

Funcionalização da superfície de microcantilevers utilizados em microscopia de força atômica com biomoléculas

Introdução

A capacidade dos microcantilevers, usados na microscopia de força atômica, em mudar a frequência vibracional ou sofrer deflexão devido à adsorção de moléculas sobre sua superfície, os torna excelentes transdutores que podem atuar como sensores químicos, físicos ou biológicos. Alterações na frequência vibracional desses dispositivos micromecânicos podem ser utilizadas para a medição de viscosidade, densidade e variações de fluxo de diversos sistemas. Deflexões do cantilever são causadas devido à tensão de adsorção molecular em apenas um dos seus lados, as quais podem ter sentido ascendente ou descendente, dependendo da natureza da ligação química da molécula. Nestes sistemas, a mudança de frequência do microcantilever foi reportada como proporcional a magnitude da adsorção de massa (PEI et al., 2004; SUBRAMANIAN et al., 2002; HANSEN e THUNDAT, 2005; DONG et al., 2010).

Avanços recentes no design e no desenvolvimento desses sensores proporcionam um sistema microeletromecânico simples, que pode ser facilmente fabricado, produzido em grande escala e capaz de detectar deflexões mecânicas muito pequenas. A constante de mola de um microcantilever é da ordem de 10^{-3} a 10^1 N/m, permitindo, dessa maneira, a detecção de forças muito pequenas (10^{-12} a 10^{-9} N) (THUNDAT e MAJUMDAR, 2003). Estes fatores resultam em um tempo de resposta rápido, menor custo de fabricação, construção de um arranjo de sensores com pequenas dimensões possibilitando, dessa forma, a investigação de microambientes (FAGAN et al., 2000). Microcantilevers são normalmente elaborados em silício e/ou nitreto de silício ou materiais poliméricos com dimensões de 100 a 500 micrômetros de comprimento e espessura de 0,5 a 5 micrômetros e, podem ter formato em "V" (triangular) ou em "T" (retangular), com uma agulha montada em sua extremidade livre (CARRASCOSA et al., 2006).

Sensores baseados em microcantilevers funcionalizados podem operar em dois diferentes modos fundamentais: (1) modo estático: as medidas de deflexão do cantilever são baseadas nas mudanças de tensão induzidas por interação molecular sobre a superfície do cantilever (XU et al., 2002; STEVENSON et al., 2002); modo dinâmico:

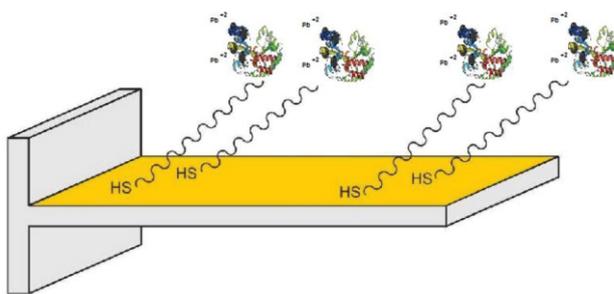
"O material adsorvido na superfície do cantilever causa um decréscimo na frequência de ressonância. A relação da massa com a frequência de ressonância é descrita na equação (1)

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

Sendo, f_0 a frequência de ressonância inicial, f_1 a frequência de ressonância após a adição da massa e o valor de n conforme o cantilever utilizado, sendo, por exemplo, 0,24 para um cantilever retangular" (WANG, 2001; LANGE et al., 2002; WANG et al., 2007).

A vibração do cantilever no modo ressonante geralmente é realizada por meio da utilização de materiais piezelétricos, como ZnO (LEE e WHITE, 1996) ou por fazer uso do efeito bilaminar, isto é, coeficientes de temperatura diferentes ou coeficientes de tensão mecânico dos materiais das camadas do cantilever (BERGER et al., 1997; HIERLEMANN et al., 2000). Essa diferença nas propriedades dos materiais que formam o cantilever dá origem a sua deflexão após o aquecimento ou a aplicação de forças mecânicas. Pulsos periódicos de aquecimento na base do cantilever podem ser utilizados para excitar termicamente o cantilever em seu modo de ressonância em 10-500 kHz (BERGER et al., 1997; HIERLEMANN et al., 2000). A detecção

Imagem: Valentin Monzane e Clarice Steffens



Autores

Alexandra Manzoli

Química, Pós Doc., Bolsista,
Embrapa Instrumentação,
Rua XV de novembro, 1452,
São Carlos, SP – Brasil.
alexandra@cnpdia.embrapa.br.

Clarice Steffens

Engenharia de Alimentos, M.Sc., Doutoranda,
Universidade Federal de São Carlos (UFSCar),
Rodovia Washington Luis, km 235
Monjolinho, 13.565-905,
São Carlos, SP – Brasil.
clarice@cnpdia.embrapa.br.

Rafaella Takehara Paschoalin

Farmácia, Mestranda,
Universidade Federal de São Carlos (UFSCar),
Rodovia Washington Luis, km 235
Monjolinho, 13.565-905,
São Carlos, SP – Brasil.
rafa_rtp@hotmail.com.

Juliano Elvis de Oliveira

Engenharia Metalúrgica e de Materiais,
M.Sc.,Doutorando,
Universidade Federal de São Carlos (UFSCar),
Rodovia Washington Luis, km 235
Monjolinho, 13.565-905,
São Carlos, SP – Brasil.
juliano@cnpdia.embrapa.br.

Luiz Henrique Capparelli Mattoso

Engenharia de Materiais, D. SC.,
Pesquisador, Embrapa Instrumentação,
Rua XV de novembro, 1452,
São Carlos, SP – Brasil.
mattoso@cnpdia.embrapa.br

Paulo Sérgio de Paula Herrmann Junior

Engenharia Elétrica, D. SC., Pesquisador,
Embrapa Instrumentação,
Rua XV de novembro, 1452,
São Carlos, SP – Brasil.
herrmann@cnpdia.embrapa.br.

Funcionalização da superfície de microcantilevers utilizados em microscopia de força atômica com biomoléculas

das mudanças de frequência pode ser feita por incorporar piezoresistores na base do cantilever (BERGER et al., 1997; HIERLEMANN et al., 2000), por medir as variações de capacitância dinâmica ou por usar detecção óptica por meio de um laser (FRITZ et al., 2000; GIMZEWSKI et al., 1994). Para que a sensibilidade ótima seja atingida em cada um dos modos é necessária a utilização de diferentes tipos de cantilevers. No método estático, para que deflexões grandes sejam alcançadas, é necessária a utilização de cantilevers com haste longa e constante de mola baixa (menores que 1 N/m), podendo ser utilizado tanto em meio gasoso como líquido. No modo dinâmico, para que frequências elevadas sejam alcançadas, faz-se necessário a utilização de cantilevers com haste curta e constante de mola grande (de 1 a 40 N/m). O modo dinâmico é mais difícil de ser utilizado em meio líquido.

Entre as diversas áreas em que os sensores de microcantilevers podem ser aplicados, devido à elevada especificidade de certas biomoléculas (anticorpos, enzimas, DNA, etc) há um grande interesse no desenvolvimento de biossensores de microcantilever. De acordo com a definição da IUPAC (MCNAUGHT e WILKINSON, 1997), um biossensor é um sensor que utiliza componentes biológicos (por exemplo, células, organelas, ou macromoléculas) e, detecta, por meio de um mecanismo de transdução, a interação desses componentes com o analito. Como transdutor entende-se o dispositivo capaz de converter sinais físicos e químicos em sinais mensuráveis, usualmente sinais eletrônicos, cuja magnitude seja proporcional à concentração da espécie ou grupamento químico.

Potenciais aplicações de biossensores incluem análises em áreas como biomédica, ambiental e agrícola (GERARD et al., 2002; DENNISON e TURNER 1995; WILSON e GIFFORD, 2005). Há uma crescente investigação do monitoramento de diversos patógenos por meio da imobilização de moléculas de DNA em matrizes poliméricas (LEONARD et al., 2003). Outras aplicações de interesse no agronegócio (GARCIA-VELASCO e MOTTRAM, 2003; ANDREESCU e MARTY, 2006) são o monitoramento de pesticidas e metais em água.

Em relação a determinação de metais pesados em água, é reportada a imobilização da enzima fosfatase alcalina em diversas matrizes para o desenvolvimento de biossensores para detecção de metais como cádmio, cobalto, zinco, níquel e chumbo em água (BEREZHETSKYY et al., 2008).

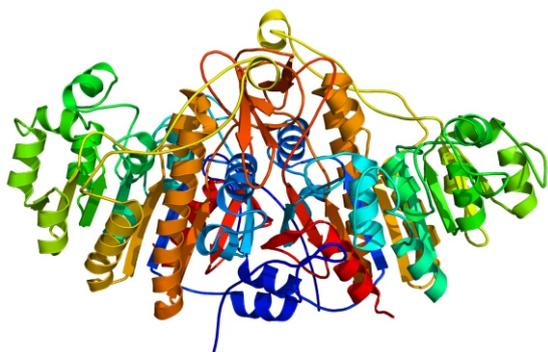
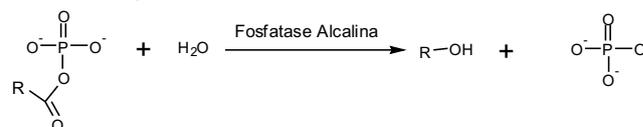


Figura 1. Diagrama de fitas de uma estrutura dimérica de uma fosfatase alcalina

*Como transdutor entende-se o dispositivo capaz de converter sinais físicos e químicos em sinais mensuráveis, usualmente sinais eletrônicos, cuja magnitude

A fosfatase alcalina compreende uma ampla classe de enzimas distribuídas em células de diversos mamíferos e bactérias (COLEMAN, 1992). A Figura 1 ilustra a conformação desta enzima em um diagrama de fitas. Cabe salientar que os grupos amino-terminais estão na cor azul claro, enquanto os grupamentos carboxi-terminais estão na cor vermelha.

Nos mamíferos as fosfatases alcalinas geralmente estão associadas com as membranas celulares, mas a sua função fisiológica exata ainda é desconhecida (FERNANDEZ e KIDNEY, 2007; COLEMAN, 1992). Apesar disso, a atividade da fosfatase alcalina é um indicador bioquímico muito útil para doenças hepáticas, como, por exemplo, doenças colestáticas (FERNANDEZ e KIDNEY, 2007). Já a fosfatase alcalina (EC 3.1.3.1) de *Escherichia coli* é uma das hidrolases mais estudadas (STEC et al., 2000) dentre os catalisadores de íons metálicos, portanto representa um sistema extremamente atraente para o estudo dos mecanismos de catálise em centros bimetálicos. Encontra-se na literatura (O'BRIEN e HERSCHLAG, 2002) um grande volume de dados cinéticos e físico-químicos que permite afirmar que a interação da enzima fosfatase alcalina com cátions metálicos ocorre em um mecanismo de reação em duas etapas, com formação de fosfoserina como intermediário e um álcool e um fosfato inorgânico como produtos de final de reação (Esquema 1).



Esquema 1. Hidrólise de um alquil fosfato pela ação da enzima fosfatase alcalina.

Os biossensores micromecânicos apresentam, em relação aos demais métodos de transdução, alta sensibilidade, baixo custo, procedimento simples, necessidade de utilização de baixas concentrações de analito e resposta rápida (HANSEN e THUNDAT, 2005). Desta forma, pode-se afirmar que um biossensor micromecânico combina a especificidade e seletividade dos sistemas biológicos a uma medida direta da interação entre a biomolécula e seu substrato. Devido a estes fatos os biossensores micromecânicos tem a função de detectar e analisar de forma qualitativa e/ou quantitativa uma dada espécie química em tempo real e de forma contínua num meio de interesse.

Embora o campo de biossensores micromecânicos esteja crescendo rapidamente, um dos desafios-chave é a integração entre os componentes biológicos e não biológicos (superfícies microfabricadas). Esta etapa é crítica, uma vez que os componentes biológicos podem perder a funcionalidade natural quando imobilizados sobre as superfícies microfabricadas. A hibridização de DNA (HANSEN et al., 2001) e o reconhecimento específico antígeno-anticorpo (GROGAN et al., 2002) são alguns exemplos de aplicação dos biossensores baseados em microcantilevers.

Objetivos

Este trabalho propõe a deposição de biomoléculas sobre a superfície de cantilever e, a avaliação de suas características vibracionais.

Materiais e Métodos

Na Figura 2 estão representadas as características do microcantilever e as etapas de construção do dispositivo de biossensoriamento.

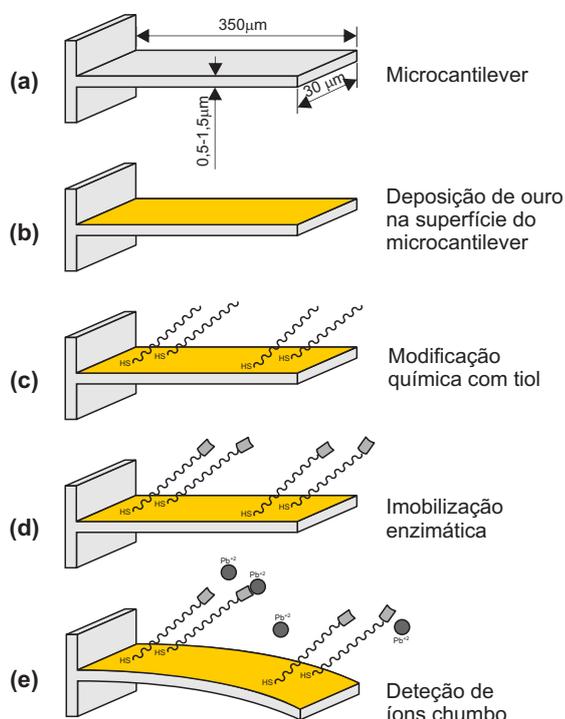


Figura 2. (a) características do microcantilever e (b, c, d, e) etapas de construção do dispositivo de biossensoriamento.

Na Figura 2 (a) estão apresentadas as características do microcantilever utilizado: microhaste de silício adquirido da NT-MDT com as seguintes especificações, constante de mola (K) de 0,063-0,13 N/m e frequência de ressonância (f_{res}) de 4-17 (13) kHz. As etapas de construção do dispositivo de biossensoriamento sobre o microcantilever estão descritas na Figura 2 b – e:

Figura 2 (b): deposição de 20 nm de ouro sobre a superfície do microcantilever por meio da técnica de "Sputtering".

Figura 2 (c): adição por gotejamento de 5 μ L (2,5 mmol) de ácido 16-mercaptohexadecanóico (Sigma) sobre a superfície do ouro.

Figura 2 (d): imobilização por gotejamento de 10 μ L (5 mg para 1 mL de solução) da enzima fosfatase alcalina 10 U/mg (Sigma) em tampão fosfato pH=7,0 sobre a superfície do ouro modificada com tiol.

Figura 2 (e): detecção de íons chumbo. Foi adicionado por gotejamento 10 L (10 ppm) de $PbCl_2$ (MERCK) sobre a superfície da enzima.

A medição da frequência de ressonância do microcantilever e a imagem em 3D em todas as etapas de construção do dispositivo de biossensoriamento foram realizadas em um microscópio de força atômica Dimension V (Veeco) e, as imagens em 2D foram realizadas em um microscópio de varredura por emissão de campo (MEV-FEG) (Philips, XL30 FE-SEM).

Resultados e Discussão

Verifica-se na Figura 3 que o ponto isoelétrico para as soluções empregadas na imobilização da fosfatase alcalina está em 3,5. Isto indica que no pH da imobilização há predominância de grupos carboxílicos protonados. Assim, pode-se afirmar que a enzima foi imobilizada na superfície do cantilever por meio da interação do grupo carboxílico presente no tiol e os poucos grupos amina que se encontravam protonados.

Este fato é um indicativo de que a enzima foi fracamente imobilizada na superfície do ouro, o que permitiu uma maior mobilidade desta hidrolase na matriz de imobilização.

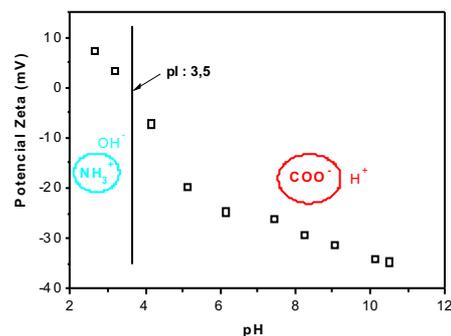


Figura 3. Influência do pH no potencial zeta da solução de fosfatase alcalina.

Na Figura 4, que relaciona a média das frequências de ressonância de cada etapa, observa-se um decréscimo gradual da frequência de ressonância com as deposições sobre o microcantilever. Este decréscimo da frequência pode ser relacionado com a massa (m) e a constante de mola (K) do cantilever por meio da equação (2):

$$f_{res} = \frac{0,32\sqrt{k}}{\sqrt{m}} \quad (2)$$

Sendo a constante de mola de 0,11 N/m, a massa adicionada em cada uma das etapas sobre a superfície do microcantilever foi calculada por meio da equação (2). A Tabela 1 contém as frequências de cada uma das etapas de construção do dispositivo, a massa calculada por meio da equação (2) e, a densidade superficial considerando 10500 m^2 como a área de deposição sobre o cantilever. A temperatura foi monitorada durante todo o experimento (25 \pm 1 $^{\circ}$ C).

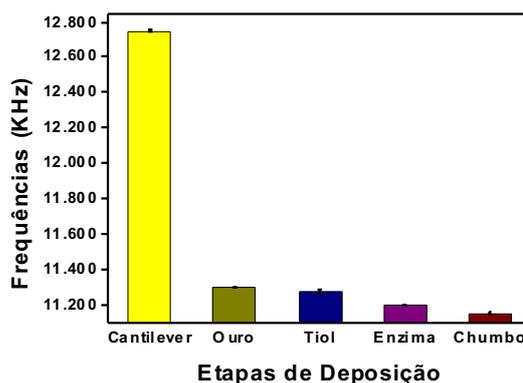


Figura 4. Frequências de ressonância do microcantilever nas diferentes etapas de construção do dispositivo de biossensoriamento (média de três medições).

Funcionalização da superfície de microcantilevers utilizados em microscopia de força atômica com biomoléculas

Tabela 1. Valores de frequência, K_{loaded} e densidade superficial para as etapas de construção do dispositivo de biossensoriamento.

Etapas de construção do dispositivo de biossensoriamento	Frequência (Hz)	K_{loaded} (N/m)	Densidade superficial ($\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$)
Microcantilever sem deposição	12,7461	0,11	6,6
Au	11,2952	0,11142	1,9
Tiol	11,2721	0,08728	0,1
Enzima	11,1998	0,08616	0,1
Pb^{+2}	11,1534	0,08545	0,1

Obs: A constante de mola com carga (K_{loaded}) foi calculada utilizando a seguinte equação

$$K_{loaded} = \left(\left(\frac{f_n - f_{0n}}{f_{0n}} \right) + 1 \right)^2 * (k_0 * \left(1 + \frac{m_a}{m_c} \right))$$

A superfície do microcantilever em todas as etapas de construção foi caracterizada com as técnicas de AFM, Figura 5 e MEV-FEG, Figura 6. A Tabela 2 contém as rugosidades das etapas de construção do dispositivo de biossensoriamento obtidas com a utilização do *software* de análise de dados Gwydion[®] 2.1.

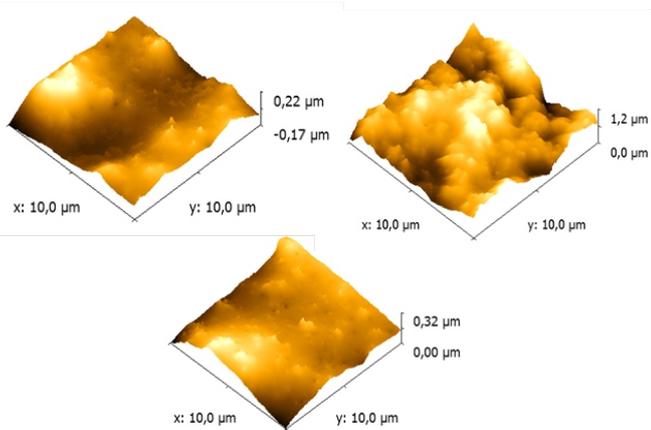


Figura 5. Imagens em 3D obtidas por AFM da superfície do microcantilever com deposição: (a) tiol, (b) enzima alcalina fosfatase e Pb^{+2} .

Observa-se na Tabela 2 um aumento da rugosidade com a imobilização da enzima sobre a superfície do ouro modificado com tiol e, uma diminuição acentuada da mesma com a ligação dos metais divalentes (Pb^{+2}) na enzima. Isto é um indicativo de que a enzima se liga fracamente ao ouro, mudando um pouco a sua conformação, facilitando a formação de estruturas globulares. A ligação do metal divalente na proteína torna a superfície mais lisa. Essas diferenças na rugosidade das superfícies com o tiol, com a enzima e com a ligação do Pb^{+2} podem ser visualizadas na Figura 5, que contém as imagens em 3D obtidas por AFM e na Figura 6, que contém as imagens em 2D obtidas por MEV-FEG.

Tabela 2. Rugosidade dos filmes depositados sobre o microcantilever em todas as etapas de construção do biossensor.

Etapas de construção do biossensor	Ra (nm)	Rms (nm)
Tiol	80,8	101
Enzima	194	240
Pb^{+2}	34,0	44,6

Após a etapa de exposição a uma solução contendo íons chumbo (teste de reversibilidade), o sensor foi exposto a uma solução de tampão fosfato pH 7,0, utilizada com a finalidade de retirar os íons chumbo da superfície. Em seguida, o biossensor foi exposto novamente a mesma solução de íons chumbo. A frequência de ressonância foi medida e, também uma imagem 2D da superfície do microcantilever foi obtida por MEV-FEG., tanto após a passagem do tampão como após a re-exposição a solução de íons chumbo. Foram obtidas frequências de ressonância tanto para o cantilever com a enzima como com os íons chumbo próximas às frequências obtidas na montagem (erro de 0,01) e, imagens 2D semelhantes. Os resultados indicam que o dispositivo de biossensoriamento foi corretamente construído, pois manteve a enzima imobilizada na sua superfície.

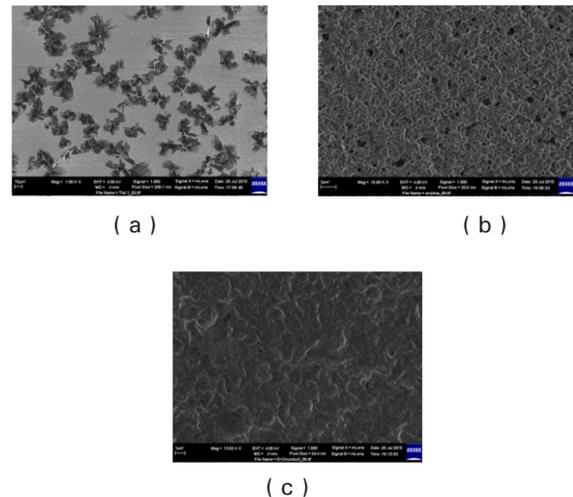


Figura 6. Imagem 2D das superfícies (a) do ouro com tiol, (b) com a enzima e (c) com os íons Pb^{+2} ligados, obtidas com MEV-FEG.

Conclusão

Os resultados demonstraram que foi possível funcionalizar o microcantilever com a biomolécula, no caso, a enzima fosfatase alcalina. Por meio do teste de reversibilidade pôde-se concluir que a enzima manteve-se imobilizada no decorrer das diversas medições. Este fato é um indicativo de que há possibilidade de que esse dispositivo de biossensoriamento possa ser utilizado em sistemas para a determinação de metais pesados.

Agradecimentos

Projeto INCT Namitec (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Sistemas Micro e

Nanoeletrônicos), área: dispositivos semicondutores, processo nº: 573738/2008-4; Projeto IBAS e Universal, processo nº:490807/2007-0; Rede agro-nanotecnologia; Projetos MP1 e MP3.

Referências

ANDREESCU, S.; MARTY, J.-L. Twenty years research in cholinesterase biosensors: From basic research to practical applications. **Biomolecular Engineering**, New York, v. 23, n. 1, p. 1-15, 2006.

BEREZHETSKYY, A. L.; SOSOVSK, O. F.; DURRIEU, C.; CHOVELON, J.-M.; DZYADEVYCH, S. V.; TRAN-MINH, C. Alkaline phosphatase conductometric biosensor for heavy-metal, ions determination, **IRBM**, [S. l.], v. 29, n. 2-3, p. 136-140, 2008.

BERGER, R.; DELAMARCHE, E.; LANG, H. P.; GERBER, C.; GIMZEWSKI, J. K.; Meyer, E.; GU"NTHERODT, H. J. Surface stress in the self-assembly of alkanethiols on gold. **Science**, [S. l.], v. 276, n. 5321, p. 2021-2024, 1997.

CARRASCOSA, L. G.; MORENO, M.; ALVAREZ, M.; LECHUGA, L. M. Nanomechanical biosensors: a new sensing tool. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 25, n. 3, p. 196-206, 2006.

COLEMAN, J. E. Structure and mechanism of alkaline phosphatase. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, Palo Alto, v. 21, p. 441-483, 1992.

DENNISON M. J.; TURNER, A. P. F. Biosensors for Environmental Monitoring. **Biotechnology Advances**, New York, v. 13, n. 1, p. 1-12, 1995.

DONG, Y.; WEI, G.; ZHOU, Q.; ZHENG, Y.; YOU, Z. Characterization of the gas sensors based on polymer-coated resonant microcantilevers for the detection of volatile organic compounds. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 671, p. 85-91, 2010.

FERNANDEZ, N. J.; KIDNEY, B. A. Alkaline phosphatase: beyond the liver. **Veterinary clinical pathology**, Santa Barbara, v. 36, n. 3, p. 223-233, 2007.

FRITZ, J.; BALLER, M. K.; LANG, H. P.; ROTHUIZEN, H.; VETTIGER, P.; MEYER E.; GU"NTHERODT, H. J.; GERBER, C. H.; GIMZEWSKI, J. K. Translating biomolecular recognition into nanomechanics. **Science**, [S. l.], v. 288, n. 5464, p. 316-318, 2000.

GARCIA-VELASCO, M. N.; MOTTRAM, T. Biosensor technology addressing agricultural problems. **Biosystems Engineering**, London, v. 84, n. 1, p. 1-12, 2003.

GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Application of conducting polymers to biosensors. **Biosensors & Bioelectronics**, Essex, v. 17, n. 5, p. 345-359, 2002.

GIMZEWSKI, J. K.; GERBER, C.; MEYER, E.; SCHLITTLER, E. E. Observation of a chemical-reaction using a micromechanical sensor. **Chemical Physics Letters**, Amsterdam, v. 217, n. 5-6, p. 589-594, 1994.

GROGAN, C.; RAITERI, R.; O'CONNOR, G. M.; GLYNN, T. J.; CUNNINGHAM, V.; KANE, M.; CHARLTON, M.; LEECH, D. Characterisation of an antibody coated microcantilever as a potential immuno-based biosensor. **Biosensors & Bioelectronics**, Essex, v. 17, n. 3, p. 201-207, 2002.

HANSEN, K. M.; JI, H.-F.; WU, G.; DATAR, R.; COTE, R.; MAJUMDAR, A.; THUNDAT, T. Cantilever-based optical deflection assay for discrimination of DNA single-nucleotide mismatches. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 73, n. 7, p. 1567-1571, 2001.

HANSEN, K. M.; THUNDAT, T. Microcantilever biosensors. **Methods**, [S. l.], v. 37, p. 57-64, 2005.

HIERLEMANN, A.; LANGE, D.; HAGLEITNER, C.; KERNESS, N.; KOLL, A.; BRAND O.; BALTES, H. Application-specific sensor systems based on CMOS chemical microsensors. **Sensors and Actuators. B. Chemical**, Lausanne, v. 70, n. 1-2, p. 2-11, 2000.

LANGE, D.; HAGLEITNER, C.; HIERLEMANN, A.; BRAND, O.; BALTES, H. Complementary metal oxide semiconductor cantilever arrays on a single chip: mass-sensitive detection of volatile organic compounds. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 74, n. 13, p. 3084-3095, 2002.

LEE, S. S.; WHITE, R. M. Self-Excited Piezoelectric Cantilever Oscillators. **Sensors and Actuators A-Physical**, Lausanne, v. 52, n. 1-3, p. 41-45, 1996.

LEONARD, P.; HEARTY, S.; BRENNAN, J.; DUNNE, L.; QUINN, J.; CHAKRABORTY, T.; O'KENNEDY, R. Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, n. 1, p. 3-13, 2003.

MCNAUGHT, A. D.; WILKINSON, A. **IUPAC Compendium of Chemical Terminology**. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 1997.

O'BRIEN, P. J.; HERSCHLAG, D. Alkaline Phosphatase Revisited: Hydrolysis of Alkyl Phosphates. **Biochemistry**, Easton, v. 41, n. 9, p. 3207-3225, 2002.

PEI, J.; FANG TIAN, F.; THUNDAT, T. Glucose Biosensor Based on the Microcantilever. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 76, p. 292-297, 2004.

STEC, B.; HOLTZ, K. M.; KANTROWITZ, E. R. A Revised Mechanism for the Alkaline Phosphatase Reaction Involving Three Metal Ions. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 23, n. 5, p. 1303-1311, 2000.

STEVENSON, K. A.; MEHTA, A.; SACHENKO, P.; HANSEN, K. M.; THUNDAT, T. Nanomechanical effect of enzymatic manipulation of DNA on microcantilever surfaces. **Langmuir**, Washington, v. 18, n. 23, p. 8732-8736, 2002.

SUBRAMANIAN, A.; ODEN, P. I.; KENNEL, S. J.; JACOBSON, K. B.; WARMACK, R. J.; THUNDAT, T.; DOKTYCZA, M. J. Glucose Biosensing Using an Enzyme-Coated Microcantilever. **Applied Physics Letters**, New York, v. 81, n. 2, p. 385-387, 2002.

Funcionalização da superfície de microcantilevers utilizados em microscopia de força atômica com biomoléculas

THUNDAT, T.; MAJUMDAR, A. (Ed.). **Sensors and Sensing in Biology and Engineering**. New York: Springer-Verlag, 2003. 399 p.

WANG, J. On-Demand Electrochemical Release of Nucleic Acids. **Electroanalysis**, New York, v. 13, n. 8-9, p. 635-638, 2001.

WANG, C.; WANG D.; MAO, Y; HU, X. Ultrasensitive biochemical sensor based on microcantilevers of atomic force microscope. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 363, p. 1-11, 2007.

WILSON, G. S.; GIFFORD, R. Biosensors for real-time in vivo measurements. **Biosensors & Bioelectronics**, Essex, v. 20, n. 12, p. 2388-2403, 2005.

XU, X. H.; THUNDAT, T. G.; BROWN, G. M.; JI, H. Detection of Hg²⁺ using microcantilever sensors. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 74, n. 15, p. 3611-3615, 2002.

Circular Técnica, 53

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Instrumentação
Rua XV de Novembro, 1452 - Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: 16 2107 2800 - **Fax:** 16 2107 2902
e-mail: sac@cnpdia.embrapa.br
<http://www.cnpdia.embrapa.br>

1a. edição

1a. impressão 2009: tiragem 300

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Comitê de Publicações

Presidente: *João de Mendonça Naimé*
Membros: *Débora Marcondes Bastos Pereira Milori,*
Sandra Protter Gouvea
Washington Luiz de Barros Melo
Valéria de Fátima Cardoso

Membro Suplente: *Dr. Paulo S. P. Herrmann Junior*

Expediente

Supervisor editorial: *Dr. Victor Bertucci Neto*
Normalização bibliográfica: *Valéria de Fátima Cardoso*
Tratamento das ilustrações: *Valentim Monzane*
Editoração eletrônica: *Camila Fernanda Borges*