

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
CENTRO DE APOIO MULTIDISCIPLINAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

MICHELLA BEZERRA LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR PARA
DETECÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF-
ALFA)**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^ª Doutora Maria Cristina dos Santos

Co-orientadora: Doutora Renata Kelly Mendes

MANAUS

2008

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAM

L732d Lima, Michella Bezerra

Desenvolvimento de imunossensor para detecção de fator de necrose tumoral (TNF-alfa) / Michella Bezerra Lima. – Manaus, AM : UFAM, 2008.

109 p. : il. color. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologias para a saúde). Universidade Federal do Amazonas. Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina dos Santos.

1. Biossensor 2. Imunossensor 3. SAM 4. APTS 5. TNF- α humano 6. SPR 7. AFM I. Dos Santos, Maria Cristina (Orient.)
II. Título

CDU(2007): 606:61 (811.3)(043.3)

DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF-ALFA).

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em 21 de agosto de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Doutora Maria Cristina dos Santos
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Doutor Spartaco Astolfi Filho
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Doutor Evandro Ribeiro
Universidade do Estado do Amazonas

Aos meus pais e irmãos pelo incentivo constante.

Ao meu marido pela compreensão, carinho,
cumplicidade e companheirismo em todos os
momentos.

A minha orientadora por todo o conhecimento
transmitido e pela coragem em favor da inovação.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela a vida, inspiração, coragem e oportunidade de realizar meus projetos de vida.

A minha orientadora Prof.^a Doutora Maria Cristina dos Santos (mãe científica) pela sua orientação, incentivo, compreensão, competência e acima de tudo, por ter acreditado neste trabalho.

A minha co-orientadora Doutora Renata Kelly Mendes por todos os ensinamentos transmitidos e atenção prestada nos dias em que estive em Campinas.

Ao Prof. Doutor Spartaco Astolfi Filho pela criação do PPGBIOTEC, por seu pioneirismo, inteligência e dedicação à ciência, além da compreensão e grande apoio dado a este trabalho.

Ao Prof. Doutor Lauro Tatsuo Kubota pela generosidade em permitir a utilização do LEEDS para a realização dos experimentos, além de todo o conhecimento transmitido e material cedido.

Ao Professor Doutor Jacobus Swart pela oportunidade de parceria com a UNICAMP.

À Coordenação do PPGBIOTEC pelo financiamento das passagens aéreas e diárias, além de todas as oportunidades de crescimento intelectual fornecidas.

À SUFRAMA, nas pessoas do Dr. Hernán Valenzuela e Sara Jones, responsáveis pela realização de eventos tecnológicos em Manaus e possibilitaram a formação de parcerias que viabilizaram este trabalho.

Ao Doutor José Alexandre Diniz e Doutora Carla Veríssimo pela atenção prestada e pela acolhida no CCS-UNICAMP.

À professora Doutora Adriana Malheiros e o mestrando Daniel Castro, da Fundação HEMOAM, pelo fornecimento de reagentes e ensinamentos sobre técnica de detecção de antígenos.

Aos professores doutores Genilson dos Santos e Saulo Lima, do Instituto de Química da UFAM, pela atenção prestada e pelo fornecimento de reagentes.

Aos amigos Luciana Fujimoto, Antônio Boechat, José Fernando Marques pelo apoio constante e pela troca de inovadoras idéias de grande incentivo para realização deste trabalho.

Aos meus amigos do PPGBIOTEC, Michelly, Lívio, Girlene, Gabriela, Márcia, Gisele, Frida e Filipe, pela maravilhosa convivência e pelos bons dias de diversão vividos

Aos amigos e parceiros Alexandre Kisner, Alberto Moreau, Angélica Bastos e Jair Fernandes pelas parcerias em projetos, pela troca de conhecimento e pela boa amizade iniciada.

Aos “meus pais” de Campinas, dona Juracilda Veiga e ao senhor Wilmar D’Angelis pela grande hospitalidade, carinho, afeto e apoio a mim dispensados.

Aos meus irmãos de Campinas, Amílcar, Gilberto, Tiago e Eduardo pelos excelentes dias de convivência e, quando foi possível, de diversão.

Aos meus amigos do LEEDS: Wilney, Phabyanno, Jailson, Murilo, José Ribamar, Denise e Danilo que tornaram os dias de intenso trabalho mais leves.

Aos queridos monitores da UEA, Nicolau, Ronísie, Alexandre, Darlisson, Antônio Filho, dentre outros, por prestarem apoio quando estive ausente.

À minha amiga Thaís Brianezi e a todos os meus amigos, que de longe ou de perto me confortaram e sempre estimularam meu crescimento pessoal.

Ao casal amigo Rosa e Silvério pelo exemplo de dedicação e amor à ciência e pelos ensinamentos de vida transmitidos.

RESUMO

Os imunossensores, ou biossensores de imunoafinidade são sistemas que exploram a seletividade e especificidade das interações antígeno-anticorpo, para detecção do analito alvo. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um imunossensor, em que anticorpos monoclonais (anti-TNF- α humano) foram imobilizados em superfícies modificadas de ouro, para reconhecimento específico do Fator de Necrose Tumoral – Alfa humano (TNF- α). Para a imobilização dessas imunoglobulinas foi necessária a formação de uma monocamada auto-organizada (SAM) sobre a superfície do sensor, composta por 3-aminopropiltriétoxissilano (APTS), sendo testadas quatro concentrações diferentes (1%, 2,5%, 5% e 10%), em dois tipos de solventes, água deionizada e tolueno, para comparação de metodologias para obtenção de melhores respostas. Os métodos de caracterização adotados foram a espectroscopia de Ressonância de Plásmon de Superfície (SPR), para análise da imobilização de anticorpos, na superfície modificada do sensor e a resposta dos sistemas desenvolvidos para detecção do TNF- α ; e, Microscopia de Força Atômica (AFM), para verificação topográfica da SAM da superfície sensora. Os resultados mostraram que as melhores condições de desenvolvimento do biossensor desenvolvido neste trabalho ocorreram com a utilização de APTS 2,5% em tolueno, bloqueado com BSA 1%. O biossensor apresentou 24 pg.mm⁻² (198,3 \pm 28,4 mgra) de TNF- α humano imobilizados na superfície de ouro, e após injeções sucessivas de 25 pg.mL⁻¹ de antígeno (n=8), em triplicata experimental, obtivemos uma região linear de resposta de 4,3 a 34,7 pg.mm⁻² (R=0.98, SD=2.18, p<0.0001). Em análise topográfica das superfícies sensoras, realizada por AFM, foi observado que as amostras preparadas em tolueno, com melhores respostas de reconhecimento do antígeno, apresentaram menor uniformidade na sua estrutura, em razão da maior rugosidade detectada. Foi desenvolvido um imunossensor experimental, que servirá como modelo para o desenvolvimento de biossensor para aplicação clínica futura para quantificação de TNF- α humano em fluidos corporais de pacientes portadores de doenças inflamatórias.

Palavras-chave: biossensor, imunossensor, SAM, APTS, TNF- α , SPR, AFM.

ABSTRACT

The development of analytical and low cost methods for fast safe diagnosis and control of illnesses in humans has been one of researchers' great interests in the last two decades. This attention is also due to simplicity of use and the great sensitivity in the results. Biosensors based on the surface plasmon resonance (SPR) technique combines the inherent specificity of the recognition elements with high sensitivity of physical transducers, enabling selective and sensitive detection of the analytes of interest without labeling and preliminary purification steps. We proposed the development of a biosensor with immobilized monoclonal antibodies on gold surface, for specific recognition of TNF- α using SPR technique. Design. Anti-TNF- α antibody was covalently immobilized on a gold substrate by silane coupling chemistry. After this, TNF- α antigens aliquots were added on the biosensor surface and the signal was measured during three minutes for TNF- α mass quantification recognized by immobilized antibodies. Results. This biosensor presented 24.0 pg.mm⁻² (198,3 \pm 28,4) of antibodies immobilized on gold surface. TNF- α human was determined from successive injections, with a linear range from 4.3 up to 34.7 pg/mm⁻² (R=0.98, SD=2.18, p<0.0001). Conclusion. We performed a preliminary biosensor to quantify TNF- α for planning of diseases treatment, such as auto immune and periodontal diseases, in which TNF- α inhibitor therapy is usually applied. In this cases, it would be necessary the quantification of this cytokine for therapeutic dose adjustment, improving treatment effectiveness and costs reduction. In the next step we intend to optimize the biosensors conditions preparation as well as to test it in human body fluids samples.

Keywords: biosensor, immunosensor, SAM, APTS, TNF- α , SPR, AFM.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Anticorpos ou imunoglobulinas
AFM	“Atomic Force Microscopy”
AFP	α -fetoproteína
APTS	3-aminopropiltriéoxisilano
BSA	“Bovine Serum Albumin”
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DAB	3,3-Diaminobenzidina
DETA	Trimetóxisililpropildietilenetriamina
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
Dot-ELISA	Dot “Enzyme-linked immuno-sorbent assay”
EDC	1-Etil-3-(3-dimetil-aminopropil) carbodiimida
ELISA	“Enzyme-linked immuno-sorbent assay”
FTIR	“Fourier-Transform Infrared Spectroscopy”
GLU	Glutaraldeído
HCl	Ácido Clorídrico
Ig	Imunoglobulina ou anticorpo
IgA	Imunoglobulina da Classe A
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
kDa	Quilo Dalton, medida de peso molecular de proteínas
MAM	Monocamada auto-organizada
MCT	Ministério de Ciência e Tecnologia
MOSFET	Transistor de efeito de campo metal-óxido-semicondutor
nm	Nanômetro

NHS	N-hidroxisuccinimida
PBS	Tampão Fosfato Salina
QCM	“Quartz Cristal Microbalance”
SAM	“Self-Assembled Monolayer”
SPR	“Surface Plasmon Resonance”
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
T.A.	Temperatura ambiente
TBS	Tampão Tris Salina
TRIS	Tampão Tris-HCl

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
1. REVISÃO DE LITERATURA	15
1.1 Nanotecnologia	15
1.2 Biossensores	16
1.2.1 Self-Assembled Monolayer (SAM)	200
1.2.1.1 Superfície de Ouro	222
1.2.1.2 Defeitos da SAM	2223
1.2.1.3 Técnicas de Imobilização de Biomoléculas	24
1.2.1.4 Silanização de superfícies com 3-aminopropiltrietóxisilano (APTS)	2627
1.2.1.5 Bloqueio de sítios de ligações inespecíficas	32
1.3 Imunoglobulinas	3435
1.3.1 IgG	36
1.4 TNF- α	37
1.4.1 Aspectos estruturais e bioquímicos	36
1.4.2 Terapias imunossupressoras de TNF- α	390
1.4.3 TNF- α como biomarcador de doenças	401
1.4.4 Desenvolvimento de biossensores para análises de TNF- α	412
1.5 Métodos para Caracterização da SAM	43
1.5.1 Aspectos teóricos sobre Espectroscopia de Ressonância de Plasmón de Superfície (SPR)	4243
1.5.2 Aspectos teóricos sobre Microscopia de Força Atômica (AFM)	47
2.OBJETIVOS	490
2.1 Objetivo Geral	490
2.2 Objetivos Específicos	490
3.MATERIAL e MÉTODOS	501
3.1 Reagentes utilizados	501
3.2 Equipamentos	501

3.3 Procedimentos experimentais.....	52
3.3.1 Reconstituição e diluição de anticorpos monoclonais.....	5152
3.3.2 Caracterização de solução de imunoglobulinas.....	53
3.3.2.1 Dot-ELISA (Titulação de IgG)	5253
3.3.3 Caracterização de SAM em Superfície de Ouro	53
3.3.3.1 Ressonância de Plásmon de Superfície (SPR)	53
3.3.3.2 Espectrometria por Microscopia de Força Atômica (AFM).....	55
3.3.4 Preparação da SAM e do Processo de Imobilização de Imunoglobulinas	55
3.3.4.1 Limpeza de superfície dos discos de ouro.....	55
3.3.4.2 Formação de monocamada automontada (SAM)	5456
3.3.4.3 Preparo de Imunoglobulinas	59
3.3.5 Estudos Analíticos do Imunossensor	591
3.3.5.1 Eficiência de ação do bloqueio de imobilização inespecífica.....	591
3.3.5.2 Especificidade.....	601
3.3.5.3 Regeneração	63
3.3.5.4 Concentração de TNF- α humano associado ao anticorpo imobilizado sobre a SAM.....	64
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
4.1 Dot-ELISA	65
4.2 SPR	65
4.2.1 Formação da SAM.....	641
4.2.2 Imobilização de biomoléculas sobre a superfície de ouro silanizada, em água e em tolueno	Error! Bookmark not defined.
4.2.3 Bloqueios de ligações inespecíficas.	704
4.2.4 Especificidade do imunossensor.	78
4.2.5 Verificação da eficiência de técnicas de regeneração	81
4.3 AFM.....	83
4.3.1 Ouro (Controle).....	84
4.3.2 APTS e água	85
4.3.3 APTS e Tolueno	89
4.3.4 Análise comparativa sobre a rugosidade topográfica das superfícies modificadas com silanização usando água ou tolueno.....	94
CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

INTRODUÇÃO

Nanotecnologia pode ser definida como a ciência que cria materiais funcionais, dispositivos e sistemas controladores de matéria em escala de um a cem nanômetros, e que explora novas propriedades e fenômenos nessa mesma escala (SRINIVAS; BARKER; SRIVASTAVA, 2002).

Existe uma ampla utilização de nanoestruturas em sistemas biotecnológicos (biossensores) para aplicações diagnósticas ou de detecção biológica, justificada pelas propriedades altamente controladas dessas estruturas, mesmo em escalas nanométricas (EL-SAYED; HUANG; EL-SHAYED, 2005).

Os biossensores foram definidos como sistemas analíticos que incorporam materiais biológicos (tecidos, microorganismos, organelas, receptores celulares, enzimas, anticorpos, ácidos nucleicos, dentre outros), derivados biológicos (anticorpos e proteínas recombinantes etc.), ou biológicos sintéticos, em superfícies de transdutores físico-químicos ou microssistemas integrados, ópticos, eletroquímicos, termométricos, piezoelétricos, magnéticos ou micromecânicos (LAZCKA; DEL CAMPO; MUÑOZ, 2007).

A MAM (Monocamada Automontada) ou SAM (“Self-Assembled Monolayer”) é formada a partir de técnicas de imobilização sobre suportes, ou substratos sólidos, que incluem numerosos materiais, como: ouro, prata, platina, vidro, quartzo, ligas metálicas, óxidos (SiO_2 , Al_2O_3 , SnO_2 , TiO_2), nitreto (N_4Si_3), polímeros orgânicos e

biomateriais (CATTARUZZA et al., 2006; H.DONG et al., 2006; JOSHI et al., 2007; YANG et al., 2006).

No presente estudo foi desenvolvido um biossensor baseado na interação antígeno-anticorpo, pela imobilização de um anticorpo monoclonal em superfícies modificadas de ouro, para reconhecimento específico da citocina pró-inflamatória, Fator de Necrose Tumoral – Alfa humano (TNF- α humano). Por apresentar ação endócrina, o TNF- α pode ser detectado na circulação sanguínea de pacientes com Septicemia, Artrite Reumatóide, Doença de Crohn, Psoríase, dentre outras, os quais secretam altas concentrações dessa citocina. A Ressonância de Plasma de Superfície (SPR) foi utilizada como método analítico, para caracterização do biossensor.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Nanotecnologia

Em 1959, na reunião anual da Sociedade Americana de Física, no *California Institute of Technology*, aconteceu a primeira explanação técnica sobre a possibilidade de miniaturização de aparelhos para análise de átomos e moléculas, proferida pelo pesquisador Richard Feynman, ganhador do Prêmio Nobel (MOORE, 2001).

Nanotecnologia, de acordo com Silva (2006), representa uma ciência que usa materiais ou aparelhos de organização funcional infinitamente pequena, em escala nanométrica (bilhonésima parte do metro, 10^{-9} m) entre, aproximadamente, um a 100 nm.

Um aspecto interessante sobre essa nanociência é a sua interdisciplinaridade, pois envolve profissionais de diversas áreas do conhecimento científico como químicos, físicos, engenheiros, biólogos, médicos, odontólogos, dentre outros (LAVAN; MCGUIRE; LANGER, 2003; SILVA; 2006).

As escalas nanométricas representam a mesma unidade de tamanho de biomoléculas e células. Por este motivo a nanotecnologia tem ampla difusão nas ciências biológicas e médicas, pois permite a mensuração de componentes celulares ou sinais celulares, proteômicos ou genômicos, em quantidades mínimas de amostras (SRINIVAS; BARKER; SRIVASTAVA, 2002).

Apesar dos grandes benefícios que essa área de conhecimento traz para a Medicina e a Biologia, vale ressaltar a inexistência de “risco-zero”, como em

qualquer tecnologia (GRUNWALD, 2004). A Comunidade Européia por meio de um informativo, em 2004, demonstrou receio de que nanopartículas apresentem efeitos indesejados sobre seres humanos e meio ambiente. Como exemplo, foi citada a possibilidade de penetração, precisa, dessas partículas diminutas, em células, ultrapassando, inclusive, barreiras biológicas (como a hemato-encefálica).

Em todos os países industrializados, a Nanotecnologia representa um dos principais focos de pesquisa, desenvolvimento e inovação, na atualidade. O Brasil possui uma produção científica significativa em temas como: manipulação de não-objetos, nanoeletrônica, nanomagnetismo, nanoquímica e nanobiotecnologia. Existe ainda, produção tecnológica representada por patentes e há projetos sendo executados por empresas, isoladas ou em cooperação com Universidades ou Institutos de pesquisa. (BRASIL, 2007).

1.2 Biossensores

Os biossensores foram definidos como sistemas analíticos que incorporam materiais biológicos (tecidos, microrganismos, organelas, receptores celulares, enzimas, anticorpos, ácidos nucleicos, dentre outros), derivados biológicos (anticorpos e proteínas recombinantes, etc.), ou biológicos sintéticos, em superfícies de transdutores físico-químicos ou microssistemas integrados, ópticos, eletroquímicos, termométricos, piezoelétricos, magnéticos ou micromecânicos (LAZCKA; DEL CAMPO; MUÑOZ, 2007).

Biossensores combinam reconhecimento bioquímico com sinais de transdução para detecção de moléculas específicas. Sendo os componentes de reconhecimento: seqüências de ácidos nucleicos, anticorpos, enzimas e outras biomoléculas que se ligam especificamente à reação catalítica de interesse. O componente transdutor transforma esse reconhecimento em sinais mensuráveis. Esses elementos juntos promovem a detecção específica de moléculas alvos em amostras complexas (Figura 01) (GAU et al., 2005; WANG, 2000; WANG, 2006).

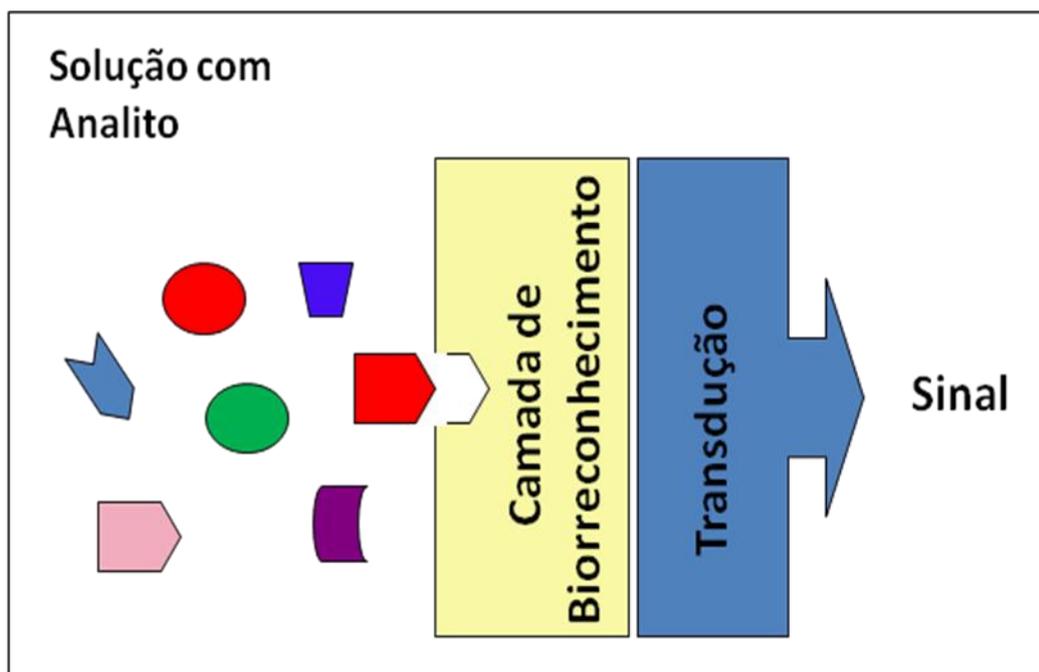


Figura 01 - Esquema sobre os componentes básicos de um biossensor. Fonte: MENDES, 2006.

A microfabricação desses sistemas bioanalíticos chama atenção por reduzir custos, devido à utilização de pequenas quantidades de amostras (alta sensibilidade), otimização do tempo de trabalho (resposta rápida) das análises bioquímicas e pela integração de múltiplos passos dos processos de análise, em uma simples operação (MIYACHI et al., 2004; NOTINGHER; SELVAKUMARAN; HENCH, 2004). Além das atrativas características citadas, apresenta, ainda, seletividade intrínseca associada (ZOU; SUN; XU, 2007).

Existem vários tipos de biossensores: enzimáticos, genossensores, imunossensores, sensores bioquímicos, dentre outros (BANDIERA et al., 2007; GAU et al. 2005).

Os biossensores são apresentados nos mais diferentes formatos: *beads*, nanopartículas metálicas, magnetizadas, coloidais, em nanotubos de carbono, biochips, com superfícies de diferentes materiais inorgânicos (ouro, prata, platina, vidro, quartzo, ligas metálicas, óxidos - SiO_2 , Al_2O_3 , SnO_2 , TiO_2 -, nitretos - N_4Si_3 -, polímeros orgânicos e biomateriais) (ARSLAN et al., 2006; EL-SAYED; HUANG;

EL-SAYED, 2005; MIYACHI et al., 2004; SOKOLOV et al., 2003; UKAJI et al., 2007; VITICOLI et al., 2006; WANG, 2000).

As mais diferentes formas de transdução de sinal também são utilizadas: óptica (colorimétrica, fluorescente), magnética, eletroquímica (amperométricos, potenciométricos, espectroscopia de impedância eletroquímica), piezoelétrica, etc. (CATTARUZZA et al., 2006; H.DONG et al., 2006; JOSHI et al., 2007; YANG et al., 2006). O quadro 01 mostra vários tipos de biossensores, seus diferentes componentes e aplicações.

Os imunossensores, ou biossensores de imunoafinidade, utilizados neste trabalho, exploram a seletividade e especificidade das interações antígeno-anticorpo para detecção do analito alvo. Esses sensores são utilizados especialmente em diagnósticos médicos para detecção de agentes infecciosos, anticorpos e biomarcadores. O método é baseado na imobilização de antígenos ou anticorpos sobre a superfície transdutora, para emissão de sinais durante o reconhecimento molecular (CHUNG; BERNHARDT; PYUN, 2006; GONG et al., 2007, SHANKARAN; GOBI; MIURA, 2007).

Existe uma variedade de sistemas ópticos de detecção utilizados em biossensores como: elipsometria, espectroscopia (luminescência, fosforescência, fluorescência, Raman), interferometria (interferometria moda, interferometria de luz branca) e ressonância de plasma de superfície (SPR), que foi a técnica adotada neste trabalho (HU et al., 2004).

Substrato	Transdução de sinal	Componentes da SAM/Biomolécula	Aplicação	Referências Bibliográficas
Nanopartículas de ouro	Óptico	Polietilenoglicol e AC anti-EGFR.	Detecção de câncer	EL-SAYED; HUANG; EL-SAYED, 2005; SOKOLOV et al., 2003.
Nanopartículas de ouro e Quantum-dots	Eletroquímica e óptica	EDC, Glicose oxidase e DNA.	Detecção de câncer	WILLNER; BARON; WILLNER, 2007.

Nanopartículas de prata	Amperométrica	Polivinil butiral (PVB), GLU e glicose oxidase.	Detecção de glicose	REN et al., 2005.
Nanopartículas de sílica e prata magnetizadas	Magnética e óptica	APTS, DETA, GLU e AC IgG.	Diagnóstico de câncer	GONG et al., 2007.
Nanotubos de carbon	Amperométrico	GLU e Glicose oxidase	Diagnóstico e controle de diabetes	TKAC; WHITTAKER; RUZGAS, 2007; ZOU et al., 2006.
Nanopartículas de TiO _x	Voltamétrico	Glicose oxidase	Diagnóstico e controle de diabetes	VITICOLI et al., 2004.
Eletrodo de vidro	Óptico	GLU e DNA	Dinâmica de hibridização de DNA	WANG et al., 2002.
Eletrodo de vidro	Amperométrico e Impedimétrico	GLU e glicose oxidase	Detecção de desordens neurológicas	MAALOUF et al., 2006.
Superfície de ouro	Óptico	Ácido Mercaptoundecanóico, EDC, NHS e IgG.	Detecção de câncer	CHUNG; BERNHARDT; PYUN, 2006.
Superfície de ouro	Óptico	Cisteamina, EDC, NHS e Troponina cardíaca.	Detecção de infarto miocárdico	DUTRA et al., 2007.
Superfície de ouro	Piezoelétrica	Ácido Mercaptoundecanóico, EDC, NHS e IgG.	Detecção de câncer	GRONEWOLD et al., 2006.

Quadro 01. Resumo dos tipos de biossensores, características e aplicações biomédicas.

Na Ressonância de Plasma de Superfície (*SPR*) é feita a quantificação da espécie de interesse pelas medidas do índice de refração, quantidade de luz absorvida, propriedades fluorescentes das moléculas analisadas, ou através de um meio de transdução químico-óptico. Esta técnica pode ser usada para estudos de fenômenos de superfície, monitorando a medida da mudança do ângulo de ressonância devido à ligação de uma camada orgânica à superfície de um metal. A escolha desse metal é fundamental para o sucesso da técnica, sendo os mais adequados: a prata, o ouro (os dois mais empregados), o cobre e o alumínio (CARVALHO; RATH; KUBOTA, 2003).

1.2.1 Self-Assembled Monolayer (SAM)

Métodos baseados nas superfícies de adsorção dos biossensores são considerados alternativas promissoras para detecção de moléculas biológicas como proteínas (enzimas, antígeno/anticorpos) ou DNA, que exibem dimensões nanométricas compatíveis com os biossensores (WILLNER; BARON; WILNER, 2007).

A modificação e a funcionalidade de superfícies são essenciais para muitas aplicações, incluindo sensores, microeletrônicos, filmes ópticos, revestimentos resistentes à água, revestimentos anticorrosivos, aumento de adesão e síntese de nanopartículas (H.DONG et al., 2006).

Silva (2006) define *SAM (Self-Assembled Monolayer)*, como uma auto-organização de moléculas sobre superfícies, orientada por variáveis químicas e físicas específicas, como mudanças de temperatura ou de concentração. Ou seja, uma monocamada automontada, ou auto-organizada. Love e colaboradores (2005) acrescentam que essas monocamadas possuem espessura de um a três nanômetros em média, e são formadas a partir de moléculas ou ligantes com funcionalidade química (grupo cabeça ou *headgroup*), com especificidade química para o substrato e, também, com alta afinidade para moléculas orgânicas, formando uma camada bifuncional (Figura 02).

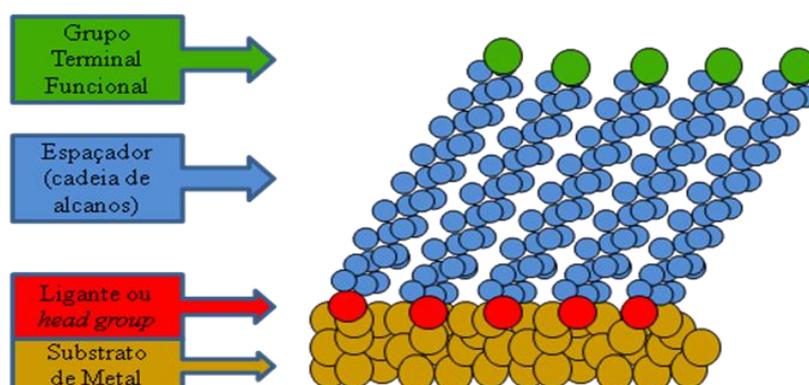


Figura 02 - Representação esquemática da SAM. Fonte: LOVE et al., 2005; MENDES, 2006.

De modo geral, a formação da *SAM* se dá pela imersão de substratos sólidos em uma solução contendo moléculas funcionais. O que mais chama a atenção na construção da *SAM* é o controle dos níveis moleculares sobre a modificação de superfícies, e incorporação de multicamadas ou múltiplos componentes moleculares da monocamada para obtenção de várias propriedades funcionais. A *SAM* pode, ainda, ser preparada utilizando diferentes tipos de moléculas e substratos. Sendo comumente empregadas monocamadas de alquilsiloxanos, alcanetióis, e ácidos graxos (ARSLAN et al., 2006). Outra forma de construção da *SAM* também pode ser feita pela deposição de moléculas por meio do vapor, como utilizado por Arroyo-Hernandéz e colaboradores (2007), que usaram APTS sobre sílica.

Diferentes sistemas de formação de *SAM* têm sido pesquisados, na atualidade. Porém, as monocamadas de alcanotióis sobre superfícies de ouro foram as mais estudadas até o presente momento, pois promovem uma forte ligação química (covalente) estável entre o ouro do substrato e o enxofre presente na solução, que promove uma *SAM* ordenada e especificamente orientada (MUNUERA; BARRENA; OCAL, 2007; ULMAN, 1996).

Allara (1995) destaca algumas vantagens do uso de *SAM* para a construção de biossensores, como:

- Facilidade de formação de monocamadas estáveis, ordenadas;
- Formação de membranas que simulam ambientes celulares propícios para imobilização de biomoléculas;
- Versatilidade na formação de grupos terminais funcionais diferentes, com características hidrofóbicas ou hidrofílicas que permitem, ainda, a imobilização de biomoléculas;
- Necessidade de quantidade mínima de biomoléculas para formação da monocamada, que, conseqüentemente, reduz os custos com reagentes;
- Boa estabilidade, que permite a utilização dessas monocamadas em diversas medidas.

1.2.1.1 Superfície de Ouro

A superfície onde a *SAM* é formada e o material que suporta essa superfície é referido usualmente como “substrato”. Os tipos de substratos variam de superfícies planares (placas de vidro ou silício mais espessas que suportam finos filmes metálicos, folhas finas de metal, cristais simples) a nanoestruturas altamente curvadas (colóides, nanocristais). Vale ressaltar que substratos planares são amplamente utilizados para caracterizar as propriedades estruturais das *SAM*, devido a facilidade de preparo e compatibilidade com numerosas técnicas de análise de superfície, como SPR, que foi utilizado neste trabalho (LOVE et al., 2005).

Os autores supracitados informam ainda que o ouro é considerado o substrato mais utilizado para construção de *SAM* por pelo menos cinco razões:

1. Fácil obtenção, tanto como filme quanto como colóide;
2. Fácil padronização pelas técnicas litográficas e gravações químicas;
3. Considerado material inerte, ou seja, não oxida em temperaturas abaixo do ponto de fusão, não reage com o ar atmosférico e não reage com a maioria dos elementos químicos;
4. Finos filmes de ouro são amplamente utilizados em diversas técnicas espectroscópicas e analíticas como *SPR*, *QCM*, Espectroscopia de Infra-Vermelho e Elipsometria;
5. Biocompatibilidade.

1.2.1.2 Defeitos da *SAM*

Existem algumas variáveis que contribuem diretamente na formação de defeitos em *SAM*. Impurezas em filme metálico ou na solução em que a *SAM* está sendo preparada, tempo de imersão, defeito da rugosidade do ouro, dentre outros aspectos, podem comprometer a estrutura da monocamada (MENDES, 2006).

Um dos tipos de defeitos inerentes ao desenvolvimento de *SAM* em superfície de ouro é a vacância monoatômica – regiões da *SAM* que possuem

desnível em relação às regiões vizinhas, gerado pela redução de átomos de ouro na superfície afetada, ou até mesmo, espaços vazios sem átomos de ouro, interferindo na formação da monocamada (LOVE et al., 2005) (Figura 03).

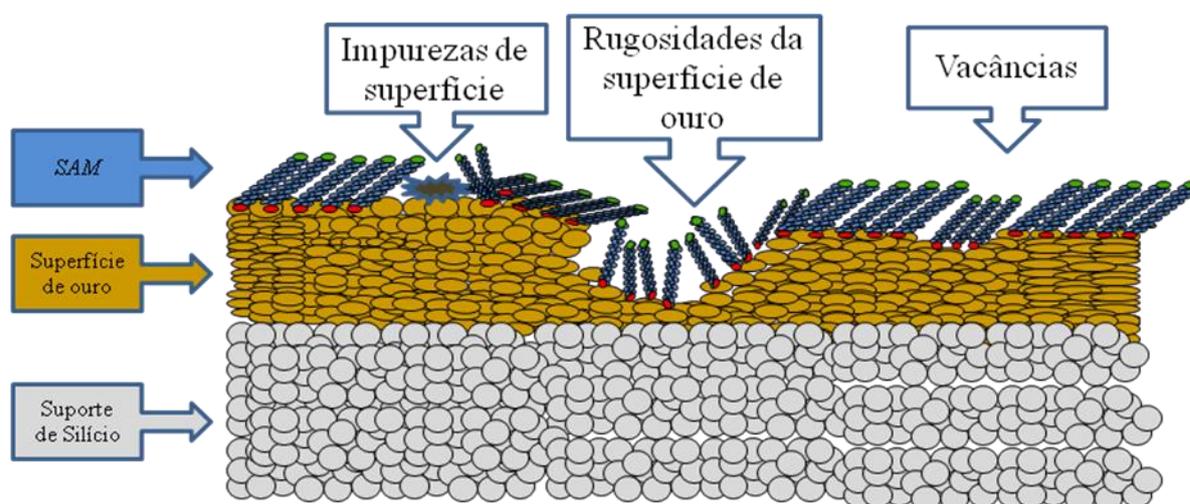


Figura 03 – Ilustração esquemática sobre defeitos da SAM em substrato de ouro policristalino. Fonte: LOVE et al., 2005.

Love e colaboradores (2005), baseados em estudos sobre tióis, sugerem ainda, que a formação estrutural e funcional da SAM e a presença aumentada ou minimizada de defeitos, dependem de alguns fatores, como: tipo de solvente usado; temperatura – acima de 25^o C pode melhorar a cinética de formação; concentração e tempo de imersão do adsorbato – parâmetros inversamente proporcionais (quanto menor a concentração, maior deverá ser o tempo de imersão, adequação ao tipo de solução usada, quanto maior o tempo de imersão, mais organizada poderá ser a monocamada formada; concentração de oxigênio na solução; limpeza do substrato – recomendam uso de “solução piranha”; pureza do adsorbato; e o tamanho da cadeia molecular das substâncias químicas envolvidas.

1.2.1.3 Técnicas de Imobilização de Biomoléculas

A imobilização de biomoléculas, como anticorpos, receptores, enzimas ou DNA, sobre suportes sólidos constitui etapa fundamental na montagem de biossensores ou sistemas bioeletrônicos (YANG; LI, 2005). Existem várias técnicas de imobilização de biomoléculas, como: adsorção física, ligação cruzada (*cross-linking*, glutaraldeído), malha de gel (agarose, gelatina), ligações covalentes (APTS, cisteamina), dentre outras (REN et al., 2005; YANG et al., 2006).

A seleção de procedimentos de imobilização é dependente de alguns parâmetros que incluem, por exemplo, a orientação de anticorpos imobilizados, a carga da proteína, a atividade protéica, regeneração (reversibilidade) e o custo. As metodologias de imobilização de biomoléculas, em geral, são baseadas em mecanismos químicos e físicos (GONG et al., 2007).

A imobilização química é interessante por promover uma forte união estável da proteína ao suporte. Porém, pode alterar a estrutura nativa da biomolécula. Já a adsorção física é uma técnica simples de imobilização de proteínas, gera menos alterações na estrutura nativa das proteínas, mas, não apresenta estabilidade. Ou seja, apresenta curto tempo de atividade retentora podendo ser lixiviada durante procedimentos de lavagem (DEMIREL et al., 2007; GONG et al., 2007).

A imobilização covalente, utilizada neste estudo, proporciona algumas vantagens para a construção de SAM em imunossensores: maior estabilidade de ligação entre proteína e substrato, o que proporciona maior resistência a qualquer tipo de dissociação em solventes (água, tampões, dentre outros); possibilidade de controle da disposição das proteínas sobre a região transdutora do sensor e de modificação química na camada de biorreconhecimento, gerando melhor reprodutibilidade e cobertura (DEMIREL et al., 2007; DISLEY et al., 1998).

A ligação química covalente é realizada entre grupos funcionais do material biológico que não sejam essenciais para sua atividade catalítica, para evitar a perda da atividade biológica. Para isso, há necessidade de reconhecimento entre os grupamentos funcionais ativos (-OH, -NH₂, -COOH, -SH) da estrutura da

monocamada com o substrato. Essa ligação covalente é descrita em três etapas: ativação dos grupos funcionais da superfície do sensor; imobilização da molécula de reconhecimento; e remoção de moléculas fracamente ligadas, ou adsorvidas (LOJOU; BIANCO, 2006).

Demirel e colaboradores (2007) relataram que quando moléculas de imunoglobulinas da classe G (IgG) são quimicamente imobilizadas em superfícies não-modificadas, com orientação desordenada, podem ter suas regiões de reconhecimento do antígeno (Fab) ocultas, o que ocasiona um impedimento de ligações antígeno-anticorpo. Por outro lado, afirmam, também, que imobilizações de IgG com orientações randomizadas podem resultar em perda de atividade biológica, devido a impedimento estereoquímico gerado.

Sendo assim, diversos autores preparam ou ativam os grupos carboxílicos, da porção cristalizada (Fc) de imunoglobulinas ou de grupos funcionais das SAM. Utilizam, por exemplo, substâncias como EDC e NHS, para que haja uma maior afinidade entre a porção Fc do anticorpo e a SAM construída sobre o substrato, através de reação de formação de amida (Figura 04) disponibilizando as porções Fab para as interações com os epítomos antigênicos (AIZAWA et al., 2006; CATARUZZA et al., 2006; DUTRA et al., 2007; DUTRA; KUBOTA, 2007; GOODING et al., 2004; LOVE et al., 2005; PEI et al., 2000).

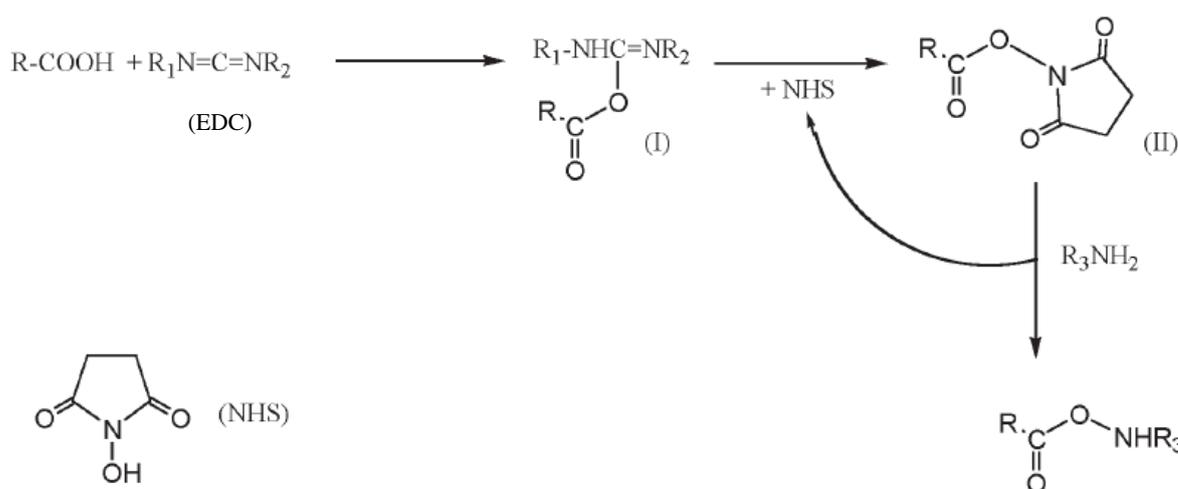


Figura 04 - Representação esquemática da fórmula estrutural de N- hidroxisuccinimida (NHS) e Carbodiimida (EDC) e a reação de formação de grupo amida do grupo carboxílico a ser ativado. Fonte: CATARUZZA et al., 2006.

Imobilização de imunoglobulinas pode ocorrer em superfícies modificadas por diversas substâncias, como: 3-aminopropiltriétoxissilano (APTS), 3-mercaptopropiltrimetoxissilano, ácido mercaptoundecanóico (MUA), ácido mercaptopropiônico (MPA), cisteamina, 4-aminothiophenol (PATP), ácido undecilênico, trimetoxissililpropildietilenetriamina (DETA), biotina, avidina, polivinilbutiral (PVB), carboximetildextrana, dentre outras, que promovem a união dessas biomoléculas à superfície desejada (CAI; PEMBERTON, 2000; DEMIREL et al., 2007; DISLEY et al., 1998; DUTRA et al., 2007; GOODING et al., 2004; REN et al., 2005; WEI et al., 2003).

A superfície onde será formada a SAM, deverá ser sistematicamente tratada e limpa previamente. A não observância desta etapa pode ser crítica e influenciar diretamente a reprodutibilidade e confiabilidade da SAM desenvolvida. Esta limpeza representa um tratamento químico dos discos de ouro, que podem ser imersos em “solução piranha” (1:3 peróxido de hidrogênio, H_2O_2 ; ácido sulfúrico concentrado, H_2SO_4), que é uma das soluções mais empregadas para limpeza em superfícies de ouro (CARVALHAL; FREIRE; KUBOTA, 2005; FAKUNLE et al., 2006; MENDES, 2006).

A solução do meio onde ocorrerão as ligações químicas ou reações de adsorção física de biomoléculas deve ser cuidadosamente preparada para garantir a integridade e estabilidade dessas moléculas. Na literatura pesquisada, soluções de Tampão Fosfato Salina (PBS), com pH entre 7,0 a 7,5 e em concentrações de 50 a 100 mM foram as mais utilizadas para construção e funcionamento de imunossensores, apresentando melhores resultados, inclusive em reações com presença de condutividade elétrica (DUTRA et al., 2007; HARNOIS et al., 2006; SEZGGINTÜRK; GÖKTUG; DINÇKAYA, 2005).

1.2.1.4 Silanização de superfícies com 3-aminopropiltriétoxissilano (APTS)

A modificação de superfície por reações de silanização é amplamente utilizada em nanotecnologia. A difusão dessa técnica está relacionada à biocompatibilidade e adesividade dos silanos em diferentes condições do estado da superfície (rugosidade, hidrofobicidade, adesividade, etc.) e à característica

bifuncional proporcionada a essas superfícies modificadas com a silanização (Figura 05). Tal fato permite a formação de ligações covalentes mais estáveis, entre peptídeos e substrato, com construção de camadas mais homogêneas e estáveis (ARROYO-HERNÁNDEZ, 2007; BEARI et al., 2001; SIMON et al., 2002).

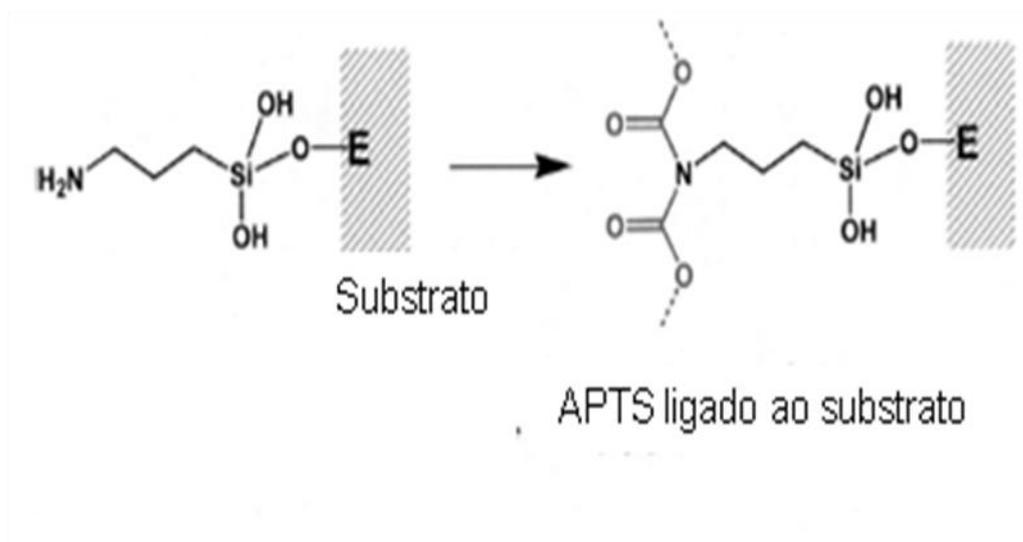


Figura 05 - Esquema sobre a bifuncionalidade do APTS. Fonte: BEARI et al., 2001.

O APTS (Figura 6) é um dos organossilanos mais utilizados, principalmente em superfícies de silício. Apresenta algumas propriedades interessantes, como a estabilidade em soluções aquosas. O grupo -NH₂ de segmentos de APTS tende a formar pontes de hidrogênio com outros grupos funcionais e que podem ser facilmente convertidos em grupos NH₃⁺ em condições ácidas, comprovado por estudos de Raman e FTIR (OGASAWARA et al., 1999).

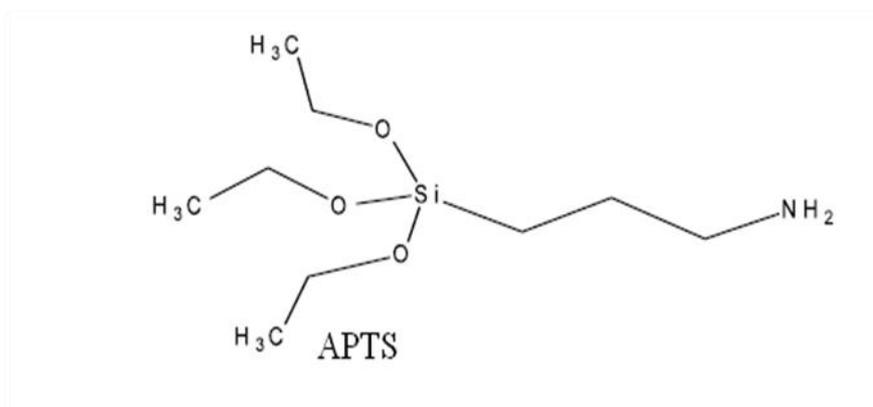


Figura 06 – Representação sobre a estrutura química do APTS. Fonte: ERBA et al., 2003.

Outra justificativa para a ampla utilização do APTS como monocamada composta por grupos aminoterminais livres, é a presença de três grupos etóxi que promovem quimiossorção ao substrato e previnem o impedimento estereoquímico de ligantes, como a biotina à SAM e, conseqüentemente, desta ao substrato (DEMIREL et al., 2007).

Quando ocorrem reações químicas envolvendo APTS, são eliminados os grupos etóxi em forma de etanol que são substituídos por unidades de hidroxila denominadas de silanóis (-Si-OH). Uma unidade recebe o nome de monosilanol, duas unidades por molécula é denominado silanodiol e, no caso de trialcóxissilanos (APTS), pode haver formação de silanetriol. Os silanóis promovem maior reatividade no estabelecimento de ligações entre o substrato e silanos organofuncionais. Adicionalmente, a rápida hidrólise de ligações etóxi-silanos e a disponibilidade de silanóis reativos, no átomo de silício central da molécula do APTS, também influenciam a reatividade dessa substância, promovendo, com isso, maior adesividade e maior estabilidade (horas ou dias) desses compostos, em soluções aquosas. Subseqüentemente, a atividade dos produtos de hidrólise, em soluções aquosas, é reduzida como resultado da formação de ligações cruzadas entre as moléculas de silano, gerando insolubilidade e siloxanos poliméricos (estruturas geleificadas). Isso reduz substancialmente o processo de adesão ao compósito. Sendo assim, a concentração de silanol e o grau de formação de oligômeros são decisivos para escolha da técnica de silanização mais adequada (BEARI et al., 2001; PLUEDDEMANN, 1991).

Para caracterização de estruturas oligoméricas são utilizados os termos: estrutura-M (*M-structures*) para representar uma ligação cruzada entre unidades; estrutura-D (*D-structures*) para representar ligação cruzada dupla entre as unidades, incluindo silanodióis; e, estrutura-T (*T-structure*) para representar a ligação cruzada tripla entre as unidades em geral (Figura 07). A presença de estruturas-D, oligômeros de cadeias curtas com duas ligações cruzadas, gerou a formação de uma cobertura mais uniforme e conseqüentemente uma camada mais homogênea, que é uma característica interessante para a formação de SAM (BEARI et al., 2001).

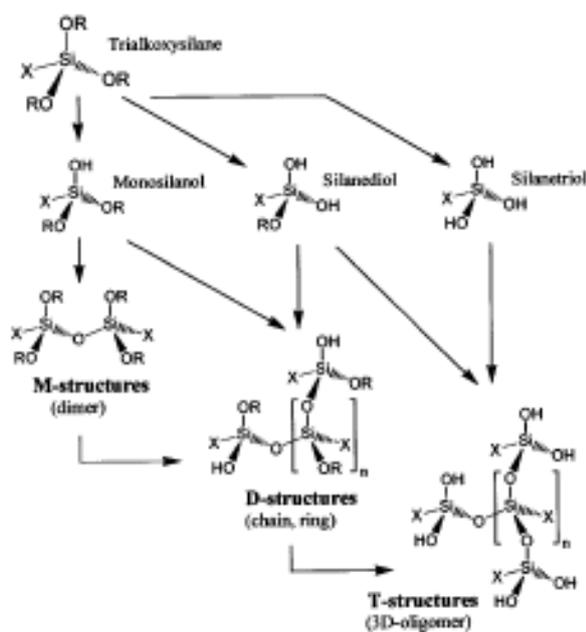


Figura 07 – Representação esquemática sobre a rota de hidrólise e condensação de organossilanos. Fonte: BEARI et al., 2001.

Vários fatores podem interferir na reação de silanização, como: a natureza dos grupos hidrolisáveis das moléculas dos silanos; tipos de solventes; temperatura; tempo de reação; pH; concentração; catálise; dentre outros. Beari e colaboradores (2001) recomendam ainda que, o tempo ótimo de reação de hidrólise e condensação de APTS está entre cinco a quarenta horas de reação, com uma faixa de pH ideal entre quatro e onze.

Na literatura, são descritos vários tipos de solventes empregados para silanização de superfícies, como: água deionizada (BEARI et al., 2001; MESKINI et al., 2007; TLILI et al., 2005), clorofórmio (KIM et al., 2004), etanol (DEMIREL et al., 2007; HAN et al., 2006; VESTERGAARD et al., 2008), tolueno anidro (ETIENNE e WALCARIUS, 2003; IUCCI, et al., 2007; QINLIN; XIANHUA, 2007), hexano anidro (SIMON et al., 2002); dentre outros.

Silberzan e colaboradores (1991) enfatizam que a presença de filme de água sobre a superfície e a quantidade de água presente na reação podem influenciar significativamente a silanização e suas características estruturais, comprometendo a função da monocamada auto-organizada, formada.

Pela análise de resultados das propriedades dos organossilanos, usando Ressonância Magnética Nuclear, foi demonstrado por Beari e colaboradores (2001) demonstraram que a redução de reatividade gerada pela utilização desses silanos, em solução aquosa, pode gerar aumento na formação de ligações cruzadas entre os silanóis, com conseqüente formação de grandes agregados, que se depositam sobre as superfícies, permitindo, com isso, uma completa cobertura de superfície.

Porém, Simon e colaboradores (2002) construíram monocamadas de APTS, sobre silício, utilizando dois tipos de solventes diferentes: solução aquosa ácida e hexano anidro (livre de água) e estudaram as características estruturais dessas diferentes SAM, utilizando técnicas de Ângulo de Contato e Microscopia de Força Atômica (AFM). E detectaram que a SAM formada com a solução anidra foi mais homogênea, estável e com limitados agregados de APTS, do que a SAM formada em solução aquosa.

Etienne e Walcarius (2003) realizaram investigação analítica da reatividade e estabilidade química do APTS, sobre a sílica, recomendando que esse silano deva ser usado em soluções com pH neutro ou levemente alcalino, para aplicações que requerem exploração de propriedades de grupos aminos, somente em experimentos de curto tempo (alguns minutos). Os meios fortemente ácidos podem ser utilizados em experimentos de longo período de tempo (dias) de reação,

estando o grupo amina, do APTS, na sua forma protonada. Outro aspecto interessante, abordado pelos autores, foi que o solvente orgânico, tolueno, aumentou mais a estabilidade química do APTS, que a solução aquosa.

Han e colaboradores (2006) caracterizaram, com auxílio da técnica de Ângulo de Contato, a espessura de SAM formada com APTS na concentração de cinco por cento, em etanol, na temperatura de 50°C, em diferentes tempos de imersão (20 minutos, uma hora, três horas e 20 horas) do substrato (silício). Observaram que o APTS tende a se acumular gradativamente, na superfície, conforme o aumento do tempo de imersão, resultando em uma superfície heterogênea e mais espessa (10 nm para 20 minutos; 32nm para uma hora; 75 nm para três horas, e 140 nm para 20 horas de imersão). E ao lavarem as superfícies modificadas com ácido acético, detectaram redução de espessura (> 4nm) das monocamadas de silano das diferentes amostras.

Apesar da difundida utilização de alcanetióis, sobre superfície de ouro e de APTS, em superfícies de silício, para a formação de SAM, neste trabalho foi realizada a construção da monocamada utilizando APTS em superfície de ouro, baseado em estudos como o de Herlem e colaboradores (2008), de Meyer, Hartmann e Keusgen (2006) e de Vestergaard e colaboradores (2008), os quais fizeram uso das mesmas substâncias com técnicas diferenciadas.

1.2.1.5 Bloqueio de sítios de ligações inespecíficas

O maior problema relacionado à construção de biossensores, para proteínas, é a adsorção inespecífica de biomoléculas diretamente sobre os suportes ou sobre a SAM gerando sinais interferentes que reduzem a fidedignidade dos testes (KIM et al., 2004). Para minimizar esses efeitos são aplicadas diversas técnicas de bloqueio de sítios livres. Dentre as substâncias descritas na literatura temos a utilização de glicina (DUTRA et al., 2007), albumina de soro bovino (BSA) (GUERRIERI, et al., 2006; GOODING et al., 2004; GONG et al., 2007; TLILI et al., 2005) e etanolamina (CATIMEL et al., 1997; LIU et al., 2004)

A glicina é o aminoácido estruturalmente mais simples (Figura 08), com cadeia lateral tão pequena que não contribui para existência de interações hidrofóbicas (NELSON; COX, 2002). Dutra e colaboradores (2007) realizaram estudos sobre eficiência de substâncias bloqueadoras de sítios livres presentes em SAM composta por cisteamina e imunoglobulinas e comprovaram que a glicina a 10 mM foi mais eficiente em reduzir as ligações inespecíficas do biossensor construído.

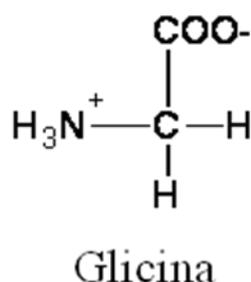


Figura 08. Fórmula estrutural do aminoácido Glicina. Fonte: NELSON; COX, 2002.

A albumina de soro bovino (BSA, Figura 09) é uma proteína composta por diversos aminoácidos com grupos funcionais amino (asparagina, glutamina, lisina e arginina) ou grupos carboxílicos (ácido aspártico e glutâmico). Por essa diversidade de aminoácidos, principalmente os ricos em grupos amino, a imobilização dessas moléculas de proteína sobre superfícies ocorre em diversas orientações, dificultando a identificação de quais partes da BSA foram ligadas ao substrato (AOYAGI et al., 2003).

Com auxílio da microscopia eletrônica foi determinado o tamanho da molécula de BSA, em condições fisiológicas. O eixo maior apresentou 60 Å e o eixo menor, 45 Å (MURPHY et al., 1988). Vale destacar que a proteína BSA, em diferentes concentrações, foi a mais utilizada para bloqueio de ligação inespecífica em biossensores na literatura consultada (GUERRIERI, et al., 2006; GONG et al., 2007; GOODING et al., 2004; MEYER; HARTMANN; KEUSGEN, 2006; TLILI et al., 2005).

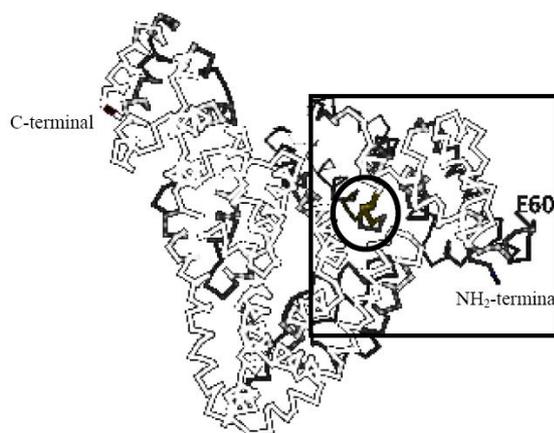


Figura 09 - Representação esquemática da estrutura da Albumina Bovina Sérica. Fonte: AOYAGI et al., 2003.

A caseína é uma proteína da família dos fosforilados (α -s₁, α -s₂, β e κ -caseína), composta por estruturas primárias e diferentes conformações de estruturas secundárias. Monômeros de caseína tendem a se auto-associarem na ausência de íons de cálcio (Ca^{+2}), gerando agregados de, aproximadamente, 9,4 nm, denominados submicelas. Na presença de íons de Ca^{+2} , essas partículas tendem a formar complexos esféricos coloidais, em leite desnatado, denominadas micelas de caseína, que são responsáveis pelo transporte de íons de cálcio e fosfato. Essa proteína está presente em 80% da composição protéica do leite bovino (BYLER; FARREL-JR; SUSI, 1988).

A caseína - obtida, geralmente, do leite em pó desidratado e desnatado - é utilizada para bloqueio de membranas de nitrocelulose e em superfícies de poliestireno (NELSON; COX, 2002) em técnicas como Dot-ELISA e ELISA (BHATTACHARYA; BHATTACHARYA; DHAR, 1999; MIZOBE-ONO, 2004).

Em modelos experimentais foi estudada essa propriedade bloqueadora da caseína e os estudos mostraram que a adsorção de β -caseína indicam que uma auto-interação gera a formação de grupos hidrofóbicos, dentro da molécula, na parte central e por longas caudas, mais externas, compostas por cadeias de grupos aminoterminais, hidrofílicos, gerando uma estrutura semelhante ao detergente. Já os estudos de adsorção da α -s₁-caseína mostram que esta proteína se apresenta

como um polímero tri bloqueador, devido a sua conformação de cadeia sinuosa, composta por unidades com alças hidrofílicas, na parte central e grupos hidrofóbicos, nas extremidades (HORNE, 2002) (Figura 10).



Figura 10 – Estruturas observadas em auto-associação de moléculas de caseína baseados em estudos de adsorção como copolímeros bloqueadores. Fonte: HORNE, 2002.

1.3 Imunoglobulinas

As imunoglobulinas ou anticorpos são glicoproteínas solúveis, produzidas e secretadas por linfócitos B diferenciados em plasmoblastos ou plasmócitos. Em humanos, existem cinco classes de Imunoglobulinas: A, D, E, G e M. Sendo que as das Classes A e G possuem as subclasses: IgA1 e IgA2; IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

O monômero de imunoglobulina é composto por quatro cadeias polipeptídicas, duas leves e duas pesadas, unidas por pontes dissulfeto (cisteína) e por forças não-covalentes. A estrutura básica das imunoglobulinas apresenta dois sítios de ligação para o epítipo antigênico (Fab) e uma região constante ou cristalizável (Fc), importante para desempenho da função biológica, das diferentes classes de imunoglobulina. Os domínios Fab e o Fc dão o aspecto de Y ao monômero de imunoglobulina (Figura 11). A especificidade e a afinidade de ligação do anticorpo ao antígeno são determinadas pelos resíduos de aminoácidos do domínio variável, composto pelas cadeias pesadas e leves, presente nas regiões Fab da imunoglobulina. Neste local são encontradas as porções aminoterminal da molécula e, no domínio Fc, a carboxiterminal (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008;

GIACOMELLI; BREMER; NORDE, 1999; JEFFERIS; LUND; GOODALL, 1995; JENEWAY et al., 2007; NELSON; COX, 2002).

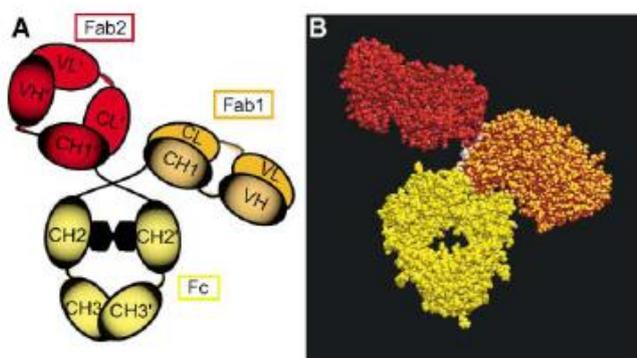


Figura 11 - Estrutura esquemática da IgG. Fonte: SANDIN et al., 2004.

1.3.1 IgG

As imunoglobulinas da classe G apresentam peso molecular de aproximadamente 150 kDa e, sobre o seu tamanho, alguns autores descrevem que a molécula de IgG apresenta doze nanômetros de altura e quatro nanômetros de espessura (BAE et al., 2005; MEUSE, 2000).

Outro aspecto estrutural interessante, de algumas classes de imunoglobulina, como a IgG, é a flexibilidade. Sandin e colaboradores (2004) afirmam que a molécula de IgG apresenta alta flexibilidade, devido aos tipos de ligações e interações químicas existentes entre as porções Fc e Fab. Essa flexibilidade proporciona, a IgG, melhor eficácia no reconhecimento e ligação com os antígenos. A porção Fab apresenta rotatividade de 158° . O ângulo existente entre as regiões Fc-Fab variam de 66° a 123° e entre Fab-Fab, de 115° a 172° .

A interação antígeno-anticorpo promove a formação de complexos, por meio de ligações não-covalentes, que dependem principalmente da complementaridade estrutural entre as superfícies tridimensionais do anticorpo e do antígeno. A mensuração do tamanho do anticorpo monoclonal foi obtida pela análise em microscopia eletrônica. A porção Fab apresenta aproximadamente 65 Å

de comprimento e 35 Å de largura. A distância entre dois sítios ligantes, de cada anticorpo, foi de aproximadamente 90 Å, em um ângulo de 90° e de 130 Å, a 180° (MURPHY et al., 1988).

1.4 TNF- α

1.4.1 Aspectos estruturais e bioquímicos

No início, o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) foi descrito como um fator envolvido na regulação de processos malignos. No entanto, hoje, é mais conhecido como importante mediador da resposta inflamatória (BAUGH; BUCALA, 2001; JACKSON, 2007; ROBERT; KUPPER, 1999).

O Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF α) pertence a uma superfamília com 19 membros ligantes e 30 receptores, descritos até o momento (WARE, 2008). Dessa superfamília, o TNF foi um dos primeiros membros a ser identificado, o qual é sintetizado como uma proteína de membrana tipo II não-glicosilada, com uma extremidade aminoterminal intracelular e, outra maior, carboxiterminal extracelular (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Na membrana, o TNF- α é expresso como homodímero que é liberado por clivagem realizada pela metaloproteinase, também, associada à membrana (PFEFFER, 2003; AGGARWAL, 2003). O homodímero de TNF- α humano foi isolado, em 1985, por Aggarwal e colaboradores, do sobrenadante de cultura de células de leucemia promielocítica, da linhagem HL-60. O peso molecular de aproximadamente 17 kDa foi determinado, em eletroforese de gel de poliacrilamida, como também, o ponto isoelétrico de 5,3. Na molécula, ainda, foi detectada a presença de duas cisteínas, as quais formam uma ponte dissulfídica (AGGARWAL et al., 1985). Três dessas moléculas polimerizadas compõem a forma de pirâmide do TNF- α secretado (PFEFFER, 2003).

Já foram descritos dois receptores: o TNFR1 (TNFRp55-60) e o TNFR2 (TNFRp75-80) que interagem com a forma homodimérica do TNF- α . O TNF- α

secretado apresenta peso molecular de 51kDa e, devido a sua forma triangular (Figura 12), pode se ligar a três receptores, simultaneamente (PFEFFER, 2003).

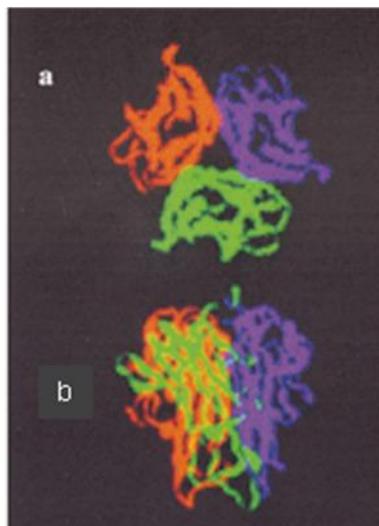


Figura 12 – Esquema sobre a estrutura trimérica do TNF- α , onde cada monômero apresenta uma cor. Temos uma vista superior (a), onde se ligam os receptores de TNF- α , e lateral (b) dessa molécula. Fonte: LOCKSLEY; KILLEEN; LENARDO, 2001.

O TNF- α é uma citocina produzida, principalmente, por fagócitos mononucleares ativados (macrófagos), embora, os linfócitos T efetores, células NK e mastócitos, também secretem essa proteína. O estímulo mais potente para desencadear a síntese de TNF- α pelos macrófagos é o lipolissacarídeo (LPS), presente na parede celular de bactérias Gram-negativas. O LPS bacteriano é reconhecido pelos receptores de membrana, como, o TLR-4 (receptor tipo *Toll* 4) ligado à proteína CD14, induzindo a liberação dessa citocina (PFEFFER, 2003; AGGARWAL, 2003).

O TNF- α estimula as células endoteliais vasculares a expressarem novas moléculas de adesão, as quais facilitam a entrada de neutrófilos e monócitos no local da infecção. O TNF- α é produzido em grandes quantidades em infecções graves e exerce efeitos sistêmicos. Por exemplo, sobre o hipotálamo, induz o aumento da temperatura corpórea; sobre o fígado, leva a produção de proteínas de fase aguda. As altas concentrações de TNF- α podem provocar choque e trombose intravascular (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

A septicemia e o choque séptico são complicações de infecções que podem ameaçar a vida e constituem causa comum de mortes em unidades de terapia intensiva. A sepse, geralmente desencadeada por lipopolissacarídeo (LPS) - principal componente da parede celular de bactérias gram-negativas – resulta na ativação de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , IL-6 e IL-12, que podem causar injúrias às células do organismo (GENFA et al., 2005).

Vários fatores contribuem para o alto índice de morbidade e mortalidade gerado por essa condição sistêmica relacionada à infecção. Como, por exemplo, a dificuldade de diagnóstico preciso, relacionado à heterogeneidade e complexidade da resposta do hospedeiro à infecção, que varia de indivíduo para indivíduo, e à falta de métodos diagnósticos eficazes, ou seja, utilização de biomarcadores biológicos que forneçam alta sensibilidade e especificidade para essa resposta inflamatória sistêmica (CARRIGAN; SCOTT; TABRIZIAN, 2004).

Utilizando o método de ELISA, a inventora Mary Cullen (JOHNSON & JOHNSON, 2004) desenvolveu e adquiriu direito de propriedade intelectual, sobre a técnica de quantificação de TNF- α , em fluidos de feridas para diagnóstico precoce de infecções. Em infecções crônicas, como as de pacientes diabéticos com infecção causada por perfuração plantar, foi detectada a concentração de TNF- α de 6,36 pg/mL, em fluido de ferida não-infectada e 62,5 pg/mL, em fluido de ferida infectada. Em estudo *in vitro*, uma cultura de neutrófilos foi estimulada pela presença de lipopolissacarídeos bacterianos e depois foi verificada a concentração de TNF- α no sobrenadante. Ao final de quatro horas de experimento foi detectada a quantidade de 50 pg/mL de TNF- α e, em 24 horas, essa quantidade aumentou para 220 pg/mL. Esses resultados comprovam a ligação direta entre infecção e aumento da concentração de TNF- α , o que o torna importante marcador inflamatório para aplicações diagnósticas e de tratamento de infecções.

A Artrite Reumatóide (AR), que acomete articulações e produz perda de qualidade de vida, é apontada como uma das doenças auto-imunes mais comuns. A AR é caracterizada por um invasivo e destrutivo infiltrado de linfócitos, macrófagos e sinoviócitos em tecidos articulares, estando o TNF- α relacionado ao

intenso quadro inflamatório associado a essa doença (FELDMAN; MAINI, 2003; KLIMIUK et al., 2001; LEE; WEINBLATT, 2001; ROSSOL et al., 2005; SANCHÉZ-PERNAUTE, 2008).

Estudos recentes sobre patogenia da Artrite Reumatóide mostram que os receptores tipo *Toll* (TLR): TLR-2, TLR-3 e TLR-4 aparecem ativados, em células locais das articulações comprometidas, estimulando a produção de TNF- α e interleucina-6 (SANCHÉZ-PERNAUTE, 2008).

Diversas técnicas de imunoenaios são utilizadas para detecção de TNF- α . Dentre estas podemos citar: ELISA (BOBBIO-PALLAVICINI et al., 2004; CHAMBERLAND et al., 2008; JOHNSON & JOHNSON, 2004; KLIMIUK et al., 2001), Citometria de Fluxo (KRONQVIST et al., 2008), Western Blot (MONTECUCCO et al., 2008), dentre outras.

1.4.2 Terapias imunossupressoras de TNF- α

A partir da década de 50, ao invés da utilização de corticóides, com seus efeitos adversos severos, a medicina começou a utilizar a terapia bloqueadora da ação de TNF- α , como tratamento de doenças auto-imune. Também denominados agentes neutralizadores de TNF- α , existem hoje, cerca de três substâncias comercializadas e amplamente difundidas: os anticorpos monoclonais (infiximab - Remicade® e adalimumab - Humira®) e o receptor solúvel conjugado à porção Fc de anticorpo (entanercept - Enbrel®) (ATZENI et al., 2007; GARDNER, 2005; MEAGER, 2006).

O infiximab é um anticorpo monoclonal anti-TNF- α aprovado pela FDA (*US Food and Drug Administration*) e utilizado como tratamento para inibição da atividade funcional do TNF- α . É administrado por infusão intravenosa, em pacientes com doenças inflamatórias como Artrite Reumatóide, Espondilite Anquilosante, Artrite Psoriática Psoríase, Doença de Crohn e Doença de Crohn Fistulizante. Esse anticorpo monoclonal humano-murínico (quimérico), possui região Fc oriunda de uma imunoglobulina humana e as regiões variáveis (Fab) isoladas de camundongo.

Apresenta forte especificidade e alta afinidade para o TNF- α , em suas formas solúveis e transmembranais (JACKSON, 2007; REMICADE®, 2005).

Feldman e Maini (2003) relataram que um grupo de pesquisadores de Hugh McDavitt`s realizou pesquisas, em camundongos, sobre a utilização de terapia bloqueadora de TNF- α e atribuíram a isso, o aparecimento de doença semelhante a lúpus, nesses animais. Os autores fazem um alerta sobre o acompanhamento criterioso de pacientes com doenças crônicas, devido a várias razões, tais como: ação sinérgica com outras citocinas da cascata do TNF- α , risco de imunogenicidade, inconveniente de injeções e os altos custos do tratamento. Por esses motivos, sugerem que o tratamento seja personalizado.

Estudos comprovam que a utilização prolongada de terapias bloqueadoras de TNF- α , com doses padronizadas, que variam de 3 a 10 mg/kg, podendo chegar até 25 mg/kg, podem gerar efeitos adversos como: aumento do risco de doenças infecciosas, por exemplo, tuberculose, herpes (LEVÄLAMPI et al., 2008; TRACEY et al., 2008); indução da produção de auto-anticorpos anti-nucleares (ANA) e anti-DNA dupla-fita, que pode desencadear reações semelhantes ao Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) (BOBBIO-PALLAVICINI et al., 200; FUSCONI et al., 2007).

1.4.3 TNF- α como biomarcador de doenças

Na Polônia, Klimiuk e colaboradores (2001) investigaram se o perfil de citocinas, em soro humano de pacientes com artrite reumatóide, estava associado com os aspectos histológicos da doença. No citado trabalho, foram coletados sangue e foi feita biópsia de 25 pacientes com AR, clinicamente ativa e de 25 pacientes com osteoartrite (AO), como grupo controle para análise comparativa. Pelo método de ELISA, os pesquisadores analisaram as concentrações sorológicas e teciduais obtidas pela biópsia das citocinas: IFN- γ , IL-12, TNF- α e IL-15. Os autores demonstraram que TNF- α foi a única citocina, dentre as estudadas, que apresentou níveis de concentração sérica maior ou igual a 44 pg.mL⁻¹ e, por isso, foi eficaz em diferenciar os pacientes com AR daqueles com AO.

Corroborando com os resultados supracitados, Marti e colaboradores (2008) investigaram a ação do TNF- α como marcador inflamatório, utilizando culturas de sangue de pacientes idosos, realizadas no dia da admissão hospitalar e no quarto dia da evolução da septicemia (infecção generalizada). Desses pacientes, apenas 34% apresentaram cultura de sangue positiva, com alta média de concentração de TNF- α no momento de admissão, 84,5 pg.mL⁻¹, enquanto os pacientes com cultura negativa apresentaram 28,5 pg.mL⁻¹. No quarto dia de evolução, esses mesmos pacientes ainda apresentaram altos valores de TNF- α , 50,5 pg.mL⁻¹.

1.4.4 Desenvolvimento de biossensores para análises de TNF- α

Corcoran e colaboradores (1994) construíram biossensor em sistema BIAcore® (SPR), contendo uma matriz de dextrana sobre superfície de ouro, na qual foi imobilizada a citocina, TNF- α , em concentração de 50 μ g.mL⁻¹ e posteriormente foi injetado no equipamento de SPR o receptor de TNF(TNF-R, p55) para caracterização da ligação específica de reconhecimento entre as duas substâncias descritas.

Liu e colaboradores (2004) criaram um imunossensor de Microbalança de Cristal de Quartz (QCM) integrado a um sistema de Análise de Fluxo de Injeção (FIA), para investigar a interação entre TNF- α humano e anticorpos monoclonais, em tempo real. O método de ELISA foi utilizado para validação desta metodologia e houve correlação positiva entre os dois métodos, com constante de dissociação (K_D) dessa interação com valores entre $2,31 \times 10^{-7}$ e $5,41 \times 10^{-7}$.

Chamberland e colaboradores (2008) desenvolveram um biossensor de monitoramento de ação de drogas anti-TNF- α . Para isso, utilizaram nano-estruturas (*nanorods*) de ouro conjugadas com Etanercept (receptor de TNF- α fusionado à porção Fc de imunoglobulina) que foram injetadas em líquido sinovial na articulação de camundongos com artrite reumatóide induzida. Em seguida, imagens das articulações dos animais foram geradas com o emprego da técnica de Tomografia Fotoacústica (PAT). Nas áreas que apresentaram maior foco inflamatório, foram detectados contrastes nas regiões de interação entre os *nanorods* e o TNF- α .

1.5 Métodos para Caracterização da SAM

A etapa de caracterização da SAM é de fundamental importância para comprovação da presença de biomoléculas, ou substâncias orgânicas e inorgânicas em superfícies modificadas. Dentre as diversas técnicas de caracterização usadas em nanotecnologia, destacaremos as que foram aplicadas neste trabalho: Espectroscopia de Ressonância de Plásmom de Superfície (*SPR*) e Microscopia de Força Atômica (*AFM*).

1.5.1 Aspectos teóricos sobre Espectroscopia de Ressonância de Plasmón de Superfície (*SPR*)

A técnica de Ressonância de Plasma (ou Plásmom) de Superfície baseia-se em princípios de transdução óptica, empregada em estudos de superfície, através do monitoramento da mudança do índice de refração, relacionado à adsorção ou imobilização de moléculas à superfície metálica do sistema analisado (FURUKI et al., 2001). Essa técnica é amplamente utilizada para detecção de biomoléculas, hibridização de DNA, interação antígeno-anticorpo, cinética de associação e dissociação, dentre outras aplicações clínicas e biológicas (SHANKARAN; GOBI; MIURA, 2007).

O plasma de superfície é uma onda eletromagnética longitudinal que se propaga na interface entre dois meios, de constantes dielétricas diferentes, como um metal que deve apresentar comportamento de elétrons livres (ouro, mais usado, ou prata), e um dielétrico (vidro). Os plasmas são criados quando uma luz p-polarizada promove uma oscilação na densidade de elétrons livres presentes no filme metálico (MENDES, 2006).

Foram criados diferentes sistemas para gerar excitação do plasma de superfície, sendo a configuração de Kretschmann, baseada na reflectância total atenuada, a mais utilizada em instrumentos de *SPR*, por apresentar maior sensibilidade e resolução em comparação à configuração por grades de difração, por exemplo (MENDES, 2006; SHANKARAN; GOBI; MIURA, 2007).

Em equipamentos que utilizam a configuração de Kretschmann (Figura 13), ocorre a ressonância de plasma de superfície quando, em um determinado ângulo de incidência da luz, o vetor de onda do plásmon ($K_{sp}=K_{ev}$) é igual ao vetor de onda do campo evanescente. Ou seja, ocorre o acoplamento de elétrons oscilantes do filme metálico, promovendo a excitação ressonante do plasma de superfície (DAMOS; MENDES; KUBOTA, 2004).

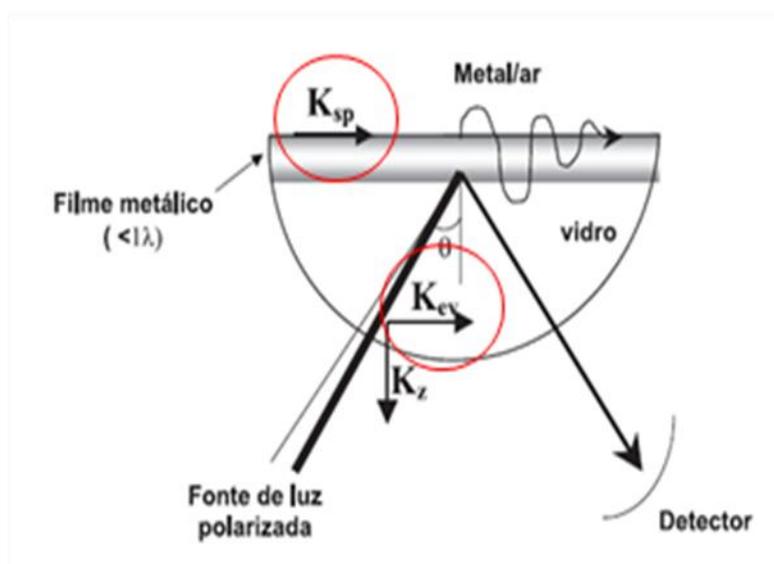


Figura 13 – Representação esquemática sobre a configuração de Kretschmann para SPR. Fonte: CARVALHO; RATH; KUBOTA, 2003.

O vetor de onda do plásmon de superfície (K_{sp}) está diretamente relacionado ao índice de refração do meio sobre o filme metálico. Quando o meio recebe uma camada protéica, por exemplo, gerará uma mudança no ângulo de incidência para que haja a excitação ressonante do plasma de superfície. Sendo assim, é possível aplicar o fenômeno de ressonância de plasma de superfície através do acompanhamento da reflectividade da luz incidente ou do ângulo de ressonância pelo tempo, possibilitando a obtenção de informações sobre a velocidade e extensão de imobilização de substâncias no meio, bem como a determinação de propriedades cinéticas de associação e dissociação, por exemplo (CARVALHO; RATH; KUBOTA, 2003; MENDES, 2006).

O funcionamento de um típico equipamento de *SPR* (Figura 14) se dá quando uma lâmina de vidro recoberta com fino filme de ouro ou prata (espessura

menor que um comprimento de onda da luz) é colocada sobre um prisma, através do qual é focado um feixe de luz monocromático p-polarizado, convergente, sobre o lado inferior do filme metálico, sendo refletido e captado por um detector de fotodiodo. As soluções do analito (tióis, proteínas, DNA, dentre outros) passam através da célula de fluxo, sobre o lado superior do filme metálico, em temperatura e velocidade definidas, gerando a formação de superfícies sensoras dos mais diversos tipos (CARVALHO; RATH; KUBOTA, 2003).

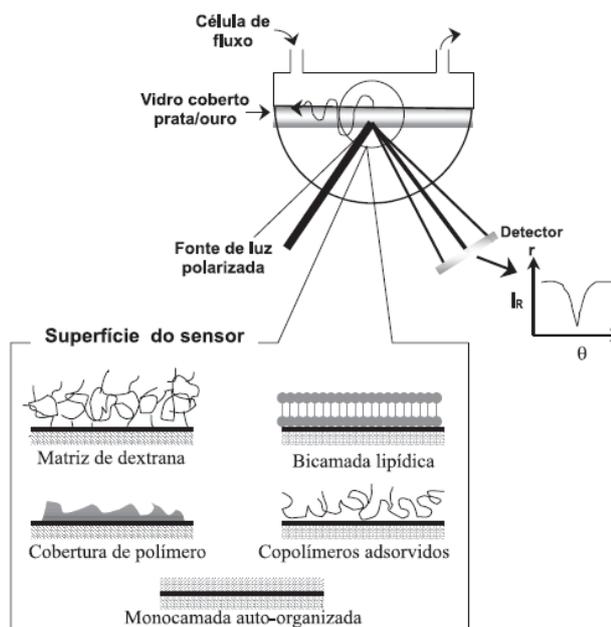


Figura 14 – Representação esquemática sobre instrumento de SPR. Fonte: CARVALHO; RATH; KUBOTA, 2003.

A Figura 15 mostra uma representação esquemática sobre a dinâmica da análise em SPR, associando o evento biomolecular de reconhecimento, ao evento físico de formação de ondas evanescentes, e à captação e processamento dos sinais ópticos por programa de computação para a leitura dos resultados através da formação dos sensorgramas.

Podemos observar através desse esquema, que quando uma biomolécula entra em contato com a superfície do biossensor, ocorre uma adsorção rápida (associação, 1) que promove um aumento no ângulo de ressonância do SPR, seguido por uma plataforma que pode representar saturação de ligações à superfície ou equilíbrio do processo de imobilização de moléculas. Importante

observar que linhas de base, com soluções tampões, são construídas no início e no final (3) do experimento como forma de controle dos ensaios. A diferença entre essas linhas (delta) representa a quantidade de moléculas imobilizadas. Para a obtenção de valores fidedignos, é necessária a realização de lavagens da superfície para remoção de moléculas fracamente ligadas à superfície (DUTRA et al., 2007).

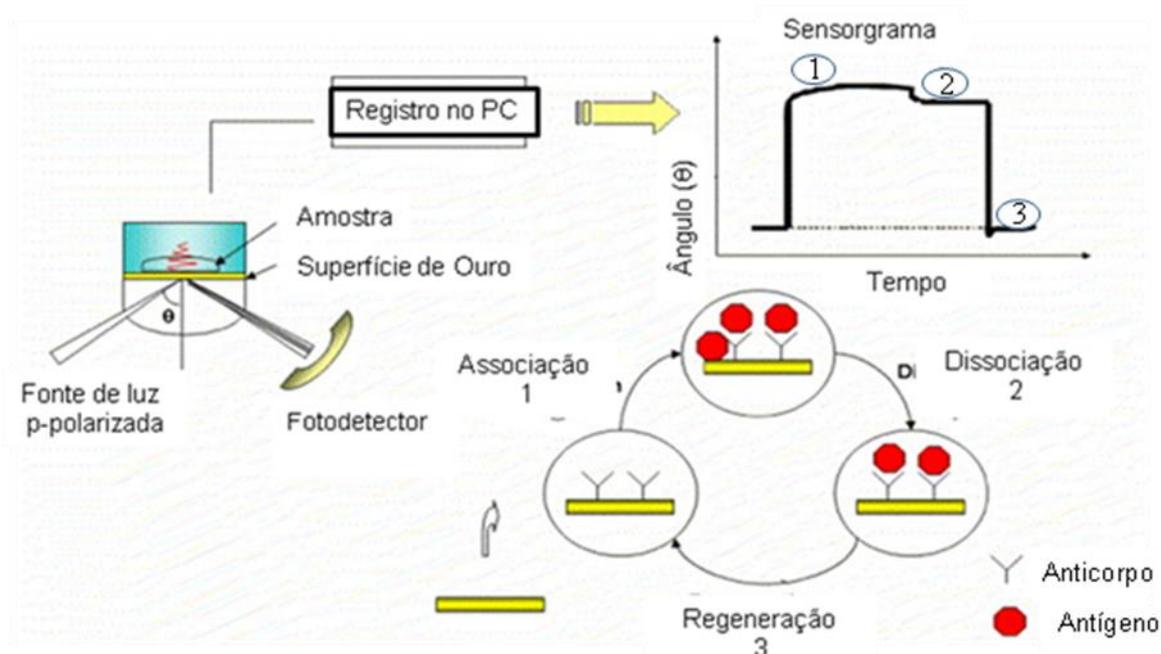


Figura 15 – Ilustração esquemática sobre o funcionamento da técnica de *SPR*. Vale destacar que cada curva do sensorgrama representa uma situação de associação ou dissociação entre biomoléculas e superfície. Fonte: DUTRA et al., 2007.

A técnica de *SPR* apresenta algumas características interessantes: não necessita de marcadores radioativos ou bioquímicos, apresenta flexibilidade no planejamento experimental, e é capaz de promover análises automáticas e rápidas (CARVALHO; RATH; KUBOTA, 2003; DUTRA et al., 2007; MENDES, 2006).

Meyer, Hartmann e Keusgen (2006) construíram imunossensor para detecção de proteína baseado na técnica de *SPR* e apontaram algumas vantagens sobre o método tradicional de análise, ELISA, como:

- Maior rapidez de análise – o imunoenensaio tradicional, ELISA, precisa de 4 a 5 horas de incubação, enquanto o SPR necessita, apenas, de 30 a 60 minutos;
- Sensores baseados em SPR permitem a visualização, em tempo real, da ligação antígeno-anticorpo e o cálculo da constante de ligação do imunocomplexo;
- SPR pode ser aplicado para análise de líquidos corporais de difícil análise como saliva, urina e até mesmo fezes.

1.5.2 Aspectos teóricos sobre Microscopia de Força Atômica (AFM)

Criada em 1986, a Microscopia de Força Atômica (AFM) é uma técnica de verificação de superfícies, que utiliza pontas móveis sobre a superfície analisada, para mensurar informações topográficas espaciais da SAM, preparada sobre o suporte, gerando imagens tridimensionais dessas áreas (BRASIL, 2006; CATTARUZZA et al., 2006; DUPRES; VERBELEN; DUFRÊNE, 2007; H. H.DONG et al., 2006; J. H.DONG et al., 2006; SILVA, 2006; YANG; LI, 2005). Essa técnica também tem sido utilizada para estudos de interação entre proteínas e seus ligantes (reconhecimento molecular), através da mensuração de força de interação entre as moléculas de estudo, dentre outros parâmetros dinâmicos (LEE et al., 2007).

Nesse método, uma alavanca (*cantilever*), flexível e sensível à força, é deslocada com um padrão de rastreamento sobre a superfície da amostra. Essa força causa pequenas flexões detectadas por meios ópticos. A movimentação da ponta (*tip*) ou da amostra é conseguida pela utilização de um tubo piezoelétrico. A informação topográfica durante a varredura da amostra é obtida através da movimentação para baixo e para cima da ponta, quando a força da ponta é mantida constante (DUFRÊNE; HINTERDORFER, 2008).

O método mais comum de detecção de flexão da alavanca (*cantilever*) que segura a ponta, pode ser visualizado na Figura 16. Um feixe de *laser* incide sobre a alavanca e é refletido de um ponto nessa alavanca para um fotodiodo (fotodetector) segmentado que detecta o movimento da sonda. A saída do fotodetector irá

controlar a força aplicada à ponta, de forma que ela fique constante. Já o sistema de movimentação dessa ponta é um dispositivo piezoelétrico tubular que move as amostras nas direções x, y e z sob a ponta. Há uma realimentação do sinal do detector de feixe de laser ao transdutor piezoelétrico da amostra, que faz com que essa se movimente para baixo e para cima para manter uma força constante entre a ponta e a amostra (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; ZAVALA, 2008).

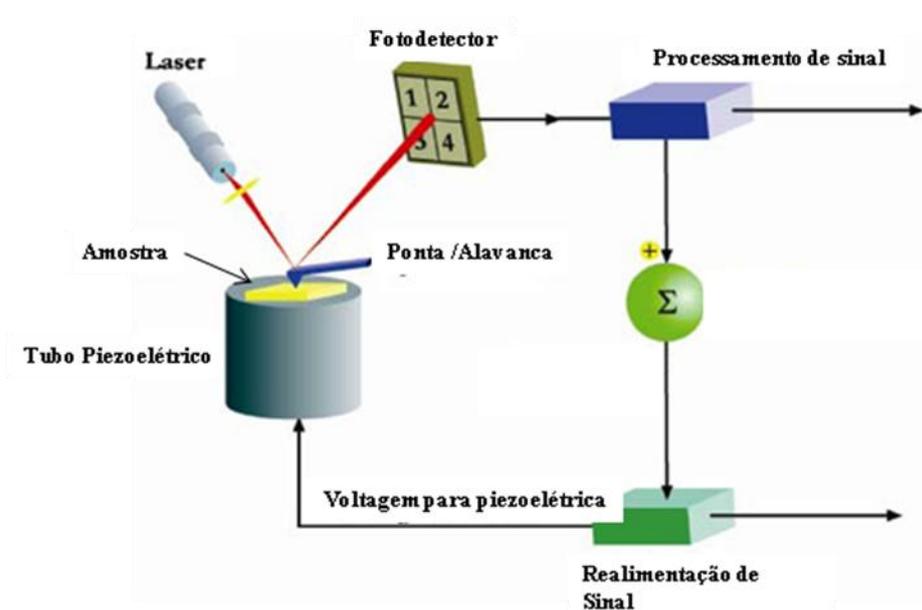


Figura 16 – Representação esquemática sobre o método de reflexão de laser e sistema de movimentação da amostra, baseado na realimentação de sinal. Fonte: ZAVALA, 2008.

O desempenho do microscópio de força atômica depende das características físicas da ponta e da alavanca (Figura 17). Que são estruturas pequenas e delicadas, compostas por silício, óxido de silício ou nitreto de silício. As alavancas podem apresentar algumas dezenas de micrômetros de comprimento, menos de dez micrômetros de largura e cerca de um micrômetro de espessura. Já as pontas, que podem ter formato piramidal ou de cone, apresentam poucos micrômetros de altura e largura na base (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

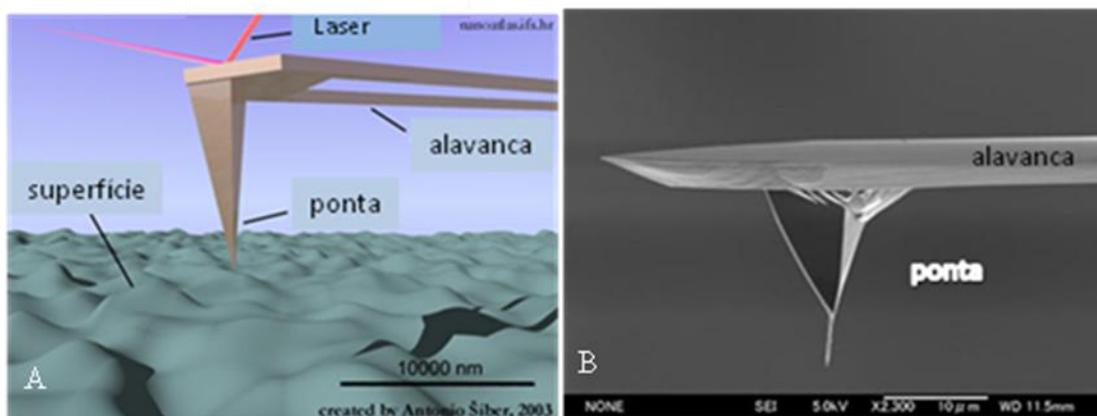


Figura 17 – Ilustrações sobre a alavanca (*cantilever*) e ponta (*tip*) do AFM. A – Ilustração esquemática. B - Imagem de Microscopia Eletrônica (aumento de 2300 vezes) de um *tip*.
 Fonte: <http://nanolabweb.com/blog/wp-content/gallery/general/afm-tip.jpg> e http://www.xintek.com/images/afm_2.jpg.

Para a realização de análise topográfica utilizando *AFM*, existem três técnicas básicas: modo de contato, modo de não-contato e modo de batida (*tapping mode*). No modo de contato a ponta está em contato constante com a superfície da amostra, podendo gerar danos superficiais na amostra com conseqüente distorção de imagem. Sendo assim, contra-indicada para análise topográfica de biomoléculas. No modo de não-contato, utilizado neste trabalho, as mensurações topográficas serão realizadas através das interações das forças de Van der Waals entre a ponta e a superfície. A principal vantagem desta técnica está relacionada à preservação da superfície. No modo de batida a ponta entra em contato com a superfície por curto tempo, periodicamente. Neste método a alavanca sofre oscilação, obtida por uma força constante, e a amplitude é monitorada continuamente (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; ZAVALA, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver biossensor com anticorpos monoclonais imobilizados em superfícies modificadas de ouro, para reconhecimento específico do Fator de Necrose Tumoral – Alfa (TNF- α) humano.

2.2 Objetivos Específicos

- Construir Monocamadas Automontadas (SAM) estáveis e funcionais.
- Imobilizar imunoglobulinas anti-TNF- α humano (proteínas) em superfícies de ouro com preservação da capacidade de reconhecimento específico ao antígeno.
- Caracterizar a presença de imunoglobulinas (proteínas) imobilizadas em superfícies de ouro.
- Verificar as características das imunoglobulinas imobilizadas em superfícies preparadas com APTS em tolueno e em água.
- Verificar a capacidade de bloqueio da Albumina Soro Bovina, Glicina e Caseína.
- Verificar a capacidade de regeneração da ligação antígeno-anticorpo no sistema desenvolvido.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes utilizados

Anticorpos monoclonais liofilizados (Infliximabe, Remicade®, Shering-Plough, Irlanda), TNF-alfa humano e anti-TNF biotilado do kit BD OptEIA™ Set Human, BD Biosciences, EUA. Anti-IgG (H+L) produzido pela PIERCE, EUA. Cloreto de 2-Aminoetanotiol (Cisteamina) e Cloreto de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) foram obtidos da Aldrich, EUA. Ácido Mercaptoundecanóico (MUA), Aminopropiltriétoxisilano (APTS, 99% de pureza), Albumina de Soro Bovino (BSA), Glicina e Caseína da Sigma-Aldrich, EUA. Peróxido de Hidrogênio 30% (m/v), Etanol (99,5%) e Tolueno da Synth, Brasil. N-hidroxisuccinimida (NHS) da Fluka, Suíça. Glutaraldeído 25% da Vetec, Brasil. 3,3'-diaminobenzidina (DAB) da BIO-RAD Laboratories, EUA. Discos de ouro carboximetilados modificados com streptavidina (Sensor Chip SA®) da BIACORE AB, Suíça, e discos de ouro planares, da Xantec Bioanalytics, Alemanha. Para todas as soluções preparadas, exceto APTS em alguns experimentos, foi utilizada água deionizada (> 18MΩ cm, Milli-Q, Millipore®).

3.2 Equipamentos

As análises das características de desenvolvimento do biossensor foram obtidas pelas medidas ópticas do ângulo de Ressonância de Plásmon de Superfície, realizadas em equipamento de espectroscopia SPR ESPRIT da AUTOLAB (Echo Chemie, Holanda) de duplo canal e monitoramento contínuo do sinal. A fonte de luz usada pelo equipamento é um laser (monocromático) com comprimento de onda de 670 nm. Para a execução das medidas foram construídas as monocamadas automontadas ou auto-organizadas (SAM), seguida da

imobilização de anticorpos, em discos de ouro planares, da Xantec Bioanalytics (Alemanha), que possuem 50 nm de espessura de ouro. Também foram utilizados discos de ouro carboximetilados modificados com estreptavidina, comercializados pela BIACORE AB (Suíça). Essas medidas foram realizadas no Laboratório de Eletroquímica, Eletroanalítica e de Desenvolvimento de Sensores (LEEDS), do Instituto de Química, da Universidade de Campinas (UNICAMP- Campinas, São Paulo, Brasil), sob a supervisão da Doutora Renata Kelly Mendes e do Doutor Lauro Tetsuo Kubota.

As análises topográficas das superfícies modificadas, foram realizadas pela Espectrometria por Microscopia de Força Atômica (AFM), em equipamento da *Park Scientific Instruments*, no Laboratório de SPM (*Scanning Probe Microscopy*) do Instituto de Física Gleb Wataghin (IFGW) da UNICAMP (Campinas, São Paulo, Brasil), pelo doutorando Alberto Moreau e supervisionado pela Doutora Mônica Cotta.

3.3 Procedimentos experimentais

3.3.1 Reconstituição e diluição de anticorpos monoclonais

Para utilização dos anticorpos monoclonais sob apresentação liofilizada (Infliximab, Remicade®, Shering-Plough, Irlanda) foi realizada a reconstituição com água deionizada ($> 18\text{M}\Omega\text{ cm}$, Milli-Q, Millipore ®) para adquirirem, em solução, concentração igual a $10\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, conforme especificações do fabricante. O material reconstituído foi alíquotado e estocado. Para análise quantitativa (espectrofotometria de luz ultravioleta visível) e qualitativa (Dot-ELISA modificado) da solução de imunoglobulinas obtida, foi feita diluição seriada, em 16 alíquotas. Para isso foi utilizada uma alíquota da solução inicial ($10\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) de Infliximab e acrescentados $900\ \mu\text{L}$ de tampão fosfato salina (PBS), pH 7,2, 100mM, para obtenção da primeira solução da diluição seriada, e a 16^a alíquota, com concentração de $0,001\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de proteína.

3.3.2 Caracterização de solução de imunoglobulinas

3.3.2.1 Dot-ELISA (Titulação de IgG)

Para a comprovação da presença de IgG na solução preparada foi utilizado o método Dot-ELISA (TOWBIN; GORDON, 1984) com algumas modificações (DOS SANTOS, 1993) como descrito a seguir.

Sobre a membrana de nitrocelulose (BIO-RAD Laboratories, EUA) foram aplicados dois microlitros, de cada alíquota da diluição seriada da solução contendo os anticorpos monoclonais. Após secagem, em temperatura ambiente, por 15 minutos, as membranas foram bloqueadas por 5 horas a 4^o C com leite em pó desnatado a 5% (Molico®, Nestlé, Araçatuba, SP, Brasil), dissolvido em tampão Tris-Salina (TBS, pH 7,5). As membranas foram retiradas da solução bloqueadora e lavadas uma vez com o Tampão Fosfato Salina (PBS, pH 7,2) para remoção do excesso de solução bloqueadora. Posteriormente, as membranas foram colocadas em presença do conjugado por uma hora, em temperatura ambiente. Para a detecção de IgG foi usado o conjugado anti-IgG (H+L, PIERCE, EUA), diluído em TBS (pH 7,5) na proporção de 1:1000 (10mL de TBS: 10 μ L de conjugado). Após quatro lavagens com PBS, pH 7,2 as reações anticorpo-conjugado foram reveladas com cinco miligramas de 3,3 diaminobenzidina (DAB) (BIO-RAD Laboratories, EUA) diluídos em 30mL de TBS, pH 7,5, na presença de 15 μ L do substrato da peroxidase, o peróxido de hidrogênio P.A. 30% (Synth, Brasil). A reação de coloração por precipitação do DAB foi interrompida com água destilada e as membranas secadas entre folhas de papel de filtro.

3.3.3 Caracterização de SAM em Superfície de Ouro

3.3.3.1 Ressonância de Plásmon de Superfície (SPR)

Para melhor entendimento sobre a metodologia adotada no imunoensaio utilizando a técnica de SPR, utilizaremos uma representação esquemática das curvas obtidas na imobilização da imunoglobulina (Figura 18). Inicialmente foi injetada solução tampão fosfato salina (PBS), pH 7,2 a 100 mM para a realização de linha de base do disco de ouro previamente silanizado, durante 100 segundos

(curva 1). Em seguida foi injetada a solução de imunoglobulina, com grupo carboxílico ativado, na célula óptica e foi acompanhada a interação dos anticorpos com a SAM durante duas horas (curva 2). Conforme ocorreu adsorção de imunoglobulinas à monocamada, houve alteração do ângulo de reflexão da luz aplicada para que ocorresse a ressonância de plásmons de superfície. Esse fenômeno pode ser acompanhado pelo equipamento até que toda a superfície de ouro esteja coberta pelas biomoléculas (curva 3). Após este tempo foi feita uma lavagem da superfície modificada com solução tampão, para a remoção de imunoglobulinas fracamente ligadas a SAM. Em seguida foi realizada nova linha de base com solução tampão durante 200 segundos, aproximadamente, para obtenção de mais uma curva (curva 4), que representa a quantidade de imunoglobulinas fortemente imobilizadas (ligação química) à superfície de ouro silanizada. A diferença entre os ângulos (Δ) obtidos nas curvas quatro e um fornece o total de anticorpos ligados nessa superfície.

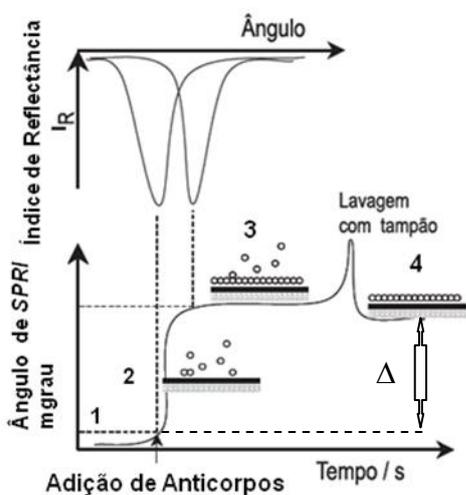


Figura 18 – Representação esquemática adaptada sobre imunossensaio utilizando técnica de SPR. Fonte: CARVALHO; RATH; KUBOTA, 2003; MENDES, 2008.

3.3.3.2 Espectrometria por Microscopia de Força Atômica (AFM)

Os discos de ouro foram fragmentados para obtenção de pequenas amostras de cerca de 01 (um) cm x 01 (um) cm para realização da caracterização das amostras em diferentes condições para análise topográfica por AFM.

Para a análise das SAM formadas com APTS em água deionizada ou tolueno sobre as superfícies de ouro, foram utilizadas pontas mais flexíveis, NSC14-AIBS da Micromash, adequadas para análise de material biológico. As medidas foram realizadas em modo de Não-Contato, no qual a sonda (*tip*) não interage diretamente com a amostra, preservando a SAM formada para repetição de imagens.

Foram realizadas pelo menos cinco imagens de cada amostra para obtenção de média das medidas de rugosidade, calculada estatisticamente pelo programa de análise de imagens *Gwyddion*, versão 2.9.

3.3.4 Preparação da SAM e do Processo de Imobilização de Imunoglobulinas

3.3.4.1 Limpeza de superfície dos discos de ouro

As superfícies foram sistematicamente tratadas e limpas antes da formação de SAM. Esta limpeza representa um tratamento químico dos discos de ouro que foram imersos em “solução piranha” (1:3 peróxido de hidrogênio, H₂O₂; ácido sulfúrico concentrado, H₂SO₄) durante 10 minutos, seguida por intensa lavagem com água deionizada (CARVALHAL; FREIRE; KUBOTA, 2005; MENDES, 2006). Os discos foram secos com jato de ar de nitrogênio (N₂) e imediatamente submetidos ao processo de silanização.

3.3.4.2 Formação de monocamada automontada (SAM)

Para a imobilização de anticorpos é necessária a utilização de moléculas químicas funcionais que promovam interações químicas mais estáveis entre as superfícies e essas proteínas. O que proporciona construção de membranas com maior reprodutibilidade e estabilidade funcional (MENDES, 2008). Em superfícies de ouro os agentes mais citados na literatura são os tióis que apresentam átomos de enxofre (S) ligados a carbonos (C), cisteínas, que permitem melhor interação entre anticorpos e ouro (Au). Neste estudo foram testados os tióis cloreto de 2-aminoetanotiol (cisteamina) e ácido mercaptoundecanóico (MUA) para formação de

SAM. Importante ressaltar, que a solução de cisteamina (2-aminoethanethiol) foi preparada no momento do uso e protegida da luz, para evitar a oxidação e conseqüente redução de sítios ativos do aminotiol (JOHNSON; WILKINS, 1984).

A cisteamina (Figura 19) foi usada na concentração de 10mM (MENDES, 2008) e 25 mM (DUTRA; KUBOTA, 2007), diluída em etanol absoluto, e foi aplicada sobre a superfície de ouro durante duas horas. Após esse período, a superfície foi lavada com solução tampão fosfato salina 100 mM (PBS, pH 7,2) e, em seguida, foi aplicada a solução de imunoglobulina na concentração de 1 µg/mL diretamente ou previamente tratadas com EDC 2mM e NHS 5mM, em solução tampão fosfato salina 100 mM (PBS, pH 7,2), durante duas horas, em temperatura ambiente. Outra tentativa foi a utilização de glutaraldeído 2,5%, imobilizado durante uma hora sobre a monocamada de cisteamina a 25mM, antes da inserção de imunoglobulinas, a 5µg.mL⁻¹, no sistema.



Figura 19 – Esquema estrutural da molécula de cisteamina. Fonte: DUTRA et al., 2007.

O ácido mercaptoundecanóico (MUA, Figura 20) foi utilizado a 5mM, em etanol, sendo imobilizado durante duas horas, em superfície de ouro. Após lavagem com solução tampão fosfato salina (PBS) 100 mM, pH 4,3, ajustado com HCl, foram inseridas sobre essa SAM formada, as soluções de EDC 2mM e NHS 5mM, em pH 4,3, durante 30 minutos, com o intuito de ativar os grupos carboxílicos livres, característicos dessa monocamada. Depois, a superfície foi lavada com solução tampão fosfato salina 100 mM (PBS, pH 7,2) e, então, aplicada a solução de imunoglobulinas a 5µg/mL diluída em PBS, pH7,2, 100mM, durante duas horas, em temperatura ambiente (CHUNG; BERNHARDT; PYUN , 2006).

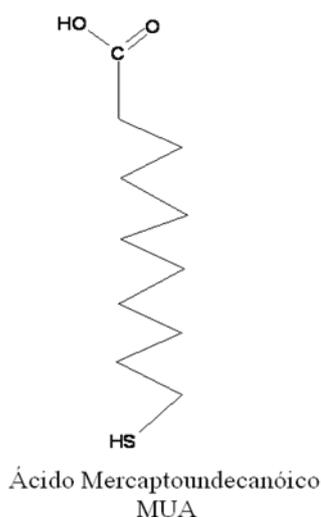


Figura 20 - Fórmula Estrutural do Ácido Mercaptoundecanóico (MUA). FONTE: CHUNG; BERNHARDT; PYUN , 2006.

Outro experimento utilizando o MUA a 5%, em etanol, durante duas horas, sobre disco de ouro também foi realizado. Porém, a porção carboxiterminal das imunoglobulinas foi tratada previamente com EDC 2mM e NHS 5 mM, em PBS 100 mM pH 5,0, durante duas horas, antes da imobilização em superfície modificada com MUA. Em seguida, a superfície foi lavada com PBS 100 mM, pH 5,0 e incubada por duas horas para possibilitar a reação de ligação dos anticorpos com grupos carboxílicos ativados, sobre a superfície de ouro modificada com MUA.

Ainda, outra metodologia foi testada usando dispositivo com superfície de ouro modificada com carboximetildextrana e estreptavidina (Biacore SA ®, Suécia), baseado nos estudos de Dutra e Kubota, 2007. Seguindo as especificações do fabricante, a superfície deste dispositivo foi ativada com três adições de solução de NaCl 1 M em NaOH 50mM antes da imobilização de imunoglobulinas. Para o preparo dessa SAM foram utilizados anticorpos anti-TNF humano biotinizados (kit BD OptEIA™ Set Human, BD Biosciences, EUA), em concentração 1:1000, que, teoricamente, apresentariam alta afinidade pela estreptavidina da superfície modificada.

Mediante o insucesso dos experimentos anteriores foi testado o 3-aminopropiltrietóxisilano (APTS, 99% de pureza, Sigma-Aldrich, EUA, Figura 21), em diferentes concentrações (1%, 2,5%, 5% e 10%), obtendo-se melhores resultados (VORNHOLT; HARTMANN; KEUSGEN, 2007).

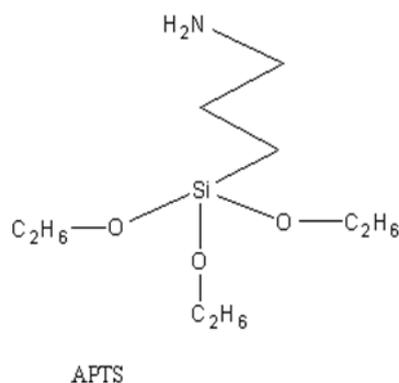


Figura 21 – Representação esquemática da molécula de APTS. Fonte: BEARI et al., 2001.

Quanto à silanização existem dois solventes comumente citados na literatura consultada: água deionizada e tolueno. Foram realizados experimentos utilizando as seguintes condições: discos de ouro foram imersos em soluções de APTS (1%, 2,5%, 5% e 10%) em água deionizada ($> 18\text{M}\Omega\text{ cm}$, Milli-Q, Millipore®) ou tolueno (Synth, Brasil) a 80°C , durante seis horas. Após esse período, as amostras, que foram preparadas em água deionizada, foram lavadas, também, em água deionizada, e etanol, a 80°C . E as amostras preparadas em tolueno, foram lavadas em tolueno e etanol, também a 80°C , com imersão dos discos durante cinco minutos, em cada reagente. Em seguida, os discos de ouro foram colocados em estufa a 110°C , *overnight*, para secagem e estabilização das ligações químicas. Os discos de ouro foram colocados no equipamento de SPR e então foi injetada solução de imunoglobulinas (anti-TNF) a $1\mu\text{g/mL}$ com grupo carboxílico tratado previamente com EDC (2mM) e NHS (5mM) para reação com a SAM durante 2 horas (Figura 22).

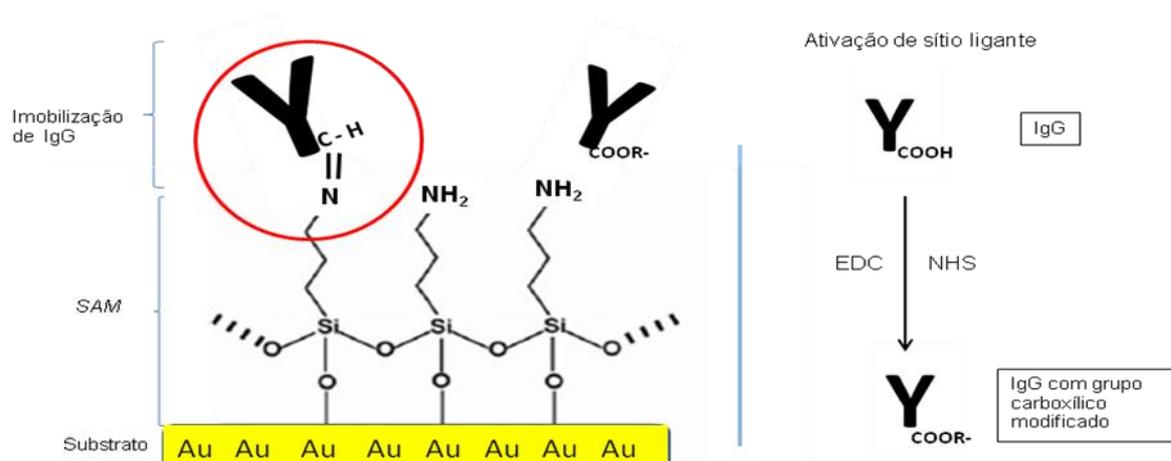


Figura 22 - Representação esquemática de formação de SAM através de silanização (APTS) e imobilização de imunoglobulinas com grupo carboxílico ativado. Fonte: BEARI et al., 2001; MENDES, 2008.

3.3.4.3 Preparo de Imunoglobulinas

A solução do meio onde ocorrerão as ligações químicas ou reações de adsorção física de biomoléculas deve ser cuidadosamente preparada para garantir a integridade e estabilidade dessas moléculas. Na literatura pesquisada, a solução Tampão Fosfato Salina (PBS), com pH entre 7,0 a 7,5 e em concentração de 50 a 100 mM foi a mais usada em imunossensores, apresentando melhores resultados, inclusive em condutividade elétrica (DUTRA et al., 2007; HARNOIS et al., 2006; SEZGGINTÜRK; GÖKTUG; DINÇKAYA, 2005). Neste trabalho foi adotada a solução tampão fosfato salina (PBS) a 100mM, em pH 7,2, baseado nas tradicionais técnicas de imunoenensaio de ELISA (DOS SANTOS, 1988; MIZOBE-ONO, 2003).

Foram utilizados EDC e NHS para ativar o grupo carboxílico (COO^-) das imunoglobulinas para formação de ligação estável com os grupos amino livres (NH_2) do APTS imobilizado sobre a superfície de ouro (AIZAWA et al., 2006; DUTRA et al., 2007; DUTRA; KUBOTA, 2007; GOODING et al., 2004; PEI et al., 2000). A reação esperada nessa ativação pode ser verificada no esquema da Figura 23.

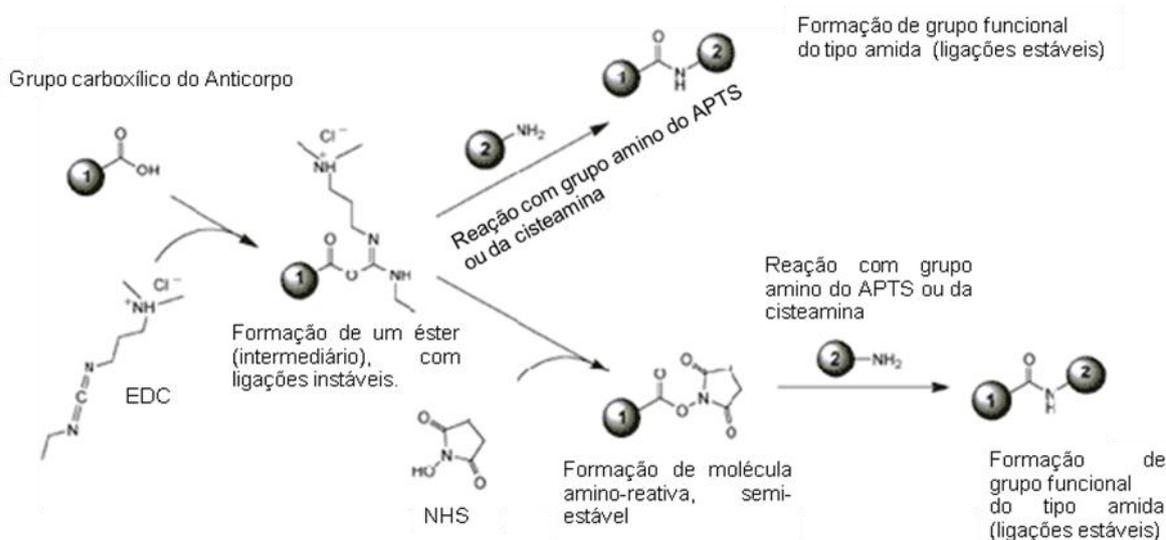


Figura 23 – Representação esquemática adaptada sobre a ativação do grupo carboxílico da Imunoglobulina. Fonte: http://www.piercenet.com/media/Sulfo-NHS_Reaction_Figure02.gif

A metodologia aplicada consiste na incubação de solução contendo EDC (2mM), NHS (5mM) e solução de imunoglobulinas a 1µg/mL, durante 2 horas, a 4°C, em repouso (MENDES, 2008). Essa ativação foi realizada antes da imobilização dos anticorpos sobre a SAM formada na superfície do disco de ouro.

3.3.5 Estudos Analíticos do Imunossensor

3.3.5.1 Eficiência de ação do bloqueio de imobilização inespecífica

Para a análise sobre a eficiência do bloqueio de sítios livres da SAM que possam gerar resposta inespecífica pelo imunossensor, foram realizados diversos testes com diferentes soluções e concentrações. As soluções bloqueadoras testadas foram: glicina a 10 mM; caseína, 1% e 5%; e BSA, 0,1% e 1%, selecionadas com base na literatura consultada (DUTRA et al., 2007; GUERRIERI, et al., 2006; GONG et al., 2007; GOODING et al., 2004; HORNE, 2002; MESKINI et al., 2007; TLILI et al., 2005).

Nestes ensaios sobre ação dos bloqueios, após a colocação dos discos de ouro silanizados no equipamento de SPR, foi injetada em um canal a solução de PBS 100 mM pH 7,2 e em outro canal solução de imunoglobulina ativada, com reação durante duas horas. Após esse tempo foi realizada a lavagem em fluxo contínuo durante 60 segundos e depois foi realizada a linha de base (100 segundos). Depois, os dois canais foram bloqueados com as diferentes soluções testadas em diferentes ensaios, durante 30 minutos. Após o tempo previsto foi feita a lavagem com PBS 100 mM pH 7,2 durante 120 segundos e foi realizada nova linha de base. Em seguida foram injetadas diversas alíquotas de solução de antígeno TNF- α humano sintético, com intervalo de 3 minutos entre cada inserção. Vale ressaltar que entre cada adição de antígeno foi realizada lavagem de 10 segundos em fluxo contínuo, usando solução de PBS 100 mM pH 7,2, sem a realização de linha de base entre elas.

3.3.5.2 Especificidade

Para análise sobre a especificidade do imunossensor foi injetada solução de anti-TNF ativada nos dois canais do equipamento de SPR para reação com a SAM durante duas horas. Após esse período foi feita a lavagem com solução tampão salina 100 mM (PBS), em fluxo contínuo durante 60 segundos, em seguida realizou-se a linha de base (100 segundos), e então foram adicionadas, nos dois canais, a solução de BSA 1% que reagiu durante 30 minutos. Após esse período foi realizada nova lavagem durante 120 segundos com solução tampão salina 100 mM (PBS), fez-se nova linha de base durante 100 segundos com solução tampão salina 100 mM (PBS) e finalmente injetou-se em um canal o TNF- α humano sintético e em solução de antígeno de proteína de folha da soja macerada, a 5ng/mL, como controle. Vale ressaltar, também, que entre cada adição de antígeno foi realizada lavagem de 10 segundos em fluxo contínuo, usando solução de PBS 100 mM pH 7,2, sem a realização de linha de base entre elas.

O resumo sobre a estratégia de imobilização de imunoglobulinas adotada e alguns problemas esperados podem ser vistos na Figura 24.

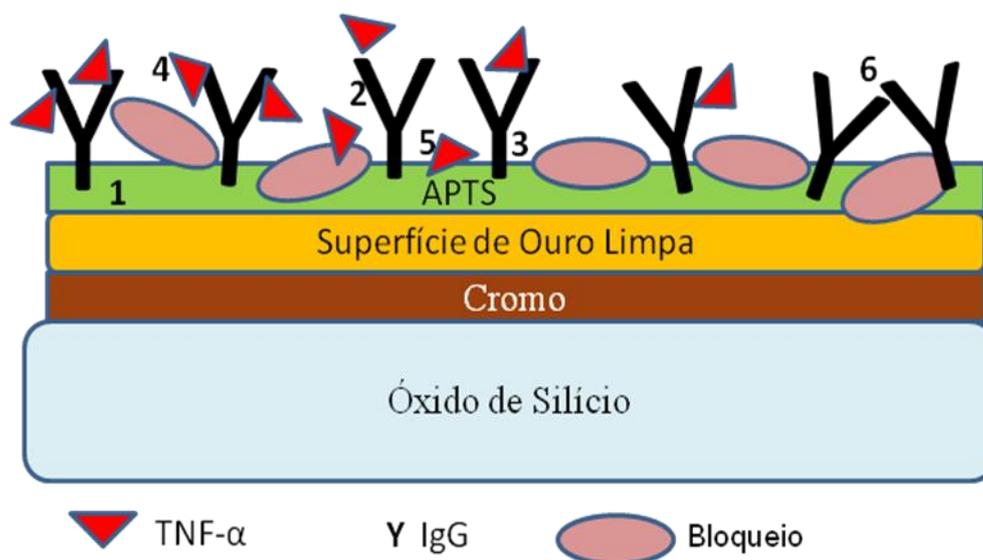


Figura 24 - Esquema sobre estratégia de formação da SAM com etapas e algumas respostas inesperadas. 1, Formação de monocamada com APTS; 2, Imobilização de imunoglobulinas; 3, Bloqueio de sítios livres; 4, Interação antígeno-anticorpo; 5, Interação inespecífica do antígeno com a SAM; 6, Impedimento estereoquímico devido à proximidade dos anticorpos que impediu a ligação com o antígeno.

3.3.5.3 Regeneração

Apesar de não haver interesse em construção de imunossensores, de aplicação clínica e comercial, reaproveitáveis, devido a possibilidade de falso-positivos, em decorrência de algum vestígio de ligação de reconhecimento ocorrida em ensaios anteriores, optou-se pela realização de estudos sobre regeneração de monocamadas imobilizadas com imunoglobulinas, com o intuito de testar a eficiência das técnicas propostas por alguns autores, como forma de aproveitamento dos discos de ouro silanizados e imobilizados.

A regeneração (dissociação entre antígeno e anticorpo) é baseada no fato das interações antígeno-anticorpo não serem covalentes, ou seja, de caráter reversível (MURPHY et al., 1988). Isso permite que variações bruscas de pH (CATIMEL, 1997; DUTRA et al., 2007) ou utilização de potencial elétrico negativo (GOODING et al., 2004) promovam a dissociação dessas interações, podendo

haver reaproveitamento dos biossensores criados de acordo com os objetivos propostos a cada um deles.

Após injetar diversas alíquotas de solução de TNF- α nos canais do equipamento de SPR, para interação antígeno-anticorpo, foi realizada nova lavagem com solução de solução de PBS 100 mM pH 7,2, durante 120 segundos para remoção de proteínas não ligadas, fez-se a linha de base, e foi injetada a solução de glicina, em concentração de 0,2 M, em pH 2,8 (ajustado com HCl), como técnica regeneradora baseada no trabalho de Catimel (1997). Foram empregados dois tempos de reação, 2 e 5 minutos.

Outra técnica adotada foi a utilização da solução detergente SDS (Dodecil Sulfato de Sódio), em concentrações de 1% e 0,5%. Também foram testados dois tempos de reação diferentes, 1 e 2 minutos (DUTRA; KUBOTA, 2007).

Após a aplicação dessas soluções foi realizada intensa lavagem com PBS, pH 7,2, 100mM, durante três minutos. Em seguida, foram injetadas alíquotas de TNF- α humano para verificação da eficácia das imunoglobulinas, após a dissociação.

3.3.5.4 Concentração de TNF- α humano associado ao anticorpo imobilizado sobre a SAM

A principal metodologia aplicada, atualmente, para quantificação do TNF- α humano é o ELISA. Sendo assim, foi realizada diluição seriada de solução-estoque ($132.000 \text{ pg.mL}^{-1}$) para análise do imunossensor conforme as especificações do fabricante de *kits* comerciais de ELISA para detecção de TNF- α (BD OptEIA™ Set Human, BD Biosciences, EUA). Foi utilizada a concentração de 25 pg.mL^{-1} nos ensaios, diluídas em solução tampão salina a 100 mM, PBS pH 7,2.

Para calcular a curva-padrão da concentração de TNF- α ligado à superfície sensora, para realizar análise sobre linearidade da resposta do imunossensor, através do coeficiente de correlação linear (R), e sobre a sensibilidade desse

sistema através da análise do coeficiente angular da equação da reta, foi usado o software Origin versão 6.5.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Dot-ELISA

Das dezesseis amostras obtidas da diluição seriada da solução de imunoglobulinas (Infliximab), houve detecção, pelo método de Dot-ELISA, até a décima quarta diluição, equivalente à concentração de $0,12 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Sendo com isso, confirmada a presença da região Fc, da molécula de IgG humana, no Infliximab, anticorpo monoclonal quimérico utilizado em todos os experimentos para o desenvolvimento do imunossensor.

4.2 SPR

4.2.1 Formação da SAM

A primeira metodologia testada para construção de monocamada auto-organizada (SAM) sobre a superfície de ouro do disco foi a cisteamina (tiol) a 10mM dissolvida em etanol, devido sua ampla utilização por outros pesquisadores (DUTRA; KUBOTA, 2007; CHA, 2004; MENDES, 2008). A Figura 25 expressa os resultados obtidos para este sistema. Foi realizada a linha de base da superfície de ouro, previamente modificada com cisteamina, em PBS, pH 7,2, a 100 mM, e em seguida foi injetada a solução contendo $1\mu\text{g.mL}^{-1}$ de imunoglobulina, previamente tratada com EDC e NHS, e foi detectado aumento no ângulo de ressonância. No entanto, após a lavagem da superfície, houve uma provável lixiviação das moléculas de superfície, representada pela diferença negativa da variação (Δ) do ângulo de ressonância, em miligradu (mgradu). Sendo assim, não houve imobilização do anticorpo na superfície do sensor. Resultados similares foram obtidos aumentando a concentração de cisteamina para 25mM.

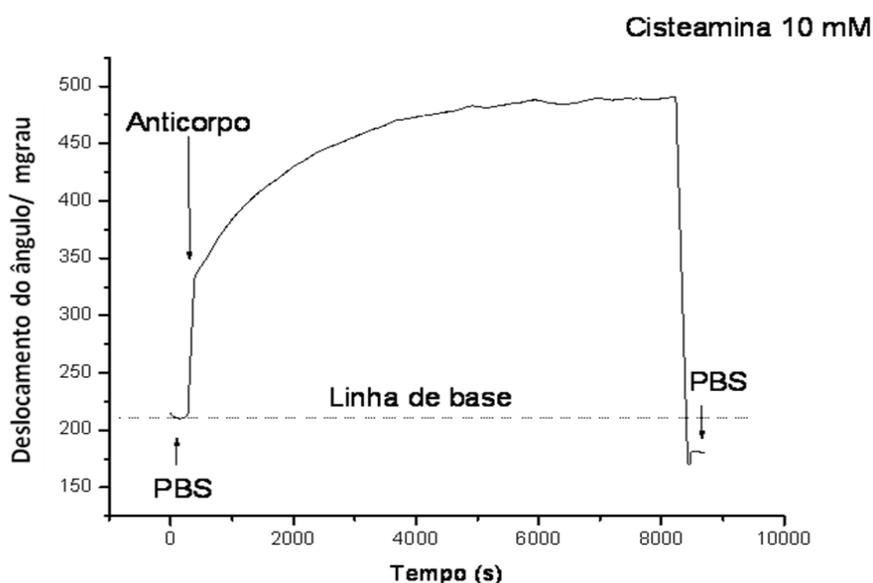


Figura 25 - Sensorgrama obtido na tentativa de imobilização de anticorpo anti-TNF- α na superfície de ouro modificada com cisteamina 10mM.

Outra metodologia testada foi a modificação dos grupamentos amino da SAM, adicionando à superfície, já recoberta com cisteamina 25 mM, uma solução de glutaraldeído a 2,5%. A estratégia consistia em imobilizar os anticorpos pela porção Fab, aminoterminal, pois, o aldeído apresenta maior afinidade por esses grupos funcionais ou pelo grupo amida, formado pela ativação da porção Fc, carboxiterminal, por EDC e NHS (DUTRA; KUBOTA, 2007; MESKINI et al., 2007; TLILI et al., 2005). A Figura 26 expressa os resultados obtidos, na qual podemos observar uma alteração no ângulo de ressonância ($\Delta = 69,0$ mgra), após a lavagem com tampão salina. Mediante esse resultado, foi dada continuidade ao experimento, realizando bloqueio de ligações inespecíficas, com glicina 10mM, durante 30 minutos. Essa substância bloqueadora foi utilizada baseada no trabalho de Dutra e Kubota (2007), que investigaram a ação de várias soluções bloqueadoras, sendo a glicina de melhor resposta. Porém, neste experimento, esse bloqueio gerou a redução do ângulo de ressonância, que pode ser interpretado

como uma dissociação de anticorpos da SAM, em decorrência da provável formação de uma monocamada instável.

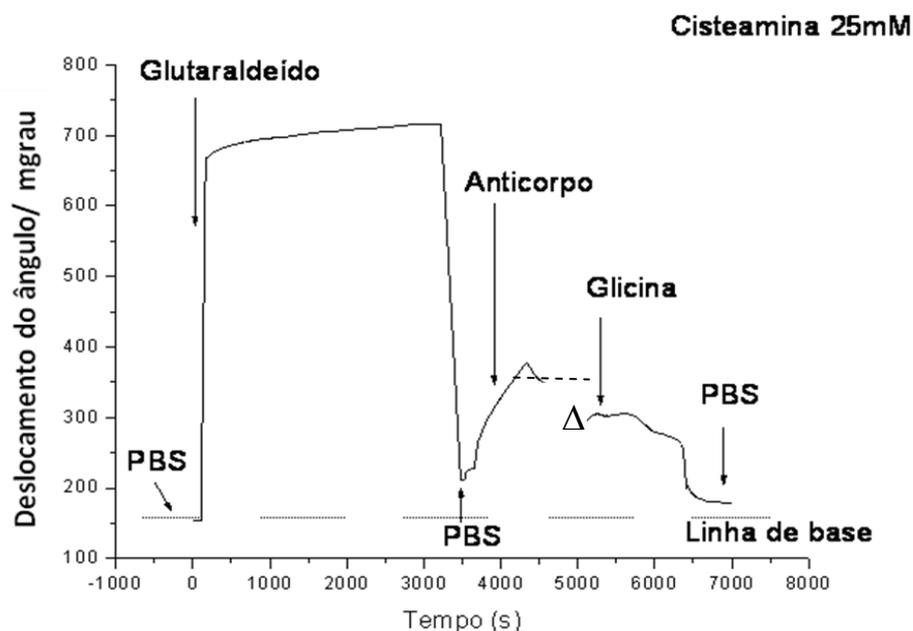


Figura 26 - Sensorgrama obtido pela imobilização de anticorpo anti-TNF- α na superfície de ouro modificada com cisteamina 25mM e glutaraldeído 2,5%.

Devido ao insucesso das técnicas aplicadas anteriormente foi testado o ácido mercaptoundecanóico (MUA) (CHUNG; BERNHARDT; PYUN, 2006). A Figura 27 expressa os resultados desse experimento, não sendo detectada a imobilização de anticorpos, mediante a ausência de variação no ângulo de ressonância entre as linhas de base, feitas antes e depois da interação dos anticorpos com a SAM. Outra metodologia utilizando o MUA a 5mM também foi testada, com ativação prévia das imunoglobulinas com EDC e NHS. Os resultados obtidos foram similares aos descritos na Figura 27.

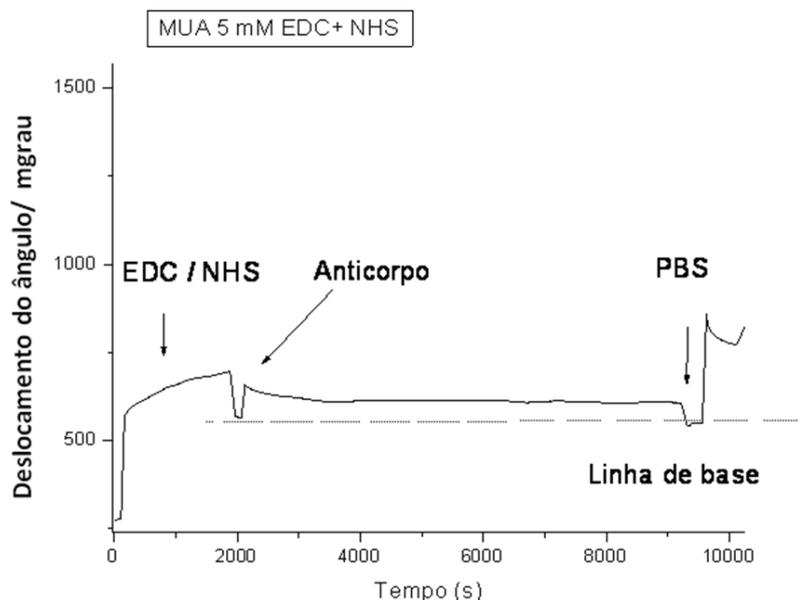


Figura 27 - Sensorgrama obtido pela imobilização de EDC e NHS sobre a monocamada de MUA 5mM, com posterior injeção de solução de anticorpo anti-TNF- α humano.

Mais uma metodologia de imobilização do anticorpo anti-TNF- α humano sobre superfície de ouro foi empregada, em que foi utilizado um dispositivo comercial, com superfície de ouro modificada com carboximetildextrana e estreptavidina (Biacore SA ®, Suécia) (DUTRA et al., 2007; MENDES, 2008). Conforme pode ser observado na Figura 28, ao ser adicionada a solução de anticorpos biotinizados no canal do equipamento, houve aumento considerável do ângulo de ressonância. Em seguida foi feita a lavagem utilizando a solução tampão e a linha de base, e então foi detectada a redução no ângulo de ressonância, abaixo do limite da linha de base inicial. Esse decréscimo do ângulo representa uma dissociação de moléculas da superfície.

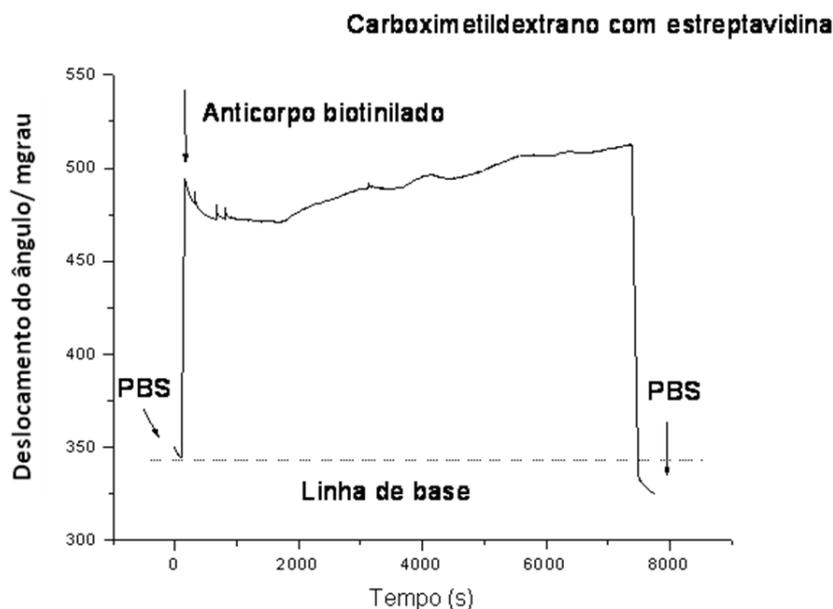


Figura 28 - Sensorgrama obtido na tentativa de imobilização de anticorpo anti-TNF- α humano biotinizado em disco de ouro comercial, preparado com carboximetildextrano e estreptavidina.

E finalmente foi testada a técnica de silanização de superfície de ouro utilizando aminopropiltriétoxissilano (HERLEM et al., 2008; MEYER; HARTMANN; KEUSGEN, 2006; VESTERGAARD et al., 2008). Conforme está representado na Figura 29, após a linha de base inicial pode ser observada uma curva ascendente, que representa a incorporação de anticorpos na superfície silanizada do sensor, que gerou uma mudança no ângulo de incidência para que haja a excitação ressonante do plasma de superfície. Com isso, ocorreu o fenômeno de ressonância de plasma de superfície através do acompanhamento da variação do ângulo de ressonância pelo tempo, possibilitando a obtenção de informações sobre a quantidade de biomoléculas imobilizadas, por exemplo (CARVALHO; RATH; KUBOTA, 2003; MENDES, 2006).

Sendo assim, após a lavagem, com PBS e formação de nova linha de base, pode ser observado que houve diferença no ângulo de ressonância ($\Delta = 142,0 \pm 1,0$), representando que houve a imobilização das imunoglobulinas na superfície silanizada.

Detectada a imobilização de anticorpos, foi dada continuidade ao experimento realizando o bloqueio de grupos funcionais livres da monocamada auto-organizada, injetando solução de BSA 1%, durante 600 segundos (10 minutos), representada no sensorgrama por um aumento do ângulo de ressonância. Em seguida foi realizada a lavagem com a solução tampão durante 120 segundos, sendo construída nova linha de base durante 100 segundos. E após esse procedimento, foram injetadas as alíquotas de TNF- α humano para analisar a resposta do imunossensor ao antígeno. Neste experimento, cada adição de TNF- α humano reagiu, durante 600 segundos (10 minutos), com a superfície sensora e foi realizada uma lavagem de 30 segundos entre cada adição, para remoção de antígeno fracamente ligado à superfície. Um aumento no ângulo de ressonância foi verificado a cada adição. O deslocamento total do ângulo de ressonância (Δ), entre as linhas de base inicial e final do TNF- α humano, foi de $220,0 \pm 2,0$ mgra.

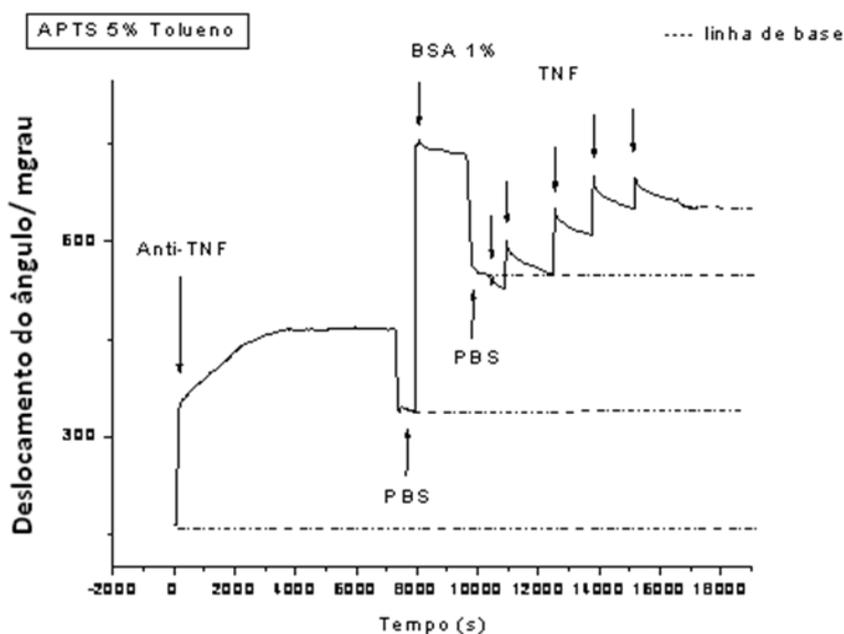


Figura 29 - Sensorgrama obtido pela imobilização de anticorpo anti-TNF- α na superfície de ouro modificada com APTS 5%, seguido do bloqueio utilizando BSA 1% e da injeção das alíquotas de TNF- α .

4.2.2 Imobilização de biomoléculas sobre a superfície de ouro silanizada, em água e em tolueno.

Na Tabela 01 podemos comparar as diferenças referentes ao deslocamento total do ângulo de ressonância (Δ) equivalente à imobilização de imunoglobulinas sobre a superfície sensora silanizada, nas oito diferentes condições testadas, preparadas sob mesmas condições de imobilização de biomoléculas e mesma metodologia de bloqueio, com variação da concentração de APTS (1%, 2,5%, 5% e 10%) e do tipo de solvente utilizado (água ou tolueno). Ao analisarmos a quantidade de imunoglobulinas imobilizadas, o sinal de SPR pode ser convertido a um valor de massa adsorvida segundo a relação de $120 \text{ mgra} = 1 \text{ ng} \cdot \text{mm}^2$ (STENBERG et al., 1991). Para o cálculo da concentração de TNF- α humano reconhecido pela camada de anticorpos imobilizados por área de superfície de ouro, utilizamos a relação de 1 RU (unidade de ressonância) equivalente a $1 \text{ pg} \cdot \text{mm}^2$ (JÖNSSON et al., 1991). Porém, como utilizamos um equipamento que adota a unidade de mgra, obtivemos a partir do manual do fabricante (SPR ESPRIT da AUTOLAB, Echo Chemie, Holanda), a relação de que 1 RU equivale a 8,3 mgra, que conseqüentemente equivale a massa adsorvida de $1 \text{ pg} \cdot \text{mm}^2$. Sendo assim, respeitando as diferenças de grandeza existente entre a concentração de imunoglobulinas ($\text{ng} \cdot \text{mm}^2$) e de TNF- α humano ($\text{pg} \cdot \text{mm}^2$) utilizadas, é possível estimar a concentração de biomoléculas imobilizadas sobre o biossensor.

Tabela 01 – Diferença de deslocamento do ângulo de ressonância (Δ) relacionada à concentração de imunoglobulinas (IgG) imobilizadas e de antígeno (TNF- α humano) reconhecido na superfície do sensor em diferentes tipos de SAM testadas.

Amostra	$\Delta\theta$ (mgra)	[IgG] $\text{ng} \cdot \text{mm}^2$	$\Delta\theta$ TNF (mgra)	[TNF] $\text{pg} \cdot \text{mm}^2$
Água - APTS 1%	$91,0 \pm 37,1$	$0,8 \pm 0,3$	$207,0 \pm 97,1$	$25,0 \pm 11,7$
Água - APTS 2,5%	$33,5 \pm 13,6$	$0,3 \pm 0,1$	$316,5 \pm 82,2$	$38,1 \pm 9,9$
Água - APTS 5%	$40,5 \pm 16,3$	$0,3 \pm 0,1$	$196,0 \pm 86,4$	$23,6 \pm 10,4$
Água - APTS 10%	$52,0 \pm 29,8$	$0,4 \pm 0,2$	$130,2 \pm 88,9$	$15,7 \pm 10,7$
Tolueno-APTS 1%	$182,3 \pm 55,1$	$1,5 \pm 0,5$	$-29,3 \pm -59,1$	0,0
Tolueno-APTS 2,5%	$137,7 \pm 3,8$	$1,1 \pm 0,0$	$198,3 \pm 28,4$	$24,0 \pm 3,4$
Tolueno-APTS 5%	$174,0 \pm 17,9$	$1,4 \pm 0,1$	$103,4 \pm 63,2$	$12,4 \pm 7,6$
Tolueno-APTS 10%	$262,5 \pm 46,0$	$2,2 \pm 0,4$	$212,6 \pm 112,4$	$25,6 \pm 13,5$

Ao compararmos os valores obtidos sobre a variação do deslocamento total do ângulo de ressonância (Δ), equivalente à imobilização de anticorpos na superfície sensora (Tabela 01), verificamos que as amostras preparadas em tolueno apresentaram maiores deslocamentos de ângulo de ressonância em relação às amostras preparadas em água. Além disso, esses experimentos apresentaram valores de desvio-padrão proporcionalmente menores em amostras preparadas em tolueno do que as preparadas em água (Tabela 01). Vale ressaltar que esse deslocamento do ângulo de ressonância representa a quantidade de anticorpos imobilizados sobre a superfície sensora silanizada (CARVALHO; RATH; KUBOTA, 2003; MENDES, 2008).

O fato das amostras preparadas em água terem apresentado menor quantidade de anticorpos imobilizados na superfície do biossensor, pode ser explicada pela hidrólise que a água pode realizar na molécula de APTS, composta por grupos aminoterminais livres e pela presença de três grupos etóxi que promovem quimiossorção ao substrato (DEMIREL et al., 2007). Esses grupos aminoterminais tendem a formar pontes de hidrogênio com outros grupos funcionais (OGASAWARA et al., 1999). Com essa provável hidrólise provocada pela água, pode haver um aumento de ligações cruzadas entre as moléculas hidrolisadas, tanto entre os silanóis, quanto pelos grupos amino, formando camadas de condensação do APTS sobre a superfície, reduzindo a quantidade de grupos funcionais livres aptos para reagirem com a imunoglobulina. Ou seja, uma superfície provavelmente mais homogênea, gerada por essas condensações, pode não ser interessante para imobilização de imunoglobulinas (BEARI et al., 2001, SIMON et al., 2002).

Os sistemas criados em experimentos aquosos não apresentaram estabilidade satisfatória, haja vista que 48 horas após o preparo das monocamadas auto-organizadas, não foi possível reproduzir os ensaios de imobilização de anticorpos nesses sistemas. Enquanto que as SAM produzidas com tolueno puderam ser utilizadas, com resultados satisfatórios de imobilização de anticorpos, pelo menos uma semana após a realização da silanização (dados não mostrados).

Dentre os ensaios realizados em tolueno, observamos que a SAM de APTS 2,5% apesar de ter apresentado menor quantidade de anticorpo imobilizado, dentre os outros em concentrações diferentes (1%, 5% e 10%), foi notado um menor desvio-padrão, que sugere uma melhor reprodutibilidade de resultados, comparado aos outros ensaios citados (Tabela 01).

Em relação à resposta do biossensor ao antígeno específico, TNF- α , foi observado que os sensores desenvolvidos com APTS 1% em tolueno, apresentaram deslocamento negativo de ângulo de ressonância (Tabela 01), sugerindo que além de não ter ocorrido reação entre os anticorpos imobilizados na superfície e o TNF- α , ainda possa ter ocorrido uma dissociação de componentes previamente imobilizados nessas superfícies (anticorpos ou BSA). Sistemas formados com APTS 2,5%, tanto em água, quanto em tolueno, apresentaram as menores variações de ângulo de ressonância (Tabela 01), dentro de seus grupos, relacionadas à quantidade de anticorpos imobilizados, porém com maiores deslocamentos de ângulo de ressonância relacionados à interação do antígeno com a superfície sensora, composta por imunoglobulinas específicas, imobilizadas, e sítios livres bloqueados, para evitar a interação inespecífica do antígeno. Os experimentos realizados com APTS 10% em tolueno apresentaram maior variação de deslocamento de ângulo durante a imobilização de anticorpos e também na quantidade de antígeno reconhecido por esses anticorpos. Porém, esses experimentos apresentaram alto valor relativo de desvio-padrão ($212,6 \pm 112,4$ mgra), comparado com APTS 2,5% em tolueno ($198,3 \pm 28,4$ mgra).

Os resultados descritos anteriormente corroboram com a hipótese de que uma maior quantidade de anticorpos na superfície não é sinônimo de uma melhor resposta ao antígeno. Essa interação antígeno-anticorpo é influenciada pela forma como a camada de imunoglobulinas foi imobilizada, explicado anteriormente, e também pela característica da cobertura da superfície do sensor: homogênea ou heterogênea (SIMON et al., 2002).

Através da análise topográfica realizada pela técnica por *AFM*, apresentada e discutida na sessão 4.3, foi verificado que as monocamadas auto-organizadas

preparadas em água apresentaram maior homogeneidade que as preparadas em tolueno (Tabela 02). Ao analisarmos as respostas dos biossensores ao TNF- α pelo *SPR*, observamos que as camadas mais heterogêneas e menos uniformes, como o APTS 2,5% em tolueno, por exemplo, apresentaram melhores respostas de interação antígeno-anticorpo. Essa situação pode ser explicada por algum impedimento estereoquímico que possa ter ocorrido em decorrência das imunoglobulinas estarem muito ordenadas, com regiões Fab sobrepostas, impedindo a ligação do antígeno às mesmas (Figura 30 em destaque).

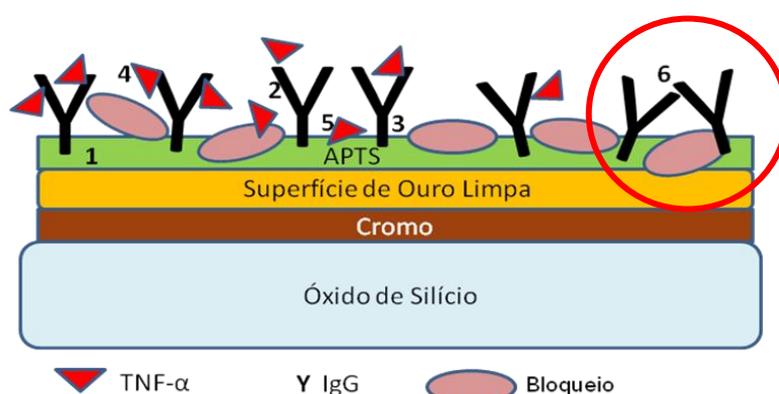


Figura 30 - Esquema sobre estratégia de formação da SAM com etapas e algumas respostas inesperadas: 1. Formação de monocamada com APTS; 2. Imobilização de imunoglobulinas; 3. Bloqueio de sítios livres; 4. Interação antígeno-anticorpo; 5. Interação inespecífica do antígeno com a SAM; 6. **Impedimento estereoquímico devido à provável proximidade dos anticorpos, com porções Fab sobrepostas, impedindo a interação antígeno-anticorpo.**

Sendo assim, mediante a análise das variáveis descritas acima, foi selecionada a metodologia que utiliza SAM formada com APTS 2,5% em tolueno, por apresentar resultado satisfatório de imobilização de anticorpos, resposta ao antígeno e estabilidade de sistema para os testes de sensibilidade e especificidade do biossensor proposto.

4.2.3 Bloqueios de ligações inespecíficas

A etapa de bloqueio de grupos funcionais livres, após a imobilização das imunoglobulinas sobre a SAM, é essencial para garantir e comprovar a especificidade de resposta de um biossensor (KIM et al., 2004). Esse procedimento impede que o antígeno seja adsorvido à superfície de forma inespecífica, o que pode acarretar em aumento do ângulo de ressonância, gerando respostas falso-positivas ou fornecendo dados quantitativos equivocados (MENDES, 2006). Para o teste de bloqueio foi realizada a imobilização do anticorpo anti-TNF- α humano em um canal, durante duas horas e, no outro canal, ao mesmo tempo, foi usado apenas PBS. As análises sobre o bloqueio e resposta do biossensor ao TNF- α humano foram feitas somente em amostras com SAM de APTS 2,5% preparada em tolueno, conforme justificado anteriormente.

A albumina bovina sérica (BSA) é a proteína mais utilizada como bloqueio de ligações inespecíficas encontrada na literatura consultada (GUERRIERI, et al., 2006; GONG et al., 2007; GOODING et al., 2004; MEYER; HARTMANN; KEUSGEN, 2006; TLILI et al., 2005). A Figura 31 mostra respostas obtidas nos experimentos utilizando bloqueio de BSA 1% durante 1800 segundos (A) e durante 600 segundos (B). Houve diferença positiva do ângulo de ressonância entre as linhas de base anterior e posterior ao reconhecimento do TNF- α humano (A, $176,0 \pm 26,2$ mgrau; B, $220,0 \pm 32,7$ mgrau), enquanto nos experimentos controle, realizados simultaneamente, não houve deslocamento do ângulo de ressonância, demonstrando especificidade na interação antígeno-anticorpo dos imunossensores, e conseqüentemente eficiência de ação de bloqueio de BSA a 1%.

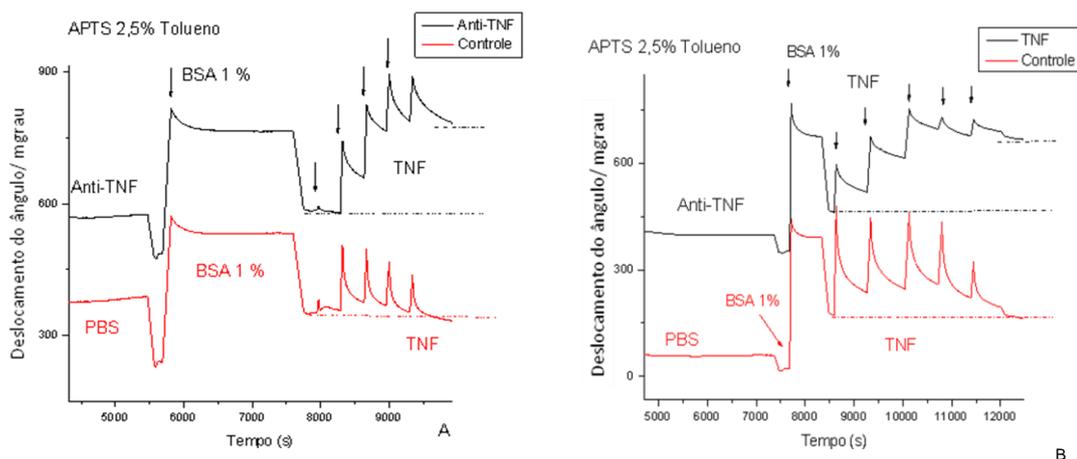


Figura 31- Sensorgramas obtidos pela imobilização de anticorpo anti-TNF- α em superfície de ouro modificada com APTS, para teste de bloqueio de ligação inespecífica, BSA 1%. A – tempo de bloqueio de 1800 s. B – tempo de bloqueio de 600 s.

Entretanto, apesar da eficiência de bloqueio de ligações inespecíficas pela BSA 1%, também foi verificada uma interferência dessa substância na resposta do imunossensor (Figura 31). Vários experimentos demonstraram que a partir da quarta adição da alíquota de antígeno, o biossensor perdeu a incorporação crescente e linear de TNF- α humano ao sistema de reconhecimento, como uma saturação das regiões de reconhecimento de antígeno nos anticorpos, porção Fab. Outro aspecto interessante que corrobora essa hipótese foi que ao utilizarmos um tempo menor de bloqueio, 600 segundos (B, $220,0 \pm 32,7$ mgraú), obtivemos uma quantidade de TNF- α humano reconhecido maior que a de 1800 segundos (A, $176,0 \pm 26,2$ mgraú).

Apesar do bloqueio de ligações inespecíficas ser essencial para a fidedignidade dos sinais detectados pelos biossensores, conseqüentemente pode ocorrer redução da atividade de reconhecimento ou até mesmo gerar dissociação entre os anticorpos e a SAM, reduzindo com isso a precisão do imunossensor, como ocorreu no presente trabalho. Mesmo reduzindo o tempo de ação do bloqueio para 600 segundos, os resultados foram similares. Outras tentativas foram realizadas utilizando BSA em concentração menor (0,1%) (DUTRA;KUBOTA, 2007), porém, não houve imobilização de BSA à superfície sensora.

Por ser uma proteína complexa, composta por diversos aminoácidos com grupos funcionais amino ou grupos carboxílicos, a imobilização da albumina bovina sérica (BSA) sobre superfícies pode ocorrer em diversas orientações, dificultando a identificação de quais partes da BSA foram ligadas ao substrato (AOYAGI et al., 2003). Além disso, trata-se de uma molécula relativamente grande apresentando 60 Å em seu eixo maior e 45 Å em seu eixo menor à microscopia eletrônica (MURPHY et al., 1988). Essas informações sobre as características da BSA podem justificar uma possível interferência dessa molécula no sistema sensor desenvolvido.

Devido a técnica de bloqueio utilizando BSA 1% ter interferido na interação antígeno-anticorpo a partir da quarta ou quinta adição de TNF- α humano, foram testados outros bloqueios como a caseína, nas concentrações de 1% (MENDES, 2008) e 5% (Figura 32) (DOS SANTOS, 1989; MIZOBE-ONO, 2003), na tentativa de obter melhor linearidade de resposta do imunossensor ao antígeno, com maior quantidade de adições de alíquotas. O tempo de ação de bloqueio utilizado foi de 1800 segundos. Houve aumento do ângulo de ressonância entre as linhas de base anterior e posterior ao reconhecimento do TNF- α humano tanto no canal correspondente ao anticorpo anti-TNF- α humano imobilizado ($253,0 \pm 76,1$ mgra), quanto no canal controle, sem anticorpo ($203,0 \pm 58,7$ mgra). Foram obtidas respostas similares entre as duas concentrações de caseína testadas. Esses resultados mostram que a caseína não foi eficiente no bloqueio de ligações inespecíficas no biossensor desenvolvido neste trabalho.

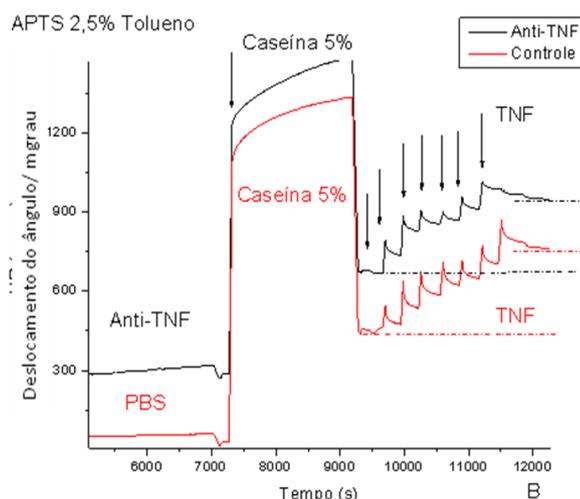


Figura 32 - Sensorgrama obtido pela imobilização de anticorpo anti-TNF- α em superfície de ouro modificada com APTS, para testes de bloqueio de ligação inespecífica, Caseína 5%.

Mesma resposta inespecífica foi obtida ao testarmos a glicina a 10 mM durante 600 e 1800 segundos (dados não mostrados), baseado nos experimentos de Dutra e Kubota (2007), nos quais esse aminoácido proporcionou melhor desempenho em relação aos outros.

4.2.4 Especificidade do imunossensor

Para testar a especificidade e sensibilidade do biossensor desenvolvido, foram realizados imunossaios com a monocamada auto-organizada formada por APTS 2,5% em tolueno. Foi realizada a injeção de anticorpos anti-TNF, previamente ativados com EDC e NHS, nos dois canais do equipamento, que reagiram com a SAM durante 7200 segundos (2 horas) em repouso, e em seguida foi realizada lavagem com PBS 100 mM pH 7,2 durante 60 segundos para posterior formação de linha de base (Figura 33).

Em seguida foi realizado o bloqueio, utilizando BSA 1% (Figura 33, A) e caseína 5% (Figura 33 B), em experimentos diferentes, durante 1800 segundos. Após a lavagem de 180 segundos com PBS, foi feita nova linha de base, e os ensaios com BSA 1% apresentaram deslocamento de ângulo de ressonância de

172,0 ± 9,0 mgraú, e os de caseína 5% apresentaram variação de 283,0 ± 58,0 mgraú.

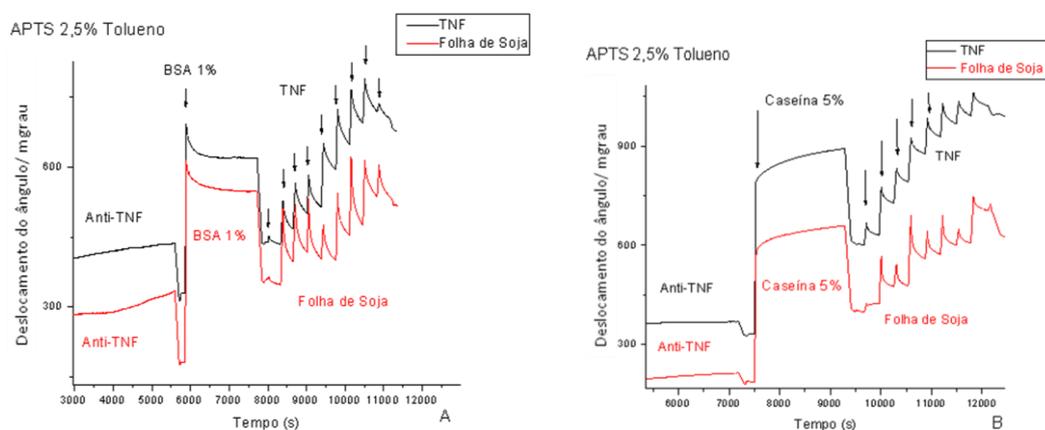


Figura 33 - Sensorgramas obtidos pela imobilização de anticorpo anti-TNF- α humano na superfície de ouro modificada com APTS 2,5% em tolueno, usando macerado de folhas de soja, como controle para estudo sobre sensibilidade e especificidade do imunossensor. A, ensaio utilizando BSA 1% como bloqueio. B, ensaio utilizando caseína 5% como bloqueio.

Ainda na Figura 33 podemos observar que após a realização do bloqueio foram adicionadas as alíquotas dos antígenos. Em um canal foi adicionada solução de TNF- α humano diluído em PBS 100 mM pH 7,2, na concentração de 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, e no outro canal, ensaio controle, foi adicionada a solução de extrato de folhas de soja, contendo 3,1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, diluído em tampão fosfato 100 mM pH 7,0. Nessa etapa foi observado deslocamento do ângulo de ressonância nos dois canais, indicando que o controle, extrato de folha de soja, foi reconhecido pelo biossensor desenvolvido para detecção de TNF- α humano, mesmo com a utilização do bloqueio com BSA 1%, que apresentou eficácia comprovada em experimentos anteriores.

A imobilização do antígeno controle na superfície sensora, será discutida baseada em dois aspectos: baixa eficiência dos bloqueios nestes ensaios ou pela presença de proteínas semelhantes ao TNF- α humano, no extrato de folhas de soja, usado como controle. Ao analisarmos a resposta do imunossensor bloqueado com BSA 1% ao TNF- α humano observamos que essa resposta manteve linearidade após a quarta adição do antígeno. Porém, nos testes sobre eficiência

de bloqueio (tópico 4.2.3), foi detectado que o BSA1% gerou interferência nessa resposta a partir da quarta adição de antígeno. Sendo assim, pode ter ocorrido ineficiência do bloqueio de BSA 1% nos experimentos sobre especificidade do imunossensor.

Segundo aspecto, a solução controle, o extrato de folha de soja, pode conter proteínas muito similares ao TNF- α humano que possam ter sido reconhecidos pelos anticorpos imobilizados na superfície sensora. Essas proteínas vegetais podem compartilhar epítomos com o TNF- α humano, e, por isso, estariam sendo reconhecidas pelos anticorpos monoclonais anti-TNF- α humano. Importante ressaltar, que na literatura científica não foram encontradas referências sobre TNF- α isolado em espécies vegetais, o que justifica a seleção deste composto como controle. No entanto, receptores, vias de sinalização envolvidas na resposta inflamatórias e na apoptose, análogos ao sistema imune inato de animais, já foram descritos para espécies vegetais. Por exemplo, receptores de reconhecimento de padrões (PRR) para padrões moleculares associados aos patógenos (PAMP), vias de sinalização intracelular, semelhante a da transcrição do NF κ B e as vias envolvidas na apoptose (AUSUBEL, 2005; IRITI;FAORO, 2007; PALMA; ZHANG; LI, 2005).

A construção da curva de calibração das respostas dos imunossensores aos antígenos, TNF- α humano e extrato de folha de soja, para três replicatas, permite a realização de algumas inferências interessantes sobre o problema de especificidade, detectado nos imunossensores construídos.

A curva analítica da interação antígeno-anticorpo, ocorrida na resposta do imunossensor bloqueado com caseína 5% ao TNF- α humano (Figura 34, A) apresentou boa linearidade, com coeficiente de correlação de 0,996 ($n = 7$), estatisticamente significativa, $p < 0.0001$. A resposta do imunossensor ao controle, extrato de folha de soja (Figura 34, B), apresentou baixa linearidade, com coeficiente de correlação de 0,977 ($n = 7$), sem relevância estatística de linearidade ($p = 1,46 \times 10^{-1}$). Apesar das diferenças analíticas detectadas, entre as respostas do imunossensor bloqueado com caseína 5%, houve deslocamento do ângulo de ressonância no experimento controle com resultados muito similares entre as

respostas ao TNF- α humano e ao extrato de folha de soja (Figura 34, B), como detectado em testes sobre ação de bloqueio (tópico 4.2.3).

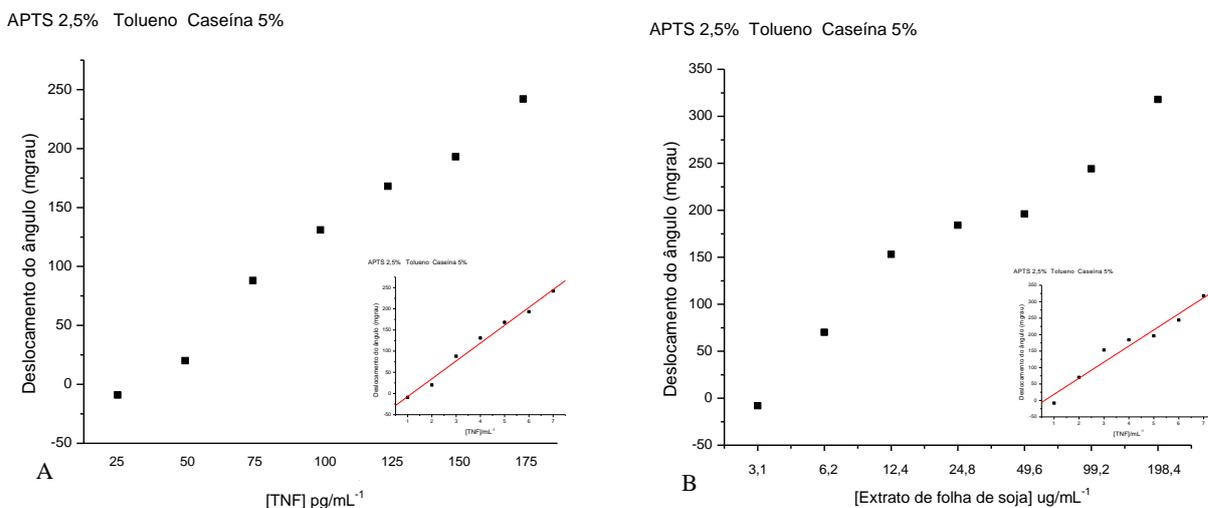


Figura 34 – Curva de calibração sobre a interação antígeno-anticorpo, ocorrida na resposta do imunossensor bloqueado com caseína 5% ao TNF- α humano (A) e ao extrato de folha de soja (B).

Ao analisarmos a curva de calibração dos imunossensores bloqueados com BSA 1%, observamos disparidades maiores entre as respostas dos antígenos testados. A interação do TNF- α humano (Figura 35, A) apresentou boa linearidade, com coeficiente de correlação de 0,988 ($n = 8$). A resposta do imunossensor ao controle, extrato de folha de soja (Figura 49, B), apresentou menor linearidade, com coeficiente de correlação de 0,916 ($n = 8$). Essa maior diferença no padrão de resposta do imunossensor aos antígenos, TNF e controle - apesar da interferência do bloqueio de BSA 1% não ter ocorrido nos ensaios sobre especificidade, como a observada nos testes sobre ação do bloqueio (tópico 4.2.3), sugerindo uma ineficiência do mesmo - permite a realização de inferências sobre a possibilidade da interação de proteínas vegetais com o imunossensor para detecção de TNF- α humano, haja vista que o deslocamento do ângulo de ressonância foi de $238,0 \pm 21,0$ mgra, enquanto a imobilização de extrato de folha de soja na superfície sensora foi de $169,0 \pm 15,0$ mgra.

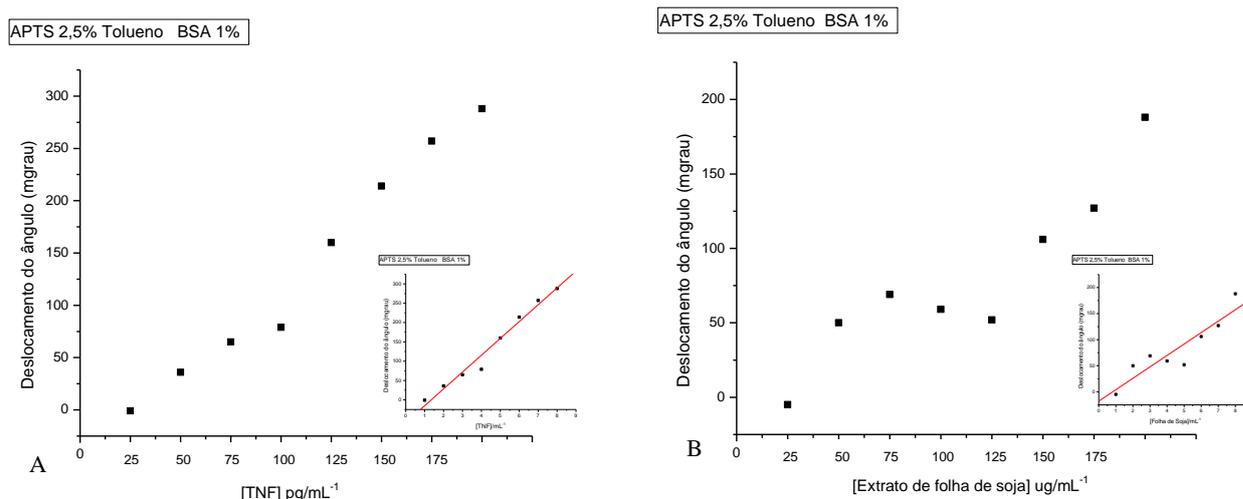


Figura 35 - Curva de calibração sobre a interação antígeno-anticorpo, ocorrida na resposta do imunossensor bloqueado com BSA 1% ao TNF- α humano (A) e ao extrato de folha de soja (B).

Levando em consideração que as melhores condições de desenvolvimento do biossensor testadas ocorreram com a utilização de APTS 2,5% em tolueno, bloqueado com BSA 1%, calculamos que o biossensor reconheceu (total adsorvido após sucessivas injeções de antígeno), aproximadamente, $24,0 \text{ pg} \cdot \text{mm}^{-2}$ ($198,3 \pm 28,4 \text{ mgra}$) de anticorpos imobilizados na superfície de ouro. De acordo com a curva de calibração obtida a partir de oito injeções sucessivas de TNF- α humano ($n=8$) (Figura 35A), em concentração de $25 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ cada uma, em triplicata experimental, obtivemos uma região linear de resposta de $4,3$ a $34,7 \text{ pg} \cdot \text{mm}^{-2}$ ($R=0,98$, $SD=2,18$, $p<0,0001$).

4.2.5 Verificação da eficiência de técnicas de regeneração

Neste estudo foram testadas duas técnicas de regeneração (dissociação entre antígeno e anticorpo) descritas na literatura: SDS 1% (DAVID et al., 2002; DUTRA;KUBOTA, 2007; DUTRA et al., 2007) e glicina 20 mM em pH 2,8 (CATIMEL, 1997).

Após a realização da interação do TNF- α humano com os anticorpos imobilizados sobre o disco de ouro, foi injetada a solução de glicina, na

concentração de 0,2 M, em PBS 100 mM a pH 2,8, ajustado com HCl, para gerar a dissociação da interação antígeno-anticorpo ocorrida (CATIMEL, 1997). No sistema desenvolvido neste trabalho, esta técnica não foi eficiente, pois não houve remoção da quantidade de antígeno imobilizado, utilizando os tempos de 15 e 30 minutos de reação (dados não mostrados).

Outra técnica adotada foi a utilização da solução detergente SDS (Dodecil Sulfato de Sódio), em concentrações de 1% e 0,5%, durante 120 segundos, em ensaios diferentes (DUTRA; KUBOTA, 2007). Na Figura 36 podemos acompanhar a realização do primeiro bloqueio de BSA 1%, lavagem com PBS, adições de TNF- α humano, outra lavagem com PBS e então observamos o momento da dissociação entre antígeno e anticorpo à inserção de SDS 1%, representado pela abrupta queda da linha. Ao analisarmos as linhas de base, expressas no sensorgrama, do início das de TNF- α humano e após a lavagem do SDS, podemos notar que a linha de base do SDS está abaixo da linha de base do TNF- α humano. Isso representa que houve dissociação do antígeno e inclusive de parte do bloqueio (comparar linha de base do BSA). Após a ação do SDS foi realizada intensa lavagem com PBS, pH 7,2, 100mM, durante três minutos. Foi realizado novo bloqueio com BSA 1% durante 1800 s. Em seguida, foram injetadas alíquotas de TNF- α humano para verificar se a eficácia das imunoglobulinas, em reconhecer antígenos, foi mantida, após a dissociação gerada. Os resultados obtidos mostraram que o SDS a 1% e a 0,5% foram eficazes em dissociar a ligação antígeno-anticorpo. A curva-padrão da regeneração obtida a partir das diferenças de ângulo de ressonância de adições de TNF- α humano, apresentou baixa linearidade de resposta ($R= 0,802$). Porém, houve imobilização de antígeno no canal contendo anti- TNF- α humano ($\Delta= 41 \pm 11$ mgra), o que não ocorreu no canal controle, sem anticorpo. Isso representa que a especificidade do biossensor foi mantida, similarmente aos resultados de David e colaboradores (2002) e Dutra e Kubota (2007).

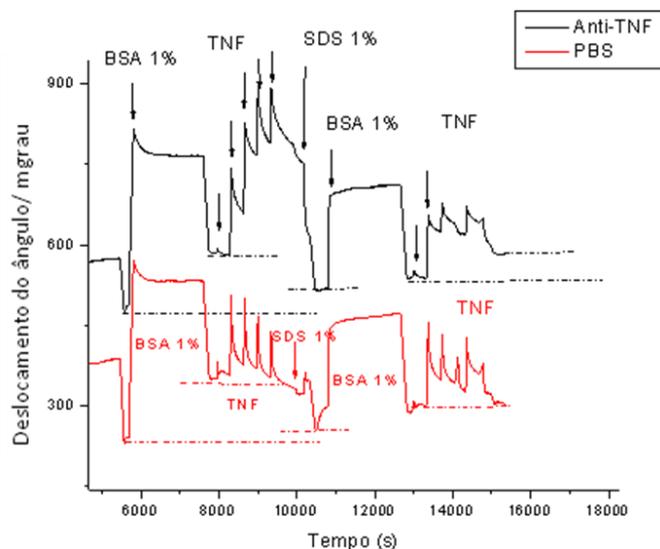


Figura 36 – Efeito da regeneração usando SDS 1% durante 120 segundos em monocamada de APTS 2,5%, imobilizada com anticorpos anti-TNF- α humano e bloqueada com BSA 1%.

4.3 AFM

As análises em Microscopia de Força Atômica (*AFM*) foram realizadas observando alguns critérios estatísticos calculados pelo programa de computação, Gwyddion® 2.9. Dentre esses critérios, com base nos resultados obtidos por outros pesquisadores, a rugosidade da superfície, foi o mais relevante para caracterização da homogeneidade da monocamada construída sobre o substrato. Além disso, a percepção visual sobre a granulosidade dessas imagens também foi empregada para a interpretação da *SAM* formada (J. H.DONG et al., 2006; SIMON et al., 2002).

As imagens foram preparadas e tratadas, em mesma escala, utilizando, também, o Gwyddion® 2.9 para adequada comparação proporcional. Vale ressaltar que a técnica de *AFM* empregada neste trabalho, teve intuito apenas de detectar medidas de superfície. Ou seja, a medida relacionada à altura da superfície, demonstrada em escala no lado direito das imagens, refere-se à diferença entre a região mais profunda, ou mais baixa, dessa superfície - que pode ser um defeito na formação da *SAM* ou do substrato. Os picos mais altos, podem representar

realmente a altura média da monocamada formada, ou apenas a medida de um aglomerado de moléculas isolado. Sendo assim, a técnica de *AFM* não foi utilizada para mensurar a espessura das camadas. Para isso, seria necessária a adequação da metodologia empregada, com geração de degraus na superfície, ou por remoção de parte da *SAM* formada ou por isolamento da superfície do substrato durante a formação da monocamada.

Para a caracterização topográfica de superfície das amostras foi realizada, inicialmente, a leitura da superfície de ouro limpa (controle), tratada com “solução piranha”. Em seguida foram feitas medidas da superfície silanizada com APTS, nas diferentes concentrações (1%, 2,5%, 5% e 10%) e em dois diferentes solventes (água e tolueno), para efeito de comparação entre as metodologias utilizadas (BEARI et al., 2001; ETIENNE e WALCARIUS, 2003; HAN et al., 2006; IUCCI, et al., 2007; MESKINI et al., 2007; PLUEDDEMANN, 1991; QINLIN; XIANHUA, 2007; SILBERZAN et al., 1991; SIMON et al., 2002; TLILI et al., 2005).

As amostras silanizadas com APTS 1% em água e 2,5% e 5% em tolueno foram selecionadas para imobilização de anticorpos para análise topográfica de superfície sensora devido às melhores respostas de reconhecimento do TNF- α humano, detectadas pela técnica de *SPR* (tópico 4.2.2).

4.3.1 Ouro (Controle)

A medida da superfície do ouro foi realizada antes de sofrer modificação, como parâmetro para as análises das diferentes monocamadas a serem formadas. Analisando a rugosidade da região analisada, obtivemos uma baixa média de rugosidade, $1,13 \pm 0,07$ nm, sugerindo homogeneidade satisfatória da superfície do disco de ouro comercial, o que favoreceu as formações das *SAM* subseqüentes. Visualizando a imagem dessa superfície (Figura 37), de forma planar (B) e tridimensional (A) observamos que os tamanhos dos grãos apresentaram proporcionalidade, corroborando com a medida de rugosidade na qualificação dessa superfície.

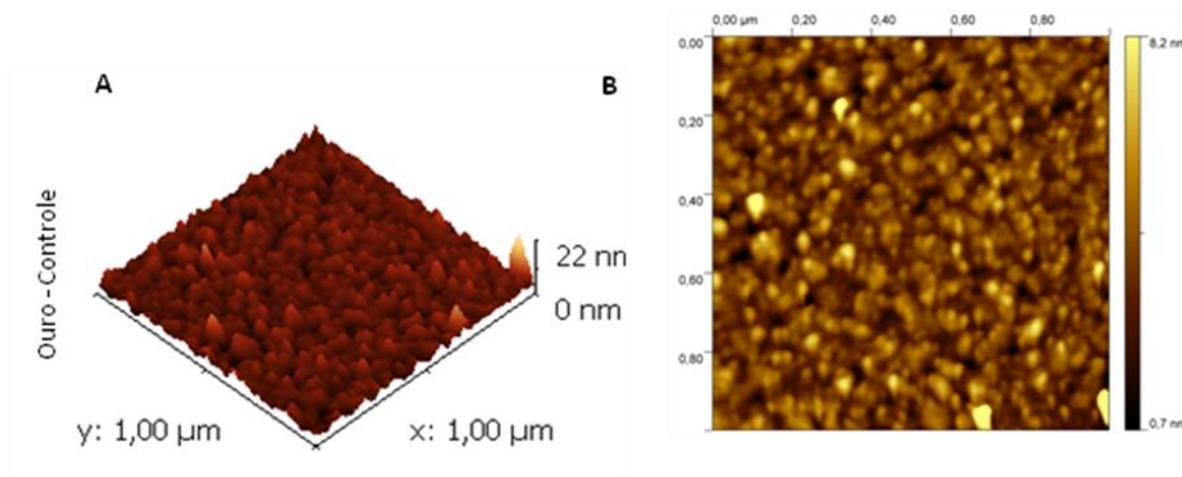


Figura 37 - Imagem de AFM de superfície de ouro (controle). A – tridimensional. B- planar.

4.3.2 APTS e água

As medidas topográficas de superfície realizadas nas amostras de APTS a 1% em água demonstram que houve modificação da superfície de ouro, detectada visualmente nas imagens mostradas, na Figura 38. Nesta Figura podemos observar que houve aumento progressivo no aspecto da granulosidade dessa superfície, modificada com o silano (segunda linha) e posteriormente imobilizada com anticorpo (terceira linha). Ao analisarmos a homogeneidade topográfica foi detectada pequena redução da média de rugosidade para a superfície que foi, apenas, silanizada, $0,98 \pm 0,05$ nm, em relação ao controle, $1,13 \pm 0,07$ nm. Esses resultados sugerem que houve a formação de uma monocamada homogênea, o que permitiu a imobilização de anticorpos (terceira linha), representada nesse caso, pela redução do aspecto granuloso na imagem planar, porém, com aumento da heterogeneidade, quando visualizamos a imagem tridimensional, e da rugosidade, $1,6 \pm 0,2$ nm. A redução da rugosidade da superfície silanizada pode ser explicada pelo preenchimento de depressões existentes na superfície de ouro, que aparecem na imagem como áreas mais escuras, gerando um recobrimento da superfície. Já com a imobilização de anticorpos, houve um aumento dessa rugosidade, devido à ligação dessas imunoglobulinas na superfície já recoberta por APTS, com depressões suavizadas, conseqüentemente.

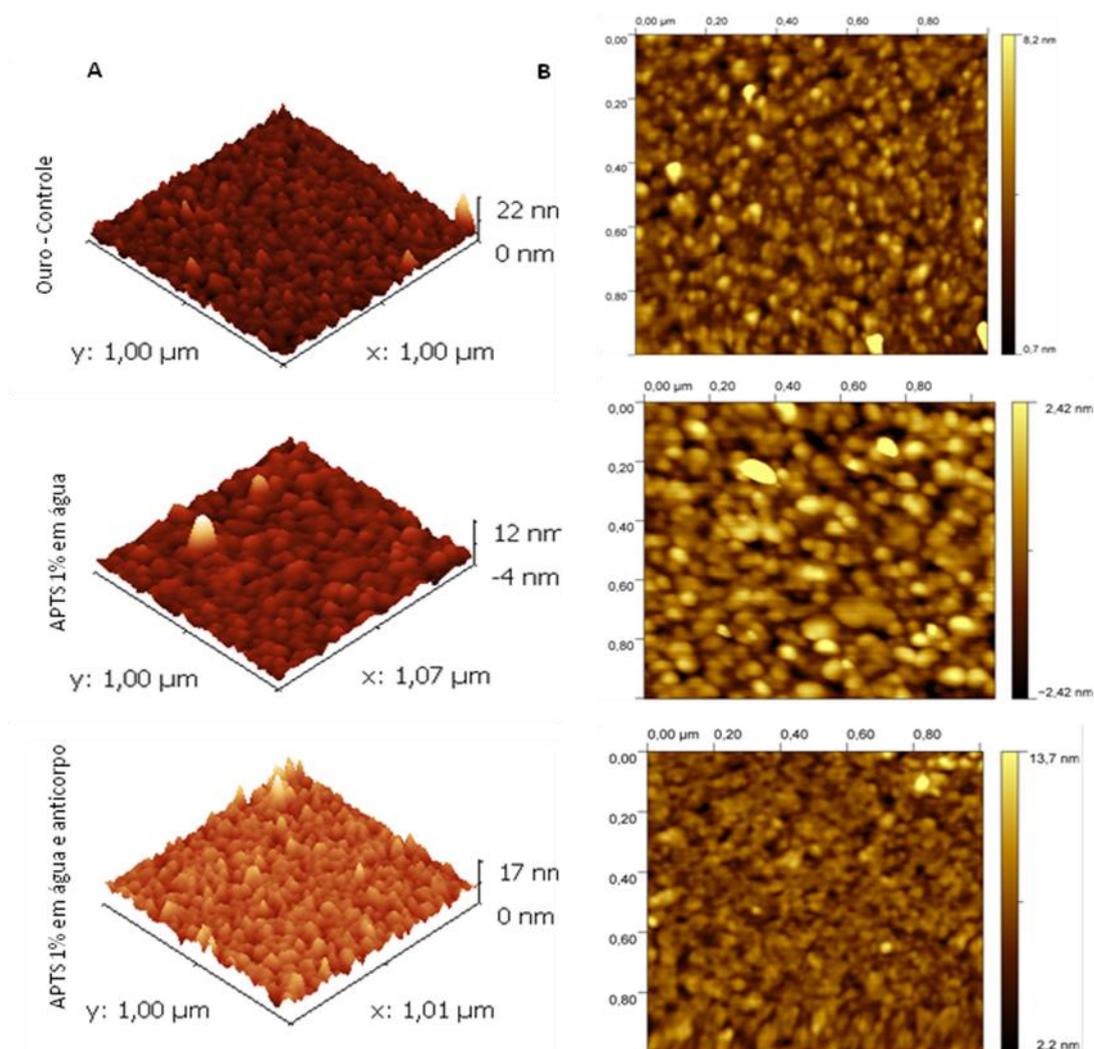


Figura 38 - Imagem de AFM sobre a formação de SAM utilizando APTS 1% em água deionizada. Na primeira linha temos imagens de superfície de ouro (controle). Na segunda linha temos a superfície modificada com APTS. E na terceira linha temos, além da SAM, imobilização de anticorpos. A – tridimensional. B- planar.

No estudo topográfico sobre a superfície de ouro modificada com APTS a 2,5% em água (Figura 39), observamos um aumento irregular na granulosidade da superfície silanizada, tanto na imagem planar (B) quanto na imagem tridimensional. Em relação à rugosidade média, foi detectada uma leve redução, $1,04 \pm 0,04$ nm, quando comparado ao controle, $1,13 \pm 0,07$ nm, este fato pode ser justificado da mesma forma como a citada para o recobrimento do APTS a 1%. Porém, percebemos um aumento de rugosidade em relação à silanização usando APTS 1%. Sendo assim, essa superfície apresenta características visuais e estatísticas que sugerem a formação, nas condições empregadas, de uma monocamada mais heterogênea do que a construída na concentração menor, de 1%.

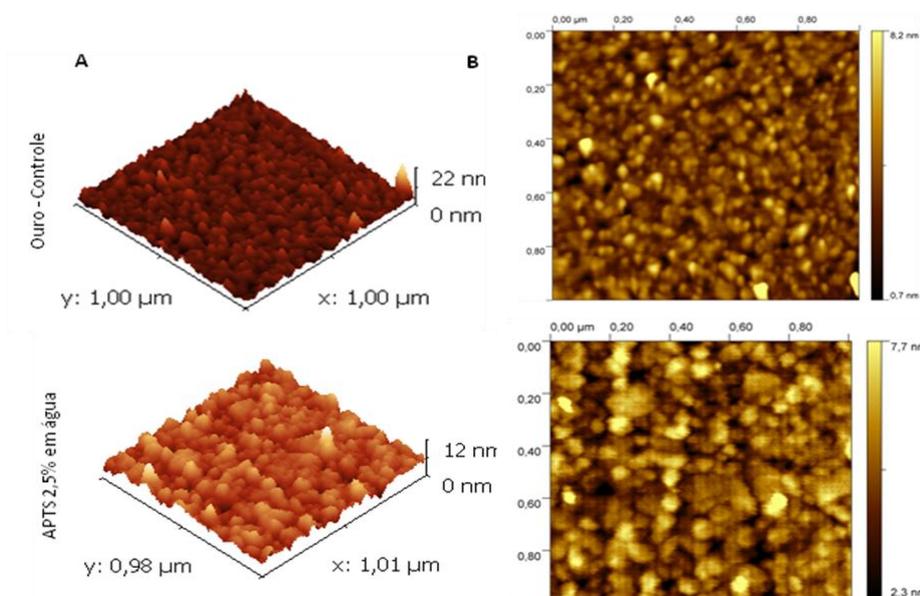


Figura 39 - Imagem de AFM sobre a formação de SAM utilizando APTS 2,5% em água deionizada. Na primeira linha temos imagens de superfície de ouro (controle). Na segunda linha temos a superfície modificada com APTS. A – tridimensional. B- planar.

Ao analisarmos as características topográficas das amostras preparadas com APTS a 5% em água (Figura 40), começamos a perceber alguns artefatos de técnica na imagem planar (B), que são pontos mais claros e presença de linhas sutis, com aspecto borrado. Esses defeitos podem estar relacionados com o aumento de espessura da SAM formada, pois foi utilizada concentração maior de silano, o que fez com que a ponta do AFM, entrasse em contato com as partes mais altas da superfície, o que gerou o aspecto de “arrastamento”, observado na imagem descrita. Importante lembrar, que a técnica de mensuração de superfície empregada, neste trabalho, foi modo de não-contato. Após as devidas observações quanto aos artefatos, seguiremos com a análise da superfície. Tanto a imagem planar quanto a tridimensional nos transmite as informações de aumento de granulosidade em relação ao controle e, também, das superfícies silanizadas com concentrações de APTS menores (1% e 2,5%). Houve pequena redução da média de rugosidade dessa superfície, $1,07 \pm 0,08$ nm, em relação ao controle, $1,13 \pm 0,07$ nm. Porém, em relação às superfícies modificadas com APTS 1% e 2,5%, manteve um aumento progressivo, em consequência do aumento da concentração. Mediante todas as observações descritas, foi observada a formação de uma

camada mais heterogênea, em relação a concentrações menores. Essa monocamada apresentou bons resultados de imobilização de anticorpos e resposta ao TNF- α humano, detectados pela técnica de *SPR*, como pode ser verificado no tópico 4.2.2.

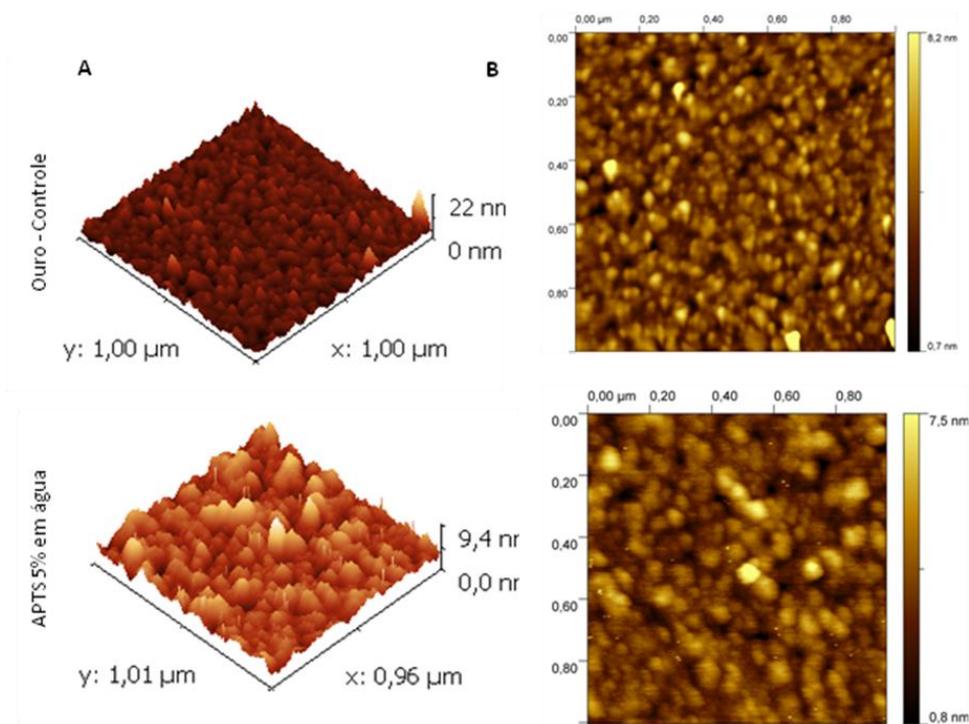


Figura 40 - Imagem de AFM sobre a formação de SAM utilizando APTS 5% em água deionizada. Na primeira linha temos imagens de superfície de ouro (controle). Na segunda linha temos a superfície modificada com APTS. A – tridimensional. B- planar.

Ao analisarmos a superfície dos experimentos preparados com APTS 10% em água (Figura 41), observamos que as imagens também apresentam artefato de técnica (“arrastamento”) representado por um possível aumento de espessura e de heterogeneidade da camada, em razão do aumento da concentração de silano na solução. As características relacionadas à uniformidade de superfície se mantêm muito semelhantes às da superfície tratada com APTS 2,5%, sob as mesmas condições de preparo. Em relação à rugosidade média dessa superfície, também foi menor, $1,11 \pm 0,04$ nm, que a do controle, $1,13 \pm 0,07$ nm. No entanto, essa redução foi menor que a detectada nas outras amostras de menor concentração de

silano, preparadas em água. Os dados sugerem aumento de heterogeneidade em relação às amostras silanizadas com concentrações inferiores.

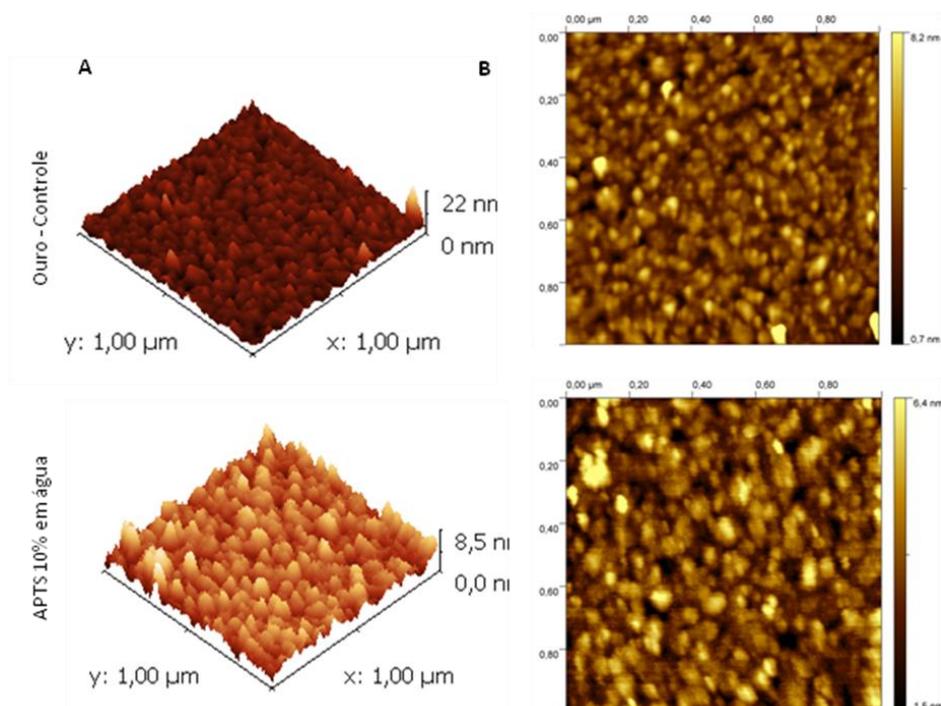


Figura 41 - Imagem de AFM sobre a formação de SAM utilizando APTS 10% em água deionizada. Na primeira linha temos imagens de superfície de ouro (controle). Na segunda linha temos a superfície modificada com APTS. A – tridimensional. B- planar.

4.3.3 APTS e Tolueno

Ao analisarmos as imagens topográficas da superfície de ouro modificada com APTS 1% em tolueno (Figura 42) observamos a formação de aglomerados de moléculas, representado pelas imagens mais claras na imagem planar (B), e pelos picos mais altos na imagem tridimensional (A). Ao analisarmos o fundo da imagem planar (B, linha inferior) da amostra silanizada, observamos recobrimento mais homogêneo do que o do controle (linha superior). Tanto essa diferença do fundo da imagem, quanto à presença de aglomerados mais superficiais comprovam a presença de silano no substrato. Porém, essa cobertura, mediante as características descritas, estava muito irregular. Outra observação, descrita por Love e colaboradores (2005), que corrobora com essa irregularidade é a presença

de depressões na superfície (áreas mais escuras em imagem planar e de depressões em imagem tridimensional), que podem ser causadas pela deposição irregular de APTS, em razão da formação de aglomerados, ou por defeitos no substrato. A medida de rugosidade média dessa superfície analisada foi a maior, dentre todos os experimentos realizados com água ou tolueno, $5,1 \pm 0,5$ nm, sendo muito superior à rugosidade do controle, $1,13 \pm 0,07$ nm. Mediante os resultados obtidos para esta amostra, foi observada uma superfície muito heterogênea e com defeitos que comprometem a função do biossensor, como também, na análise em *SPR* (tópico 4.2.2), houve imobilização dos anticorpos, porém não ocorreu a interação com o antígeno.

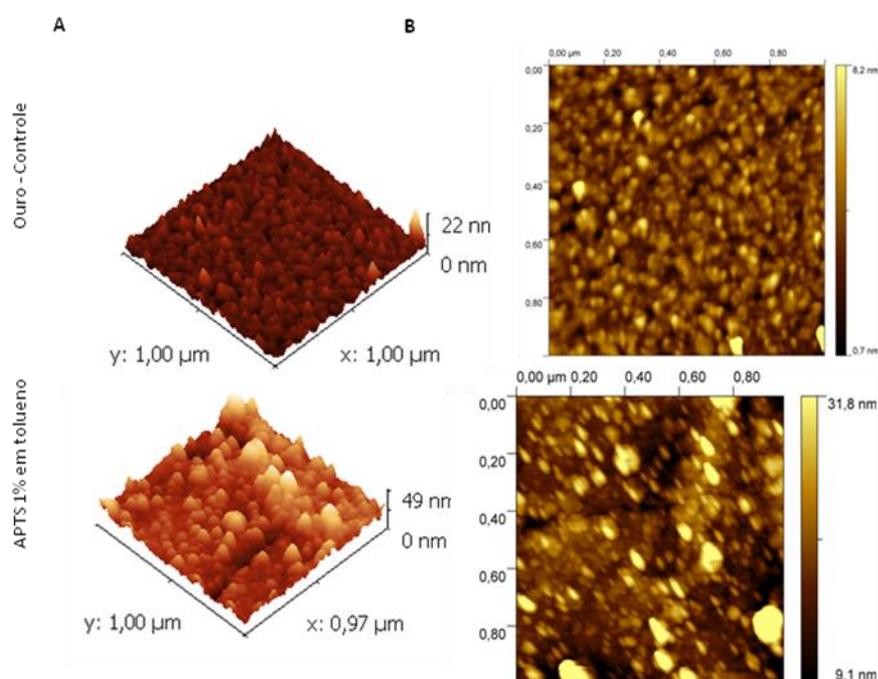


Figura 42 - Imagem de AFM sobre a formação de SAM utilizando APTS 1% em tolueno. Na primeira linha temos imagens de superfície de ouro (controle). Na segunda linha temos a superfície modificada com APTS. A – tridimensional. B- planar.

A análise topográfica da superfície modificada com APTS 2,5%, em tolueno (Figura 43), também apresentou aglomerados, porém menores. Outro aspecto interessante, o fundo da imagem foi mais homogêneo do que o da amostra de 1%, devido à redução da granulosidade (linha inferior, B) e a ausência de depressões,

que foram confirmadas pela imagem tridimensional (linha inferior, A). A rugosidade média dessa superfície também foi alta, $4,0 \text{ nm} \pm 0,5 \text{ nm}$, em relação ao controle, $1,13 \pm 0,07 \text{ nm}$, porém, foi menor do que a da amostra silanizada com APTS 1%, apresentada anteriormente. A imagem tridimensional mostrou que esse aumento da média da rugosidade pode ser devido aos picos de aglomerados, pois, a superfície de fundo estava mais homogênea (linha inferior, A). Quando analisamos a imobilização de anticorpos (terceira linha) sobre essa monocamada, observamos alteração da superfície. A imagem planar mostra uma cobertura homogênea, recobrando toda a superfície, composta por estruturas globosas, compatíveis com a presença de imunoglobulinas. A rugosidade média aumenta, $15,0 \pm 1,0 \text{ nm}$, apesar de não provocar artefatos de técnica como o “arrastamento”, observado nas amostras de água nas concentrações de cinco e 10%. Em SPR foram detectadas as melhores respostas de interação antígeno-anticorpo (tópico 4.2.2)

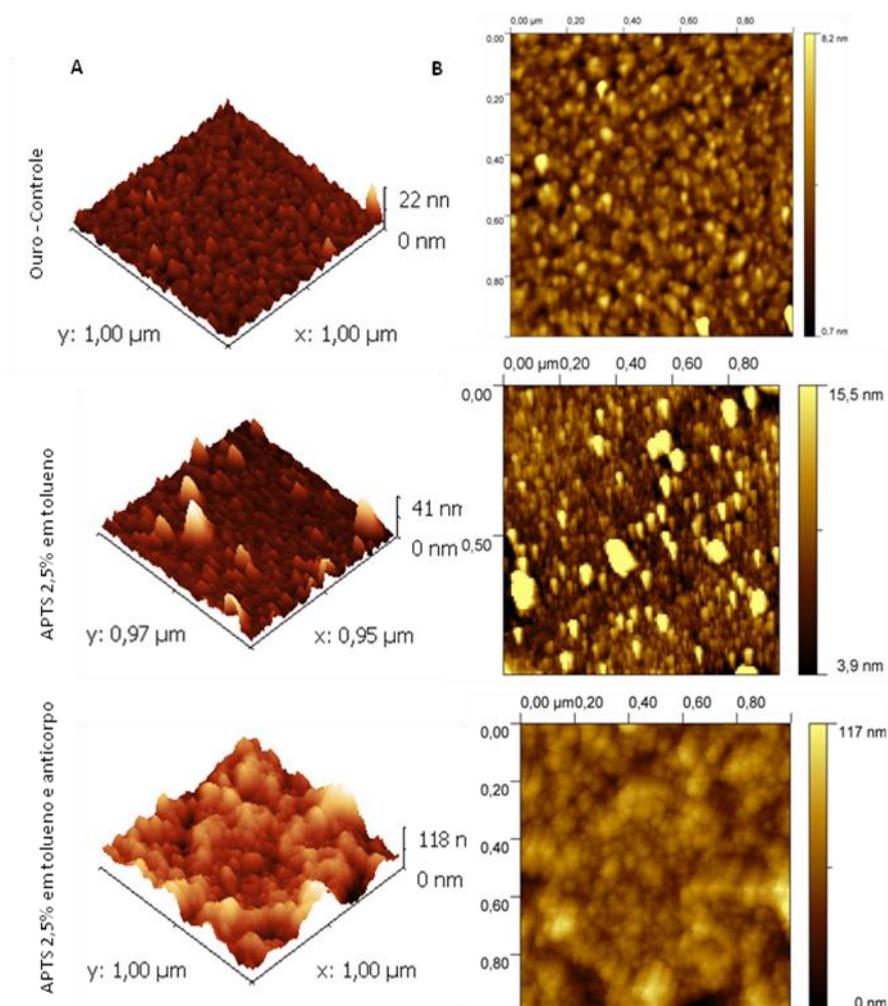


Figura 43 - Imagem de AFM sobre a formação de SAM utilizando APTS 2,5% em tolueno. Na primeira linha temos imagens de superfície de ouro (controle). Na segunda linha temos a superfície modificada com APTS. E na terceira linha temos, além da SAM, imobilização de anticorpos. A – tridimensional. B - planar.

As imagens de topografia de superfície, obtidas da amostra de APTS a 5% em tolueno, podem ser verificadas na segunda linha da Figura 44. Na imagem B (planar) podemos observar uma redução da quantidade de aglomerados, em relação às amostras anteriores, e uma redução discreta da granulosidade comparada ao controle. Na imagem A (tridimensional), podemos notar maior homogeneidade da superfície do que a do controle, comprovada pela média obtida da rugosidade, $2,4 \pm 0,2$ nm, porém, menor do que todas as outras amostras preparadas em tolueno. Ao analisarmos a superfície com anticorpos imobilizados (terceira linha), observamos que as estruturas globosas, também detectadas na amostra de 2,5% com imunoglobulinas, estão maiores, e a camada parece mais heterogênea, sugerindo a presença de maior quantidade de imunoglobulinas. Alta

rugosidade média dessa superfície foi detectada, $11,0 \pm 1,0$ nm, porém, menor que a apresentada pela amostra de 2,5%, $15,0 \pm 1,0$ nm. Em *SPR*, essa metodologia de silanização usando APTS a 5% em tolueno apresentou bons resultados de imobilização e resposta ao TNF (tópico 4.2.2).

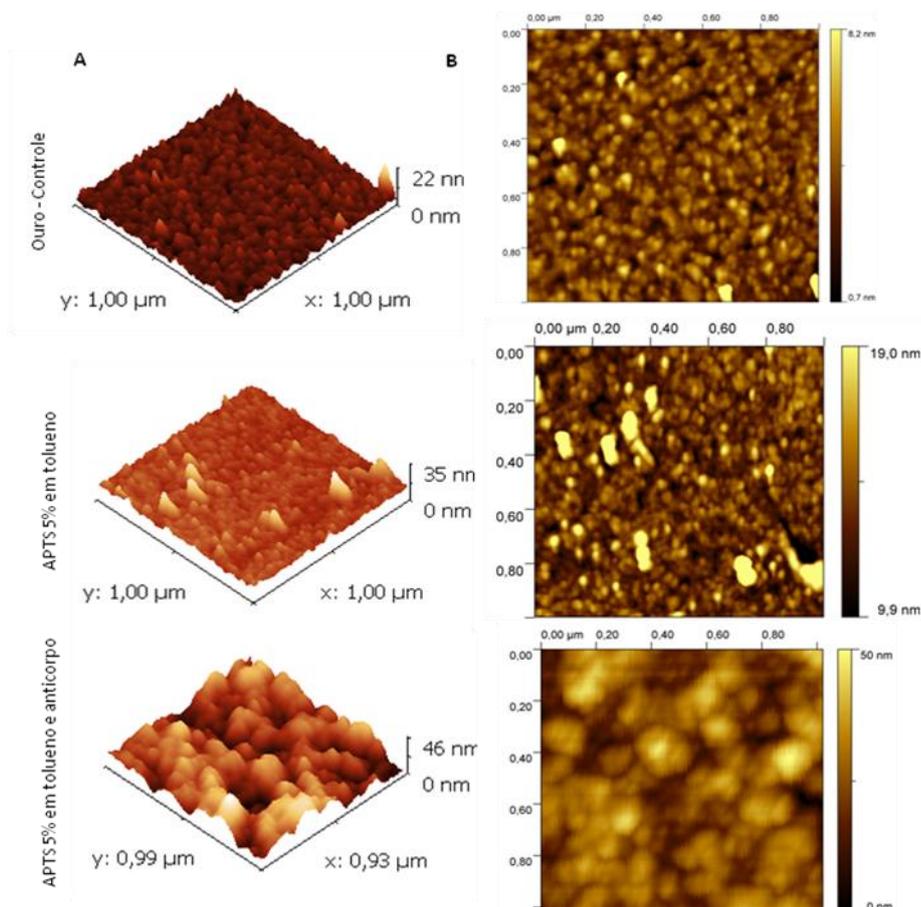


Figura 44 - Imagem de AFM sobre a formação de SAM utilizando APTS 5% em tolueno. Na primeira linha temos imagens de superfície de ouro (controle). Na segunda linha temos a superfície modificada com APTS. E na terceira linha temos, além da SAM, imobilização de anticorpos. A – tridimensional. B- planar.

Ao verificarmos as imagens da técnica de silanização usando APTS a 10%, em tolueno (Figura 45), foi notado aumento na formação de aglomerados, maiores do que os presentes nas amostras analisadas anteriormente, de concentrações menores. No fundo das imagens, observamos uma cobertura heterogênea da superfície composta por estruturas globosas e por algumas depressões. A

rugosidade média dessa superfície foi de $2,7 \text{ nm} \pm 0,5 \text{ nm}$, ligeiramente maior do que na amostra de 5%. Em *SPR* apresentou boa imobilização de anticorpos, porém menor resposta ao antígeno (tópico 4.2.2)

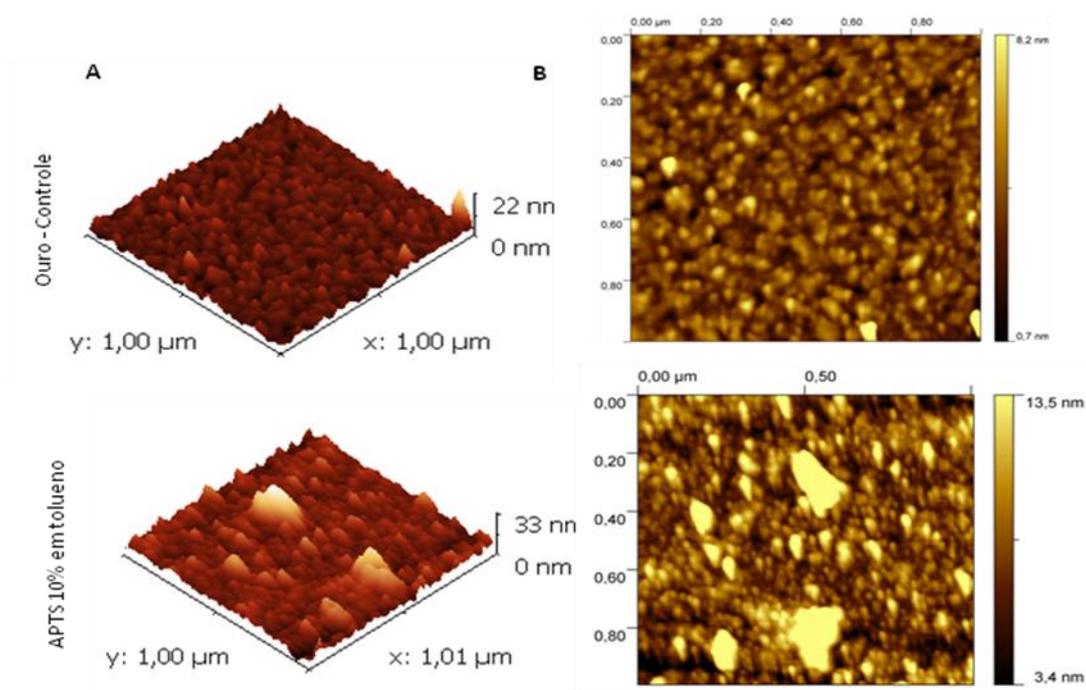


Figura 45 - Imagem de AFM sobre a formação de SAM utilizando APTS 10% em tolueno. Na primeira linha temos imagens de superfície de ouro (controle). Na segunda linha temos a superfície modificada com APTS. E na terceira linha temos, além da SAM, imobilização de anticorpos. A – tridimensional. B- planar.

4.3.4 Análise comparativa sobre a rugosidade topográfica das superfícies modificadas com silanização usando água ou tolueno.

Um resumo sobre as medidas estatísticas de rugosidade topográfica das superfícies analisadas pode ser visto na Tabela 02. Utilizando o controle como referência, observamos as diferenças de resultado dentro de um grupo (água ou tolueno) e, em seguida, entre os grupos.

Tabela 02 - Resumo sobre a rugosidade da superfície do substrato de ouro, modificada com APTS preparado em Água ou Tolueno, em diferentes concentrações e com a imobilização de anticorpos.

Amostra	Rugosidade [nm]	Erro [nm]	Erro relativo [%]
Controle – ouro (Au)	1,13	± 0,07	6 %
Tolueno-APTS 1%	5,1	± 0,5	10 %
Tolueno-APTS 2,5%	4,0	± 0,5	25 %
Tolueno-APTS 5%	2,4	± 0,2	9%
Tolueno-APTS 10%	2,7	± 0,5	17 %
Tolueno-APTS2,5% - Anticorpo	15,0	± 1,0	7%
Tolueno-APTS 5% - Anticorpo	11,0	±1,0	9%
Água-APTS 1%	0,98	± 0,05	5 %
Água-APTS 2,5%	1,04	± 0,04	4 %
Água-APTS 5%	1,07	± 0,08	8 %
Água-APTS 10%	1,11	± 0,04	4 %
Água-APTS 1% - Anticorpo	1,6	± 0,2	13%

Ao compararmos as amostras que foram preparadas em tolueno, percebemos que todas apresentaram valores de rugosidade média de superfície, maiores do que a rugosidade do controle. Enquanto, todas as amostras preparadas em água apresentaram a rugosidade abaixo do valor da superfície de ouro-controle. Outra diferença interessante foi a presença de aglomerados nas amostras em tolueno, não observadas nas amostras de água.

A presença desses aglomerados, nas amostras preparadas em tolueno, pode ser explicada pelo fato do solvente utilizado, neste trabalho, não ter sido anidro, como geralmente é citado na literatura. Como a água promove hidrólise da molécula de APTS, pode ter ocorrido hidrólise de algumas moléculas que se ligaram e se depositaram na superfície formando os aglomerados. No caso das amostras preparadas em água, houve a hidrólise das moléculas de APTS, que formaram ligações cruzadas entre si, iniciando uma deposição na superfície por condensação. Isso pode explicar o fato da rugosidade nas amostras de água ser

menor que nas de tolueno. Como o APTS não reage com o tolueno, haverá uma interação direta dessa molécula com a superfície de ouro, gerando superfícies mais heterogêneas, como foi observado pela análise topográfica em *AFM* (BEARI et al., 2001; PLUEDDEMANN, 1991; SIMON et al., 2002).

Sendo assim, as superfícies mais homogêneas obtidas foram as das amostras de água, que também apresentaram resultados satisfatórios na análise de *SPR*. O inconveniente encontrado para utilização desta técnica foi a instabilidade da *SAM* formada, o que inviabilizou a repetição dos experimentos por disco de ouro. Os discos de ouro utilizados em *SPR* são caros, e quando é realizada a silanização de um disco, há formação de ligações covalentes, irreversíveis, que impedem o reaproveitamento do disco. O disco de ouro silanizado em tolueno, após a realização de imunoenensaio, era devidamente demarcado, para evitar sobreposição de ensaios, e guardado em recipiente hermeticamente fechado, com sílica-gel ativada, em temperatura ambiente. Esses discos foram utilizados até sete dias depois da silanização, sem comprometerem a imobilização da proteína e da resposta ao antígeno. Os discos preparados em água, armazenados sob mesmas condições descritas para técnica em tolueno, apresentaram resposta satisfatória até o segundo dia, após a imobilização, sendo descartados sem o aproveitamento total. Esse problema também pode ser justificado pela hidrólise das moléculas de APTS, que interagem entre si, promovendo a condensação dessa rede de moléculas na superfície de ouro, reduzindo a quantidade de sítios ligantes disponíveis para interagirem com a imunoglobulina (BEARI et al., 2001; SILBERZAN et al., 1991).

CONCLUSÕES

O imunossensor obtido a partir da imobilização do anticorpo anti-TNF- α apresentou alguns resultados satisfatórios nessa primeira etapa do projeto, como eficiente imobilização de anticorpos e reconhecimento de antígeno.

No entanto os testes sobre especificidade do imunossensor podem ter sido prejudicados pela provável detecção de moléculas TNF- α símiles, ainda não descritas, presentes em espécies vegetais, que foram utilizadas como controle nos ensaios.

A partir do biossensor desenvolvido neste trabalho, pretendemos otimizar as condições de sensibilidade e especificidade para realização de testes em fluidos corporais de pacientes portadores de doenças inflamatórias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. Traduzido por Alessandro dos Santos Farias e outros. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564pp.

AGGARWAL, B.B. et al. Human tumor factor. Production, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.*, v. 260, n.4, p.2345-2354. 1985.

AGGARWAL, B.B. Signalling pathways of the superfamily: a double-edged sword. *Nature Reviews Immunology*, v.3, p.745-756. 2003.

AIZAWA, H. et al. Antibody Immobilization on Functional Monolayers Using a Quartz Crystal Microbalance. *IEEE Sensors Monolayers Journal*, v.6, n.5, oct. 2006.

ALLARA, D.L. Critical issues in applications of self-assembled monolayers. *Biosensors and Bioelectronics*, v.10, p.771-783. 1995.

AOYAGI, S. et al. Structure analysis of immobilized-bovine serum albumin by means of TOF-SIMS. *e-J. Surf. Sci. Nanotec*, v.4, p.614-618. 2006.

ARROYO-HERNÁNDEZ, M. et al. One step processing of aminofunctionalized gate oxides. *Biosensors and Bioelectronics*, v.22, p.2786-2789. 2007.

ARSLAN, G. et al. Surface Modification of Glass Beads with an Aminosilane Monolayer. *Turk J Chem*, v.30, p.203-210. 2006.

ATZENI, F. et al. Potential target of infliximab in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmunity Reviews*, v. 6, p.529-536. 2007.

AUSUBEL, F.M. Are innate immune signaling pathways in plants and animal conserved? *Nature immunology*, v. 6, n.10, p.973-979, oct. 2005.

BAE, Y.M. et al. Study on orientation of immunoglobulin G on protein G layer. *Biosensors and Bioelectronics*, v.21,n.1, p. 103-110. 2005.

BANDIERA, L. et al. A fully electronic sensor for the measurement of cDNA hybridization kinetics. *Biosensors and Bioelectronics*, v.22, p.2108-2114. 2007.

BAUGH, J.A., BUCALA, R. Mechanisms for modulation TNF alpha in immune inflammatory disease. *Curr.Opin. Drug Discov. Dev.*, v.4, p.635-650, 2001.

BHATTACHARYA, R., BHATTACHARYA, D., DHAR, T.K. A novel signal amplification technology based on catalyzed reporter deposition and its application in a Dot-ELISA with ultrahigh sensitivity. *Journal of Immunological Methods*, v.227, p. 31–39. 1999.

BEARI, F. et al. Organofunctional alkoxysilanes in dilute aqueous solution: new accounts on the dynamic structural mutability. *Journal of Organometallic Chemistry*, v.625, p.208-216. 2001.

BRASIL. Ministério de Ciência e Tecnologia. *Pequeno Glossário de Nanotecnologia*. Brasília. set. 2006. 20pp.

BRASIL. Ministério de Ciência e Tecnologia. *Proposta do Grupo de Trabalho criado pela Portaria MCT nº 252 como subsídio ao Programa de Desenvolvimento da Nanociência e da Nanotecnologia do PPA 2004-2007*. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.mct.gov.br>, em 10/01/2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Disponível no endereço eletrônico: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm, em 10/07/2008.

BYLER, D.M.; FARRELL-JR, H.M.; SUSI, H. Raman Spectroscopic Study of Casein Structure. *J Dairy Sci.*, v. 71, p.2622-2629. 1988.

CAI, M.; HO, M.; PEMBERTON, J.E. Surface Vibrational Spectroscopy of Alkylsilane Layers Covalently Bonded to Monolayers of (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane on Ag Substrates. *Langmuir*, v.16, p.3446–3453. 2000.

CARRIGAN, S.D.; SCOTT, G.; TABRIZIAN, M. Toward Resolving the Challenges of Sepsis Diagnosis. *Clinical Chemistry*, v.50, n.8, p.1301–1314. 2004.

CARVALHAL, R.F.; FREIRE, R.S.; KUBOTA, L.T. Polycrystalline gold electrodes: A comparative study of pretreatment procedures used for cleaning and thiol self-assembled monolayer formation. *Electroanalysis*, v. 17, n.14, p.1251-1259. 2005.

CARVALHO, R.M.; RATH, S.; KUBOTA, L.T. SPR – Uma nova ferramenta para biossensores. *Química Nova*, v.26, n. 1, p.97-104. 2003.

CATTARUZZA, F. et al. Controlled loading of oligodeoxyribonucleotide monolayers onto unoxidized crystalline silicon; fluorescence-based determination of the surface coverage and of the hybridization efficiency; parallel

imaging of the process by Atomic Force Microscopy. *Nucleic Acids Research*, v. 34, n. 4, 2006. 13pp.

CATIMEL, B. et al. Kinetic analysis of the interaction between the monoclonal antibody A33 and its colonic epithelial antigen by the use of an optical biosensor. A comparison of immobilization strategies. *Journal of Chromatography A*, v.776, p.15-30. 1997.

CHA, S-K. SAMs of 2-Aminoethanethiol Modified with 3,4-Dihydroxyphenylalanine for the Electrochemical Oxidation of NADH on Gold Electrodes. *Bull. Korean Chem. Soc.*, v. 25, n. 6, p. 786-790. 2004.

CHAMBERLAND, D.L. et al. Photoacoustic tomography of joints aided by an Etanercept-conjugated gold nanoparticle contrast agent—an ex vivo preliminary rat study. *Nanotechnology*, v.19, 095101, p.1-7. 2008.

CHUNG, J.W.; BERNHARDT, R.; PYUN, J.C. Additive assay cancer marker CA 19-9 by SPR biosensor. *Sensors and Actuators B*, v.118, p.28-32. 2006.

CORCORAN, A.E. et al. Characterization of ligand binding by the human p55 tumour-necrosis-factor receptor. Involvement of individual cysteine-rich repeats. *Eur. J. Biochem.*, v.223, p.831-840, 1994.

DAMOS, F.S; MENDES, R.K.; KUBOTA, L.T. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. *Quim. Nova*, v.27, n.6, p.970-979. 2004.

DEMIREL, G. et al. Construction of a novel multilayer system and its use for oriented immobilization of immunoglobulin G. *Surface Science*, v. 601, p.4563-4570. 2007.

DISLEY, D.M. et al. Covalent coupling of immunoglobulin G to self-assembled monolayers as a method for immobilizing the interfacial-recognition layer of a surface plasmon resonance immunosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, v.13, p.1213-1225. 1998.

H. DONG, et al. Sensitive electrochemical enzyme immunoassay microdevice based on architecture of dual ring electrodes with a sensing cavity chamber. *Biosensors and Bioelectronics*, v.22, p.624-626. 2006.

DONG, J. et al. Self-assembly of octadecyltrichlorosilane monolayers on silicon-based substrates by chemical vapor deposition. *Thin Solid Films*, n.515, p.2116-2122. 2006.

DOS-SANTOS, M.C. et al. Phospholipase A₂ injection in mice induces immunity against the lethal effects of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*, v.26, n.2, p.207-213. 1988.

DOS SANTOS, M.C. Caracterização bioquímica e das atividades biológicas dos venenos variedades “amarela” e “branca” de *Crotalus durissus ruruima* (HOGE, 1965). 1993. 72f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

DUFRENE, Y.F.; HINTERDORFER, P. Recent progress in AFM molecular recognition studies. *Eur J Physiol*, v.256, p.237–245. 2008.

DUPRES, V.; VERBELEN, C.; DUFRENE, Y.F. Probing molecular recognition sites on biosurfaces using AFM. Review. *Biomaterials*, v. 28, p.2393–2402. 2007.

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, p. 1744-1750. 2007.

DUTRA, R.F.; KUBOTA, L.T. An SPR immunosensor for human cardiac troponin T using specific binding avidin to biotin at carboxymethyl-dextran-modified gold chip. *Clinica Chimica Acta*, v.376, p.114-120. 2007.

EL-SAYED, I.H.; HUANG, X.; EL-SAYED, M.A. Surface Plasmon Resonance Scattering and Absorption of anti-EGFR Antibody Conjugated Gold Nanoparticles in Câncer Diagnostics: Applications in Oral Cancer. *Nano Lett.*, v.5, n.5, p.829-834. 2005.

ERBA, I.E.D. et al. Poly(silsesquioxanes) derived from the hydrolytic condensation of organotrialkoxysilanes containing hydroxyl groups. *Journal of Organometallic Chemistry*, v. 686, p. 42-51. 2003.

ETIENNE, M.; WALCARIUS, A. Analytical investigation of the chemical reactivity and stability of aminopropyl-grafted silica in aqueous medium. *Talanta*, v.59, p.1173-1188. 2003.

FAKUNLE, E.S. et al. Evaluation of Screen-Printed Gold on Low-Temperature Co-Fired Ceramic as a Substrate for the Immobilization of Electrochemical Immunoassays. *Langmuir*, v. 22 p. 10844-10853. 2006.

FELDMAN, M.; MAINI, R.N. TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nature Medicine*, v. 9, n. 10, p.1245-1250, oct. 2003.

FURUKI, M. et al. Surface plasmon resonance sensors utilizing microfabricated microchannels. *Sensors and Actuators B*, v.79, p.63-69. 2001.

FUSCONI, M. et al. Etanercept and infliximab induce the same serological autoimmune modifications in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*, v.28, p.47–49. 2007.

GAU, V. et al. Electrochemical Molecular Analysis Without Nucleic Acid Amplification. *Methods*, v.37, n.1, p.73-83. 2005.

GARDNER, G.C. Inflammatory arthritis in the era of the biologics. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, v.5, p.19–44. 2005.

GENFA, L. et al. The screening and isolation of an effective anti-endotoxin monomer from Radix Paeoniae Rubra using affinity biosensor technology. *International Immunopharmacology*, v.5, p.1007–1017. 2005.

GIACOMELLI, C.E.; BREMER, M.G.E.G.; NORDE, W. ATR-FTIR Study of IgG Adsorbed on Different Silica Surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.220, p.13-23. 1999.

GOODING, J.J. et al. Electrochemical modulation of antigen-antibody binding. *Biosensors and Bioelectronics*, v.20, p.260-268. 2004.

GONG, J.L. et al. Ag/SiO₂ core-shell nanoparticle-based surface-enhanced Raman probes for immunoassay of cancer marker using silica-coated magnetic nanoparticles as separation tools. *Biosensors and Bioelectronics*, v.22, p.1501–1507. 2007.

GRONEWOLD, T.A. et al. Discrimination of Single Mutations in Cancer-Related Gene Fragments with a Surface Acoustic Wave Sensor. *Analytical Chemistry*, v.78, n.14, jul. 2006.

GRUNWALD, A. The case of nanobiotechnology. Towards a prospective risk assessment. *EMBO reports*, v.5, special issue, p.S32-S36. 2004.

GUERRIERI, et al. Electrosynthesized poly (pyrrole)/ poly (2-naphtol) bilayer membrane as an effective anti-interference layer for simultaneous determination of acetylcholine and choline by a dual electrode amperometric biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, v.21, p.1710 - 1718. 2006.

HAN, Y. et al. Surface activation of thin silicon oxides by wet cleaning and silanization. *Thin Solid Films*, v. 510, p.175 – 180. 2006.

HARNOIS, M. et al. Biological Species Detection Thanks Poly-Si SGFET. *Euro-Sensors*, 2006.

HERLEM, G. et al. Electrodeposition and characterization of silane thin films from 3-(aminopropyl)triethoxysilane. *Surface & Coatings Technology*, v.202, p.1437–1442. 2008.

HORNE, D.S. Casein structure, self-assembly and gelation. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, v.7, p. 456–461. 2002.

HU, W.P. et al. A novel ultrahigh-resolution surface plasmon resonance biosensor with an Au nanocluster-embedded dielectric film. *Biosensors and Bioelectronics*, v.19, p.1465-1471. 2004.

IRITI, M.; FAORO, F. Review of innate and specific immunity in plants and animals. *Mycopathologia*, v.164, p.57–64, 2007.

IUCCI, G. et al. Novel immobilizations of an adhesion peptide on the TiO₂ surface: An XPS investigation. *Materials Science and Engineering C*, v.27, p.1201-1206. 2007.

JACKSON, J.M. TNF- α inhibitors. *Dermatologic Therapy*, v.20, p.251-264, 2007.

JEFFERIS, R., LUND, J., GOODALL, M. Recognition sites on human IgG for Fc γ receptors: the role of glycosylation. *Immunology Letters*, v.44, p.111-117. 1995.

JENEWAY, C.A. et al. *Imunobiologia. O sistema imune na saúde e na doença*. 6 ed. São Paulo: Artmed. 2007. 824 pp.

JOHNSON & JOHNSON MEDICAL LIMITED. Mary Breda Cullen. Prediction and detection of wound infection. G01N 33/543, A61L 15/38, G01N 33/52. WO 2004/086043 A1. 26 mar. 2003, 07 oct. 2004. World Intellectual Property Organization. International Bureau. International Application Published under the Patent Cooperation Treaty (PCT).

JOHNSON, M.D.; WILKINS, R.G. Kinetics of the Primary Interaction of Pentacyanonitrosylferrate(2-) (Nitroprusside) with Aliphatic Thiols. *Inorganic Chemistry*, v. 23, n. 2, p.231-234. 1984.

JÖNSSON, U. et al. Real Time Biospecific Interaction Analysis Using Surface Plasmon Resonance and a Sensor Chip Technology. *BioTechniques*, v.11, n.5, p.620-627. 1991.

JOSHI, M. et al. A novel dry method for surface modification of SU-8 for immobilization of biomolecules in Bio-MEMS. *Biosensors and Bioelectronics*, v.22, p.2429–2435. 2007.

KIM, J-K. et al. Effects of polymer grafting on a glass surface for protein chip applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.33, p. 67-75. 2004.

KLIMIUK, P.A. et al. Serum cytokines in different histological variants of rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.*, v.28, n.6, p.1211-1217. 2001.

KRONQVIST, N. et al. A novel affinity protein selection system based on staphylococcal cell surface display and flow cytometry. *Protein Engineering, Design & Selection*, v.21, n.4, p. 247-255. 2008.

LAVAN, D.A; MCGUIRE, T.; LANGER, R. Small-scale systems for *in vivo* drug delivery. *Nature biotechnology*, v.21, n.10, p.1184-1191, out. 2003.

LAZCKA, O.; DEL CAMPO, F.J.; MUÑOZ, F. X. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, v.22, p.1205-1217. 2007.

LEE, C-K. et al. Atomic force microscopy: Determination of unbinding force, off rate and energy barrier for protein–ligand interaction. *Micron*, v. 38, p.446–461. 2007.

LEE, D.M.; WEINBLATT, M.E. Rheumatoid arthritis. *Lancet*, v.358, p.903–911. 2001.

LEVÄLAMPI T. et al. Etanercept and adalimumab treatment in patients with rheumatoid arthritis and spondyloarthropathies in clinical practice: adverse events and other reasons leading to discontinuation of the treatment. *Rheumatol Int*, v.28, p.261-269. 2008.

LIU, Y. et al. Quartz crystal biosensor for real-time kinetic analysis of interaction between human TNF-alfa and monoclonal antibodies. *Sensors and Actuators B*, v. 99, p. 416–424. 2004.

LOJOU, É.; BIANCO, P. Application of the electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices. *J. Electroceram.*, v. 16, p.79-91. 2006.

LOCKSLEY, R.M; KILLEEN, N.; LENARDO, M.J. The TNF and TNF Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian Biology. Review. *Cell*, v.104, p.487–501, feb. 2001.

LOVE, J.C. et al. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem Rev.*, v. 105, n.4, p.1103-1170. 2005.

MAALOUF, R. et al. Amperometric and impedimetric characterization of a glutamate biosensor based on Nafion® and a methyl viologen modified glassy carbon electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, v. xxx, p. xxx. 2006.

MARTI, J. et al. Inflammatory response in elderly patients with bacteremia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v.26, n.3, p.146-149, mar. 2008.

MEAGER, A. Measurement of cytokines by bioassays: Theory and application. *Methods*, v.38, p.237–252. 2006.

MENDES, R.K. Investigação dos Efeitos dos Procedimentos de Imobilização em Monocamadas Auto-Organizadas da Enzima Peroxidase no Desenvolvimento de um Biossensor. 2006. 107f. Tese (Doutorado em Ciências – Química Analítica). Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MENDES, R.K. Desenvolvimento de Biossensor para detecção precoce da ferrugem asiática da soja. Relatório de Atividades. FAPESP. São Paulo, 2008, 29 pp. Trabalho não publicado.

MESKINI, O. et al. Porous silicon as functionalized material for immunosensor application. *Talanta*, v.71, p.1430-1433. 2007.

MEUSE, C.W. Infrared Spectroscopic Ellipsometry of Self-Assembled Monolayers. *Langmuir*, v.16, n.24, p. 9483-9487. 2000.

MEYER, M.H.F; HARTMANN, M.; KEUSGEN, M. SPR-based immunosensor for the CRP detection—A new method to detect a well known protein. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 21, p. 1987–1990.2006.

MIYACHI, H. et al. Single nucleotide polymorphism typing on DNA array with hydrophobic surface fabricated by plasma-polymerization technique. *Biosensors and Bioelectronics*, v.20, p.184-189. 2004.

MIZOBE-ONO, L. Avaliação da Composição Protéica da Saliva nos Pacientes Irradiados na Cabeça e Pescoço. 2004.123f. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

MOORE, A. Brave small world. Biotechnology and nanotechnology may give rise to a completely new industry. *EMBO reports*, v.21. n.21, p.86-88. 2001.

MONTECUCCO, F. et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) induces integrin CD11b/CD18 (Mac-1) up-regulation and migration to the CC chemokine CCL3 (MIP-1 α) on human neutrophils through defined signalling pathways. *Cellular Signalling*, v.20, p. 557–568. 2008.

MUNUERA, C.; BARRENA, E.; OCAL, C. Scanning force microscopy three-dimensional modes applied to conductivity measurements through organic SAMs. *Nanotechnology*, v.18, 125505. 2007. 7pp.

MURPHY, R.M. et al. Size and Structure of Antigen-Antibody Complexes. Electron Microscopy and Light Scattering Studies. *Biophys. J.*, v.54, p.45-56, jul. 1988.

NELSON, D.L.; COX, M. M. *Lehninger Princípios de Bioquímica*. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 975 pp.

NOTINGHER, I.; SELVAKUMARAN, L.; HENCH, L.L. New detection system for toxic agents based on continuous spectroscopic monitoring of living cells. *Biosensors and Bioelectronics*, v.20, p.780-789. 2004.

OGASAWARA, T. et al. Raman and IR studies of the interaction between aerosol OT and polyaminopropylsiloxane. *Vibrational Spectroscopy*, v.20, p.189–194. 1999.

PALMA, K.; ZHANG, Y.; LI, X. An Importin Homolog, MOS6, Plays an Important Role in Plant Innate Immunity. *Current Biology*, v.15, p.1129–1135. 2005.

PEI, R. et al. Real-Time immunoassay of antibody activity in serum by surface plasmon resonance biosensor. *Talanta*, v.53, p.481-488. 2000.

PFEFFER, K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v.14, p.185-191, 2003.

PLUEDDEMANN, E.P. Silane Coupling Agents, *Plenum Press*, New York. 1991.

QINLIN, G.; XIANHUA, C. Micro/nanotribological studies of lanthanum-based thin films on phosphorylated 3-Aminopropyltriethoxysilane self-assembled monolayers. *Surface & Coatings Technology*, v. 202, p. 126–132. 2007.

REMICADE®: infliximabe. Rio de Janeiro: Schering-Plough, 2005. Bula de remédio.

REN, X. et al. Using silver nanoparticle to enhance current response of biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, v.21, p.433-437. 2005.

ROBERT, C., KUPPER, T.S. Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance. *N. Engl. J. Med.*, v.341, p.1817-1828, 1999.

ROSSOL, M. et al. The contact-mediated response of peripheral-blood monocytes to preactivated T cells is suppressed by serum factors in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, v. 7, n.6, p. 189-199. 2005.

SÁNCHEZ-PERNAUTE, O. et al. Epigenetic clues to rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity*, v.30, p.12-20. 2008.

SANDIN, S. et al. Structure and Flexibility of Individual Immunoglobulin G Molecules in Solution. *Structure*, v.12, p.409-415, mar. 2004.

SEZGINTÜRK, M.K.; GÖKTUG, T.; DINÇKAYA, E. A biosensor based on catalase for determination of highly toxic chemical azide in fruit juices. *Biosensors and Bioelectronics*, v.21, p.684-688. 2005.

SHANKARAN, D.R; GOBI, K.V.; MIURA, N. Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest. *Sensors and Actuators B*, v. 121, p.158–177. 2007.

SILVA, G.A. Neuroscience nanotechnology: progress, opportunities and challenges. *Nature Neuroscience*, v.7, p.65-74, jan. 2006.

SIMON, A. et al. Study of Two Grafting Methods for Obtaining a 3-Aminopropyltriethoxysilane Monolayer on Silica Surface. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.251, p.278-283. 2002.

SILBERZAN, P. et al. Silanation of Silica Surfaces. A New Method of Constructing Pure or Mixed Monolayers. *Langmuir*, v.7, p.1647-1751. 1991.

SKOOG, D.A; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. Tradução de Ignez Caracelli e colaboradores. Princípios de Análise Instrumental. 5 ed. São Paulo: Artmed, 2002. 836p.

SOKOLOV, K. et al. Real Time Vital Optical Imaging of Precancer Using Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Antibodies Conjugated to Gold Nanoparticles. *Cancer Research*, v.63, p.1999-2004, mai. 2003.

SRINIVAS, P. R.; BARKER, P.; SRIVASTAVA, S. Nanotechnology in Early Detection of Cancer. *Laboratory Investigations*, United States, v.82. n.5, p.657-662, mai. 2002.

STENBERG, E. et al. Quantitative-determination of surface concentration of protein with surface-plasmon resonance using radiolabeled proteins. *J. Coll. Interf. Sci.* v.143, p.513-526. 1991.

TKAC, J.; WHITTAKER, J.W; RUZGAS, T. The use of single walled carbon nanotubes dispersed in a chitosan matrix for preparation of a galactose biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, v.22, p.1820 - 1824. 2006.

TLILI, A. et al. A novel silicon nitride biosensor for specific antibody-antigen interaction. *Materials Science and Engineering C*, v.25, p.490-495. 2005.

TOWBIN, H.; GORDON, J. Immunoblotting and dot-immunobinding: current status and outlook. *Journal of Immunology Methods*, v.72, p.313-21. 1984.

TRACEY, D. et al. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 117, p. 244-279. 2008.

UKAJI, E. et al. The effect of surface modification with silane coupling agent on suppressing the photo-catalytic activity of fine TiO₂ particles as inorganic UV filter. *Applied Surface Science*, v.254, p.563-569. 2007.

ULMAN, A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chem. Rev.*, v.96, p.1533-1554. 1996.

VESTERGAARD, M. et al. Detection of Alzheimer's tau protein using localized surface plasmon resonance-based immuno-chip. *Talanta*, v.74, p.1038-1042. 2008.

VITICOLI, M. et al. Third-generation biosensors based on TiO₂ nanostructured films. *Materials Science and Engineering C*, v.26, p.947-951. 2006.

VORNHOLT, W; HARTMANN, M.; KEUSGEN, M. SPR studies of carbohydrate-lectin interactions as useful tool for screening on lectin sources. *Biosensors and Bioelectronics*, v.22, p.2983-2988. 2007.

WANG, H. et al. Label-free hybridization detection of a single nucleotide mismatch by immobilization of a molecular beacon on an agarose film. *Nucleic Acids Research*, v.30, n.12, e6. 2002. 9p.

WANG, J. From DNA biosensors to gene chips. *Nucleic Acids Research*, v.28 n.16, p.3011-3016. 2000.

WANG, J. Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics*, v.21, p.1887-1892. 2006.

WARE, C.F. The TNF superfamily-2008. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v.19, p.183-186, 2008.

WEI, F. et al. Monitoring DNA hybridization on alkyl modified silicon surface through capacitance measurement. *Biosensors and Bioelectronics*, v.18, p.1157-1163. 2003.

WILLNER, I.; BARON, R.; WILLNER, B. Integrated nanoparticle-biomolecule systems for biosensing and bioelectronics. *Biosensors and Bioelectronics*, v.22, p.1841-1852. 2007.

YANG, L; LI, Y. AFM and impedance spectroscopy characterization of the immobilization of antibodies on indium-tin oxide electrode through self-assembled monolayer of epoxysilane and their capture of *Escherichia coli* O157:H7. *Biosensors and Bioelectronics*, v.20, p.1407-1416. 2005.

YANG, X. et al. A fluorescent glucose biosensor based on immobilized glucose oxidase on bamboo inner shell membrane. *Biosensors and Bioelectronics*, v.21, p.1613-1620. 2006.

ZAVALA, G. Atomic force microscopy, a tool for characterization, synthesis and chemical processes. *Colloid Polym Sci*, v. 286, p.85–95. 2008.

ZOU, Y.; SUN, L-X; XU, F. Biosensor based on polyaniline–Prussian Blue/multi-walled carbon nanotubes hybrid composites. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 22, n.11, p. 2669-2674. 2007.

