

DETECÇÃO DE BIOTINA-ESTREPTAVIDINA USANDO DIFRAÇÃO EM NANOBURACOS DE OURO FABRICADOS POR LITOGRAFIA INTERFEROMÉTRICA

ANDERSON THESING¹; JACSON W. MENEZES²; ALEXANDRE G. BROLO³ E
 JACQUELINE FERREIRA¹

¹Universidade Federal de Pelotas – adnthesing@gmail.com

²Universidade Federal do Pampa – jacsonmenezes@unipampa.edu.br

³University of Victoria – agbrolo@uvic.ca

¹Universidade Federal de Pelotas – jacqueline.research@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Biossensores têm atraído a atenção da comunidade científica por possuírem resposta rápida e facilidade de manuseio, além do potencial para a aplicação em diagnósticos clínicos e monitoramento de fármacos (PANDAY, 2007). O principal objetivo do sistema de reconhecimento é proporcionar um sensor com um elevado grau de sensibilidade para o analito a ser analisado.

O funcionamento de biossensores fundamenta-se no conceito de interação de superfícies, com a finalidade de detectar a presença de moléculas biológicas no meio de análise. Biossensores podem ser classificados de acordo com o modo de transdução do sinal físico-químico, podendo ser, por exemplo, uma resposta baseada no efeito de ressonância de plasmons de superfície (PEREIRA, 2007) ou pelo fenômeno da difração (CHANG, 2007). A difração é um fenômeno resultante da interferência que ocorre quando ondas passam por orifícios na mesma ordem de grandeza do seu comprimento de onda.

Quando se usa um padrão periódico, a difração ocorre simultaneamente em todos os pontos da rede. Cada ponto da rede atuará como uma fonte secundária de ondas. Como consequência, interferências construtivas e destrutivas de onda são formadas. Um padrão de difração ocorre nos pontos onde existe interferência construtiva. A intensidade de luz na primeira ordem de difração depende de fatores como o comprimento de onda da fonte (λ) a altura da grade (d) e o índice de refração (n) do material e do meio.

De acordo com a literatura (CHANG, 2007), a intensidade da luz difratada na primeira ordem de difração é dada por:

$$I_1 \propto \sin^2 \frac{2\pi d}{\lambda} \quad (1)$$

Neste trabalho, uma amostra com nanoburacos de ouro foi preparada pela técnica de litografia interferométrica (LI), devido à simplicidade e baixo custo, para posterior aplicação como biossensor na detecção da proteína estreptavidina usando a intensidade da primeira ordem de difração como resposta do biossensor.

2. METODOLOGIA

2.1. Fabricação e caracterização da amostra

A amostra usada para a detecção de estreptavidina foi fabricada pela técnica de LI, seguida do processo de *lift-off* (MENEZES, 2010). Uma resina positiva (SC-1827, Room and Haas) de aproximadamente 550 nm de espessura foi depositada

pela técnica de *spin-coating* sobre um substrato de vidro de 2,5 x 2,5 cm. Para a gravação interferométrica, a amostra foi exposta a um setup de gravação utilizando um laser de argônio de $\lambda=458$ nm (coherent) numa dose de 200 mJ/cm². A fotoresina foi removida em uma mistura de revelador Microposit 351 Developer (Room and Haas) e água ultrapura na proporção 1:3 por 40 segundos. Depois disto, um filme fino de ouro (70 nm) foi depositado por *e-beam* e a fotoresina foi removida (processo *lift-off*).

Para caracterização morfológica da amostra, um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) Hitachi S-4800 FESEM foi usado operando a 1 kV.

2.2. Detecção de estreptavidina por difração

A detecção de estreptavidina adsorvida sobre a amostra de nanoburacos de ouro foi realizada por difração usando um arranjo experimental conforme a Figura 1. Um laser azul (458 nm) foi utilizado como fonte de luz e uma CCD (iDus - Andor) foi utilizada para detectar as variações da intensidade da luz difratada na primeira ordem de difração devido a modificação da superfície. Durante todo o processo de caracterização, a posição da amostra não foi alterada.

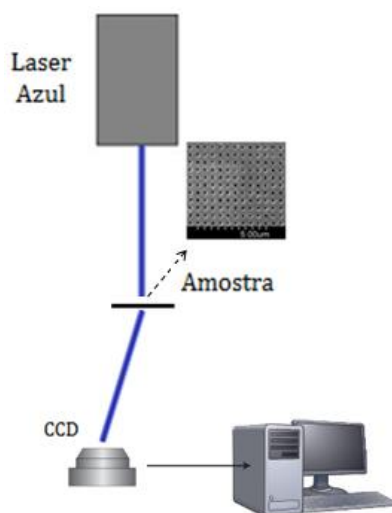


Figura 1: Arranjo experimental para detecção de estreptavidina.

Após fixar a amostra no arranjo experimental, 70 μ L de uma solução de 1 mM de biotina (Biotin-polyethyleneglycol) foi depositada sobre a amostra por 3 horas. Em seguida a amostra foi lavada com uma solução tampão de fosfato (PBS) (Sigma, diluída 10 vezes, pH 6,8) e secada com nitrogênio. A intensidade de luz da primeira ordem de difração da superfície modificada com biotina foi comparada com as intensidades de luz obtidas após a imobilização de estreptavidina (*Streptomyces Avidinii*, Sigma). Cada solução de estreptavidina (2,5 μ g.mL⁻¹, 5 μ g.mL⁻¹ e 10 μ g.mL⁻¹) foi colocada sobre a superfície da amostra por 25 minutos. As amostras foram lavadas com PBS e secadas suavemente com nitrogênio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização da amostra

A Figura 2 mostra a imagem por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para a amostra de nanoburacos de ouro preparada pela técnica de LI. A periodicidade foi de 550 nm e a espessura do filme de ouro foi de 70 nm. A

amostra fabricada mostrou-se extremamente homogênea numa área de 2,5 cm x 2,5 cm.

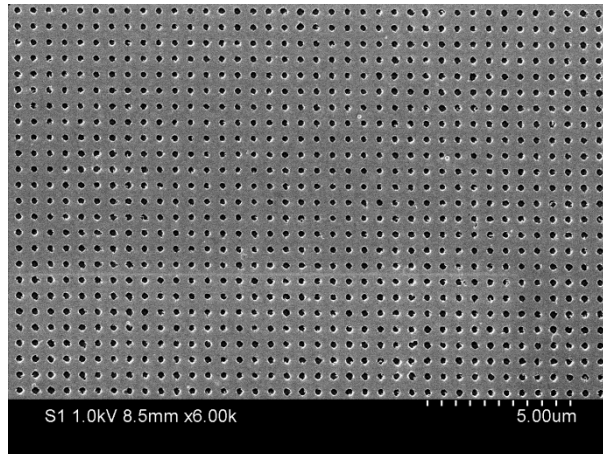


Figura 2: Imagem MEV da amostra de nanoburacos de ouro fabricada por LI.

3.2. Detecção de estreptavidina por difração

O desempenho do biossensor proposto foi quantificado usando moléculas de biotina e estreptavidina, devido a sua alta constante de bioafinidade (HAES, 2004) e especificidade da ligação (RUSMINI, 2007). A Figura 3 mostra os resultados da imobilização de estreptavidina na superfície do biossensor, onde uma mudança de intensidade da primeira ordem de difração, conforme a Equação 1, indica que a altura da grade foi modificada.

É possível observar na Figura 3a o decaimento de intensidade em função do tempo. A Figura 3b mostra o decaimento de intensidade em função da concentração de estreptavidina, mostrando uma sensibilidade em termos da Intensidade de Difração de Primeira Ordem (IDPO) de $0,019 \text{ IDPO}/\mu\text{g.mL}^{-1}$. O limite de detecção para essa técnica foi de $121,8 \text{ ng.mL}^{-1}$, demonstrando que os resultados estão de acordo com outros trabalhos descritos na literatura para detecção de moléculas biológicas (GANG, 2010).

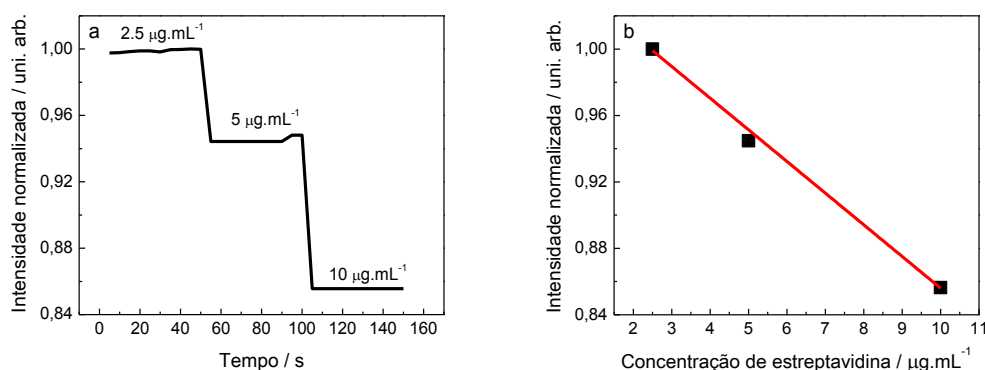


Figura 3: (a) Intensidade normalizada da primeira ordem de difração em função do tempo e (b) intensidade normalizada em função da concentração de estreptavidina. $\lambda_{\text{laser}} = 457 \text{ nm}$.

4. CONCLUSÕES

Estruturas periódicas em filmes de ouro foram fabricadas utilizando a técnica de litografia interferométrica. Modificação da superfície foi realizada e o biossensor foi caracterizado através de medidas de intensidade de luz da primeira

ordem de difração. Com a utilização deste método proposto foi possível detectar variações de concentração de estreptavidina de ca. 122 ng.ml^{-1} , com uma sensibilidade de $0,019 \text{ IDPO}/\mu\text{g.ml}^{-1}$. Desenvolveu-se, portanto, um biossensor através de uma metodologia simples e de baixo custo que se mostrou tão eficiente quanto outros descritos na literatura para detecção de moléculas biológicas, além de ser promissor devido a capacidade de detecção de moléculas em tempo real e na possibilidade de investigação para aplicação na detecção de outros analitos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

PANDAY, P.; SINGH, S. P.; ARYA, S. K.; GUPTA, V.; DATTA, M.; SINGH, S.; MALHOTRA, B, D.; Application of thiolated gold nanoparticles for enhancement of glucose oxidase activity. **Langmuir**, 23, 3333-3337, 2007.

PEREIRA, F. C.; ZANONI, M. V. B.; MORETTO, L. M.; UGO, P.; Características ópticas e morfológicas de nanopartículas de ouro. **Química Nova**, 30, 1550-1554, 2007.

CHANG, C-L.; ACHARYA, G.; SAVRAN, C. A. *In situ* assembled diffraction grating for biomolecular detection. **Applied Physics Letters** 90, 233901, 2007.

MENEZES, J. W.; FERREIRA, J.; SANTOS, M. J. L.; CESCATO, L.; BROLO, A. G.; Large-area fabrication of periodic arrays of nanoholes in metal films and their application in biosensing and plasmonic-enhanced photovoltaics. **Advanced Functional Materials**, 20, 3918-3924, 2010.

HAES, A. J.; VAN DUYNE, R. P.; A unified view of propagating and localized surface plasmon resonance biosensors. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 379, 920-930, 2004.

RUSMINI, F.; ZHONG, Z.; FEIJEN, J.; Protein immobilization strategies for protein biochips. **Biomacromolecules**, 8, 1775-1789, 2007.

GANG, Y.; CANQIANG, Y.; XIAOGONG, W.; Sensing diffraction Gratings of Antigen-Responsive Hydrogel for Human Immunoglobulin-G Detection. **Macromolecular Rapid Communication**, 31, 1332-1336, 2010.