



ESTUDO DE FILMES DE LANGMUIR E LANGMUIR-BLODGETT VISANDO O  
DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR DE COLESTEROL

Juliana Aguilar Guimarães

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em Engenharia  
Química, COPPE, da Universidade Federal do  
Rio de Janeiro, como parte dos requisitos  
necessários à obtenção do título de Mestre em  
Engenharia Química.

Orientadores: Tito Lívio Moitinho Alves  
Helen Conceição Ferraz

Rio de Janeiro  
Abril de 2009

ESTUDO DE FILMES DE LANGMUIR E LANGMUIR-BLODGETT VISANDO O  
DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR DE COLESTEROL

Juliana Aguilar Guimarães

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO  
LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA  
(COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE  
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE  
EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Aprovada por:

---

Prof. Tito Lívio Moitinho Alves, D.Sc.

---

Prof<sup>a</sup>. Helen Conceição Ferraz, D.Sc.

---

Prof<sup>a</sup>. Vera Maria Martins Salim, D.Sc.

---

Prof. Márcio Nele de Souza, D.Sc.

---

Prof<sup>a</sup>. Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

ABRIL DE 2009

Guimarães, Juliana Aguilar

Estudo de Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett Visando o Desenvolvimento de Biossensor de Colesterol/ Juliana Aguilar Guimarães. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2009.

XVII, 99 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Tito Lívio Moitinho Alves

Helen Conceição Ferraz

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2009.

Referencias Bibliográficas: p. 87-92.

1. Filmes de Langmuir. 2. Colesterol oxidase. 3. Biossensor. I. Alves, Tito Lívio Moitinho *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

À minha família.

## **Agradecimentos**

Primeiramente, agradeço a Deus, por abençoar-me todos os dias, e a minha família, por todo seu amor.

Aos meus orientadores Tito e Helen, por acreditar em mim e desenvolver esse trabalho inovador no programa, que por isso contou com muitos desafios. Agradeço também a boa amizade, às palavras de incentivo e ao apoio na busca do conhecimento.

Aos colegas e amigos com quem partilhei as salas de aula e os laboratórios de Bioprocessos e Fenômenos Interfaciais. Às pessoas que contribuíram na parte experimental deste trabalho, em especial, Liliane e Mariana (PAM), Indira (Engene Tech) e Cecília (INMETRO), sempre prontos a ajudar. Ao professor Casé e seus alunos (Pedro, Priscila, Adriana, Diogo, etc.), da UNESP – Presidente Prudente, por toda receptividade e apoio.

Aos membros da banca por aceitarem o convite e pela grande contribuição com sugestões e críticas ao trabalho. À Prof<sup>a</sup>. Renata Simão (MetalMat/COPPE) pela ajuda na interpretação das imagens de AFM e à Deborah Vargas (NUCAT/COPPE), pela atenção e sugestões referentes aos resultados de FT-IR.

Ao Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ e às pessoas que fazem parte dele (Paula, Luciana, Artur, Wagner, etc.).

À Capes e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

ESTUDO DE FILMES DE LANGMUIR E LANGMUIR-BLODGETT VISANDO O  
DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSOR DE COLESTEROL

Juliana Aguilar Guimarães

Abril/2009

Orientadores: Tito Lívio Moitinho Alves

Helen Conceição Ferraz

Programa: Engenharia Química

Neste trabalho estudou-se a formação de filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett da colesterol oxidase (COx), responsável pela catálise enzimática do colesterol e matéria-prima de interesse para o desenvolvimento de biossensores. Foi possível preparar filmes mistos de COx / proteínas da camada S (proteínas com capacidade de auto-organização na interface) e de DPPC / proteínas da camada S. A COx e as proteínas apresentaram propriedades anfífilas, formando filmes de Langmuir na interface ar-água e ar-sólido, com alta reprodutibilidade. A caracterização dos filmes de Langmuir foi feita através de isotermas  $\pi - A$  e a dos filmes LB, por AFM, FT-IR e, quando transferidos para superfícies do eletrodo de trabalho de um sensor impresso, por caracterização eletroquímica, que se mostrou uma técnica adequada para avaliar os biossensores obtidos, além de confirmar a transferência do filme de Langmuir. Observou-se que a técnica de deposição do filme para obtenção do biossensor afeta a capacidade de detecção do mesmo. A presença das proteínas de camada S juntamente com a COx contribuiu para a obtenção de biossensores com propriedades mais adequadas ao uso, com maior pico de oxidação, com reação mais rápida e para uma menor diferença de potencial menor.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

STUDY OF LANGMUIR AND LANGMUIR-BLODGETT FILMS AIMING THE  
DEVELOPMENT OF CHOLESTEROL BIOSENSOR

Juliana Aguilar Guimarães

April/2009

Advisors: Tito Lívio Moitinho Alves

Helen Conceição Ferraz

Department: Chemical Engineering

This work studied the formation Langmuir and Langmuir-Blodgett films of cholesterol oxidase (COx), responsible for enzymatic catalysis of cholesterol and raw material of interest to the biosensor development. It was possible to prepare mixed films of COx / S-layer proteins (proteins with the ability of self-organization at the interface) and DPPC / S-layer proteins. The COx and proteins presented amphiphilic properties, producing Langmuir films at the interface air-water and air-solid, with high reproducibility. The characterization of Langmuir films was done by isotherms  $\pi$  - A while the LB films were characterized by AFM, FT-IR. After LB films deposition on the surface of work printed sensors, electrochemical characterization was employed, and shown to be a suitable technique to assess the biosensors obtained. Through this technique, the transfer of the Langmuir film to the electrode was confirmed. It was observed that film deposition technique for obtaining biosensor affects its ability of detection. The presence of S-layer proteins in mixed films with the COx contributed to the achievement of biosensors with properties more appropriate to use, with higher redox peaks, faster reaction rate and a lower potential difference.

## ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Introdução e Objetivos</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1. Introdução  | 1         |
| 1.2. Objetivos   | 4         |
| 1.3. Organização da Dissertação  | 4         |
| <br>   |           |
| <b>Revisão Bibliográfica.</b>  | <b>5</b>  |
| 2.1. Introdução  | 5         |
| 2.2. Biossensor  | 5         |
| 2.2.1. Técnicas de Imobilização  | 7         |
| 2.2.2. Histórico dos Biossensores e Aplicações                                 | 7         |
| 2.2.3. Biossensor de Colesterol  | 8         |
| 2.2.4. Eletroquímica   | 10        |
| 2.3. Filmes Monomoleculares  | 12        |
| 2.3.1. Histórico sobre os Filmes Monomoleculares                               | 12        |
| 2.3.2. Propriedades dos Filmes Finos   | 14        |
| 2.3.2.1. Tensão Superficial ( $\gamma$ )                                       | 14        |
| 2.3.2.2. Pressão de Superfície ( $\pi$ )                                       | 15        |
| 2.3.2.3. Potencial de Superfície ( $\Delta V$ )                                | 17        |
| 2.3.3. Filmes de Langmuir, Langmuir-Blodgett e Langmuir-Schaefer               | 17        |
| 2.3.4. Filmes de Lipídeos, Proteínas e Enzimas                                 | 20        |
| 2.3.5. Técnicas de Caracterização dos Filmes Finos                             | 22        |
| 2.3.6. Aplicação de Filmes de Langmuir e LB em Biossensores                    | 23        |
| 2.4. Proteínas da Camada S   | 24        |
| 2.4.1. Obtenção e Auto-montagem na Interface                                   | 26        |
| 2.4.2. Aplicação das Proteínas da Camada S em Biossensores                     | 27        |
| <br>   |           |
| <b>Materiais e Métodos</b>   | <b>29</b> |
| 3.1. Introdução  | 29        |
| 3.2. A Bactéria <i>Bacillus sphaericus</i> CCM 2177 e as Proteínas da Camada S | 29        |
| 3.2.1. Meio de Cultivo   | 29        |
| 3.2.2. Cultivo Inicial e Estocagem   | 30        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.2.3. Cultivo                                     | 30        |
| 3.2.4. Curva de Crescimento                        | 30        |
| 3.2.5. Curva de Massa Seca                         | 31        |
| 3.2.6. Extração e Isolamento                       | 31        |
| 3.2.7. Purificação                                 | 34        |
| 3.3. Enzima Colesterol Oxidase                     | 35        |
| 3.4. Caracterização das Proteínas e Enzimas        | 36        |
| 3.4.1. Dosagem de Proteínas                        | 36        |
| 3.4.2. Eletroforese                                | 37        |
| 3.5. Formação de Filmes de Langmuir                | 38        |
| 3.5.1. Cuba de Langmuir e Estrutura do Laboratório | 38        |
| 3.5.2. Materiais                                   | 39        |
| 3.5.3. Isotermas $\pi - A$                         | 40        |
| 3.5.4. Ciclos de Compressão-Descompressão          | 41        |
| 3.5.5. Estudo da Estabilidade dos Filmes           | 42        |
| 3.6. Formação de Filmes de Langmuir-Blodgett       | 42        |
| 3.6.1. Escolha do Suporte Sólido                   | 43        |
| 3.6.2. Caracterização                              | 43        |
| 3.7. Biossensor de Colesterol                      | 44        |
| 3.8. Caracterização Eletroquímica                  | 46        |
| 3.8.1. Preparação de Soluções de Colesterol        | 46        |
| 3.8.2. Ciclos Voltamétricos                        | 46        |
| <b>Resultados e Discussões</b>                     | <b>48</b> |
| 4.1. Introdução                                    | 48        |
| 4.2. Proteínas da Camada S                         | 48        |
| 4.2.1. Curva de Crescimento                        | 48        |
| 4.2.2. Curva de Massa Seca                         | 49        |
| 4.2.3. Extração e Isolamento                       | 50        |
| 4.2.4. Purificação                                 | 52        |
| 4.3. Filmes de Langmuir                            | 55        |
| 4.3.1. Filme Lipídico de DPPC                      | 56        |
| 4.3.2. Filmes Protéicos                            | 58        |
| 4.3.2.1. Filmes das Proteínas da Camada S          | 58        |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.3.2.2. Filmes Monomoleculares da Enzima COx              | 62        |
| 4.3.3. Filmes LB Mistos                                    | 63        |
| 4.4. Filmes de Langmuir-Blodgett                           | 65        |
| 4.5. Caracterização Eletroquímica                          | 73        |
| <b>Conclusões e Sugestões</b>                              | <b>83</b> |
| 5.1. Conclusões  | 83        |
| 5.2. Sugestões   | 85        |
| <b>Referências Bibliográficas</b>                          | <b>87</b> |
| <b>ANEXO I – Protocolo de Eletroforese</b>                 | <b>93</b> |
| <b>ANEXO II – Controle de Caracterização Eletroquímica</b> | <b>96</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 2.1. Desenho esquemático do funcionamento de um biossensor eletroquímico.  | 6  |
| Figura 2.2. Esquema de um biossensor de colesterol.   | 9  |
| Figura 2.3. Mecanismo de oxidação de colesterol pela enzima colesterol oxidase (COx).<br>Adaptada de ARYA <i>et al.</i> , 2008  | 9  |
| Figura 2.4. Esquema da variação do potencial no tempo. Sendo (a) diminuição linear, (b) limite inferior, (c) aumento linear e (d) limite superior do potencial aplicado ao sistema no primeiro ciclo (adaptada de TAVARES, 2004).   | 11 |
| Figura 2.5. Esquema de uma molécula anfifílica na superfície ar-água  | 12 |
| Figura 2.6. Ilustração das forças de atração entre as moléculas na superfície e no interior de um líquido (BORGES <i>et al.</i> , 2005).  | 14 |
| Figura 2.7. Isotermas $\pi - A$ de um fosfolipídio (DPPC). Ilustração modificada de GIRARD-EGROT <i>et al.</i> , (2005).  | 16 |
| Figura 2.8. Esquema das técnicas LB (a) e LS (b), mostrando a subfase aquosa, as barreiras móveis da cuba de Langmuir comprimindo um filme monomolecular na interface ar-água e o substrato sólido. Adaptada de RUBINGER <i>et al.</i> , 2006   | 18 |
| Figura 2.9. Tipos de deposição do filme de Langmuir num suporte através da técnica LB, sendo (a) deposição tipo X, em substrato hidrofóbico, (b) deposição tipo Y, em substrato hidrofílico e (c) deposição tipo Z, em substrato hidrofílico.   | 19 |
| Figura 2.10. Ilustração das três formas de adsorção para formar monocamadas de proteínas através das técnicas de Langmuir e Langmuir-Blodgett. (A) e (B) Filmes simples através da adsorção na superfície aquosa, pela injeção da solução de proteínas na subfase ou pelo espalhamento na interface, respectivamente. (C) e (D) Filmes mistos pela adsorção na interface de uma monocamada lipídica de Langmuir e de Langmuir-Blodgett, respectivamente. Adaptada de LEBLANC e HUO, 2006. | 21 |
| Figura 2.11. Ilustração da organização estrutural (oblíqua - p1 e quadrada - p4) dos reticulados das proteínas da camada S. Adaptada de SLEYTR <i>et al.</i> (2003).  | 25 |

- Figura 2.12. Ilustração esquemática da recristalização das subunidades das proteínas da camada S em arranjos bidimensionais. O processo de auto-organização pode ocorrer em suspensão (a), na interface ar-líquido (b), na interface sólido-líquido (c) e em filmes de fosfo- ou tetraeterlipídios (d). Figura adaptada de PUM *et al.* (2000). 26
- Figura 3.1. Ilustração esquemática do procedimento de extração das proteínas da camada S (obtenção da amostra zero e amostra 1). 32
- Figura 3.2. Ilustração esquemática da extração das proteínas da camada S com etapa de diálise contra solução de cloreto de cálcio 10 mM, obtendo as amostras 2 e 3. 32
- Figura 3.3. Ilustração esquemática do procedimento de extração das proteínas da camada S com precipitação com etanol a 80% (v/v), obtendo as amostras 4 e 5. 33
- Figura 3.4. Ilustração esquemática do procedimento de extração das proteínas da camada S com precipitação com sulfato de amônio a 75% da saturação, obtendo as amostras 6, 7 e 8. 34
- Figura 3.5. (A) Cuba de Langmuir KSV 2000 (V = 1500 mL) e (B) cuba de Langmuir MicroTrough - S, Kibron (V = 50 mL). 39
- Figura 3.6. Aparato utilizado na deposição LB – cuba de Langmuir (*Kibron*). Sendo: (1) aparato de Langmuir-Blodgett para deposição, (2) porta-suporte (3) suporte para deposição. 43
- Figura 3.7. Ilustração com a configuração do sensor. 44
- Figura 4.1. Curva de crescimento de *B. sphaericus* – CCM 2177 em caldo nutriente, sob agitação de 170 rpm, 30°C, ambiente estéril, por 28 horas. 49
- Figura 4.2. Curva de massa seca do *B. sphaericus* CCM 2177 cultivada em caldo nutriente sob agitação de 170 rpm, 30°C, ambiente estéril, por 24 horas. 49

Figura 4.3. Gel de SDS-PAGE 10% de extratos celulares de *B. sphaericus*. O padrão utilizado foi a proteína BSA (67 kDa) e as amostras numeradas são as amostras: (1) com uma única extração com hidrocloreto de guanidina, (2) extração seguida de diálise contra solução de CaCl<sub>2</sub> 10 mM, (3) dupla extração intercalada por diálise contra CaCl<sub>2</sub> 10 mM, (4) extração seguida de precipitação com etanol 80% (v/v), (5) dupla extração intercalada por precipitação com etanol, (6) extração seguida de precipitação com sulfato de amônio 75% da saturação, (7) extração seguida de ressuspensão em tampão Tris-HCl do precipitado obtido com sulfato e, (8) dupla extração intercalada por precipitação com sulfato.

51

Figura 4.4. Fotos obtidas durante a diálise dos extratos celulares contendo as proteínas da camada S contra solução de CaCl<sub>2</sub> 10 mM.

52

Figura 4.5. Dosagem de proteínas pelo método de Bradford das frações da cromatografia de troca iônica do extrato de proteínas da camada S do *B. sphaericus* CCM 2177, utilizando uma coluna comercial Hitrap QFF, a 25°C.

53

Figura 4.6. Gel de SDS-PAGE 10% (1) do padrão Bio-Rad e (2) das frações 21 e 22, misturadas e concentradas, geradas a partir da cromatografia de troca iônica, coluna comercial HiTrap QFF.

54

Figura 4.7. Dosagem de proteínas pelo método de Bradford das frações da cromatografia de Afinidade Hidrofóbica do extrato de proteínas da camada S do *B. sphaericus* CCM 2177, utilizando uma coluna comercial HiTrap Butyl FF, a 25°C.

54

Figura 4.8. Isoterma  $\pi - A$  do filme de DPPC em clorofórmio (volume aplicado de 100  $\mu\text{L}$ , concentração igual a 0,85  $\text{mg mL}^{-1}$ ) propagado sobre a superfície da subfase de água ultra pura (cuba KSV 2000), a  $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . O valor obtido pela intersecção da linha tracejada com o eixo das abscissas representa a área média ocupada por uma molécula no filme de Langmuir.

57

Figura 4.9. Isoterma  $\pi - A$  do filme das proteínas da camada S (volume aplicado de 10  $\mu\text{L}$ , concentração de 0,762  $\text{mg mL}^{-1}$  de proteínas em tampão fosfato pH 7,0) propagadas na superfície da subfase de água (cuba Kibron – S), a  $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ .

58

- Figura 4.10. Ciclos de compressão-descompressão do filme das proteínas da camada S (volume aplicado de 50  $\mu\text{L}$ , concentração de 0,762  $\text{mg mL}^{-1}$  de proteínas em tampão fosfato pH 7,0) propagadas na superfície da subfase de água (cuba KSV 2000), senso o filme comprimido até uma pressão de superfície de 15  $\text{mN m}^{-1}$ , a  $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . 59
- Figura 4.11. Ciclos de compressão-descompressão do filme das proteínas da camada S (volume aplicado de 50  $\mu\text{L}$ , concentração de 0,762  $\text{mg mL}^{-1}$  de proteínas em tampão fosfato pH 7,0) propagadas na superfície da subfase de água (cuba KSV 2000), senso o filme comprimido até uma pressão de superfície de 30  $\text{mN m}^{-1}$ , a  $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . 60
- Figura 4.12. Teste de estabilidade do filme das proteínas da camada S (50  $\mu\text{L}$  propagado na superfície, concentração de 0,762  $\text{mg mL}^{-1}$ ) em uma pressão de superfície fixada em 15  $\text{mN m}^{-1}$  por 6000 segundos, em uma cuba KSV 2000, a  $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . 61
- Figura 4.13. Isotermas  $\pi - A$  do filme da enzima COx injetada na subfase e propagada na superfície (20  $\mu\text{L}$ , 1  $\text{mg mL}^{-1}$ ), em uma cuba Kibron – S, a  $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . O valor obtido pela intersecção da linha tracejada com o eixo das abscissas representa a área média ocupada por uma molécula no filme de Langmuir. 62
- Figura 4.14. Isotermas  $\pi - A$  dos filmes de COx e proteínas da camada S puras e dos filmes mistos na proporção 2:1, 1:1 e 1:2 (v/v) de COx : proteínas da camada S, em uma cuba Kibron – S, a  $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . 64
- Figura 4.15. Isotermas  $\pi - A$  do filme de DPPC puro e dos filmes mistos de DPPC e proteínas da camada S, nas proporções 2:1, 1:1 e 1:2 (v/v) de DPPC : proteínas da camada S, em uma cuba Kibron – S, a  $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . 65
- Figura 4.16. Deposição pela técnica de Langmuir-Blodgett das proteínas da camada S para um suporte de quartzo, em uma cuba KSV 2000, a  $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . 66
- Figura 4.17. Espectro FT-IR de uma placa de ouro (a) e dos filmes LB do DPPC depositados em uma placa de ouro, com 1 camada depositada (b) e com 17 camadas depositadas (c). 67
- Figura 4.18. Espectro FT-IR de uma placa de ouro (a) e do filme LB das proteínas da camada S depositado na placa de ouro (b), com 1 camada depositada. 68

- Figura 4.19. Espectro FT-IR de um eletrodo de trabalho de carbono (a) e, dos filmes LB da COx (b) e dos filmes mistos de COx / proteínas da camada S (c) depositados na superfície de um eletrodo de trabalho de carbono, com 6 camadas depositadas cada um. 69
- Figura 4.20. Imagens de amplitude AFM do eletrodo de trabalho de carbono sem deposição (a) e com seis camadas de filmes LB de COx (b) e de COx / proteína de camada S (c). Análise realizada no INMETRO. 70
- Figura 4.21. Imagens de contraste de fase de AFM do eletrodo de trabalho de carbono sem deposição (a) e com seis camadas de filmes LB de COx (b) e de COx / proteína de camada S (c). Análise realizada no INMETRO. 72
- Figura 4.22. Voltamogramas cíclicos a  $25 \text{ mV s}^{-1}$  em solução de colesterol  $100 \text{ mg dL}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ M}$  pH  $7,0$ , isopropanol e triton X-100,  $86:10:4$  (% peso), antes e após (0 e 20 minutos) a adição de  $400 \mu\text{L}$  de solução de COx. Eletrodo de ouro (a) e eletrodo de carbono (b), a  $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . 74
- Figura 4.23. Voltamogramas cíclicos a  $25 \text{ mV s}^{-1}$  em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ M}$  pH  $7,0$ , isopropanol e triton X-100,  $86:10:4$  (%peso) na ausência de colesterol (linha cheia) e na presença de colesterol  $150 \text{ mg dL}^{-1}$  (linha interrompida), utilizando biossensor fabricado pela deposição tipo Z (a) e Y (b) de filmes LB de COx em eletrodo de trabalho impresso de carbono em 2 minutos de reação, a  $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . 76
- Figura 4.24. Voltamogramas cíclicos a  $25 \text{ mV s}^{-1}$  em solução de colesterol  $150 \text{ mg dL}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ M}$  pH  $7,0$ , isopropanol e triton X-100,  $86:10:4$  (% peso), utilizando biossensor fabricado pela deposição tipo Z e Y de filmes LB mistos de COx / proteínas da camada S em eletrodo de trabalho impresso de carbono, ao longo do tempo indicado, a  $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . 79
- Figura 4.25. Voltamograma cíclico a  $25 \text{ mV s}^{-1}$  em solução de colesterol  $150 \text{ mg dL}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ M}$  pH  $7,0$ , isopropanol e triton X-100,  $86:10:4$  (% peso), utilizando biossensor fabricado pela deposição tipo Y de filmes LB mistos de COx / proteínas da camada S em eletrodo de trabalho impresso de carbono, nos tempos de 35 minutos, a  $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . 80

Figura 4.26. Voltamogramas cíclicos a  $25 \text{ mV s}^{-1}$  em solução de colesterol  $150 \text{ mg dL}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ M}$  pH  $7,0$ , isopropanol e triton X-100,  $86:10:4$  (% peso), utilizando biossensor fabricado pela deposição tipo Z, em eletrodo de trabalho impresso de carbono, de filmes LB de COx pura (linha interrompida verde) e de filmes LB mistos de COx / proteínas da camada S (linha cheia azul), ambos em 2 minutos de reação, a  $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . 81

Figura 4.27. Voltamogramas cíclicos a  $25 \text{ mV s}^{-1}$  em solução de colesterol  $150 \text{ mg dL}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ M}$  pH  $7,0$ , isopropanol e triton X-100,  $86:10:4$  (% peso), utilizando biossensor fabricado pela adsorção de uma gota de solução de COx em eletrodo de trabalho impresso de carbono, em 0, 5 e 15 minutos, a  $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . 82

Figura A-II.1. Voltamogramas cíclicos a  $25 \text{ mV s}^{-1}$  em soluções de controle, tampão fosfato  $0,1 \text{ M}$  e  $0,01 \text{ M}$ , tampão fosfato  $0,1 \text{ M}$  com isopropanol e com triton X-100 (separadamente), utilizando sensor impresso com eletrodo de trabalho de carbono, a  $40^\circ\text{C}$ . 97

Figura A-II.2. Voltamogramas cíclicos a  $25 \text{ mV s}^{-1}$  em soluções de controle (tampão fosfato  $0,1 \text{ M}$  pH  $7,0$  com triton X-100 e isopropanol; colesterol  $150 \text{ mg dL}^{-1}$ ; tampão fosfato  $0,1 \text{ M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  e; colestenona  $150 \text{ mg dL}^{-1}$ ) utilizando sensor impresso com eletrodo de trabalho de carbono, a  $40^\circ\text{C}$ . 98

Figura A-II.3. Voltamograma cíclico a  $25 \text{ mV s}^{-1}$  em solução  $150 \text{ mg dL}^{-1}$  de colesterol e em solução  $150 \text{ mg dL}^{-1}$  de colestenona (ambas em tampão fosfato  $0,1 \text{ M}$  pH  $7,0$ , isopropanol e triton X-100 na proporção de  $86:10:4$  (%peso)), a  $40^\circ\text{C}$ . 99

## ÍNDICE DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1.1 – Relação entre os níveis de colesterol e o risco de desenvolver doença cardíaca (adaptada de SHEN e LIU, 2007)                             | 1  |
| Tabela 4.1. Valores dos picos redox obtidos em soluções eletrolíticas de colesterol e colestenoa (ambos com concentração de 150 mg dL <sup>-1</sup> ). | 73 |
| Tabela A-I.1. Reagentes e volumes correspondentes para o preparo dos géis de poliacrilamida.   | 94 |

# CAPÍTULO I

## INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

### 1.1. INTRODUÇÃO

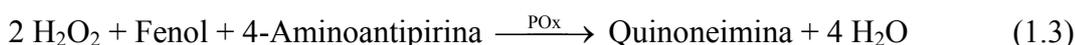
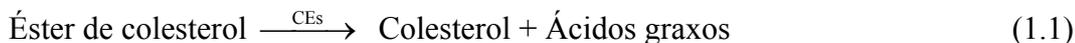
Hábitos pouco saudáveis, como má alimentação e ausência de atividades esportivas, são fatores que, reconhecidamente, contribuem para o aumento dos índices de doenças cardiovasculares, principalmente aquelas relacionadas ao alto nível de colesterol no sangue. Esse fato alerta para a necessidade de acompanhamento contínuo dos níveis de colesterol de indivíduos enquadrados em grupos de risco. A Tabela 1.1 apresenta a relação dos níveis de colesterol sanguíneos totais, em indivíduos em jejum, e o risco de desenvolver doenças cardíacas.

**Tabela 1.1.** Relação entre os níveis de colesterol e o risco de desenvolver doença cardíaca (adaptada de SHEN e LIU, 2007).

| Nível (mg dL <sup>-1</sup> ) | Risco de doença cardíaca                        |
|------------------------------|---|
| < 200                        | Nível desejável: menor risco de doença cardíaca |
| 200 - 239                    | Limiar de alto risco                            |
| > 240                        | Nível não-desejável: alto risco                 |

Atualmente, o método tradicional enzimático-colorimétrico para medir colesterol total, pela análise do soro ou plasma sanguíneo, requer tempo e técnicas de laboratório elaboradas (MARTINS, 2006). Como no plasma sanguíneo cerca de 70% do colesterol está na forma esterificada (ALLAIN *et al.*, 1974), este método, descrito pelas equações abaixo, envolve três reações catalisadas por enzimas diferentes. Primeiramente, ocorre uma reação de hidrólise dos ésteres de colesterol pela enzima colesterol esterase (CEs), formando ácidos graxos e colesterol livre (Equação 1.1). Este sofre oxidação catalisada pela enzima colesterol oxidase (COx), formando peróxido de hidrogênio (Equação 1.2), que é utilizado como oxidante em uma reação de acoplamento oxidativo do fenol e da 4-aminoantipirina, catalisada pela enzima peroxidase (POx), formando quinoneimina,

um complexo de cor avermelhada (Equação 1.3) que absorve no comprimento de onda de 500 nm proporcionalmente à concentração de colesterol na amostra (MALIK e PUNDIR, 2002, MARTINS, 2006).



Os biossensores (sensores que possuem sistema de detecção biológico) representam uma alternativa interessante aos métodos tradicionais, por permitir a dosagem de colesterol com grande rapidez, precisão e sem a necessidade de mão de obra especializada, porém são aparelhos sofisticados e com valor de mercado dependente da tecnologia aplicada, do material utilizado e da quantidade fabricada. Um dos fatores determinantes para a viabilidade dos biossensores está na forma em que as biomoléculas ativas são imobilizadas na superfície detectora dos dispositivos.

As técnicas de imobilização utilizadas para produção de biossensores são divididas em dois grupos principais: sem ou com ligação covalente entre a enzima e o suporte. Os métodos que não envolvem ligação covalente ao suporte são baseados em adsorção, encapsulamento físico da enzima por forças de van der Waals ou ligação iônica. Já os métodos baseados na ligação covalente da enzima ao suporte incluem reações entre os grupos funcionais da proteína (grupos amino, grupos carboxílicos etc.) e do suporte (ARYA *et al.*, 2008).

Segundo FREIRE *et al.* (2003), esses procedimentos, apesar de serem os mais empregados, produzem uma superfície altamente desorganizada, com as biomoléculas orientadas randomicamente, provocando mudanças conformacionais que afetam a atividade funcional do componente bioativo, diminuindo a eficiência do biossensor. Outra desvantagem dessas técnicas para a produção de biossensores é o seu custo relativamente alto. Isto se deve, principalmente, à quantidade de enzimas de alto custo

imobilizadas no suporte do biossensor. A enzima colesterol oxidase, por exemplo, tem um valor elevado devido a sua produção em pequena quantidade por microorganismos e pela necessidade de adição de colesterol ao meio de cultivo, para induzir a produção da enzima (MARTINS, 2006).

A técnica de imobilização de Langmuir-Blodgett apresenta-se como uma alternativa aos métodos comumente empregados. A técnica envolve a formação de um filme monomolecular da biomolécula sobre uma interface líquido-ar e, posterior transferência do filme pela imersão/emersão vertical do suporte através do filme pré-formado. Esta técnica vem sendo estudada mais recentemente na elaboração de biossensores pelas possibilidades de controlar o ordenamento dos filmes no nível molecular, de fabricar estruturas multicamadas, de reduzir o tempo de resposta induzido por uma camada ultrafina, e de controlar a densidade do empacotamento das moléculas biológicas (FIOL *et al.*, 1992, HOU *et al.*, 2002, MALHOTRA *et al.*, 2005, FERREIRA *et al.*, 2005, YIN *et al.*, 2006).

Desta forma, uma menor quantidade de biomoléculas ativas é necessária para fabricar um biossensor, levando à redução do custo final. Além disto, como essas biomoléculas podem ser organizadas ao nível molecular, o filme resultante é bastante fino (pode ter a espessura de uma molécula) e homogêneo, com consequência direta na melhoria da eficiência de transdução do sinal, resultando em biossensores mais precisos e com menor tempo de resposta.

Uma contribuição relativamente recente da nanotecnologia no campo de biossensores está relacionada ao uso de estruturas auto-organizadas. Dentre estas, proteínas da camada S (conhecidas como *S-Layer proteins*) têm sido investigadas com o objetivo de auxiliar na formação da camada de reconhecimento do biossensor (PUM *et al.*, 2000). Essas proteínas, originárias da camada mais externa de algumas bactérias, têm a capacidade de formar filmes auto-organizados em interfaces (SLEYTR *et al.*, 1986). Dependendo da espécie de bactéria e condições ambientais, diferentes tipos e características dessas proteínas podem ser verificados (PUM *et al.*, 2000).

## **1.2. OBJETIVOS**

O objetivo principal desta pesquisa foi estudar as características do filme de Langmuir e desenvolver, através da técnica de Langmuir-Blodgett, um filme suportado estável para aplicação em biossensor de colesterol.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar os componentes biológicos quanto às suas propriedades interfaciais, através de isothermas de Langmuir, visando a sua aplicação na construção de biossensores para detecção de colesterol;
- Investigar as propriedades da enzima colesterol oxidase, e sua interação com proteínas da camada S, que apresentam propriedades de auto-organização, e com moléculas lipídicas (dipalmitoil fosfatidil colina – DPPC);
- Selecionar suportes adequados para transferência dos filmes de Langmuir;
- Caracterizar os filmes produzidos;
- Avaliar a estabilidade e a atividade catalítica do filme imobilizado, através da técnica eletroquímica voltametria cíclica.

## **1.3. ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO**

Esta dissertação está dividida em cinco capítulos. O presente capítulo apresentou uma introdução ao assunto e citou os objetivos, geral e específicos, desta dissertação de Mestrado. O capítulo II apresenta uma revisão bibliográfica sobre o assunto, mostrando o estado da arte sobre biossensores, filmes monomoleculares e proteínas da camada S. A metodologia empregada neste trabalho foi descrita no capítulo III e, os resultados e discussões no capítulo IV. Conclusões e sugestões são apresentadas no capítulo V.

## **CAPÍTULO II**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **2.1. INTRODUÇÃO**

Este capítulo apresenta uma revisão bibliográfica sobre os biossensores, filmes monomoleculares e proteínas da camada S.

Primeiramente, serão expostos o conceito, as características, as aplicações gerais e um breve histórico sobre a evolução dos biossensores. Também serão abordadas as características da biomolécula ativa imobilizada na superfície, a enzima colesterol oxidase, as reações ocorridas no biossensor de colesterol, e uma breve revisão bibliográfica sobre eletroquímica e voltametria cíclica, técnica utilizada na caracterização dos biossensores fabricados neste trabalho.

Seguindo a revisão bibliográfica, apresentam-se os filmes monomoleculares, dando ênfase à evolução do estudo de filmes finos, suas principais características, estados físicos, as técnicas de caracterização estrutural e organizacional, a teoria envolvida, como isotermas de compressão (isotermas  $\pi - A$ ) e técnicas de transferência, e aplicações tecnológicas.

As principais características, propriedades e aplicações das proteínas da camada S também são relatadas neste capítulo, juntamente com as formas de extração e purificação dessas proteínas.

#### **2.2. BIOSSENSOR**

Os sensores são dispositivos que respondem a estímulos físicos ou químicos, produzindo uma resposta proporcional à quantidade da substância detectada. Quando

estes possuem um sistema de detecção biológico, tais como, enzimas, anticorpos, materiais de origem biológica, moléculas orgânicas etc., são conhecidos por biossensores (MALHOTRA *et al.*, 2005, ARYA *et al.*, 2008). Assim, a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) define biossensor como um dispositivo independente capaz de fornecer informação analítica específica quantitativa ou semi-quantitativa (THÉVENOT *et al.*, 2001).

A estrutura dos biossensores é composta por três componentes essenciais, que são um detector, um transdutor e um sistema de saída (Figura 2.1). O detector de um biossensor é um dispositivo mecânico, elétrico ou químico que identifica, registra ou indica uma alteração em uma das variáveis na sua vizinhança, como pressão, temperatura, carga elétrica. O transdutor de sinais transforma uma forma de energia não elétrica (temperatura, som, luz) em sinal elétrico. Eles podem ser eletroquímicos (amperométrico, potenciométrico, etc.), óticos, magnéticos ou piezoelétricos (MALHOTRA *et al.*, 2005). Finalmente, o sistema de saída de dados modela os sinais eletrônicos do transdutor para apresentá-los em um medidor, um *display* ou tela de computador, ou armazená-los.



**Figura 2.1.** Desenho esquemático do funcionamento de um biossensor eletroquímico.

A fabricação de um biossensor envolve a seleção das biomoléculas, da matriz (suporte) e técnica de imobilização, e do sistema transdutor. Porém, o principal desafio na elaboração de um biossensor está na interface detector-transdutor, que pode comprometer a eficiência do dispositivo. Esse problema está diretamente relacionado com a imobilização das biomoléculas sobre suportes, em sua forma estável e sem comprometer suas propriedades biológicas de reconhecimento (FREIRE *et al.*, 2003), que, segundo MALHOTRA *et al.* (2005) depende de condições físicas e químicas satisfatórias (pH, temperatura e ausência de contaminantes), da espessura da camada sensora e da estabilidade da matriz.

### **2.2.1. TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO**

Polímeros condutores, nano-materiais, sol-gel e hidro-gel, membranas, fibras, vidro e grafite são alguns dos suportes utilizados como matrizes de imobilização. ARYA *et al.* (2008) ressaltam a importância da estabilidade das enzimas por longos períodos quando imobilizadas no suporte. Neste sentido, a técnica de imobilização usada para fixar o material biológico na superfície de um transdutor é fundamental para a eficiência de um biossensor.

Técnicas comumente utilizadas incluem adsorção física ou química, ligação covalente usando agentes de reticulação, etc. Os biossensores produzidos por diversas técnicas ainda têm custo elevado por demandarem de componentes biológicos, em soluções concentradas e com alto grau de pureza, e têm pequena vida útil. A espessura da camada biologicamente ativa também se apresenta como um problema, pois interfere no tempo de resposta do dispositivo (FIOL *et al.*, 1992, HOU *et al.*, 2002).

Ultimamente estão em desenvolvimento técnicas utilizando filmes nanoestruturados como: deposição camada por camada (LbL, do inglês *Layer-by-Layer*), evaporação a vácuo (PVD, do inglês *Physical Vapor Deposition*), filmes de Langmuir-Blodgett e Langmuir-Schaefer. A imobilização de filmes monomoleculares utilizando as técnicas de Langmuir-Blodgett e Langmuir-Schaefer está sendo estudada por acreditar-se que essas técnicas possuem vantagens no desenvolvimento de biossensores, como o controle do ordenamento dos filmes no nível molecular e da densidade do empacotamento das moléculas biológicas (GIRARD-EGROT *et al.*, 2005).

### **2.2.2. HISTÓRICO DOS BIOSSENSORES E APLICAÇÕES**

A tecnologia de biossensores está em expansão, desde o primeiro biossensor produzido por Clark e Lyon, em 1962 (DAVIS e HIGSON, 2005). Eles desenvolveram um sensor de glicose, que era composto por um eletrodo de pH envolto por uma camada de gel contendo a enzima glicose oxidase. Em 1969, Guibaud utilizou o método potenciométrico para detectar uréia. Allain, já em 1976, desenvolveu um *kit* de dosagem

de colesterol, mas este não foi considerado um sensor, pois precisava de manipulação adicional além do dispositivo sensor.

Didaticamente, os biossensores são divididos em três gerações. A primeira geração é caracterizada pelos sensores em forma de tiras reagentes e acompanhada pela leitura visual. Na segunda geração, os biossensores ainda eram as tiras reagentes, porém a leitura era eletrônica, com armazenagem de dados e calibração. Os dispositivos biossensores de terceira geração têm como características principais a miniaturização, a capacidade de efetuar múltiplas análises e uma elevada sensibilidade. Apesar da variedade de aplicações dos biossensores em diversas áreas (controle do meio ambiente, indústria de alimentos, agricultura, diagnóstico clínico, etc.) (MALHOTRA *et al.*, 2005), as principais aplicações estão na área da saúde.

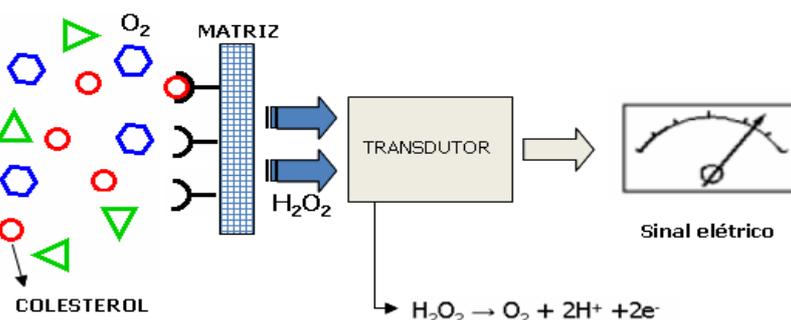
Para pessoas que sofrem de doenças que necessitam de controle freqüente de certas substâncias prejudiciais ao organismo, como o colesterol no sangue, uma consulta precisa, confiável e rápida é fundamental para o melhor acompanhamento, facilitando assim o diagnóstico e a recuperação. No entanto, segundo ARYA *et al.* (2008) mesmo com o aumento dos índices de doenças cardiovasculares na sociedade contemporânea, e a procura crescente por biossensores, apenas poucos têm chegado ao mercado, principalmente pela dificuldade de otimização de parâmetros críticos, tais como, estabilização da enzima, controle de qualidade e *design* do instrumento. O mercado global de biossensores no início deste século girava em torno de US\$ 5 bilhões, sendo 85% deste destinado ao sensoriamento de glicose (NEWMAN *et al.*, 2004 apud DAVIS e HIGSON, 2005).

### **2.2.3. BIOSSENSOR DE COLESTEROL**

O método clínico tradicional (enzimático-colorimétrico) para dosagem de colesterol é feito por procedimentos complicados e de elevado custo devido à grande quantidade de enzima utilizada para a realização de uma única análise.

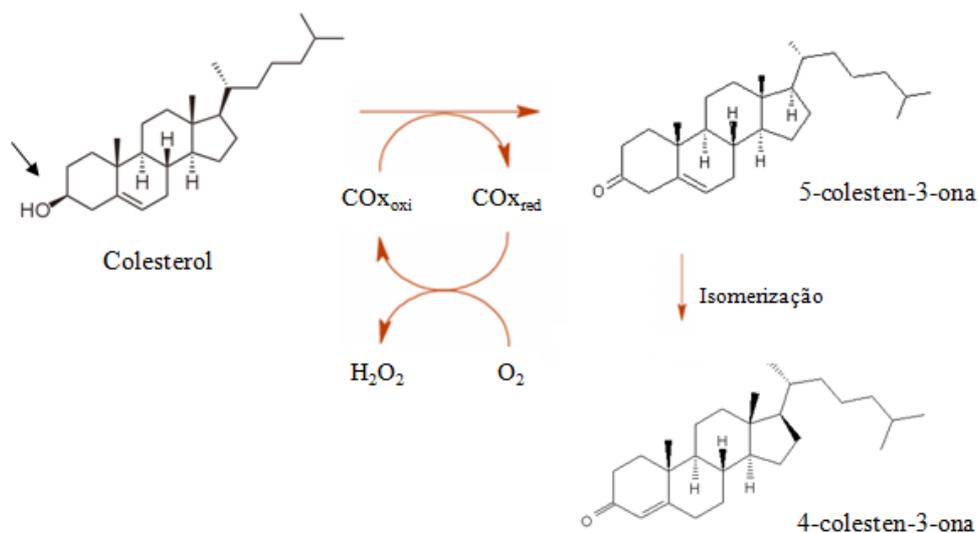
Uma alternativa ao método tradicional de determinação de colesterol seria o uso de biossensores. A Figura 2.2 apresenta um esquema simplificado de um biossensor de

colesterol, contendo apenas a enzima colesterol oxidase (COx) imobilizada na superfície da matriz receptora. A reação do colesterol, analito alvo, com o oxigênio molecular presente no ambiente ocorre no sítio ativo da COx, elemento sensor, gerando 4-colesten-3-ona e peróxido de hidrogênio. Este último, em um transdutor eletroquímico, dissocia em oxigênio molecular e hidrogênio, gerando elétrons livres, que podem ser quantificados e dispostos como resposta para o usuário em um monitor de computador.



**Figura 2.2.** Esquema de um biossensor de colesterol.

A COx é uma enzima da classe oxirredutase, um dinucleotídeo-adenina-flavina contendo uma flavoenzima que catalisa a desidrogenação da ligação C(3)-OH da molécula de colesterol (Figura 2.3) (ARYA *et al.*, 2008).



**Figura 2.3.** Mecanismo de oxidação de colesterol pela enzima colesterol oxidase (COx). Adaptada de ARYA *et al.*, 2008.

Os vários tipos de colesterol oxidase, ou mais corretamente 3 $\beta$ -hidroxi esterol oxidase, são um grupo de enzimas produzidas por vários tipos de microorganismos (SLOTTE, 1992), podendo ser estocadas em membranas intracelulares ou liberadas no seu meio de cultivo (MARTINS, 2006). Suas propriedades físicas variam de acordo com o microrganismo de origem, mas normalmente apresenta como condições ótimas, temperatura em torno de 37°C e pH neutro. Possui alta massa molar, ~55 kDa, e seu sítio ativo contém um cofator FAD (Flavina Adenina Dinucleotídeo) (MARTINS, 2006). E, segundo SAMPSON e VRIELINK (2003), a enzima colesterol oxidase tem propriedade interfacial, pois além de ser solúvel em água, também se liga transitoriamente à superfície de membranas celulares.

DAVIS e HIGSON (2005) relataram em artigo de revisão bibliográfica que Gobi e Mizutani, no ano de 2001, utilizando técnica de multicamadas poliméricas auto-organizadas, co-depositaram a enzima COx para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos de colesterol, obtendo resposta linear de 0,2 a 3 mM, tempo de resposta inferior a 20 segundos e efeitos mínimos de interferentes. Já Ram e colaboradores, no mesmo ano, fabricaram filmes similares com camadas de colesterol esterase e colesterol oxidase com polietilenoamina sobre eletrodos, mostrando sensibilidade semelhante aos biossensores de Gobi e Mizutani.

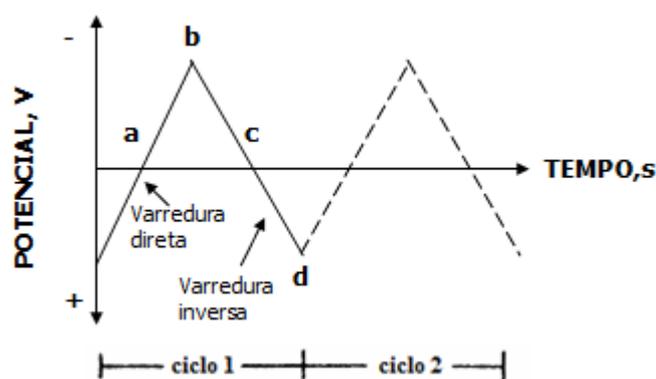
#### **2.2.4. ELETROQUÍMICA**

Eletroquímica estuda os processos químicos quando envolvem a transferência de elétrons. Quando o processo químico é espontâneo e ocorre gerando corrente elétrica (transferência de elétrons) é chamado de pilha ou bateria, já quando é provocado pela passagem de corrente elétrica (não-espontâneo) é designado como eletrólise. Neste trabalho interessa apenas os conhecimentos referentes à eletrólise.

A voltametria cíclica foi a técnica eletroanalítica utilizada neste trabalho para a caracterização eletroquímica dos biossensores fabricados. Pode ser aplicada para a detecção de intermediários ou detecção da existência de reações acopladas a processos eletroquímicos. O potencial do eletrodo de trabalho é variado linearmente, em uma determinada velocidade de varredura ( $V s^{-1}$ ), com o tempo e, depois, é invertido, sendo

variado no sentido oposto. Esta inversão pode ser feita várias vezes, gerando múltiplos ciclos, como ilustrado na Figura 2.4. A corrente elétrica gerada entre o eletrodo de trabalho e o contra eletrodo é representada como uma função da voltagem aplicada entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência, obtendo-se, assim, o voltamograma do sistema.

A varredura no sentido direto, diminuindo o potencial, provoca redução das espécies, produzindo um pico quando se atinge o potencial de redução dos íons ou moléculas. Então a corrente cai, uma vez que a concentração na superfície do eletrodo é esgotada. Se a reação for reversível, quando o potencial é invertido na varredura no sentido contrário, haverá um pico de oxidação do material.



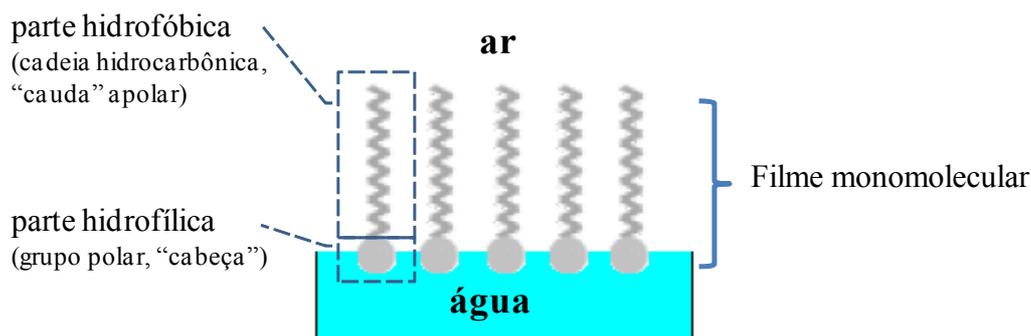
**Figura 2.4.** Esquema da variação do potencial no tempo. Sendo (a) diminuição linear, (b) limite inferior, (c) aumento linear e (d) limite superior do potencial aplicado ao sistema no primeiro ciclo (adaptada de TAVARES, 2004).

Em trabalho recente, SHEN e LIU (2007) testaram eletrodos de trabalho de ouro e de platina, como matrizes de imobilização, obtendo resultados mais satisfatórios para o eletrodo de ouro, em termos de intensidade de corrente e sensibilidade. Assim, desenvolveram um biossensor amperométrico de colesterol, em que a enzima COx foi imobilizada covalentemente na superfície de um eletrodo de trabalho de ouro de um sensor impresso contendo três eletrodos (trabalho, contra e referência) pela técnica de auto-montagem. Eles concluíram que esta metodologia mostrou-se simples e efetiva na imobilização da enzima sobre a superfície do sensor. Voltametria cíclica e amperometria foram as técnicas utilizadas para a caracterização eletroquímica do

biossensor. Estudos de interferentes e estabilidade do biossensor após estocagem também foram avaliados, sem resultados satisfatórios.

### 2.3. FILMES MONOMOLECULARES

Monocamadas de Langmuir são filmes finos nanoestruturados ou películas com espessura monomolecular que se formam sobre uma superfície de uma subfase aquosa. Elas são formadas pelo espalhamento de pequenas quantidades de moléculas com características anfífilicas na interface ar-água, seja por soluções diluídas ou pelo pequeno volume aplicado. A parte hidrofílica (polar) da molécula direciona-se para a subfase aquosa e a parte hidrofóbica (apolar) para o ar (Figura 2.5).



**Figura 2.5.** Esquema de uma molécula anfífilica na superfície ar-água.

Esses filmes são produzidos em um aparato, conhecido como cuba de Langmuir, que possui um compartimento raso, feito de material hidrofóbico, que contém a subfase aquosa, um sensor de tensão superficial, geralmente uma placa de *Wilhelmy*, e barreiras móveis, utilizadas para comprimir a monocamada formada na superfície.

#### 2.3.1. HISTÓRICO SOBRE OS FILMES MONOMOLECULARES

O aprofundamento no estudo de filmes finos, com elaboração de teorias sobre sua estrutura e estabilidade, bem como a compreensão dos fenômenos envolvidos na sua

formação, dependia, intrinsecamente, do avanço no conhecimento a respeito das moléculas, que começou a ocorrer no século XIX.

Porém, já no ano de 1774, Benjamim Franklin, ao adicionar óleo em um tanque de água, notou que o óleo se espalhava como um filme, com espessura menor que 2 nm. Nos anos de 1870, Lorde Rayleigh conduziu uma série de experimentos quantitativos com óleo e água. Ele foi capaz de medir a área ocupada por certo volume de óleo e também calculou a espessura do filme de óleo formado. Em 1891, Agnes Pockels desenvolve um equipamento capaz de medir a área exata de um filme de óleo. Este equipamento foi o precursor da cuba de Langmuir, e ainda é usado nos tempos atuais para estudo de fenômenos de superfície (ADAMSON e GAST, 1997).

No entanto, somente na década de 1930, os primeiros trabalhos completos e aprofundados surgiram. Irving Langmuir foi o primeiro a observar a grande estabilidade de filmes monoatômicos adsorvidos em filamentos de tungstênio e platina, e desenvolveu, depois de experiências com filmes de óleo sobre a água, uma teoria geral dos filmes adsorvidos, incluindo estudos de suas propriedades catalíticas. A denominação monocamada de Langmuir foi dada em sua homenagem, pois este realizou trabalhos pioneiros que fundamentaram esta área de pesquisa. Já Katherine Blodgett foi, por muito tempo, colaboradora de Langmuir. Juntos, eles desenvolveram a teoria de filmes transportados para suportes sólidos, entre muitas outras invenções. Por sua imensa contribuição para a ciência e tecnologia de filmes finos que essa área é geralmente conhecida como tecnologia de Langmuir-Blodgett.

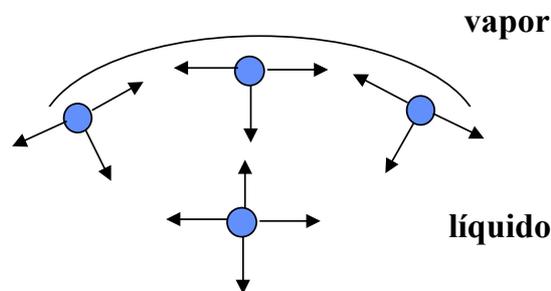
As aplicações tecnológicas e o interesse mais amplo pela comunidade científica foram ascender apenas na décadas de 1970 e 1980. Hoje diversas áreas específicas estudam o tema: "físico-química de superfícies", "propriedades de monocamadas de interface", "filmes monomoleculares", "filmes Langmuir-Blodgett", etc.

### 2.3.2. PROPRIEDADES DOS FILMES FINOS

As propriedades da monocamada dependem do equilíbrio entre grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na molécula. Dentre as principais propriedades estão: a tensão superficial, a pressão de superfície e o potencial de superfície.

#### 2.3.2.1. TENSÃO SUPERFICIAL ( $\gamma$ )

A tensão superficial de um material está relacionada à diferença entre as energias das espécies na superfície e no interior deste. Em um líquido, as moléculas que estão no interior sofrem forças de atração homogêneas, todas as forças são canceladas por forças na mesma direção porém em sentido contrário, pois estas moléculas estão totalmente cercadas por outras moléculas. Já as moléculas na superfície têm suas forças de atração formando uma resultante no sentido do interior do líquido (Figura 2.6). A existência desse desequilíbrio de forças na superfície faz com que as moléculas aí localizadas apresentem um conteúdo energético superior às moléculas no seio da fase.



**Figura 2.6.** Ilustração das forças de atração entre as moléculas na superfície e no interior de um líquido (BORGES *et al.*, 2005).

A fim de reduzir a energia livre total do sistema, a área superficial deve ser minimizada. Assim, a resistência ao aumento da área de superfície traduz-se na tensão superficial característica de cada material. A tensão superficial pode ser quantificada em unidades de energia por área, ou ainda, em unidades de força por comprimento ( $\text{mN m}^{-1}$  ou  $\text{dina cm}^{-1}$ ) (BORGES *et al.*, 2005).

A presença de um segundo componente pode tanto aumentar quanto diminuir a tensão superficial de uma fase aquosa. Por exemplo, moléculas orgânicas com caráter anfifílico têm tendência de se dispor na interface já que a dissolução das mesmas em água é desfavorável. Desta forma, espécies anfifílicas se acumulam na superfície, dando origem a um filme superficial cuja espessura pode ser monomolecular, diminuindo a tensão superficial da água.

### 2.3.2.2. PRESSÃO DE SUPERFÍCIE ( $\pi$ )

A definição de pressão de superfície é a diferença entre a tensão superficial de um líquido puro, geralmente água ( $\gamma$  igual a 72,8 mN m<sup>-1</sup> a 25°C) e a tensão superficial deste líquido quando contendo moléculas de caráter anfifílico na superfície, calculada conforme a Equação 2.1.

$$\pi = \gamma_o - \gamma_m \quad (2.1)$$

Onde:

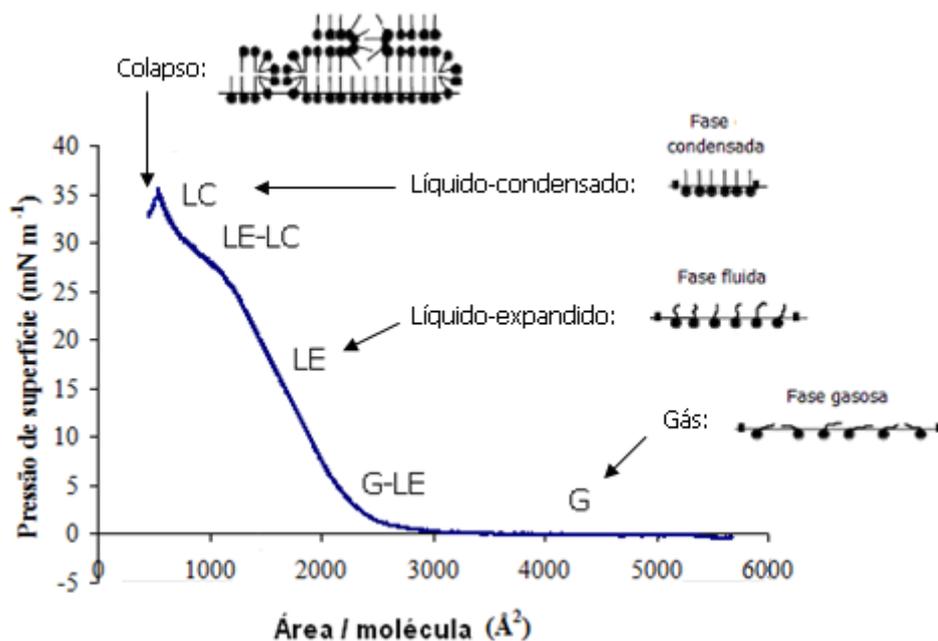
$\gamma_o$  representa a tensão superficial do líquido puro

$\gamma_m$  é a medida da tensão superficial após a deposição de moléculas na superfície

A pressão de superfície pode ser medida de diversas formas (SHAW, 1992), porém, a mais usual é pelo método de placa de Wilhelmy, que determina a força devida a tensão de superfície sobre a placa suspensa parcialmente imersa na subfase. Após o posicionamento das moléculas na superfície e a formação do filme, a tensão superficial tende a diminuir, logo, a pressão de superfície aumenta.

Utilizando-se uma cuba de Langmuir, é possível acompanhar a variação da pressão de superfície à medida que as barreiras vão movimentando-se, no sentido da redução da área compreendida entre elas. Quando a temperatura é mantida constante ao longo do processo, obtém-se uma isoterma de compressão (isoterma  $\pi - A$ ), ilustrada na Figura 2.7. Nesta ilustração, GIRARD-EGROT *et al.* (2005) apresentam uma isoterma típica de fosfolipídeos, possuindo dupla cadeia carbônica hidrofóbica, caracterizada pelas fases gás, líquido-expandido, um patamar da transição de fase,

líquido-condensado e sólida, apresentando o colapso do filme monomolecular ao final da compressão. Neste caso, a pressão de superfície está representada como uma função da área média ocupada por uma molécula no filme.



**Figura 2.7.** Isotermas  $\pi - A$  de um fosfolipídio (DPPC). Ilustração modificada de GIRARD-EGROT *et al.* (2005).

A análise das isotermas  $\pi - A$  fornece informações sobre a reorientação das moléculas no sistema bidimensional, sobre a existência de fases de transição (gasoso, líquido-expandido, líquido-condensado, sólido) e transformações conformacionais e sobre a estabilidade da monocamada na interface ar-água (GIRARD-EGROT *et al.*, 2005). Um filme é considerado estável quando mantém suas propriedades invariáveis ao longo do tempo, sem apresentar colapso ou transição de fase. A forma da isoterma depende grandemente da temperatura e das características da molécula formadora do filme, como o tamanho e a presença de insaturações da cadeia carbônica.

Área molecular média é definida como a área limite da dispersão molecular em um filme de Langmuir. Assim, a intersecção da extrapolação de uma linha reta traçada na região da fase mais condensada da isoterma  $\pi - A$  e o eixo das abcissas representa a área ocupada por uma molécula em uma monocamada de Langmuir (SHAW, 1992).

Problemas experimentais (impurezas na monocamada, na cuba ou na subfase; solubilidade do material espalhado ou seu excesso; temperatura e umidade variáveis; turbulência) podem refletir na irreprodutibilidade das isotermas.

### **2.3.2.3. POTENCIAL DE SUPERFÍCIE ( $\Delta V$ )**

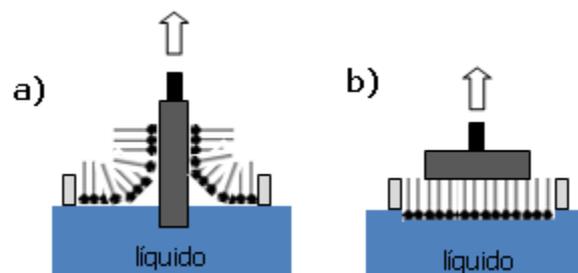
O potencial de superfície é a diferença de potencial elétrico entre uma superfície aquosa contendo moléculas na sua interface, formando um filme de Langmuir, e uma superfície sem monocamada. Essa diferença de potencial surge devido à presença de dipolos elétricos permanentes do material que compõe o filme ou a dupla região formada na interface filme/água, quando trata-se de uma molécula anfifílica. Esta técnica é mais sensível que a pressão de superfície, assim, modificações mínimas no arranjo molecular influenciam na orientação do momento dipolo e, conseqüentemente, no valor do potencial, enquanto que não são suficientes para afetar significativamente a pressão de superfície (SHAW, 1992).

### **2.3.3. FILMES DE LANGMUIR, LANGMUIR-BLODGETT E LANGMUIR-SCHAEFER**

Os filmes monomoleculares de Langmuir são formados pela característica natural das moléculas de caráter anfifílico tenderem a se orientar na interface de uma subfase aquosa com uma fase gasosa ou com outra fase líquida, minimizando, assim, a energia livre do sistema.

Assim, os materiais usualmente empregados na formação dos filmes de Langmuir são anfifílicos, com partes polares (hidrofílicas) e apolares (hidrofóbicas) bem definidas, por exemplo o dipalmitoilfosfatidilcolina – DPPC, utilizado neste trabalho. A parte hidrofóbica, geralmente constituída de cadeias carbônicas alifáticas, diminui a solubilidade das moléculas na subfase aquosa. A parte hidrofílica é responsável pelo espalhamento do filme na superfície da água devido à sua maior interação com a subfase aquosa.

Os filmes de Langmuir adquirem utilidade quando transportados para suportes adequados. Existem duas técnicas para a deposição desses filmes flutuantes: Langmuir-Blodgett (LB) e Langmuir-Schaefer (LS), como mostrado na Figura 2.8.



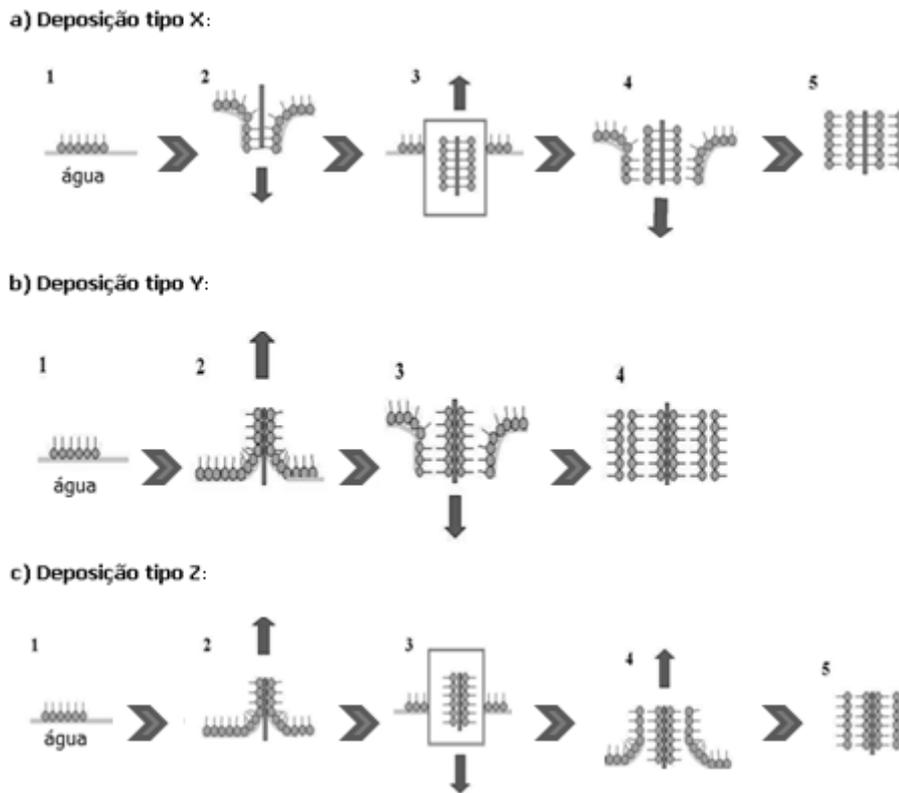
**Figura 2.8.** Esquema das técnicas LB (a) e LS (b), mostrando a subfase aquosa, as barreiras móveis da cuba de Langmuir comprimindo um filme monomolecular na interface ar-água e o suporte sólido. Adaptada de RUBINGER *et al.*, 2006.

A técnica LB permite a deposição de filmes monocamada por monocamada, sendo que cada monocamada pode ter a espessura de uma única molécula. Nesta técnica, há a transferência de um filme na interface ar-água para um suporte sólido através da imersão e/ou retirada deste, verticalmente, da subfase. Assim, a repetição dos processos de imersão e retirada permite a formação de multicamadas, que podem ser altamente organizadas. Já a técnica LS, o filme flutuante na interface ar-água é transferido através do contato horizontal do suporte.

A vantagem da técnica LB na fabricação de biossensores é a possibilidade de: um maior ordenamento dos filmes no nível molecular, fabricar estruturas multicamadas, ter um pequeno tempo de resposta induzido por uma camada ultrafina e, controlar a densidade do empacotamento das moléculas biológicas (HOU *et al.*, 2002).

Com relação a metodologia de transferência dos filmes LB, existem três tipos de deposição do filme flutuante em um suporte sólido: deposição X, Y e Z (Figura 2.9). Na deposição do tipo X faz-se apenas imersões deste através do filme. Ao contrário, na deposição do tipo Z, a transferência ocorre na etapa de emersão. Estes esquemas de deposição ainda não foram estudados com grande ênfase (GIRARD-EGROT *et al.*, 2005). A deposição do tipo Y transfere o filme de Langmuir tanto na emersão quanto na

imersão e apresenta-se como a técnica mais comumente estudada, na medida que produz estruturas mais representativa da membrana celular (mimetização).



**Figura 2.9.** Tipos de deposição do filme de Langmuir num suporte através da técnica LB, sendo (a) deposição tipo X, em substrato hidrofóbico, (b) deposição tipo Y, em substrato hidrofílico e (c) deposição tipo Z, em substrato hidrofílico.

Para ser quantitativamente transferida, a monocamada deve estar submetida a uma pressão de superfície constante durante o processo de deposição. Um circuito de controle é, então, necessário para monitorar a movimentação das barreiras da cuba de Langmuir e assim manter a pressão de superfície constante no momento da transferência. Neste sentido, um parâmetro importante na deposição de filmes de Langmuir é a razão de transferência, que consiste na razão entre a área de monocamada transferida da interface ar-água e a área do suporte sólido (Equação 2.2).

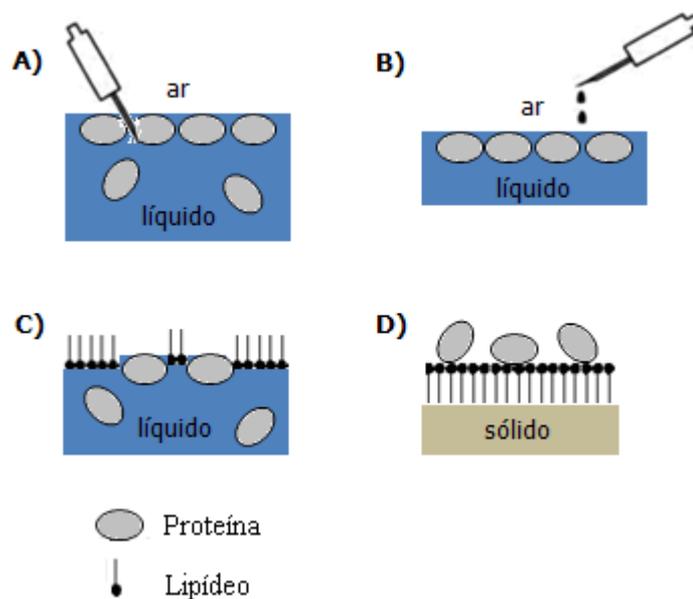
$$RT = \frac{A_{m(transf)}}{A_{substrato}} \quad (2.2)$$

Segundo GIRARD-EGROT *et al.* (2005), este parâmetro caracteriza a deposição pela técnica de LB, sendo considerada uma transferência eficiente quando esta razão é igual a unidade (área da monocamada transferida igual a área do suporte). Geralmente, a primeira camada tem razão de transferência maior que um, e isso é explicado pela não-homogeneidade microscópica do suporte.

#### **2.3.4. FILMES DE LIPÍDEOS, PROTEÍNAS E ENZIMAS**

Monocamadas de Langmuir estáveis na interface ar-água são formadas a partir de moléculas com características anfifílicas. Um exemplo típico dessas moléculas são os lipídeos, pois apresentam partes hidrofílicas e hidrofóbicas bem definidas. Já as proteínas são moléculas intrinsecamente anfifílicas, porque são constituídas de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos (LEBLANC e HUO, 2006).

As monocamadas de proteínas e enzimas podem ser formadas pela adsorção na superfície aquosa formando filmes simples, ou formando filmes mistos pela adsorção na interface de monocamadas lipídicas de Langmuir ou Langmuir-Blodgett (Figura 2.10).



**Figura 2.10.** Ilustração das três formas de adsorção para formar monocamadas de proteínas através das técnicas de Langmuir e Langmuir-Blodgett. (A) e (B) Filmes simples através da adsorção na superfície aquosa, pela injeção da solução de proteínas na subfase ou pelo espalhamento na interface, respectivamente. (C) e (D) Filmes mistos pela adsorção na interface de uma monocamada lipídica de Langmuir e de Langmuir-Blodgett, respectivamente. Adaptada de LEBLANC e HUO, 2006.

A adsorção de proteínas na superfície da água pode ser feita por diferentes métodos: injeção na subfase aquosa (Figura 2.10 A) ou espalhamento na interface ar-água (Figura 2.10 B). Este método foi utilizado na formação de filmes mistos deste trabalho, fazendo o espalhamento das soluções separadamente na superfície e posteriormente comprimindo as barreiras. As proteínas também podem ser adsorvidas em monocamadas lipídicas de Langmuir, estas podem ser inseridas dentro da monocamada de lipídeos ou apenas ligadas pelo grupo polar dos lipídeos (Figura 2.10 C). Na adsorção na interface de filmes lipídicos de Langmuir-Blodgett, monocamadas de lipídeos são previamente depositados em um suporte sólido formando filmes LB, e então, são imersos em uma solução contendo proteínas, que podem ser adsorvidas na interface por várias interações intermoleculares com grupos funcionais dos lipídeos (Figura 2.10 D).

Baseado nos estudos de HOU *et al.* (2002) sobre filmes da proteína urease, que produziram monocamadas altamente estáveis na interface ar-água, nas condições experimentais aplicadas, e estas foram transferidas com êxito para um suporte sólido hidrofóbico, espera-se que os filmes de outras proteínas também possam apresentar comportamento semelhante. Os autores afirmam que a boa estabilidade da monocamada de urease deve-se a sua alta massa molar.

### 2.3.5. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES FINOS

Existem várias técnicas para analisar os filmes finos de Langmuir e Langmuir-Blodgett, tanto para caracterizar a estrutura, como a composição e suas propriedades. As principais técnicas são aquelas que informam sobre a estrutura e/ou orientação molecular dos filmes (GIRARD-EGROT *et al.*, 2005), como, análise de pressão e potencial de superfície (já comentadas anteriormente), elipsometria, microscopias, espectroscopias, eletroquímica, etc.

A técnica de elipsometria é um método óptico que permite medir a espessura de filmes finos transparentes, com precisão de 2 Å, sobre um suporte altamente absorvente. O método consiste em avaliar as mudanças no estado de polarização da luz causada pela reflexão em uma superfície.

A microscopia de força atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscopy*) possibilita a investigação da morfologia e topografia do domínio lipídico e protéico, a visualização de defeitos e do empacotamento submolecular (YIN *et al.*, 2006, RUBINGER *et al.*, 2006, MORAES *et al.*, 2009). Outra técnica de microscopia muito utilizada na caracterização de filmes é a microscopia eletrônica de varredura (MEV), que possibilita a visualização do filme suportado (regularidade, ligações, etc.). Ao MEV pode ser acoplado o sistema de EDS (do inglês *Energy Dispersive System*), o qual possibilita a determinação da composição qualitativa e semiquantitativa das amostras, a partir da emissão de raios X característicos. Já o microscópio de ângulo de Brewster (*Brewster Angle Microscopia*, BAM) adquire imagens em 2-D das estruturas em monocamada de filmes flutuantes sobre a própria cuba de Langmuir (PASTORINO e NICOLINI, 2002, FERNÁNDEZ *et al.*, 2007).

As espectroscopias usualmente adaptadas à análise da superfície e da composição dos filmes finos estão na região do UV-visível e do infravermelho, como a espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS, do inglês *X-ray Photoelectron Spectroscopy*), que analisa a composição química da superfície quantitativamente, e a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR, do inglês *Fourier Transform Infrared*), que permite estudar a conformação da cadeia carbônica, grau de ionização dos grupos hidrofílicos (cabeça polar), mudanças químicas e estruturais.

Quando os filmes de Langmuir são depositados sobre superfícies condutoras, tais como ouro ou carbono, técnicas eletroquímicas podem ser utilizadas, como voltametria cíclica, amperometria e impedância AC (YIN *et al.*, 2006, SHEN e LIU, 2007, MORAES *et al.*, 2009). Estas técnicas são de grande utilidade na aplicação de sensores por terem baixo custo e relativa facilidade operacional (DAVIS e HIGSON, 2005).

### **2.3.6. APLICAÇÃO DE FILMES DE LANGMUIR E LB EM BIOSENSORES**

Biossensores de glicose são os mais extensivamente estudados na Literatura (DAVIS e HIGSON, 2005). FIOLETTI *et al.* (1992) desenvolveram um biossensor de glicose baseado na técnica de Langmuir-Blodgett, com o uso de monocamadas mistas de um ácido graxo e glicose oxidase. A caracterização da ordem molecular e o processo de adsorção da enzima sobre o ácido graxo foram feitas por isotermas  $\pi - A$  e espectroscopia FT-IR. A dosagem da resposta enzimática (amperometria) revelou a importância da espessura ultrafina do filme no pequeno tempo de resposta do biossensor, pois os efeitos difusivos foram reduzidos.

A imobilização de enzimas na superfície de um suporte, visando desenvolver um biossensor, depende de alguns fatores, como método de imobilização, condições físicas e químicas, presença de contaminantes, espessura e estabilidade da membrana usada para acoplar a enzima. MALHOTRA *et al.* (2005) estudaram a formação de filmes mistos de enzimas oxidases (galactose, lactose ou glicose) e um polímero condutor (poli-3-hexiltiofeno), transferidos pela técnica de LB para um eletrodo, e o efeito da

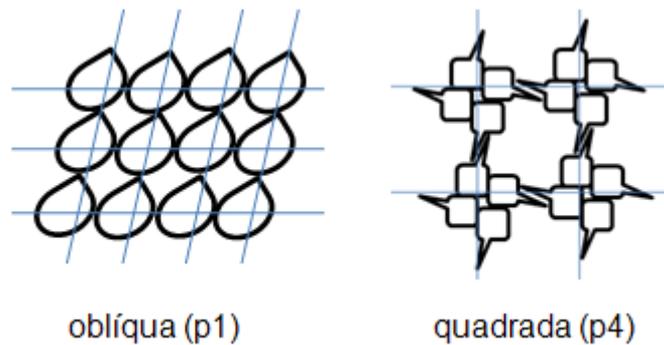
concentração da enzima, pH e estabilidade da enzima imobilizada nestes filmes. Os resultados demonstraram que os eletrodos fabricados podem ser usados para dosagem de galactose, lactose e glicose no ensaio de cada uma das substâncias, respectivamente.

YIN *et al.* (2006) desenvolveram um biossensor amperométrico de peróxido de hidrogênio baseado na imobilização de hemoglobina (Hb) incorporada com ácido linoléico (LA) sobre a superfície de um eletrodo de ouro utilizando a técnica de Langmuir-Blodgett. A comparação das isothermas  $\pi$  - A do filme puro de LA e do filme misto Hb-LA, mostrou o aumento da área sobre uma dada pressão de superfície, indicando a existência das moléculas de Hb na monocamada de LA. Os resultados experimentais indicaram que o eletrodo modificado com o filme LB misto de Hb-LA apresentou alta atividade eletrocatalítica para redução do  $H_2O_2$  sem a ajuda de qualquer mediador eletrônico, ou seja, sais condutores que auxiliam na transferência dos elétrons para o eletrodo polarizado, facilitando a regeneração de enzimas e cofatores.

#### 2.4. PROTEÍNAS DA CAMADA S

O uso de proteínas da camada S tem sido investigado no campo de biossensores com o objetivo de auxiliar na formação de um filme mais estável. Essas proteínas são originárias da camada mais externa de algumas bactérias e archeobactérias, a qual é mais conhecida como camada de proteínas de superfície bacteriana (no inglês, *crystalline bacterial cell surface layer, s-layer proteins*) e apresenta estrutura isoporosa monomolecular, exibindo propriedades de auto-organização (SLEYTR *et al.*, 1986, PUM *et al.*, 2000).

Dependendo do organismo e das condições ambientais (temperatura, pH do meio, etc.), essas proteínas podem variar suas características, como, a massa molar (40 – 200 kDa), a simetria (oblíqua – p1 e p2, quadrada – p4 ou hexagonal – p3 e p6) (Figura 2.11), o espaço entre as subunidades (3 – 30 nm), e o ponto isoelétrico (pH entre 3 – 6). As proteínas da camada S geralmente têm espessura de 5 a 10 nm e apresentam poros de morfologia e tamanho idênticos, com diâmetro variando entre 2 a 8 nm (PUM e SLEYTR, 1994).

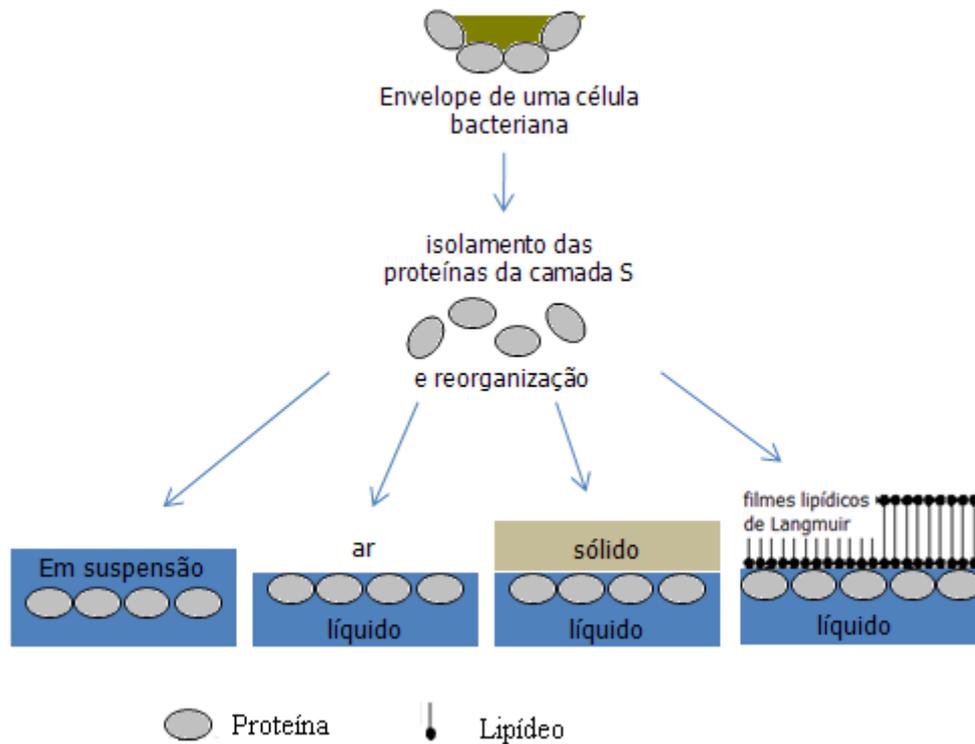


**Figura 2.11.** Ilustração da organização estrutural (oblíqua - p1 e quadrada – p4) dos reticulados das proteínas da camada S. Adaptada de SLEYTR *et al.* (2003).

Segundo SÁRA e SLEYTR (1989) apud PUM *et al.* (2000), a camada formada por essas proteínas é uma estrutura altamente anisotrópica em sua topografia, apresentando uma diferença notável entre a face interna e externa com relação à rugosidade e à química da sua superfície.

As subunidades das proteínas de superfície bacteriana interagem uma com as outras e com a camada do envelope celular pela combinação de forças não-covalentes, incluindo ligações de hidrogênio e ligações iônicas, e interações hidrofóbicas ou eletrostáticas (SLEYTR e MESSNER, 1983 apud PUM *et al.*, 2000). O isolamento e desintegração das redes dessas proteínas demonstram que as forças intermoleculares entre as subunidades são mais fortes que a ligação do arranjo cristalino com a camada do envelope onde ela está suportada (SLEYTR, 1975 apud PUM *et al.*, 2000). Essas características permitem a manutenção de um cristal superficial fechado e uma contínua recristalização das redes de proteínas da camada S sobre a superfície celular durante o crescimento e divisão celular (SLEYTR *et al.*, 2003).

Uma das mais fascinantes propriedades das proteínas da camada S é sua capacidade de reorganização em suspensão, na interface líquido-ar, na superfície de sólidos, em monocamadas lipídicas flutuantes e sobre lipossomos (PUM *et al.*, 2000), ilustrado na Figura 2.12. A orientação da rede recristalizada é determinada pelas propriedades físico-químicas das superfícies.



**Figura 2.12.** Ilustração esquemática da recristalização das subunidades das proteínas da camada S em arranjos bidimensionais. O processo de auto-organização pode ocorrer em suspensão (a), na interface ar-líquido (b), na interface sólido-líquido (c) e em filmes de fosfo- ou tetraeterlipídios (d). Figura adaptada de PUM *et al.* (2000).

#### 2.4.1. OBTENÇÃO E AUTO-MONTAGEM NA INTERFACE

Em geral, a completa desintegração dessas proteínas da superfície das células bacterianas pode ser alcançada usando alta concentração de agentes caotrópicos (como hidrocloreto de guanidina, uréia), aumentando ou diminuindo o pH do meio, pela aplicação de agentes quelantes de metais (como EDTA, EGTA), ou substituição de cátions.

Após a remoção do agente perturbador, geralmente por diálise, as proteínas da camada S podem se auto-organizar novamente em outra superfície. Estudos dos processos de automontagem têm mostrado que a fase inicial é determinada pela rápida nucleação das subunidades em compostos precursores oligoméricos consistindo de muitas unidades de proteínas. Posteriormente, estes agregados são montados em um processo muito mais lento em grandes matrizes cristalinas (JAENICKE *et al.*, 1985

apud PUM *et al.*, 2000). Duplas camadas podem ser formadas no curso do processo de automontagem. Neste caso específico, os dois constituintes das monocamadas estão face a face uns aos outros, quer com as suas faces interiores ou exteriores. Duplas camadas são muitas vezes apenas estabilizadas por cátions divalentes interagindo com grupos polares (MESSNER *et al.*, 1986 apud PUM *et al.*, 2000).

#### **2.4.2. APLICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA CAMADA S EM BIOSENSORES**

SLEYTR *et al.* (1997), baseado na riqueza de informações existentes sobre o princípio geral das proteínas da camada S, revelaram uma ampla aplicação potencial, por exemplo, nas áreas de biotecnologia, diagnósticos, desenvolvimento de vacinas, membranas biomiméticas, engenharia supramolecular e nanotecnologia. Proteínas da camada S associadas e integradas a membranas são uma classe de macromoléculas biológicas importantes da medicina e da biotecnologia, especialmente no desenvolvimento de biossensores.

PUM *et al.* (2000) citam que o desenvolvimento de membranas lipídicas funcionalizadas, com proteínas da camada S como suporte sólido, tem um grande potencial no desenvolvimento de uma nova geração de biossensores altamente específicos e sensíveis, principalmente no quesito aumento do tempo de robustez (ou seja, aumento da estabilidade do filme, mesmo quando submetido a variações ambientais, por exemplo), pois filmes lipídicos associados a proteínas da camada S são estruturas mais estáveis.

Reticulados de proteínas da camada S foram utilizados como matrizes para imobilização de um amplo espectro de proteínas biologicamente ativas (por exemplo, enzimas, anticorpos, ligantes). Com base nessas estruturas, uma vasta gama de biossensores amperométricos ou óticos e em fase sólida têm sido desenvolvidos (SÁRA e SLEYTR, 1996).

WETZER *et al.* (1997) transferiram bicamadas lipídicas para um suporte sólido através da técnica de Langmuir-Schaefer, injetando proteínas da camada S na subfase

abaixo da camada lipídica, formando, assim, um filme estável de proteínas que auxiliou na transferência. Como conclusões, obtiveram estruturas mais estáveis, com as proteínas da camada S estabilizando e protegendo a bicamada lipídica adjacente.

As vantagens da utilização das proteínas da camada S, de acordo com WETZER *et al.* (1997), no sistema de um biossensor são: evita o contato do elemento detector com o ar, o que pode provocar a desnaturação, no caso de enzimas; forma um filme mais rígido; aumenta o tempo de estocagem e; serve como uma estrutura estabilizante e protetora da camada lipídica. O aumento no tempo de vida útil dos filmes lipídicos quando associados às proteínas da camada S, também foi reportado por SLEYTR *et al.* (2003), o que é explicado por um aumento na resistência contra estresse mecânico.

GUFLER *et al.* (2004) investigaram, através da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica, membranas lipídicas suportadas com proteínas da camada S formadas pela técnica LB modificada. Os resultados obtidos demonstraram que a implementação de matrizes cristalinas de proteínas da camada S (matrizes hidrofílicas, isoporosas e estabilizantes) é uma tecnologia muito competitiva para o desenvolvimento de biossensores de membranas à base de proteínas.

## CAPÍTULO III

### MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. INTRODUÇÃO

Este capítulo descreve toda a metodologia empregada neste trabalho, desde o cultivo e a extração das proteínas da camada S de uma cepa de bactéria, passando pela formação e caracterização de filmes monomoleculares da enzima colesterol oxidase nas interfaces ar-água e ar-sólido, até testes preliminares de voltametria cíclica.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioprocessos e no Laboratório de Fenômenos Interfaciais do PEQ/COPPE/UFRJ. Experimentos complementares foram realizados no Laboratório de Filmes Finos, localizado no Departamento de Física, Química e Biologia no Campus de Presidente Prudente, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, utilizando uma cuba de Langmuir KSV 2000, com respectivo *software*.

#### 3.2. A BACTÉRIA *Bacillus sphaericus* CCM 2177 E AS PROTEÍNAS DA CAMADA S

##### 3.2.1. MEIO DE CULTIVO

As proteínas da camada S foram extraídas da bactéria *Bacillus sphaericus* CCM 2177 (ATCC 14577), cultivada em caldo nutriente (5 g L<sup>-1</sup> de Peptona de Carne - Sigma e 3 g L<sup>-1</sup> de Extrato de Carne - Sigma) esterilizado por calor úmido (autoclave a pressão de 1,2 atm por 20 minutos).

### **3.2.2. CULTIVO INICIAL E ESTOCAGEM**

Inicialmente, a bactéria liofilizada, contida na ampola cedida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade de Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), foi cultivada em caldo nutriente por 24 horas em agitador rotacional, sob agitação constante de 170 rpm, e a temperatura de 30°C.

Após este período, 5% (v/v) deste meio de cultura foi re-inoculado em caldo nutriente estéril com o propósito de propiciar amplo crescimento da cultura.

Em seguida para estocagem da cultura, foram preparados 30 microtubos tipo *Eppendorf* da Millipore® com 1 mL de glicerol 40% (esterilizado com calor úmido – autoclave 1,2 atm por 20 minutos) e 1 mL do meio caldo nutriente contendo as bactérias crescidas por 24 horas. A estocagem foi feita à temperatura de -16°C (freezer).

### **3.2.3. CULTIVO**

Cada cultivo da bactéria era iniciado a partir de um microtubo estocado no freezer. Este era inoculado em 100 mL de caldo nutriente estéril, ou seja, um inóculo de 1% (v/v), crescendo em agitador rotatório a 170 rpm, temperatura de 30°C. Após 16 horas, fazia-se uma re-inoculação de 5% (v/v) deste caldo em um volume de 250 mL de um novo caldo nutriente estéril, por mais 16 horas. A determinação do tempo necessário para o crescimento da bactéria foi baseada na curva de crescimento desta.

### **3.2.4. CURVA DE CRESCIMENTO**

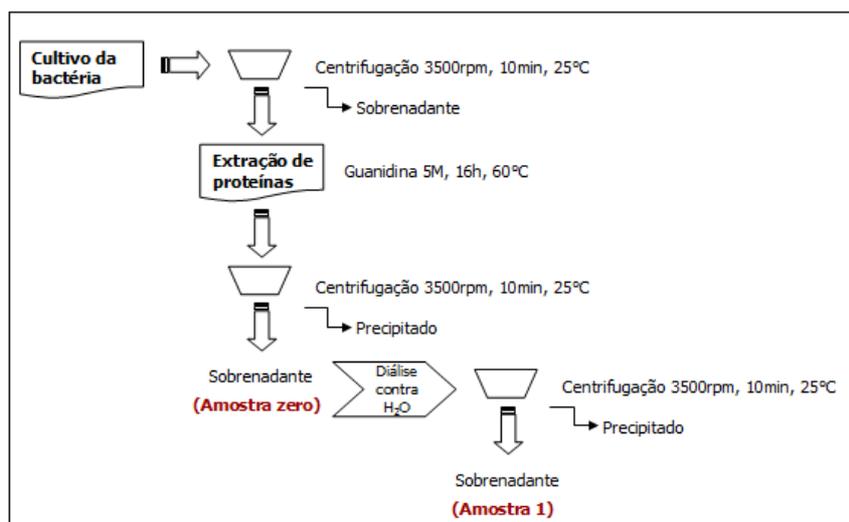
A curva de crescimento foi obtida a partir do acompanhamento do processo coletando alíquotas de 1,5 mL em intervalos de 1,5 hora, pela leitura da D.O. (densidade ótica) das amostras em espectrofotômetro modelo Spectronic 20D+ em um comprimento de onda ( $\lambda$ ) igual a 600 nm. Quando necessário, fez-se diluições das alíquotas de até oito vezes para obter absorvância na faixa entre 0,1 e 0,2, faixa considerada ideal para a leitura da absorvância.

### 3.2.5. CURVA DE MASSA SECA

A curva de massa seca característica da bactéria *B. sphaericus* CCM 2177 foi elaborada utilizando o método convencional, em triplicata. Centrifugou-se (3500 rpm, 10 minutos) a massa de células contida em 25 mL de meio de cultura com células em crescimento na fase estacionária. Lavou-se as células duas vezes. Pesaram-se os cadinhos antes e depois da deposição das células e, após a secagem completa em estufa do material que estava neles, ou seja, até a massa tornar-se constante. A diferença das massas dos cadinhos, antes da deposição das células e após a secagem completa, determinava a massa das células secas em 25 mL de meio. A concentração média foi determinada pela média aritmética da massa seca dos três cadinhos. Foram feitas diluições do mesmo meio com as células em crescimento na fase estacionária para traçar a curva de massa seca, relacionando-se com a concentração de células no meio.

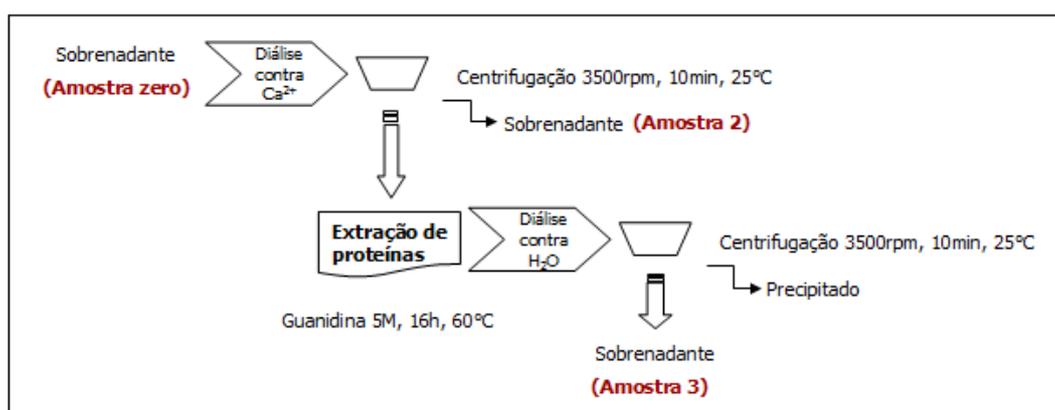
### 3.2.6. EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO

Após o cultivo da bactéria como descrito acima, estas eram colhidas por centrifugação a 3500 rpm por 10 minutos. O material da parede celular era extraído com uma solução 5 M de hidrocloreto de guanidina em 50 mM de tampão Tris-HCl pH 7,2 por 16 horas a 60°C. O extrato era centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante (amostra zero) sofria uma diálise contra água destilada a temperatura ambiente por, no mínimo, 2 horas. Após nova centrifugação, obtinha-se um sobrenadante claro (amostra 1). Esta metodologia foi adaptada de PUM e SLEYTR (1994). A Figura 3.1 ilustra as etapas de extração das proteínas da camada S descritas acima.



**Figura 3.1.** Ilustração esquemática do procedimento de extração das proteínas da camada S (obtenção da amostra zero e amostra 1).

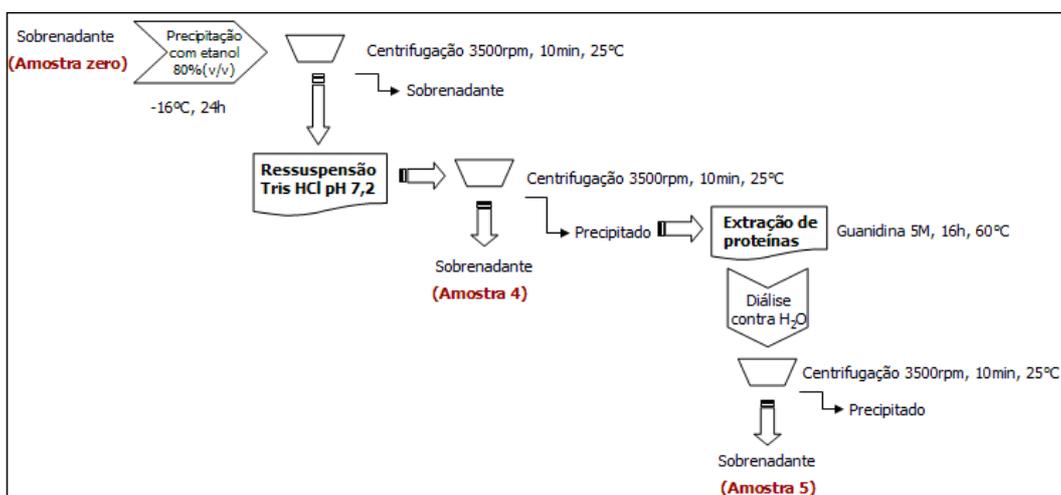
Outra metodologia (SLEYTR *et al.*, 1986) propõe uma etapa adicional no isolamento das proteínas da camada S, a diálise contra solução de cloreto de cálcio 10 mM ( $V = 500$  mL). Colocava-se 5 mL do sobrenadante identificado como amostra zero em uma membrana de diálise sob leve agitação a 25°C por, no mínimo, 2 horas. Após centrifugação (3500 rpm, 10 minutos) obtinha-se um sobrenadante (amostra 2), e um precipitado, que sofria nova desintegração por hidrocloreto de guanidina 5 M (amostra 3). A Figura 3.2 apresenta um esquema do procedimento descrito nesta etapa.



**Figura 3.2.** Ilustração esquemática da extração das proteínas da camada S com etapa de diálise contra solução de cloreto de cálcio 10 mM, obtendo as amostras 2 e 3.

Metodologias para precipitação de proteínas usualmente praticadas no Laboratório de Bioprocessos (PEQ-COPPE) também foram testadas, partindo do sobrenadante identificado como amostra zero. São elas: precipitação com etanol 80% (v/v) a  $-16^{\circ}\text{C}$  por 24 horas e precipitação com sulfato de amônio 75% da saturação a  $0^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Antes das análises, as amostras passavam por um processo de diálise contra água para a retirada do excesso do sal, que interfere nas análises, e uma centrifugação para obtenção de amostras sem interferência de particulados.

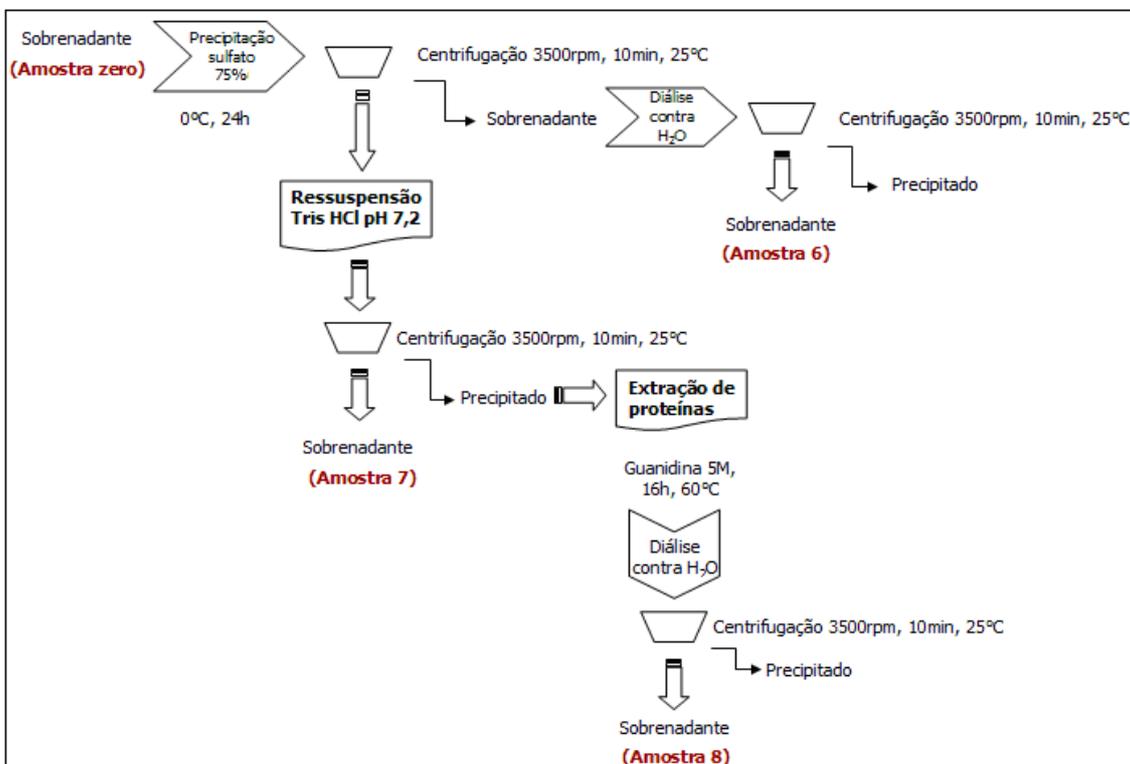
Na Figura 3.3 estão ilustrados os procedimentos da precipitação com etanol. O sobrenadante (amostra zero) era misturado com etanol puro em uma proporção de 1:4 (v/v) e submetido a baixas temperaturas ( $-16^{\circ}\text{C}$ ) por 24 horas. Após este tempo, centrifugava-se a mistura e o precipitado era ressuspensão em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,2 ( $V = 2\text{ mL}$ ). Após centrifugação, separava-se o sobrenadante (amostra 4) do precipitado, que sofria nova extração das proteínas por hidrocloreto de guanidina 5 M ( $V = 2\text{ mL}$ ) (amostra 5).



**Figura 3.3.** Ilustração esquemática do procedimento de extração das proteínas da camada S com precipitação com etanol a 80% (v/v), obtendo as amostras 4 e 5.

Finalmente, testou-se a precipitação com sulfato (Figura 3.4). Misturou-se sulfato de amônio ao sobrenadante (amostra zero) na proporção de 75% da saturação sob leve agitação e temperatura de  $50^{\circ}\text{C}$ . Essa mistura foi mantida a  $0^{\circ}\text{C}$  por 24 horas e depois centrifugada ( $3500\text{ rpm}$ , 10 minutos). O sobrenadante sofria diálise contra água

(amostra 6). Já o precipitado era ressuspensão em 2 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,2 e centrifugado, obtendo um sobrenadante (amostra 7) e um precipitado que sofria nova extração com guanidina 5 M (amostra 8).



**Figura 3.4.** Ilustração esquemática do procedimento de extração das proteínas da camada S com precipitação com sulfato de amônio a 75% da saturação, obtendo as amostras 6, 7 e 8.

### 3.2.7. PURIFICAÇÃO

Para a purificação da proteína, foram utilizadas as técnicas de cromatografia de troca iônica e interação hidrofóbica. Na cromatografia de troca iônica foi utilizada uma coluna comercial HiTrap QFF (HiTrap<sup>TM</sup>), com propriedade de forte troca aniônica e volume de 1 mL, onde foi passado tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7,0 (tampão de partida), fazendo o gradiente de eluição com adição de cloreto de sódio neste tampão. Já na cromatografia de interação hidrofóbica, foi utilizada uma coluna comercial HiTrap Butyl FF (HiTrap<sup>TM</sup>), com volume de 4 mL. A amostra, antes de ser injetada na coluna, era misturada com sulfato de amônio até obter uma solução 1 M. O tampão fosfato

50 mM pH 7,0 com 1 M de sulfato de amônio foi utilizado como tampão de partida e fazia-se uma eluição em gradiente decrescente de concentração deste sal. Todas as frações eram analisadas por determinação de proteínas totais (método de Bradford) e as frações de maior concentração de proteínas eram concentradas, sofriam diálise contra água destilada e eram analisadas por eletroforese (SDS-PAGE). A concentração das amostras de proteínas, citada acima, era realizada por um dispositivo de membranas (Millipore, tamanho de poro igual a 10 kDa) em centrífuga a 3500 rpm.

### 3.3. ENZIMA COLESTEROL OXIDASE

Para a formação dos filmes monomoleculares, utilizou-se a enzima colesterol oxidase obtida de *Cellulomonas sp.* e fornecidas em solução de 10 mM de tampão Tris-HCl pH 8,0 (Sigma-Aldrich), com massa molar de 62 kDa (SDS-PAGE), pH ótimo variando entre 7,0 e 7,5. Outras características dessa enzima são: atividade enzimática específica maior ou igual a 30 U mL<sup>-1</sup>, estrutura com um cofator FAD, ponto isoelétrico (pI) igual a 4,5 e temperatura ótima em torno de 50°C. A atividade enzimática da COx foi aferida baseado na metodologia descrita por ALLAIN *et al.* (1974) e MALIK e PUDIR (2002).

Em ensaios preliminares de voltametria cíclica, teste de verificação do eletrodo de trabalho a ser utilizado como suporte para a fabricação do biossensores de colesterol, foi utilizada a enzima COx de *Rhodococcus erythropolis* em solução tampão fosfato 0,05 M pH 7,0 (atividade enzimática de 0,5 U mL<sup>-1</sup>), fornecida pela empresa EngeneTech. Antes dos experimentos serem realizados, as soluções de COx sofriam diálise contra água destilada para retirar o excesso de sulfato, sal utilizado na etapa de precipitação da enzima COx.

### 3.4. CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS E ENZIMAS

#### 3.4.1. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Um procedimento simples para a determinação da concentração de proteínas é o método colorimétrico de Bradford, no qual se emprega o corante azul brilhante de Coomassie (BRADFORD, 1976). A interação entre o corante e macromoléculas de proteínas, que contém aminoácidos de cadeia laterais básicas ou aromáticas, no pH de reação, provoca o deslocamento do equilíbrio deste para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm (ZAIA *et al.*, 1998).

Preparo dos Reagentes:

**Solução de Azul Brilhante de Coomassie (CBB-G) 100 mg L<sup>-1</sup>:** Para a preparação de 1 L do reagente, dissolveu-se 0,1 g do reagente Azul de Coomassie (CBB-G, C<sub>47</sub>H<sub>48</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>Na, PM = 844 g mol<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich) em 50 mL de etanol a 95%, sob agitação constante, e em seguida, misturava-se 100 mL de ácido ortofosfórico a 85%. Para a completa digestão do CBB-G, os reagentes ficavam sob agitação por 24 horas. Filtrava-se em papel de filtro qualitativo e completava-se o volume para 1 L, com água destilada. A solução era guardada a 4°C por um mês, em frasco âmbar para protegê-lo da ação da luz, já que o mesmo é fotossensível.

**Solução de Albumina do Soro Bovina (BSA, de *bovine serum albumin*, em inglês) 250 mg L<sup>-1</sup>:** Dissolvia-se 25 mg de albumina bovina com água destilada, e completava-se o volume para 100 mL em balão volumétrico. A solução era estocada a 4°C.

**Determinação da Curva de Calibração:** A absorbância era medida em um espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 595 nm. A comparação dos resultados com uma curva padrão, com valores de concentrações conhecidos na faixa de 70 mg L<sup>-1</sup> a 250 mg L<sup>-1</sup> de solução de BSA, permite a determinação da concentração da proteína em estudo. As amostras a serem analisadas eram preparadas misturando 2 mL da solução de Azul Brilhante de Coomassie a 100 µL da solução a ser analisada, com

tempo de reação de 10 minutos. A cada dia de análise era necessário construir uma curva de calibração.

### 3.4.2. ELETROFORESE

As proteínas apresentam tanto grupamentos com cargas positivas quanto negativas, provenientes dos aminoácidos que as constituem. A somatória das cargas de todas as regiões carregadas de uma proteína confere uma carga total à proteína.

Eletroforese é uma técnica de separação de moléculas que envolve a migração de partículas carregadas quando submetidas a uma diferença de potencial. Na eletroforese em gel de poliacrilamida, as proteínas são separadas apenas por tamanho, uma vez que estas são desnaturadas previamente pelo efeito do dodecil sulfato de sódio (SDS) e da temperatura elevada (95°C – vide ANEXO I). Assim, as proteínas de maior tamanho são retardadas muito mais do que as de menor tamanho. Uma mistura complexa de proteínas é fracionada em diferentes bandas de proteínas arranjadas de acordo com sua massa molecular.

Essa técnica foi utilizada, principalmente, para a detecção das proteínas da camada S, de massa molar aproximada de 120 kDa, fazendo uma comparação das bandas com uma amostra padrão (solução de proteínas de tamanho conhecido). Foram utilizadas neste trabalho, uma solução pura de proteínas de soro bovino (BSA, 67 kDa, 250 mg L<sup>-1</sup>) ou uma solução padrão para eletroforese (Bio-Rad), contendo proteínas de tamanhos conhecidos (10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 e 250 kDa), em que as bandas formadas com as proteínas de 25, 50 e 75 kDa são três vezes mais intensas que as demais, e servem como referência. Utilizou-se gel de corrida 10% e gel de nivelamento 4%, sob uma diferença de potencial de 100 volts. O protocolo da técnica de eletroforese encontra-se no ANEXO I.

Ao término da eletroforese, o gel era corado com uma solução de azul de coomassie R-250 (Sigma) por, aproximadamente, 2 horas e descorado por igual período. De acordo com SLEYTR *et al.* (1986), seguindo o procedimento de extração das proteínas da camada S e analisando os géis de poliacrilamida, as bandas de maior

massa molar dos extratos celulares são referentes às proteínas da camada S, pois estas são as proteínas de superfície celular de maior tamanho.

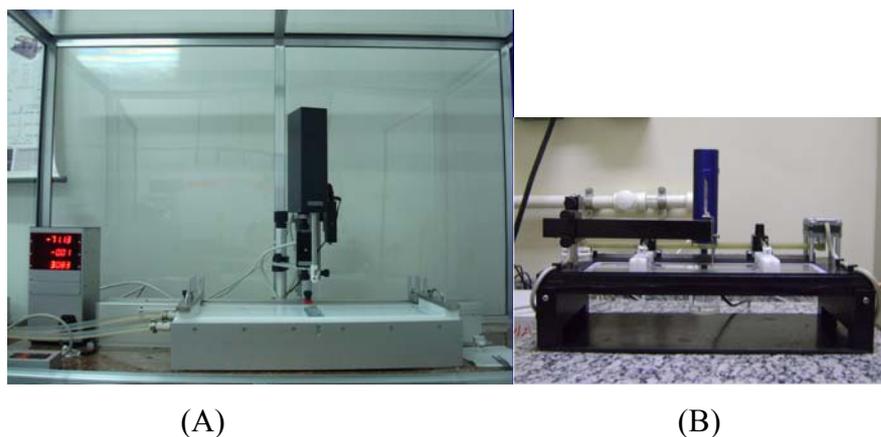
### **3.5. FORMAÇÃO DE FILMES DE LANGMUIR**

#### **3.5.1. CUBA DE LANGMUIR E ESTRUTURA DO LABORATÓRIO**

Os experimentos foram realizados em uma cuba de Langmuir de alta precisão, modelo *MicroTrough - S*, *Kibron Inc.*, medindo 59 mm de largura por 202 mm de comprimento. A profundidade variava de acordo com o tipo de bandeja utilizada para determinado experimento. Esta cuba tinha bordas da bandeja e barreiras móveis de teflon (poli(tetrafluoroetileno)) e era equipada com um sistema de medição de pressão de superfície do tipo *Wilhelmy*. O *software Filmware* versão 2.5, que acompanha o equipamento, possibilitava o ajuste dos parâmetros iniciais e registrava os valores das pressões de superfície obtidas durante os experimentos. A limpeza da cuba era feita, primeiramente, passando sobre ela água quente em abundância (~100°C), seguido de etanol, e por fim, água a temperatura ambiente, sendo depois seca com ar comprimido.

Em alguns dos experimentos, também foi utilizada uma cuba de Langmuir, modelo KSV 2000, de dimensões maiores (volume de subfase igual a 1500 mL), bandeja e barreiras em teflon, placa de *Wilhelmy*, e *software* com maior possibilidade de controle dos parâmetros.

A estrutura laboratorial necessária para execução dos experimentos exige um ambiente limpo, com temperatura e umidade controladas. A cuba foi posicionada em uma bancada isolada de outros equipamentos, para evitar turbulências na superfície do sistema, e era envolta por uma caixa de acrílico. Na Figura 3.5 podem ser vistas fotografias das duas cubas utilizadas: a cuba KSV 2000 utilizada no Laboratório de Filmes Finos da UNESP (à esquerda), e a cuba Kibron utilizada no Laboratório de Fenômenos Interfaciais do PEQ (à direita).



**Figura 3.5.** (A) Cuba de Langmuir KSV 2000 ( $V = 1500 \text{ mL}$ ) e (B) cuba de Langmuir MicroTrough - S, Kibron ( $V = 50 \text{ mL}$ ).

### 3.5.2. MATERIAIS

A subfase era preparada com água ultra pura (Milli-Q, Millipore). As soluções de DPPC (L-alfa-fosfatidilcolina dipalmitoil sintético, Sigma-Aldrich) em clorofórmio ( $0,85 \text{ mg mL}^{-1}$  de DPPC/clorofórmio) eram preparadas no dia de cada experimento, a estocagem era feita a  $-16^\circ\text{C}$ . A enzima colesterol oxidase obtida de *Cellulomonas* em  $10 \text{ mM}$  de tampão Tris-HCl pH 8,0 (Sigma-Aldrich), com concentração igual a  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  (item 3.3). A solução de proteínas da camada S, como descrita anteriormente (item 3.2.6 – amostra 1), foi extraída da bactéria *B. sphaericus* CCM 2177 com hidrocloreto de guanidina  $5 \text{ M}$  por 16 horas a  $60^\circ\text{C}$ , sendo feita em seguida uma diálise contra água destilada para retirada do excesso do sal.

Como a espessura do filme deve ser de apenas uma molécula, a quantidade de material espalhado sobre a superfície era pequena em relação à área superficial total da cuba. As soluções utilizadas eram de baixa concentração para evitar que as gotas depositadas na superfície migrassem para a subfase.

### 3.5.3. ISOTERMAS $\pi$ - A

A caracterização dos filmes de Langmuir é um tópico importante neste trabalho, pois, segundo FERREIRA *et al.* (2005), um filme LB de boa qualidade requer necessariamente a obtenção de filmes de Langmuir estáveis sobre a subfase aquosa, o que nem sempre é trivial, principalmente para as macromoléculas como as proteínas/enzimas, pois estas não possuem partes hidrofílicas e hidrofóbicas bem definidas nas moléculas como os lipídeos (Figura 2.5), como já comentado no item 2.3.4. A velocidade de compressão das barreiras também não pode ser alta, assim, fixou-se para todos os experimentos a velocidade de 10 mm min<sup>-1</sup>.

A partir dos dados de entrada (volume, concentração e massa molar da molécula analisada), o *software* calculava o número de moléculas presentes na superfície (Equação 3.1).

$$N^{\circ} = \frac{6,022 \cdot 10^{23} \left(\frac{\text{moléc}}{\text{mol}}\right) \cdot C \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right) \cdot V (\mu\text{L}) \cdot 10^{-6} \left(\frac{\text{L}}{\mu\text{L}}\right)}{MM \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)} \quad (3.1)$$

Sendo: N<sup>o</sup> = número de moléculas

C = concentração (g L<sup>-1</sup>)

V = volume (μL)

MM = massa molar (g mol<sup>-1</sup>)

Assim, à medida que as barreiras móveis da cuba de Langmuir aproximavam-se uma da outra, diminuindo a área entre elas, a área média ocupada por uma molécula era reduzida, como mostrado pela Equação 3.2, e a pressão de superfície era detectada pelo sensor do tipo *Wilhelmy*.

$$\Delta \text{Área}_{\text{molécula}} \left(\frac{\text{Å}^2}{\text{molécula}}\right) = \frac{\Delta \text{Área}_{\text{cuba}} (\text{mm}^2)}{N^{\circ} (\text{molécula})} \cdot 10^{14} \left(\frac{\text{Å}^2}{\text{mm}^2}\right) \quad (3.2)$$

Sendo:  $\Delta \text{Área}_{\text{molécula}}$  = área média ocupada por uma molécula

$\Delta \text{Área}_{\text{cuba}}$  = área superficial entre as barreiras na cuba de Langmuir

Isotermas de DPPC foram usadas como controle, garantindo que o equipamento estava funcionando corretamente e as condições do ambiente estavam adequadas. O fosfolípido dissolvido em clorofórmio era propagado na superfície, ou seja, depositado através de pequenas gotas que se espalhavam por toda a área disponível entre as barreiras, utilizando uma micro-seringa Hamilton. Antes de comprimir as barreiras, esperava-se 20 minutos para que o solvente evaporasse completamente. As isotermas da enzima COx eram geradas por duas metodologias, ou a solução de COx era injetada na subfase e esperava-se o tempo de 1 hora ou era propagada na interface ar-água e, nesse caso, esperava-se 20 minutos para, então, comprimir as barreiras. Já as isotermas de filmes formados com soluções das proteínas da camada S eram também obtidas pela injeção na subfase ou propagados na superfície da subfase de água ultra pura, esperando tempo similar ao da COx antes de iniciar a compressão das barreiras.

Filmes mistos eram formados pela propagação de duas soluções de moléculas diferentes na superfície, por exemplo, a enzima COx e as proteínas da camada S. Aplicava-se primeiro a proteína e, após 20 minutos, aplicava-se a enzima, ambas na superfície. Três isotermas  $\pi$  - A com diferentes proporções (volume/volume) entre as duas moléculas foram formadas: (2:1), com aplicação de 10  $\mu$ L de solução de COx (1 mg mL<sup>-1</sup>) e 5  $\mu$ L de solução de proteínas de superfície (extrato bruto de proteínas, 0,762 mg mL<sup>-1</sup>); (1:1), com volume aplicado de 10  $\mu$ L para ambos; e (1:2), com 5  $\mu$ L de DPPC e 10  $\mu$ L de COx. Também foram formados filmes mistos de DPPC e proteínas da camada S, nas mesmas proporções volume/volume indicadas acima, para verificar a influência das proteínas na modificação na forma da isoterma de DPPC.

#### **3.5.4. CICLOS DE COMPRESSÃO-DESCOMPRESSÃO**

Ciclos de compressão-descompressão da monocamada de proteína foram realizados para estudar a reversibilidade dos filmes de Langmuir. A solução das proteínas da camada S foi propagada na superfície e, após o tempo de 20 minutos, realizava-se a compressão das barreiras, inicialmente, até uma pressão menor que a pressão de superfície da mudança de fase de líquido-expandido para líquido-condensado, observado numa isoterma previamente formada e igual a 15 mN m<sup>-1</sup>, e,

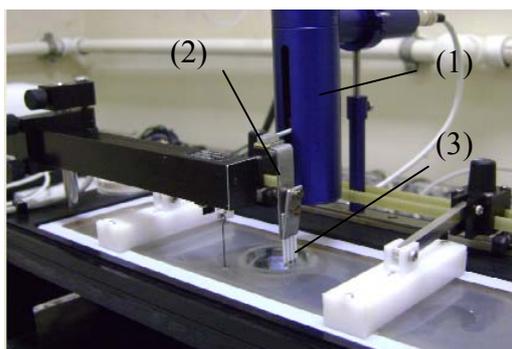
então, as barreiras eram relaxadas. Repetia-se este procedimento por mais duas vezes, com intervalos de um minuto entre cada ação do ciclo, compressão e relaxamento das barreiras. Depois, repetia-se todo o procedimento inicial com a definição dos mesmos parâmetros, porém, fixava-se uma nova pressão de superfície, igual a  $30 \text{ mN m}^{-1}$ , agora maior que a pressão da transição de fase citada. A forma dos ciclos das isotermas formadas era analisada com o intuito de verificar a presença do fenômeno de histerese, entre a isoterma de compressão e a de descompressão, o que revelava a capacidade de reversibilidade do filme de Langmuir.

### **3.5.5. ESTUDO DA ESTABILIDADE DOS FILMES**

A solução de proteínas da camada S foi propagada na superfície aquosa e, após 15-20 minutos, as barreiras foram comprimidas até o filme apresentar uma pressão de filme de  $15 \text{ mN m}^{-1}$ . Esta pressão de superfície foi mantida constante pela movimentação compensatória das barreiras (controladas pelo computador), durante o tempo determinado do experimento, 6000 segundos. A estabilidade do filme foi avaliada pela variação da área média ocupada pelas moléculas na superfície.

### **3.6. FORMAÇÃO DE FILMES DE LANGMUIR-BLODGETT**

Os filmes de Langmuir-Blodgett (filmes LB) foram formados a partir dos filmes de Langmuir, pela imersão/emersão vertical do suporte sólido com velocidade controlada e pressão de superfície constante durante a deposição do filme (*software Filmware* versão 2.5). A pressão de superfície padrão para a deposição era definida através da análise prévia da isoterma  $\pi - A$  para cada monocamada de moléculas. Filmes multicamadas eram fabricados pela repetida imersão e retirada do suporte, verticalmente, da subfase.



**Figura 3.6.** Aparato utilizado na deposição LB – cuba de Langmuir (*Kibron*). Sendo: (1) aparato de Langmuir-Blodgett para deposição, (2) porta-suporte (3) suporte para deposição.

### 3.6.1. ESCOLHA DO SUPORTE SÓLIDO

Cada deposição LB era feita em um suporte sólido, cujo material era selecionado a depender das propriedades requeridas para a imobilização orientada das moléculas (como por exemplo, polaridade). Neste sentido, foram testados suportes de quartzo, quartzo recoberto com ouro, alumínio recoberto com ouro e superfície de eletrodo de trabalho (contido em um sensor impresso, Figura 3.7), principalmente de carbono, para análise eletroquímica.

### 3.6.2. CARACTERIZAÇÃO

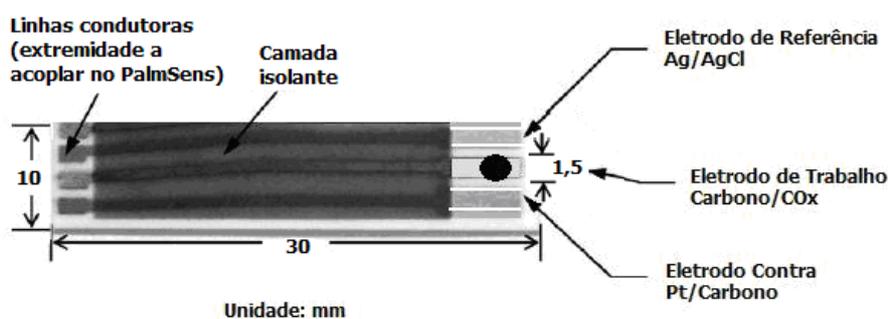
Após a transferência para um suporte sólido, filmes de COx, DPPC e das proteínas da camada S foram analisados em um espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR *Spectrometer*), marca Perkin Elmer, modelo Spectrum 100, localizado no Laboratório PAM no PEQ, através de reflectância total atenuada (ATR). Esta análise permite comparar as vibrações das ligações químicas existentes no suporte antes e após a transferência dos filmes.

A morfologia e topografia da superfície do eletrodo de trabalho, utilizados como suportes sólidos, foram analisados no microscópio de força atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscopy*), da marca JPK Instruments, modelo NanoWizard AFM,

localizado no INMETRO. Para esta análise, no modo de operação contato intermitente, foi utilizada uma ponteira da marca Tip Veeco. Este modo de operação foi utilizado para analisar a superfície do eletrodo de trabalho de carbono, pois o material depositado neste suporte (moléculas biológicas, proteínas) é mais maleável e seria facilmente deformado pela ponteira, e também por tratar-se de amostras muito rugosas. Assim, a ponteira percorre a região da amostra oscilando a certa frequência (kHz), com grande amplitude, e responde a forças de interação ou gradientes de força que se estabelecem entre a ponta e amostra, atenuando a amplitude da oscilação. Antes da análise, as amostras eram secas em um desumidificador com sílica-gel por 2 horas.

### 3.7. BIOSENSOR DE COLESTEROL

Biossensores de colesterol foram fabricados através da tecnologia de filmes LB, utilizando sensores impressos como suportes sólidos para os filmes de Langmuir contendo a enzima COx. Os filmes foram transferidos apenas para a superfície do eletrodo de trabalho, protegendo os outros dois eletrodos (referência e contra) no momento da transferência com fita adesiva celofane. A Figura 3.7 ilustra um sensor (Palm Instruments) semelhante ao utilizado para a caracterização eletroquímica do biossensor de colesterol, com eletrodos impressos (referência, trabalho e contra) ao longo do sensor, sendo uma extremidade detectora e outra que se acopla ao instrumento de interface sensora eletroquímica PalmSens, da marca Ivium Technologies; entre elas, os caminhos são isolados por uma camada de material impermeabilizante.



**Figura 3.7.** Ilustração com a configuração do sensor.

Em um experimento típico, propagava-se na superfície 10  $\mu\text{L}$  de COx em solução de 1  $\text{mg mL}^{-1}$  em 10 mM de tampão Tris-HCl pH 8,0 (Sigma-Aldrich), esperava-se 20 minutos e, em seguida, fazia-se a compressão das barreiras ( $10 \text{ mm min}^{-1}$ ) até a pressão de superfície de  $15 \text{ mN m}^{-1}$ , acompanhando a isoterma  $\pi - A$ . Como a molécula da enzima COx possui domínios hidrofóbicos e hidrofílicos, foram testadas duas metodologias de deposição do filme para o suporte de carbono (apolar hidrofóbico). Nos biossensores com deposição tipo Z, as moléculas de COx eram imobilizadas apenas na subida do suporte sólido, ou seja, quando o sensor impresso era retirado da subfase aquosa a uma velocidade pequena ( $1,5 \text{ mm min}^{-1}$ ). Para evitar a imobilização na descida, empregava-se uma velocidade elevada ( $6 \text{ mm min}^{-1}$ ), assim, a razão de transferência (Equação 2.2) tenderia a zero. Já os biossensores fabricados com a deposição tipo Y, as moléculas eram imobilizadas tanto na imersão quanto na subida do sensor impresso da subfase aquosa a uma velocidade de  $1,5 \text{ mm min}^{-1}$ . Ao final, seis deposições de filmes LB foram realizadas.

Outra metodologia testada foi a adsorção da COx na superfície do eletrodo de trabalho de carbono, apenas aplicando uma gota de solução de COx ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) na superfície do eletrodo de trabalho (carbono).

Também foram fabricados biossensores utilizando filmes mistos de COx/proteínas da camada S na proporção de 1:1 (v/v). Propagava-se 5  $\mu\text{L}$  de proteínas da camada S ( $0,762 \text{ mg mL}^{-1}$ ), esperava-se 20 minutos, e propagava-se 5  $\mu\text{L}$  de COx ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ), esperava-se 20 minutos. Aproximava-se as barreiras até a pressão de superfície de  $15 \text{ mN m}^{-1}$ , e fazia-se as transferências.

Durante o tempo que não estavam sendo utilizados, esses sensores com eletrodos de carbono modificado com diferentes filmes (filmes contendo a enzima adsorvida a partir da solução gotejada, filmes LB da enzima pelas metodologias de deposição tipo Z e tipo Y, e filme LB enzima - proteínas da camada S) foram estocados em geladeira dentro de placas de Petri envoltas por filme PVC, contendo no seu interior sílica gel.

### **3.8. CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA**

A metodologia aplicada para a caracterização eletroquímica dos biossensores de colesterol fabricados pela técnica LB foi baseada nos experimentos realizados por SHEN e LIU (2007). Voltamogramas cíclicos foram registrados para o estudo da eletrocatalise do colesterol.

O sistema sensor era composto por três eletrodos impressos (Figura 3.7): um eletrodo de trabalho constituído de carbono ( $7,06 \text{ mm}^2$ ), com a enzima COx imobilizada na superfície, um eletrodo de referência composto de prata/cloreto de prata e, um eletrodo contra de platina com carbono. Foi testado também o eletrodo de trabalho de ouro, porém sem resultados expressivos.

#### **3.8.1. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES DE COLESTEROL**

As soluções de colesterol eram preparadas imediatamente antes do uso. Tanto para a detecção de colesterol em solução (testes preliminares) quanto para os testes do biossensor de colesterol fabricado através da técnica LB, diferentes quantidades de colesterol (Vetec) foram diluídas em uma mistura de triton X-100 (Vetec) e isopropanol (Vetec), sendo em seguida adicionado tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, ficando a solução final em uma razão de tampão fosfato:isopropanol:triton X-100 igual a 86:10:4 (%peso).

#### **3.8.2. CICLOS VOLTAMÉTRICOS**

Inicialmente, ensaios com a enzima COx em solução foram realizados com o objetivo de determinar o melhor tipo de eletrodo, ouro ou carbono, para a detecção de colesterol. O sensor era imerso em uma solução de colesterol  $100 \text{ mg dL}^{-1}$ , gerando um voltamograma cíclico, representando o branco do experimento, na ausência de enzima COx. Imediatamente após a adição de  $400 \mu\text{L}$  de uma solução de COx (EngeneTech,  $0,5 \text{ U mL}^{-1}$ ), gerava-se mais um voltamograma. E, finalmente, decorrendo um tempo de 20 minutos, mais um voltamograma era gerado. Nesses

ensaios foram utilizados velocidade de varredura igual a  $25 \text{ mV s}^{-1}$ , e temperatura de  $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ .

A técnica de voltametria cíclica também foi utilizada para caracterizar os biossensores fabricados pela modificação da superfície do eletrodo de trabalho de carbono com a enzima COx. Foram desenvolvidos biossensores com o eletrodo de trabalho de carbono, utilizando as metodologias de deposição tipo Z e Y, contendo filmes LB da COx, ou contendo filmes LB mistos da enzima COx / proteínas da camada S, ou contendo uma gota da solução da enzima adsorvida. Nesses testes foi utilizado um volume de 1 mL de solução de colesterol  $150 \text{ mg dL}^{-1}$  em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, isopropanol e triton X-100, 86:10:4 (% peso), com temperatura controlada a  $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ , e velocidade de varredura igual a  $25 \text{ mV s}^{-1}$ .

Os ciclos voltamétricos foram iniciados a um potencial igual a 0,5 V (*versus* Ag/AgCl), sendo, então, diminuído este potencial para regiões mais negativas (catódica) ocorrendo possivelmente a redução dos compostos em solução e gerando um pico de corrente proporcional à concentração destes compostos. Quando o potencial atingir um valor em que nenhuma reação de redução ocorra, o potencial inverte o sentido, aumentando o potencial até o valor inicial. No caso da reação ser reversível, os produtos gerados no sentido direto, e se localizam ainda próximos à superfície do eletrodo de trabalho, serão oxidados, gerando um pico anódico.

## **CAPÍTULO IV**

### **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

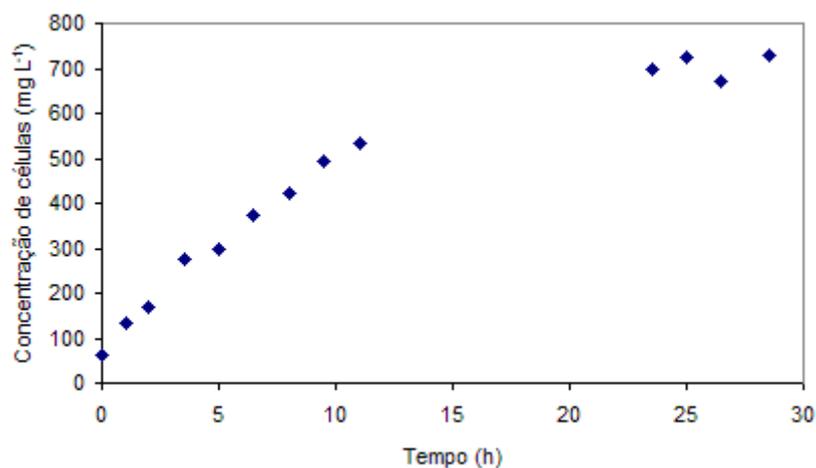
#### **4.1. INTRODUÇÃO**

Neste capítulo são apresentados e discutidos os principais resultados obtidos neste trabalho. São relatados os resultados referentes à extração e purificação das proteínas da camada S, ao estudo de filmes monomoleculares e a caracterização eletroquímica de biossensores de colesterol.

#### **4.2. PROTEÍNAS DA CAMADA S**

##### **4.2.1. CURVA DE CRESCIMENTO**

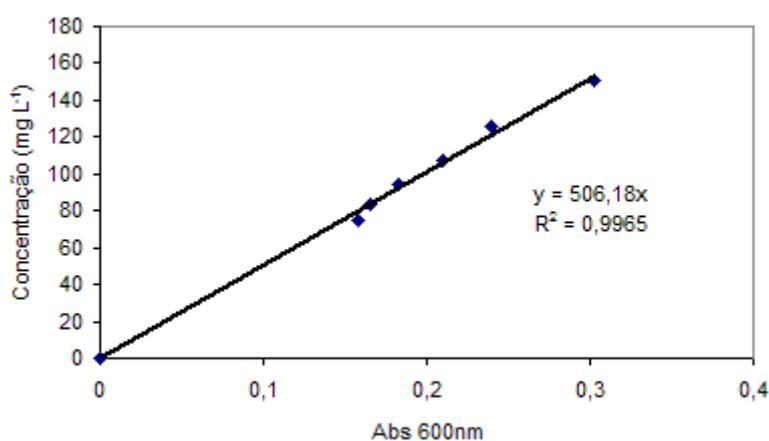
Uma curva típica de crescimento de *B. sphaericus* CCM 2177, nas condições já descritas (item 3.2.3), está sendo apresentada na Figura 4.1. Observa-se que, em um tempo anterior a 24 horas de crescimento, quando as células foram colhidas para extração das proteínas da camada S, as mesmas já se encontravam na fase estacionária do crescimento.



**Figura 4.1.** Curva de crescimento de *B. sphaericus* – CCM 2177 em caldo nutriente, sob agitação de 170 rpm, 30°C, ambiente estéril, por 28 horas.

#### 4.2.2. CURVA DE MASSA SECA

A Figura 4.2 mostra uma típica curva de correlação de massa seca do *B. sphaericus* CCM 2177. Observa-se que os pontos apresentam uma boa correlação, ou seja,  $R^2$  aproximadamente igual a 1.



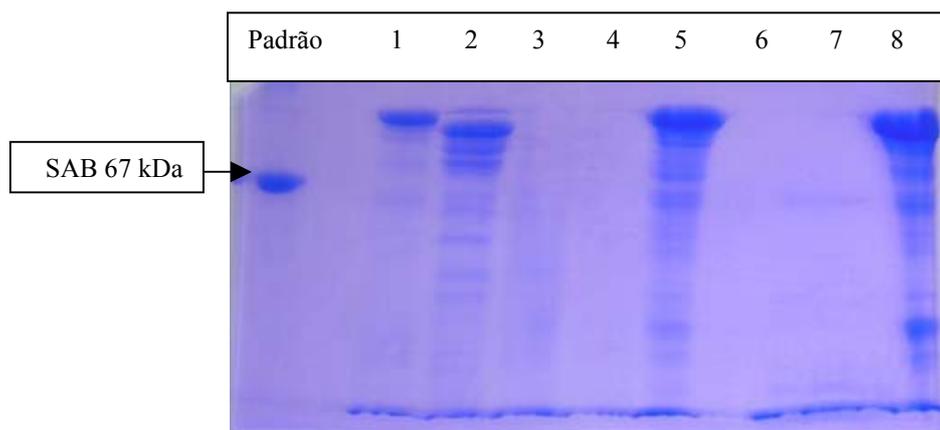
**Figura 4.2.** Curva de massa seca do *B. sphaericus* CCM 2177 cultivada em caldo nutriente sob agitação de 170 rpm, 30°C, ambiente estéril, por 24 horas.

### 4.2.3. EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO

Além da metodologia de extração de proteínas da camada S do *B. sphaericus* CCM 2177 utilizando solução concentrada de hidrocloreto de guanidina, técnicas de isolamento usualmente empregadas no laboratório foram avaliadas, como: precipitação com álcool etílico 80% (v/v) a -16°C por 24 horas e precipitação com sulfato de amônio 75% da saturação a 0°C por 24 horas.

A Figura 4.3 apresenta uma imagem do gel de poliacrilamida de 10% contendo as bandas referentes às proteínas das amostras de extratos celulares obtidas pelas metodologias já citadas. Uma solução de proteína de tamanho conhecido, albumina de soro bovino (BSA) de tamanho igual a 67 kDa, foi utilizada como solução padrão para comparação das bandas.

A amostra 1 foi obtida apenas extraíndo as proteínas com hidrocloreto de guanidina 5 M a 60°C por 16 horas, com posterior diálise contra água destilada. Já para a amostra 2, a extração foi seguida por diálise contra solução de cloreto de cálcio 10 mM. A amostra 3 sofreu duas extrações com guanidina. Nas amostras 4 e 5, fez-se precipitação com etanol a 80% (v/v), e nas amostras 6, 7 e 8 utilizou-se o sulfato de amônio a 75% da saturação como agente precipitante de proteínas.



**Figura 4.3.** Gel de SDS-PAGE 10% de extratos celulares de *B. sphaericus*. O padrão utilizado foi a proteína BSA (67 kDa) e as amostras numeradas são as amostras: (1) com uma única extração com hidrocloreto de guanidina, (2) extração seguida de diálise contra solução de  $\text{CaCl}_2$  10 mM, (3) dupla extração intercalada por diálise contra  $\text{CaCl}_2$  10 mM, (4) extração seguida de precipitação com etanol 80% (v/v), (5) dupla extração intercalada por precipitação com etanol, (6) extração seguida de precipitação com sulfato de amônio 75% da saturação, (7) extração seguida de ressuspensão em tampão Tris-HCl do precipitado obtido com sulfato e, (8) dupla extração intercalada por precipitação com sulfato.

O gel de eletroforese apresentou bandas fortes e bem definidas na parte superior para as amostras 1, 2, 5 e 8, evidenciando a alta concentração de proteínas de alta massa molar. No entanto, as amostras com dupla extração com guanidina e um método de precipitação (amostras 5 e 8, precipitadas com etanol e sulfato, respectivamente) conseguiram extrair proteínas de vários tamanhos, formando bandas intensas ao longo de todo gel. Como as amostras 4 e 6, também precipitadas com etanol e sulfato, não apresentaram bandas significativas correspondentes às esperadas para as proteínas da camada S, conclui-se que o método de precipitação empregado não foi eficiente para promover a recuperação e a purificação das proteínas de interesse.

Na obtenção da amostra 2, derivada do processo com única extração com guanidina e diálise contra solução de cloreto de cálcio 10 mM, observou-se que, assim que o processo de diálise contra solução de cloreto de cálcio 10 mM iniciava-se, a solução interna, que contém os extratos celulares da bactéria, tinha aparência límpida e

de cor amarela. Com o tempo, esta solução perdia o sal (hidroclorato de guanidina) presente em grande concentração para o meio externo e turvava-se (Figura 4.4). Este fenômeno é explicado pela formação de agregados auto-organizados das subunidades isoladas das proteínas da camada S quando em contato com íons de bivalentes, como citado por SLEYTR *et al.* (1986). No entanto, esse procedimento também resultava na extração de outras proteínas, como pode ser constatado pela presença de bandas intensas com proteínas de alta massa molar, provavelmente das proteínas da camada S, e de várias outras bandas de intensidade moderada, atribuídas a outras proteínas contaminantes. Segundo PUM e SLEYTR (1994), a massa molar das proteínas da camada S é igual a 120 kDa.



**Figura 4.4.** Fotos obtidas durante a diálise dos extratos celulares contendo as proteínas da camada S contra solução de  $\text{CaCl}_2$  10 mM.

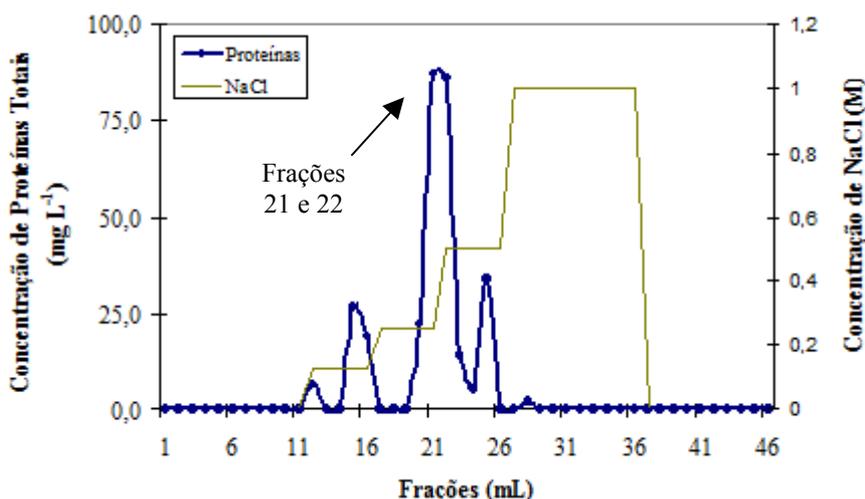
Sendo assim, o processo com única extração com guanidina (amostra 1) mostrou-se mais apropriado, pois conseguiu isolar proteínas de alta massa molar em uma única banda forte, com maior grau de pureza.

#### 4.2.4. PURIFICAÇÃO

Na tentativa de se purificar ainda mais as proteínas da camada S extraídas na amostra 1, foram avaliadas as técnicas de cromatografia de troca iônica e interação hidrofóbica, visto que para a aplicação de filmes monomoleculares é desejável utilizar

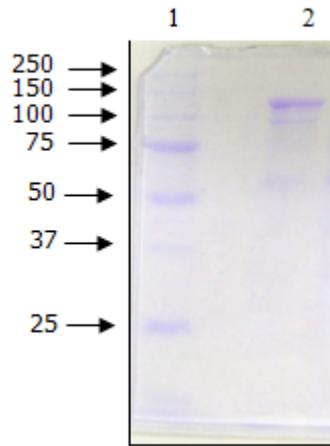
materiais com maior grau de pureza. As frações obtidas na cromatografia foram analisadas pela dosagem de proteínas totais.

Na cromatografia de troca iônica foi utilizada uma coluna comercial HiTrap QFF (HiTrap™) e uma solução tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7,0 como tampão de partida, fazendo o gradiente de eluição com adição de cloreto de sódio neste tampão. A Figura 4.5 apresenta as concentrações de proteínas totais das frações retiradas da coluna a cada mililitro.



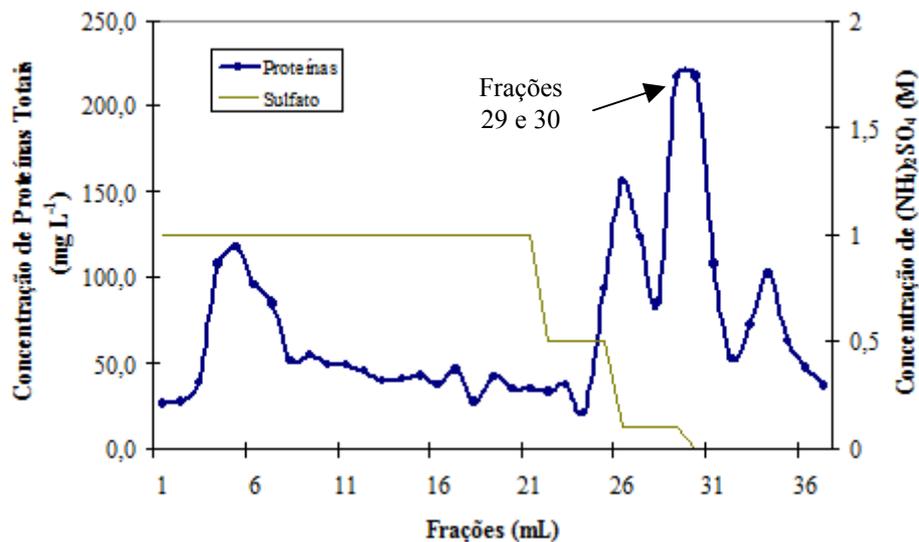
**Figura 4.5.** Dosagem de proteínas pelo método de Bradford das frações da cromatografia de troca iônica do extrato de proteínas da camada S do *B. sphaericus* CCM 2177, utilizando uma coluna comercial Hitrap QFF, a 25°C.

Percebe-se que uma grande concentração de proteínas foi eluída da coluna (frações 21 e 22) quando a solução de concentração de 0,25 M de cloreto de sódio foi injetada. Estas frações, posteriormente, foram misturadas e concentradas em dispositivo de membrana de tamanho de poro igual a 10 kDa, e então, analisadas. A dosagem de proteínas, após a concentração, revelou uma concentração de proteínas de 3450 mg L<sup>-1</sup> e o gel de eletroforese (Figura 4.6), um maior isolamento da proteína quando comparado ao gel da amostra 1 da Figura 4.3, feito nas mesmas condições.



**Figura 4.6.** Gel de SDS-PAGE 10% (1) do padrão Bio-Rad e (2) das frações 21 e 22, misturadas e concentradas, geradas a partir da cromatografia de troca iônica, coluna comercial HiTrap QFF.

Testes cromatográficos de interação hidrofóbica foram feitos utilizando uma coluna comercial HiTrap Butyl FF (HiTrap™). Foram utilizados também tampão fosfato 0,05 M pH 7,0 com 1 M de sulfato de amônio como tampão de partida e tampões de eluição derivados do tampão de partida em gradiente decrescente de concentração deste sal. A Figura 4.7 apresenta as concentrações de proteínas totais pelo método de Bradford das frações retiradas da coluna a cada mililitro.



**Figura 4.7.** Dosagem de proteínas pelo método de Bradford das frações da cromatografia de Afinidade Hidrofóbica do extrato de proteínas da camada S do *B. sphaericus* CCM 2177, utilizando uma coluna comercial HiTrap Butyl FF, a 25°C.

O pico inicial é característico da saturação da coluna, após a aplicação da amostra a ser analisada, quando as proteínas não se agregam mais ao recheio da coluna. Já os picos apresentados no final da cromatografia representam as frações eluídas com concentrações baixas de sulfato de amônio, ou seja, as proteínas eluídas nesta fase possuem características hidrofóbicas.

Os resultados para esta cromatografia não se mostraram satisfatórios, uma vez que não foi possível separar com eficiência as proteínas de interesse. As frações 29 e 30 foram as que apresentaram maior concentração de proteínas totais, eluídas com a solução tampão gradiente com concentração de 0,1 M de sulfato de amônio. Porém, ao serem misturadas e concentradas em dispositivo de membrana, não apresentaram bandas no gel de eletroforese.

Resumindo, o teste de purificação, utilizando a técnica de cromatografia líquida iônica, apresentou resultado satisfatório (aumentando o grau de pureza do extrato), porém ainda havendo presença de outras proteínas contaminantes. A etapa de purificação não foi empregada para obtenção de matéria-prima de proteínas da camada S na formação de filmes de Langmuir. Este fato é justificado pela boa reprodutibilidade apresentada pelos filmes desta proteína quando utilizados seus extratos brutos e, a adição de mais uma etapa no processo aumentaria o custo final, quando empregando estas proteínas na formação de biossensores.

### **4.3. FILMES DE LANGMUIR**

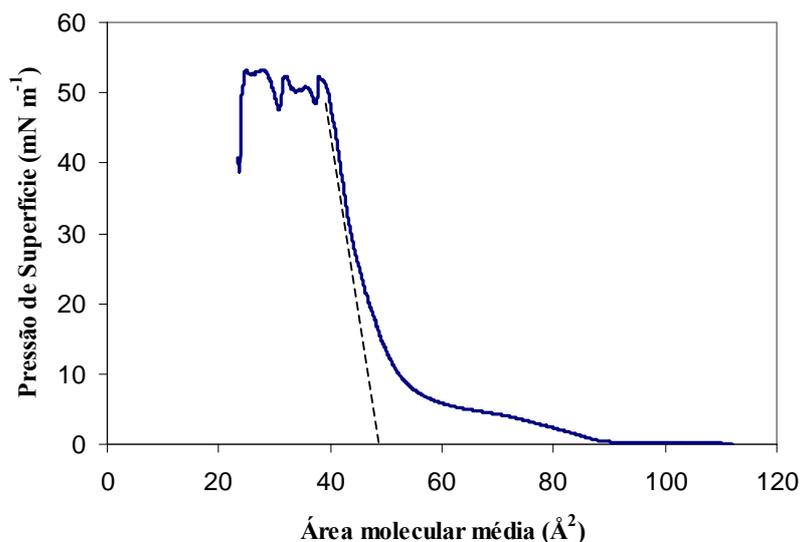
O estudo dos filmes finos na interface ar – água foi acompanhado pela formação de isothermas de pressão de superfície (unidade  $\text{mN m}^{-1}$ ) em função da área molecular média ( $\text{\AA}^2$ ), ou seja, isothermas  $\pi - A$ . Inicialmente, houve problemas experimentais durante a medida da pressão de superfície devido à instabilidade do equipamento, presença de impurezas na superfície aquosa e/ou na cuba e excesso de material espalhado, o que prejudicava a reprodutibilidade das isothermas. Posteriormente, foi montado um sistema mais apropriado, com controle de temperatura e umidade relativa do ar, em uma sala isolada, com bancada protegida de vibrações, e com rede elétrica

exclusiva para o equipamento e seus acessórios. Estas medidas foram fundamentais para a melhoria da qualidade dos dados obtidos.

#### **4.3.1. FILME LIPÍDICO DE DPPC**

Este ensaio foi proposto como um teste de controle usando o DPPC, por este lipídeo se tratar de uma molécula com características anfifílicas bem definidas, e assim, produzir um filme de Langmuir bem estudado e facilmente encontrado na literatura científica (KIM *et al.*, 2001, MA e ALLEN, 2006).

A isoterma do filme de dipalmitoilfosfatidilcolina - DPPC (100  $\mu\text{L}$  de uma solução  $0,85 \text{ mg mL}^{-1}$  de DPPC – Sigma – em clorofórmio propagado sobre a subfase de água ultra pura) foi gerada pela compressão das barreiras da balança de Langmuir a uma velocidade de  $10 \text{ mm min}^{-1}$ , após estabilização do filme durante 20 minutos, a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa do ar igual a 40% (Figura 4.8). Este experimento foi realizado em uma cuba de Langmuir KSV 2000.



**Figura 4.8.** Isoterma  $\pi - A$  do filme de DPPC em clorofórmio (volume aplicado de  $100 \mu\text{L}$ , concentração igual a  $0,85 \text{ mg mL}^{-1}$ ) propagado sobre a superfície da subfase de água ultra pura (cuba KSV 2000), a  $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . O valor obtido pela intersecção da linha tracejada com o eixo das abscissas representa a área média ocupada por uma molécula no filme de Langmuir.

Nesta isoterma  $\pi - A$  para a monocamada de DPPC puro observa-se a presença de fases distintas: gasosa, líquido-expandido e líquido-condensado. O patamar na faixa de  $70$  a  $55 \text{ \AA}^2 \text{ molécula}^{-1}$  corresponde à transição de fase líquido-expandido para líquido-condensado. Esta isoterma apresenta colapso a uma pressão de aproximadamente  $50 \text{ mN m}^{-1}$ .

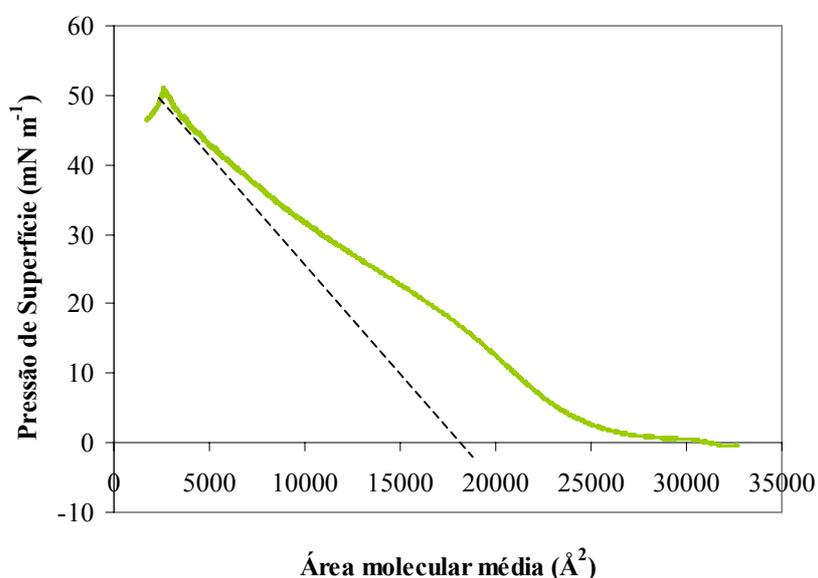
A área ocupada por uma molécula anfifílica pode ser calculada traçando-se uma tangente ao ponto de curvatura da isoterma, que corresponde ao ponto onde as moléculas estão na fase mais condensada, e prolongando-a até tocar o eixo das abscissas, esta intersecção é conhecida como a área limite de dispersão molecular. A área média ocupada por uma molécula do fosfolípido DPPC, encontrada a partir do gráfico, foi de aproximadamente  $50 \text{ \AA}^2$ , valor próximo ao relatado na Literatura, que é de, aproximadamente,  $46 \text{ \AA}^2$  a  $24^\circ\text{C}$  (MA e ALLEN, 2006).

## 4.3.2. FILMES PROTÉICOS

### 4.3.2.1. Filmes das Proteínas da Camada S

#### - Isotermas $\pi$ - A:

A isoterma  $\pi$  - A do filme das proteínas da camada S apresenta a forma de um filme mais fluido, com fases bem definidas e ocorrendo o colapso do filme ao final da compressão. A pressão de superfície máxima obtida nas condições empregadas foi de  $50 \text{ mN m}^{-1}$  e área média ocupada por uma molécula, obtida a partir da isoterma, foi de  $180 \text{ nm}^2$ . Como estas proteínas formam células unitárias com tamanho variando de 3 a 30 nm (PUM *et al.*, 2000), este resultado indica que estruturas organizadas contendo uma ou mais células unitárias podem ter sido obtidas. Neste experimento, as moléculas foram propagadas na superfície da subfase de água ultra pura sem o auxílio de solvente. O tempo para a estabilização do filme foi de 20 minutos, a velocidade de compressão das barreiras igual a  $10 \text{ mm min}^{-1}$  e condições ambientais controladas (temperatura de  $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade de 40%).

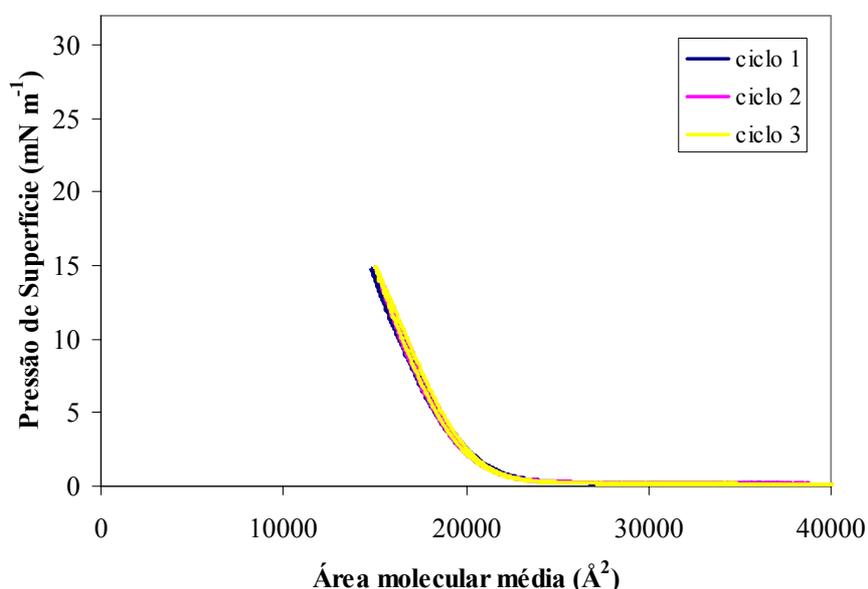


**Figura 4.9.** Isoterma  $\pi$  - A do filme das proteínas da camada S (volume aplicado de  $10 \mu\text{L}$ , concentração de  $0,762 \text{ mg mL}^{-1}$  de proteínas em tampão fosfato pH 7,0) propagadas na superfície da subfase de água (cuba Kibron - S), a  $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ .

Observando a forma da isoterma da Figura 4.9, tem-se que próximo à pressão de  $15 \text{ mN m}^{-1}$  há mudança na inclinação da curva, que pode ser interpretada como uma transição de fase de líquido expandido para líquido condensado. Vale ressaltar que não foi encontrado na literatura isoterma das proteínas de superfície bacteriana para efeito de comparação. No entanto, as isotermas geradas experimentalmente mostraram-se reprodutíveis e estáveis.

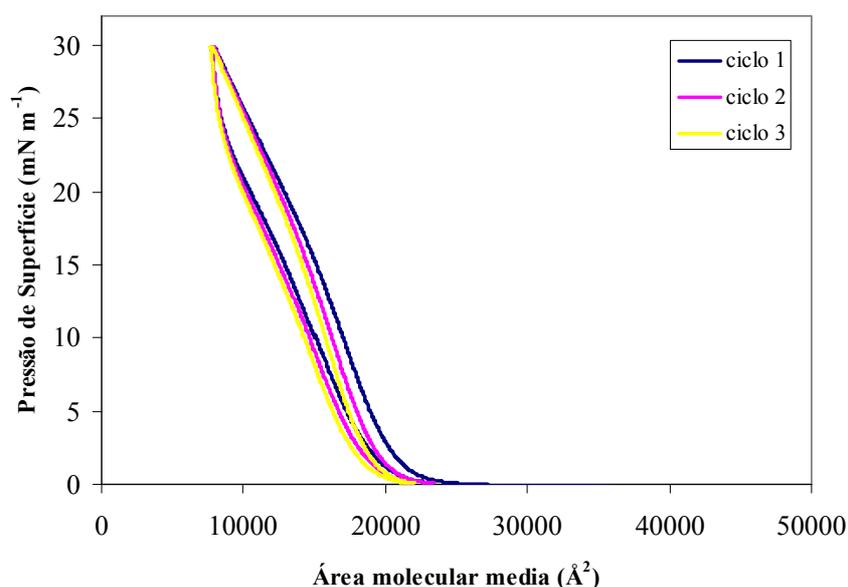
#### - Ciclos de Compressão – Descompressão:

Para verificar a reversibilidade da isoterma das proteínas S, foram realizados três ciclos de compressão–descompressão do filme até a pressão de superfície de  $15 \text{ mN m}^{-1}$ , pressão esta inferior à mudança de inclinação na isoterma. Analisando a Figura 4.10, percebe-se que as isotermas de compressão são coincidentes com as isotermas de descompressão para um mesmo ciclo, e também entre ciclos. Ou seja, há reversibilidade na formação da monocamada das proteínas da camada S até esta pressão de superfície, pois existe pouca interação entre as moléculas, que se comportam de forma homogênea e, ao final de cada ciclo, o filme retorna à pressão nula.



**Figura 4.10.** Ciclos de compressão-descompressão do filme das proteínas da camada S (volume aplicado de  $50 \mu\text{L}$ , concentração de  $0,762 \text{ mg mL}^{-1}$  de proteínas em tampão fosfato pH 7,0) propagadas na superfície da subfase de água (cuba KSV 2000), sendo o filme comprimido até uma pressão de superfície de  $15 \text{ mN m}^{-1}$ , a  $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ .

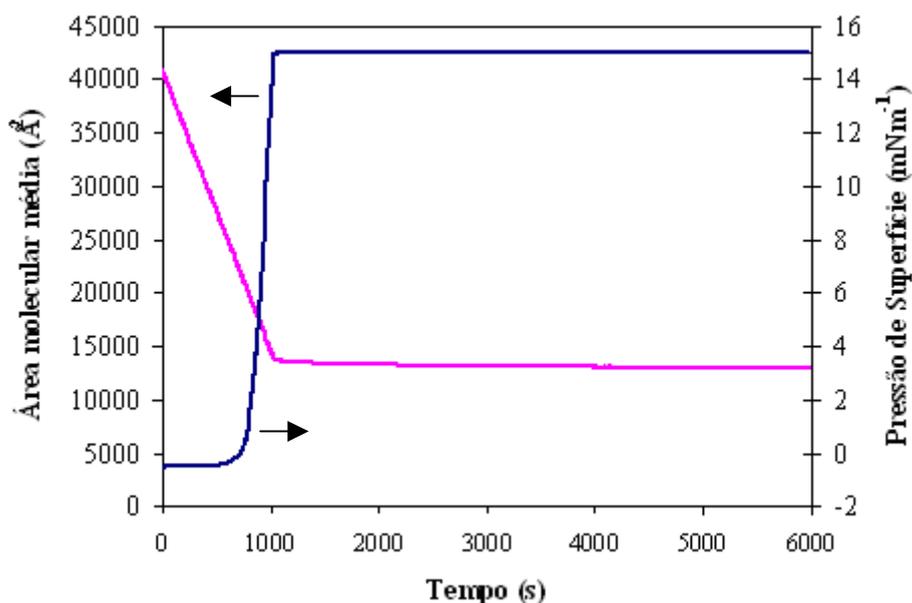
No entanto, quando uma pressão de superfície maior é definida como limite para o ciclo,  $30 \text{ mN m}^{-1}$ , as isotermas  $\pi - A$  apresentaram o fenômeno da histerese (Figura 4.11). Segundo LEBLANC e HUO (2006), podem ocorrer formação de agregados irreversíveis de proteínas ou estas terem sido dissolvidas na água durante a descompressão da monocamada. Neste caso, as isotermas não são reversíveis. No entanto, observou-se também que em cada ciclo, para a uma mesma pressão de superfície, as moléculas ocupam uma área menor na descompressão do que na compressão. Esta é uma evidência de que não houve solubilização das moléculas na fase aquosa, pois, neste caso, a área ocupada por molécula que restou na superfície seria maior. Também se observou que, em ciclos sucessivos, há uma tendência de deslocamento no sentido de redução da área ocupada por molécula. Como para a pressão de  $15 \text{ mN m}^{-1}$  não foi observada histerese, estes resultados sugerem que, para pressões maiores, ocorrem formação de agregados maiores, possivelmente de células unitárias de estruturas organizadas das proteínas da camada S.



**Figura 4.11.** Ciclos de compressão-descompressão do filme das proteínas da camada S (volume aplicado de  $50 \mu\text{L}$ , concentração de  $0,762 \text{ mg mL}^{-1}$  de proteínas em tampão fosfato pH 7,0) propagadas na superfície da subfase de água (cuba KSV 2000), sendo o filme comprimido até uma pressão de superfície de  $30 \text{ mN m}^{-1}$ , a  $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ .

### - Estudo da Estabilidade do Filme:

De acordo com HOU *et al.* (2002), a estabilidade da monocamada na interface é um parâmetro crítico para a qualidade da deposição dos filmes LB. Assim, estudou-se a estabilidade do filme das proteínas da camada S na pressão de superfície de  $15 \text{ mN m}^{-1}$ , durante o tempo de 6000 segundos. Esta pressão foi determinada baseada no comportamento do filme após os ciclos de compressão-descompressão, onde foi verificado que a pressão de superfície mais adequada para se trabalhar com o filme é aquela em que não há interações molécula-molécula.

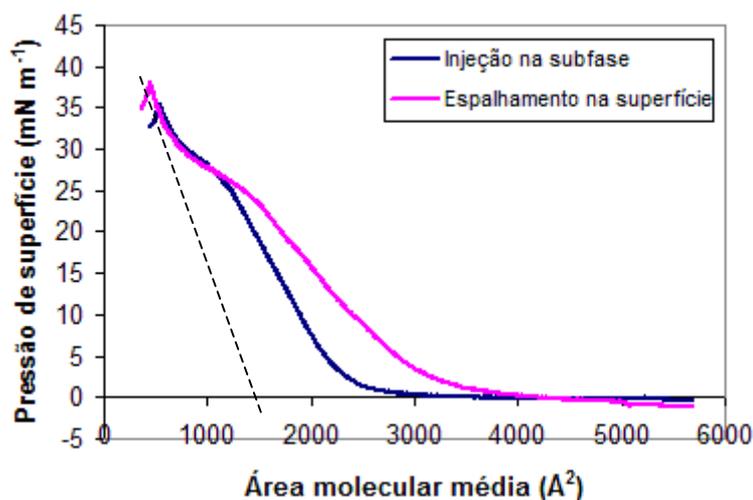


**Figura 4.12.** Teste de estabilidade do filme das proteínas da camada S ( $50 \mu\text{L}$  propagado na superfície, concentração de  $0,762 \text{ mg mL}^{-1}$ ) em uma pressão de superfície fixada em  $15 \text{ mN m}^{-1}$  por 6000 segundos, em uma cuba KSV 2000, a  $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ .

A monocamada dessas proteínas mostrou-se bem estável, com o transcorrer do tempo, pois se mantiveram na interface ar-água, preservando a área molecular média em um valor constante, sem a ocorrência de dissolução na subfase, durante as quase 2 horas do experimento. Conseqüentemente, a pressão superficial também manteve-se constante, como pode ser observado na Figura 4.12.

#### 4.3.2.2. Filmes Monomoleculares da Enzima COx

A enzima colesterol oxidase, por ser uma proteína de membrana, tem característica hidrofóbica e tende a ir para a superfície. Assim, quando a COx foi aplicada no seio da subfase, apresentou forma semelhante à isoterma quando esta foi propagada na superfície (Figura 4.13).



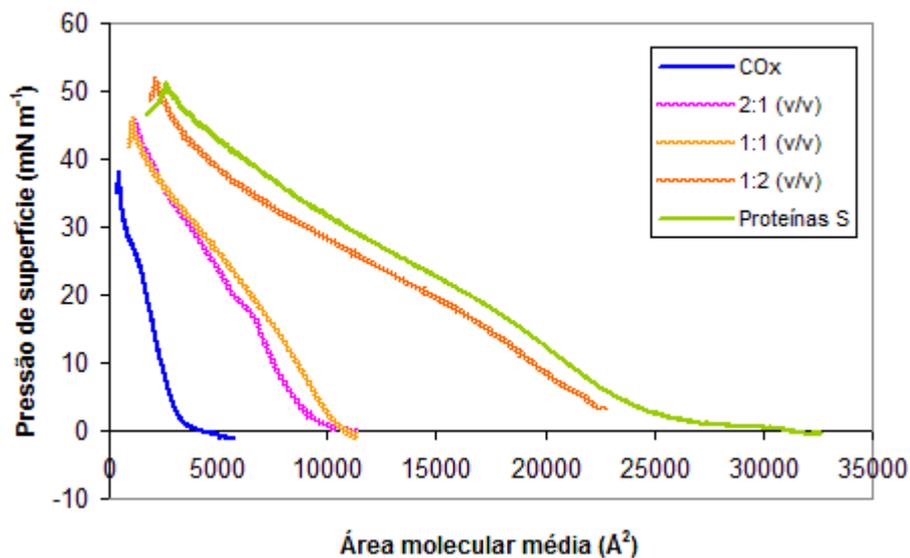
**Figura 4.13.** Isotermas  $\pi - A$  do filme da enzima COx injetada na subfase e propagada na superfície ( $20 \mu\text{L}$ ,  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ), em uma cuba Kibron – S, a  $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . O valor obtido pela intersecção da linha tracejada com o eixo das abscissas representa a área média ocupada por uma molécula no filme de Langmuir.

Comparando-se as duas curvas nesta figura, tomando como referência uma mesma pressão de superfície na região da fase líquido expandido, observa-se uma redução da área média ocupada pelas moléculas para o caso do procedimento por injeção na subfase. Isto acontece porque, antes da obtenção das isotermas, é necessário fornecer ao programa que controla o equipamento o volume aplicado da amostra (isto é, a quantidade de moléculas aplicadas). Ocorre que, quando a injeção acontece na subfase, nem todas as moléculas injetadas conseguem migrar para a superfície, mas o programa considera que a migração foi completa. Assim, o número de molécula na superfície é superestimado e, conseqüentemente, a área ocupada por uma molécula é subestimada.

A pressão de superfície máxima obtida nas condições empregadas foi de, aproximadamente,  $35 \text{ mN m}^{-1}$  e área média ocupada por uma molécula, obtida a partir das isotermas, foi de  $15 \text{ nm}^2$ . Em ambos os casos, as isotermas  $\pi - A$  da COx apresentam mudança de fase, de gasoso para líquido-expandido, na faixa entre  $4000\text{-}3000 \text{ \AA}^2$  e, de líquido-expandido para líquido-condensado, entre  $1500\text{-}700 \text{ \AA}^2$ . Cabe ressaltar que estes resultados são inéditos já que não foi encontrada na literatura isoterma da COx, para fins de comparação com os resultados obtidos neste trabalho. Os resultados mostram também a viabilidade de se produzir um filme monomolecular desta proteína visando sua posterior transferência para um suporte adequado.

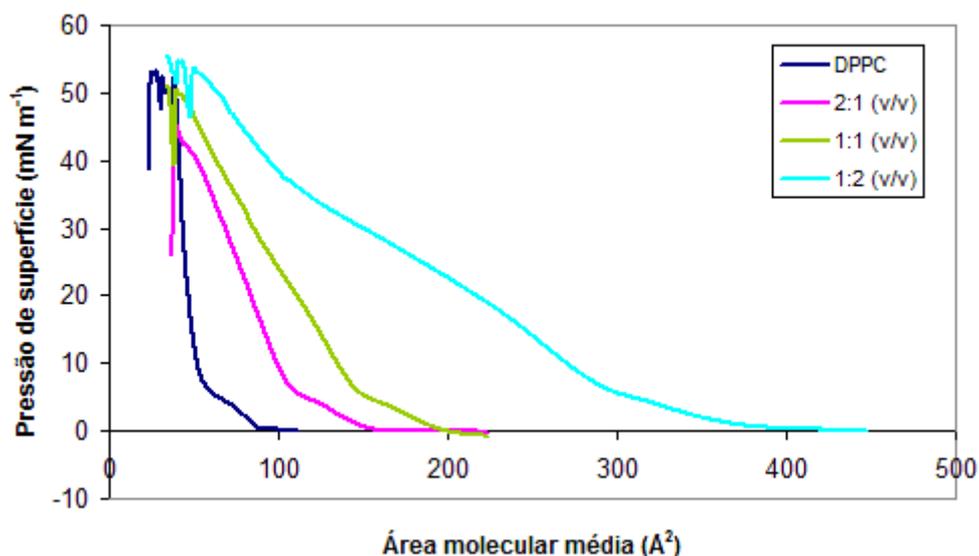
#### **4.3.3. FILMES LB MISTOS**

Segundo FERREIRA *et al.* (2005), é comum que as propriedades dos filmes LB mistos difiram consideravelmente das propriedades dos materiais em separado. Existem, então, duas possibilidades principais para filmes mistos com dois componentes: filmes com separação de fases entre os componentes, quando a área por molécula varia linearmente com a concentração relativa dos componentes, ou filmes com interação no nível molecular. Assim, na formação de filmes LB mistos de COx com proteínas da camada S, as isotermas mostradas na Figura 4.14 faz-se inferir que, com a introdução da proteína em filmes pré-formados de COx, a isoterma tornou-se mais expandida, o efeito sendo proporcional ao aumento da concentração das proteínas da camada S.



**Figura 4.14.** Isotermas  $\pi - A$  dos filmes de COx e proteínas da camada S puras e dos filmes mistos na proporção 2:1, 1:1 e 1:2 (v/v) de COx : proteínas da camada S, em uma cuba Kibron – S, a  $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

O mesmo efeito foi observado para os filmes mistos combinando dois tipos de moléculas, um lipídeo e uma proteína. Quando o volume aplicado de lipídeos é o dobro do volume de proteínas, ou seja, proporção 2:1 (v/v), a isoterma apresenta-se mais densa, similar à isoterma do lipídeo puro. Observa-se que com o aumento da quantidade de proteínas da camada S no filme monomolecular, proporção 1:2 (v/v), este se torna mais fluido, aproximando-se da forma da isoterma da proteína pura (Figura 4.15).



**Figura 4.15.** Isotermas  $\pi$  - A do filme de DPPC puro e dos filmes mistos de DPPC e proteínas da camada S, nas proporções 2:1, 1:1 e 1:2 (v/v) de DPPC : proteínas da camada S, em uma cuba Kibron – S, a  $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

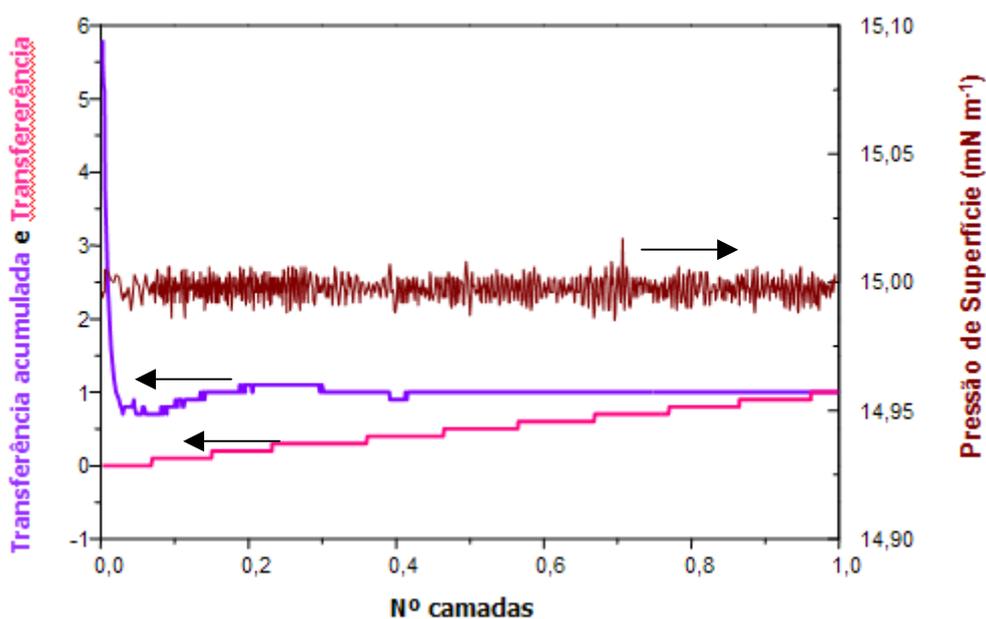
Vale salientar que o *software* que acompanha a cuba de Langmuir é iniciado apenas com os dados de um dos componentes, ou seja, os cálculos da área molecular média só levaram em consideração a quantidade propagada da COx ou do DPPC, respectivamente. Assim, é possível observar a mudança na configuração das isotermas  $\pi$  - A quando submetida à influência de um segundo tipo de molécula.

#### 4.4. FILMES DE LANGMUIR-BLODGETT

Os filmes LB foram produzidos a partir de filmes de Langmuir, formados na interface ar-água, utilizando uma cuba de Langmuir equipada com um aparato para transferência LB. Utilizando a cuba de Langmuir KSV 2000, o programa de computador através de um sistema de retro-alimentação mantinha a pressão de superfície determinada para a transferência constante, além de informar sobre a razão de transferência alcançada durante o processo de imobilização das moléculas no suporte sólido. Assim, para compensar a redução da pressão de superfície devido à transferência

das moléculas do filme de Langmuir para o suporte sólido, o sistema de controle, através do sensor de *Wilhelmy*, mantém a pressão de superfície constante durante a transferência atuando nas barreiras móveis da cuba e, portanto, na área ocupada pelo filme.

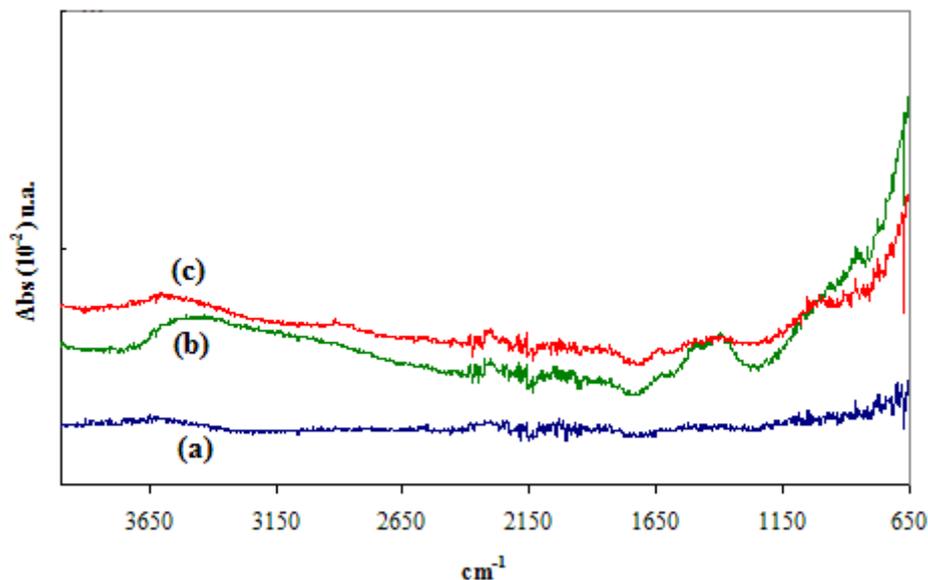
Na Figura 4.16 observa-se a pressão de superfície do filme de Langmuir variando em torno da pressão de  $15 \text{ mN m}^{-1}$ , fixada no *software*. A transferência acumulada, ou razão de transferência, que é a razão entre a área da monocamada transferida e a área do suporte (Equação 2.2), inicialmente é bem elevada, porém reduzindo a velocidade de elevação do suporte, fez com que a razão de transferência se mantivesse próxima da unidade, razão dita ideal para a transferência LB (HOU *et al.*, 2002), pois o filme flutuante recobre homogeneamente a superfície do suporte.



**Figura 4.16.** Deposição pela técnica de Langmuir-Blodgett das proteínas da camada S para um suporte de quartzo, em uma cuba KSV 2000, a  $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Após os filmes de Langmuir de DPPC e das proteínas da camada S serem transferidos para uma placa de ouro através da técnica LB, estas foram analisadas por espectroscopia FT-IR. A Figura 4.17 apresenta espectros da placa de ouro sem nenhuma deposição e da mesma placa de ouro após a deposição de filmes LB do DPPC, com uma camada e com 17 camadas. Já na Figura 4.18, são apresentados espectros da placa de

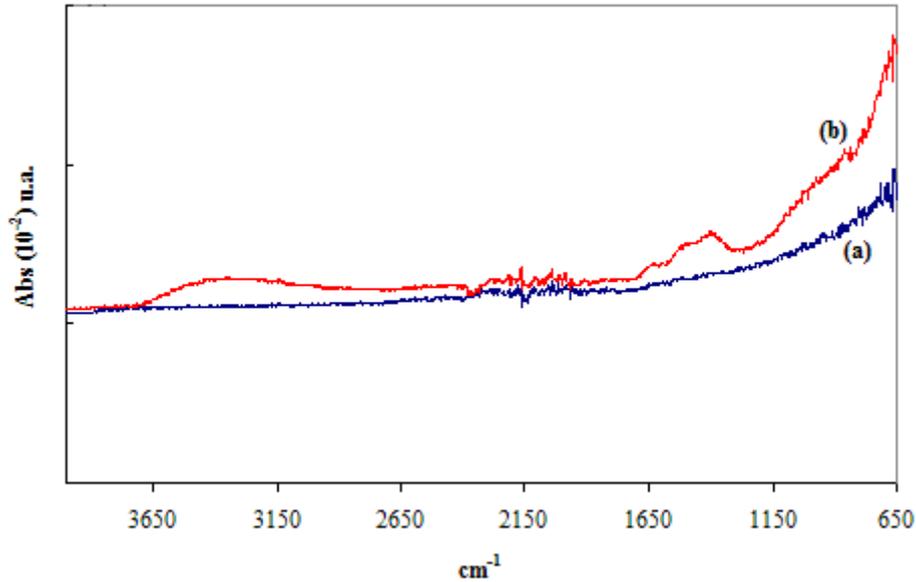
ouro sem deposição e da placa após a deposição LB de uma camada de filme das proteínas da camada S.



**Figura 4.17.** Espectro FT-IR de uma placa de ouro (a) e dos filmes LB do DPPC depositados em uma placa de ouro, com 1 camada depositada (b) e com 17 camadas depositadas (c).

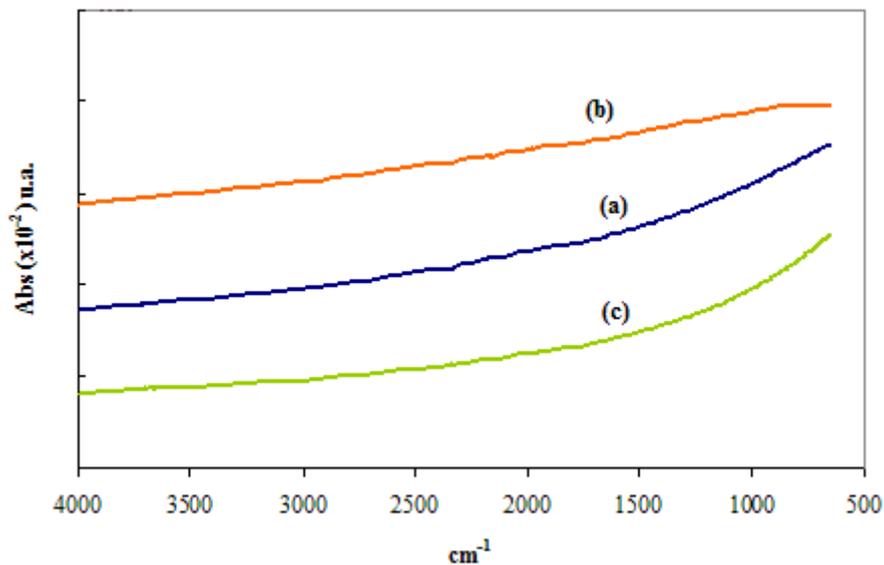
Na Figura 4.17, espectros referentes à imobilização LB do DPPC na superfície de uma placa de ouro, observou-se a formação de bandas no intervalo de 3500-3200  $\text{cm}^{-1}$  e também entre 1700-1300  $\text{cm}^{-1}$ . Embora os picos característicos do DPPC ( $\sim 2850 \text{ cm}^{-1}$  para C-H e  $\sim 1050$  para C-N<sup>+</sup>, BAKSHI *et al.*, 2007) não tenham sido observados, a presença de outras bandas indicam que houve transferência do filme, já que as mesmas não estavam presentes no suporte sem recobrimento. Cabe ressaltar que a presença do suporte e o número reduzido de camadas transferidas podem justificar a ocorrência de ruídos no sinal e a baixa intensidade ou ausência dos picos esperados para o DPPC.

Na Figura 4.18, os espectros FT-IR para as proteínas da camada S mostram o aparecimento de bandas na região característica da absorção das proteínas (amida II, entre 1650 e 1515  $\text{cm}^{-1}$  (SILVERSTEIN *et al.*, 1991 apud FIGUEIREDO, 2008)) que não estavam presentes no suporte sem deposição. Este resultado pode ser um indício de que as proteínas da camada S mantiveram sua conformação nativa ao serem imobilizadas no suporte sólido de ouro (FIGUEIREDO, 2008).



**Figura 4.18.** Espectro FT-IR de uma placa de ouro (a) e do filme LB das proteínas da camada S depositado na placa de ouro (b), com 1 camada depositada.

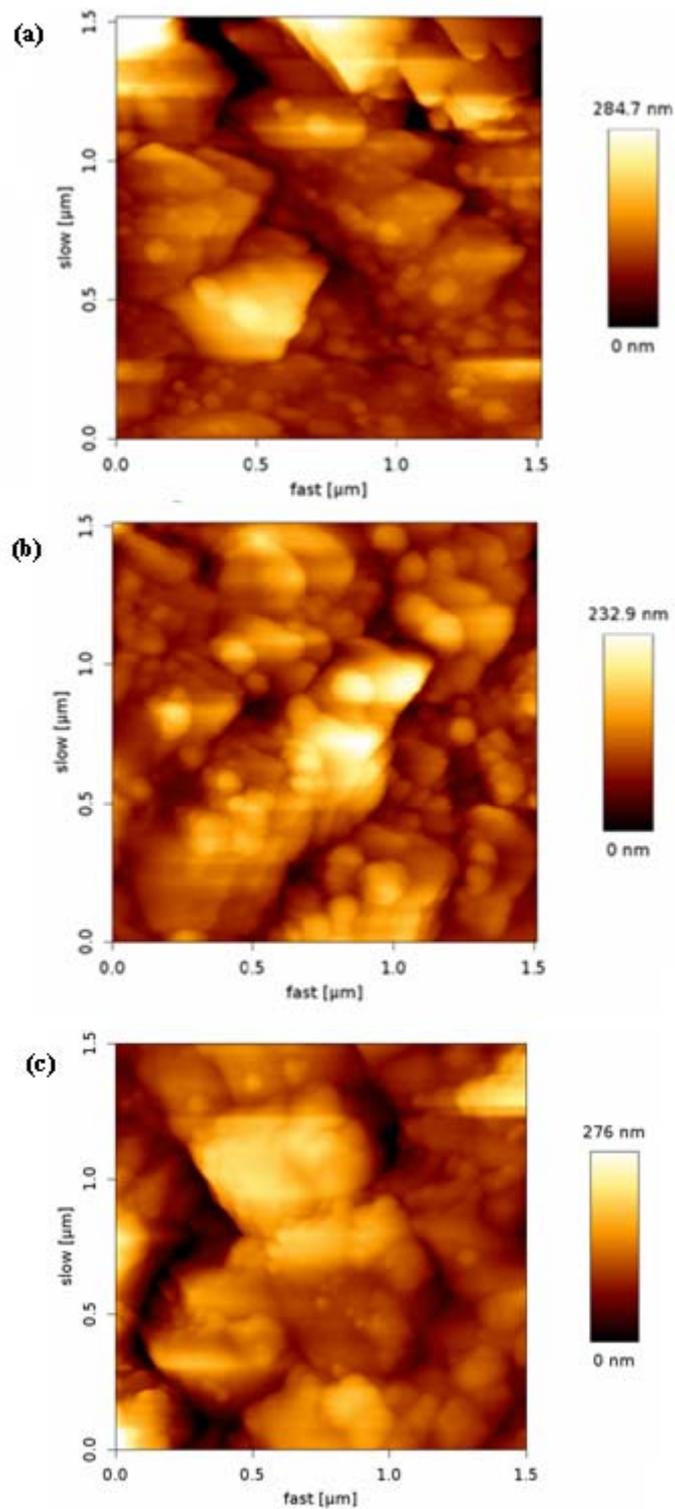
Superfícies do eletrodo de trabalho de carbono do sensor impresso, que foram os suportes utilizados para a transferência dos filmes LB de COx e filmes mistos LB de COx / proteínas da camada S para a fabricação dos biossensores, foram analisadas pela técnica de FT-IR. Não foram observados picos de absorção na região analisada, como mostra a Figura 4.19, provavelmente devido à espessura muito reduzida da camada depositada e ao fato de o feixe de luz penetrar a certa profundidade do suporte.



**Figura 4.19.** Espectro FT-IR de um eletrodo de trabalho de carbono (a) e, dos filmes LB da COx (b) e dos filmes mistos de COx / proteínas da camada S (c) depositados na superfície de um eletrodo de trabalho de carbono, com 6 camadas depositadas cada um.

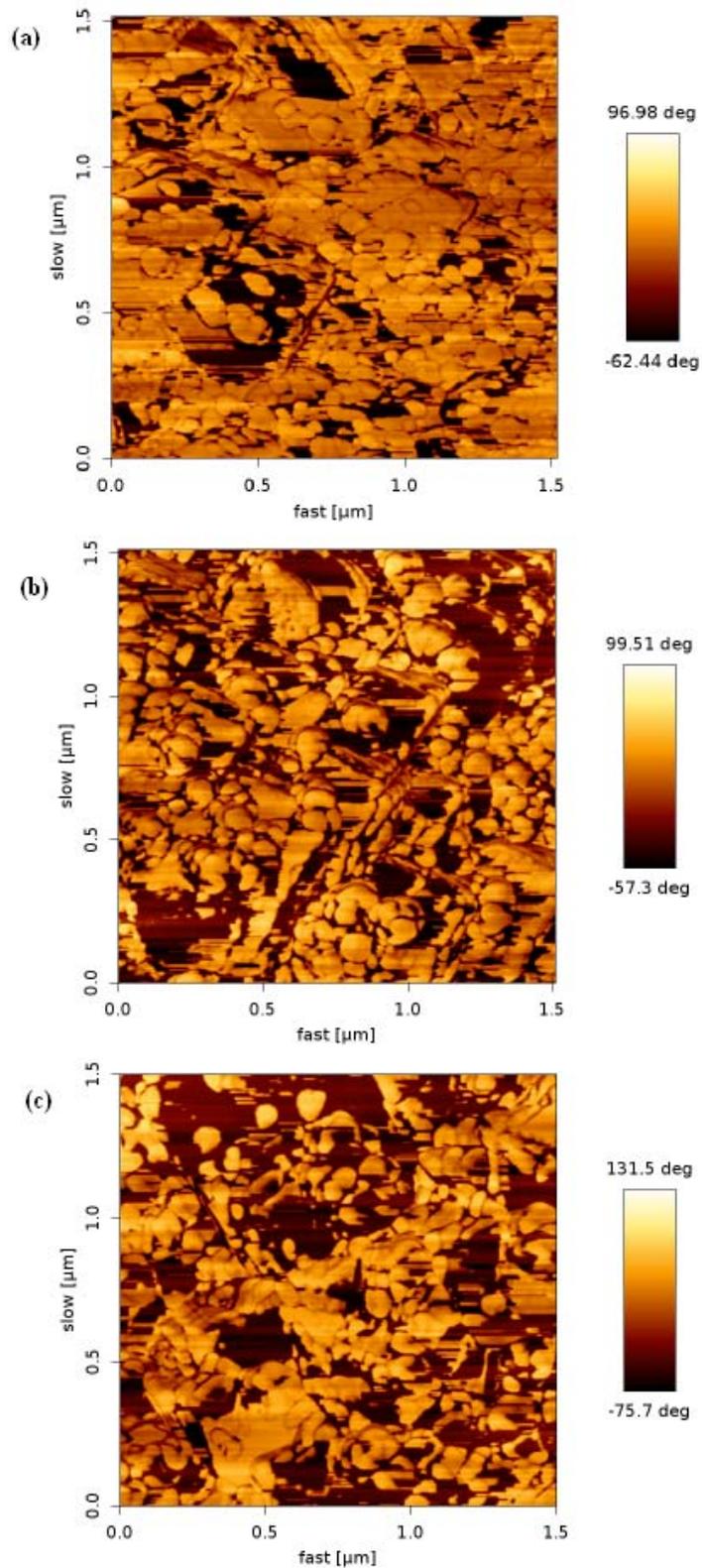
Os filmes LB de COx depositados na superfície também foram analisados através da técnica de AFM em uma resolução de  $1,5 \times 1,5 \mu\text{m}^2$ . A Figura 4.20 (a) apresenta uma imagem de AFM de um eletrodo de carbono sem deposição, com rugosidade média quadrada (RMS) igual a 50,84 nm e máxima distância entre picos e vales (Rt) igual a 646,8 nm. Já a Figura 4.20 (b) mostra uma imagem de AFM de um eletrodo de carbono com a superfície modificada com 6 camadas de filmes LB de COx, apresentando RMS e Rt respectivamente iguais a 35,29 nm e 300,0 nm. A Figura 4.20 (c) apresenta uma imagem de um eletrodo de carbono com 6 camadas de filmes LB mistos de COx e proteínas da camada S, com RMS e Rt respectivamente iguais a 46,0 nm e 325,2 nm.

Nesta resolução, foi possível visualizar diferenças significativas entre as superfícies do eletrodo sem deposição e dos eletrodos depositados, principalmente quando referente ao suporte recoberto com o filme misto COx /proteínas da camada S. Apesar da superfície do eletrodo sem deposição já apresentar uma elevada rugosidade e o número de camadas depositadas ser pequeno, houve uma diminuição da rugosidade média e da distância entre picos e vales desta superfície, sendo este último parâmetro reduzido em mais da metade do valor inicial.



**Figura 4.20.** Imagens de amplitude AFM do eletrodo de trabalho de carbono sem deposição (a) e com seis camadas de filmes LB de COx (b) e de COx / proteína de camada S (c). Análise realizada no INMETRO.

As imagens de contraste de fase AFM são apresentadas na Figura 4.21, com resolução de  $1,5 \times 1,5 \mu\text{m}^2$ . Para a superfície do eletrodo de carbono sem deposição, a imagem da Figura 4.21 (a) apresenta estruturas de forma arredondada e em forma de plaquetas na mesma fase (coloração), ou seja, com variação pequena na faixa de 150 deg (ângulo de fase). Para a superfície do eletrodo de carbono recoberto com seis camadas de filmes LB de COx, a imagem apresentada na Figura 4.21 (b) permite inferir que aumentou a quantidade de estruturas arredondadas na superfície, havendo a formação de aglomerados, porém não recobrimo a superfície como um todo. Placas escuras provavelmente são partes do material original (suporte de carbono). O contraste manteve-se na faixa de 150 deg. Já para a imagem da superfície do eletrodo de carbono recoberto com seis camadas de filmes mistos LB de COx / proteínas da camada S (Figura 4.21 (c)), o contraste aumentou para em torno de 200 deg, sugerindo que a superfície foi recoberta com materiais com diferença significativa de viscoelasticidade, o que confirmaria a presença do filme misto de COx e proteínas da camada S.



**Figura 4.21.** Imagens de contraste de fase de AFM do eletrodo de trabalho de carbono sem deposição (a) e com seis camadas de filmes LB de COx (b) e de COx / proteína de camada S (c). Análise realizada no INMETRO.

#### 4.5. CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

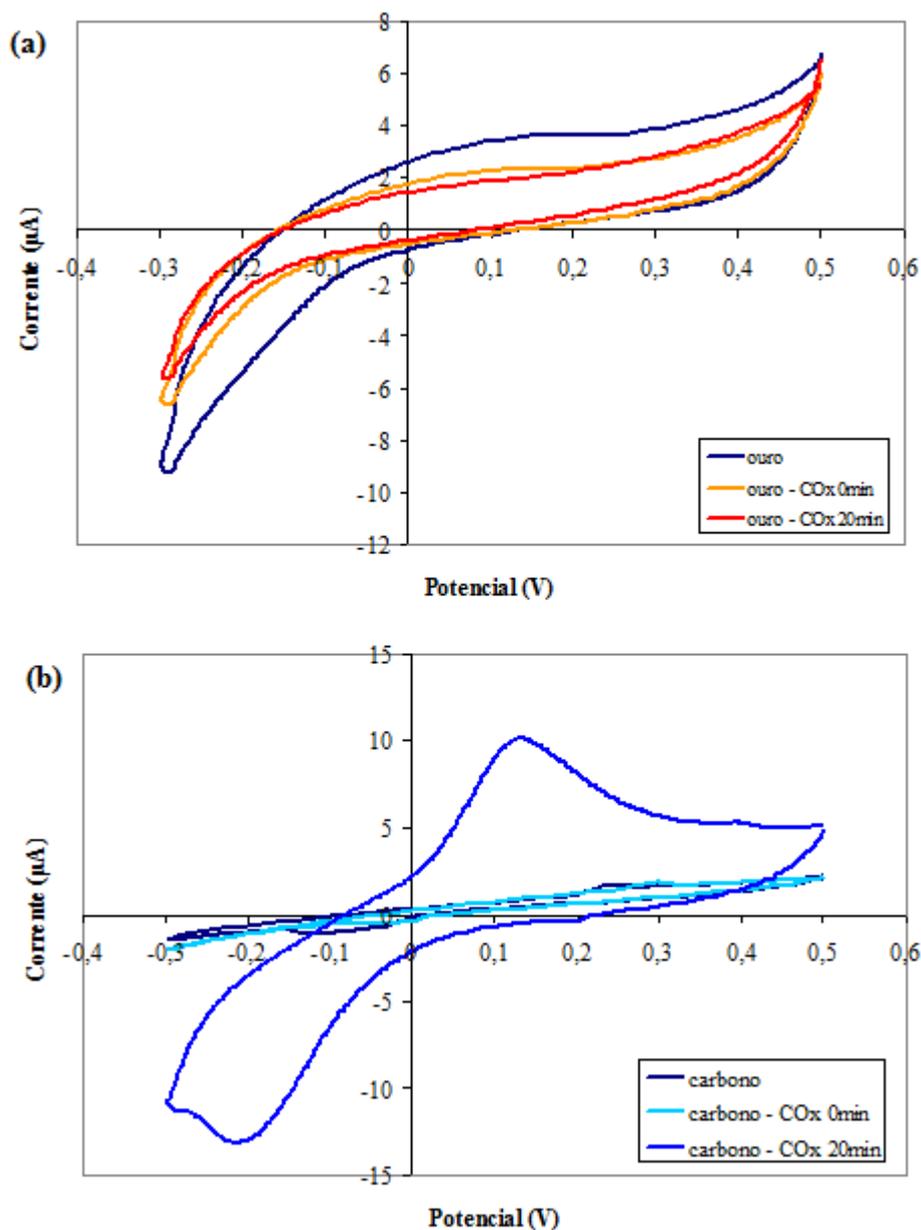
Os voltamogramas cíclicos referentes ao controle das análises aqui apresentadas encontram-se no ANEXO II, onde são apresentados estudos para avaliação dos íons e moléculas presentes no meio reacional. Os ciclos voltamétricos para estes meios reacionais não apresentaram a formação de picos característicos de oxidação e/ou redução. Já nos testes realizados em solução de 150 mg dL<sup>-1</sup> de colesterol e 150 mg dL<sup>-1</sup> de colestenona (ambas em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, isopropanol e triton X-100 na proporção de 86:10:4 (%peso)) verificou-se formação de picos de oxidação e de redução. No entanto, os picos obtidos em solução de colesterol estavam deslocados para a direita em relação aos picos obtidos em solução de colestenona, como apresentado na Tabela 4.1, sendo os valores de potencial obtidos *versus* eletrodo Ag/AgCl. A colestenona, conforme pode ser conferido nas equações (1.1) a (1.3), é o produto da oxidação do colesterol pela enzima colesterol oxidase. O fato de a mesma também apresentar picos redox em valores de potencial diferentes do colesterol sugere que seriam esperados dois conjuntos de picos redox nos ciclos voltamétricos do colesterol: um devido a sua própria oxidação/redução e outro devido à oxidação/redução da colestenona. No entanto, no intervalo de tempo em que é feita a medida, não ocorre produção de colestenona suficiente para que sua presença seja detectável pelos eletrodos e, conseqüentemente, para que a mesma seja oxidada e reduzida no ciclo.

**Tabela 4.1.** Valores dos picos redox obtidos em soluções eletrolíticas de colesterol e colestenona (ambos com concentração de 150 mg dL<sup>-1</sup>).

| Solução eletrolítica | Pico de oxidação |               | Pico de redução |               |
|----------------------|------------------|---------------|-----------------|---------------|
|                      | Potencial (V)    | Corrente (µA) | Potencial (V)   | Corrente (µA) |
| colesterol           | 0,24             | 0,059         | -0,07           | -0,048        |
| colestenona          | 0,14             | 0,057         | -0,20           | -0,052        |

Em todos os resultados apresentados neste item, adotou-se como procedimento não reutilizar os eletrodos. Quando os eletrodos foram reutilizados, obteve-se a formação de picos redox em solução controle (na ausência de colesterol). Este fato pode ser explicado pela permanência de moléculas de colesterol adsorvidas na superfície do eletrodo que não foram removidas mesmo após a lavagem.

Nos ensaios de voltametria cíclica, foram avaliados eletrodos impressos, de ouro ou carbono, a serem utilizados na fabricação dos biossensores de colesterol. Os ensaios de voltametria cíclica foram realizados com a enzima em solução, imediatamente após a injeção da enzima na solução de colesterol e após 20 minutos (Figura 4.22).



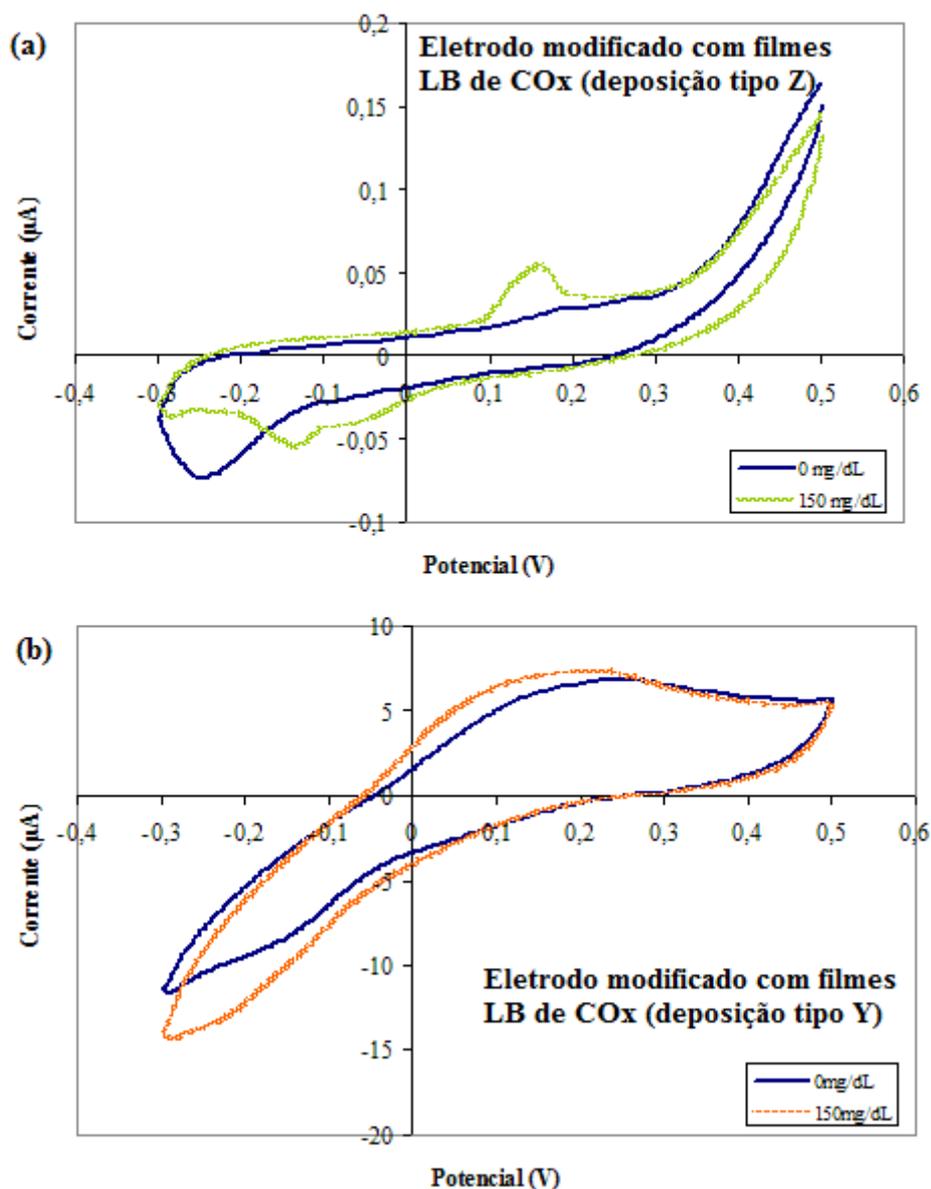
**Figura 4.22.** Voltamogramas cíclicos a  $25 \text{ mV s}^{-1}$  em solução de colesterol  $100 \text{ mg dL}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ M}$  pH  $7,0$ , isopropanol e triton X-100,  $86:10:4$  (% peso), antes e após (0 e 20 minutos) a adição de  $400 \text{ µL}$  de solução de COx. Eletrodo de ouro (a) e eletrodo de carbono (b), a  $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ .

Os voltamogramas cíclicos referentes ao sistema contendo o eletrodo de trabalho de ouro, mostrados na Figura 4.22 (a), não apresentam indícios de ocorrência de reação eletroquímica. No entanto, os referentes ao sistema contendo o eletrodo de carbono, Figura 4.22 (b), revelam significativas diferenças, quando comparando os ciclos voltamétricos na ausência da enzima e imediatamente após a adição desta na célula eletrolítica ao ciclo voltamétrico na presença da enzima com tempo de reação igual a 20 minutos. Neste último, são verificadas características de reações reversíveis na superfície do eletrodo e uma maior intensidade dos picos catódico e anódico. O pico de oxidação ocorre no potencial de 0,132 V (*versus* Ag/AgCl), gerando uma corrente de 10,09  $\mu\text{A}$ , e o pico de redução ocorre no potencial de -0,214 V (*versus* Ag/AgCl), gerando uma corrente de -13,17  $\mu\text{A}$ . Baseado neste resultado, o eletrodo de trabalho de carbono foi escolhido como matriz de imobilização da COx no estudo de biossensores de colesterol deste trabalho.

Os voltamogramas cíclicos, apresentados na Figura 4.23, são referentes à caracterização eletroquímica dos biossensores desenvolvidos através da modificação da superfície do eletrodo de trabalho de carbono, em sensores impressos, pela transferência de filmes LB da enzima de interesse, COx, testando duas metodologias de transferência, a deposição tipo Z e a deposição tipo Y. Verifica-se que a magnitude das correntes envolvidas são bem distintas e o comportamento das curvas também.

Na Figura 4.23 (a), referente à caracterização do eletrodo modificado com filme LB da COx pela deposição tipo Z, são apresentados os voltamogramas gerados na ausência da solução de colesterol (controle) e, na presença do analito alvo, ou seja, em solução de 150 mg dL<sup>-1</sup> de colesterol, após 2 minutos de reação. O voltamograma cíclico de controle não apresenta a formação de picos redox. Já o voltamograma obtido na presença do colesterol, apresentou picos redox, ou seja, um pico de oxidação em potencial de 0,16 V (*versus* Ag/AgCl), com intensidade de corrente de 0,05  $\mu\text{A}$ , e um pico de redução em -0,134 V (*versus* Ag/AgCl), com intensidade de -0,05  $\mu\text{A}$ . Assim, este eletrodo modificado mostrou-se com atividade eletroquímica para a oxidação do colesterol sem a ajuda de nenhum outro mediador, confirmando seu potencial como biossensor para detecção desta biomolécula. Entretanto, na Figura 4.23 (b), referente ao eletrodo modificado com filme LB pela deposição tipo Y, os voltamogramas cíclicos de controle, quando na ausência de colesterol na solução eletrolítica, e o gerado na

presença de colesterol ( $150 \text{ mg dL}^{-1}$ ) não apresentaram picos redox. A diferença entre os resultados observados para as duas metodologias de transferência investigadas reflete a diferença na estrutura do filme imobilizado obtido. Quando se emprega a metodologia de deposição do tipo Y, a ausência de sinal pode ter sido causada pela obstrução do eletrodo de trabalho pela molécula imobilizada ou por uma orientação molecular que desfavoreceu a reação enzimática.



**Figura 4.23.** Voltamogramas cíclicos a  $25 \text{ mV s}^{-1}$  em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ M}$  pH 7,0, isopropanol e triton X-100, 86:10:4 (%peso) na ausência de colesterol (linha cheia) e na presença de colesterol  $150 \text{ mg dL}^{-1}$  (linha interrompida), utilizando biossensor fabricado pela deposição tipo Z (a) e Y (b) de filmes LB de COx em eletrodo de trabalho impresso de carbono em 2 minutos de reação, a  $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ .

Comparando a Figura 4.22 (b) e a Figura 4.23 (a), observa-se que a presença da enzima COx imobilizada na superfície do eletrodo retardou a transferência de elétrons entre a superfície do eletrodo e o analito, reduzindo drasticamente o valor da corrente. No entanto, a presença da enzima imobilizada, que caracteriza a existência do biossensor, assegura uma detecção específica do colesterol.

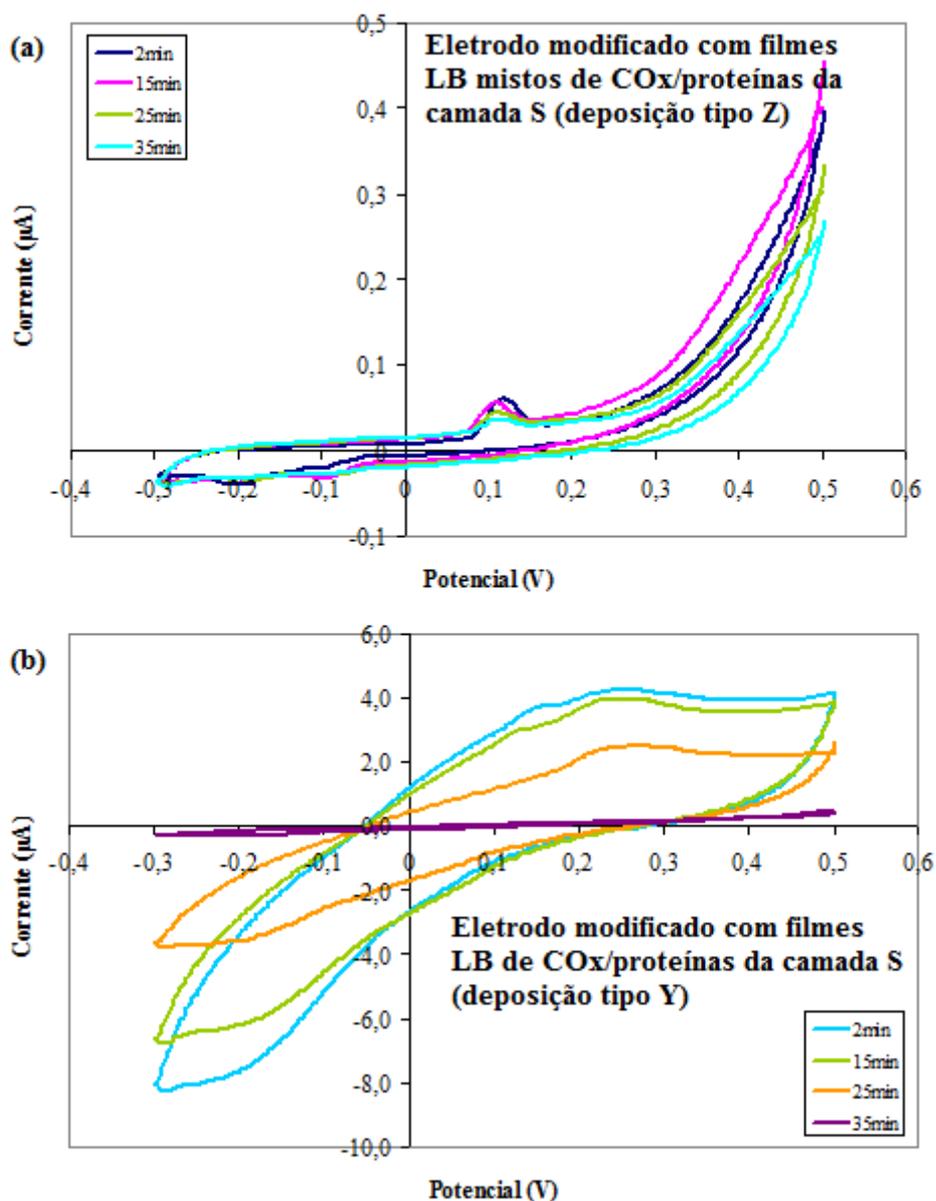
Com o intuito de avaliar o efeito da presença das proteínas da camada S na estrutura da matriz dos sensores, foram imobilizados filmes LB mistos de COx / proteínas da camada S utilizando as metodologias de deposição tipo Z e Y (Figura 4.24).

A Figura 4.24 (a) apresenta voltamogramas cíclicos para a deposição tipo Z ao longo do tempo (2, 15, 25 e 35 minutos). Ocorre uma diminuição da intensidade da corrente no pico de oxidação com o tempo, porém o potencial anódico se mantém constante em aproximadamente 0,11 V (*versus* Ag/AgCl). Este efeito pode ser atribuído à irreversibilidade da reação na presença das proteínas da camada S, pois há uma oxidação do colesterol nas proximidades da superfície do eletrodo, o qual não é reduzido no ciclo inverso. Isso gera uma diminuição na concentração local de colesterol na forma reduzida para os próximos ciclos.

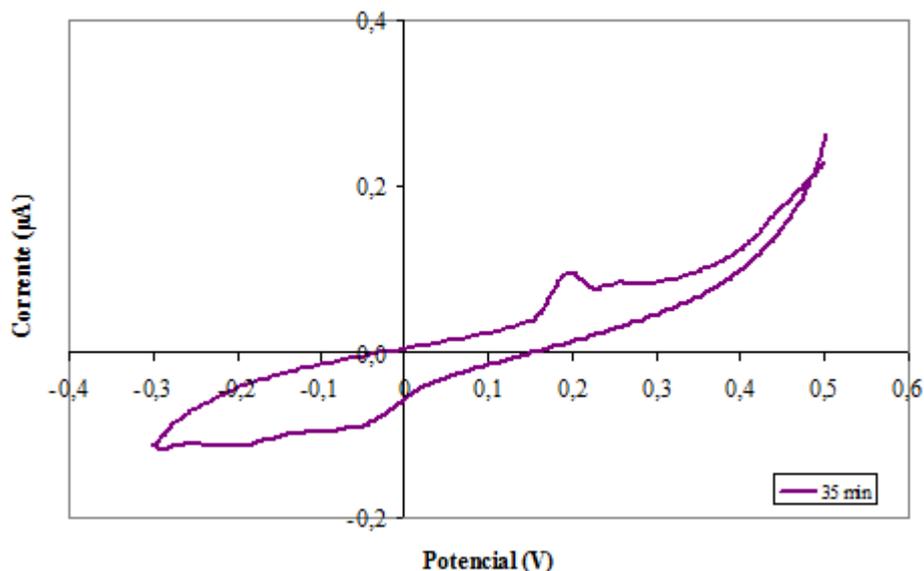
Os voltamogramas cíclicos da Figura 4.24 (b) são referentes aos filmes LB mistos de COx / proteínas da camada S pela deposição tipo Y ao longo do tempo (2,15, 25 e 35 minutos). As formas dos voltamogramas cíclicos diminuem de intensidade e apresentam uma tendência para a formação de pico de oxidação no potencial de 0,25 V (*versus* Ag/AgCl), aproximadamente. O pico de redução não foi perceptível. Como a intensidade da corrente diminui muito, a visualização do voltamograma cíclico referente ao tempo de reação de 35 minutos na Figura 4.24 (b) ficou comprometida. Assim, quando se apresenta este isolado (Figura 4.25), verifica-se a forma totalmente distinta dos resultados anteriores, com formação de pico de oxidação bem definido em potencial de 0,19 V (*versus* Ag/AgCl), com intensidade de corrente de aproximadamente 0,1  $\mu$ A, e pico de redução não perceptível. O deslocamento do pico de oxidação para um valor de potencial mais próximo ao observado anteriormente para a deposição tipo Z, e a mudança no formato do voltamograma para o tempo de 35 minutos sugerem uma

limitação da reação de oxidação pela etapa de difusão do colesterol até a superfície do eletrodo.

A diferença entre os resultados obtidos para as deposições Y e Z confirmam a influência do tipo de imobilização sobre o desempenho do biossensor, como discutido anteriormente, e, novamente, melhores resultados foram obtidos com a deposição tipo Z.

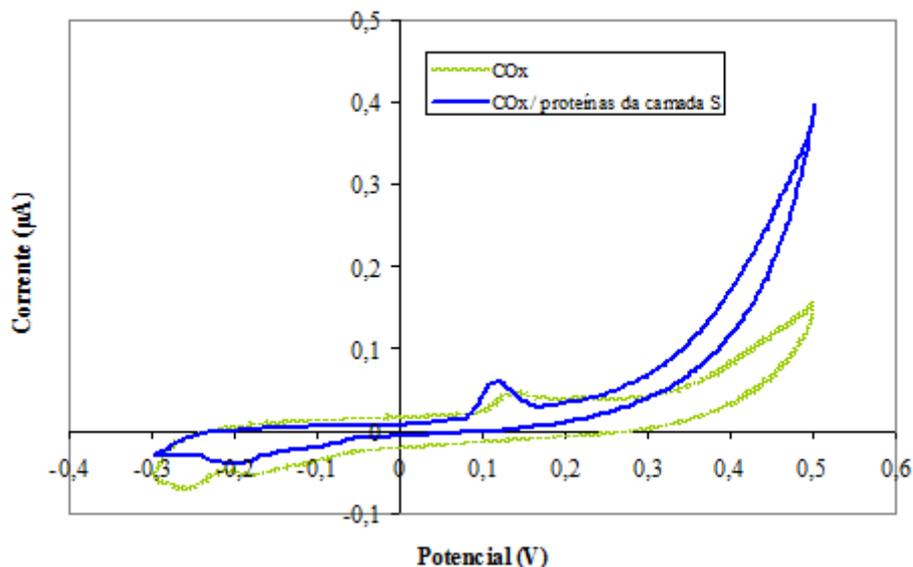


**Figura 4.24.** Voltamogramas cíclicos a  $25 \text{ mV s}^{-1}$  em solução de colesterol  $150 \text{ mg dL}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ M}$  pH  $7,0$ , isopropanol e triton X-100,  $86:10:4$  (% peso), utilizando biossensor fabricado pela deposição tipo Z e Y de filmes LB mistos de COx / proteínas da camada S em eletrodo de trabalho impresso de carbono, ao longo do tempo indicado, a  $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ .



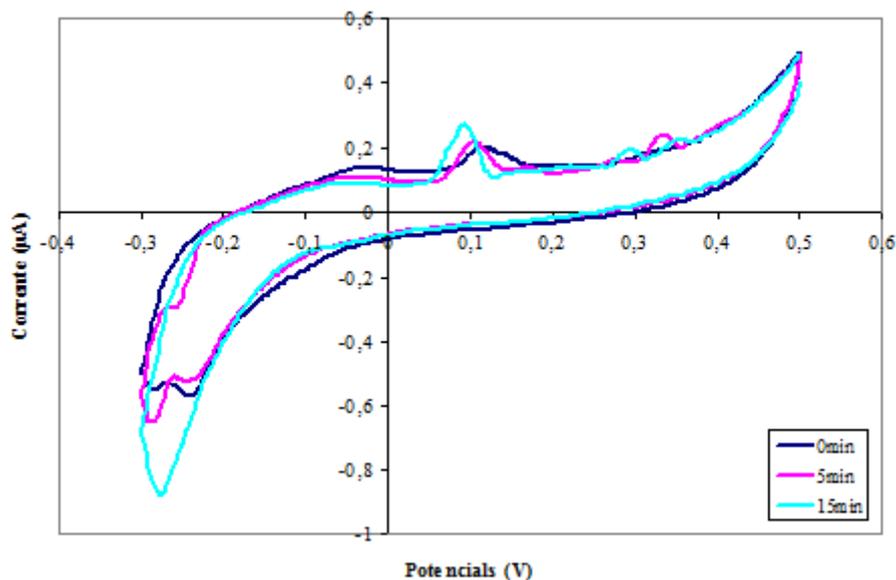
**Figura 4.25.** Voltamograma cíclico a  $25 \text{ mV s}^{-1}$  em solução de colesterol  $150 \text{ mg dL}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ M}$  pH  $7,0$ , isopropanol e triton X-100,  $86:10:4$  (% peso), utilizando biossensor fabricado pela deposição tipo Y de filmes LB mistos de  $\text{COx}$  / proteínas da camada S em eletrodo de trabalho impresso de carbono, nos tempos de 35 minutos, a  $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ .

A Figura 4.26 mostra uma comparação entre os resultados obtidos na caracterização eletroquímica do sensor com eletrodo de trabalho modificado apenas pela transferência de filmes LB da enzima  $\text{COx}$  e com eletrodo de trabalho modificado pela transferência de filmes LB mistos de  $\text{COx}$  e proteínas da camada S, ambos pela deposição tipo Z. Foi verificada uma diferença significativa entre os voltamogramas cíclicos destes, pois o segundo biossensor apresentou voltamograma cíclico contendo um pico de oxidação com maior intensidade, deslocado para a esquerda e mais estreito em relação ao primeiro. Este resultado é um indício da presença das proteínas de camada S na superfície do biossensor. A presença dessas proteínas interfere na forma de imobilização da enzima colesterol oxidase, resultando, provavelmente, em uma organização que facilitar a ocorrência da reação, aumentando a sensibilidade do biossensor. No entanto, a reprodutibilidade desses resultados deve ser avaliada em novos testes, visando confirmar este efeito.



**Figura 4.26.** Voltamogramas cíclicos a  $25 \text{ mV s}^{-1}$  em solução de colesterol  $150 \text{ mg dL}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ M}$  pH  $7,0$ , isopropanol e triton X-100,  $86:10:4$  (% peso), utilizando biossensor fabricado pela deposição tipo Z, em eletrodo de trabalho impresso de carbono, de filmes LB de COx pura (linha interrompida verde) e de filmes LB mistos de COx / proteínas da camada S (linha cheia azul), ambos em 2 minutos de reação, a  $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ .

Os voltamogramas cíclicos de biossensores preparados através da deposição de solução concentrada de COx na superfície do eletrodo de trabalho ao longo do tempo, são mostrados na Figura 4.27.



**Figura 4.27.** Voltamogramas cíclicos a  $25 \text{ mV s}^{-1}$  em solução de colesterol  $150 \text{ mg dL}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ M}$  pH  $7,0$ , isopropanol e triton X-100,  $86:10:4$  (% peso), utilizando biossensor fabricado pela adsorção de uma gota de solução de COx em eletrodo de trabalho impresso de carbono, em  $0, 5$  e  $15$  minutos, a  $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ .

O voltamograma da COx adsorvida a partir da solução gotejada apresentou outros picos anódicos, diferentemente daqueles obtidos com a deposição LB. Este resultado pode ser atribuído à não especificidade na adsorção das moléculas de COx quando depositadas por gotejamento, expondo diferentes partes da proteína e podendo levar à formação de múltiplas camadas. Além disto, pode ocorrer que impurezas presentes na solução da proteína também fiquem imobilizadas na superfície do biossensor. Já os voltamogramas realizados com sensores utilizando deposições LB são mais reprodutíveis, mantendo o potencial anódico característico da oxidação do colesterol (em torno de  $0,15 \text{ V}$  (*versus* Ag/AgCl)). Neste caso, a deposição do filme formado pela técnica de Langmuir e depositado pela técnica de LB favorece a obtenção de uma superfície mais uniforme, sem presença de impurezas.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSÕES E SUGESTÕES

#### 5.1. CONCLUSÕES

As principais conclusões obtidas nesta pesquisa foram:

- Os resultados dos procedimentos utilizados para a extração das proteínas da camada S confirmaram que a metodologia convencional, utilizando um agente caotrópico em alta concentração e altas temperaturas (hidrocloro de guanidina, 5 M, 60°C), é a mais apropriada para adquirir extratos com elevada concentração e pureza.

- A enzima colesterol oxidase comercial e as proteínas da camada S extraídas do *B. sphaericus* apresentam propriedades anfífilas, formando filmes de Langmuir na interface ar-água e ar-sólido. Os filmes com estas biomoléculas foram obtidos com alta reprodutibilidade. Cabe ressaltar o ineditismo desses resultados.

- A respeito do filme de Langmuir das proteínas da camada S, observa-se que este apresentou uma forma de um filme mais fluido, com fases bem definidas (gás, líquido-expandido e líquido-condensado), ocorrendo colapso do filme ao final da compressão. O filme mostrou-se estável em 6000 segundos, mantendo a área média ocupada por uma molécula constante, quando fixada a pressão de superfície em 15 mN m<sup>-1</sup>. Ciclos de compressão-descompressão revelaram a pouca interação molécula-molécula até a pressão de 15 mN m<sup>-1</sup>, evidenciada pela ausência de histerese nos ciclos. Com o aumento do valor da pressão de superfície em cada ciclo para 30 mN m<sup>-1</sup>, ocorre histerese. Assim, a pressão de superfície adequada para transportar o filme para um suporte foi de 15 mN m<sup>-1</sup>, pois mesmo que haja uma pequena variação da pressão durante a deposição, o filme não sofreria a formação de aglomerados irreversíveis, provocados pelo fenômeno da histerese.

- Foi possível preparar filmes mistos de COx / proteínas da camada S e de DPPC / proteínas da camada S. Os filmes mistos apresentaram características intermediárias aquelas observadas para os filmes de cada biomolécula separadamente, indicando a formação de filmes do tipo ideal, no qual os componentes formam um filme homogêneo, mas sem interações significativas entre eles. Estes resultados também são inéditos na Literatura.

- A caracterização dos filmes LB pelas técnicas de microscopia de força atômica (AFM) indicou a presença de camadas depositadas, como pôde ser observado pela redução dos parâmetros de rugosidade média quadrada (RMS) e distância entre picos e vales (Rt).

- Quanto à técnica de espectroscopia de infravermelho (FT-IR), os resultados sugerem que houve deposição de material na superfície do suporte de ouro. Já nos eletrodos impressos de carbono, não foi possível confirmar a deposição por esta técnica.

- A caracterização eletroquímica mostrou-se uma técnica adequada para avaliar os sensores fabricados pela modificação do eletrodo de trabalho através da deposição de filmes pela técnica LB. Os biossensores preparados apresentaram picos de redução e oxidação estáveis e de intensidade moderada (da ordem de alguns microampéres). Além disso, comparando-se os eletrodos com ou sem deposição, observaram-se diferenças significativas na forma dos voltamogramas cíclicos, na intensidade da corrente e nos potenciais catódicos e anódicos, confirmando a transferência do filme de Langmuir.

- A técnica de deposição do filme para obtenção do biossensor afeta a capacidade de detecção do mesmo. Neste trabalho, melhores resultados foram obtidos quando utilizou-se a deposição tipo Z, para imobilização tanto dos filmes de COx pura quanto para os filmes mistos de COx e proteínas da camada S.

- Na comparação dos voltamogramas cíclicos dos biossensores fabricados com a transferência de filmes LB com deposição tipo Z, há indícios de que a presença das proteínas de camada S contribui para a obtenção de biossensores com propriedades mais adequadas ao uso, visto que o pico de oxidação observado foi de intensidade maior,

com reação mais rápida (pico estreito) e deslocado para a esquerda, ou seja, a reação ocorre em uma diferença de potencial menor.

## 5.2. SUGESTÕES

Para produzir superfícies limpas, homogêneas, relativamente planas e reprodutivas, imprescindíveis para melhorar a qualidade da transferência, sugere-se um estudo sobre pré-tratamentos das superfícies dos eletrodos (tratamentos térmicos e químicos, ou eletroquímicos) adequados ao eletrodo escolhido e às moléculas que irão ser imobilizadas.

Na etapa de obtenção de filmes monomoleculares utilizando a balança de Langmuir, seria interessante estudar outras condições experimentais, como o efeito da temperatura, pH e composição da subfase. Um estudo mais profundo da interferência da concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  na subfase sobre a formação de filmes das proteínas da camada S, isoladas ou em filmes mistos, também poderia resultar em melhorias no biossensor já que esses íons têm efeito reconhecido na capacidade de auto-organização das proteínas de camada S.

Investigar mais detalhadamente as propriedades dos filmes mistos. Por exemplo, através das isotermas  $\pi - A$  desses filmes, sugere-se obter a relação entre a fração volumétrica de um componente e a área ocupada por molécula no filme, visando caracterizar o tipo de filme formado.

Visando a uma caracterização mais detalhada dos filmes monomoleculares, propõem-se o estudo aprofundado destes utilizando técnicas como isotermas de potencial de superfície ( $\Delta V - A$ ), elipsometria, microscopia de ângulo de Brewster, e estudos mais sistemáticos por microscopia de força atômica. Além disto, seria necessária a caracterização da atuação enzimática da COx.

Com a intenção de caracterizar o biossensor fabricado, sugerem-se ensaios que avaliem a repetibilidade, reprodutibilidade e a faixa limite de detecção do analito alvo.

Sugere-se estudar a variação de parâmetros importantes, como a velocidade de varredura, a temperatura de reação, o uso de mediadores, o número de camadas imobilizadas, etc. Também, a construção de uma curva de calibração, relacionando a concentração de colesterol e a intensidade de corrente gerada (amperometria).

Outra sugestão é a condução de testes de estabilidade do biossensor, tanto nas condições de uso quanto à estocagem. Estes poderiam ser realizados através de caracterizações eletroquímicas por voltametria cíclica ou usando outras técnicas, como, cronoamperometria. Além disso, a avaliação da especificidade do biossensor quando em contato com outras espécies biológicas, que podem ser interferentes no sistema, é fundamental para determinar a sua eficiência nas condições reais de uso.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMSON, A. W., GAST, A. P., 1997, **Physical Chemistry of Surfaces**, 6 ed., New York, John Wiley & Sons Inc.
- ALLAIN, C.C., POON, L. S., CHAN, C. S. G. *et al.*, 1974, “Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol”, **Clinical Chemistry**, v. 20, pp. 470–475.
- ARYA, S. K., DATTA, M., MALHOTRA, B. D., 2008, “Recent advances in Cholesterol Biosensor”, **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, pp. 1083–1100.
- BAKSHI, M. S., KAUR, G., THAKUR, P. *et al.*, 2007, “Surfactant Selective Synthesis of Gold Nanowires by Using a DPPC - Surfactant Mixture as a Capping Agent at Ambient Conditions”, **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, pp. 5932–5940.
- BORGES, C. P., FERRAZ, H. C., ALVES, T. L. M. *et al.*, 2005, Fundamentos e Aplicações de Fenômenos Interfaciais – Série Escola Piloto em Engenharia Química, COPPE/UFRJ.
- BRADFORD, M. M., 1976, “A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding”, **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254.
- DAVIS, F., HIGSON, S. P. J., 2005, “Structural Thin Films as Functional Components within Biosensors”, **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, pp. 1–20.

- FERNANDÉZ, M. C., SÁNCHEZ, C. C., RODRÍGUEZ NIÑO, M. R. *et al.*, 2007, “Structural Characteristics of Adsorbed Protein and Monoglyceride Mixed Monolayers at the Air-Water Interface”, **Food Hydrocolloids**, v. 21, pp. 906–919.
- FERREIRA, M., CAETANO, W., ITRI, R. *et al.*, 2005, “Técnicas de Caracterização para Investigar Interações no Nível Molecular em Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB)”; **Química Nova**, v. 28; n. 3, pp. 502–510.
- FIGUEIREDO, 2008, Desenvolvimento de Membrana com Mioglobina para a Permeação Seletiva de Oxigênio, Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- FIOL, C., VALLETON, J., DELPIRE, N. *et al.*, 1992, “Elaboration of a Glucose Biosensor based on Langmuir-Blodgett Technology”, **Thin Solid Films**, v. 210/211, pp. 489–491.
- GIRARD-EGROT, A. P., GODOY, S., BLUM, L. J., 2005, “Enzyme Association with Lipidic Langmuir–Blodgett Films: Interests and Applications in Nanobioscience”, **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 116, pp. 205–225.
- GONÇALVES, S. B., 2007, Extração, Purificação e Estudos sobre a Formação de Filmes Monomoleculares da Hialuronidase Bovina, Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- GUFLER, P. C., PUM, D., SLEYTR, U. B., *et al.*, 2004, “Highly Robust Lipid Membranes on Crystalline S-layer Supports Investigated by Electrochemical Impedance Spectroscopy”, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1661, pp. 154–165.
- HOU, Y., JAFFREZIC-RENAULT, N., ZHANG, A. *et al.*, 2002, “Study of Pure Urease Langmuir-Blodgett Film and Application for Biosensor Development”, **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 86, pp. 143–149.

- JAENICKE, R., WELSCH, R., SÁRA, M. *et al.*, 1985, “Stability and Self-assembly of the S-Layer Protein of the Cell Wall of *Bacillus stearothermophilus*”, **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, v. 366, pp. 663–670.
- KIM, K., KIM, C., BYUN, Y., 2001, “Preparation of a Dipalmitoylphosphatidylcholine/Cholesterol Langmuir-Blodgett Monolayer that Suppresses Protein Adsorption”, **Langmuir**, v. 17, pp. 5066–5070.
- KSV Instruments LTD, Langmuir and Langmuir – Blodgett Films what and how? - Application Note 107. Disponível em: <http://www.ksvltd.fi>. Acesso em 10 abr. 2009.
- LEBLANC, R. M., HUO, Q., 2006, “Langmuir and Langmuir-Blodgett Films of Proteins and Enzymes”, In: Encyclopedia of Surface and Colloid Science, v. 5, Taylor & Francis Group, CRC Press Inc., pp. 3233–3237.
- MA, G., ALLEN, H. C., 2006, “DPPC Langmuir Monolayer at the Air-Water Interface: Probing the Tail and Head Groups by Vibrational Sum Frequency Generation Spectroscopy”, **Langmuir**, v. 22, pp. 5341–5349.
- MALHOTRA, B. D., SINGHAL, R., CHAUBEY, A. *et al.*, 2005, “Recent Trends in Biosensors”, **Current Applied Physics**, v. 5, pp. 92–97.
- MALIK, V., PUNDIR, C. S., 2002, “Determination of Total Cholesterol in Serum by Cholesterol Esterase and Cholesterol Oxidase Immobilized and Co-immobilized on to Arylamine Glass”, **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 35, pp. 191–197.
- MARTINS, M., 2006, Biossensores de Colesterol Baseados no Sistema Poli(álcool vinílico)/ftalocianina, Dissertação de M.Sc., UNIFEI, Itajubá, MG, Brasil.
- MESSNER, P., PUM, D., SÁRA, M. *et al.*, 1986, “Ultrastructure of the Cell Envelope of the Archaeobacteria *Thermoproteus tenax* and *Thermoproteus neutrophilus*”, *The Journal of Bacteriology*, v. 166, pp. 1046–1054.

- MORAES, M. L., SOUZA, N. C., HAYASAKA, C. O. *et al.*, 2009, “Immobilization of Cholesterol Oxidase in LbL Films and Detection of Cholesterol using AC Measurements”, **Materials Science and Engineering C**, v. 29, pp. 442–447.
- NEWMAN, J. D., TIGWELL, L. J., TURNER, A. P. F. *et al.*, 2004, “Biosensors: A Clearer View”, In: *Biosensors 2004 – Proceedings of the Eighth World Congress on Biosensors*, Elsevier.
- PASTORINO, L., NICOLINI, C., 2002, “Langmuir–Blodgett Films of Lipase for Biocatalysis”, **Materials Science and Engineering C**, v. 22, pp. 419–422.
- PUM, D., NEUBAUER, A., GYÖRVARY, E. *et al.*, 2000, “S-layer Proteins as Basic Building Blocks in a Biomolecular Construction Kit”, **Nanotechnology**, v. 11; pp. 100–107.
- PUM, D., SLEYTR, U. B., 1994, “Large-scale Reconstitution of Crystalline Bacterial Surface Layer Proteins at the Air-water Interface and on Lipid Films”, **Thin Solid Films**, v. 244, pp. 882–886.
- RUBINGER, C. P. L., MOREIRA, R. L., CURY, L. A. *et al.*, 2006, “Langmuir-Blodgett and Langmuir-Schaefer Films of Poly(5-amino-1-naphthol) Conjugated Polymer”, **Applied Surface Science**, v. 253, pp. 543–548.
- SAMPSON, N. S., VRIELINK, A., 2003, “Cholesterol Oxidases: A Study of Nature's Approach to Protein Design”, **Accounts of Chemical Research**, v. 36, no. 9, pp. 713–722.
- SÁRA, M., SLEYTR, U. B., 1989, “Use of Regularly Structured Bacterial Cell Envelope Layers as Matrix for the Immobilization of Macromolecules”, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 30, pp. 184–189.
- SÁRA, M., SLEYTR, U. B., 1996, “Crystalline Bacterial Cell Surface Layers (S-Layers): From Cell Structure to Biomimetics”, **Progress Biophysics and Moleccular Biology**, v. 65, nº. 1/2, pp. 83–111.

- SHAW, D. J., 1992, **Introdução à Química dos Colóides e de Superfícies**, São Paulo, Editora Edgard Blucher e Editora da Universidade de São Paulo.
- SHEN, J., LIU, C., 2007, “Development of a Screen-printed Cholesterol Biosensor: Comparing the Performance of Gold and Platinum as the Working Electrode Material and Fabrication Using a Self-assembly Approach”, **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 120, pp. 417–425.
- SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G. C., MORRIL, T. C., 1991, **Spectrometric Identification of Organic Compounds**, 5 ed., New York, John Wiley & Sons Inc.
- SLEYTR, U. B., 1975, “Heterologous Re-attachement of Regular Arrays of Glycoproteins on Bacterial Surfaces”, **Nature**, v. 257, pp. 400–402.
- SLEYTR, U. B.; BAYLEY, H., SÁRA, M. *et al.*, 1997, “VI. Applications of S-layers”, **FEMS Microbiology Reviews**, v. 20, pp. 151–175.
- SLEYTR, U. B., GYÖRVARY, E., PUM, D., 2003, “Crystallization of S-layer Protein Lattices on Surfaces and Interfaces”, **Progress in Organic Coatings**, v. 47, pp. 279–287.
- SLEYTR, U. B., MESSNER, P., 1983, “Crystalline Surface Layers on Bacteria”, **Annual Review Microbiology**, v. 37, pp. 311–339.
- SLEYTR, U. B., SÁRA, M., KÜPCÜ, Z. *et al.*, 1986, “Structural and Chemical Characterization of S-layers of Selected Strains of *Bacillus stearothermophilus* and *Desulfotomaculum nigrificans*”, **Archives of Microbiology**, v. 146, pp. 19–24.
- SLOTTE, J. P., 1992, “Substrate Specificity of Cholesterol Oxidase from *Streptomyces cinnamomeus* – A Monolayer Study”, **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, no. 5, pp. 521–526.

- TAVARES, P., Voltametria – Métodos Instrumentais de Análise I - 2004 - parte C. Disponível em: <http://www.dq.fct.unl.pt/cadeiras/miai/download/Voltametria-MIA2004-parteC.pdf>. Acesso em 07 fev. 2009.
- THÉVENOT, D. R., TOTH, K., DURST, R. A. *et al.*, 2001, “Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification”, **Biosensors & Bioelectronics**, v. 16, pp. 121–131.
- WETZER, B., PUM, D., SLEYTR, U. B., 1997, “S-layer Stabilized Solid Supported Lipid Bilayers”, **Journal of Structural Biology**, v. 119, pp. 123–128.
- YIN, F., KAFI, A. K. M., SHIN, H. *et al.*, 2006, “A Novel Amperometric Hydrogen Peroxide Biosensor Based on Immobilization of Hemoglobin in Linoleic Acid Monolayer by Langmuir-Blodgett Technique”, **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 284-285, pp. 125–129.
- ZAIA, D. A. M., ZAIA, C. T. B. V., LICHTIG, J., 1998, “Determinação de Proteínas Totais Via Espectrofotometria: Vantagens e Desvantagens dos Métodos Existentes”, **Química Nova**, v. 21, no. 6, pp. 787–793.

## ANEXO I

### PROTOCOLO DE ELETROFORESE

Preparo das soluções:

**Solução de monômero 30%T / 2,7%C:** Trabalhando na capela com luvas, mistura-se 14,6 g de acrilamida (Sigma) com 0,4 g de bis-acrilamida (Sigma), completando o volume com água ultra-pura (Milli-Q, Millipore) até o volume de 50 mL. Estocar a solução em frasco âmbar, a 4°C por três semanas.

$$T = (\% \text{ bis-acrilamida} + \% \text{ acrilamida}) \quad (\text{I.1})$$

$$C = \frac{\% \text{ bis-acrilamida}}{T} \quad (\text{I.2})$$

**Tampão de corrida:** Para preparar 1 L desta solução, mistura-se 3 g de Tris-base (USB) e 14,5 g de Glicina (Vetec). Adiciona-se 10 mL de solução de SDS 10% (m/v). O estoque deve ser em temperatura ambiente e a solução deve ser utilizada, no máximo, em três corridas de eletroforese.

**Solução para aplicação de amostra:** Misturar 1,25 mL de tampão Tris-HCl 1,0 M pH 6,8 com 2 mL de solução de SDS 10% (m/v), 0,5 mL de mercaptoetanol, 4 mL de solução de azul de bromofenol 0,05% (m/v), 1 mL de glicerol e 1,25 mL de água ultra-pura (Milli-Q, Millipore). Estocar esta solução a -20°C durante quatro semanas, em alíquotas de 1 mL.

**Solução corante (azul de coomassie R-250 0,025% (m/v), metanol 40% (v/v), ácido acético 7% (v/v)):** Mistura-se 12,5 mL da solução de azul de coomassie 1% (m/v) com 25 mL de metanol e 1 mL de ácido acético, completando com água destilada até o volume de 100 mL.

**Solução descorante:** 30 mL de metanol e 7 mL de ácido acético, completando o volume para 100 mL com água destilada.

Preparo do gel de poliacrilamida:

**Gel de corrida e gel de nivelamento:** Num béquer previamente limpo, os reagentes seqüenciados na Tabela I.1 eram adicionados. Primeiramente preparava-se o gel de corrida 10% e depositava-o entre os vidros para preparação do gel fino, Somente após sua polimerização, preparava-se o gel de nivelamento, que era aplicado sobre o primeiro com o aparato para formação dos poços de aplicação das amostras.

**Tabela A-I.1.** Reagentes e volumes correspondentes para o preparo dos géis de poliacrilamida.

| <b>Reagentes</b>      | <b>Gel de corrida 10%<br/>(mL)</b> | <b>Gel de nivelamento 4%<br/>(mL)</b> |
|-----------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| Água Milli-Q          | 2,0                                | 2,1                                   |
| Monômero 30%T / 2,7%C | 1,7                                | 0,5                                   |
| Tris.HCl 1,5 M pH 8,8 | 1,3                                | -                                     |
| Tris-HCl 1,0M pH 6,8  | -                                  | 0,38                                  |
| SDS 10%               | 0,05                               | 0,03                                  |
| Persulfato 10%        | 0,05                               | 0,03                                  |
| TEMED                 | 0,002                              | 0,003                                 |

O TEMED (catalisador) e o persulfato de amônio (gerador de radicais livres) devem ser adicionados por último para dar início à polimerização dos monômeros (acrilamida e bis-acrilamida).

Para o preparo de cada amostra era misturada com 40% (v/v) de *solução para aplicação de amostra*. Então, permaneciam em banho térmico a 95°C por 5 minutos.

Preparo da cuba de eletroforese:

Com o gel devidamente imerso no *tampão de corrida* dentro da cuba de eletroforese, injetava-se 25  $\mu\text{L}$  das amostras em cada poço e aplicava-se uma diferença de potencial de 100 volts na cuba de eletroforese.

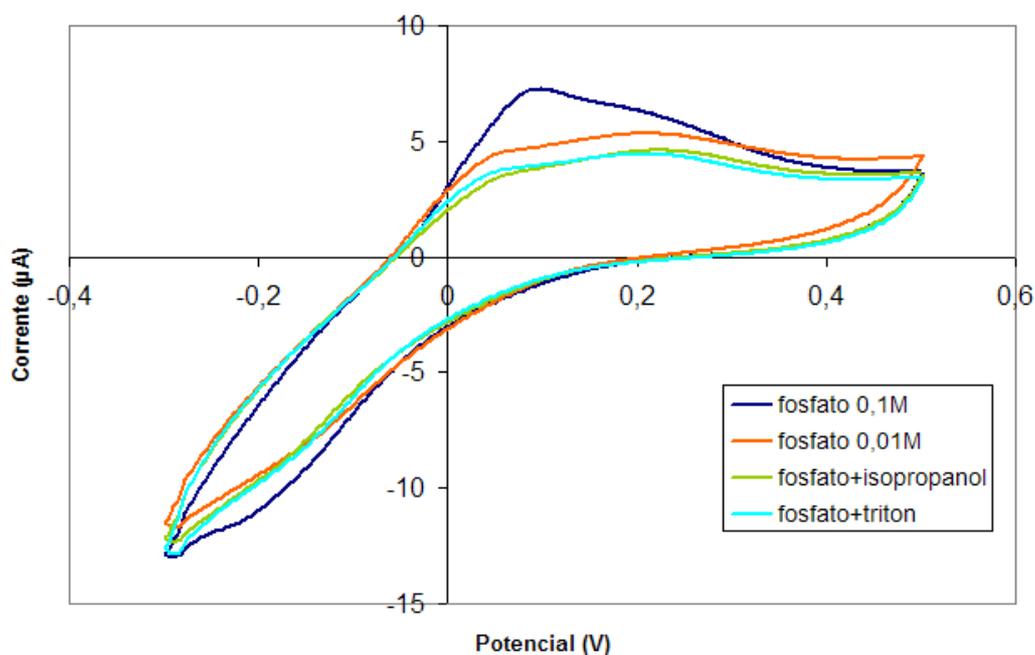
## ANEXO II

### CONTROLE DA CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

Com o propósito de obter mais confiabilidade e facilitar na interpretação dos resultados obtidos na caracterização eletroquímica dos biosensores desenvolvidos neste trabalho, serão apresentados, neste anexo, voltamogramas cíclicos de controle do sistema. Nestas análises, foi utilizado um sensor impresso com eletrodo de trabalho de carbono, eletrodo de referência prata/cloreto de prata e eletrodo contra de platina/carbono. As soluções foram preparadas imediatamente antes de cada experimento.

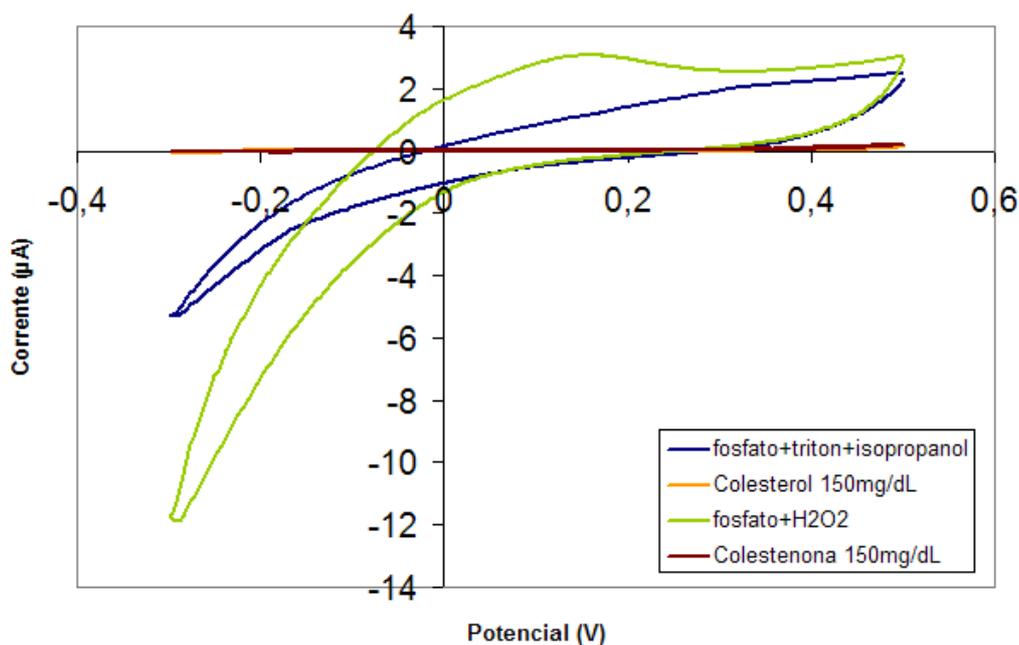
Foram realizados ciclos em soluções de tampão fosfato de sódio 0,1 M e 0,01 M pH 7,0 para avaliar a interferência dos íons presentes na solução. Em seqüência, ciclos em solução tampão fosfato com isopropanol e triton X-100 foram avaliados, nas mesmas condições dos testes anteriores. Os voltamogramas cíclicos gerados nesses testes estão apresentados na Figura A-II.1.

Observa-se que os ciclos voltamétricos não apresentam a formação de picos característicos de reação de oxidação nem redução.



**Figura A-II.1.** Voltamogramas cíclicos a  $25 \text{ mV s}^{-1}$  em soluções de controle, tampão fosfato 0,1 M e 0,01 M, tampão fosfato 0,1 M com isopropanol e com triton X-100 (separadamente), utilizando sensor impresso com eletrodo de trabalho de carbono, a  $40^\circ\text{C}$ .

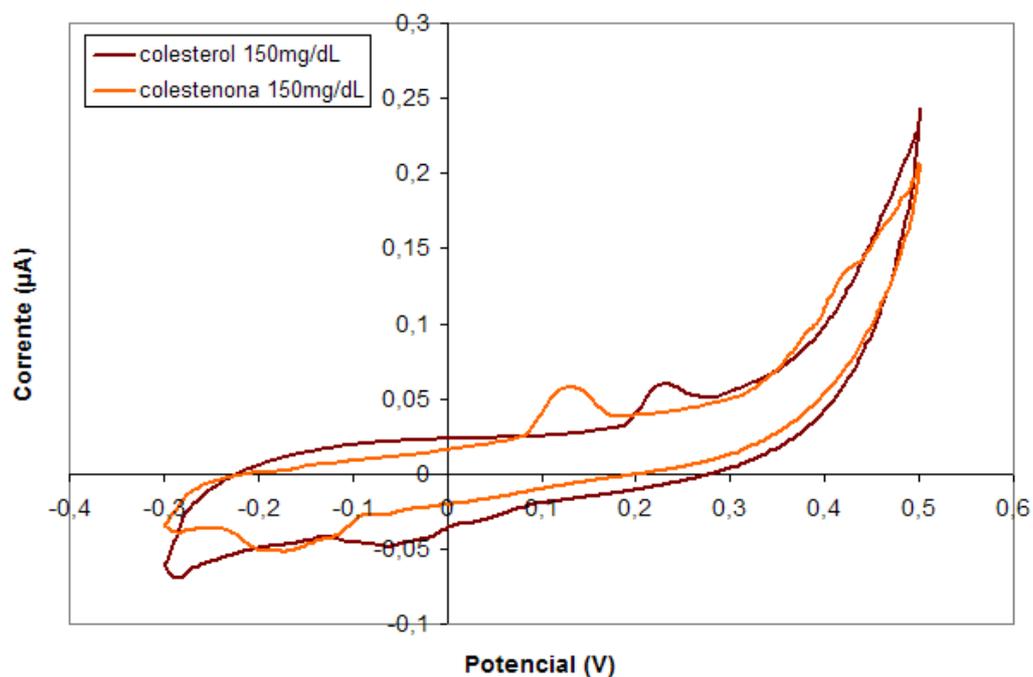
Também foram adquiridos voltamogramas cíclicos em solução de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, isopropanol e triton X-100 na proporção de 86:10:4 (%peso), em solução de colesterol  $150 \text{ mg dL}^{-1}$  em tampão fosfato : isopropanol : triton X-100 (86:10:4 (%peso)) e, em solução de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 com peróxido de hidrogênio. Foi avaliada a corrente gerada pelo sensor quando em contato com o produto da reação, ou seja, em solução de colesteno  $150 \text{ mg dL}^{-1}$  em fosfato : isopropanol : triton X-100 (86:10:4 (%peso)). Os resultados são apresentados na Figura A-II.2.



**Figura A-II.2.** Voltamogramas cíclicos a  $25 \text{ mV s}^{-1}$  em soluções de controle (tampão fosfato  $0,1 \text{ M}$  pH  $7,0$  com triton X-100 e isopropanol; colesterol  $150 \text{ mg dL}^{-1}$ ; tampão fosfato  $0,1 \text{ M H}_2\text{O}_2$  e; colestenona  $150 \text{ mg dL}^{-1}$ ) utilizando sensor impresso com eletrodo de trabalho de carbono, a  $40^\circ\text{C}$ .

Como a forma característica do voltamograma cíclico em solução de colesterol  $150 \text{ mg dL}^{-1}$  e do em solução de colestenona  $150 \text{ mg dL}^{-1}$  não ficaram aparentes, apresentam-se estes voltamogramas isolados dos demais na Figura A-II.3.

Em ambos os voltamogramas foram caracterizados pela presença de picos de oxidação e redução das espécies em solução. Porém, os picos obtidos no teste com o colesterol são deslocados para a direita em relação aos picos obtidos no teste com a colestenona. O pico de oxidação obtido quando na solução contém colesterol acontece no potencial de  $0,30 \text{ V}$ , com intensidade de corrente de  $0,054 \text{ }\mu\text{A}$ , e o pico de oxidação obtido quando na solução contém colestenona acontece no potencial de  $0,13 \text{ V}$ , com intensidade de  $0,057 \text{ }\mu\text{A}$ . Já o pico de redução em solução de colesterol acontece no potencial de  $-0,07 \text{ V}$ , com intensidade de  $-0,048 \text{ }\mu\text{A}$ , e o pico de redução em solução de colestenona aparece no potencial de  $-0,20 \text{ V}$ , com intensidade de corrente de  $-0,052 \text{ }\mu\text{A}$ .



**Figura A-II.3.** Voltamograma cíclico a  $25 \text{ mV s}^{-1}$  em solução  $150 \text{ mg dL}^{-1}$  de colesterol e em solução  $150 \text{ mg dL}^{-1}$  de colesthenona (ambas em tampão fosfato  $0,1 \text{ M}$  pH  $7,0$ , isopropanol e triton X-100 na proporção de  $86:10:4$  (%peso)), a  $40^\circ\text{C}$ .