



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS DE PAMAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO PROFISSIONAL EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE

GILSON TAVARES DE LIMA

**CONSTRUÇÃO DE UMA MICROBALANÇA DE CRISTAL DE
QUARTZO PROTOTIFICADA PARA ANÁLISE BIOATIVA E
GRAVIMÉTRICA**

Palmas/TO
2020

GILSON TAVARES DE LIMA

**CONSTRUÇÃO DE UMA MICROBALANÇA DE CRISTAL DE
QUARTZO PROTOTIFICADA PARA ANÁLISE BIOATIVA E
GRAVIMÉTRICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Foi avaliada para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde e aprovada em sua forma final pelo orientador e pela Banca Examinadora.

Orientadora: Doutora Poliana Guerino

Palmas/TO
2020

<https://sistemas.uft.edu.br/ficha/>

FOLHA DE APROVAÇÃO

GILSON TAVARES DE LIMA

CONSTRUÇÃO DE UMA MICROBALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO PROTOTIFICADA PARA ANÁLISE BIOTIVA E GRAVIMÉTRICA

Dissertação apresentada ao Mestrado
Profissional em Ciências da Saúde da
Universidade Federal do Tocantins para a
obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Poliana Guerino Marson

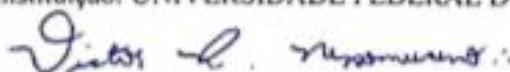
Aprovada em: 02 / 03 / 2020

BANCA EXAMINADORA



Dra. Poliana Guerino Marson
Orientadora

Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS



Dr. Victor Rodrigues Nepomuceno
Examinador Interno
Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS



Dra. Raquel de Oliveira Vilhena
Examinador Externo
Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA- UFPR

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

L732c Lima, Gilson Tavares de .

CONSTRUÇÃO DE UMA MICROBALANÇA DE CRISTAL DE
QUARTZO PRÓTOTIFICADA PARA ANÁLISE BIOATIVA E
GRAVIMÉTRICA. / Gilson Tavares de Lima. – Palmas, TO, 2020.

71 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins
– Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em
Ciências da Saúde, 2020.

Orientador: Poliana Guerino Marson

1. Ensino. 2. Ciências da Saúde. 3. Biotecnologia. 4. Protótipo. I. Título

CDD 610

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

*Dedico este trabalho à minha mãe Dona
Luíza, a minha segunda mãe, Mãe Chaga e
Meu pai, Pai Santana, a todos meus
professores até aqui. E a minha família Geane
e João*

I think and think for months and years. Ninety-nine times, the conclusion is false. The hundredth time I am right.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Este trabalho só existe porque pessoas dedicadas e bem intencionadas se comprometeram juntamente comigo para sua execução, em vários momentos, e de vários modos então não farei lista de nomes, mas a agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para esse trabalho.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um protótipo de Microbalança de Cristal de Quartzo – MCQ de baixo custo, útil como ferramenta de ensino, capaz de realizar análises micro gravimétricas e detectar interação de moléculas bioativas. O uso de equipamentos de análise biomoleculares não marcados não é comum no ensino de ciências biomédicas, biotecnologia e outras áreas, uma vez que estes equipamentos são de alto custo e com características industriais ou comerciais que excedem as características necessárias para o ensino. Foi foco deste trabalho a pesquisa de componentes eletromecânicos de baixo custo mas que resultasse em um equipamento que tivesse reprodutibilidade de resultados. A ANOVA demonstrou que o equipamento respondeu adequadamente a padrões gravimétricos pré-estabelecidos produzindo um modelo de regressão satisfatório, $[F(1, 16) = 382.487, p < 0,001; R^2 = 0,959]$. Em comparação com o custo de um equipamento comercial, o modelo proposto teve custo 28 vezes inferior. Já para as análises biomoleculares o protótipo foi capaz de identificar a interação antígeno anticorpo em tempo real bem como o momento em que o complexo antígeno-anticorpo foi desfeito. O equipamento foi projetado para ser construído utilizando-se materiais comuns em eletrônica e com uma linguagem computacional simples. Os resultados dos testes de desempenho e das características fundamentais foram exitosos, mostrando aplicabilidade adequada da MCQ como instrumento de ensino ou mesmo pesquisa básica.

Palavras-chaves: Microbalança de Cristal de Quartzo. Construção de Protótipo. Ferramentas de Ensino

ABSTRACT

The objective of this work was to develop a low-cost prototype of a Quartz Crystal Microbalance - MCQ, useful as a teaching tool, capable of performing micro gravimetric and interaction analysis between bioactive molecules. The use of unmarked biomolecular analysis equipment is not common in the teaching of biomedical sciences, biotechnology and other areas, since such equipment is expensive and has industrial or commercial characteristics that sometimes exceed those necessary for teaching. The focus of this work was the research of low-cost electromechanical components, but which resulted in an equipment that had reproducible results. ANOVA demonstrates that the equipment responded adequately to pre-produced gravimetric patterns, producing a satisfactory regression model, [F (1, 16) = 382.487, p <0.001; R² = 0.959]. In comparison with the cost of commercial equipment, the model developed had a cost 28 times lower. For biomolecular analyzes or a prototype capable of identifying the antigen-antibody interaction in real time, as well as at the time when the antigen-antibody complex was undone. The equipment was designed to be built using common electronic materials and with a simple computational language. The results of the performance tests and the fundamental characteristics were successful, showing the appropriate applicability of the MCQ as a teaching tool or even basic research.

Key-words: Quartz Crystal Microbalance. Prototype construction. Teaching Tool

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Orientação cristalográfica do corte-AT	24
Figura 2 - Mudança da frequência de oscilação com associação e desassociação de massa ...	26
Figura 3 - Configuração operacional típica da MCQ	28
Figura 4 - Vedação de sensor MCQ pelas extremidades.....	28
Figura 5 - Anticorpos com orientação aleatória	32
Figura 6 - Estrutura principal das imunoglobulinas humanas	34
Figura 7 - Representação de uma SAM sobre um substrato.....	35
Figura 8- Microcontrolador Arduíno.....	39
Figura 9 - Conexões elétricas, portas de entradas e saídas de dados.....	40
Figura 10 - Circuito do oscilador Pierce.....	41
Figura 11 - <i>Screenshot</i> Arduíno IDE.....	42
Figura 12 - GUI (<i>Graphic Unit Interface</i>) interface gráfica do usuário OpenQCM®	43
Figura 13 - Cristais osciladores de quartzo	44
Figura 14 - Placas de acrílico utilizadas no projeto.....	45
Figura 15 - Estrutura de proteção dos componentes eletrônicos	46
Figura 16 - Câmara de reação.....	46
Figura 17 - Processo de montagem da câmara de reação	47
Figura 18 - Câmara de reação tipo fechada parcialmente montada.....	47
Figura 19 - Visão geral da MCQ	48
Figura 20 - Fotografia da MCQ.....	49
Figura 21 - Fotografia da MCQ completamente montada.....	49
Figura 22 – Gráfico da variação de frequência na mudança de interface ar-água para confirmação da equação de Kanazawa – Gordon.....	53
Figura 23 – Gráfico da variação de frequência da MCQ causado por injeções sucessivas de água e sacarose em diferentes concentrações 7,5, 15 e 30 % p/v.....	54
Figura 24 – Gráfico do ajuste linear da concentração de glicose e variação da frequência	56
Figura 25 - Processo de imobilização orientada de anticorpos	58
Figura 26 - Resposta analítica e regenerativa do imunossensor.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estratificação dos custos de montagem de uma unidade da MCQ.....	50
Tabela 2 - Variação de frequência medida nas diferentes concentrações de sacarose	54
Tabela 3 - Frequências estáveis de diferentes concentrações de solução de glicose.....	55
Tabela 4 – Análise de Covariância – ANOVA	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MEMS	Micro electromechanical Systems
μ TAS	Micro Total Analysis
PBL	Problem Based Learning
MCQ	Microbalanço de Cristal de Quartzo
DDP	Diferença de Potencial
MCQ-D	Microbalanço de Cristal de Quartzo com Dissipação
MEMQ	Sistema Micro Eletromecânico De Quartzo
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgD	Imunoglobulina D
GLU	Glutaraldeído
mAb	monoclonal Antibodies
IFTO	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Tocantins
UFT- EMVZ	Universidade Federal do Tocantins – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia
CA	Corrente alternada
CC	Corrente contínua
RPS	Ressonância Plasmônica De Superfície
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
ELISA	Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay
β HCG	β Human Chorionic Gonadotropin
Fab	Fragment antigen binding
Fc	Fragment crystallizable
SAM	SELF ASSEMBLED MONOLAYER
NHS	N-hydroxysuccinimide
EDC	(3-Dimethylaminopropyl)-N'- ethylcarbodiimide hydrochloride
TCEP	Tris(2 -carboxyethyl)phosphine hydrochloride
UV	Ultravioleta
APTES	3-aminopropyltri ethoxysilane
AFM	Atomic Force Microscopy
USB	Universal Serial Bus
PWM	Pulse Width Modulation
ICSP	In Circuit Serial Programming
GND	Graduated Neutral Density filter
SRAM	Static Random Access Memory
EEPROM	Electrically Erasable Programmable Read Only Memory
CI	Circuito integrado
IDE	Integrated Development Environment
GPL	General Public License

LGPL	Lesser General Public License
GUI	Graphic Unit interface
ASCII	American Standard Code for Information Interchange
ANOVA	Análise de Covariância
PBS	Phosphate Buffered Saline
BSA	Bovine Serum Albumin

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	Micrograma
pg	Picogramas
ng	Nanograma
mL	Mililitro
p/v	peso/volume
ppm	parte por milhão
M	Mol
NP's	Nanopartículas
AuNP's	Nanopartículas de ouro
Δf	Varição de frequência
ΔD	Varição de Dissipação
Δm	Varição de Massa
cm^2	Centímetro Quadrado
kDa	kilo Daltons
Au	Ouro
Hz	Hertz
MHz	Mega Hertz
kHz	Kilohertz
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
n	Número de Sobretons
pH	potencial Hidrogeniônico
C++	Linguagem de programação
mA	Mili ampére
KB	Kilobits
V	Volt
f_0	Frequência de vibração nominal do cristal seco
ηL	Viscosidade absoluta do cristal de quartzo
ρL	Densidade do líquido
μQ	Módulo de cisalhamento do cristal de quartzo
ρQ	Densidade do cristal de quartzo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Objetivos.....	21
1.1.1 Objetivo Geral.....	21
1.1.2 Objetivos Específicos.....	21
2 METODOLOGIA.....	21
2.1 Local.....	22
2.2 Tipo de pesquisa	22
2.3 Coleta de dados	22
2.4 Análise dos dados.....	23
2.5 Procedimentos metodológicos	23
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
3.1 Cristais de quartzo	24
3.2 Equação de sauerbrey	25
3.3 Microbalança de cristal de quartzo com dissipação – MCQ-D.....	26
3.4 Método operacional típico da mcq.....	27
3.5 Microssensores imunológicos mcq	29
3.6 Orientação de imunoglobulinas	32
3.6.1 Imunoglobulinas Humanas	33
3.7 Monocamadas auto-organizadas - <i>Self-Assembled Monolayer</i> (SAM).....	34
3.8 Alvos de ligação covalente.....	35
3.9 Grupos carboidratos	36
3.10 Grupos amina a carboxila	36
3.11 Grupos Tiol	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Construção da Microbalança de Cristal de Quartzo	38
4.1.1 Microcontrolador Arduíno	38
4.1.2 Freqüncímetro oscilador de Pierce.....	40
4.1.3 Softwares utilizados	41
4.1.4 Cristal oscilador de Quartzo	44
4.1.5 Estrutura de proteção dos componentes eletrônicos.....	45
4.1.6 Câmara de reação.....	46

4.1.7	Operação da MCQ	47
4.1.8	Análise de custo da construção da MCQ	50
4.1.9	Estudo da capacidade de análise em meio líquido	51
4.1.10	Estudo da capacidade de análise gravimétrica em meio líquido	53
4.1.11	Elaboração de imunossensores tipo Au-Cisteamina-GLU-mAb-IgG	56
4.1.12	Análise da capacidade de reconhecimento de antígenos meio líquido.....	58
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

Há uma tendência mundial para o desenvolvimento de equipamentos analíticos chamados de “equipamentos verdes”.(QIAN; ZHAI; MENG, 2019) Tem como característica baixo impacto ambiental, tanto no seu processo produtivo quanto no seu uso, eficiência energética, baixa toxicidade de reagentes são características necessárias neste tipo de desenvolvimento. Estas técnicas são conhecidas como Tecnologias Limpas.(SCHMIDT; HUENTELER, 2016) Outra forte tendência nas últimas décadas é a miniaturização de dispositivos analíticos, principalmente nas áreas de Mecatrônica e Engenharia Química. O aperfeiçoamento dessas áreas, fortemente influenciado pelos avanços da área de microeletrônica, permitiu o surgimento dos MEMS (*Micro-electromechanical Systems –* Microsistemas Eletromecânicos) onde sistemas mecânicos e sistemas eletrônicos foram integrados.(LYSHEVSKI, 2018)

A área de química teve uma grande evolução, onde a miniaturização permite a obtenção ou manipulação de amostras em volume muito pequeno, tanto na fase pré quanto na analítica. Nesta última, os Microsistema de Análise Total (μ TAS – *Micro Total Analysis System*) são fortemente aplicados por se tratar de sistemas miniaturizados, permitem análises em tempo curto, utilizando poucos recursos e volumes muito pequenos, da ordem de microlitros.(STEVEN et al., 2018) Tanto o MEMS quanto o μ TAS estão intimamente ligados ao desenvolvimento de novas tecnologias possíveis para o ensino de ciências, química e engenharia e suas ramificações (PATABADIGE et al., 2016; STEVEN et al., 2018).

As técnicas de ensino têm focado seus esforços na prática do uso do conhecimento, com o uso de abordagens direcionadas para a resolução de problemas do que no simples uso da informação. Estas abordagens são definidas como Ensino Baseado na Resolução de Problemas (PBL – *Problem Based Learning*).(SILVA, W. R. S. da; SOUZA; RODRIGUES-MOURA, 2019) Estas técnicas de ensino são mais adequadas para acompanhar a rapidez do desenvolvimento tecnológico que exige inclusive uma rápida adaptação do processo de ensino-aprendizagem. Um outro ponto a ser considerado é em relação à capacidade e usos didáticos dos instrumentos, é que estes equipamentos não excedam muito o exigido na aplicação a qual estão destinados.(SHONNARD et al., 2003) Este conceito é de difícil aplicação no ensino, uma vez que a exigência neste nível é geralmente menor que aquela capaz de ser fornecida pelos equipamentos comerciais. Assim, MEMS e μ TAS apresentam boas características, como baixo uso de reagentes, energia e custo competitivo, que podem fornecer novas perspectivas ao ensino.(LYSHEVSKI, 2018; STEVEN et al., 2018)

A evolução tecnológica demandado o ensino de vários fenômenos físico-químicos normalmente pouco explorados didaticamente, como é o caso dos fenômenos de superfície de eletrodos funcionalizados. Botteon (2007) propôs um método para estudo de membranas utilizando equipamentos não destinados para este fim específico.(BOTTEON et al., 2007) Santos (2008) propôs um sistema microeletrônico capaz de realizar análises em vários eletrodos de filmes finos.(SANTOS, L. C. et al., 2008) Microssistemas eletrônicos também foram desenvolvidos para uso no ensino e aplicados no ensino de biociências e engenharia.(STEVEN et al., 2018)

Seguindo os conceitos de baixo custo, miniaturização e tecnologia limpa a Microbalança de Cristal de Quartzo (MCQ) se apresenta como uma boa alternativa para o desenvolvimento de material de ensino e com possibilidade de uso também em pesquisa básica. A MCQ é um instrumento de análise gravimétrica extremamente sensível que pode medir as alterações de massa nas escalas de micrograma (μg) e nanograma (ng) por unidade de área, normalmente milímetro quadrado (mm^2). Todas essas medidas e as reações que as precedem ocorrem em um disco de cristal de quartzo funcionalizado, sendo este o cerne da tecnologia. (POHANKA, 2018a)

O quartzo é um material piezoelétrico – materiais que respondem a deformação física produzindo diferença de potencial elétrico (DDP) ou o contrário - que pode, de acordo com a tecnologia de produção oscilar em uma frequência definida. (HUSSAIN et al., 2018) A frequência de oscilação definida no processo produtivo pode ser alterada pela adição ou remoção de pequenas quantidades de massa na superfície do eletrodo, geralmente de metal. Essa variação na frequência (Δf) pode ser medida com hardware e software adequados e em tempo real, para obter informações úteis sobre interações ou reações moleculares que ocorrem na superfície do eletrodo ou diretamente do cristal, como crescimento de filme, oxidação, corrosão, interação antígeno anticorpo etc. Por mais de 60 anos, a MCQ tem sido usada sob vácuo em fase gasosa, há cerca de 40 anos atrás essa técnica também se mostrou aplicável em meios líquidos (NOMURA, Toshiaki; MINEMURA, 1980).

A reação molecular com o eletrodo revestido com filme reativo via fase de vácuo ou gás normalmente resulta em filmes rígidos que são totalmente ligados a superfície do eletrodo. Portanto, a mudança na massa de tais filmes está diretamente relacionada a alterações na frequência de oscilação que é definida por uma equação chamada Equação de Sauerbrey.(HUSSAIN et al., 2018)

A MCQ pode fornecer informações úteis sobre o incremento de massa e a taxa de deposição (ou remoção) sobre o eletrodo. (HUSSAIN et al., 2018; LU; CZANDERNA;

TOWNSHEND, 1987; NOMURA; HATTORI, 1980). Nas reações de fase líquida, no entanto, a adsorção molecular sofre influências do meio, as moléculas líquidas associadas como uma massa dinâmica adicional via hidratação, solvatação direta e/ou aprisionamento no filme adsorvido. A adsorção em fase líquida pode produzir filmes macios ou viscoelásticos neste caso a camada reativa resultante pode não está firmemente ligada ao cristal oscilante. Isso pode levar a suavização ou perda da energia de oscilação.

O incremento de massa em filmes suavizados não pode ser determinado com precisão, neste caso apenas a mudança de frequência pode ser medida. Tanto a alteração de frequência quanto a perda de energia (medida como alteração de dissipação, ΔD) precisam ser medidas para determinar com precisão a alteração de massa de um filme viscoelástico. Além disso, pelo monitoramento de Δf e ΔD é possível obter informações estruturais adicionais como: alterações conformacionais no filme, reticulação, propriedades viscoelásticas, viscosidade, e densidade.(RODAHL; KASEMO, 1996)

A sensibilidade gravimétrica máxima da técnica em fase líquida é inferior a 1 ng/cm^2 a espessura máxima do filme que pode ser medida pode ser de centenas de nanômetros a alguns microns, dependendo da rigidez do filme. A MCQ-D tem uma ampla gama de aplicações em vários campos da ciência.(XIAOYU et al., 2000)

A estrutura simples dos osciladores MCQ e o desenvolvimento de uma técnica de sistema micro-eletromecânico de quartzo (MEMQ) tornaram possível ao longo do tempo desenvolver arranjos miniaturizados de sensores osciladores com frequências muito estáveis. (MICHALZIK; WILKE; BÜTTGENBACH, 2005; SKLÁDAL, 2003; ZIMMERMANN et al., 2001)).

Recentemente, a construção e análise de um MEMQ genérico e a aplicação de um sistema miniaturizado portátil baseado em injeção em câmara de fluxo foram descritos. (LIANG et al., 2017). A MCQ proposta nessa pesquisa foi composta de uma microseringa injetora de amostras, uma câmara de reação desenhada sob medida e um software de monitoramento de frequência. Ademais, foram relatados progressos na construção de um oscilador de frequência para aplicações reais e uma câmara de reação em fluxo mais vantajoso ao usuário, de simples construção e operação o desempenho de trabalho da MCQ desenvolvida foi examinado com base na imunorreação comum entre IgG humana e IgG anti-humana.(LIANG et al., 2016)

Assim, o objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de um equipamento de análise de baixo custo, baseado na técnica do sistema construtivo micro-eletromecânico de quartzo para construção de Microbalança de Cristal de Quartzo, para uso no ensino nas áreas de

Ciências, engenharia, química, bioquímica e biotecnologia ou mesmo como ferramenta para pesquisa básica. Desse modo contribuir para popularização de técnicas de análises micrométricas e moleculares com possibilidade de uso em vários níveis de ensino, do básico a pós-graduação. Levando-se em conta o alto investimento requerido para implantação deste tipo de equipamento no ensino, qualquer tentativa de redução de investimento é relevante.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Demonstrar o processo construtivo uma Microbalança de Cristal de Quartzo prototificada de baixo custo, para fins acadêmicos, que seja capaz de realizar análises de moléculas bioativas bem como análise gravimétrica.

1.1.2 Objetivos Específicos

1. Construir uma MCQ com uso de *hardware* e *software* livres utilizando o sistema construtivo MEMQ.
2. Demonstrar custos e características de materiais possíveis de utilização.
3. Analisar a capacidade de análise gravimétrica da MCQ com uso de padrões analíticos em meio líquido.
4. Produzir imunossensores tipo (Au-Cisteamina-GLU-mAb-IgG) aplicando protocolo de imobilização orientada de anticorpos.
5. Analisar a capacidade dos imunossensores de reconhecer antígenos ativos em meio líquido.
6. Aplicar protocolo de regeneração do imunossensor.

2 METODOLOGIA

Com a intenção de construir um modelo prototificado de MCQ de baixo custo que favoreça o desenvolvimento e aplicação de práticas de experimentais de ensino voltada para microanálise e análise biomolecular será aplicado um modelo de pesquisa experimental, com base em prova de fundamentos e conceitos da tecnologia em questão. Para Santos (2014), a prova de fundamentos e conceitos são termos adequados para definir um modelo prático que

possa reafirmar um conceito teórico. Sua aplicação faz uso de um protótipo de hardware desenvolvido a partir vários conceitos teóricos.(SANTOS, D. V., 2014) No entanto é necessário esclarecer que a pesquisa experimental não é apenas realizada no laboratório, do mesmo modo a descritiva não é apenas pesquisa de campo. (CERVO; BERVIAN; SILVA, 2007)

Novos protótipos, métodos e linguagens não deveriam ser apenas publicados, sugeridos ou apresentados sem antes passar por um processo de experimentação. A abordagem mais apropriada para a área de protótipos de engenharia seja biomédica, biotecnológica ou outra é o método experimental. (TRAVASSOS; GUROV; AMARAL, 2002) O método científico experimental pode, por exemplo, facilitar o entendimento de como os materiais e objetos do experimento foram desenvolvidos por uma pesquisa, de forma que a ferramenta proposta possa ser utilizada em um processo, seja acadêmico, industrial ou comercial.

2.1 Local

Neste estudo, será abordado os aspectos fundamentais relativos à experiência de desenvolvimento de um estudo qualitativo e quantitativo em que é adotado um método simultâneo de projeção e construção do experimento. O *design* e construção do protótipo foi realizado nos laboratórios de física e análises clínicas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Tocantins, *Campus Araguaína* - IFTO. As análises de funcionalidade ocorreram no laboratório de parasitologia da Universidade Federal do Tocantins – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, *Campus Araguaína* – UFT-EMVZ.

2.2 Tipo de pesquisa

Houve empenho inerente a pesquisa em adquirir novos conhecimentos, porém orientada para o desenvolvimento experimental de um objeto de estudo. Esse tipo de pesquisa, mesmo essencialmente prática, não deixa de incluir uma revisão teórica. Dessa forma, a pesquisa tem o objetivo relacionado ao contexto pelo qual o objeto pesquisado e desenvolvido está inserido. Assim, esse estudo classifica-se como bibliográfico e experimental. (ANDRADE; STEFANO; ZAMPIER, 2010)

2.3 Coleta de dados

Os dados foram coletados a partir da pesquisa e descrição de características de materiais de baixo custo, processos construtivos, avaliação do protótipo e de material

acessível ao público em geral, publicado em livros, artigos, relatórios técnicos e conteúdo eletrônico.

2.4 Análise dos dados

Os dados qualitativos foram avaliados com base na análise de suas características e possibilidade de uso e comparados com resultados de outros trabalhos. Os dados quantitativos foram submetidos a tratamento estatístico e/ou comparados com métricas pré-estabelecidas.

2.5 Procedimentos Metodológicos

A MCQ consiste fundamentalmente de um circuito oscilador em que os pulsos de frequência são gerados disco de cristal piezelétrico de quartzo, com grande estabilidade físico-química e elétrica, e amplamente utilizada em sistemas similares. (PAN et al., 2018) Também é utilizado o controlador eletrônico Arduíno® Micro fortemente difundido como plataforma de prototipagem de microssistemas eletrônicos. O oscilador usa o esquema elétrico do circuito tipo Pierce. Para atender aos objetivos deste estudo e apresentar similaridade com outros MEMQ's, o estudo seguiu as seguintes premissas.

- Regime de trabalho: A MCQ deve ter amplitude de detecção da ordem de 1 Hz a 10 MHz;
- Estabilidade: A MCQ deve mostrar estabilidade do sinal de leitura nos testes com padrões analíticos pré-estabelecidos;
- Baixo custo: No processo construtivo a MCQ deve utilizar hardware e software baratos, mesmo que esses fossem mais suscetíveis a variações e interferências. Assim, espera-se reduzir o custo da elaboração, mesmo com eventuais limitações ao equipamento.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O funcionamento da MCQ é baseado no efeito piezoelétrico. A piezoelectricidade é definida como sendo a propriedade que alguns materiais dielétricos possuem de se deformarem quando submetidos a um campo elétrico ou de produzirem campo elétrico quando deformados mecanicamente. (SKLÁDAL, 2003) O cristal de quartzo pertence a esta classe de materiais.

A palavra piezoelectricidade é derivada da palavra grega “piezein”, que significa “pressionar”, e a eletricidade gerada em resposta à pressão aplicada nesses tipos de materiais. Os físicos franceses Pierre e Jacques Curie descobriram esse efeito em 1880, quando demonstraram que os cristais de sal podiam produzir eletricidade quando deformados ao

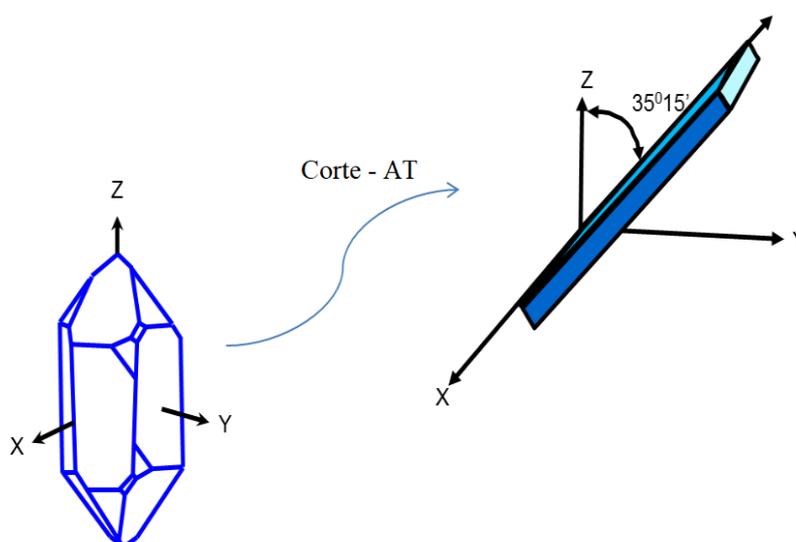
longo de certas orientações cristalográficas.(LUCKLUM; EICHELBAUM, 2007) Um ano depois, eles demonstraram que o efeito inverso também era possível, ou seja, o quartzo poderia se deformar com a aplicação de tensão. (JOHANNSMANN, 2015)

3.1 Cristais de Quartzo

O quartzo, além de piezoelétrico, também possui outras propriedades que o tornam um dos melhores materiais para dispositivos ultrassensíveis. É de grande abundância na natureza, é de fácil crescimento sintético e seu processamento é relativamente simples. Além disso, o α -quartzo, tipo que pode ser usado como cristal oscilante, é termodinamicamente estável até 573 °C. Para fabricar cristal de quartzo ressonantes, as lâminas são cortadas de bloco maior em orientações específicas em relação ao eixo cristalográfico. (ELETTRONICA, 2017; ORMOND, 1985)

Os discos de quartzo usados nas MCQ's são mais comumente processados usando a orientação de corte-AT ou do inglês, *AT-cut* (Figura 1) que fornecem oscilação em modo de cisalhamento - fenômeno de deformação ao qual um corpo está sujeito quando as forças que sobre ele agem provocam um deslocamento em planos diferentes, mantendo o volume constante. (DIXON, 2008) Quando a corrente alternada é aplicada ao disco de quartzo, ele oscila na sua frequência de ressonância. As frequências de ressonância são tipicamente da ordem de MHz e inversamente proporcionais a espessura do cristal. O cristal de quartzo comum de 5 MHz tem uma espessura correspondente de aproximadamente 330 μm .

Figura 1- Orientação cristalográfica do corte-AT



Fonte: Autor

3.2 Equação de Sauerbrey

A mudança de frequência nos MCQ's pode ser medida com uma resolução de 1 Hz. Devido à sua alta estabilidade como material ressonante, os cristais de quartzo foram incorporados com sucesso, no início dos anos 1900, como componentes em vários dispositivos como filtros eletrônicos, dispositivos de controle de frequência e transdutores ultrassônicos. (BOTTOM, 2008; VAUGHAN; O'SULLIVAN; GUILBAULT, 2001)

A aplicação de cristais de quartzo como sensores gravimétricos foi realizada no final da década de 1950, após o trabalho pioneiro de Sauerbrey que demonstrou, em 1959, que a variação de frequência (Δf) do quartzo oscilante poderia estar linearmente relacionada à sua alteração de massa (Δm), essa linearidade foi expressa pela equação abaixo, conhecida como equação de Sauerbrey conforme expressa por

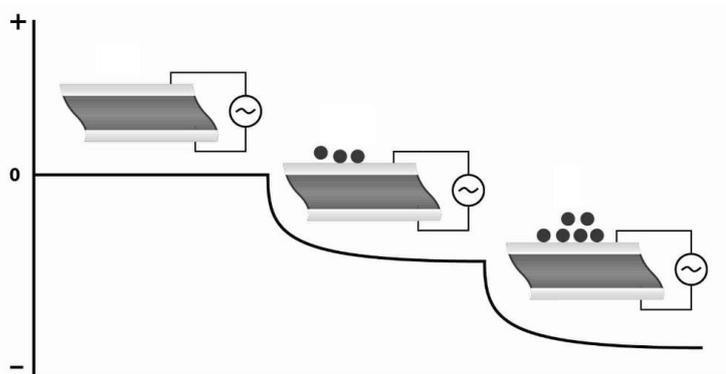
$$\Delta m = -C \cdot \Delta f / n$$

onde n é o número de sobretons e C é uma constante que depende da propriedade do cristal usado. Essa equação constitui o princípio básico da tecnologia MCQ. (SAUERBREY, 1959)

Para um cristal de quartzo 5 MHz corte-AT, a temperatura ambiente, C é aproximadamente igual a $17,7 \text{ ng}/(\text{cm}^2 \cdot \text{Hz})$. Isso significa que a adição de $17,7 \text{ ng}/\text{cm}^2$ de massa em um cristal de quartzo de 5 MHz causa uma mudança de frequência de 1 Hz. A frequência do quartzo de 5 MHz pode ser facilmente medida com uma precisão de 0,01 Hz no vácuo; portanto, é possível medir diferenças de massa em escala de nanogramas. Por exemplo, a mudança de frequência correspondente na adição de uma monocamada de água com uma densidade de área de aproximadamente $25 \text{ ng}/\text{cm}^2$ a superfície de um cristal de quartzo de corte AT é de aproximadamente 1,4 Hz e está dentro dos limites de detecção. Em 1963, Warner e Stockbridge conseguiram medir uma mudança na massa tão pequena quanto $1 \text{ pg}/\text{cm}^2$, que correspondia a cerca de 0,1% de uma monocamada de hidrogênio. (WARNER; STOCKBRIDGE, 1963)

Sauerbrey considerou no desenvolvimento de sua equação que uma pequena massa adicionada a superfície do cristal pode ser tratada como uma mudança equivalente na massa do próprio cristal de quartzo. Isso significa que a equação só é válida quando a massa adicionada é adsorvida rigidamente na superfície do quartzo sem atenuações. A descoberta de Sauerbrey é esquematicamente representada na (Figura 2) abaixo.

Figura 2 - Mudança da frequência de oscilação com associação e desassociação de massa



Fonte: (Dixon, 2008)

Sauerbrey continuou sua investigação das propriedades de detecção de massa do MCQ e mais tarde demonstrou que a vibração do cristal é restrita à área onde os eletrodos se sobrepõem. A amplitude da vibração, atinge seu máximo na região central do eletrodo, e diminui de forma gaussiana em direção às bordas dos eletrodos. (SAUERBREY, 1959)

Em resumo, a equação de Sauerbrey só se aplica plenamente se: a massa a ser avaliada for pequena em relação do cristal; a massa medida deve ser ligada fortemente a superfície, e finalmente, a massa deve ser uniformemente distribuída sobre o eletrodo.

Essa equação ainda é utilizada para verificar o crescimento de filmes rígidos em fase de vácuo e gasosa. O desenvolvimento de uma MCQ aplicável em meios líquidos foi o próximo passo necessário a diversificação de sua aplicação. Em 1980 Nomura e Hattori demonstraram a possibilidade de um cristal de quartzo gerar frequências oscilatórias estáveis submerso em meio líquido. (NOMURA; HATTORI, 1980)

3.3 Microbalança de Cristal de Quartzo com Dissipação – MCQ-D

O método de decaimento como método de estudo de osciladores acústicos foi desenvolvido em 1954 (SITTEL; ROUSE; BAILEY, 1954). Nas aplicações em MCQ Hirao e colaboradores descreveram as formas de aplicação da MCQ. A aplicação de uma tensão de corrente alternada (CA) sobre os eletrodos faz com que o cristal entre em modo de cisalhamento até o ponto ressonante (HIRAO; OGI; FUKUOKA, 1993). Quando a tensão CA cessa, a oscilação diminui ou decai. Este decaimento é medido junto com a frequência de ressonância e o fator de dissipação de energia (D). D é definido como a perda de energia em cada período de oscilação dividida pela energia total armazenada no sistema

(JOHANNSMANN, 2007; PLUNKETT et al., 2003) (D) é igual à largura de banda de ressonância dividida pela (Δf).

Outros instrumentos MCQ determinam a dissipação de energia pelos espectros de condutância. A MCQ-D funciona em tempo real, e é sensível à superfície, equipamentos mais modernos permitem medir mais de 200 pontos de dados por segundo. Alterações na frequência de ressonância (Δf) estão relacionadas principalmente à captação ou liberação de massa na superfície do sensor. Quando empregado como sensor de massa, o instrumento possui uma sensibilidade de cerca de $0,5 \text{ ng/cm}^2$, essa relação massa/área é variável de acordo com as características de fabricação do cristal. Alterações no fator de dissipação (ΔD) estão relacionadas principalmente à viscoelasticidade (JOHANNSMANN, 2008) A viscoelasticidade geralmente está relacionada às características estruturais do filme acoplado à superfície do sensor.

Quando utilizada como sensor gravimétrico, a MCQ-D é frequentemente usada para estudar a dinâmica de interação molecular com vários tipos de superfícies (VUORILUOTO et al., 2015). Ao contrário de técnicas ópticas, como espectroscopia de ressonância plasmônica de superfície (RPS), elipsometria, a MCQ determina a massa do filme adsorvido, incluindo o solvente aprisionado na câmara de reação (PLUNKETT et al., 2003).

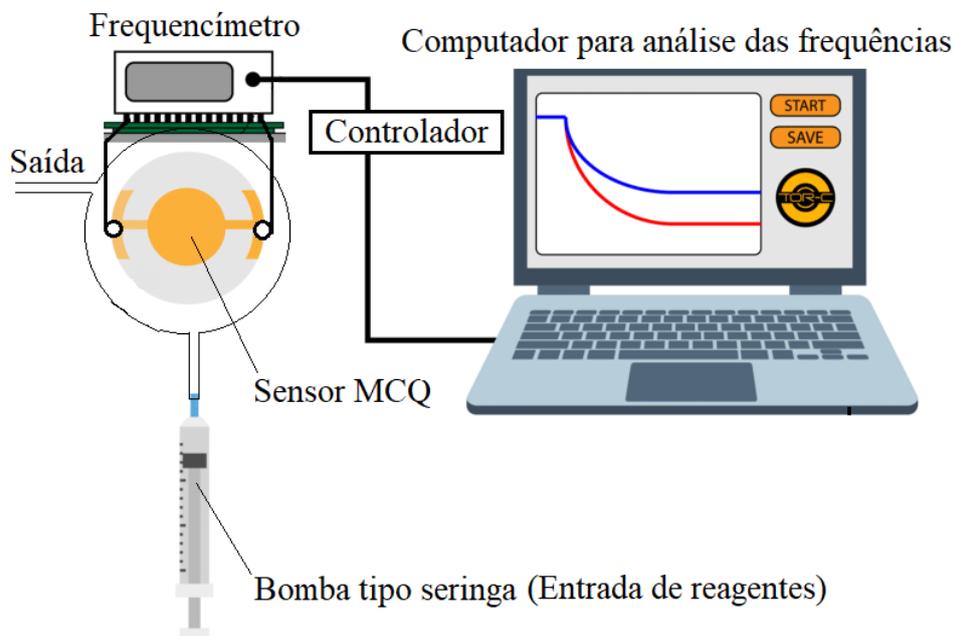
Diferença de massa seca e úmida medida por MCQ-D e RPS é mais significativo em camadas altamente hidratadas (EMILSSON et al., 2015). Como a elasticidade da amostra é afetada por uma grande variedade de parâmetros, a MCQ-(D) é útil para estudar interações moleculares com superfícies, bem como interações entre moléculas. A MCQ-D é comumente usada nos campos de biomateriais, adesão celular, descoberta de medicamentos, ciência de materiais e biofísica entre outras aplicações (MOHAN et al., 2014).

3.4 Método operacional típico da MCQ

O sistema MCQ mais comum consiste em um cristal de quartzo com eletrodos metálicos montados firmemente ligados nas laterais superior e inferior, um suporte para prender o cristal e possibilitar conexão elétrica, frequencímetro que excita o cristal até sua frequência de ressonância, um controlador eletrônico e computador/monitor que lê a mudança de frequência e armazena os parâmetros do processo (Figura 3).

Os eletrodos na parte superior e inferior do cristal geralmente têm a forma de um círculo ligado a uma trilha. Essa forma de eletrodo permite que a MCQ oscile apenas na área onde os eletrodos são aderidos (BOTTOM, 2008).

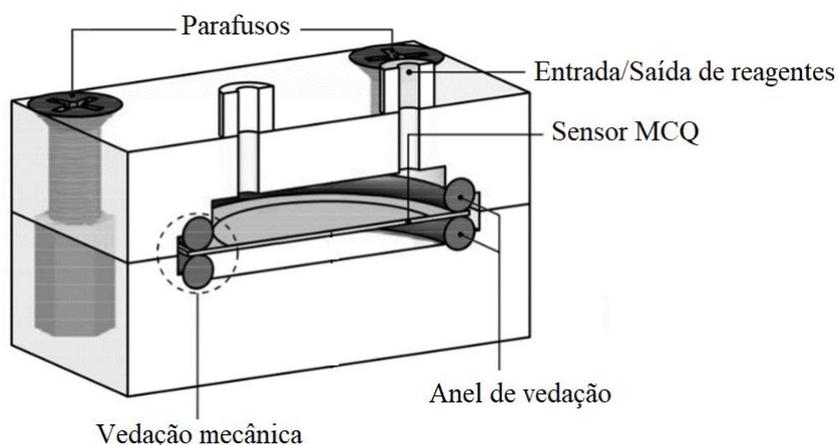
Figura 3 - Configuração operacional típica da MCQ



Fonte: Próprio autor

A onda acústica gerada como resultado da oscilação do cristal é focada no centro do sensor, o que facilita a montagem do cristal selando-o pelas extremidades sem amortecimento excessivo da oscilação (Figura 4).

Figura 4 - Vedação de sensor MCQ pelas extremidades



Fonte: Adaptado de (SANDSTRÖM *et al.*, 2017)

Como a estabilidade da frequência de oscilação é alterada pelas mudanças de temperatura, o suporte de cristal de quartzo é geralmente colocado em uma câmara fechada e com temperatura controlada. A câmara de reação deve ser dimensionada para medições em fase gasosa, de vácuo ou líquida (MICHALZIK; WILKE; BÜTTGENBACH, 2005)

3.5 Microssensores imunológicos MCQ

Os imunossensores baseados em piezoeletricidade são dispositivos analíticos que podem ser produzidos para análise de uma grande variedade de elementos macromoleculares e microrganismos (AFZAL et al., 2017).

Os imunossensores piezoelétricos são biossensores que utilizam um anticorpo como elemento de biorreconhecimento e, obviamente a especificidade do anticorpo influencia diretamente a especificidade e qualidade de todo o imunossensor. De modo geral, um imunossensor piezoelétrico é específico quando o anticorpo usado é específico e o eletrodo com as outras partes sensíveis do material piezoelétrico não sejam sensíveis a reações inespecíficas ou com compostos interferentes (POHANKA, 2018a)

Embora os imunossensores comumente contenham anticorpos imobilizados e sejam capazes de reconhecer antígenos, o contrário também é possível. Assim, o imunossensor pode ser produzido com antígeno imobilizado, desse modo, o anticorpo é a molécula analisada. Os imunossensores piezoelétricos com antígeno imobilizado são, portanto, adequados para o diagnóstico direto de doenças infecciosas (POHANKA, 2018b)

Os imunossensores piezoelétricos foram e são pesquisados há muito tempo e vários usos promissores foram estabelecidos. MCQ é bastante difundida para fins de elaboração de imunossensores, isso pelo fato de que a MCQ ser amplamente utilizado em dispositivos eletrônicos disponíveis comercialmente. Essa disponibilidade permite a elaboração de protótipos de variados tipos de biossensores. Por exemplo, Muratsugu e colaboradores (1993) prepararam um imunossensor para a determinação da albumina na urina (albuminúria) e usaram uma MCQ com anticorpo imobilizado para detecção da albumina sérica humana. Como resultado a albumina foi medida no intervalo de concentração de 0,1 a 100 $\mu\text{g/mL}$ (MURATSUGU et al., 1993)

Em outro trabalho, o fragmento C4 do sistema complemento foi determinado por um imunossensor, onde os eletrodos de trabalho foram revestidos com uma membrana de Nafion e depois por um anticorpo contra o C4. O fragmento foi determinado em uma faixa de concentração de 0,08-1,6 $\mu\text{g/mL}$ e o desvio padrão relativo para o ensaio foi de cerca de 5% (DENG et al., 2005). Um último e ótimo exemplo imunossensor foi descrito por Funari e colaboradores (2017) que utilizaram imobilização espacial orientada de anticorpos contra o glúten e atingiram um limite de detecção de 4 ppm, a faixa de sensibilidade ao glúten é entre 7,5 e 15 ppm (VENTURA et al., 2017)

Como demonstrado nos exemplos acima, os imunossensores piezoelétricos são adequados para alvos de alto peso molecular porque causam diminuição acentuada da frequência de oscilação do cristal. Isto também é uma limitação do método, porque o reconhecimento direto de alvos de baixo peso molecular por anticorpos imobilizados é mais trabalhoso.

Os microrganismos são alvos que podem ser analisados diretamente e estes são frequentemente testados por novas adaptações de sensores (CAMPBELL et al., 2007; MARALDO; MUTHARASAN, 2007; SHARMA; MUTHARASAN, 2013a). Por outro lado, a análise de microrganismos também pode ter problemas. Uma célula microbiana não funciona como uma massa ideal, apenas uma parte da membrana na proximidade do receptor capturado por um anticorpo preso a superfície do eletrodo está envolvida nas alterações de ressonância.

Embora existam essas limitações, também há protocolos que minimizam as falhas. Olsen e colaboradores (2006) prepararam um biossensor MCQ para *Salmonella typhimurium* utilizando um bacteriófago como elemento de biorreconhecimento. O biossensor tinha um limite de detecção de 100 células/mL (OLSEN et al., 2006). Em outro trabalho, o imunossensor para a detecção de bactérias baseadas em anticorpos foi construído em cristais de 10 MHz. O imunossensor continha anticorpo policlonal contra *Francisella tularensis* imobilizada em uma monocamada auto-organizada e foi capaz de detectar o microrganismo com limite de detecção de 105 Unidades Formadoras de Colônias - UFC/mL em 5 minutos.

A limitação antes citada no ensaio bacteriano pode ser resolvida pela aplicação de nanopartículas (NP's), geralmente de ouro, funcionalizada por outros anticorpos contra o alvo, o que aumenta a massa sobre o sensor e organiza as bactérias específicas em uma camada coesa. Um ensaio em que o analito foi capturado dentro de um sanduíche entre um anticorpo imobilizado na superfície do cristal e um anticorpo ligado às NP's foi testado com sucesso por alguns pesquisadores. Salam e colaboradores (2013) detectaram *Salmonella typhimurium* por um imunossensor MCQ e usaram nanopartículas de ouro (AuNP's) cobertas com anticorpo para melhorar o sinal. (SALAM; ULUDAG; TOTHILL, 2013) O limite de detecção atingido foi de 10 a 20 UFC/mL, o que é muito impressionante para um imunoenensaio prototificado, os autores foram capazes de analisar de forma confiável as bactérias nas amostras de alimentos.

Um conceito muito parecido foi adotado por Guo e colaboradores (2012) que detectaram *Escherichia coli* O157: H7 por um imunossensor MCQ usando anticorpos

conjugados a AuNP's como um amplificador de sinal. (GUO et al., 2012) O limite de detecção para o ensaio iniciou-se com 10 UFC/mL.

Como no exemplo acima à amplificação do sinal por NP's modificadas pode ser também baseada em propriedades magnéticas, as nanopartículas magnéticas contêm óxidos de ferro que são conhecidos por sua alta densidade de massa. Apenas a alta densidade já é um parâmetro ideal para um ensaio piezoelétrico (WUJCIK et al., 2014)

O magnetismo das partículas pode ser vantajoso, por exemplo, para a organização microfluídica de todo o ensaio. Um protótipo de uso de NP's magnéticas funcionalizadas com anticorpos foi descrito em um estudo para a detecção do Fator de Necrose Tumoral α - TNF α do inglês (*Tumor Necrosis Factor α*) e o limite de detecção foi de 1,62 pg/mL, a correlação linear com o método imunológico padrão foi citada no trabalho (POHANKA, 2018a)

Anticorpos também são alvos que podem ser detectados por imunossensores, desse modo, o antígeno é o elemento de biorreconhecimento. A detecção direta de anticorpos já é bem descrita em vários trabalhos há vários anos, foi e continua sendo promissora para o diagnóstico de doenças infecciosas e autoimune. (KÖSSLINGER et al., 1994)

O diagnóstico de doenças infecciosas pelo reconhecimento de anticorpos contra o vírus da imunodeficiência humana, *Leishmania chagasi* (RAMOS-JESUS et al., 2011), *Francisella tularensis* (POHANKA; PAVLIŠ; SKLÁDAL, 2007) e imunoglobulinas totais IgG são apenas alguns exemplos.

Os imunossensores piezoelétricos podem ser as principais alternativas ao teste ELISA do inglês (*Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*) e a Imunocromatografia de Fluxo Lateral. O ELISA é um método comum disponível em larga escala em forma de kits e com grande variedade de marcadores imunológicos. É um método válido para um grande número de análises com custos acessíveis (ORSINI et al., 2012) Por outro lado, o teste tem vários subprocessos baseados em várias incubações nas quais são aplicadas amostras e anticorpos primários, secundários, reagentes cromogênicos e outros produtos químicos de suporte como ácido sulfúrico, comum na etapa final em que a coloração ocorre.

Um imunossensor piezoelétrico pode fornecer parâmetros analíticos semelhantes o ELISA, sem necessidade de aplicar reagentes específicos e quando necessário, a quantidade é menor isso porque os imunossensores são desenhados para um ensaio sem marcador e em tempo real. Portanto, são capazes de concorrer com o ELISA (POHANKA, 2018b)

A imunocromatografia de fluxo lateral como o teste de Gonadotrofina Coriônica Humana na urina β HCG do inglês (*β Human Chorionic Gonadotropin*) utilizada como exame de gravidez, é um exemplo típico do imunoenensaio de fluxo lateral. Comparado ao ELISA, é

significativamente mais simples e mais adequado para uso por pessoas não treinadas. De modo geral, é necessária apenas que uma amostra seja aplicada para que o imunoenensaio de fluxo lateral seja realizado.

Por outro lado, estes testes não são capazes de fornecer mais informações como concentração do antígeno ou do anticorpo identificado (MALITESTA et al., 2012)

Estas comparações aqui apresentadas podem ser concluídas com a afirmação de que os imunossensores piezoelétricos podem ser comparáveis ao ELISA em termos de qualidade, e contemporaneidade a testes como o imunoenensaio de fluxo lateral em relação à simplicidade operacional.

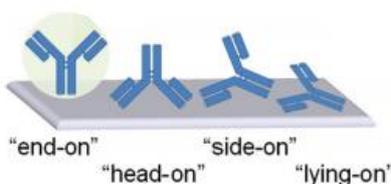
3.6 Orientação de imunoglobulinas

Imunoenensaio, *biochips* de proteína, e imunossensores são utilizados para identificação e análise quantitativa e qualitativa de antígenos em amostras empregam frequentemente biomoléculas de reconhecimento tais como anticorpos (NIU et al., 2012; WUJCIK et al., 2014). Os anticorpos são biopolímeros de aminoácidos cuja seqüência e composição, como outras proteínas, definem a estrutura tridimensional (MENTI et al., 2016)

A sensibilidade dos testes depende da qualidade de imobilização e densidade dos anticorpos de captura em um suporte. As reações de fixação também devem ser capazes de manter a conformação nativa da molécula em solução, e uma orientação que maximize a captura de antígenos.

As regiões Fab do inglês (*Fragment antigen-binding*) e Fc do inglês (*Fragment crystallizable*) nos anticorpos são similares em sua composição, ponto isoelétrico, e estrutura, permitindo em ambas a determinação da orientação do anticorpo em suportes. O anticorpo pode ser orientado de tal modo que a região de interação com o antígeno fique disponível. Essa orientação ideal, em vários estudos é referida como "end-on"; no entanto, os anticorpos imobilizados de forma aleatória podem assumir várias orientações no suporte por exemplo "head-on", "side-on" e "lying-on" (Figura 5)(PENG; CHUNG; LIN, 2011)

Figura 5 - Anticorpos com orientação aleatória



Fonte: (WELCH et al., 2017)

Geralmente, os aminoácidos hidrofóbicos são internalizados na estrutura de proteína, deixando resíduos hidrofílicos na superfície, com funcionalidades quimicamente reativas, incluindo grupos amina, carboxila e hidroxila. Dissulfetos, podem ser reduzidos formando grupos tiol que também podem ser funcionalizadas. Além disso, sítios para orientação de aminoácidos naturais ou não naturais, podem ser introduzidos a anticorpos por tecnologia recombinante (HUI et al., 2015; TRILLING; BEEKWILDER; ZUILHOF, 2013).

Adsorção física de anticorpos em suportes sólidos de imunoenensaio tradicional, como o poliestireno, são possíveis por interação apolares e eletrostáticas. Este método de fixação é mais simples, mas não há controle na orientação dos anticorpos. Nas etapas de lavagem subsequentes pode ocorrer desnaturação ou descolamentos das estruturas (BUTLER, J. E. et al., 1992; BUTLER, John E., 2004).

O desenvolvimento de tecnologias de fixação aumentou a sensibilidade e especificidade de imunoenensaio reduzindo a desnaturação das estruturas de biorreconhecimento na superfície. A fixação por ligação covalente do anticorpo, através dos seus grupos funcionais, com substratos quimicamente projetados resultou em outras melhorias como a densidade de anticorpos, embora a orientação desfavorável possa ocorrer (WANG, Y. et al., 2016).

3.6.1 Imunoglobulinas Humanas

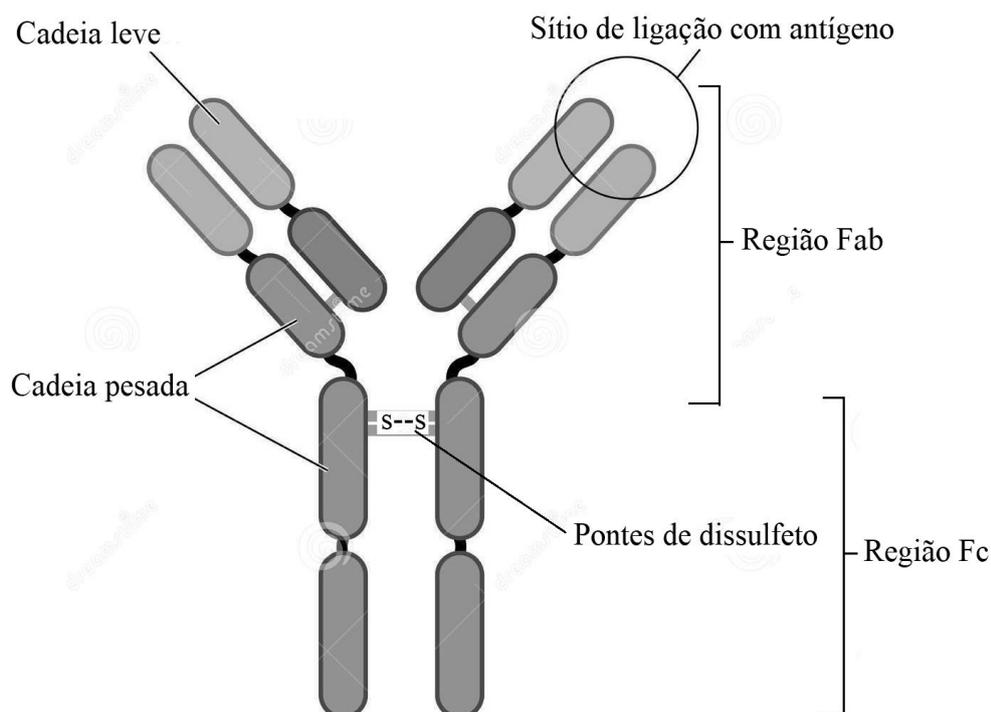
As imunoglobulinas humanas tem uma estrutura molecular muito parecida, são divididas em cinco classes $\mu, \gamma, \alpha, \delta, \epsilon$ e as imunoglobulinas são chamadas de IgM, IgG, IgA, IgD e IgE, respectivamente. As três principais classes são a IgG, IgM e IgA e as presentes em menor quantidade são a IgD e IgE, menos de 1% do total de imunoglobulinas, elas se diferem umas das outras por variações na molécula, por exemplo glicosilação, quantidade e localização das ligações S-S (dissulfeto) (COOK; TOMLINSON, 1995)Essas globulinas são biopolímeros de aminoácidos cuja sequência e composição, como outras proteínas, definem a estrutura tridimensional.

Salvo as particularidades de estrutura e função a principal imunoglobulina humana é a IgG (150 kDa – kilo Daltons) (SCHARF et al., 2001) muito utilizada em imunoenensaio.

Uma IgG é formada por duas cadeias longas chamadas de cadeias pesadas e duas curtas chamadas de cadeias leves. Essas cadeias são unidas pelas ligações de dissulfeto. Tanto a cadeia leve quanto a pesada possuem sítios variantes e constantes. As porções variáveis das

cadeias formam o sítio de ligação com o antígeno. Um anticorpo é compreendido de duas regiões de ligação do antígeno, fragmento Fab e um fragmento não reativo região (Fc). (SCHARF et al., 2001) A (Figura 6) mostra a estrutura principal das imunoglobulinas humanas, sendo possível observar detalhes como pontes de dissulfeto e regiões.

Figura 6 - Estrutura principal das imunoglobulinas humanas



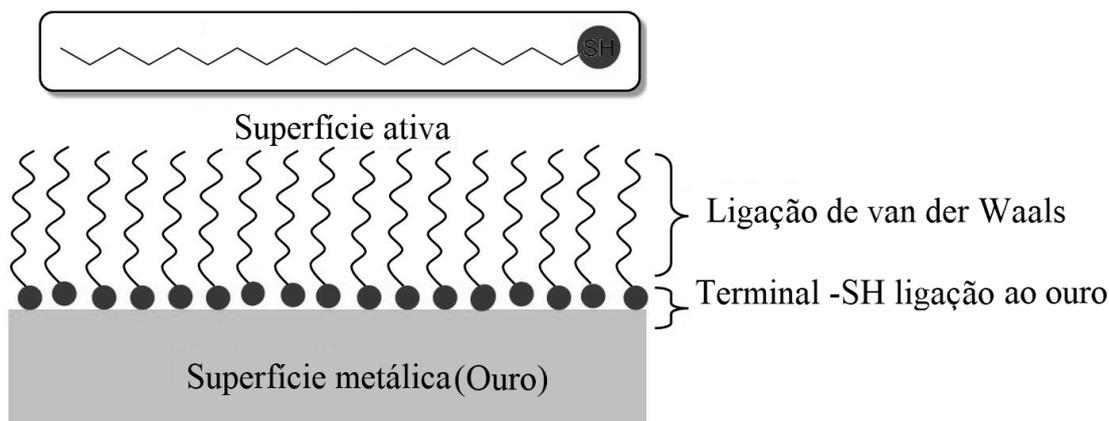
Fonte: Próprio autor

3.7 Monocamadas Auto-organizadas - *Self-Assembled Monolayer* (SAM)

Monocamadas auto-organizadas são uma outra forma de modificação físico-química de suporte para adsorção direta de anticorpos ou para produzir grupos funcionais para ligação covalente (ACERO SÁNCHEZ et al., 2016).

As SAM's são normalmente formadas a partir de moléculas que contêm grupos funcionais ativos em suas extremidades, separados por uma cadeia de hidrocarbonetos e uma cadeia de carbono linear que promove a auto-organização quando se ligam a uma superfície/suporte. Uma das extremidades tem afinidade específica com a superfície (*Head Group*), enquanto a outra, (*Terminal Functional Group*) interage quimicamente para adsorção ou fixação de proteínas. (Figura 7)

Figura 7 - Representação de uma SAM sobre um substrato



Fonte: adaptado de TRAVIS L., 2015

A interação metal-tiol por exemplo é muito explorada utilizando alcanotióis para produzir ligantes que podem interagir com substratos metálicos através do grupo tiol, e possibilitar estratégias de adsorção ou acoplamento químico de anticorpos para SAM's (CHEN, S. et al., 2003; LOVE et al., 2005) Vashist e colaboradores (2014) fornecem uma boa revisão da imobilização de anticorpos usando silanização para produção de SAM's com densidades melhoradas (VASHIST et al., 2014)

3.8 Alvos de ligação covalente

Embora o design e as características dos substratos/suportes sejam importantes, a capacidade de anexar um anticorpo ou uma proteína a um suporte sólido é base para o sucesso de um imunoenensaio. A ligação covalente de proteínas de captura garante uma imobilização confiável e pode aumentar a densidade da camada funcional e os resultados de orientação. No entanto, para imobilização de anticorpos, ligação orientada é necessária (RAO; ANDERSON; BACHAS, 1998)

A ligação covalente pode ser realizada de várias formas sofrendo influências de algumas variáveis como funcionalidade do suporte/substrato, sítio alvo do anticorpo, e características físico-químicas do sistema, isto é pH, temperatura e grau de conjugação (GODDARD; HOTCHKISS, 2007). Os sítios de ligação mais comuns nos anticorpos para fixação covalente, são grupamentos amina, carboxila, tiol e hidrocarbonetos (LIU; YU, 2016)

3.9 Grupos Carboidratos

Os anticorpos são glicosados na porção Fc e esta característica pode fornecer condições para a imobilização direcionada destas proteínas nas superfícies de diversos tipos de microssensores (ADAK et al., 2014; VASHIST et al., 2014) A oxidação de periodato - ânion composto de iodo e oxigênio - pode ser um método para oxidar radicais dióis nos carboidratos transformando-os em grupos aldeído reativos com aminas (PELUSO et al., 2003) Os radicais dióis também podem ser esterificados pela ação do ácido borônico (DUVAL; VAN BEEK; ZUILHOF, 2015).

Nesse contexto, Song e colaboradores demonstraram a imobilização de anticorpos utilizando 3-ácido aminofenilborônico para acoplar um primeiro anticorpo ligado á superfície funcional do sensor pelo (NHS) do inglês (*N-hydroxysuccinimide*) e um segundo ligado ao carboidrato pela porção Fc. Os ésteres de boronato são reversíveis, por conta disso, Adak e colaboradores utilizaram uma única molécula com dois grupos funcionais disponíveis para formar em um deles um éster de boronato com o carboidrato, e em seguida a ligação covalente do anticorpo foi possível por reticulação foto iniciada por luz ultravioleta. A exposição aos raios ultravioleta (UV) forma carbenos reativos que se ligam irreversivelmente ao anticorpo (HUI et al., 2015; SONG et al., 2014)

Alternativamente, Huang e colaboradores (2016) oxidaram o carboidrato da imunoglobulina anti-alfa-fetoproteína em aldeído e ligaram covalentemente ao (APTES) do inglês (*3-aminopropyltri ethoxysilane*) sobre uma superfície de quartzo (HUANG et al., 2016). A quantidade de anti-alfa-fetoproteína imobilizada aumentou 32% e a interação com o antígeno 16% em relação à adsorção física. Nessa mesma ideia, em um protótipo utilizou-se a oxidação periódica dos carboidratos do anti-CD34 para promover a imobilização orientada. Neste protótipo, substratos de aço inoxidável foram revestidos com acetato de etileno, em seguida foram tratados com plasma de O₂ e funcionalizados com APTES para criar grupos aminas. As aminas foram então ligadas aos carboidratos oxidados e a ligação foi avaliada pela captação celular pelo anticorpo anti-CD34 (CHEN, X. et al., 2004)

3.10 Grupos Amina e Carboxila

Os grupos amina e carboxila são muito presentes e uniformemente distribuídos na estrutura dos anticorpos por conta de sua polaridade. A lisina apresenta cadeias laterais reativas de amina primária já as cadeias laterais carboxílicas têm como origem o aspartato e

glutamato, essas duas cadeias podem ser direcionadas para fixação covalente. Devido à sua distribuição em toda a superfície do anticorpo, a imobilização covalente direcionada do anticorpo, utilizando esses grupos é uma tarefa difícil. O acoplamento entre o substrato e a proteína é comumente obtido a partir da carbodiimida EDC do inglês (*N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride) combinado com ésteres de succinimidil como o NHS. (GODDARD; HOTCHKISS, 2007) Esse método é conhecido como acoplamento EDC/NHS e resulta na formação de ligações amida muito fortes.

As reações entre EDC/NHS tem sido muito utilizada como método de fixação covalente e funcionalização de proteínas e também como método para a preparação de substratos. Carrigan e colaboradores (2005) usaram EDC/NHS de duas formas, a primeira para a reticulação de polietilenimina e carboximetil celulose formando assim o substrato e na segunda para a ativação desse substrato para proteínas tendo como alvo amina e carboxila (CARRIGAN; SCOTT; TABRIZIAN, 2005)

3.11 Grupos Tiol

As cisteínas formam pontes de dissulfeto, como as presentes na região flexível dos anticorpos, essas pontes também pode ser úteis se reduzidas por exemplo com agentes como TCEP do inglês (*Tris*(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride) também chamado de cisteamina. Essa redução forma grupos tióis reativos, (TRILLING; BEEKWILDER; ZUILHOF, 2013) que podem por exemplo reagir com superfícies ativadas por maleimida ou iodoacetil (SHARMA; MUTHARASAN, 2013b) No entanto, as cisteínas são internas para estrutura do anticorpo, a ligação covalente através desta estratégia pode mudar a conformação do anticorpo (KARYAKIN et al., 2000), enquanto o impedimento estérico pode limitar a ligação com antígeno. De outra forma a reação ouro-tiol torna útil essa estratégia de imobilização para substratos de ouro e nanopartículas (MAURIZ; GARCÍA-FERNÁNDEZ; LECHUGA, 2016)

A excitação por luz UV também pode ser usada para iniciar a foto redução de pontes dissulfeto, de acordo com uma abordagem conhecida como a técnica de imobilização fotônica. Pulsos a 258 nm, com frequência de 10 kHz, podem ser úteis para produzir tióis livres que são capazes de ligar substratos de ouro para aplicações com MCQ por exemplo (DELLA VENTURA et al., 2011)

Fragmentos de anticorpos, como os Fab's, podem ser produzidos com tióis reativos. A imobilização de fragmentos Fab em eletrodos de ouro é termodinamicamente favorável através da formação da ligação Au-S. Também é muito simples monitorar a mudança na composição da superfície através da RPS. Anticorpos não fragmentados e fragmentados tipo Fab' foram imobilizados diretamente em monocamadas de ouro. As amins livres na superfície do anticorpo foram transformadas em tióis. Ambas as superfícies foram analisadas pelo método AFM do inglês (*Atomic Force Microscopy*). Superfícies com anticorpos íntegros adsorvidos não puderam ser analisadas devido a ponta da sonda ter movido os anticorpos fracamente ligadas a superfície. (CRIVIANU-GAITA; THOMPSON, 2015).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Construção da Microbalança de Cristal de Quartzo

4.1.1 Microcontrolador Arduíno

O Arduino Micro (Figura 8) é um *hardware* de código aberto (MELLIS et al., 2007) usado para elaboração de protótipos de programação de eletrônicos. A placa de circuito e *software* (BADAMASI, 2014) usa a linguagem C++ simplificada para programação (MINNS, 2013). O Arduino Micro é muito usado como microcontrolador, entre outras coisas devido a interface do usuário ter configuração amigável e de fácil utilização.

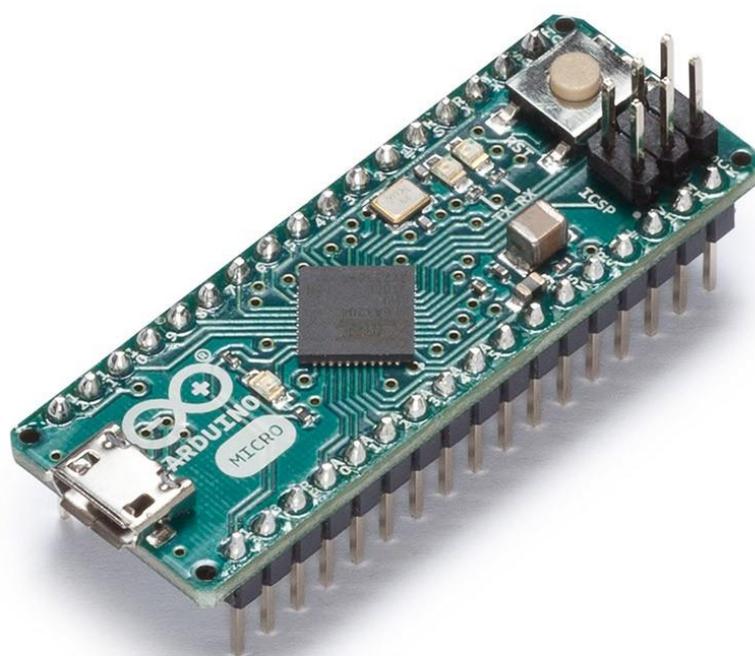
Como qualquer outro microcontrolador é uma placa de circuito com um processador que pode ser programado para executar uma variedade de tarefas, é possível enviar informações do programa de computador para o microcontrolador para que este se ligue ao circuito ou máquina específica para executar um comando particular, ou controlar processos eletrônicos bem como leitura de sensores diversos tanto de entrada quanto de saída de dados (MARGOLIS, 2011)

Diferente da maioria dos programas e placas de circuito, (BOXALL, 2013) não possui um *hardware* específico para carregar um novo código ou programa na placa, é necessário usar apenas um cabo USB do inglês (*Universal Serial Bus*) para carregar um novo código, os códigos de programa são mais fáceis de desenvolver tornando a programação mais simplificada. Uma placa Arduino pode ser classificada em duas partes: I) *Hardware*: consiste de muitos componentes que se combinam para as mais diversas funções (BADAMASI, 2014)

O principal componente é o processador ATmega32u4 (Figura 9), esse componente é composto de 20 entradas e saídas digitais destas 7 podem ser utilizadas como saídas PWM do inglês (*Pulse Width Modulation*) e 12 como saídas analógicas, um cristal gerador de clock de 16 MHz, uma micro conexão USB, uma conexão ICSP do inglês (*In Circuit Serial Programming*). Esse arranjo dá o suporte ao microcontrolador. A placa também é *Plug and Play*, o que significa que basta a conexão USB para funcionar, eliminando a necessidade de um processador secundário. Isto permite que o controlador seja identificado pelo computador como um periférico qualquer.

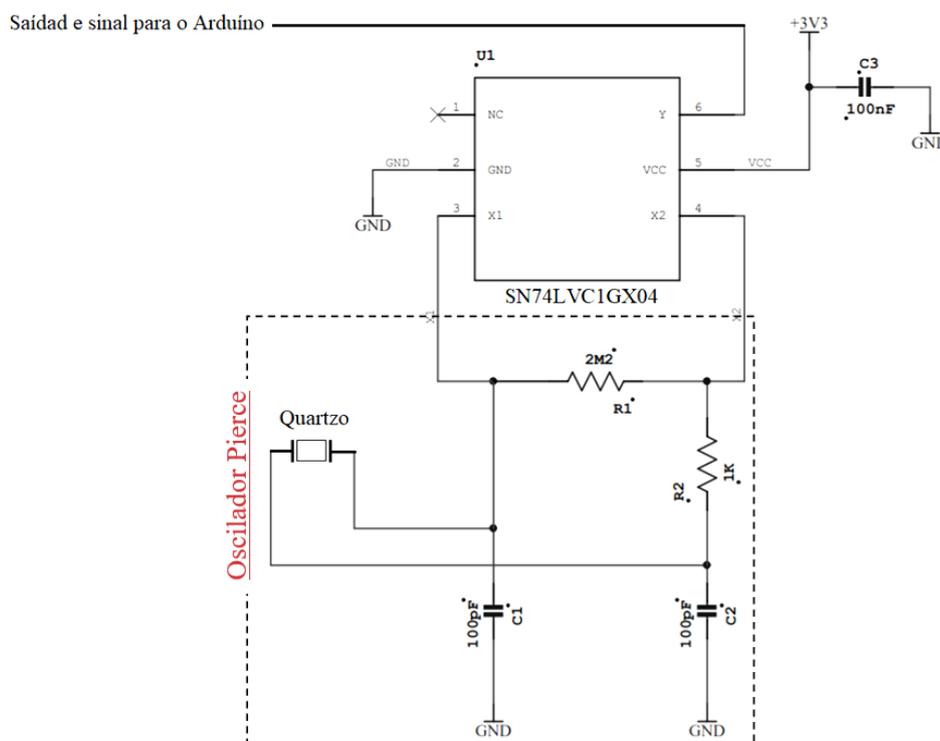
Alimentação externa (não USB) pode ser tanto de um adaptador CA (Corrente alternada) como um CC (Corrente contínua) pilhas ou baterias por exemplo. Os bornes de uma bateria ou fonte podem ser conectados aos pinos GND do inglês (*Graduated Neutral Density filter*) e no pino *Vin*. A voltagem mínima e máxima nesses conectores é respectivamente de 6 a 20V. A corrente máxima suportada é de 50mA. O ATmega32u4 tem 32KB memória, dos quais 4KB são utilizados pelo *bootloader*. Tem também 2,5KB de SRAM do inglês (*Static Random Access Memory*) e 1KB de EEPROM do inglês (*Electrically Erasable Programmable Read Only Memory*) que pode ser lida ou gravada com a biblioteca EEPROM. (BOXALL, 2013; MINNS, 2013; TO BUILD FUTURE TECHNOLOGY, 2017)

Figura 8- Microcontrolador Arduíno



seletivo de alta resolução. (PIERCE, 1923; SILVA, R. H., 2010) O driver SN74LVC1GX04 do oscilador é otimizado para trabalhar com tensão de alimentação de 3,3 V, corrente de saída de ± 24 mA. Essas condições de operação garantem estabilidade de frequência e baixo consumo de energia. O Arduino Micro possui uma fonte de 3,3 V gerada pelo regulador embarcado, o consumo máximo de corrente é de 50 mA. Assim, o pino de 3,3 V é adequado para alimentar o driver do oscilador. O pino de 3,3 V também é regulado quando o Arduino Micro é alimentado pela porta USB. Além disso, o driver do oscilador (IC1) é alimentado nas condições corretas de trabalho. Esta é a solução mais simples, para garantir o desempenho das leituras de frequência da MCQ.

Figura 10 - Circuito do oscilador Pierce



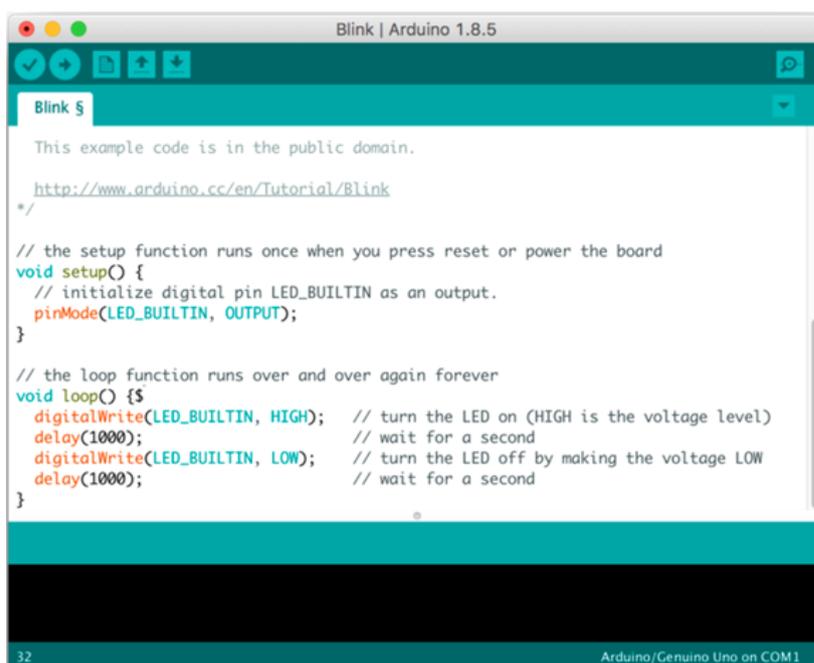
Fonte: (NOVAETECH, 2019)

4.1.3 Softwares utilizados

Dois softwares são necessários para desenvolvimento e operação da MCQ e ambos são de código aberto, são eles: o Arduino IDE (*Integrated Development Environment*) e OpenQCM[®]. O IDE é um aplicativo multiplataforma desenvolvido em linguagem de programação Java. É usado para desenvolver e fazer upload de Scripts de programação em placas compatíveis com Arduino.

O Arduino IDE suporta as linguagens C e C ++, neste caso as regras de estruturação do código são diferentes. O Arduino IDE fornece uma biblioteca de software de projeto, que disponibiliza muitos procedimentos comuns de entrada e saída de dados. O código desenvolvido ou baixado pelo usuário requer apenas duas funções básicas para iniciar, o sketch e o loop principal do programa, que são compilados e vinculados a um *stub do programa main ()* em um script executável com a cadeia de ferramentas GPL (*General Public License*), também incluída na distribuição do IDE (ARDUINO, 2018) O Arduino IDE usa o programa avrdude para converter o código executável desenvolvido em um arquivo de texto em codificação hexadecimal que é carregado na placa do Arduino por um programa carregador no firmware da placa. Na (Figura 11) é apresentado o *Screenshot* do Arduino IDE e nele é mostrado o *Blink*, um programa simples embarcado na placa (BLINK 1.8.5, 2019)

Figura 11 - *Screenshot* Arduino IDE



```

Blink 5
This example code is in the public domain.

http://www.arduino.cc/en/Tutorial/Blink
*/

// the setup function runs once when you press reset or power the board
void setup() {
  // initialize digital pin LED_BUILTIN as an output.
  pinMode(LED_BUILTIN, OUTPUT);
}

// the loop function runs over and over again forever
void loop() {
  digitalWrite(LED_BUILTIN, HIGH); // turn the LED on (HIGH is the voltage level)
  delay(1000); // wait for a second
  digitalWrite(LED_BUILTIN, LOW); // turn the LED off by making the voltage LOW
  delay(1000); // wait for a second
}
32 Arduino/Genuino Uno on COM1

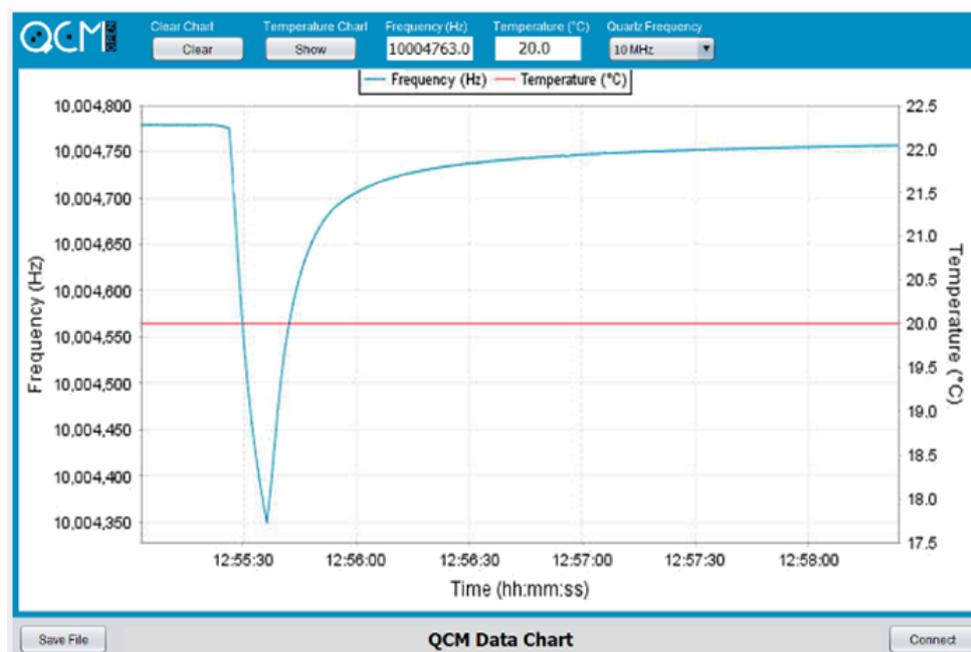
```

Fonte: (Arduíno, 2018)

A versão do IDE utilizado para upload do *firmware* da MCQ foi a 1.8.10 de 13 de setembro de 2019 o repositório utilizado é o github.com/arduino as licenças de uso são LGPL (*Lesser General Public License*) ou GPL (*General Public License*). O segundo software necessário para desenvolvimento da MCQ foi o OpenQCM[®] o projeto do software aproveita os recursos embarcados do *NetBeans* para criar GUI (*Graphic Unit interface*) interface gráfica de usuário (Figura 12). O aplicativo usa as bibliotecas Java de terceiros como: *ArduLink* uma biblioteca de código aberto para controle e comunicação com placas Arduino, entre elas o

Arduíno Micro utilizada nesse projeto. O *Ardulink* também fornece componentes Java *Swing* prontos, capazes de se comunicar com a placa para leitura serial dos dados de frequência e temperatura do cristal de quartzo.

Figura 12 - GUI (*Graphic Unit Interface*) interface gráfica do usuário OpenQCM®



Fonte: (NOVAETECH, 2019)

Para exibições dos dados é utilizado a *JFreeChart* que é uma biblioteca Java de código aberto para plotagem gráfica de dados, essa biblioteca permite a exibição de gráficos em tempo real com leituras de frequência e temperatura. Para que os dados sejam plotados em tempo real e sejam confiáveis, utiliza-se a *CommonsMath*, uma biblioteca de matemática. A medição da frequência do cristal de quartzo é afetada por falhas causadas principalmente pelo algoritmo de contagem do número de pulsos em um intervalo fixo de tempo. A média dos dados da frequência é calculada pela *CommonsMath* ao longo desse intervalo de tempo suaviza as falhas.

A conexão à placa Arduino com o software usa protocolo de comunicação baseado no *Ardulink*, esse protocolo é o mais importante para comunicação entre o computador e a placa conectada na porta serial *portCOM*. A conexão e a comunicação entre a placa Arduino e o PC são implementadas em uma sequência de instruções que resultam na leitura e plotagem das informações de frequência (eixo Y) e temperatura (eixo X), o comando que faz essa plotagem é o *CombinedDomainXYPlot* da biblioteca *JfreeChart*, o gráfico dinâmico plota os dados

versus o tempo atual, usando um primeiro eixo para a frequência e um eixo secundário para a temperatura.

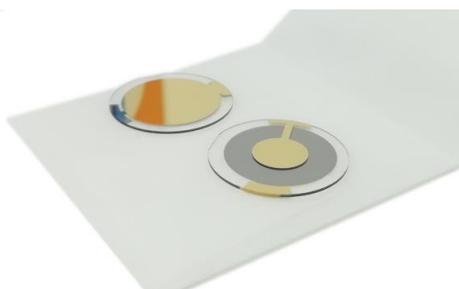
Os dados de frequência e temperatura podem ser salvos em um arquivo de texto no formato ASCII (*American Standard Code for Information Interchange*) Código Padrão Americano para o Intercâmbio de Informação - é um código binário que codifica um conjunto de 128 sinais: 95 sinais gráficos e 33 sinais de controle, utilizando portanto apenas 7 bits para representar todos os seus símbolos. Depois que o arquivo de dados gerado é selecionado, o software anexa os novos dados ao arquivo. O arquivo de dados é formatado da seguinte forma: data (MM / dd / aa) hora (hh: mm: ss) frequência (%. 1f) temperatura (%. 1f) (NOVAETECH, 2019)

4.1.4 Cristal oscilador de Quartzo

Na MCQ proposta utilizou-se cristais de osciladores de quartzo com corte AT (Figura 13), com frequência de oscilação em forma de cisalhamento de 10 MHz colocado entre dois eletrodos de ouro para conexão elétrica. A superfície do cristal de quartzo é plana e polida, ainda necessária limpeza prévia para o uso. A adesão do eletrodo de ouro a superfície é aprimorada usando um substrato de Titânio (Ti). A Sensibilidade nominal do sensor é de $4,42 \times 10^{-9} \text{ g Hz}^{-1} \text{ cm}^{-2}$, a relação entre frequência e estabilidade térmica é de $\pm 20 \text{ KHz}$ a $23 \text{ }^\circ\text{C}$ com densidade de $0,0026497 \text{ Kg / m}^3$ a 25°C .

A espessura de quartzo é de $\sim 160 \text{ }\mu\text{m}$ com diâmetro total de $13,9 \text{ mm}$, já o eletrodo tem diâmetro 6mm revestido com Ouro (Au) a espessura do eletrodo é de $\sim 200 \text{ nm}$ a conexão elétrica se dá pelos eletrodos móveis da câmara de reação da MCQ proposta. O cristal usa conexões tipo HC-48/U. Os dados de área e densidade do eletrodo são úteis para quantificação da massa medida sobre o eletrodo, no entanto esses dados não foram medidos no trabalho (NOVAETECH, 2019)

Figura 13 - Cristais osciladores de quartzo



Fonte: (NOVAETECH, 2019)

4.1.5 Estrutura de proteção dos componentes eletrônicos

Para a construção da estrutura de proteção da MCQ foi utilizado placas de acrílico de 3, 2, e 1 mm de espessura (Figura 14). As placas que compõem o case foram usinados com serra elétrica, as peças de acrílico que constituem a estrutura permanente foram unidas com adesivo líquido tipo cianoacrilato. A juntas móveis foram possíveis com uso de parafusos de 1,5 mm de espessura e 3 mm de comprimento. A estrutura de proteção foi construída para proteção do frequencímetro e do controlador Arduíno, as medidas do case estão ilustradas na (Figura 15). Há duas entradas, uma tipo micro USB para alimentação elétrica e saída de dados para o computador e outra tipo RJ-45, esta liga o sensor da câmara de reação diretamente ao frequencímetro.

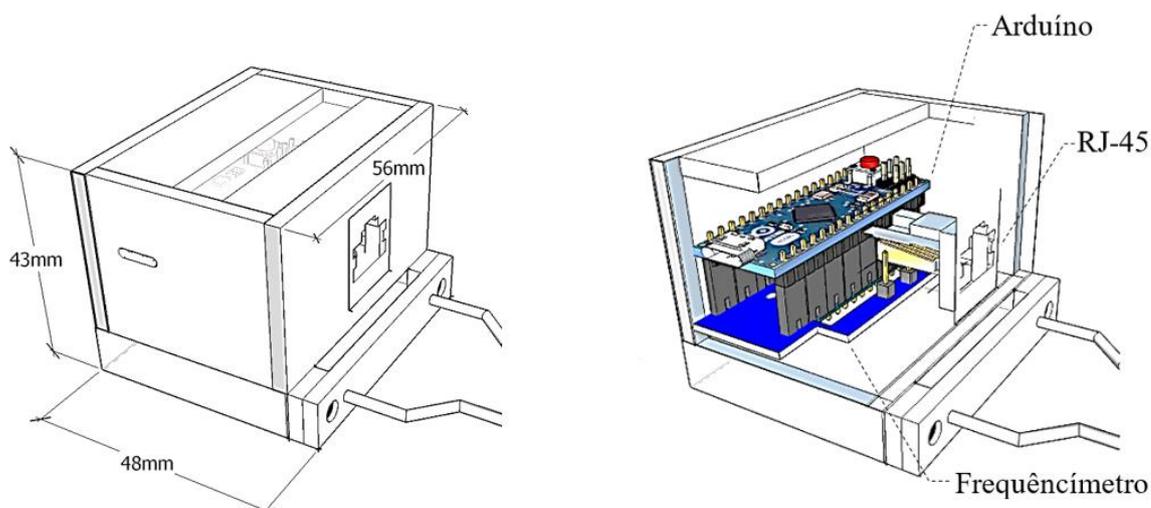
Na imagem também é possível observar o Arduíno micro conectado ao frequencímetro. Todas as partes do desenho de execução do projeto da MCQ foram modeladas com o software SketchUp Make 2017[®]

Figura 14 - Placas de acrílico utilizadas no projeto



Fonte: Próprio autor

Figura 15 - Estrutura de proteção dos componentes eletrônicos

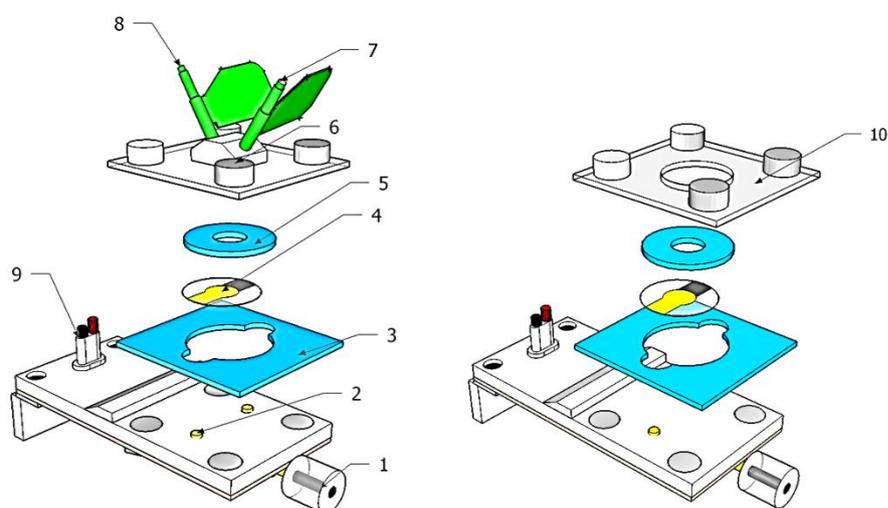


Fonte: Próprio autor

4.1.6 Câmara de reação

A câmara de reação (Figura 16) foi construída com uma variedade maior de materiais em relação a estrutura de proteção, isso por conta da especificidade de seu uso, além dos materiais comuns ao case foram utilizados anéis de silicone (3, 5) para vedação das reações em meio líquido, tubos de 1mm de entrada e saída de reagentes (7, 8), eletrodos de latão de 1mm x 0,5mm para contato elétrico com sensor (2), placa de fenolite com camada única de cobre para construção de circuito elétrico, ímãs de neodímio de 6 mm de diâmetro por 3 mm de altura (6).

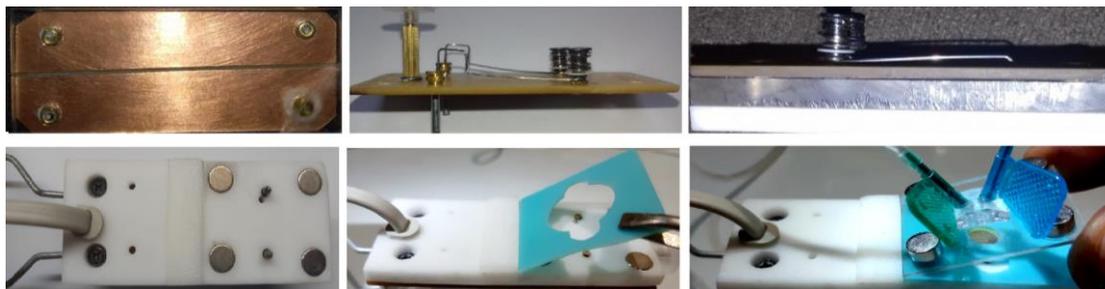
Figura 16 - Câmara de reação



Fonte: Próprio autor

A (Figura 17) ilustra o processo de montagem da câmara de reação, para construção desse componente as peças de acrílico, Placa de circuito cobreado já com os eletrodos de latão montados foram sobrepostas formando três camadas juntas com parafusos M2 2,5 x 6 mm e cola permanente de cianoacrilato. Um conector RJ-45 foi adicionado para capturar o sinal da leitura da câmara reação até o frequencímetro.

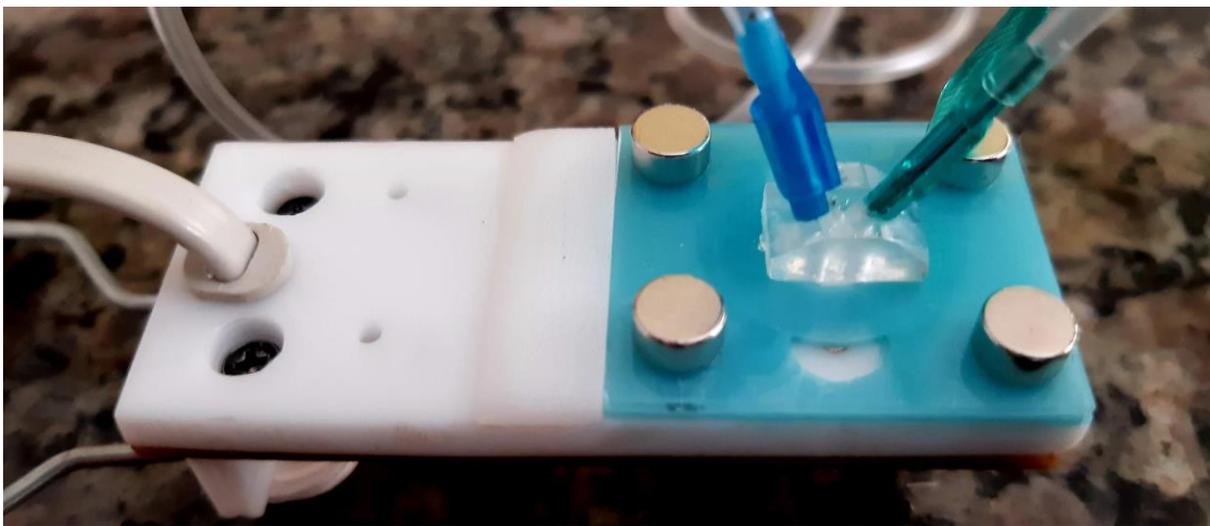
Figura 17 - Processo de montagem da câmara de reação



Fonte: Próprio autor

A (Figura 18) mostra a câmara de reação tipo fechada parcialmente montada. Este modelo exige a colocação de tubos conectados em bomba peristáltica ou bomba tipo seringa para sucção dos reagentes. A conexão do topo seja no modo aberto ou fechado é possível com uso de ímãs neodímio que também oferece vedação por compressão.

Figura 18 - Câmara de reação tipo fechada parcialmente montada



Fonte: Próprio autor

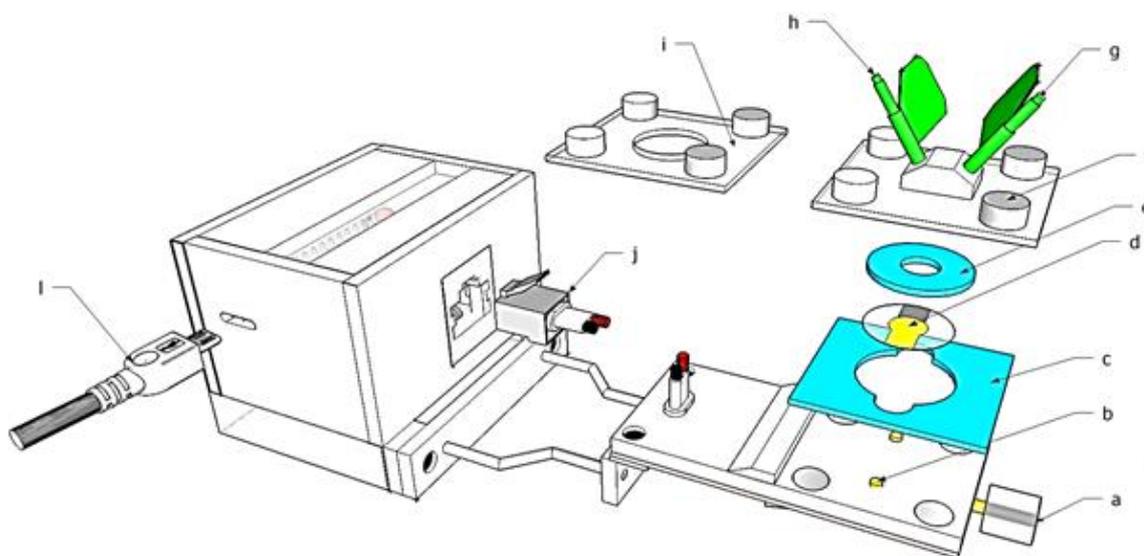
4.1.7 Operação da MCQ

Para operação da Microbalança é necessário garantir boa montagem da câmara de reação, a estanqueidade das substâncias permite confiança nas medições, também é necessário

seguir a ordem correta dos componentes a serem montados. A (Figura 19) apresenta uma visão geral da MCQ em perspectiva explodida. A sequência adequada de montagem da câmara de reação é ilustrada nas fotos a seguir. É necessário delicadeza na montagem das partes para não incorrer em quebra do sensor ou contaminação na superfície do sensor após limpeza dos componentes para montagem da câmara de reação.

Antes da colocação do silicone de vedação os eletrodos móveis (Figura 19b) devem ser rebaixados girando o botão de acionamento (Figura 19a) no sentido horário. É importante perceber se no momento da montagem do sensor, se este está alinhado na câmara de reação conforme Figura 13d esse cuidado previne que os contatos do eletrodo móvel e o eletrodo do sensor seja mal feito, diferente disso as reações no sensor não serão lidas pelo freqüencímetro ou haverá muita instabilidade na leitura.

Figura 19 - Visão geral da MCQ, a) botão de acionamento dos eletrodos móveis, b) eletrodos móveis, c) silicone de vedação, d) sensor MCQ, e) Anel de vedação, f) ímã de neodímio, g) saída de reagente, h) entrada de reagentes, i) câmara aberta de vedação, j) conector USB

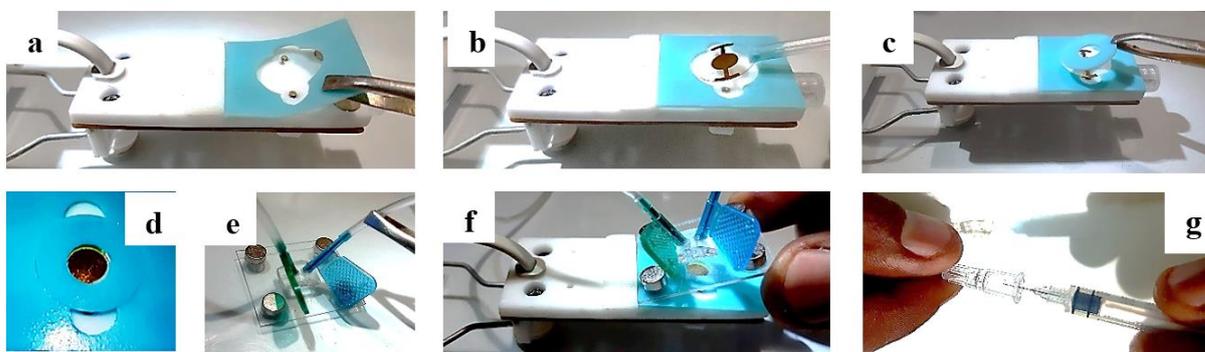


Fonte: Próprio autor

Os tubos de entrada e saída devem ser montados na parte superior da câmara de reação antes da colocação sobre o sensor para evitar danos no mesmo (Figura 20e). Outro ponto crítico é a colocação deste último componente (Figura 20f) isso porque os ímãs de neodímio podem comprimir o sensor de forma abrupta e resultar em danos e mau funcionamento do aparelho. Finalmente conecta-se a seringa para sucção de reagentes (Figura 20g). Aqui cabe outra ressalva, como em todos os aparelhos MCQ que operam em fluxo com câmara fechada, é imprescindível que os reagentes nunca sejam injetados sobre o sensor. Isso porque a forte

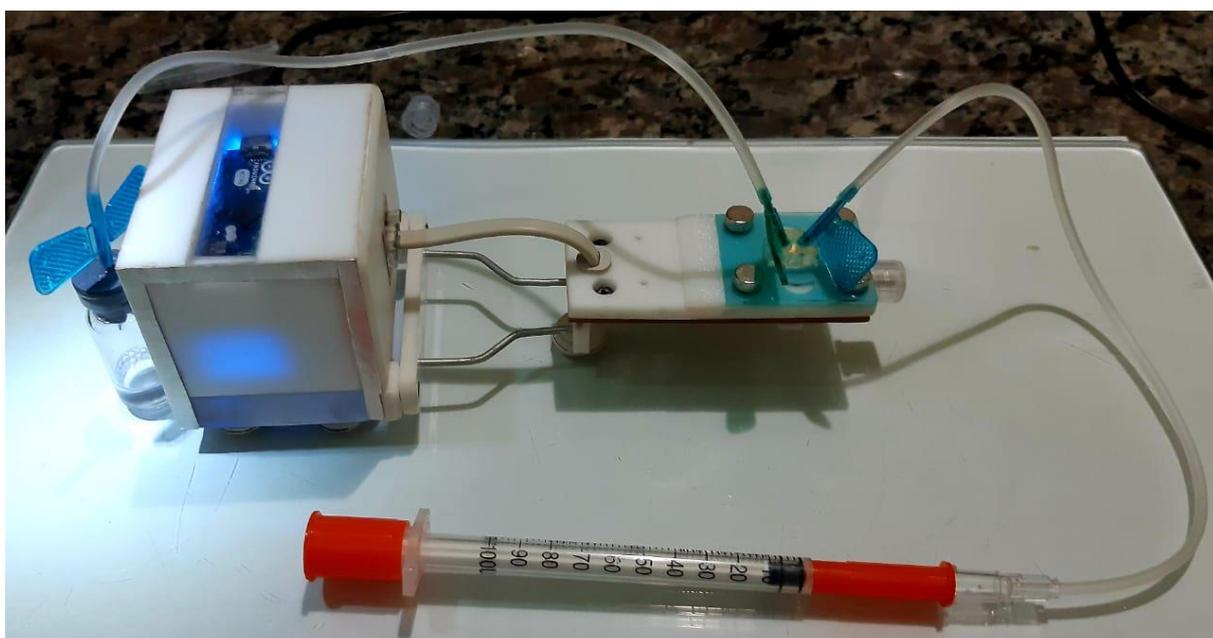
elevação de pressão sobre o sensor provoca variação excessiva na leitura das frequências, outro ponto é que a estanqueidade da câmara fica prejudicada que pode resultar em extravasamento de líquidos nos componentes elétricos. Quando os líquidos são succionados cria-se um vácuo no interior que extraem possíveis bolhas formadas entre o sensor e o anel de vedação, esse vácuo também diminui a possibilidade de formação de bolhas sobre o sensor bem como possibilita que as soluções entrem em contato com toda a área do sensor. A formação de bolhas diminui consideravelmente a capacidade do sensor.

Figura 20 - Fotografia da MCQ - Ordem de montagem da câmara de reação: a) silicone de vedação, b) instalação do sensor MCQ, c) anel de vedação, d) visão superior - alinhamento do sensor na câmara, e) Tubos de entrada e saída de reagentes, f) instalação da parte superior da câmara tipo fechada, g) instalação de seringa



Fonte: Próprio autor

Figura 21 - Fotografia da MCQ completamente montada



Fonte: Próprio autor

4.1.8 Análise de custo da construção da MCQ

A execução do projeto da MCQ apresentou um custo muito inferior comparado com equipamentos de mercado, alcançando assim um dos seus principais objetivos que era o baixo custo de produção. Na (Tabela1) são estratificados os principais custos com componentes para que seja feita uma unidade do equipamento. Não foi possível totalizar os custos por que os custos indiretos deste projeto como tempo, deslocamento de pessoal para pesquisa e aquisição de materiais, gastos com sistemas de informação, eletricidade internet, telefone etc.

O custo dos componentes totalizou, aproximadamente R\$ 726, 65. Vale informar que, nesse valor, não estão inclusos custo de alguns materiais e serviços que foram reciclados de componentes eletrônicos ou doados com fornecedores envolvidos com a proposta do projeto.

Quando comparado com o modelo de referência mais barato disponível no mercado a eQCM 10M *Quartz Crystal Microbalance* do fornecedor Gamry Instruments que custa R\$ 20.827,92 (COOLBAUGH, 2015) observa-se que o valor é aproximadamente 28 vezes menor. Cabe ressaltar também que essa diferença é importante quando se observa o propósito do equipamento proposto, já citado ainda introdução desse estudo.

Tabela 1 - Estratificação dos custos de montagem de uma unidade da MCQ

Item	Dimensões	Unidades	Custo de mercado (r\$)	Custo de aquisição (R\$)
Placas de acrílico	3 mm	6.936 mm ²	1.60	0
Placas de acrílico	1 mm	2.464 mm ²	0.40	0
Placas de acrílico	10 mm	1.938 mm ²	4.45	0
Frequencímetro	17,7 x 48,2 mm	1	240.00	240
Placa Arduíno micro	17,7 x 48,2 mm	1	15.00	15
Parafuso	M2 2,5 x 6 mm	10	0.10	0
Manta de silicone	1 mm	2.464 mm ²	0.30	0
Disco de quartzo	10 MHz 13,9 mm	10	450.00	450
Imãs de Neodímio	3 x 6 mm	8	10.00	10
Placa de circuito cobreada	1 mm	1.701 mm ²	7.65	7.65
Cola cianoacrilato	10 mL	1	4.00	4
Conector RJ-45	13 x 14 mm	1	0.10	0
Tubos de silicone	2 x 154 mm	2	2.00	0
Barra eletrodo latão	10 mm	2	0.50	0
TOTAL			736.10	726.65

Fonte: Próprio autor

4.1.9 Estudo da capacidade de análise em meio líquido

Para a verificação da Microbalança de cristal de quartzo utilizou-se água pura, de acordo com a teoria baseada na (equação 1) de Kanazawa – Gordon essa equação expressa a variação de frequência de um cristal de quartzo em contato com um líquido em termos de parâmetros físicos do fluido e do quartzo (KEIJI KANAZAWA; GORDON, 1985). A relação é:

Equação 1 - Equação de Kanazawa – Gordon

$$\Delta f = -f_0^{\frac{3}{2}} \cdot \left(\frac{\eta_L \rho_L}{\pi \mu_Q \rho_Q} \right)^{1/2}$$

Onde:

f_0 = frequência de vibração nominal do cristal seco

η_L = viscosidade absoluta do cristal de quartzo

ρ_L = densidade do líquido

μ_Q = módulo de cisalhamento do cristal de quartzo

ρ_Q = densidade do cristal de quartzo

De modo mais simples, a variação de no padrão de ressonância de um cristal de quartzo em meio líquido depende do produto da densidade-viscosidade do líquido estudado. A equação acima é dependente das seguintes características: i) o cristal de quartzo é um sólido mas com propriedades elásticas, há dissipação e energia na estrutura do cristal bem como na estrutura da câmara ii) o líquido é newtoniano, o que significa que é um líquido puramente viscoso; iii) o líquido –se assemelha a uma camada infinita, assim a penetração da onda de cisalhamento é muitas vezes menor que a espessura do líquido.

Foi utilizado um disco de quartzo de 10 MHz com corte AT e eletrodo de ouro de 6 mm de diâmetro. Água pura foi injetada na câmara de reação da MCQ usando uma bomba de seringa. O volume da câmara de medição é de aproximadamente 28 μL . Os parâmetros físicos do fluido e do quartzo são:

$$f_0 \cong 10 \text{ Mhz}$$

$$\eta_L = 1.002 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \quad (T = 20^\circ)$$

$$\rho L = 0.9982 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3} (T = 2 - 20^\circ)$$

$$\mu Q = 2.947 \times 10^{11} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{s}^{-2}$$

$$\rho Q = 2.648 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$$

Ainda de acordo com a equação de Kanazawa - Gordon, a variação de frequência do ar para a água destilada é $\Delta f = 2020 \text{ Hz}$ (KEIJI KANAZAWA; GORDON, 1985).

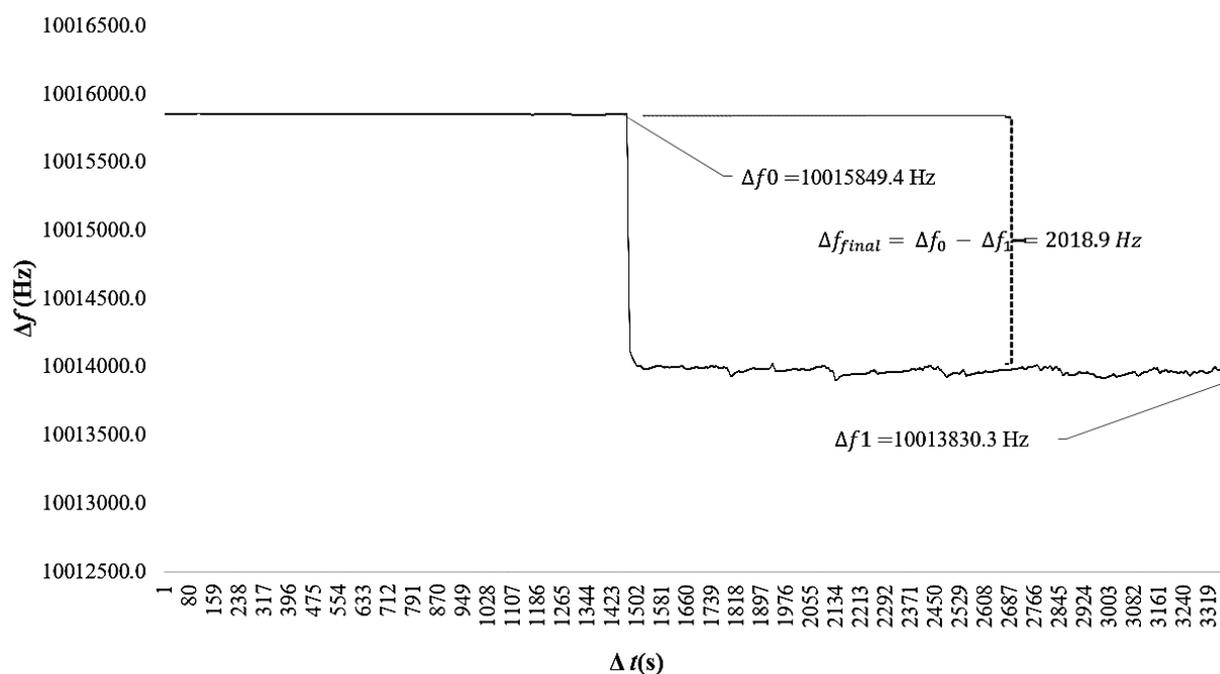
A mudança de frequência causada pela injeção de água pura na câmara de reação foi medida usando o seguinte procedimento: A MCQ foi conectada via porta USB e aguardou-se o tempo de estabilização de temperatura e frequência estacionária. Após 30 minutos a frequência inicial da MCQ foi medida e registrada durante um intervalo de mais 30 minutos.

A frequência inicial corresponde ao cristal de quartzo em contato com o ar. Após a medição da frequência de contato com ar, água MiliQ foi injetada na câmara usando bomba tipo seringa. Um novo período estacionário de 30 minutos foi aguardado, as leituras da MCQ foram registradas. A frequência final corresponde ao cristal de quartzo em contato com água.

O resultado da frequência do cristal na mudança do ar para água é calculado como a diferença da frequência final no ar (Δf_0) menos a frequência final na água (Δf_1), como mostrado na (Figura 22). Os resultados dos testes demonstram $\Delta f_0 = 10015849.4 \text{ Hz}$ e $\Delta f_1 = 10013830.3 \text{ Hz}$ mostraram uma boa concordância entre a mudança de frequência medida pela MCQ na mudança da interface do ar para a água pura, a determinação matemática da equação de Kanazawa Gordon também foi confirmada.

A equação prevê uma variação na frequência de ressonância na ordem de 2020 Hz. O resultado calculado no teste é de 2018,9 Hz, a diferença para o valor teórico ideal é de $\pm 1,1 \text{ Hz}$ para um cristal de quartzo de 10 MHz na mudança da interface ar para a água pura à temperatura de 20°C. A variação de frequência medida usando a MCQ proposta está muito próxima ($\Delta f_{final} = 2018.9 \text{ Hz}$) do valor teórico. O teste e os resultados aqui relatados mostraram a sensibilidade do equipamento proposto para operação em meio líquido, a diferença encontrada neste teste é obstáculo suficiente para alcançar um dos objetivos propostos uma vez que se optou por hardware e software de baixo de custo em que esperava-se possíveis divergências entre valores teóricos e valores medidos.

Figura 22 – Gráfico da variação de frequência na mudança de interface ar-água para confirmação da equação de Kanazawa – Gordon



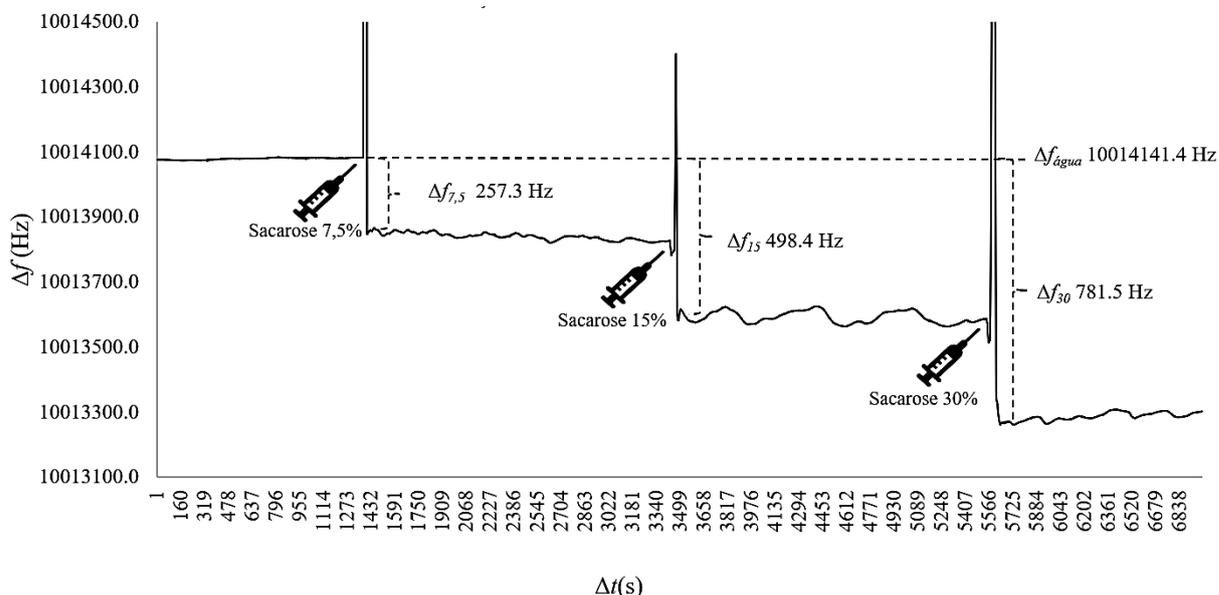
Fonte: Próprio autor

4.1.10 Estudo da capacidade de análise gravimétrica em meio líquido

Para este estudo. Foram preparadas três soluções com diferentes concentrações de sacarose 7,5%, 15% e 30% peso/volume (p/v).

Uma bomba tipo seringa foi utilizada para injetar as diferentes concentrações na câmara de reação. As soluções foram bombeadas até observação de que a câmara estava totalmente preenchida com a nova solução. Em seguida, a variação de frequência foi aferida em estado estacionário. A medição de frequência foi realizada sempre no equilíbrio de condições estáticas dos líquidos, a câmara de reação foi lavada com água destilada entre injeções das soluções. De fato, o que foi medido nesse experimento foram as variações de frequência causadas por mudança de massa devido ao processo de alteração de densidade e viscosidade da amostra líquida. Essas duas características não são dissociáveis, por isso é necessário lavar a câmara de reação antes de cada nova injeção. Desta forma, é possível medir e comparar a mudança de frequência causada por soluções com diferentes concentrações de sólidos dissolvidos. A variação de frequência da MCQ durante todo o teste com diferentes concentrações de sacarose é mostrada na (Figura 23).

Figura 23 – Gráfico da variação de frequência da MCQ causado por injeções sucessivas de água e sacarose em diferentes concentrações 7,5, 15 e 30 % p/v.



Fonte: Próprio autor

A maior variação no sinal de frequência, indicada pelos picos no gráfico, é causada principalmente pela variação abrupta de pressão na superfície do cristal de quartzo devido a injeção de líquido. Mas, essa variação é transitória e não é considerada. É importante notar que o processo de regeneração do sensor não foi medido após as injeções sucessivas. No entanto, a estabilidade do sinal referente a leitura da água ($\Delta f_{\text{água}}$) serve como parâmetro branco ou “0” para cálculo diferencial com as diferentes concentrações. Na (Tabela 2) é mostrada a frequência medida na MCQ para as três concentrações, a diminuição de frequência em relação a água pura também foi medida.

Tabela 2 - Variação de frequência medida nas diferentes concentrações de sacarose

Soluções	Frequência (Hz)	Δf (Hz)
Água	10014141.4	0
Sacarose 7,5%	10013824.8	257.3
Sacarose 15%	10013583.7	498.4
Sacarose 30%	10013300.6	781.5

Fonte: Próprio autor

Este resultado aqui relatado mostra que equipamento proposto responde a variações de concentração de soluto. No entanto para elaboração do teste de ajuste linear e outras provas

estatísticas fez-se necessário aumentar o número de análises. A MCQ foi submetida a solução de glicose em água que variaram de 1,6 a 90 mg/mL. Os valores de frequência estáveis para cada concentração são mostrados na (Tabela 3).

Tabela 3 - Frequências estáveis de diferentes concentrações de solução de glicose

Análises	Concentração de glicose (mg/mL)	Frequência (Hz)
1	1,6	10006837.3
2	3,1	10006805.5
3	6,3	10006778.7
4	12,5	10006744.5
5	25	10006656.0
6	50	10006495.2
7	2,2	10006861.4
8	4,4	10006847.5
9	8,8	10006825.5
10	17,5	10006783.9
11	35	10006684.7
12	70	10006459.7
13	2,8	10006870.0
14	5,6	10006851.8
15	11,3	10006817.8
16	22,5	10006750.4
17	45	10006594.4
18	90	10006286.9

Fonte: Próprio autor

Para a verificação da adequação do modelo os dados foram submetidos a Análise de Covariância – ANOVA. A (Tabela 4) mostra os resultados desse tratamento.

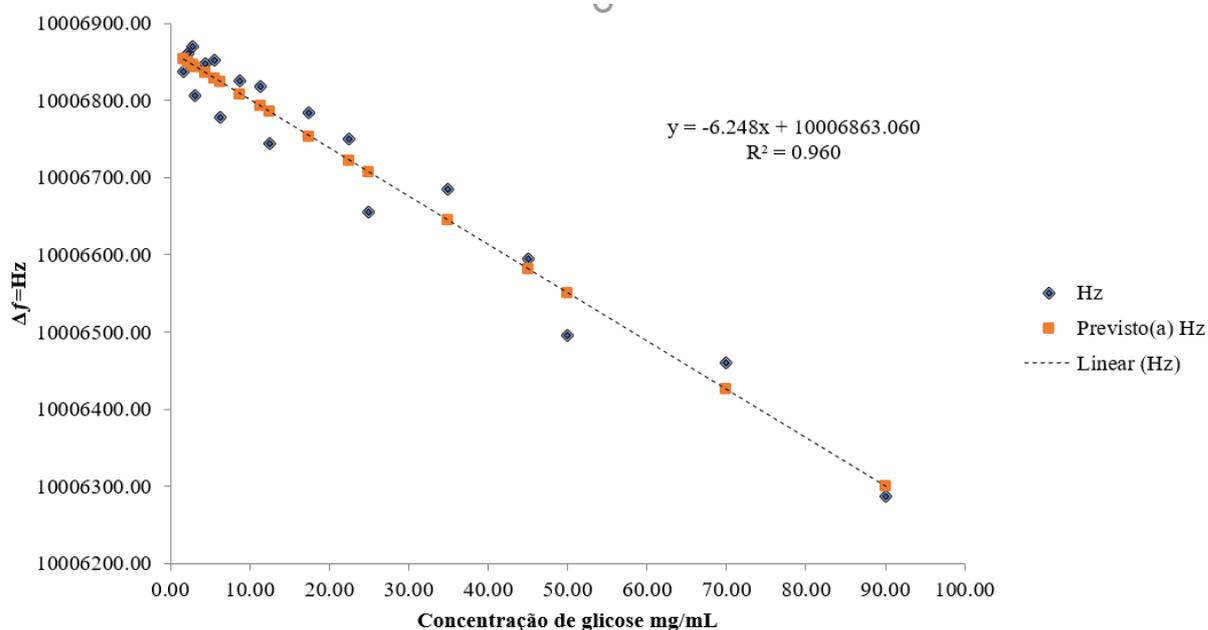
Tabela 4 – Análise de Covariância – ANOVA

Fonte da Variação	Grau de Liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	<i>p</i>
Regressão	1	435662.880	435662.880	382.488	< 0.001
Resíduo	16	18224.402	1139.025		
Total	17	453887.282			

Fonte: Próprio autor

A regressão linear simples (Figura 24) mostrou que a variação da concentração de glicose nas soluções prevê a variação da frequência medida na MCQ [F (1, 16) = 382.487, p < 0,001; R² = 0,959]

Figura 24 – Gráfico do ajuste linear da concentração de glicose e variação da frequência



Fonte: Próprio autor

4.1.11 Elaboração de imunossensores tipo Au-Cisteamina-GLU-mAb-IgG

Para elaboração de um imunossensor a correta imobilização dos elementos de bioreconhecimento é um fator crítico, o que melhora significativamente a sensibilidade e reprodutibilidade analítica. (RADI et al., 2009) Um dos protocolos mais amplamente utilizados para imobilizar anticorpos em superfícies metálicas tem sido a ligação por monocamadas automontadas (ARYA et al., 2009)

Nas SAM's dos tióis são obtidos por um processo simples de imersão do metal de interesse em uma solução diluída contendo cadeias tioladas de alcano preparados em solventes orgânicos, esses solventes variam de acordo com o protocolo empregado. (DUTRA et al., 2007)

As monocamadas são quimicamente ligadas em superfícies de metais nobres, que são utilizados devido à forte ligação do enxofre nesses metais (VERICAT et al., 2006). SAM's podem ser usadas para imobilizar anticorpos próximos à superfície do eletrodo com muito controle e orientação. (WANG, X. H.; WANG, 2008)

O uso de grupos funcionais apropriados para ligar anticorpos via monocamadas autoorganizadas forma ligações fortes e irreversíveis na superfície do sensor, estas características podem permitir o reuso do sistema analítico. Nesta sessão será descrito o processo de elaboração de um microimunossensor MCQ baseado na SAM para detecção de anticorpos.

O anticorpo monoclonal de camundongo anti-humano (mAb-IgG Anti-humano) e o IgG-Humano foram adquiridos da (EBRAM, São Paulo - Brasil). Os demais reagentes são: água ultrapura MilliQ (Merck, São Paulo - Brasil), Cisteamina (LEMMA, São Paulo - Brasil) CAS [156-57-0], glutaraldeído a 25% (DINÂMICA, Indaiatuba - Brasil) CAS [111-30-8], glicina (Vetec, Campinas - Brasil) CAS [50-40-6], Ácido Clorídrico - HCL 37% (NEON, Suzano - Brasil) CAS [7647-01-0], Tampão Fostato Salino do inglês *Phosphate Buffered Saline* (PBS), Albumina Bovina Sérica – (BSA) do inglês *Bovine Serum Albumin* (Sigma-Aldrich, São Paulo - Brasil) CAS [9048-46-8] Álcool Metílico absoluto (Química Moderna, São Paulo - Brasil) CAS [67-17-5]. Solução de glicina ácida pH 3,0 a 0,1 M preparada com 750 mg de glicina e 83, 2 mg de HCL em água. Todos os reagentes foram preparados com produtos químicos de qualidade analítica.

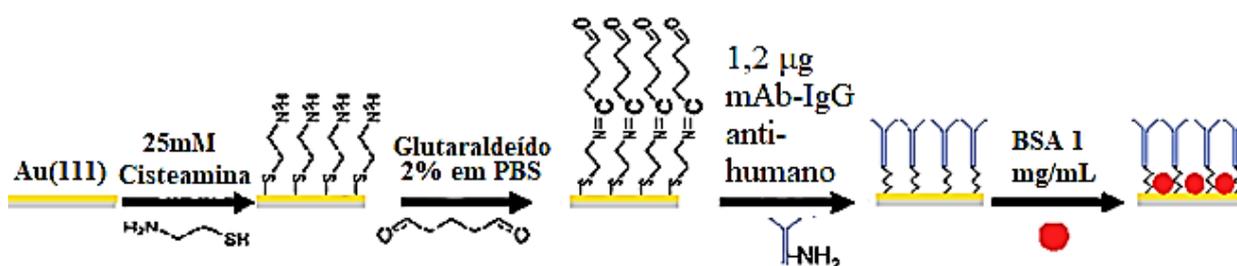
Para o preparo da superfície de biorreconhecimento o eletrodo de ouro do sensor MCQ foi limpa com a solução “piranha” preparada na proporção 1:3 partes de H₂O₂ 30% v/v em H₂SO₂ concentrado por 2 minutos, em seguida lavada com água ultrapura. Depois os sensores MCQ foram submersos em álcool metílico em câmara úmida sob agitação constante por 30 minutos. A SAM foi preparado por imersão do sensor em uma solução de Cisteamina a 25 mM em etanol, colocado em câmara úmida por 2h. Em seguida, os sensores foram cuidadosamente lavados com PBS por 4 min, seguido por uma imersão de solução recente de glutaraldeído a 2 % (v/v) em PBS a 50 mM (pH 7,4) por 45 minutos em câmara úmida sob agitação constante.

Por fim, as SAM's foram formadas, exceto a camada do mAb-IgG anti-humano. Para este procedimento uma solução de mAb-IgG anti-humano (1,2 µg/mL), preparada em PBS, foi pipetada (100 µL) no eletrodo de quartzo e deixada em repouso por 1h em câmara úmida para evitar evaporação. Neste momento, a ligação covalente pelo grupo reativo da amina do mAb-IgG com os terminais de aldeído é efetivada. Em seguida, o sensor de quartzo agora funcionalizado com a molécula de biorreconhecimento, foi lavado com solução de PBS e inserido na câmara de reação fechada, nesse momento a câmara de reação foi preenchida com PBS e ligada ao software de análise para registro dos dados de frequência em fase estacionária por 30 minutos. Para bloqueio de ligações inespecíficas, uma solução de 1 mg/mL de BSA em

PBS foi injetada na câmara de reação, as leituras de frequência foram feitas por 30 minutos em fase estacionária.

A resposta analítica foi avaliada a partir da injeção de 1,4 $\mu\text{g/mL}$ de IgG-humano preparado em PBS até preenchimento da câmara de reação, as leituras de frequência foram feitas por 30 minutos em fase estacionária. O imunossensor foi regenerado desfazendo o complexo antígeno anticorpo pelo uso de solução ácida de glicina pH 3,0. Em seguida, PBS foi injetada na câmara de reação. As leituras de frequência foram feitas por 60 minutos em fase estacionária. A (Figura 25) resume o processo de imobilização orientada dos anticorpos que neste estudo são as estruturas de biorreconhecimento.

Figura 25 - Processo de imobilização orientada de anticorpos



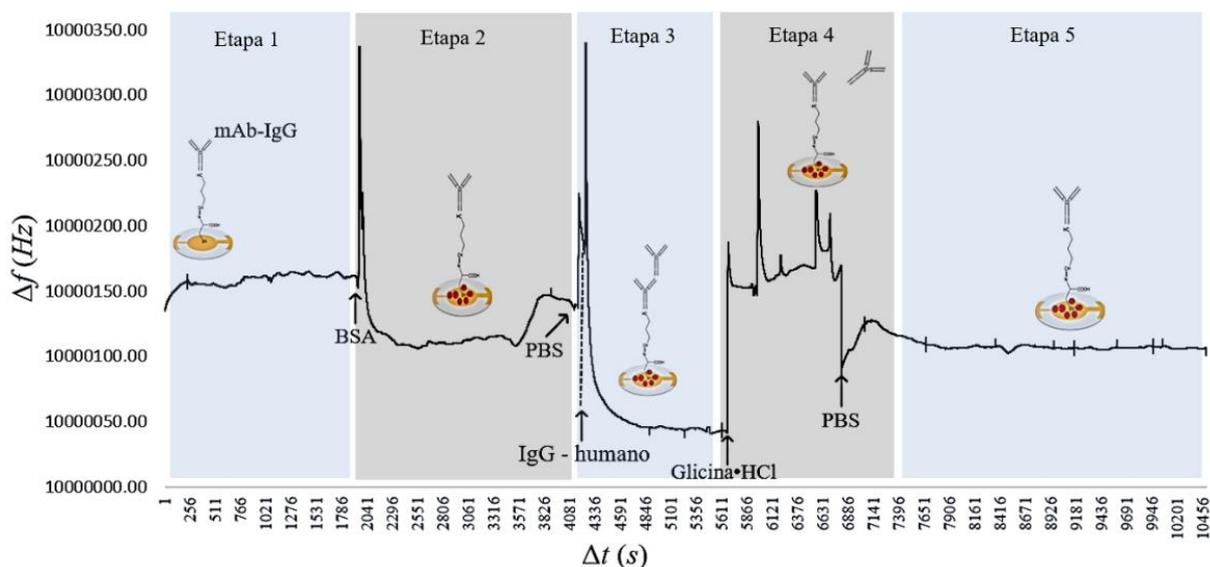
Fonte: adaptado de (POITRAS; TUFENKJI, 2009)

4.1.12 Análise da capacidade de reconhecimento de antígenos meio líquido

Para o imunossensor MCQ, a quantidade ideal de anticorpos imobilizados pode ser estabelecida em relação ao valor máximo de interações antigênicas. (CHEN, Z. G.; TANG, 2007) Na maioria dos estudos, diferentes concentrações de uma estrutura de biorreconhecimento são testadas para se encontrar a concentração ótima a ser imobilizada.

Neste estudo utilizou-se estruturas para as quais já se conhece a concentração ótima, no caso 1,2 $\mu\text{g/mL}$ nesta concentração (MATTOS et al., 2012) estabeleceu o valor máximo da mudança de frequência como resultado do equilíbrio máximo exigido para imobilizar o mAb-IgG anti-humano na superfície do eletrodo MCQ. A quantidade de mAb-IgG anti-humano que é imobilizada na superfície do cristal pode alterar o desempenho do imunossensor por conta da variação da disponibilidade de grupos reativos funcionais no sensor (ZHANG et al., 2004) A concentração ótima de cisteamina para este estudo é 25 mM, enquanto a concentração de glutaraldeído foi fixado em 2% (v/v) (POITRAS; TUFENKJI, 2009) A resposta analítica do imunossensor é mostrada na (Figura 26).

Figura 26 - Resposta analítica e regenerativa do imunossensor



Fonte: Próprio autor

A regeneração da camada funcionalizada é importante para os biossensores reutilizáveis, mas costuma ser um processo delicado. Após a ligação do alvo com o mAb-IgG anti-humano uma solução glicina/HCl pH 3,0 a 0,1 M foi injetada no sistema.

A glicina HCl é um dos reagentes mais comuns para dissociar complexos antígeno-anticorpo (SCHLECHT et al., 2006; TOMBELLI; MASCINI; TURNER, 2002). Isso resultou na liberação do IgG-humano como mostra a (Figura 20 Etapa 4), é possível verificar que a frequência de ressonância retorna ao estágio anterior após a injeção de glicina. A média de frequência na fase estável de reconhecimento do alvo foi de 10000110.95 Hz enquanto a de regeneração foi de 10000106.69 Hz. A diferença entre elas é de apenas ± 4.26 Hz, isso demonstra a similaridade das duas fases e indica a eficiência da dissociação do alvo da molécula de biorreconhecimento. No entanto, ainda é necessário um novo ciclo de adição do alvo (Etapa 3) para verificar se a molécula de biorreconhecimento não foi danificada no processo de regeneração (PIRINCCI et al., 2018)

Os anticorpos imobilizados podem ter sido irreversivelmente danificados ou terem sua conformação espacial modificada, isso diminuiria substancialmente a capacidade de reconhecimento do sensor. Embora biossensores à base de anticorpos possam ser reutilizáveis (WANG, D. et al., 2013), uma perda de atividade do anticorpo imobilizado sempre acontece no processo de regeneração mesmo que este seja muito ajustado. Nesse caso, injeções subsequentes de analito poderiam demonstrar quanto de dano o sensor sofre após a

regeneração, mensurar a diminuição de eficiência e estabelecer o número de ciclos analíticos do sensor.

Mattos (2012) utilizando protocolo semelhante ao desse estudo estabeleceu que os sensores MCQ testados podiam ser usados continuamente por 10 vezes, e as mudanças de frequência relativa obtidas tinham alto grau de similaridade, em torno de 80% da resposta obtida no primeiro ciclo.(MATTOS et al., 2012)

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo teve como objetivo principal a implementação de um protótipo de Microbalança de cristal de Quartzo de baixo custo capaz de realizar teste de gravimétricos e de interação entre moléculas bioativas. Para tanto, foi desenvolvido um protótipo funcional a partir de materiais de fácil acesso que detecta a variação de massa de solutos dissolvidos e interação de biomoléculas em eletrodo específico, processa e transmite sinais para um software, que mostra essas interações em tempo real e armazena os dados.

Esta pesquisa possibilitou a aplicação e o uso de técnicas de projeto e construção de dispositivos micro eletromecânicos destinados a implementação e desenvolvimento de ferramenta de ensino capaz de aproximar do ambiente acadêmico técnicas de análises micrométricas e moleculares. A utilização de solutos diluídos com diversas variações de concentração mostrou-se eficaz como ferramenta de validação dos testes micrométricos de massa.

A escolha do Arduíno micro® como dispositivo controlador do frequencímetro foi essencial para se chegar à solução final. Com o uso desse controlador, foi possível evitar o investimento de tempo e recursos no desenvolvimento de dispositivo capaz de comunicação de dados rápida e estável com o computador. Outra funcionalidade adquirida pelo uso Arduíno foi a capacidade de ajuste simplificado da comunicação com computador, alimentação de todo o sistema via porta USB, dispensado o desenvolvimento de sistema para esse fim, a disponibilidade de ampla biblioteca de scripts de forma gratuita, linguagem de programação fácil e software intuitivo.

Esses foram exemplos práticos de como essa placa de prototipagem contribuiu no desenvolvimento do protótipo. permitindo abordagem corretiva dos mecanismos de ajuste sempre que necessário, melhorando a performance e a qualidade dos resultados. Contudo, a montagem do sensor nos eletrodos da MCQ ainda necessita de uma série de passos e cuidados

para um selamento perfeito da câmara de reação, em um trabalho futuro, poderão ser realizados testes com um sistema de selamento mais ágil e seguro.

É necessária aplicação de novos testes com outros equipamentos existentes, a fim de verificar a acurácia com os resultados de outros trabalhos relacionados as duas proposições deste. Outro ponto de destaque é ao intervalo de tempo gasto para as análises, cada ponto analítico precisa de no mínimo 30 minutos para estabilidade do sinal. Para essa característica, se for levado em consideração a redução do tempo, haveria um impacto significativo no volume de pontos de análise.

Quanto à funcionalidade do sistema proposto, foram detectadas algumas limitações, como, por exemplo, alta sensibilidade a variações na rede elétrica, assim a estabilidade ótima do sistema só foi atingida com uso notebooks ou desktops desligados da rede elétrica. A conexão em rede sem uso de algum tipo de estabilizador pode vir a prejudicar desempenho do equipamento.

Neste estudo foi abordado uma tecnologia muito atrativa e relativamente simples para pesquisa e desenvolvimento, de instrumentos didáticos e de pesquisa básica, que pode ser muito útil para aproximar a teoria da análise molecular com prática dentro do universo acadêmico. As técnicas microanalíticas e de interação biomolecular estão disponíveis a muito tempo e com nível de sofisticação altíssimo assim como o investimento para sua aquisição. No entanto, ainda falta no mercado instrumentos voltados para o ensino com que ofereçam a oportunidade de contato com essas tecnologias, para que se possa ainda nos primeiros anos de uma graduação ou mesmo no ensino técnico pensar em implementação, seja de protocolos de uso ou da tecnologia em si. A solução proposta, neste estudo, se mostrou bastante viável, considerando a proposta de uso e o acerto das análises durante o desenvolvimento. A maior parte dos testes realizados obtiveram resultados satisfatórios, salvo algumas limitações já discutidas. Espera-se que seu conceito não mais esteja associado a algo “intangível”.

Como proposta de melhorias futuras, destacam-se: sofisticação do design, simplificação no processo de montagem do sensor, miniaturização dos sistemas eletrônicos, implementação de um sistema de detecção de energia dissipada que aumentaria significativamente a qualidade da análise de moléculas bioativas.

REFERÊNCIAS

- ACERO SÁNCHEZ, J. L. et al. Site-directed introduction of disulfide groups on antibodies for highly sensitive immunosensors. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 19, p. 5337–5346, 1 jul. 2016.
- ADAK, A. K. et al. Fabrication of antibody microarrays by light-induced covalent and oriented immobilization. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 6, n. 13, p. 10452–10460, 9 jul. 2014. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/am502011r>>. Acesso em: 14 nov. 2019.
- AFZAL, A. et al. **Gravimetric viral diagnostics: QCM based biosensors for early detection of viruses**. **Chemosensors**. [S.l.]: MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute. , 1 mar. 2017
- ANDRADE, S. M. de; STEFANO, S. R.; ZAMPIER, M. Metodologia de pesquisa. **Rev. bras. enferm**, v. 17, n. 5, p. 217–22, 2010. Disponível em: <<http://get.adobe.com/br/reader/>>. Acesso em: 19 fev. 2020.
- ARDUINO. **Arduino IDE Software**. Disponível em: <<https://www.arduino.cc/en/main/software>>. Acesso em: 14 nov. 2019.
- ARYA, S. K. et al. Recent advances in self-assembled monolayers based biomolecular electronic devices. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 9, p. 2810–2817, 15 maio 2009.
- BADAMASI, Y. A. The working principle of an Arduino. set. 2014, [S.l.]: IEEE, set. 2014. p. 1–4. Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/document/6997578/>>. Acesso em: 12 out. 2019.
- BLINK 1.8.5, A. **Arduino - Getting Started**. Disponível em: <<https://www.arduino.cc/en/Guide/HomePage>>. Acesso em: 14 nov. 2019.
- BOTTEON, M. M. et al. **Metodologia para ensino de membranas seletivas: PVC e celulose como exemplos**. **Boletim Técnico da FATEC-SP - BT**. São Paulo: [s.n.], 2007. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/264876930>>. Acesso em: 10 dez. 2019.
- BOTTOM, V. E. A History of the Quartz Crystal Industry in the USA. 16 set. 2008, [S.l.]: Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE), 16 set. 2008. p. 3–12.
- BOXALL, J. **Arduino Worskhop - A hands-on introduction with 65 Projects**. [S.l.]: No Starch Press, 2013.
- BUTLER, J. E. et al. The physical and functional behavior of capture antibodies adsorbed on polystyrene. **Journal of Immunological Methods**, v. 150, n. 1–2, p. 77–90, 24 jun. 1992.
- BUTLER, John E. Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays. **Methods in molecular medicine**, v. 94, p. 333–372, 2004.
- CAMPBELL, G. A. et al. Detect of Escherichia coli O157:H7 in ground beef samples using piezoelectric excited millimeter-sized cantilever (PEMC) sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 7, p. 1296–1302, 15 fev. 2007.

CARRIGAN, S. D.; SCOTT, G.; TABRIZIAN, M. Real-time QCM-D immunoassay through oriented antibody immobilization using cross-linked hydrogel biointerfaces. **Langmuir**, v. 21, n. 13, p. 5966–5973, jun. 2005. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la0503294>>. Acesso em: 14 nov. 2019.

CERVO, A. L.; BERVIAN, P. A.; SILVA, R. **Metodologia científica 6. ed.** [S.l.]: Pearson Prentice Hall, 2007.

CHEN, S. et al. Controlling antibody orientation on charged self-assembled monolayers. **Langmuir**, v. 19, n. 7, p. 2859–2864, abr. 2003. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la026498v>>. Acesso em: 14 nov. 2019.

CHEN, X. et al. Characteristics of {NixFe}100-x films deposited on {SiO}2/Si(100) by {DC} magnetron co-sputtering. **Vacuum**, v. 75, n. 3, p. 217–223, jul. 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016%2Fj.vacuum.2004.03.001>>.

CHEN, Z. G.; TANG, D. Y. Antigen-antibody interaction from quartz crystal microbalance immunosensors based on magnetic CoFe₂O₄/SiO₂ composite nanoparticle-functionalized biomimetic interface. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 30, n. 4, p. 243–249, jul. 2007.

COOK, G. P.; TOMLINSON, I. M. The human immunoglobulin VH repertoire. **Immunology Today**, v. 16, n. 5, p. 237–242, 1995.

COOLBAUGH, M. **Electrochemical Workstation for Research on Chemical Surface Modifications and Characterization of Novel Conductive Polymers.** . Charlotte, NC: [s.n.], 2015. Disponível em: <<https://apps.dtic.mil/dtic/tr/fulltext/u2/1080774.pdf>>. Acesso em: 14 fev. 2020.

CRIVIANU-GAITA, V.; THOMPSON, M. **Immobilization of Fab' fragments onto substrate surfaces: A survey of methods and applications.** **Biosensors and Bioelectronics.** [S.l.]: Elsevier Ltd. , 5 ago. 2015

DELLA VENTURA, B. et al. Light assisted antibody immobilization for bio-sensing. **Biomedical Optics Express**, v. 2, n. 11, p. 3223, 1 nov. 2011. Disponível em: <<https://www.osapublishing.org/boe/abstract.cfm?uri=boe-2-11-3223>>. Acesso em: 30 jul. 2019.

DENG, T. et al. Piezoelectric immunoassay for complement C4 based on a Nafion-modified interface for antibody immobilization. **Journal of Immunological Methods**, v. 299, n. 1–2, p. 1–8, abr. 2005.

DIXON, M. C. Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring: Enabling real-time characterization of biological materials and their interactions. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 19, n. 3, p. 151–158, jul. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19137101>>. Acesso em: 28 set. 2019.

DUTRA, R. F. et al. Surface plasmon resonance immunosensor for human cardiac troponin T based on self-assembled monolayer. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 5, p. 1744–1750, 11 abr. 2007.

DUVAL, F.; VAN BEEK, T. A.; ZUILHOF, H. **Key steps towards the oriented**

immobilization of antibodies using boronic acids. *Analyst*. [S.l.]: Royal Society of Chemistry. , 7 out. 2015

ELETTRONICA, 2B. **Quartz Crystals Theory – 2B Elettronica**. Disponível em: <http://www.2belettronica.it/?page_id=876>. Acesso em: 24 set. 2019.

EMILSSON, G. et al. Strongly stretched protein resistant poly(ethylene glycol) brushes prepared by grafting-to. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 7, n. 14, p. 7505–7515, 15 abr. 2015. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsami.5b01590>>. Acesso em: 29 set. 2019.

GODDARD, J. M.; HOTCHKISS, J. H. **Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds.** *Progress in Polymer Science (Oxford)*. [S.l.: s.n.]. , jul. 2007

GUO, X. et al. A piezoelectric immunosensor for specific capture and enrichment of viable pathogens by quartz crystal microbalance sensor, followed by detection with antibody-functionalized gold nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 38, n. 1, p. 177–183, out. 2012.

HIRAO, M.; OGI, H.; FUKUOKA, H. Resonance EMAT system for acoustoelastic stress measurement in sheet metals. **Review of Scientific Instruments**, v. 64, n. 11, p. 3198–3205, 9 nov. 1993. Disponível em: <<http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.1144328>>. Acesso em: 29 set. 2019.

HUANG, C. et al. Site-directed immobilization antibody for alpha-fetoprotein detection by optical biosensor. **Integrated Ferroelectrics**, v. 171, n. 1, p. 70–78, 3 maio 2016.

HUI, J. Z. et al. LASIC: Light Activated Site-Specific Conjugation of Native IgGs. **Bioconjugate Chemistry**, v. 26, n. 8, p. 1456–1460, 19 ago. 2015. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.bioconjchem.5b00275>>. Acesso em: 14 nov. 2019.

HUSSAIN, M. et al. **Bioapplications of acoustic crystals, a review.** *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. [S.l.]: Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.ez361.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0165993618300062>>. Acesso em: 30 set. 2019. , 1 maio 2018

JOHANNSMANN, D. Studies of Viscoelasticity with the QCM BT - Piezoelectric Sensors. **Piezoelectric Sensors**. [S.l.]: Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 49–109. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/5346_024>. Acesso em: 29 set. 2019.

The Quartz Crystal Microbalance in Soft Matter Research. Cham: Springer International Publishing, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-07836-6>>. (Soft and Biological Matter).

Viscoelastic, mechanical, and dielectric measurements on complex samples with the quartz crystal microbalance. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 10, n. 31, p. 4516–4534, 29 jul. 2008. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=b803960g>>. Acesso em: 29 set. 2019.

KARYAKIN, A. A. et al. Oriented immobilization of antibodies onto the gold surfaces via their native thiol groups. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 16, p. 3805–3811, ago. 2000.

Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac9907890>>. Acesso em: 14 nov. 2019.

KEIJI KANAZAWA, K.; GORDON, J. G. The oscillation frequency of a quartz resonator in contact with liquid. **Analytica Chimica Acta**, v. 175, n. C, p. 99–105, 1 jan. 1985. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000326700082721X?via%3Dihub>>. Acesso em: 9 out. 2019.

KÖSSLINGER, C. et al. Quartz crystal microbalance for immunosensing. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 349, n. 5, p. 349–354, maio 1994.

LIANG, J. et al. Development of a flow injection based high frequency dual channel quartz crystal microbalance. **Sensors (Switzerland)**, v. 17, n. 5, p. 1136, 16 maio 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1424-8220/17/5/1136>>. Acesso em: 10 jul. 2019.

Development of portable quartz crystal microbalance for biosensor applications. **Sensors and Materials**, v. 28, n. 3, p. 201–207, 2016. Disponível em: <https://myukk.org/SM2017/sm_pdf/SM1170.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2019.

LIU, Y.; YU, J. **Oriented immobilization of proteins on solid supports for use in biosensors and biochips: a review**. **Microchimica Acta**. [S.l.]: Springer Vienna. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00604-015-1623-4>>. Acesso em: 11 jul. 2019. , 25 jan. 2016

LOVE, J. C. et al. **Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology**. **Chemical Reviews**. [S.l.: s.n.], , abr. 2005

LU, C.; CZANDERNA, A. W.; TOWNSHEND, A. **Applications of piezoelectric quartz crystal microbalances**. [S.l.]: Elsevier Science, 1987. v. 199.

LUCKLUM, R.; EICHELBAUM, F. Interface Circuits for QCM Sensors. **Piezoelectric Sensors**. [S.l.]: Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 3–47. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/5346_023>. Acesso em: 17 jul. 2019.

LYSHEVSKI, S. E. **Mems Nems**. [S.l.]: CRC Press, 2018.

MALITESTA, C. et al. Tools for the Development of Electrochemical Sensors: An EQCM Flow Cell with Flow Focusing. **Electroanalysis**, v. 24, n. 4, p. 790–797, 1 abr. 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/elan.201100559>>. Acesso em: 23 set. 2019.

MARALDO, D.; MUTHARASAN, R. Preparation-free method for detecting Escherichia coli O157:H7 in the presence of spinach, spring lettuce mix, and ground beef particulates. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 11, p. 2651–2655, 2007.

MARGOLIS, M. **Arduino Cookbook**. 2nd. ed. [S.l.: s.n.], 2011.

MATTOS, A. B. et al. A dual quartz crystal microbalance for human cardiac troponin T in real time detection. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 161, n. 1, p. 439–446, 3 jan. 2012.

MAURIZ, E.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, M. C.; LECHUGA, L. M. **Towards the design of universal immunosurfaces for SPR-based assays: A review**. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**. [S.l.]: Elsevier B.V. , 1 maio 2016

MELLIS, D. et al. **Arduino: An open electronic prototyping platform**. Proc. CHI. New York: [s.n.], 2007.

MENTI, C. et al. **Antibody-based magneto-elastic biosensors: potential devices for detection of pathogens and associated toxins**. *Applied Microbiology and Biotechnology*. [S.l.]: Springer Verlag. , 1 jul. 2016

MICHALZIK, M.; WILKE, R.; BÜTTGENBACH, S. Miniaturized QCM-based flow system for immunosensor application in liquid. 11 nov. 2005, [S.l: s.n.], 11 nov. 2005. p. 410–415.

MINNS, P. **C Programming For the PC the MAC and the Arduino Microcontroller System**. [S.l: s.n.], 2013.

MOHAN, T. et al. Triggering protein adsorption on tailored cationic cellulose surfaces. *Biomacromolecules*, v. 15, n. 11, p. 3931–3941, 10 nov. 2014. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm500997s>>. Acesso em: 29 set. 2019.

MURATSUGU, M. et al. Quartz Crystal Microbalance for the Detection of Microgram Quantities of Human Serum Albumin: Relationship Between the Frequency Change and the Mass of Protein Adsorbed. *Analytical Chemistry*, v. 65, n. 20, p. 2933–2937, 15 out. 1993. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00068a036>>. Acesso em: 14 nov. 2019.

NIU, Y. et al. Antibody oriented immobilization on gold using the reaction between carbon disulfide and amine groups and its application in immunosensing. *Langmuir*, v. 28, n. 51, p. 17718–17725, 2012.

NOMURA, T.; HATTORI, O. Determination of micromolar concentrations of cyanide in solution with a piezoelectric detector. *Analytica Chimica Acta*, v. 115, n. C, p. 323–326, 15 mar. 1980.

NOVAETECH, S. **OpenQCM**. Disponível em: <<https://openqcm.com/openqcm>>. Acesso em: 14 nov. 2019.

OLSEN, E. V. et al. Affinity-selected filamentous bacteriophage as a probe for acoustic wave biodetectors of Salmonella typhimurium. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 21, n. 8, p. 1434–1442, 15 fev. 2006.

ORMOND, T. Crystal Oscillators. *Edn*, v. 30, n. 23, p. 98–108, 110, 1985.

ORSINI, M. et al. High frequency of asymptomatic Leishmania spp. infection among HIV-infected patients living in endemic areas for visceral leishmaniasis in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 106, n. 5, p. 283–288, 2012.

PAN, T. et al. **Getting Started with Arduino**. Disponível em: <<https://dl.acm.org/citation.cfm?id=1502111>>. Acesso em: 14 nov. 2019.

PATABADIGE, D. E. W. et al. Micro Total Analysis Systems: Fundamental Advances and Applications. *Analytical Chemistry*, v. 88, n. 1, p. 320–338, 5 jan. 2016. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.5b04310>>. Acesso em: 01 Jan. 2020.

PELUSO, P. et al. Optimizing antibody immobilization strategies for the construction of protein microarrays. **Analytical Biochemistry**, v. 312, n. 2, p. 113–124, 15 jan. 2003.

PENG, C. C.; CHUNG, C. K.; LIN, J. F. Effects of Al film thickness and annealing temperature on the aluminum-induced crystallization of amorphous silicon and carrier mobility. **Acta Materialia**, v. 59, n. 15, p. 6093–6102, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016%2Fj.actamat.2011.06.020>>.

PIERCE, G. W. Piezoelectric Crystal Resonators and Crystal Oscillators Applied to the Precision Calibration of Wavemeters. **Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences**, v. 59, n. 4, p. 81, 1923.

PIRINÇCI, Ş. Ş. et al. Label-free QCM immunosensor for the detection of ochratoxin A. **Sensors (Switzerland)**, v. 18, n. 4, 11 abr. 2018.

PLUNKETT, M. A. et al. Adsorption of pNIPAM layers on hydrophobic gold surfaces, measured in situ by QCM and SPR. **Langmuir**, v. 19, n. 17, p. 6837–6844, 2003. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la034281a>>. Acesso em: 29 set. 2019.

POHANKA, M. Piezoelectric biosensor for the determination of Tumor Necrosis Factor Alpha. **Talanta**, v. 178, p. 970–973, 1 fev. 2018a.

Piezoelectric immunosensor for the determination of immunoglobulin G. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 13, n. 9, p. 8784–8791, 1 set. 2018b.

POHANKA, M.; PAVLIŠ, O.; SKLÁDAL, P. Diagnosis of tularemia using piezoelectric biosensor technology. **Talanta**, v. 71, n. 2, p. 981–985, 15 fev. 2007.

POITRAS, C.; TUFENKJI, N. A QCM-D-based biosensor for E. coli O157:H7 highlighting the relevance of the dissipation slope as a transduction signal. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 7, p. 2137–2142, 15 mar. 2009.

QIAN, K.; ZHAI, F.; MENG, Q. Research on Efficiency Evaluation of Green Innovation. 7 out. 2019, [S.l.]: Atlantis Press, 7 out. 2019.

RADI, A. E. et al. An electrochemical immunosensor for ochratoxin A based on immobilization of antibodies on diazonium-functionalized gold electrode. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 8, p. 2180–2184, 1 mar. 2009.

RAMOS-JESUS, J. et al. A piezoelectric immunosensor for Leishmania chagasi antibodies in canine serum. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, n. 3, p. 917–925, ago. 2011.

RAO, S. V.; ANDERSON, K. W.; BACHAS, L. G. **Oriented Immobilization of Proteins. Mikrochimica Acta**. [S.l.: s.n.], 1998

RODAHL, M.; KASEMO, B. A simple setup to simultaneously measure the resonant frequency and the absolute dissipation factor of a quartz crystal microbalance. **Review of Scientific Instruments**, v. 67, n. 9, p. 3238–3241, 4 set. 1996. Disponível em: <<http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.1147494>>. Acesso em: 29 set. 2019.

SALAM, F.; ULUDAG, Y.; TOTHILL, I. E. Real-time and sensitive detection of Salmonella Typhimurium using an automated quartz crystal microbalance (QCM) instrument with nanoparticles amplification. **Talanta**, v. 115, p. 761–767, 2013.

SANDSTRÖM, N. et al. Batch fabrication of polymer microfluidic cartridges for QCM sensor packaging by direct bonding. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 27, n. 12, p. 124001, 1 dez. 2017. Disponível em: <<http://stacks.iop.org/0960-1317/27/i=12/a=124001?key=crossref.9a300988e1b54ad36cff743c92148500>>. Acesso em: 30 set. 2019.

SANTOS, D. V. Predição De Links Em Redes De Coautoria : Um Estudo Utilizando a Teoria Da Evolução Espectral Em. 2014. Disponível em: <<http://fumec.br/revistas/sigc/article/view/2983>>. Acesso em: 19 fev. 2020.

SANTOS, L. C. et al. Desenvolvimento de testes semi-automatizados de miniestructuras. **Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo**, v. 25, n. 2, p. 75–81, 30 jan. 2008.

SAUERBREY, G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. **Zeitschrift für Physik**, v. 155, n. 2, p. 206–222, abr. 1959. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF01337937>>. Acesso em: 27 set. 2019.

SCHARF, O. et al. Immunoglobulin G3 from Polyclonal Human Immunodeficiency Virus (HIV) Immune Globulin Is More Potent than Other Subclasses in Neutralizing HIV Type 1. **Journal of Virology**, v. 75, n. 14, p. 6558–6565, 15 jul. 2001.

SCHLECHT, U. et al. Comparison of antibody and aptamer receptors for the specific detection of thrombin with a nanometer gap-sized impedance biosensor. **Analytica Chimica Acta**, v. 573–574, p. 65–68, 28 jul. 2006.

SCHMIDT, T. S.; HUENTELER, J. Anticipating industry localization effects of clean technology deployment policies in developing countries. **Global Environmental Change**, v. 38, p. 8–20, 1 maio 2016.

SHARMA, H.; MUTHARASAN, R. Half antibody fragments improve biosensor sensitivity without loss of selectivity. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 4, p. 2472–2477, 19 fev. 2013a. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac3035426>>. Acesso em: 31 ago. 2019.

Half antibody fragments improve biosensor sensitivity without loss of selectivity. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 4, p. 2472–2477, 19 fev. 2013b. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac3035426>>. Acesso em: 14 nov. 2019.

SHONNARD, D. R. et al. Green Engineering Education through a U.S. EPA/Academia Collaboration. **Environmental Science & Technology**, v. 37, n. 23, p. 5453–5462, 1 dez. 2003. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es0344415>>. Acesso em: 19 fev. 2020.

SILVA, W. R. S. da; SOUZA, D. P. de; RODRIGUES-MOURA, S. A abordagem PBL (Problem Based Learning) em um curso técnico em enfermagem: elementos autobiográficos da prática docente em anatomia humana. **Revista Pesquisa Qualitativa**, v. 7, n. 15, p. 428–452, 23 dez. 2019.

SILVA, R. H. **Universidade federal do rio grande do sul escola de engenharia engenharia de materiais. Federal, Universidade Rio, D O Do, Grande Engenharia, Escola D E Materiais, Engenharia D E.** [S.l.: s.n.], 2010. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/27536>>. Acesso em: 27 out. 2019.

SITTEL, K.; ROUSE, P. E.; BAILEY, E. D. Method for determining the viscoelastic properties of dilute polymer solutions at audio-frequencies. **Journal of Applied Physics**, v. 25, n. 10, p. 1312–1320, 14 out. 1954. Disponível em: <<http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.1721552>>. Acesso em: 29 set. 2019.

SKLÁDAL, P. **Piezoelectric quartz crystal sensors applied for bioanalytical assays and characterization of affinity interactions.** **Journal of the Brazilian Chemical Society.** [S.l.: s.n.], 2003. Disponível em: <<http://intel.ucc.ie/sensors/universal/>>.

SONG, H. Y. et al. End-on Covalent Antibody Immobilization on Dual Polarization Interferometry Sensor Chip for Enhanced Immuno-sensing. **Plasmonics**, v. 9, n. 4, p. 851–858, 2014.

STEVEN, Y. et al. Micro Total Analysis System Application for Biomedicals: A Mini-Review. v. 5, 2018. Disponível em: <<https://biomedres.us/>>. Acesso em: 19 fev. 2020.

TO BUILD FUTURE TECHNOLOGY, E. P. **Arduino Micro | Modern Electronics.** Disponível em: <<https://modernelectronics.com.pk/product/arduino-micro/>>. Acesso em: 12 out. 2019.

TOMBELLI, S.; MASCINI, M.; TURNER, A. P. F. Improved procedures for immobilisation of oligonucleotides on gold-coated piezoelectric quartz crystals. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, n. 11–12, p. 929–936, dez. 2002.

TRAVASSOS, G.; GUROV, D.; AMARAL, E. Introdução à Engenharia de Software Experimental. **Relatório Técnico ES59002Abril Programa de Engenharia de Sistemas e Computação COPPEUFRJ**, p. 52, 2002. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/a416/35cc4e30960300a0526a67634bda7d255963.pdf>>. Acesso em: 19 fev. 2020.

TRILLING, A. K.; BEEKWILDER, J.; ZUILHOF, H. **Antibody orientation on biosensor surfaces: A minireview.** **Analyst.** [S.l.]: Royal Society of Chemistry. , 21 mar. 2013

VASHIST, S. K. et al. **Immobilization of antibodies and enzymes on 3-aminopropyltriethoxysilane-functionalized bioanalytical platforms for biosensors and diagnostics.** **Chemical Reviews.** [S.l.]: American Chemical Society. , 12 nov. 2014

VAUGHAN, R. D.; O’SULLIVAN, C. K.; GUILBAULT, G. G. Development of a quartz crystal microbalance (QCM) immunosensor for the detection of *Listeria monocytogenes*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 10, p. 635–638, 2001.

VENTURA, B. Della et al. Effective antibodies immobilization and functionalized nanoparticles in a quartzcrystal microbalance-based immunosensor for the detection of parathion. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. e0171754, 9 fev. 2017. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0171754>>. Acesso em: 30 jul. 2019.

VERICAT, C. et al. Surface characterization of sulfur and alkanethiol self-assembled monolayers on Au(111). **Journal of Physics Condensed Matter**, v. 18, n. 48, 6 dez. 2006.

VUORILUOTO, M. et al. Effect of Molecular Architecture of PDMAEMA-POEGMA Random and Block Copolymers on Their Adsorption on Regenerated and Anionic Nanocelluloses and Evidence of Interfacial Water Expulsion. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 119, n. 49, p. 15275–15286, 10 dez. 2015. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jpcc.5b07628>>. Acesso em: 29 set. 2019.

WANG, D. et al. A reusable quartz crystal microbalance biosensor for highly specific detection of single-base DNA mutation. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 48, p. 276–280, 5 out. 2013.

WANG, X. H.; WANG, S. **Sensors and biosensors for the determination of small molecule biological toxins**. **Sensors**. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1424-8220/8/9/6045>>. Acesso em: 30 jul. 2019. , 26 set. 2008

WANG, Y. et al. Smartphone spectrometer for colorimetric biosensing. **Analyst**, v. 141, n. 11, p. 3233–3238, 7 jun. 2016.

WARNER, A. W.; STOCKBRIDGE, C. D. Quartz Resonators; Reduction of Transient Frequency Excursion Due to Temperature Change. **Journal of Applied Physics**, v. 34, n. 2, p. 437–438, 1963.

WUJCIK, E. K. et al. **Antibody nanosensors: A detailed review**. **RSC Advances**. [S.l.]: Royal Society of Chemistry. , 2014

XIAOYU, J. et al. Numerical simulation of micro-scratch tests for coating/substrate composites. **Composite Interfaces**, v. 8, n. 1, p. 19–40, jan. 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1163%2F15685540052543638>>.

ZHANG, B. et al. A novel piezoelectric quartz micro-array immunosensor based on self-assembled monolayer for determination of human chorionic gonadotropin. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, n. 7, p. 711–720, 15 fev. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14709389>>. Acesso em: 15 nov. 2019.

ZIMMERMANN, B. et al. Electrical characterisation of high-frequency thickness-shear-mode resonators by impedance analysis. 1 jun. 2001, [S.l.: s.n.], 1 jun. 2001. p. 47–57.