

Caracterização de pontas de microscopia de força atômica por microscopia confocal à laser para aplicação em nanobiossensores.

Isabela T. S. Rossi^{1*}, Moema Hausen², Ariana S. Moraes³, Fabio L. Leite⁴.

1. Estudante de IC (Bolsista PIBIT), Grupo de Pesquisa em Nanoneurobiofísica, UFSCar; *isabela_rossi@hotmail.com

2. Pesquisador Associado, DBIO, Grupo de Pesquisa em Nanoneurobiofísica, UFSCAR, Sorocaba, São Paulo

3. Bióloga, Grupo de Pesquisa em Nanoneurobiofísica, UFSCAR, Sorocaba, São Paulo

4. Professor Adjunto, DFQM, Grupo de Pesquisa em Nanoneurobiofísica, UFSCAR, Sorocaba, São Paulo

Palavras-Chave: Microscopia Confocal, Microscopia de Força Atômica, Nanobiossensor .

Introdução

Dentre as diversas potencialidades da microscopia de força atômica (AFM), as análises de curva de força pela espectroscopia atômica de força (AFS) a partir de pontas de AFM funcionalizadas viabiliza o desenvolvimento de nanobiossensores através da detecção de moléculas-alvo. No entanto, a funcionalização pode ser modificada a partir de vários parâmetros, tais como: 1) o tipo de material que constitui o chip de prova; 2) o método de funcionalização; 3) o tipo de molécula adsorvida na superfície; 3) e o meio que envolve a superfície-alvo e a ponta. Conforme já demonstrado em nosso grupo de pesquisa [1,2,3,4], pontas de AFM detectam eficazmente moléculas a partir de diferentes métodos e moléculas-alvo. Portanto, em virtude da diversificação nestes parâmetros, a microscopia confocal a laser (MCL) é ferramenta chave que permite caracterizar precisamente as pontas funcionalizadas a partir de marcadores específicos. O laser varre a amostra de acordo com uma configuração pré-estabelecida gerando imagens de superfície além de excitar os fluoróforos em determinados comprimentos de onda que para serem identificados na amostra. Os diversos planos focais obtidos pela MCL podem ser sobrepostos formando imagens 3D e/ou identificando a co-localização de estruturas. Os trabalhos científicos que associam a microscopia confocal e AFM ainda são escassos e os poucos já publicados se apresentam muito inovadores.

Resultados e Discussão

Foram analisadas pontas funcionalizadas usadas e novas, através da marcação indireta por anticorpos. As pontas foram previamente funcionalizadas conforme ilustrado na Figura 1, no qual APTES e EDC foram agentes que viabilizaram a ligação com o anticorpo antiatrazina (1^oAc). Para afirmar se o 1^oAc encontrava-se ligado após a ponta ser utilizada (ou não), foi realizada imunomarcação tipo indireta. Após lavagem em solução de Albumina à 2% para bloqueio de sítios inespecíficos, o anticorpo secundário conjugado ao fluoróforo CF488A (2^oAc) foi ligado ao 1^oAc. O CF488A apresenta forte sinal quando excitado no comprimento de onda da faixa de 490 até 516nm, além de apresentar alta fotoestabilidade. A figura 2, apresenta pontas de AFM caracterizadas por MCL após serem submetidas a marcação com o CF488A. Segundo Ang-Li et al (2011) pontas funcionalizadas usadas apresentaram

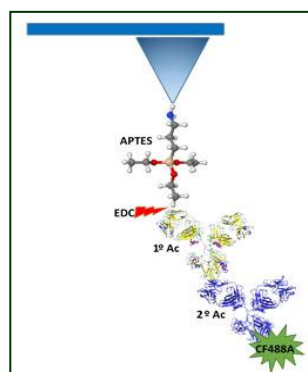


Figura1. Esquema simplificado de funcionalização seguida de marcação indireta com o fluoróforo CF488A.

desgaste e perderam a marcação ao ser analisada por MCL. Estes autores estabeleceram um limite de 400 medidas de força para as pontas funcionalizadas, pois nesta quantidade de medidas ainda há marcação. Provavelmente, o desgaste ocorre pela perda do 1^o Ac que ao se acoplar e desacoplar no substrato-alvo vem a se destacar da ponta. Conforme observado na ponta usada da Figura 2B, o qual foi utilizada em 100 medições de força, a marcação se manteve presente pela identificação do CF488A.

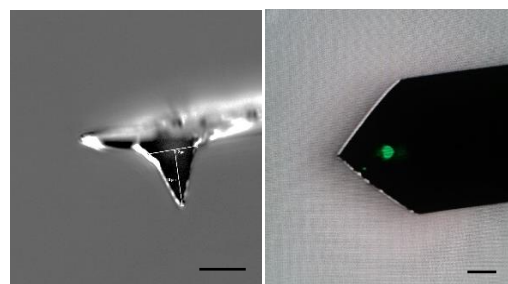


Figura 2. Imagens de microscopia confocal à laser de pontas de AFM em modo de deflexão. Em A, uma ponta (triângulo invertido) não marcada em vista lateral, com as medidas de largura (11,2µm) e altura (11,8µm). Em B, além da imagem em modo de deflexão, há sobreposição de imagem para detecção do fluoróforo CF488A (verde). O plano focal selecionado é da extremidade do vértice do triângulo de uma ponta marcada, conforme observado em A. Barras 10µm.

Conclusões

As conclusões preliminares indicam que a MCL é fundamental para corroborar o processo de funcionalização. O anticorpo anti-atrazina foi identificado na ponta pelo marcador fluorescente antes e após ser utilizada no AFM. Assim, além de avaliar um potencial desgaste das pontas, a caracterização por MCL vêm a determinar um limite, dentro de uma margem segura, para a utilização do nanobiossensor. Portanto, a caracterização por MCL abre uma vertente fundamental para assegurar a eficácia da funcionalização de pontas de AFM.

Agradecimentos

Às professoras Dra. Elaine S. Zaccarin e Dra. Monica Jones e à CAPES, CNPq e FAPESP pela concessão de bolsa e fomento.

- Garcia et al. IEEE Sensors Journal. 15(4): pp.2106–13, 2015.
- Deda et al. Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology. Formatec (2012)
- Deda et al. Materials Research, 16(3), 683 (2013).
- Steffens et al. Sensors 12, 8278 (2012).
- Ang-Li A, Lim TS, Shi H, Yin J, Tan SJ, et al. (2011) Correction: Molecular Mechanistic Insights into the Endothelial Receptor Mediated Cytoadherence of Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes.