanho bastante reduzido, alta precisão, seletividade e maior confiabilidade em comparação com sensores convencionais. Para esta finalidade, foi desenvolvido um biossensor através da imobilização da enzima álcool desidrogenase na superfície de um  $\mu\text{C}$ . Utilizando um microscópio de força atômica (AFM), foi possível quantificar a detecção da adsorção de moléculas de etanol na superfície da haste, com elevada sensibilidade (em média  $4,35845\text{E}+13$  moléculas/s com glutaraldeído e  $6,13278\text{E}+11$  moléculas/s com tiol), seletividade (substratos diferentes de etanol e metanol foram testados e não foram detectados) e reprodutibilidade (três ensaios realizados por semana testados por 4 semanas, com perda de sensibilidade apenas na última semana). Quando uma molécula de etanol interage com a enzima imobilizada, provoca um aumento da massa adsorvida na haste alterando a frequência natural de ressonância, que é detectada pelo AFM em modo dinâmico. A mudança na frequência de ressonância pode ser diretamente relacionada com a variação da massa através da seguinte equação (HANSEN; THUNDAT, 2005):

$$\Delta m = \left( \frac{K}{4\pi^2} \right) \cdot \left( \frac{1}{f_1^2} - \frac{1}{f_0^2} \right) \quad (1)$$

onde K é a constante de mola do  $\mu\text{C}$  e  $f_0$  e  $f_1$  são respectivamente a frequência de ressonância antes de depois da adsorção.

## 2. Materiais e Métodos

O biossensor foi desenvolvido utilizando os seguintes reagentes e equipamentos: Enzima Álcool Desidrogenase (A7011 - Sigma Aldrich), Glutaraldeído 25% (G5882 – Sigma Aldrich), Albumina de soro bovino - BSA (A7906 – Sigma Aldrich), Tiol 6-Amino-1-hexanethiol hydrochloride (739294 - Sigma Aldrich) e Tiol 11-Amino-1-undecanethiol hydrochloride (674397 - Sigma Aldrich),  $\mu$ C (NT-MDT NSG10) e AFM (Veeco – Dimension V).

Para realizar as medidas de frequência do  $\mu$ C funcionalizado (NSG10) no AFM foi necessário adaptar um suporte de acrílico com volume máximo de 9ml para as amostras Figura 1, (STEFFENS et al., 2012).



Figura 1. Diagrama da célula de medição (a) vedação de silicone e suporte do  $\mu$ C (b), AFM (c) (STEFFENS et al., 2011).

Os ensaios foram realizados em condições de laboratório, a 25° C de temperatura e 55% de umidade relativa. O substrato utilizado foi 5.0 $\mu$ L de etanol 99,5%, com tempo de evaporação total em média de 3 minutos.

Testes realizados com o espectrofotômetro de UV a 340nm, foram utilizados para verificar a atividade da enzima.

Para a funcionalização com glutaraldeído, a solução estoque foi preparada com 1,8  $\mu$ moles da enzima álcool desidrogenase e 0,5 mg de BSA, em 1,0 ml de água Milli-Q. Cinco microlitros (5.0 $\mu$ L) desta mistura foram depositadas em uma lamina de vidro e um novo  $\mu$ C foi mergulhado nesta solução. Então 1,0  $\mu$ L de glutaraldeído 25% (reagente de reticulação) foi adicionada à mistura, formando um gel sobre a superfície do  $\mu$ C. Após 1,0 minuto o  $\mu$ C foi retirado da solução e seco durante 3 horas à temperatura ambiente, seguido de lavagem com água Milli-Q para remover o excesso de reagentes (ADELOJU, 2011).

Para a funcionalização utilizando tiois, um novo  $\mu$ C foi limpo e revestido de ouro com 20 nm de espessura de um lado pelo método de “sputtering” e lavado com solução piranha (ácido sulfúrico 70% e 30% de peróxido de hidrogênio, na proporção 3: 1) durante 15 min. A superfície de ouro tem tendência para absorver substâncias orgânicas, por conseguinte, é necessário remover estas substâncias a partir da superfície do metal, antes da preparação da monocamada (SAM) (DOJINDO, 2014; SCHREIBER, 2000).

Para a formação de SAM, soluções de 1,0 mM de cloridrato de tiol 6-amino-1-hexanotiol (6C) e cloridrato de 11-amino-1-undecanethiol (11C) foram aplicadas sobre o  $\mu$ C preparado durante 24 horas e secou-se com nitrogênio.

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1. Funcionalização com glutaraldeído

O biossensor de  $\mu$ C funcionalizado foi testado na célula de medição e o resultado obtido é demonstrado na Figura 2, na tabela anexa estão os valores obtidos e legendas: “ $\Delta m$ ”, é a variação de massa, “qt mol” é a quantidade de moléculas adsorvidas na haste, “qt enz” é a quantidade de enzimas na haste e “Var” é a variação máxima da frequência de ressonância para este ensaio, e no quadro (B) o aumento da massa da haste após a funcionalização.

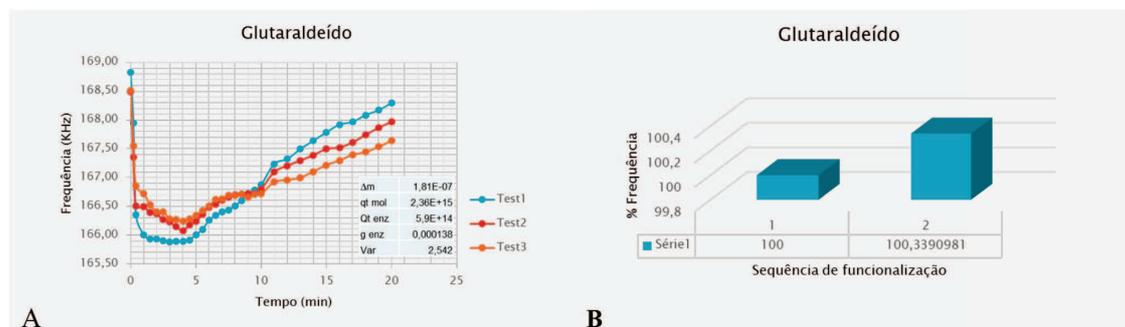


Figura 2. (A) Resposta do biossensor a 5 $\mu$ L de etanol (triplicata), (B) Variação da frequência após funcionalização.

A análise gráfica permite estimar a quantidade de massa adsorvida e enzimas imobilizadas, figura 2 (A), o tempo total de evaporação de etanol (a  $\rightarrow$  b) e o tempo de detecção (a  $\rightarrow$  c).

3.2. Funcionalização - deposição de alquiltióis na superfície recoberta de ouro (SAM)

Foi utilizada a mesma solução estoque com a enzima álcool-desidrogenase de 1,8 μmoles com / sem 0,5 mg de BSA, em 1,0mL de água Milli-Q. Após 8 horas, o μC foi retirado do recipiente de vidro contendo enzimas solubilizadas, secou-se durante 3 horas à temperatura ambiente e lavou-se com água Milli-Q para remover o excesso de reagentes.

Para cada deposição, foi realizada a medida da ressonância a cada passo conforme a figura 3, comparando os resultados com e sem o BSA.



Figura 3. Comparativo da frequência de ressonância a cada passo da funcionalização (1: μC novo; 2: banho de ouro; 3: solução piranha; 4: SAMs; 5: Enzima +/- BSA). a) Tiol 11C, b) Tiol 6C.

Para cada combinação, foi analisada a variação da frequência de ressonância por 20 minutos com a exposição de 5μL de etanol 99.5%, a 25° C, Figura 4.

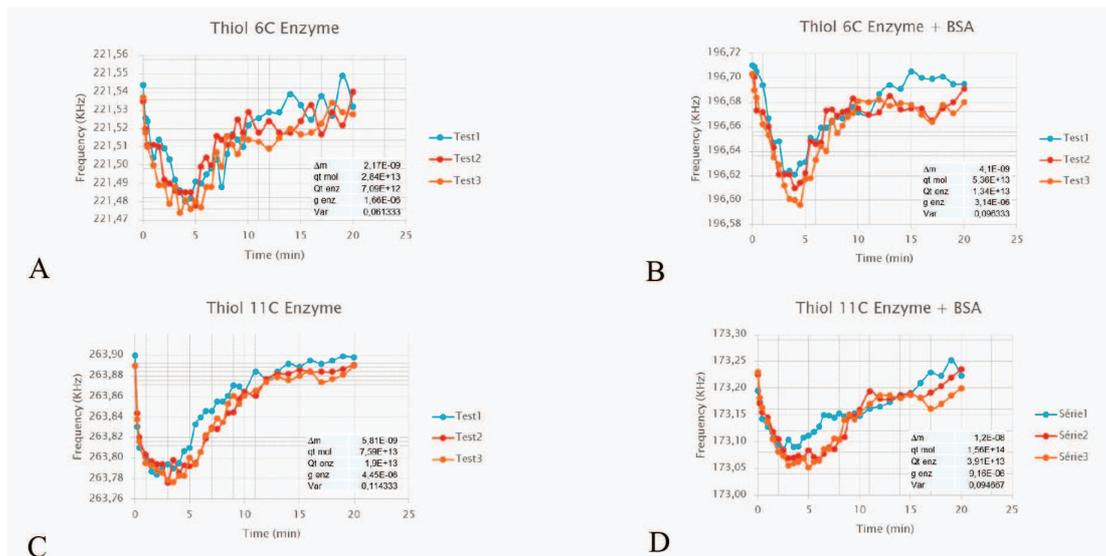


Figura 4. Resposta do biossensor para 5μL de etanol (triplicata), em diferentes composições.

Na figura 5, fica evidente a maior adsorção de substrato com o método utilizando glutaraldeído, onde constatou a maior variação da frequência de ressonância.

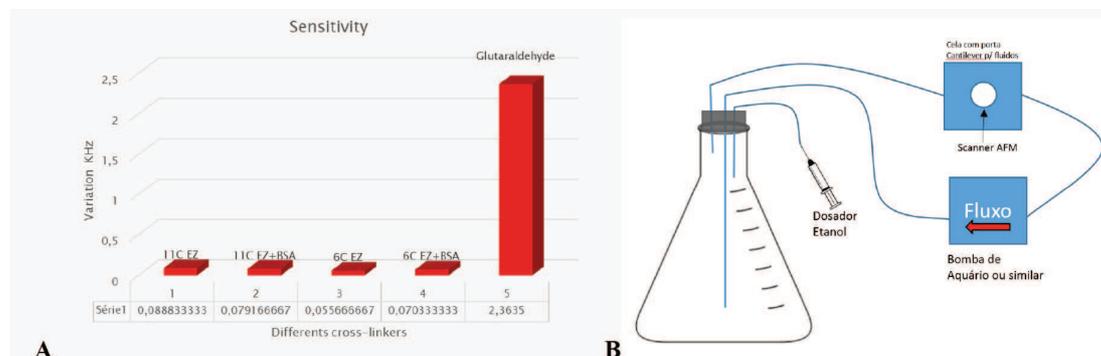


Figura 5. (A) Comparativo da sensibilidade com diferentes biolinkers, em média 4,35845E+13 moléculas/s adsorvidas com glutaraldeído e 6,13278E+11 moléculas/s com tiol. (B) Sistema para diluição controlada de etanol no ar para determinar início de sensibilidade.

O biossensor funcionalizado com glutaraldeído iniciou sua detecção com 0,00394mg/L de etanol, equivalente a 394ppt (partes por trilhão), comparado com o sensor de etanol comercial MQ-3 gas sensor da Hanwei Electronics CO LTDA, inicia sua detecção em 0,05mg/L ou seja 200ppm (HANWEI, 2014).

#### 4. Conclusões

Apesar de diminuir o fator de qualidade do  $\mu\text{C}$ , o glutaraldeído é o que proporcionou melhor resultado para a aplicação específica, não só devido ao menor custo, bem como em relação a sua facilidade de manuseamento, ao tempo de montagem e de resposta em ppt, a praticidade e a durabilidade. Ambos os biossensores mantiveram uma boa resposta, mesmo após 4 semanas armazenadas a 5° C. A enzima em estado solubilizado não resistiu por mais de 10 horas. Pequenas variações de umidade e temperatura (~ 5%) não influenciaram na resposta do biossensor. O uso de BSA, apesar de aumentar a rugosidade da superfície não influenciou na sensibilidade de detecção. NAD e BSA não foram necessárias para atividade enzimática. Em todos os biossensores, moléculas de etanol puderam ser detectadas por quase 20 minutos, em que poucas moléculas foram imobilizadas na superfície do  $\mu\text{C}$ . Esta pode ser uma técnica de solução alternativa de Eletroantenografia, porém mais rápido, simples, seguro e barato.

#### Agradecimentos

Agradecimento pelo apoio financeiro da agencia CNPq, processo: 141267/2013-5.

#### Referências

- CAI, C.; XUE, K., ZHOU, Y., YANG, H., “Amperometric biosensor for ethanol based on immobilization of alcohol dehydrogenase on a nickel hexacyanoferrate modified microband gold electrode,” *Talanta*, vol. 44, pp 339-347, 2007.
- HANSEN, K. M., THUNDAT, T., “Microcantilever biosensors,” *Methods*, vol. 37, pp 57-64, 2005.
- STEFFENS C. “Atomic force microscopy as a tool applied to nano/biosensors,” *Sensors*, vol.12, pp 8278-8300, Aug. 2012.
- THUNDAT, T. et al. Cantilever Sensor: Nanomechanical tolls for diagnostics. *MRS Bulletin*, v. 34, p. 449-454, June 2009.
- <http://www.dojindo.com/store/c/120-Surface-Modification.html> visited on 14/04/2014.
- ADELOJU S. B. et al. Fabrication of a bilayer potentiometric phosphate biosensor by cross-link immobilization with bovine serum albumin and glutaraldehyde. *Analytica Chimica Acta*, v.691, p.89–94, Nov. 2011.
- SCHREIBER, F. Structure and growth of self-assembling monolayers. *Progress in Surface Science*, V. 65, Issues 5–8, P. 151–257, December 2000.
- HANWEI. MQ-3. p. Gas Sensor, 2014. Disponível em: < <http://www.hwsensor.com> >. Acesso em: 09-10-2014.