

DESENVOLVIMENTO DE SUBSTRATO PLASMÔNICO PARA APLICAÇÃO EM BIOCENSORES

JORDANA SANGALLI LUFT¹; JACQUELINE FERREIRA²

¹Universidade Federal de Pelotas – jordana_luft@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – jacqueline.research@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Neste trabalho foi desenvolvido um biossensor baseado no efeito de ressonância de plasmon de superfície (SPR) utilizando filmes de nanopartículas de ouro (NpAu). A ressonância de plasmon de superfície implica na obtenção de área sensível muito pequena, mas com surpreendente sensibilidade devido às intensificações de sinal geradas pelo SPR. Isto possibilita o desenvolvimento de biossensores altamente sensíveis, os quais podem ser futuramente empregados na detecção precoce do câncer, onde se busca a detecção em amostras extremamente diluídas.

Biossensores são dispositivos de detecção que utilizam elementos de reconhecimento químico ou molecular (receptor) acoplados a transdutores. Podem ser divididos em diversas categorias com base nos processos de transdução, como óptico, eletroquímico, piezoelétrico e térmico (Thévenot *et al.*, 2001). Os biossensores baseados em SPR se enquadram na categoria dos ópticos. Nestes biossensores, a ressonância é gerada pela incidência da luz sobre um filme metálico, excitando os plasmons da superfície, gerando ondas propagantes que oscilam em ressonância, como resultado, parte da radiação é absorvida pelo metal. Os biossensores SPR se tornam ainda mais interessante se utilizarmos superfícies metálicas nanoestruturadas, pois permitem que a aquisição de dados seja feita com incidência normal, permitindo o uso de um sistema mais simples para a observação da excitação dos plasmons.

Um dos fatores que afeta o desempenho do biossensor é a imobilização das biomoléculas. Um método muito utilizado para a imobilização de proteínas é baseado na afinidade bioquímica entre as espécies. Através deste método, a proteína é imobilizada sobre a superfície do sensor, gerando sítios de ligação para ligação de proteínas. A reação mais comum deste método é a estreptavidina-biotina devido à sua alta constante de bioafinidade ($K_a 10^{13} M^{-1}$), (HAES s.d.) já que permite a utilização de condições mais severas durante a análise bioquímica (O'SHANNESY *et al.*, 1992). Além disso, o que fornece uma grande vantagem sobre outros métodos de imobilização é que a especificidade da interação permite a imobilização da proteína de forma orientada (RUSMINI e ZHONG s.d.). A superfície do sensor deve possibilitar a imobilização de elementos de biorreconhecimento suficientes, evitando assim ligações não específicas (MARQUES DE OLIVEIRA *et al.*, 2011) e estes elementos precisam ser imobilizados na superfície sem que seja afetada sua atividade biológica. (ZHANG, 2012)

2. METODOLOGIA

Nanopartículas de ouro foram sintetizadas através do método descrito por Fan e Brolo (FAN E BROLO 2009, p.7382), utilizando 10 µL de sal de ouro,

2,5 mL de citrato de sódio e 100 mL de água ultra pura (Milli-Q). Após a síntese, a solução foi concentrada utilizando uma centrífuga (Eppendorf MiniSpin) durante 30 minutos com uma rotação de 12000 rpm.

Filmes de NpAu foram depositados sobre lâminas de vidro previamente limpas com solução piranha (25% de ácido sulfúrico P.A. (Synth) e 75% de peróxido de hidrogênio (Synth), enxaguadas com água ultrapura (Milli-Q) e secas em estufa. As lâminas de 1,0 x 3,0 cm² foram submersas em uma solução de 10 mmol.L⁻¹ de 3-mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTMS) (Sigma Aldrich) em metanol, por 24 horas. Foram enxaguadas com metanol, secas com ar comprimido, novamente enxaguadas com água ultrapura, e então mergulhadas na solução concentrada de NpAu. Para obter o número de camadas desejadas (3 e 7), o filme foi submerso em solução sol-gel contendo 250 µL de ácido clorídrico 0,1 mol.L⁻¹ e 300 µL de MPTMS em 25 mL de água ultrapura. Este procedimento foi repetido até que se chegasse ao número de camadas desejado.

O estudo de sensibilidade dos filmes de NpAu foi realizado utilizando soluções de glicose 99,5% (Sigma Aldrich) com diferentes concentrações. Os índices de refração destas soluções foram determinados com um refratômetro portátil (ATAGO).

Para aplicar o biossensor desenvolvido na detecção da proteína estreptavidina, seguiu-se o procedimento descrito por De Leebeek (DE LEEBEECK et al, 2007). Todas as etapas de modificação da superfície do filme de NpAu foram acompanhadas registrando espectros de absorção UV-VIS (Perkin Elmer Lambda 25) dos filmes imersos em solução tampão fosfato com pH 7,5.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A formação das NpAu pode ser evidenciada através da banda plasmônica característica que aparece na região visível do espectro eletromagnético. Em virtude disto, espectros de absorção UV-Vis da solução coloidal de NpAu foram obtidos (Figura 1). De acordo com o resultado obtido, é possível observar uma banda de absorção em ca. 529 nm, que de acordo com a literatura (LEE, 1982), caracteriza a formação de nanopartículas esféricas de ouro. Estas evidências foram confirmadas através de imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (*Inset* – Figura 1) com 120 kV (Carl Zeiss Inc., model Libra 120, equipado com filtro ômega), onde as partículas esféricas têm diâmetro de ca. 20 nm.

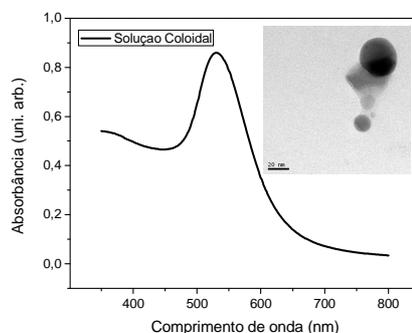


Figura 1: Espectro de absorção Uv-Vis da solução coloidal de NpAu. *Inset*: Imagem obtida por Microscopia Eletrônica de Transmissão das NpAu (120kV).

A deposição das camadas de NpAu em filme foram monitoradas através da aquisição de espectros de absorção UV-Vis (Figura 2). Este monitoramento é

importante, pois a aplicação do substrato como biossensor requer que sejam mantidas as propriedades plasmônicas. De acordo com os resultados obtidos, além de se verificar que estas propriedades foram mantidas, observou-se um aumento da intensidade da banda plasmônica conforme novas camadas foram adsorvidas e um leve deslocamento da banda de absorção para uma região com maior comprimento de onda. O aumento da intensidade da banda plasmônica sugere que um maior número de NpAu são depositadas com o aumento do número de camadas, enquanto que o deslocamento do máximo de absorção para maiores comprimentos de onda sugere que pode estar ocorrendo aglomeração das nanopartículas resultando na propagação de modos plasmônicos de menor energia. O alargamento da banda de absorção é um somatório das absorções de nanopartículas aglomeradas de diferentes tamanhos, o que gera diferentes modos de propagação do plasmon de superfície.

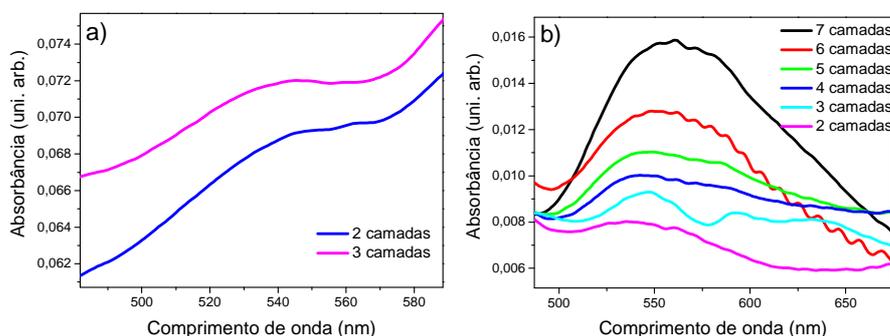


Figura 2: Espectros de absorção Uv-Vis dos filmes com 3 (a) e 7 (b) camadas de NpAu.

Para investigar qual número de camadas seria mais adequado para o desenvolvimento do biossensor, foram realizados testes de sensibilidade (Figura 3). Verifica-se que a banda plasmônica se desloca para uma região com maior comprimento de onda com o aumento da concentração de glicose. Neste estudo foram avaliadas as sensibilidades de filmes obtidos com 3 (Figura 3a) e 7 (Figura 3b) camadas de NpAu, sendo ca. 340 e 460 nm.UIR, respectivamente.

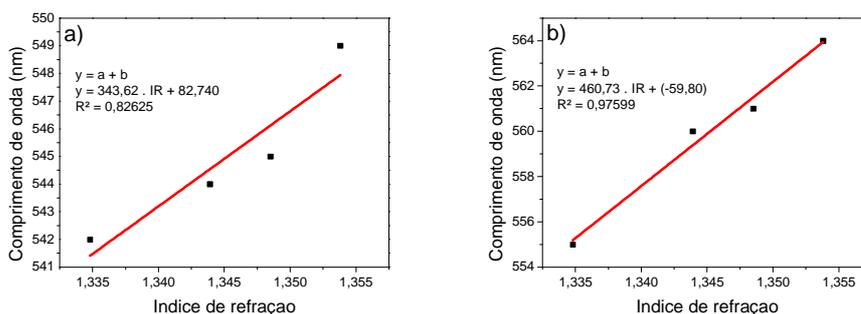


Figura 3) Deslocamento do máximo de absorção do filme de NpAu de 3 (a) e 7 (b) camadas em diferentes índices de refração.

Após a modificação da superfície do filme por cada uma das camadas de cisteamina, NHS-biotina, estreptavidina, foi registrado um espectro de absorção Uv-Vis do filme imerso em solução tampão fosfato (pH 7,5). O processo de imobilização foi detectado através do deslocamento para maiores comprimentos da banda plasmônica com relação ao filme modificado com cisteamina. Este deslocamento é observado devido a um aumento no índice de refração efetivo após a imobilização das biomoléculas (JUNG et al, 1999).

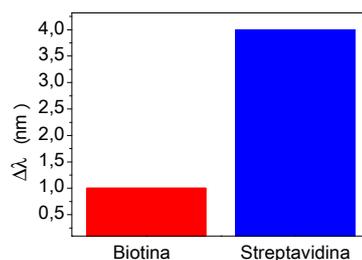


Figura 6: Espectro de absorção Uv-Vis após a modificação do filme por uma monocamada de cisteamina, NHS-biotina e estreptavidina.

4. CONCLUSÕES

Após os resultados obtidos foi possível verificar que é possível obter filmes de nanopartículas de ouro sem que haja perda das propriedades plasmônicas. Adicionalmente, verificou-se que a sensibilidade do biossensor desenvolvido é afetada pelo número de camadas de nanopartículas, sendo que o filme com 7 camadas apresentou maior sensibilidade. O biossensor desenvolvido foi aplicado de forma eficiente na detecção da biomolécula estreptavidina.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

O'SHANNESY, D. J.; BRIGHAM-BURKE, M. e PECK, K. Immobilization Chemistries Suitable for use in the BIAcore Surface Plasmon Resonance Detector. **Analytical Biochemistry**, v. 205, n. 1, p. 132-136, 1992.

MARQUES DE OLIVEIRA, R.; FERREIRA, J.; SANTOS, M. J. L.; FARIA, R. M. e OLIVEIRA, O. N. Probing the Functionalization of Gold Surfaces and Protein Adsorption by PM-IRRAS. **ChemPhysChem**, v. 12, n. 9, p. 1736-1740, 2011.

ZHANG, Y. J. Comparing the Interparticle Coupling Effect on Sensitivities of Silver and Gold Nanoparticles. **Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer**, v. 113, n. 8, p. 578-581, 2012.

DE LEEBEECK, A.; KUMAR, L. K. S.; DE LANGE, V.; SINTON, D.; GORDON, R. e BROLO, A. G. On-Chip Surface-Based Detection with Nanohole Arrays. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 11, p. 4094-4100, 2007/06/01 2007.

LEE, P. C. e MEISEL, D. Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 86, n. 17, p. 3391-3395, 1982/08/01 1982.

JUNG, L. S.; NELSON, K. E.; CAMPBELL, C. T.; STAYTON, P. S.; YEE, S. S.; PÉREZ-LUNA, V. e LÓPEZ, G. P. Surface Plasmon Resonance Measurement of Binding and Dissociation of Wild-Type and Mutant Streptavidin on Mixed Biotin-Containing Alkylthiolate Monolayers. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 54, n. 1-2, p. 137-144, 1999.

THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A. e WILSON, G. S. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, n. 1-2, p. 121-131, 2001.