UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

RODRIGO MATIAS TROLISE

Desenvolvimento de metodologia para funcionalizar superfícies de ouro com biomoléculas. Construção de biosensor para detecção de citocromo c.

São Paulo-SP

Data do Deposito na SPG:

09/11/2010

RODRIGO MATIAS TROLISE

Desenvolvimento de metodologia para funcionalizar superfícies de ouro com biomoléculas. Construção de biosensor para detecção de citocromo c.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Orientador: Prof. Dr. Mauricio da Silva Baptista

São Paulo-SP

2010

RODRIGO MATIAS TROLISE

Desenvolvimento de metodologia para funcionalizar superfícies de ouro com biomoléculas. Construção de biosensor para detecção de cit c.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Aprovado em:_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedico este trabalho a Romualdo e Rina

AGRADECIMENTOS

Especialmente à minha querida família, Tia Rina, Pai, Joelma e Rafa pela paciência e imenso apoio incondicional, acreditando sempre em mim. Sem vocês não teria conseguido. Obrigado meus queridos!

Ao Professor Maurício (Mau), pela confiança, credibilidade, companheirismo e amizade depositada em mim, desde a data de 26/02/2007, quando nos conhecemos. Obrigado Mau! Ganhei um orientador acadêmico e um amigo.

Ao Professor Bayardo (Mestrão) (IQ-USP) por ter confiado na minha capacidade, pelo convite da monitoria, por ter me ajudado a estudar para o exame de qualificação, sem o qual, não teria conseguido, e pelo principal; nossas conversas, me encorajando a acreditar em mim. Obrigado mestrão!

Aos Professores Iolanda (IQ-USP), Denise Zezell (IPEN-USP), Antônio (Toninho) (IF-USP), Koiti Araki (IQ-USP), pela colaboração e por cederem equipamentos e materiais para execução deste trabalho.

À minha Co-orientadora Carla Oliveira durante meus primeiros experimentos, sempre com grandes idéias e sugestões; e pela paciência, parceria e ensinamentos.

À querida Silvia por sua eficiência, disposição em sempre ajudar, pela confiança e nossas conversas. Obrigado Silvinha!

Ao meu grande amigo Vinicius pela parceria, confiança, paciência e por todos os momentos de alegrias e sofrimentos que passamos juntos durante o mestrado. Valeu irmão!

Aos antigos e atuais colegas de laboratório: Aaron, Adjaci, Alan, Alexandre Vieira, Alexandre Marques, Alice, Celine, Cintia, Christiane, Daiana, Daniela, Décio, Divino, Elisa, Helena, Mandela, Michelle, Orlando, Patrícia, Tathy, Thati Ferrer, Rhaisa, Roberta, e Suellen pela convivência, discussões, colaborações, cafezinhos e picolés.

Ao colega de trabalho Raphael Mantovani pela ajuda na formatação da dissertação com o software Microsoft Word.

Aos meus professores de Inglês da United Institute of English, que de certa forma, participaram do meu mestrado, contribuindo para que eu pudesse ler meus artigos: Bruna, Caio, Fabrício, Francisco, Hyron, Leonardo, Roberto e Steve. Thank you teachers!

À empresa Farma Service Bioextract Ltda. (Nestor) pela colaboração e fornecimento de materiais para meus experimentos.

Ao CNPq pelo apoio financeiro durante minha pós-graduação.

Tudo no Universo é Energia/Deus!!

Pergunte ao físico quântico, "Quem criou o Universo?"
E ele dirá: "A Energia". Ora, descreva Energia.
"Tudo bem: ela não pode ser criada nem destruída,
está sempre se transformando;
sempre foi e sempre tem sido tudo que o que sempre existiu."
Pergunte ao teólogo, "Quem criou o Universo?"
E ele dirá: "Deus". Ora, descreva Deus.
Tudo bem: ele não pode ser criado nem destruído,
é capaz de fazer tudo, e sempre se transformando;
está em todos os lugares ao mesmo tempo, é eterno."
Viu só? È a mesma descrição, mas com outra terminologia.

(John Hagelin, PhD. Físico Quântico e
Joe Vitale, PhD. Metafísico).

RESUMO

Trolise, R. M., **Desenvolvimento de metodologia para funcionalizar superfícies de ouro com biomoléculas. Construção de biosensor para detecção de citocromo c.** 2010, 126p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Instituto de Química – IQ, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo/SP.

Neste trabalho estão apresentadas novas estratégias para funcionalizar superfícies de ouro baseadas na sustentação de bicamadas lipídicas em superfícies de sensores de imagem por Ressonância de Plasmons de Superfície (SPRi) e a construção de um biosensor para detecção de citocromo c. SPRi é uma técnica ótica de gravimetria em tempo real. Por meio de medidas de variações de índice de refração (n) próximas a uma interface, a adsorção e desorção de moléculas podem ser mensuradas. Inicialmente testamos várias estratégias para encontrar um suporte adequado que se ligasse na superfície de ouro e que oferecesse sustentação e estabilidade para a bicamada de fosfolipídeo biotinilado. Estudos de FT-IR e MEV mostraram que a quitosana facilita a formação de uma bicamada íntegra de fosfolipídeos, de tal modo, que a mesma alcança valores de espessura próximos àqueles previstos, ~ 34,5 Å. Além disso, mostramos que esse sistema apresenta vantagens perante outros modelos, tais como, (poli-lisina/fosfolipídeos) e (tiol hidrofóbico/fosfolipídeo). Utilizando-se o complexo químico biotina/estreptoavidina conseguimos imobilizar o anticorpo anti cit c na bicamada, mantendo-o afastado da superfície de ouro. A construção do biosensor foi acompanhada com experimentos de SPRi. O limite de detecção de citocromo c atingido foi de 10^{-11}mol/L. Um sensor construído somente com BSA e anticorpo anti cit c apresentou sensibilidade

semelhante. Esta sensibilidade é em torno de três ordens de grandeza superior aos experimentos de imunoblotting usualmente utilizados para detecção de cit c. A principal limitação deste biosensor, tal como de outros imunoensaios, está intimamente ligada às vantagens e desvantagens dos anticorpos como ferramentas analíticas.

Palavras Chaves: Citocromo c, quitosana, fosfolipídeos, biosensores, ressonância de plasmons de superfície, limite de detecção.

ABSTRACT

Trolise, R. M., **Development of methodology to functionalize gold surfaces with biomolecules. Construction of biosensor for detection of cytochrome c.** 2010, 126p. Master's Thesis – Graduate Program in Biochemistry, Instituto de Química-IQ, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo/SP.

In this work we developed new strategies to functionalize gold surfaces based on the support of lipid bilayers on the surfaces of surface plasmon resonance imaging sensors (SPRi) and the construction of a biosensor for detection of cytochrome c. SPRi is an optical gravimetric real time technique. Through measurements of changes in refractive index (n) in close proximity to an interface, the adsorption and desorption of molecules can be measured. Initially we tested several strategies for finding a suitable medium that would adsorb on the gold surface and also support and stabilize a biotinylated phospholipid bilayer. Studies of FT-IR and SEM showed that chitosan induces the formation of an intact phospholipid bilayer, so that it reaches thickness values close to those expected, ~ 34.5 Å. Furthermore, we showed that this system has advantages in relation to other models, such as (poli-lisine/phospholipids) and (thiol hydrophobic / phospholipid). Using the chemical complex biotin/streptavidin anti cyt c antibody could be immobilized in the bilayer, keeping it away from the gold surface. The construction of the biosensor was accompanied with SPRi experiments. The limit of detection of cytochrome c was achieved from 10^{-11}mol / L. A sensor built only with BSA and anti cyt c showed similar sensitivity. This sensitivity is about three orders of magnitude higher than the immunoblotting experiments commonly used for detection of cyt c. The main

limitation of this biosensor, like in other immunoassays, is linked to the advantages and disadvantages of antibodies as analytical tools.

Key words: Cytochrome c, chitosan, phospholipids, biosensors, surface plasmon resonance, limit of detection.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM – *Atomic Force Microscopy*, Microscopia de Força Atômica

Ag-Ac – antígeno-anticorpo

anti cit c - anti citocromo c

BSA – *Bovine Serum Albumin*, Albumina de Soro Bovino

c – velocidade da luz

CCD – *Charge Coupled Device*, Dispositivo de Carga Acoplado

cit c - citocromo c

cmc – concentração micelar crítica

d – espessura

DMSO – Demetil Sulfóxido

dn/dc - *refractive index increment;* variação no índice de refração em função da concentração

DNA – *Deoxyribonucleic Acid*, Ácido Deoxirribonucléico

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, Ensaios de imunoabsorção enzimática

EMIT – *Enzyme Multiplied Immuno Technique*, Técnica de imunomultiplicação enzimática

Fe – átomo de ferro

FEG – *Field Emmition Gun*, Emissão de campo eletromagnético

FIG-SPR - *flow injection gradient-surface plasmon resonance;* gradiente por injeção de fluxo em ressonância plasmons de superfície

FI-IAs – Flow Injection-Immuno Assays – Injeção em fluxo acoplado a imunoensaios

FT-IR – *Fourier Transformed – Infra Red*, Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

GD 80% - Grau de Desacetilação em 80%

HBM – *Hybrid Bilayer Membrane,* Bicamada de Membrana Híbrida

Heme – grupo prostético que consiste de um átomo de ferro no centro de um anel orgânico

His 18 – aminoácido histidina

IgG – anticorpo imunoglobulina

k – constante estatística

KBr – Brometo de Potássio

k_{ev} - vetor de onda do fóton paralelo ao plano de incidência

k_{sp} - vetor de onda do fóton que excita os elétrons livres da superfície

LB – Langmuir-Blodgett

l_d – decaimento exponencial

LED – *Light Emmiting Diode*, Diodo Emissor de Luz

LOD – *Limit of Detection*, Limite de Detecção

m – coeficiente angular da reta

M – Molar

MCD – *Magnetic Circular Dichroism*, Dicroísmo Magnético Circular

Met 80 – aminoácido metionina

mL/min – mililitros por minuto

mM – milimolar

N – átomo de nitrogênio

n_a – índice de refração do analito (adsorbato)

n_b – índice de refração da solução tampão

N-Biotinil PE – *1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethalonamine*, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletalonamina

n_{eff} – índice de refração obtido após associação/dissociação de um composto, em relação à linha base

ng/mm^2 – nanograma por milímetro quadrado

nM – nanomolar

n_p - índice de refração do prisma

PAMAM – *Polyamidoamine*, Poliamidoamina

PG – *L-α-phosphatidylglycerol*, L-α-Fosfatidilglicerol

pH – potencial hidrogênionico. Essa grandeza indica acidez, alcalinidade ou neutralidade de uma solução

PI – ponto isoelétrico

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SAMs – *Self Assembled Monolayer*s, Monocamadas Auto-Montadas

S_b – desvio padrão da curva

SPR – *Surface Plasmon Resonance*, Ressonância de Plasmons de Superfície

SPRi – *Surface Plasmon Resonance Imaging,* Ressonância de Plasmons de Superfície por Imagem

SUV – *Small Unilamellar Vesicles*, Vesículas Unilamelares Pequenas

Å – Angstrom

T_m – Temperatura de transição

Γ – quantidade de material adsorvido

%ΔR – variação de refletividade

Δ(%R)/Δn – variação de refletividade em função do índice de refração

ε_a – constante dielétrica da água

ε_m – constante dielétrica do metal

θ – ângulo de incidência do feixe luminoso

θ_{SPR} - ângulo incidente do feixe luminoso no qual ocorre a ressonância de plasmons de superfície

λ_{inc} - comprimento de onda da luz incidente pelo equipamento

μL – microlitros

μM – micromolar

ω - freqüência da luz incidente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16

1.1 CITOCROMO C E O PROCESSO DE APOPTOSE. 16
1.2 MÉTODOS DE DETECÇÃO E APLICAÇÕES BIOQUÍMICAS EM IMUNOENSAIOS 18
1.3 BIOSENSORES 21
1.4 MÉTODO DE DETECÇÃO ÓPTICO POR RESSONÂNCIA DE PLASMONS DE SUPERFÍCIE (SPR) – HISTÓRICO E PRINCÍPIOS 23
1.5 INSTRUMENTAÇÃO 28
1.6 MÉTODOS DE FUNCIONALIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES DE OURO 30
1.7 FOSFOLIPÍDEOS AUTO-ASSOCIADOS COMO MODELOS MIMÉTICOS DE MEMBRANAS E PARA IMOBILIZAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS 34

2 OBJETIVOS 38

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: 38

3 MATERIAIS E MÉTODOS 39

3.1 EQUIPAMENTO DE SPRI E CALIBRAÇÃO DO BIOCHIP 39
3.2 ADAPTAÇÃO DO INJETOR MANUAL NO SISTEMA EM FLUXO 40
3.3 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS NA CONSTRUÇÃO DO BIOSENSOR 41
3.3.1 Soluções Tampão 41
3.3.2 Solução Piranha 42
3.3.3 Solução de Quitosana 42
3.3.4 Solução de BSA (Albumina de Soro Bovino) 43
3.3.5 Solução de Estreptoavidina 43
3.3.6 Solução de Anti Cit c biotinilado 43
3.3.7 Solução de Cit c 44
3.3.8 Solução e protocolo de preparo dos lipossomos de glicerofosfolipídeos 45
3.4 ESTUDO DA ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS NA SUPERFÍCIE DE OURO 47
3.4.1 Desenvolvimento de uma superfície de ouro ultrafina sobre lamínulas de vidro 47
3.4.2 Protocolo de preparação das pastilhas KBr de quitosana e fosfolipídeos para medidas em FT-IR 48
3.4.3 Protocolo de análises qualitativas de adsorção de quitosana em lamínulas de ouro por FT-IR e MEV 49
3.4.4 Protocolo de verificação das interações entre a quitosana e os fosfolipídeos por FT-IR 51
3.4.5 Protocolo de análises quantitativas de adsorção de quitosana em lamínulas de ouro, e lipossomos sobre quitosana por SPRi 52
3.5 PROTOCOLO PARA A FORMAÇÃO DA CAMADA DE ESTREPTOAVIDINA LIGANDO-SE A BIOTINA MARCADA NOS FOSFOLIPÍDEOS 53
3.6 LIGAÇÃO DO ANTICORPO ANTI CIT C, MARCADO COM BIOTINA, NA ESTREPTOAVIDINA 53
3.7 ASSOCIAÇÃO DO ANTÍGENO CIT C COM O ANTICORPO ANTI CIT C POR SPRI 54
3.8 ESTIMATIVA DO LIMITE DE DETECÇÃO DE CIT C POR SPRI, COM BLINDAGEM DA SUPERFÍCIE DE OURO COM BSA, SEM O SENSOR DE MEMBRANA 55
3.9 CÁLCULO DA SENSIBILIDADE DO SENSOR E ESTIMATIVA DO LIMITE DE DETECÇÃO (LOD) 56
3.10 CÁLCULO DE ESPESSURAS DAS CAMADAS E QUANTIDADE DE MATERIAL ADSORVIDO .. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 59

4.1 OBTENÇÃO DE UM SUPORTE HIDROFÍLICO, COM BASE NA MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE COM BIOPOLÍMERO 59
4.2 FORMAÇÃO DE CAMADAS FOSFOLIPÍDICAS SOBRE UMA SUPERFÍCIE DE OURO MODIFICADA: UM SISTEMA MIMÉTICO DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS 65
4.3 ESTUDO DA ADSORÇÃO E DESORÇÃO DE ESTREPTOAVIDINA EM FOSFOLIPÍDEOS MARCADOS COM BIOTINA 71
4.4 IMUNOSENSOR ANTI CIT C, MARCADO COM BIOTINA, IMOBILIZADO POR ESTREPTOAVIDINA 75
4.5 ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DO ANTÍGENO CIT C, COM SENSOR DE MEMBRANA, CONTENDO ANTICORPO ANTI CIT C LIGADO ATRAVÉS DA INTERAÇÃO BIOTINA/ESTREPTOAVIDINA 77
4.6 BIOSENSOR ALTERNATIVO CONSTRUÍDO PELA INTERAÇÃO ELETROSTÁTICA DE ANTI CIT C COM BSA 85

5 CONCLUSÕES FINAIS 96

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 98

SÚMULA CURRICULAR 111

1 INTRODUÇÃO

1.1 Citocromo c e o processo de apoptose.

O citocromo c (cit c) é uma proteína globular, composta por uma cadeia polipeptídica única de 104 resíduos de aminoácidos e um grupo heme, com as cadeias laterais de Histidina (His 18) e Metionina (Met 80) ligadas covalentemente ao átomo de ferro (Fe) (figura 1). O heme é um grupo prostético constituído por uma parte orgânica e pelo átomo de ferro (Fe), que se liga ao anel porfirínico através de nitrogênios (N). Esta unidade não polipeptídica é essencial para a atividade do cit c, pois o ferro é o seu componente redox. Localizado na periferia da membrana mitocondrial interna, o cit c participa da cadeia de transporte de elétrons, transportando-os do Complexo III ao Complexo IV. (Voet et al., 2008). Além disso, a liberação do cit c da membrana mitocondrial interna para o citosol é uma parte importante do processo de morte celular programada (Green & Reed, 1998). O interesse do grupo em entender os processos que levam a apoptose celular, trouxe a motivação principal deste trabalho, e a oportunidade de desenvolver uma nova metodologia para detectar citocromo c.

Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de melhor compreender a interação entre o citocromo c e os fosfolipídios aniônicos presentes na membrana interna da mitocôndria. Nesses estudos destaca-se a espectroscopia no infravermelho (FT-IR) (Choi & Swanson, 1995), ressonância de plasmons de superfície (SPR) (Salamon & Tollin, 1996; Suraniti et al., 2007), ressonância magnética nuclear (RMN) (Pinheiro, Duer & Watts, 1997), dicroísmo circular magnético (MCD) (Nantes et al., 2001) e Microscopia de Força Atômica (AFM) (Dufrene & Lee, 2000). Há diferentes formas de associação entre o cit c e

membranas constituídas de fosfolipídios aniônicos: interação eletrostática, pontes de hidrogênio, interação hidrofóbica resultante da inserção parcial de cit c no interior da membrana (Salamon & Tollin, 1996). O ponto Isoelétrico (pI) do cit c é 9,6 e em pH fisiológico possui oito cargas positivas (Rytomaa et al., 1992).

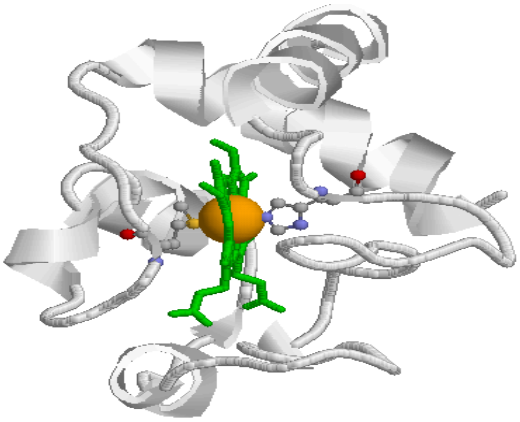

Figura 1 - Estrutura espacial da molécula de citocromo c de coração equino*. A localização do grupo heme pode ser observada, bem como as cadeias laterais de His 18 e Met 80, que estão ligadas ao átomo de ferro (ilustração do Protein Data Bank).*

A apoptose (figura 2) é um processo de morte programada de células, em que seu o ambiente interno sofre uma degradação controlada. Um dos principais eventos no curso da apoptose é a liberação do cit c da mitocôndria para o citosol. A associação do cit c com a proteína peptidase Apaf-1 resulta na formação de um complexo protéico (apoptossomo) o qual recruta e ativa a proteína caspase-9, iniciando e/ou amplificando o processo de apoptose (Green & Reed, 1998) e (Hu et al., 1999). O cit c é uma proteína muito estudada, e o mecanismo subjacente, à sua liberação, é assunto de intensa investigação e de considerável controvérsia (Petronilli et al., 2001). Quantificar precisamente a concentração de cit c liberado é um dos parâmetros que definem o perfil de viabilidade e morte celular. *No entanto, não há ainda métodos precisos, que possibilitem estudos quantitativos da liberação de cit c, em diferentes etapas da evolução do ciclo de vida e morte celular.*

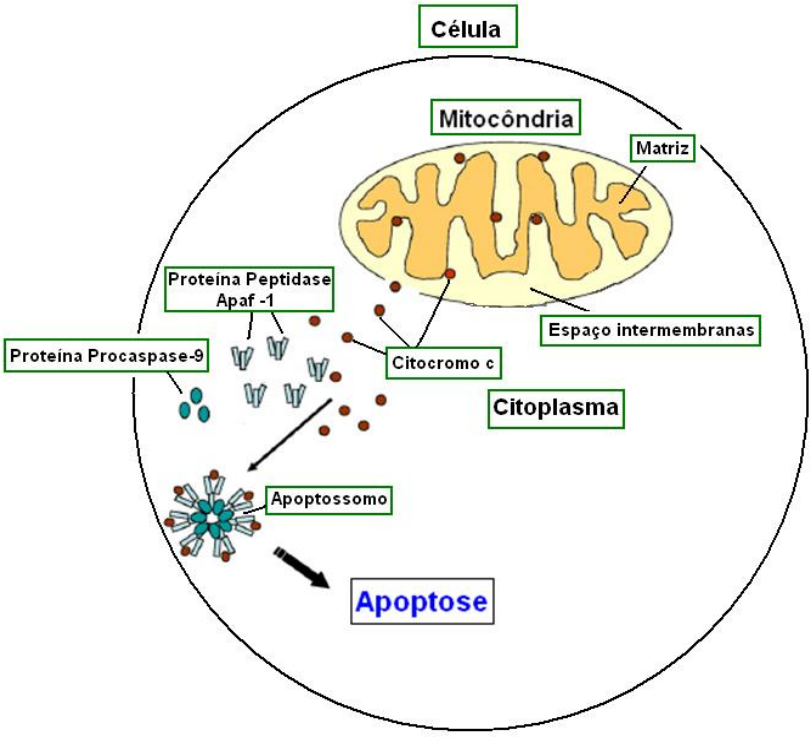

Figura 2 – Esboço resumido do processo de apoptose*. Observa-se a associação das proteínas cit c, peptidase Apaf-1 e caspase-9, formando o complexo protéico (apoptossomo). Nessa ilustração não estão presentes todos os componentes e fases do processo de morte celular programada.*

1.2 Métodos de detecção e aplicações bioquímicas em imunoensaios

Uma das primeiras técnicas imunoanalíticas descritas foi a imunopreciptação. Trata-se de técnica semiquantitativa, que vem sendo usada até hoje em testes de resultado negativo ou positivo. O radioimunoensaio constituiu-se num grande avanço no campo de imunoensaios quantitativos, seguido pelo surgimento de imunoensaios enzimáticos como ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assays), EMIT (Enzyme Multiplied Immuno Technique) e Western Blott tendo enzimas como meio alternativo de detecção (Shen et al., 1997). Outros avanços como o desenvolvimento de sistemas de injeção em fluxo acoplados a imunoensaios (FI-IAs), imunosensores e cromatografia por imunoafinidade complementam os esforços empregados até aqui,

no aperfeiçoamento e utilização de imunoensaios aplicados à bioquímica analítica (Makower et al., 1997).

O fator mais marcante em imunoanálises é o ganho em seletividade, dada a grande especificidade de anticorpos por seus antígenos. De maneira geral, além da seletividade, os imunoensaios apresentam, também dependendo do marcador e ou método de detecção empregado, boa sensibilidade e reprodutibilidade. Entre as principais desvantagens encontradas nos métodos convencionais de imunoanálises estão à significativa complexidade associada a sua automação e longo tempo de análise (Krishnan et al., 1996).

Neste sentido, a fusão de imunoensaios clássicos com outras metodologias analíticas constitui-se numa saída para superar estas desvantagens e se expressa no desenvolvimento e aperfeiçoamento de imunosensores, FI-IAS e cromatografia por bioafinidade (Jackson et al., 1986).

Anticorpos podem ser utilizados como reagentes altamente seletivos, não somente em imunoensaios, mas também, em diversos tipos de biosensores. Enquanto em eletrodos enzimáticos ou baseados em microrganismos, são monitorados concentrações de substratos ou produtos; os imunosensores são baseados nos princípios de fase sólida de imunoensaios e nos eventos físico-químicos resultantes da interação antígeno-anticorpo (Ag-Ac) (Santandreu et al., 1997).

A associação entre os anticorpos e seus antígenos envolve forças de van der Waals, interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e interações iônicas. Suas constantes de dissociação variam de 10^{-4} a 10^{-10} M, comparáveis em força (ou superiores) às associações entre enzimas e os seus substratos. A especificidade e a

afinidade de um complexo antígeno-anticorpo são decorrentes da excelente complementaridade estrutural entre o antígeno e o anticorpo (Voet, D. et al., 2008).

Uma das limitações dos imunosensores é o fato de que a interação Ag-Ac não é prontamente reversível, em contraste com muitos biosensores baseados em enzimas onde ocorre um evento catalítico. Este fato pode ser contornado utilizando-se anticorpos de baixa afinidade ou agentes capazes de provocar dissociação do complexo Ag-Ac. Nos imunosensores são detectadas as concentrações de anticorpo ou antígeno, tanto por mudanças diretas no transdutor, quanto por deslocamento no equilíbrio de reações (imunoensaios típicos) (Davies et al., (1993) e Brecht et al., (1995)).

Na detecção de cit c, os dois principais transdutores empregados, são os eletroquímicos (amperométricos, potenciométricos, condutométricos), e os ópticos (ressonância de plasmons de superfície, espectroscopia de interferência reflectométrica) (Reeves et al., (1994) e Medyantseva et al., (1996)). O primeiro devido à sua simplicidade, torna-se uma rota de sucesso para criar biosensores de baixo custo, quando acoplados a enzimas, no entanto, a detecção eletroquímica de uma imunoreação é difícil. Enzimas que levam a formação de substâncias eletroativas são necessárias. Essas configurações de imunosensores são conhecidas como imunoensaios eletroquímicos (Green, M. J. et al., 1987). O segundo é baseado na adsorção ou emissão de luz pelos imunoreagentes. Os primeiros desenvolvimentos desses tipos de sensores aproveitaram a flexibilidade e baixo custo de fibras ópticas. Imunosensores de fibra óptica consistem geralmente em um fio de fibra óptica com uma camada de sensoriamento adequado na ponta distal da fibra. A luz viaja ao longo da fibra óptica por reflexão interna total até a camada de interação dos imunoreagentes, onde ocorre detecção através de

mudanças de absorção, luminescência, polarização ou índice de refração (Ligler, F. S., (1993); Agayn, V. & Walt, D. R., (1993)).

Devido à importância do papel do citocromo c no processo de apoptose, muitos esforços têm sido realizados, com o intuito de se definir um método analítico específico, sensível e simples para execução de imunoensaios com cit c. Através de monocamadas automontadas modificadas com grupos carboxilas, utilizando microbalança de cristal de quartzo, Li et al., (2005) apresentou resultados de imunoensaios detectando cit c com um LOD (Limite de Detecção – do inglês Limit of Detection) de 1,19 x 10^{-9} M. Yaxiong & Wanzhi (2008) fizeram uso de espectroscopia de impedância eletroquímica, onde alcançaram um LOD de 5,0 x 10^{-8} M. Portanto, a literatura tem mostrado através de imunoensaios, que monitorar a concentração de cit c, liberado em sistemas biológicos complexos, é de grande importância para o estudo do mecanismo da apoptose.

1.3 Biosensores

Um biosensor é um tipo específico de sensor químico constituído de um elemento biológico de reconhecimento e um transdutor físico-químico, frequentemente um dispositivo eletroquímico ou óptico. O elemento biológico é capaz de reconhecer a presença e atividade e/ou concentração de um determinado analito em solução. O reconhecimento pode ser tanto decorrente de uma reação de *biocatálise* quanto um *processo de ligação não covalente* (biosensor baseado em afinidade), quando o elemento de reconhecimento é, por exemplo, um anticorpo, segmento de DNA ou receptores celulares (Sundberg et al., 2006). A interação do elemento de reconhecimento com um analito alvo resulta na mudança mensurável

em uma determinada propriedade do dispositivo. O transdutor então converte a mudança de propriedade da solução em sinal elétrico. Vários modos de transdução foram desenvolvidos, incluindo eletroquímico, enzimático, termoquímico e óptico (Burtis et al., 2008). A presente discussão será focada aos biosensores baseados em modos de transdução ópticos e de reconhecimento por especificidade.

Biosensores de interação específicas consistem em uma classe especial de biosensores em que os elementos de reconhecimentos biológicos imobilizados são obrigatoriamente proteínas, anticorpos (imunosensores) ou oligonucleotídeos (p. ex., DNA, RNA) com alta afinidade e especificidade para um analito. Esses sensores foram desenvolvidos como alternativa aos ensaios convencionais para aumentar a velocidade e a conveniência de um vasto número de testes que seriam normalmente executados em analisadores de imunoensaio sofisticado. De maneira ideal, a ligação direta entre a espécie imobilizada e o respectivo alvo em uma amostra deve produzir um sinal proporcional à concentração do analito. No entanto, o sensoriamento “direto” em concentrações de analito que cobrem toda a gama de aplicações bioquímicas é muito difícil de alcançar. Além disso, a grande afinidade de tais reações de ligação, necessária para atingir a sensibilidade ótima, também limita a reversibilidade destes dispositivos. Assim sensores ópticos baseados em afinidade, são tipicamente dispositivos de aplicação única, evitando, assim, a necessidade de alguma etapa de regeneração (mudança de pH etc.) para a dissociação da ligação forte entre o elemento de reconhecimento e o alvo. Na maioria dos biosensores ópticos, é necessário utilizar moléculas fluorescentes como transdutores, restringindo a aplicação dos mesmos (Burtis et al., 2008).

1.4 Método de detecção óptico por Ressonância de Plasmons de Superfície (SPR) – histórico e princípios

Os primeiros trabalhos sobre Plasmons de Superfície foram documentados no início do século XX (1902), quando o físico Wood (1902), observou faixas estreitas e escuras de feixes luminosos irradiados sobre superfícies metálicas. Estas faixas foram referidas por ele como irregularidades associadas a ondas eletromagnéticas excitadas na superfície de uma rede de difração (Homola, 2006).

Otto (1968), Kretschmann & Raether (1968), precursores nos estudos de SPR, observaram que quando um feixe de luz monocromática é incidido sobre uma superfície fina metálica em configuração de reflexão total atenuada, nota-se a diminuição da reflexão da luz. Esse fenômeno foi então associado à excitação de plasmons na superfície metálica (figura 3).

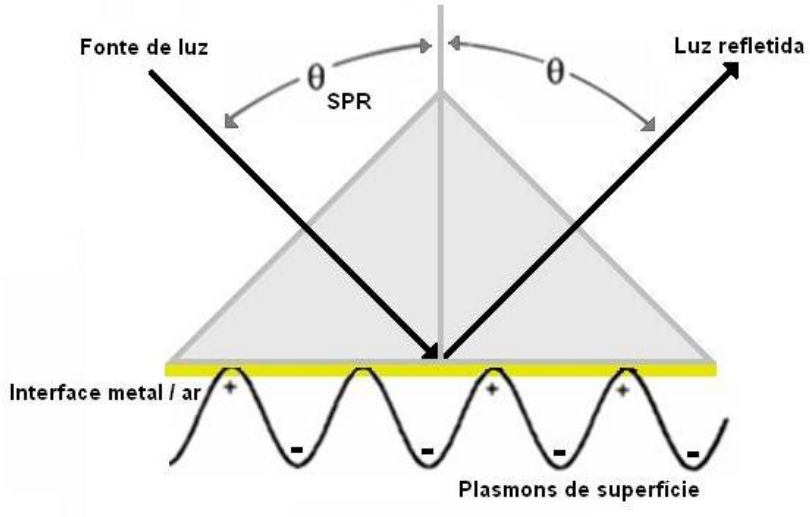

Figura 3 *–* ***Geração de plasmons de superfície utilizando a configuração de Kretschmann, com reflexão total atenuada.*** *O filme metálico, de ouro ou prata, é evaporado diretamente no prisma de vidro ou quartzo, e os plasmons são excitados do outro lado desse filme. Θ é o ângulo onde se observa o efeito ou ângulo de SPR.*

No intuito de explicar o fenômeno de excitação de plasmons de superfície, é necessário definir termos como reflexão total e ângulo de SPR crítico. Ilustremos uma situação em que uma fonte de luz monocromática (lasers ou LEDs) e p-polarizada (seu componente vetor-elétrico é paralelo ao plano de incidência) atinge uma interface do tipo ar-água. Quando isso ocorre, parte da luz é refletida e parte é refratada. O aumento do ângulo de incidência acarreta aumento no ângulo de refração, que ao alcançar 90º indica uma refração tangente a interface. Os ângulos acima deste ângulo de refração tangencial são denominados ângulos de reflexão total (Kretschmann et al., 1968).

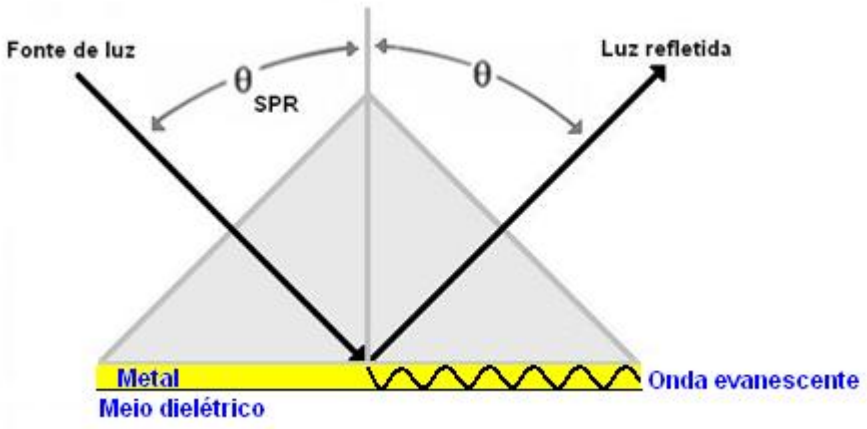

Figura 4 – ***Onda evanescente gerada pela interação de feixes luminosos com os elétrons livres do ouro.*** *Filme metálico de 50 nm de espessura evaporado diretamente no prisma. O meio ar-água pode ser considerado um dielétrico.*

Em certos ângulos de incidência, os elétrons livres do metal (ouro) oscilam e absorvem energia luminosa, gerando ondas evanescentes que se propagam paralelamente à interface do metal com o meio dielétrico (figura 4). Portanto, ocorrerá a excitação de plasmons de superfície, se um metal for colocado na interface com um meio dielétrico e se a fonte luminosa for monocromática e p-polarizada. A ressonância de plasmons de superfície será detectada pela diminuição

na intensidade da luz refletida. O ângulo que ocorre essa interação é chamado de ângulo de SPR (Kretschmann et al., 1968).

O princípio da técnica de SPR é baseado no fato que as propriedades ópticas da interface afetam o ângulo de SPR (θ_{SPR}). Quando o feixe luminoso alcança a interface entre os meios indicados na figura 5, ocorre à formação de uma oscilação de densidade de carga superficial, que é associada com uma onda eletromagnética, cujo vetor do campo é máximo na superfície e decai exponencialmente com a distância (campo evanescente), podendo assim afetar e "sentir" as regiões próximas à interface (Homola, J., 2006).

Hanken et al., (1998) descreveu que o vetor de onda do campo evanescente no plano de incidência é dado pela equação 1 (Jung et al., 1998):

$$k_{ev} = n_p \left(\frac{\omega}{c} \right) sen\theta \qquad (1)$$

onde k_{ev} é o vetor de onda do fóton paralelo ao plano de incidência, n_p é o índice de refração do prisma, θ é o ângulo de incidência no prisma, ω é a freqüência da luz incidente, c é a velocidade da luz. A dispersão dos elétrons superficiais numa determinada interface metal-meio dielétrico (ar ou água) é dada pela equação 2 (Jung et al., 1998) :

$$\omega = ck_{sp} \sqrt{\left(\frac{1}{\varepsilon_m} \right) + \left(\frac{1}{\varepsilon_a} \right)} \qquad (2)$$

onde k_{sp} é o vetor de onda do fóton que excita os elétrons livres da superfície (induz *plasmon*), ε_m e ε_a são as constantes dielétricas do metal e do meio dielétrico em contato com o ouro (ar ou água), respectivamente. É importante ressaltar que para ocorrer a ressonância de plasmons é necessário que os dois meios da interface

tenham constantes dielétricas (ε) de sinais opostos (como o ouro, de sinal negativo, e a água, de sinal positivo). Quando k_{ev} se iguala a k_{sp}, o campo elétrico entra em ressonância com os elétrons livres da superfície metálica (daí o nome de ressonância de *plasmons*) e *plasmons* de superfície são criados, aumentando a intensidade do campo evanescente (figura 5) (Hanken et al.,1998).

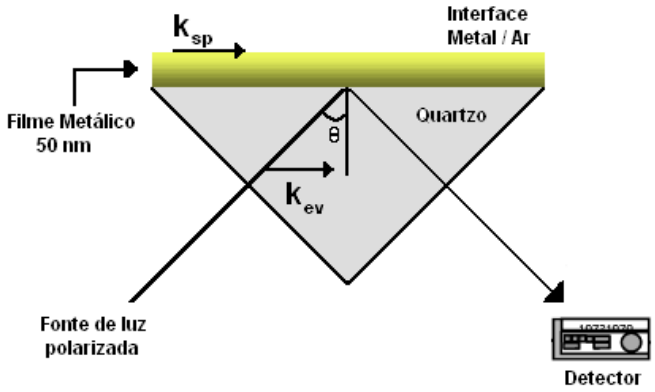

Figura 5 – Fenômeno de excitação de plasmons de superfície. *Quando k_{sp} se iguala a k_{ev}, o campo elétrico entra em ressonância com os elétrons livres da superfície metálica (daí o nome de ressonância de plasmons) e plasmons de superfície são criados. (figura adaptada de Hanken et al., 1998).*

A intensidade da onda evanescente decai exponencialmente com a distância da superfície de ouro (figura 6), sendo que a sua extensão de decaimento (l_d) varia conforme o sistema que está sendo analisado e é aproximadamente 25 a 50% do comprimento de onda da luz incidente (λ_{inc}) (Liedberg, Lundstrom & Stenberg, 1993). O cálculo desse decaimento, obtido em nm, é dado pela equação 3 (Jung et al., 1998), onde (λ_{inc}) é o comprimento de onda da luz incidente pelo equipamento, (n_{eff}) é o valor de índice de refração obtido após associação/dissociação de um composto, em relação a linha base e (ε) é a constante dielétrica do ouro (23,124) (Kukanskis et al., 1999) ou de outro metal utilizado. Em equipamentos comerciais, o (λ_{inc}) é cerca de 600 – 850nm, que resultam em valores de (l_d) da ordem de 260nm.

$$l_d = \left(\frac{\lambda}{2\pi}\right) / \left[\frac{-n_{eff}^4}{(n_{eff}^2 + \varepsilon_{metal})}\right]^{1/2} \qquad (3)$$

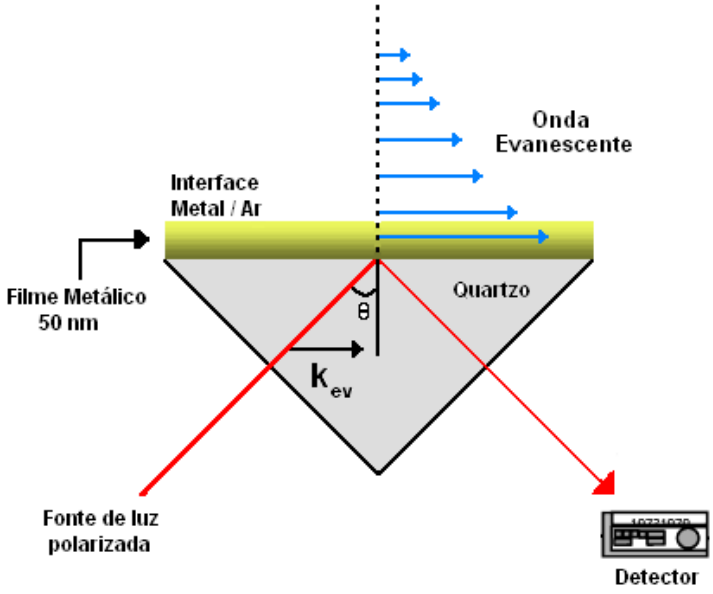

Figura 6 – Decaimento exponencial da onda evanescente a partir da superfície metálica (I_d). *A extensão desse decaimento pode ser estimado pela equação 3.*

A posição do ângulo em que ocorre o máximo de ressonância depende do índice de refração do meio que está em contato com o metal, e varia proporcionalmente com a concentração de moléculas na região de propagação da onda evanescente (figura 6). Portanto, SPR pode ser uma ferramenta útil para detectar a associação e a dissociação de biomoléculas em tempo real e sem a necessidade de um sistema de revelação, funcionando como uma balança óptica (figura 7). Essa ausência de um sistema de revelação no estudo de interação entre biomoléculas é uma vantagem da técnica de SPR sobre outras de imunoensaios tais como: ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) e *Western Blott*. Se o índice de refração imediatamente acima da superfície do metal sofre alguma alteração, pela adsorção de qualquer molécula, uma mudança no ângulo de SPR é observada através do monitoramento deste ângulo, em que pode-se quantificar a adsorção de moléculas em função do tempo. (Homola et al., 2006). Embora SPR tenha sido utilizado para desenvolver diversos tipos de sensores, não há relatos na literatura de desenvolvimento de sensores para detectar cit c. (Homola et al., 2006).

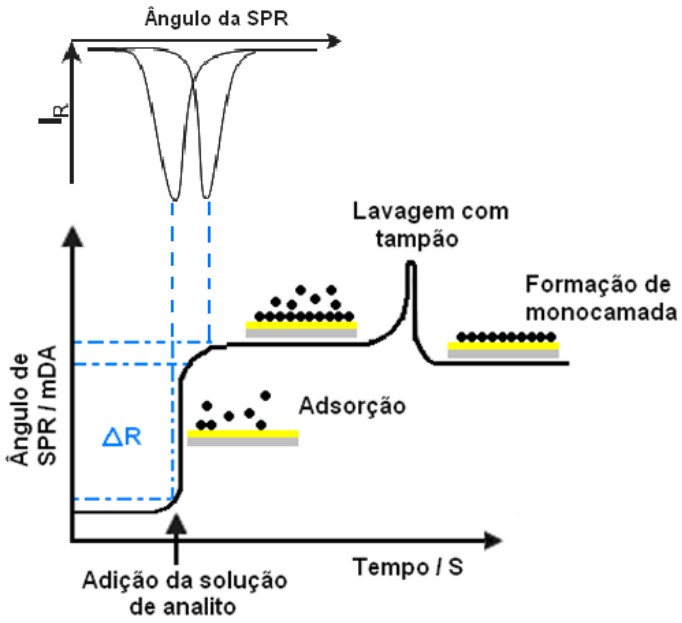

Figura 7 – Respostas obtidas no equipamento de SPR. *Variação da Reflectância em função do ângulo de (SPR_A). A mudança no valor do ângulo do SPR em função do tempo é usada para monitorar as cinéticas de adsorção. IR é intensidade de radiação refletida (reflexibilidade) e mDA - miligraus de ângulo (do inglês "millidegree of angle"). (Adaptado de Jung et al., 2000).*

1.5 Instrumentação

Os componentes fundamentais de um equipamento de SPR são uma fonte luminosa polarizada, um prisma com filme metálico em um das faces e um fotodetector. A maioria dos instrumentos mede a intensidade de luz refletida em função do ângulo de incidência. Embora a maioria dos trabalhos disponíveis na literatura mostre o monitoramento da refletividade da luz em um único comprimento de onda e em função do ângulo de incidência, pode-se monitorar também a refletividade em função da variação do comprimento de onda, fixando-se o ângulo de incidência (Hanken et al., 1998).

Em alguns equipamentos de SPR utilizam-se uma câmera CCD ao invés de fotodiodo, com o objetivo de se obter imagens da superfície (Grosjean et al., (2005); Cherif et al., (2006); Bouffartigues et al., (2007); Suraniti et al., (2007)). O CCD, ou

dispositivo de carga acoplado, é formado por um circuito integrado contendo capacitores acoplados sensíveis à luz, os quais são controlados por um circuito externo. A exibição dos dados de uma determinada imagem é realizada pela transformação da luz refletida em sinais elétricos, que são convertidos em bits por meio de um conversor analógico-digital.

Os equipamentos de SPR, seja o mais compacto ou aquele mais robusto, têm sido acoplados com métodos automáticos de injeção para carregar a amostra até a superfície do sensor. A utilização de sistema de fluxo em equipamento de SPR traz diversas vantagens, entre elas: monitoramento constante da variação do índice de refração de um composto, fluxo constante de líquidos sobre o sensor (minimizando o contato da superfície de ouro com o ar, o que causaria a contaminação da mesma), injeção de volumes predefinidos de um determinado analito, obtenção de cinéticas de associação e dissociação em função do tempo, variação da vazão e ainda a possibilidade de inserção de outros acessórios dos sistemas análise por injeção de fluxo (FIA – do inglês Flow Injection Analysis) como câmaras de mistura ou bobinas de reação para aprimorar a detecção por SPR (Manuel et al., (1993); Caruso et al., (1995); Kösslinger et al., (1995)).

Utilizando um equipamento de SPR miniaturizado e de baixo custo acoplado a um sistema FIA, Tumolo, et al., (2004) propuseram a automatização das determinações do gradiente de índice de refração em função da concentração do soluto (d*n*/dC). O equipamento foi acoplado a uma câmara de mistura, a qual permitiu que, com uma única solução estoque de um composto fosse possível determinar o valor de dn/dc. Esta técnica foi denominada de (FIG-SPR – do inglês Flow Injection Gradient-Surface Plasmon Resonance) (Tumolo, 2008).

Os equipamentos de SPR com detector de CCD acoplado são denominados SPRi, (*Surface Plasmon Resonance Imaging*). Este equipamento tem se mostrado bastante promissor no campo biológico e com crescente utilização por diversos grupos de pesquisa, por permitir análises multiparamétricas (Hickel, Kamp & Knoll, (1989) *apud* Brockman, Nelson & Corn, (2000)). Interessante observar que com esse método pode-se obter a visualização de toda a área da superfície do sensor, que pode ser dividida em pequenas áreas ("*spots*"), sendo possível efetuar diferentes funcionalizações em cada uma delas. A variação na reflectância devido à interação molecular (ou biomolecular) em cada um dos *spots* é então registrada pela câmera CCD (figura 8).

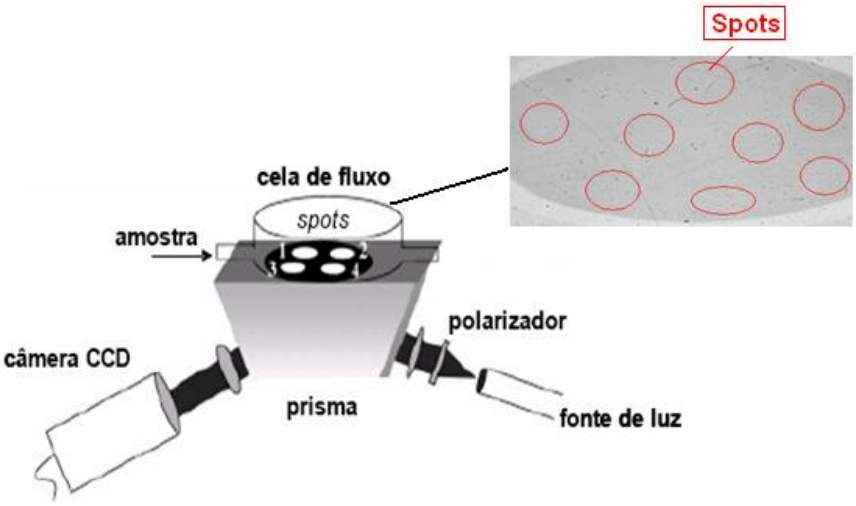

Figura 8 – Esquema simplificado de um equipamento de SPRi. *Nota-se a presença de uma câmera CCD, necessária para a aquisição das imagens da superfície de ouro. A quantidade de spots presente na superfície de ouro varia para cada experimento. (adaptado de SURANITI et al., 2007).*

1.6 Métodos de funcionalização de superfícies de ouro

A maioria dos métodos de modificação da superfície de ouro é baseada na forte ligação dos seus átomos com alquil-tióis (SH). Compostos orgânicos assimétricos, possuindo um ou mais grupos tióis em uma extremidade e outros grupos funcionais (álcool, carboxila, amina, fosfato etc.) na outra extremidade são

geralmente utilizados para iniciar a modificação da superfície metálica. Esta funcionalização pode ser realizada e caracterizada no próprio equipamento de SPRi (Plant et al., 1995).

Outras possibilidades de funcionalização são através da adsorção de polieletrólitos como PAMAM (Zucolotto et al., 2005) e poli-lisina (Benìtez et al., 2002), utilizando o método de construção de camadas (LBL – do inglês Layer/By/Layer). Exemplos de polímeros naturais utilizados com essas finalidades são quitina e quitosana, como suporte em substrato de ouro, para possível formação de monocamadas ou bicamadas de fosfolipídeos (Huang & Xiurong, 2003); e (Pedano et al., 2004). Também, modificações químicas utilizando compostos com funções orgânicas nucleofílicas e eletrofílicas são bastante utilizadas (Mattei, B. et al., 2004).

Polímeros são compostos com massa molar na ordem de 10^4 a 10^6, formados pela repetição de um grande número de unidades estruturais químicas chamadas monômeros (M). Podem ser classificados quanto à ocorrência: em naturais (proteínas, polissacarídeos, polinucleotídeos) ou sintéticos (obtidos industrialmente: polietileno-PET, poliestireno, policloreto de vinila-PVC); também quanto a forma estrutural: em linear (formado pela ligação dos monômeros em um comprimento contínuo), ramificada (com ramificações curtas ou longas) e reticulada (cadeias poliméricas ligadas entre si formando uma rede) (figura 9) (Mano et al., 1999) e (Akcelrud, L., 2007).

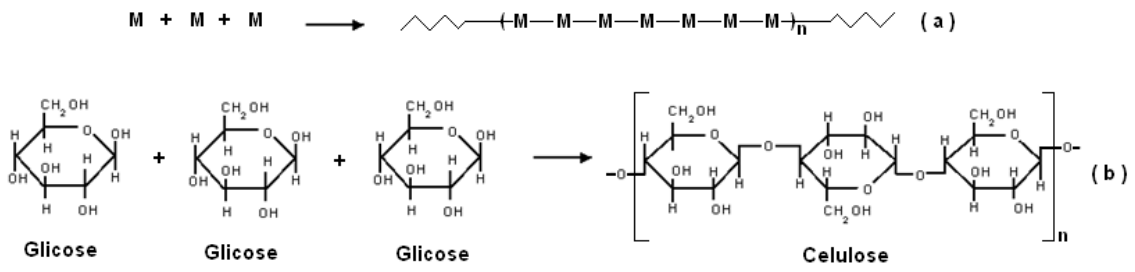

Figura 9 – Fórmula química de um polímero. *A estrutura (a) representa uma equação geral de monômeros ligados covalentemente, resultando em um polímero. A estrutura (b) ilustra um polímero do monossacarídeo glicose, quando estas são ligados através de ligações glicosídicas β(1-4), originando a celulose. (Adaptado de Mano et al., (1999) e Akcelrud, L., (2007)).*

A quitina é um polímero natural, linear e de alto peso molecular. É o principal componente estrutural do exoesqueleto de invertebrados como crustáceos, insetos e aranhas, e está também presente na maioria dos fungos e de muitas algas. É o segundo composto orgânico mais abundante da natureza, ficando atrás apenas da celulose. Quimicamente é um homopolímero de resíduos de N-acetil-D-glicosamina ligados por ligações β(1→ 4) (figura 10). Ela se diferencia da celulose apenas porque cada grupamento OH do carbono 2 na celulose é substituído por uma função acetamida na quitina (Voet, D. et al., 2008).

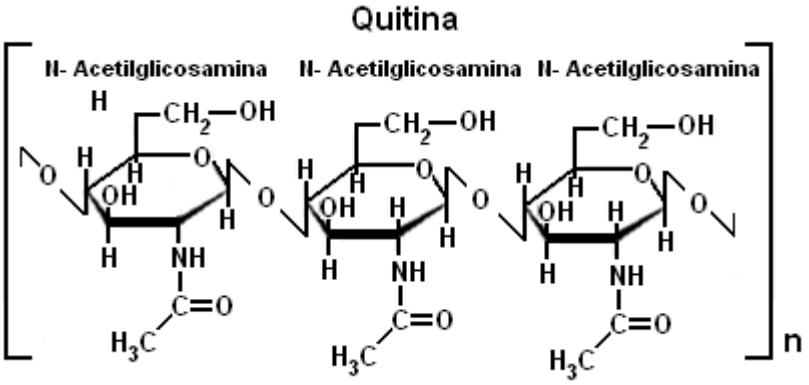

Figura 10 – Fórmula química da quitina. *Nota-se a presença do grupo acetamida no carbono 2, diferenciando-a da estrutura molecular da celulose.(Adaptado de Voet, D. et al., 2000).*

A quitosana é um polímero obtido a partir da quitina, por um processo de desacetilação parcial, através de tratamento com hidróxido de sódio 40% a 120º C com duração aproximada de três horas. Esse tratamento produz um grau de desacetilação em torno de 70% a 80%. Sua estrutura molecular é formada pela repetição de resíduos de N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina (ou 2-amino-2-desoxi-D glicose), unidos entre si por ligações β(1→ 4) (figura 11). O grau de desacetilação representa a proporção de unidades de D-glicosamina com respeito ao número total de unidades; ou seja, a proporção de grupos amina livres que podem realizar equilíbrio ácido/base. Isto permite distinguir a quitina da quitosana. Consequentemente, o grau de desacetilação determina também o limite de solubilidade do polímero em soluções ácidas diluídas (2 < pH < 6) (Chatelet et al., 2001) e (Ravi Kumar et al., 1999).

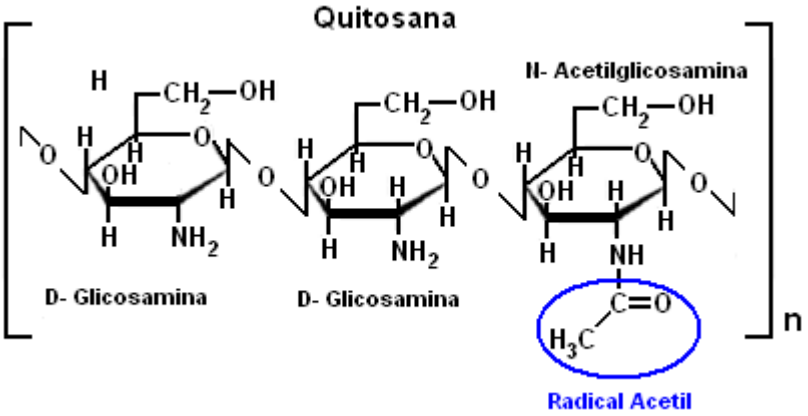

Figura 11 – Fórmula química da quitosana. *Nota-se a presença do radical acetil ligado ao grupo amino do carbono 2, caracterizando o grau de desacetilação da molécula.*

A literatura tem mostrado que por se tratar de um polímero biodegradável, extremamente abundante, atóxico, e com grande afinidade por metais e lipídeos, a quitosana tem sido proposta como um material para usos diversos, principalmente em cosmetologia, farmacologia e biotecnologia (Baldwin et al., 1996).

Resultados apresentados por Assis, O.B. et al., (2002), Wang, X. et al., (1998) e Shahidi, F. et al., (1999) mostraram a ação de filmes de quitosana, como membranas filtrantes em sistemas de purificação de água e separação de resíduos, liberação de drogas ou compostos moleculares, e em coberturas comestíveis sobre alimentos processados e embalagens. Nettles, D. L. (2002) e Cárdenas et al., (2007) também descreveram em seus trabalhos estudos com películas densas de quitosana testadas como “pele” temporária, que é um material apropriado para reestruturação de cartilagens ou em aplicações tópicas para regeneração e cicatrização de injúrias animais.

Swrizawa, T. et al., (2002) e Lvov, Y. et al., (1998) estudaram as características físico-químicas, de filmes de quitosana, em superfícies metálicas, através de técnicas de automontagem (LBL). Os mesmos também relataram em seus trabalhos, sistemas de multicamadas formados entre quitosana com polímeros aniônicos e com fosfolipídeos carregados negativamente.

1.7 Fosfolipídeos auto-associados como modelos miméticos de membranas e para imobilização de biomoléculas

Lipídios são moléculas insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos polares como clorofórmio. Diferentes compostos químicos se encaixam nesta classificação tais como ácidos graxos, triacilglicerois, glicerofosfolipídeos, esfingolipídeos e esteróides (Nelson & Cox, 2002).

Glicerofosfolipídeos são os principais compostos constituintes das membranas biológicas. Possuem longas caudas hidrofóbicas e grupos “cabeça” hidrofílicos; sendo, portanto moléculas anfipáticas. Os grupos “cabeça” podem ser carregados positivamente, negativamente, ou zwiteriônicos. A figura 12 exemplifica a

estrutura de um fosfolipídeo e alguns grupos “cabeça” que podem ocorrer (Nelson & Cox, (2000); Voet, D., (2008)).

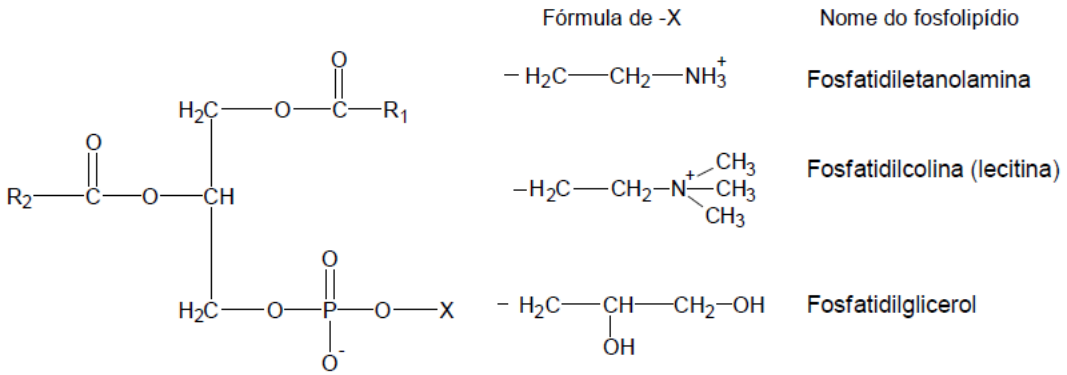

Figura 12 – Estrutura de um Fosfolipídeo e exemplos de grupos cabeça que podem ocorrer nessa molécula. As caudas hidrofóbicas são representadas por R1 e R2 e os grupos cabeça por –X.

Quando em contato com a água, fosfolipídeos formam complexos auto-associados, onde as porções hidrofílicas interagem com o meio aquoso e as porções hidrofóbicas interagem entre si. O principal componente termodinâmico que possibilita a formação destes agregados é o aumento na entropia do sistema, devido à redução da área exposta à água (efeito hidrofóbico). De acordo com Tanford (1991), Nelson & Cox (2002), diferentes tipos de agregados lipídicos podem ser formados quando as moléculas anfipáticas entram em contato com as moléculas de água (figura 13).

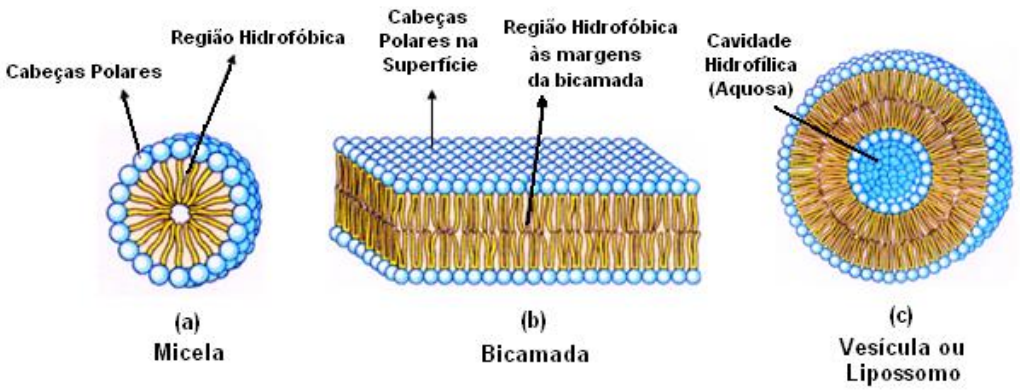

Figura 13 – Tipos de agregados lipídicos que podem ser formados em água: micelas, bicamadas e vesículas. *(adaptado de Nelson e Cox, 2002).*

No caso de tensoativos com uma cadeia apolar, se estabelece um equilíbrio entre moléculas solúveis em água, interfaces e agregados. A partir de uma determinada concentração, denominada concentração micelar crítica (cmc), ocorre à completa saturação da interface, iniciando-se a formação de outros tipos de agregados em solução, tais como as ***micelas*** (figura 13a). Quanto maior o comprimento da cadeia hidrofóbica da molécula anfipática, maior tendência a agregação, ocasionando a diminuição da cmc, ou seja, a interface é rapidamente saturada de maneira que as moléculas que permanecem em solução buscam a diminuição do contato com água, dirigindo a formação de estruturas micelares (Tanford, C., 1991).

Outro tipo de agregado lipídio que é observado em meio aquoso é a ***bicamada*** (figura 13b), que se forma principalmente quando a secção transversal do grupo cabeça do lipídeo é semelhante ao da cadeia hidrofóbica, como é o caso dos fosfolipídeos (Nelson & Cox, 2002). Nesse tipo de agregado duas monocamadas se organizam gerando uma lâmina bidimensional, onde as regiões hidrofóbicas das monocamadas interagem entre si e os grupos cabeça interagem com a água que os solvata. Já as regiões hidrofóbicas situadas nas margens da bicamada experimentam transitoriamente o contato com a água, o que gera instabilidade e promove a formação de agregados tridimensionais, sendo principalmente ***vesículas*** ou ***lipossomos***, que se constituem de bicamadas lipídicas com meio aquoso interno e externo (figura 13c).

Um dos métodos mais utilizados no estudo das propriedades de membranas e suas interações com biomoléculas é a formação de monocamadas ou bicamadas lipídicas sobre suportes sólidos, como sílica, mica e ouro. Avanços nessa área têm possibilitado uma variedade de estudos envolvendo membranas, proteínas de

membrana, imunoensaios e aprimoramento de biosensores. A formação dessas camadas lipídicas é comumente obtida com adsorção de vesículas em suportes sólidos (Richter, Mukhopadhyay & Brisson, 2003).

Muitos estudos têm avaliado os modos de interação entre lipossomos com superfícies sólidas, como sílica (Rapuano & Carmona-Ribeiro, 1997), mica (Richter & Brisson, 2005), ouro ou com alcanotiol (Keller & Kasemo, 1998), em sistemas poliméricos automontados em superfície solida (Ma et al., 2003), e com fosfolipídios modificados quimicamente (Berquand et al., 2003). A caracterização das camadas lipídicas formadas pode ser realizada por diferentes técnicas, como microscopia de forca atômica (AFM) (Richter & Brisson, 2003), microbalanca de cristal de quartzo (QCM) (Richter, Mukhopadhyay & Brisson, 2003), elipsometria (Puu & Gustafson, 1997), microscopia de fluorescência (Berquand et al., 2003), ressonância de plasmons de superfície (SPR) (Glasmastar et al., 2002), além de medidas eletroquímicas como condutância e capacitância (Micelli et al., 2002).

Dominar o processo de transferência de membranas para substratos sólidos permitirá o desenvolvimento de sensores de membranas, onde os elementos de reconhecimento molecular podem ser as próprias proteínas das membranas. Membranas também podem servir de arcabouço para construção de diferentes receptores, devido à grande diversidade de funcionalidades químicas dos lipídeos naturais e sintéticos.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é desenvolver uma metodologia para detectar citocromo c utilizando SPRi.

2.1 Objetivos específicos:

1. Descobrir estratégias de sustentação de bicamadas na superfície de ouro.
2. Construir o sensor descrito na figura 14 e caracterizar a ligação com citocromo c através da técnica de SPRi.
3. Mensurar a sensibilidade e o limite de detecção do biosensor e comparar com outro baseado em construção mais simples.

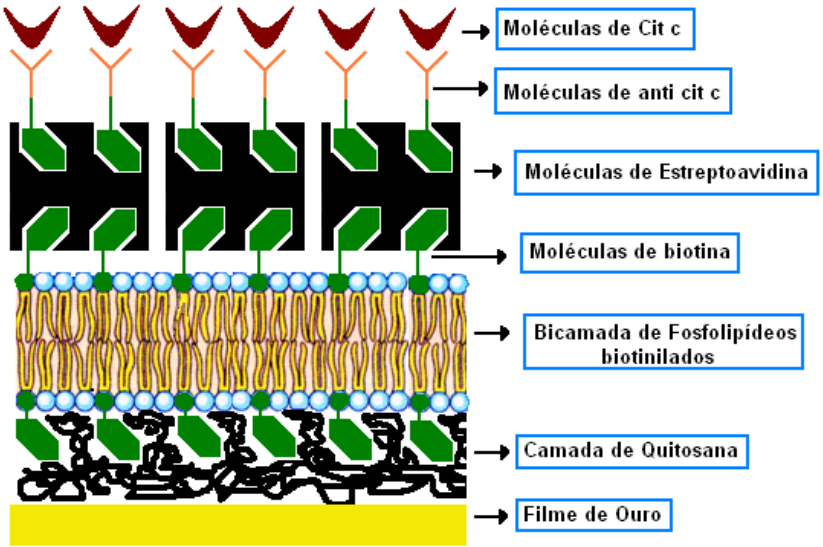

Figura 14 – Esboço da construção, camada por camada, do biosensor para detecção de Cit c. *O desenho tem caráter ilustrativo, e não está mostrada a correta ligação do antígeno nos sítios de ligação das cadeias moleculares do anticorpo.*

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Equipamento de SPRi e calibração do Biochip

O equipamento de SPR utilizado para as análises desenvolvidas foi um SPRi-Lab^{+}, que é constituído de um LED que emite luz no comprimento de onda λ = 635 nm, um polarizador, uma câmera CCD para o fornecimento de imagens da superfície e uma cela de fluxo de volume de 500 µL. O sensor SPRi-Biochip (prisma de quartzo, de 2,5 cm, com alto índice de refração *n* =1,515, sendo uma das faces cobertas com um fino filme de ouro de 48nm) (figura 15), foi especialmente desenvolvido para experimentos de imagem, e adquirido juntamente com o software específico do equipamento (SPRi-View), da Genoptics Bio Interactions (Orsay, França) – o detalhe técnico do equipamento e seus acessórios podem ser obtidos na página http://www.genoptics-spr.com.

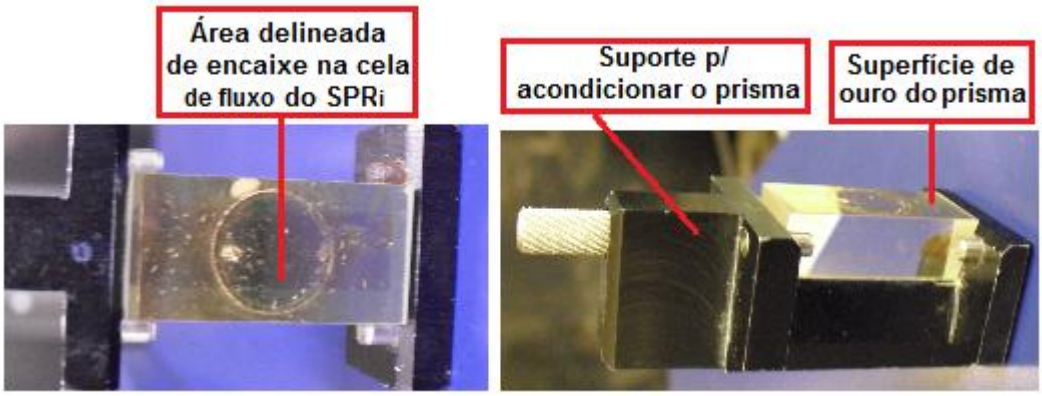

Figura 15 – Vista superior e lateral de um SPRi-Biochip. *O prisma é feito de uma mistura especial de quartzo e vidro. Na parte superior pode ser visto claramente a superfície de ouro. (Foto obtida do equipamento de SPRi).*

Quando um sensor é utilizado pela primeira vez torna-se necessária a calibração (comando acessado pelo SPRi-View), pois é durante esta etapa que o sensor ajustará o tempo de integração do fotodiodo com a interface metal/ar, bem como a intensidade do LED. Por fim, calibra-se o sensor com um líquido de índice

de refração conhecido (por exemplo, a água ou solução tampão). Nos experimentos iniciais para calibração e otimização do sistema foram utilizadas soluções de água, tampão fosfato (50mM), tampão acetato (50mM) e tampão hepes (5mM); todas preparadas em água purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA). Os experimentos foram realizados na temperatura de 24ºC e os resultados monitorados pelo programa *SPR-View,* foram todos tratados no programa Origin 7.0 (OriginLab Co., Northampton, MA, EUA).

Quanto ao tempo de vida dos Biochips, destaca-se que são reutilizáveis, desde que sua superfície seja devidamente limpa e que não ocorram danos mecânicos irreversíveis na mesma. Pode-se optar também pela remoção química dos compostos adsorvidos utilizando solução piranha, preparada com ácido sulfúrico concentrado (teor 95– 98%, Vetec Química Fina, SP/Brasil) e peróxido de hidrogênio (teor 50%, Vetec Química Fina, SP/Brasil) na proporção 3:1, respectivamente. Esta solução, quando necessário, foi deixada sobre a superfície de ouro por aproximadamente 15 minutos.

3.2 Adaptação do injetor manual no sistema em fluxo

O sistema de injeção de amostra foi construído com um injetor manual, um dispositivo redutor de pulsação da bomba peristáltica (Cole- Parmer, EUA) e um degaseificador Degasser DGU-20As (Shimadzu Corporation, Chiyoda-ku Tokyo, Japão). Com o uso do injetor manual pode-se manter o fluxo de tampão ou água constante na superfície do sensor, sem a necessidade de ser realizada a parada da bomba peristáltica, para alimentar o loop de amostragem, com solução de analito. E ainda, volumes definidos de amostra, podem ser injetados pela variação do comprimento e/ou diâmetro interno do tubo de polietileno acoplado a esse injetor. O

degaseificador atua na retirada de mini bolhas de ar suspensas nas soluções de água e tampão. Esse sistema de remoção de ar impede a presença de ar na linha de alimentação do biochip. A presença de mini bolhas de ar no biochip, traz contato de ar com a superfície do sensor, muitas vezes comprometendo o sensor ou evitando a continuidade do experimento.

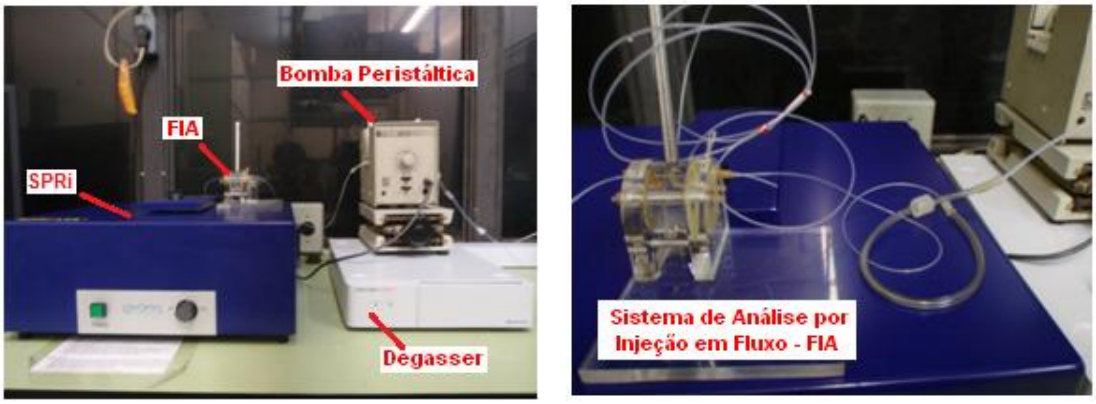

Figura 16 – Foto tirada do equipamento de SPRi Lab +, acoplado a um injetor manual no sistema de Análise de Injeção em Fluxo – FIA, uma bomba peristáltica e um degasser. *Apresenta-se nas fotos a identificação de cada componente.*

3.3 Preparação das soluções utilizadas na construção do biosensor

3.3.1 Soluções Tampão

Os tampões utilizados foram Acetato, Hepes e Fosfato: Tampão Hepes: Pesou-se 0,6g de soluto Hepes (Sigma/Aldrich) diluindo-o em 500mL água milli Q, obtendo-se uma concentração de 5mM e um volume de 500mL; o pH foi ajustado para 7,4 com solução de NaOH concentrado. Tampão Acetato: Pesou-se 0,33g de acetato de sódio (Synth Lab), em que se diluiu o mesmo em 498,55 de água milli Q e 1,45mL de ácido acético glacial (Vetec), obtendo-se uma concentração 50 mM e volume de 500mL; em seguida ajustou-se o pH em 4,0 . Tampão Fosfato: Pesaram-se 0,3g de fosfato de sódio monobásico (Synth Lab), 0,355 de fosfato de sódio

dibásico (Synth Lab) e 0,435 de cloreto de sódio (Synth Lab). Misturaram-se os três reagentes em um erlenmeyer, onde se dilui a mistura com água milli Q. Seu pH foi ajustado para 7,4 obtendo-se uma concentração de 50 mM.

3.3.2 Solução Piranha

Sob a proteção de uma capela com fluxo de ar constante, pipetou-se 6mL de solução de peróxido de hidrogênio 50% (H_2O_2) (Synth Lab) e esta, foi acondicionada em um béquer; em seguida, pipetou-se 14mL de solução de ácido sulfúrico PA (H_2SO_4) (Synth Lab), adicionando-o no béquer lentamente, pois essa reação é extremamente perigosa, devido ser exotérmica e altamente corrosiva. Devido a essas características físico-químicas, ela é designada como solução piranha (solução de 70% de ácido sulfúrico e 30% de peróxido de hidrogênio). Com essa solução realizou-se a limpeza dos prismas de ouro.

3.3.3 Solução de Quitosana

Em um balão volumétrico de fundo chato, pesou-se 1g de quitosana em pó (GD 80% - Farma Service Bioextract Ltda.), dissolvendo-a em 100mL de ácido acético 5%. Logo após, a dissolução inicial com ultrasom, submeteu-se à agitação por um período de 12 horas, para total solubilização. Ao término da dissolução, obteve-se uma solução de 10mg/mL de quitosana.

3.3.4 Solução de BSA (Albumina de Soro Bovino)

Pesou-se 15mg de BSA (Sigma/Aldrich) em um erlenmeyer; em seguida, adicionou-se 1,5mL de solução tampão fosfato. Obteve-se a dissolução completa da proteína através de agitação mecânica (10mg/mL).

3.3.5 Solução de Estreptoavidina

Sobre uma balança analítica, pesou-se em um balão volumétrico de fundo chato, 0,3mg de estreptoavidina (Sigma/Aldrich) e adicionou-se 2mL de solução tampão fosfato. Ao final, obteve-se uma concentração de 0,15 mg/mL e um volume de 2mL.

3.3.6 Solução de Anti Cit c biotinilado

A reação de biotinilação do anti cit c (figura 17) foi preparada de acordo com o protocolo do fabricante Pierce. Dissolveu-se 1mg de NHS-Biotin (ligante de molécula de biotina) (Pierce) em 1mL de solvente DMSO (Dimetil Sulfóxido) (Merck). Em seguida, foi montada uma solução estoque de 100mg/mL de anti cit c policlonal isolado por afinidade, de coração de ovelha, de peso molecular 15.000Da (Sigma/Aldrich); e a partir dela foi obtida, para injeção no SPR, uma solução de 10mg/mL. Então, foi misturado 10mg/mL de solução de anticorpo (anti cit c) com 1mg/mL do ligante de biotina. Foi deixado “overnight” em freezer para que ocorresse a biotinilação do anti cit c. O produto final foi filtrado, lavado e concentrado, usando-se um filtro Millipore de (5.000 Da), por centrifugação durante 3 horas seguidas de

adição de tampão fosfato para lavagem. Para ensaio no SPR, foram utilizados 1,5mL do produto final, a uma concentração de 10mg/mL.

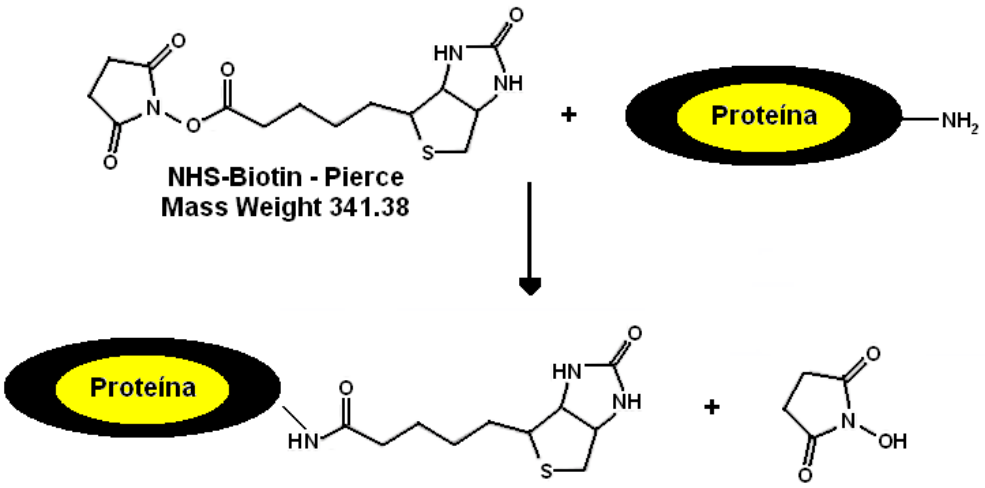

Figura 17 – Reação geral de biotinilação de proteínas, através do ligante de biotina. *A reação entre a proteína e o ligante NHS-Biotin, ocorre através de uma ligação éster lábil de uma amina primária, na terminação N-terminal, geralmente um resíduo de Lisina da proteína, e o grupo carbonila, adjacente da estrutura N-hidroxisuccinimida biotina (NHS-B).*

3.3.7 Solução de Cit c

Foram preparadas soluções em várias concentrações de citocromo c de coração equino ≥95% de peso molecular PM 12.384 Da (Sigma/Aldrich). De 50nM (10^{-9}) a 0,001nM ou 1pM (10^{-12}) utilizando uma solução estoque de cit c de 100µM (10^{-6}). Essas soluções foram usadas para detectar o limite de detecção do biosensor.

3.3.8 Solução e protocolo de preparo dos lipossomos de glicerofosfolipídeos

Os fosfolipídeos utilizados foram 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-Biotinil (N-Biotinil PE) e o L-α-Fosfatidil-DL-Glicerol (PG), comprados da (Avanti Polar Lipids Inc). A figura 18 mostra a fórmula estrutural dos fosfolipídeos.

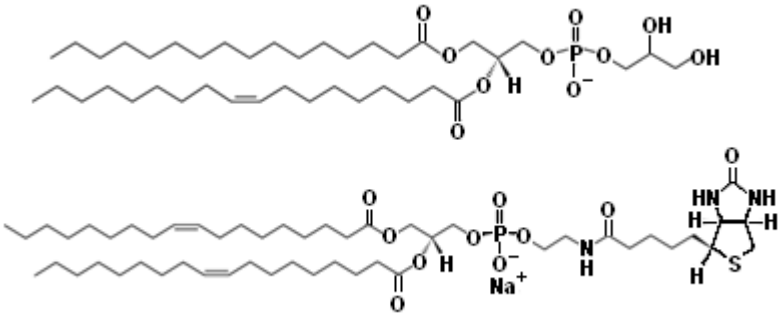

Figura 18 – Fórmula estrutural dos fosfolipídeos utilizados. *De cima para baixo, L-α-Fosfatidil-DL-Glicerol (PG) e 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-Biotinil (N-Biotinil PE).*

Com o auxílio de uma balança analítica e dentro de um tubo de ensaio, os lipossomos foram preparados pelo método de extrusão, pesando-se 40mg de N-Biotinil PE e 40mg de PG (50% de N-Biotinil PE e 50% de PG). Então se dissolveu a mistura lipídica em clorofórmio (Merck), sob leve agitação em um vórtex. Através de um fluxo de argônio (White Martins), evaporou-se o clorofórmio, e formou-se um filme de fosfolipídeo. Submeteu-se o tubo de ensaio a vácuo, por 30 minutos, para que qualquer resquício de clorofórmio se transformasse em vapor. Em seguida ressuspendeu-se o filme com solução tampão hepes 5mM, pH=4,0, obtendo-se assim, uma solução lipídica de aspecto turvo, devido a formação de agregados lipídicos, de concentração de 10mg/mL. Utilizando-se um extrusor de membranas (Avanti Polar Inc.), acoplado a seringas manuais, passou-se a suspensão, por doze vezes, de uma seringa para outra, através de membranas de policarbonato, com poros de 0,1µm (100nm) de diâmetro. Assim, os agregados lipídicos, transformam-

se em lipossomos ou vesículas unilamelares (SUV) de tamanho igual ao diâmetro dos poros dos filtros, tornando a solução com um aspecto límpido (figura 19). Essa diferença na opalescência da solução deve-se ao efeito Tyndall, o qual foi confirmado por experimentos de espalhamento dinâmico de luz (Itzhak, 1995).

Figura 19 – Preparação dos lipossomos de fosfolipídeos. *Metodologia aplicada para cada etapa na formação de lipossomos (partículas em suspensão). Nota-se a mudança no espalhamento de luz antes e depois da extrusão. Fenômeno ocorrido devido ao efeito Tyndall. Extrusor obtido da Avanti Polar Lipids Inc. (Adaptado de Avanti Polar Lipids Inc.)*

A extrusão foi realizada em temperatura ambiente (25ºC); mas o processo de extrusão deve ser realizado em temperatura superior a temperatura de transição (Tm) dos fosfolipídeos presentes na solução. Cada fosfolipídeo apresenta sua

temperatura de transição de fase (Tm). Tm aumenta com o comprimento da cadeia alifática, diminui com a insaturação e depende da natureza do grupo polar da cabeça (Voet et al., 2000). As temperaturas de transição dos fosfolipídeos utilizados neste estudo são: PG = 10ºC (Hegner, Schummer e Schnepel, 1973), N-Biotinil PE= 21,2 ºC (Marsch, 1990).

3.4 Estudo da adsorção de proteínas e carboidratos na superfície de ouro

Com o intuito de se obter um suporte que sustente a bicamada de fosfolipídeo no sensor, testou-se a proteína BSA – Albumina de Soro Bovino (Sigma/Aldrich) e o carboidrato quitosana (GD 80% - Farma Service Bioextract Ltda.); ambos com concentração de 10mg/mL. Foram utilizados equipamentos de espectroscopia de infravermelho (FT-IR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), evaporação atômica por plasma (Sputtering) e ressonância de plasmons de superfície (SPR), para caracterizar a formação destes filmes moleculares.

3.4.1 Desenvolvimento de uma superfície de ouro ultrafina sobre lamínulas de vidro

Para que se pudessem realizar estudos de adsorção de biomoléculas no filme de ouro nos equipamentos de FT-IR e MEV, em colaboração com o Prof. Dr. Antônio Domingues Santos (Toninho) (Departamento de Física dos Materiais e Mecânica do Instituto de Física-USP) e a Prof. Dra. Denise Zezell (Centro de Lasers e Aplicações-

IPEN-USP), foram desenvolvidos filmes finos de ouro (Au) sobre lamínulas de vidro. Estas lamínulas foram compradas da Corning Inc., e tem tamanho de 1,24 cm x 4,0 cm. As lamínulas passaram por um pré-tratamento de solução piranha (70% H_2SO_4 / 30% H_2O_2) por 15 minutos; em seguida lavou-se em excesso com álcool etílico (Merck) e água purificada pelo sistema Milli Q, e logo após, secaram-se as mesmas sob um fluxo de argônio. Após o pré-tratamento, as lamínulas foram submetidas a um processo físico sob vácuo, a nível atômico, de deposição por plasma de átomos de ouro, chamado "Sputtering", onde permaneceram na câmara evaporadora por 5 minutos. Após o término, obtiveram-se lamínulas (figura 20) apresentando uma superfície homogênea de ouro, de 50 nm de espessura.

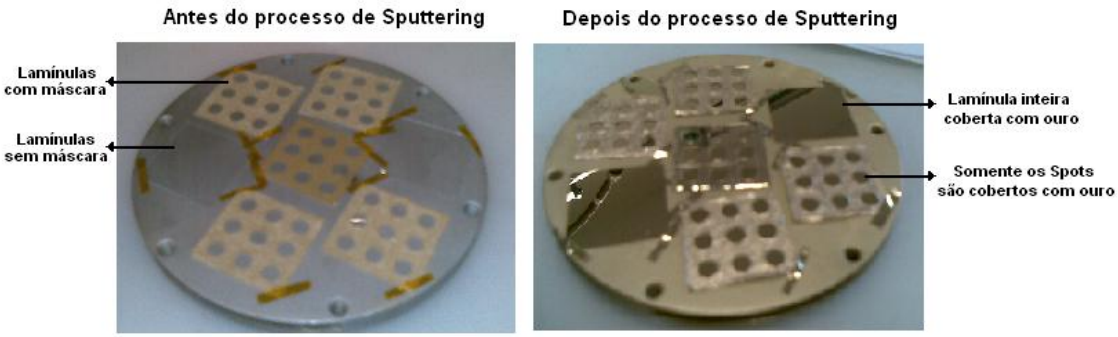

Figura 20 – Fotos das lamínulas obtidas após o processo de deposição por Sputtering. *Nota-se que, há lamínulas de vidro com e sem máscaras. As lamínulas com máscara foram criadas apenas como teste para formação de spots de ouro, caso fosse necessário utilizá-las.*

3.4.2 Protocolo de preparação das pastilhas KBr de quitosana e fosfolipídeos para medidas em FT-IR

Em FT-IR, a utilização de pastilha de KBr é a mais recomendada para análise de sólidos, especialmente sob a forma de pó. Primeiramente triturou-se com um pistilo, dentro de um almofariz de ágata, 1g de KBr (Brometo de Potássio) (Vetec); em seguida, pesou-se 400mg e colocou-se o conteúdo dentro de uma estufa

(Termaks) a (150ºC) por 24 horas, para eliminação de água. Então, procedeu-se similarmente ao processo anterior, triturando-se e pesando-se 2mg de quitosana; posteriormente misturaram-se os dois componentes e colocou-se em um molde para pastilhas (pastilhador), seguido de compressão em prensa hidráulica (Perkin Elmer® modelo 4037) com pressão de 8 toneladas por 7 minutos, obtendo-se pastilhas finas e transparentes. Ressalta-se que, realizou-se o mesmo procedimento para o preparo e obtenção das pastilhas de KBr dos fosfolipídeos.

3.4.3 Protocolo de análises qualitativas de adsorção de quitosana em lamínulas de ouro por FT-IR e MEV

A formação de filmes de quitosana em lamínulas de ouro foi executada em um espectrômetro por transformada de Fourier (FT-IR) (Thermo Nicolet – modelo 6700), utilizando-se uma faixa espectral entre os números de onda 4000 e 400 cm^{-1}, e também, em um microscópio eletrônico de varredura (MEV), com filamento de FEG (JEOL). Os equipamentos foram mantidos em sala com temperatura e umidade controladas. Antes da leitura das amostras em lamínula de ouro, utilizou-se no FT-IR, como branco, amostras contidas nas pastilhas de KBr.

Na técnica de FT-IR uma lamínula de ouro passou por um pré-tratamento de solução “piranha”, para limpeza da superfície, através de lavagem com água e secagem sob um pequeno fluxo de argônio. Submergiu-se a lamínula em uma solução de quitosana, 10mg/mL, onde esta permaneceu por 30 minutos. Lavou-se novamente com água e secou-se sob um baixo fluxo de argônio. Transportou-se até um dissecador, acoplado a um sistema de vácuo, onde a lamínula permaneceu por aproximadamente (24 horas) para evaporação da umidade remanescente. Após

secagem completa, a lamínula de ouro foi levada até o FT-IR para obtenção de dados. A figura 21 ilustra o processo explanado acima.

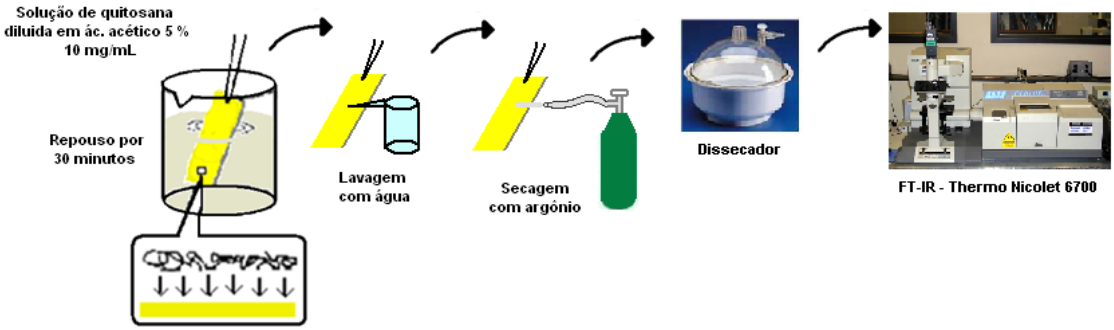

Figura 21 – Processo de adsorção de quitosana em lamínula de ouro para caracterização por FT-IR. *Técnica de Langmuir-Blodgett (LB), que permite a deposição de filmes camada por camada, em que, cada camada pode ter espessura de uma única molécula.*

Para a coleta de resultados com MEV, foram selecionadas duas lamínulas de ouro, ambas receberam um pré-tratamento com solução piranha para limpeza da superfície; em seguida lavou-se com água e secou-se sob um baixo fluxo de argônio. Posteriormente, levaram-se as mesmas até um dissecador, acoplado a um sistema de vácuo. Uma das lamínulas foi utilizada como background (amostra branca) e a outra, foi mergulhada em solução de quitosana onde permaneceu por 30 minutos. Novamente lavou-se com água e secou-se sob um baixo fluxo de argônio, e posteriormente também foi colocada no dissecador. As duas lamínulas foram analisadas por MEV. Este procedimento está apresentado na figura 22.

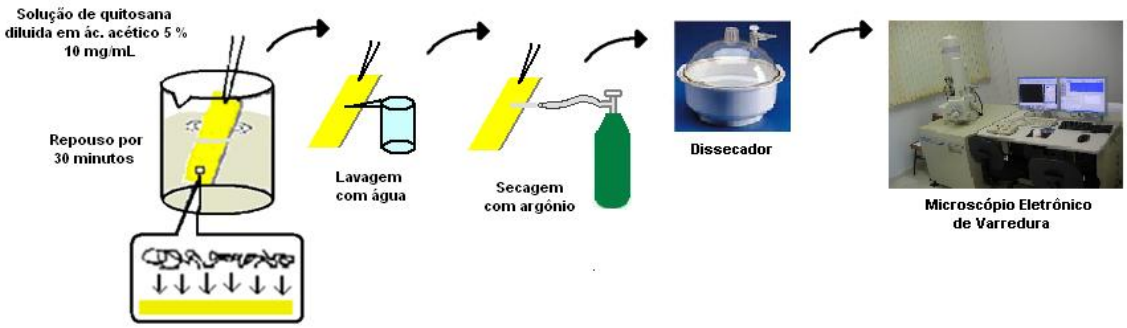

Figura 22 – Processo de adsorção de quitosana em lamínula de ouro para caracterização por MEV. *Utilização do método de Langmuir-Blodgett (LB) para deposição de quitosana em superfície metálica de ouro. Após deposição do biopolímero, a lamínula passa por lavagem, secagem e então é acoplada ao MEV para leitura.*

3.4.4 Protocolo de verificação das interações entre a quitosana e os fosfolipídeos por FT-IR

A lamínula de ouro foi tratada com solução piranha (70% H_2SO_4 / 30% H_2O_2). Com uma pinça de aço inox, mergulhou-se a lamínula em solução de quitosana por 30 minutos. Em seguida, lavou-se com água e secou-se sob um baixo fluxo de argônio. Logo após, levou-se ao FT-IR para leitura de dados. Posteriormente submergiu-se a lamínula na solução de fosfolipídeos (PG /N-Biotinil PE – 10mg/mL), onde permaneceu por 30 minutos; em seguida lavou-se com água milli Q e secou-se sob fluxo de argônio. Então, transportou-se ao FT-IR para análise. A Figura 23 ilustra o procedimento de adsorção, camada por camada, explanado acima com a formação do filme de fosfolipídeo sobre o de quitosana.

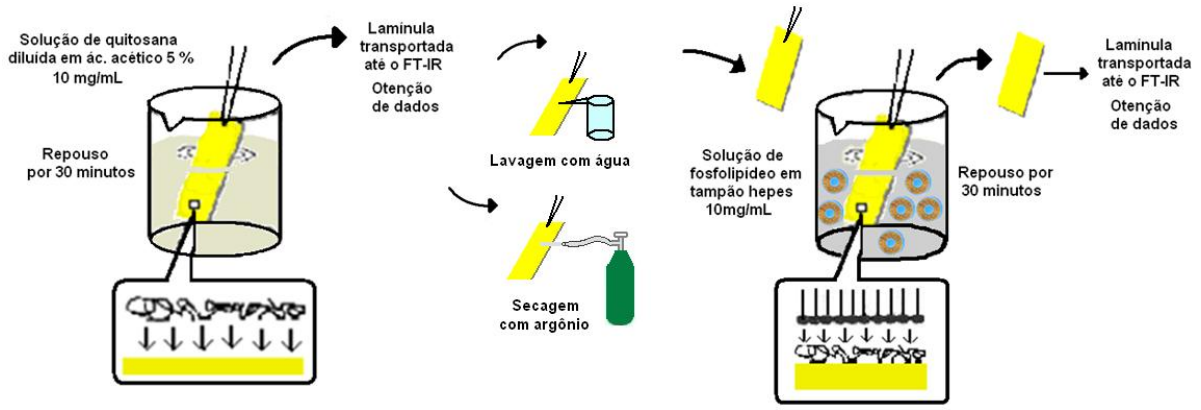

Figura 23 – Processo de adsorção de quitosana em lamínula de ouro, e fosfolipídeo sobre quitosana, para verificação de ligação entre as biomoléculas. *Nota-se na parte ampliada do desenho, a adsorção da quitosana na lamínula de ouro e do fosfolipídeo na quitosana.*

3.4.5 Protocolo de análises quantitativas de adsorção de quitosana em lamínulas de ouro, e lipossomos sobre quitosana por SPRi

Após a etapa de limpeza do prisma de ouro e executada a calibração do equipamento de SPRi, iniciou-se a formação do sistema multicamadas Quitosana/Fosfolipídeos (PG /N-Biotinil PE) com o monitoramento da refletividade em tempo real. Iniciou-se o experimento com um fluxo de solução tampão acetato 50 mM e (pH 4,0) para se obter a linha base. Depois de aproximadamente 15 minutos injetou-se ~ 500µL da solução de quitosana, aguardou-se em média 5 minutos com o fluxo desligado, para adsorção da mesma no filme de ouro. Em seguida, o fluxo foi reiniciado para lavagem do restante não adsorvido no filme. Repetiu-se esse procedimento por mais duas vezes, para se obter preenchimento total da superfície de ouro e com o filme homogêneo e nanoporoso de quitosana.

Dando-se sequência no experimento, esperou-se uma nova estabilização da linha base, e realizou-se a troca de tampão de acetato por tampão hepes, para posterior injeção dos lipossomos. Injetou-se duas vezes, separadamente, 500µL de solução de lipossomos sobre o filme de quitosana. Desligou-se o fluxo, aguardou-se

15 minutos, em média, para a desintegração dos mesmos e posterior formação de uma bicamada de fosfolipídeos. Em seguida, iniciou-se o fluxo para lavagem e remoção dos fosfolipídeos não ligados.

3.5 Protocolo para a formação da camada de estreptoavidina ligando-se a biotina marcada nos fosfolipídeos

Depois da formação do filme de quitosana na superfície de ouro e da bicamada de fosfolipídeo biotinilado, trocou-se a fase móvel, de tampão hepes (5mM pH 7,0) para tampão fosfato (50mM pH 7,4). Efetuou-se duas injeções, cada uma de 500 µL de solução de estreptoavidina (0,15 mg/mL). Aguardou-se, em média 15 minutos, para ocorrer à ligação entre as duas biomoléculas. Em seguida, ligou-se o fluxo para lavagem do excesso não ligado.

3.6 Ligação do anticorpo anti cit c, marcado com biotina, na estreptoavidina

A etapa final na construção do biosensor foi a ligação da estreptoavidina com o anti cit c. É importante salientar que, após a ligação da estreptoavidina na superfície do biosensor, restaram dois sítios equivalentes de ligação da estreptoavidina para interagir com a biotina. Portanto, esses serão preenchidos pelas moléculas de biotina ligadas no anticorpo. Foram preparadas soluções de anti cit c biotinilado, de acordo com o modo de preparo, já descrito no protocolo 3.3.6. Após a estabilização da linha base com tampão fosfato, injetou-se 500 µL de solução de anti cit c 10mg/mL, em seguida, desligou-se o fluxo e aguardou-se cerca de 10 minutos, para as interações ocorrerem. Logo após, reiniciou-se o fluxo para

lavagem com tampão fosfato, do que não havia sido especificamente ligado. Repetiu-se esse procedimento, onde se obteve a formação de anticorpos ligados no biosensor; e estes agora poderão interagir com o antígeno cit c, que é o alvo da construção do sensor.

3.7 Associação do antígeno cit c com o anticorpo anti cit c por SPRi

Foram preparadas soluções de cit c na faixa de concentração de 50nM a 0,001nM (1pM) em tampão fosfato 50mM pH 7,4. Todas as soluções foram preparadas por diluição de uma solução de citocromo 100μM em tampão fosfato 50mM no pH indicado. As interações foram estudadas pela técnica de SPRi, através da monocamada de anti cit c, formada sobre a monocamada de estreptoavidina. As injeções de cit c foram realizadas com loop de amostragem de 500 μL e vazão 0,35 mL/min, sendo que a solução de cit c foi deixada em contato com a monocamada do anticorpo pelo tempo de 10 minutos, com o fluxo parado. Dando sequência na construção do biosensor, foram injetadas várias concentrações em diferentes experimentos realizados (50 nM até 0,001nM). Todos os experimentos seguiram a mesma metodologia, apenas, com suas concentrações diferentes. Então injetou-se 500 μL de cit c, e com o fluxo desligado, aguardaram-se em média 10 minutos, para as devidas interações entre antígeno-anticorpo ocorrerem. Logo após, reiniciou-se o fluxo de tampão para verificação da ligação entre as biomoléculas e remoção do remanescente não adsorvido. Após a estabilização da linha base, foi realizado novamente esse procedimento, por mais duas vezes. Depois das duas últimas injeções, monitorou-se a estabilização da linha base e encerrou-se o experimento. Então, coletou-se todos os dados do SPRi, para serem tratados no programa Origin 7.0.

3.8 Estimativa do limite de detecção de cit c por SPRi, com blindagem da superfície de ouro com BSA, sem o sensor de membrana

Este protocolo foi realizado, com o intuito de se avaliar o limite mínimo, em termos de concentração, da capacidade de interação do antígeno citocromo c no seu anticorpo anti cit c; que é passível de detecção pelo biosensor sem membrana. Como descrito no item 3.7, também foram executadas várias injeções de cit c em diversas concentrações (50nM, 1nM, 0,1nM, 0,01nM e 0,001nM).

Utilizou-se BSA como agente de blindagem da superfície de ouro. Inicialmente efetuou-se a limpeza do prisma em solução piranha, e em seguida, o mesmo foi acoplado ao SPRi, e com as calibrações realizadas, iniciou-se o experimento. Ligou-se o fluxo de tampão fosfato, e após alguns minutos com a linha base estabilizada, injetou-se BSA; desligou-se o fluxo de tampão e aguardou-se as interações com o ouro. Então, iniciou-se o fluxo para a remoção do BSA não ligado. Repetiu-se por mais duas vezes o mesmo procedimento, para cobrir totalmente a superfície de ouro com BSA e evitar a ligação não específica do cit c com a superfície de ouro (Fasman, 1976), (Lori & Hanawa, 2004) e (Hirayama et al., 1990). Passado alguns minutos, para a linha base se estabilizar, injetou-se anti cit c, desligou-se o fluxo, para a interação das duas proteínas, e novamente, ligou-se o fluxo, para lavagem. Após a estabilização da linha base, injetou-se cit c e desligou-se o fluxo, para que as interações especificas de antígeno-anticorpo ocorressem. Ligou-se o fluxo novamente para lavagem das moléculas não ligadas.

3.9 Cálculo da sensibilidade do sensor e estimativa do Limite de Detecção (LOD)

A sensibilidade é o intervalo de concentração linear das curvas de calibração no estado estacionário determinada pelo gráfico de (ΔR)/C ou (ΔR)/log C/C^0 versus log C/C^0. A sensibilidade descreve o quanto a resposta (refletividade) varia com a variação da concentração do analito e, pode ser expressa como a inclinação da curva analítica (coeficiente angular). O limite de detecção é o mínimo de concentração da substância em análise que pode ser detectada (Fatibello & Capelato, 1992).

Limites de Detecção *(LOD – do inglês Limit of Detection* é indicativo da sensibilidade instrumental para um determinado analito (Yeatman, 1996); (Kunz, U. et at., 1996). LOD foi calculado segundo a definição da IUPAC, a partir da equação 4:

$$LOD = \frac{ks_b}{m} \qquad \textbf{(4)}$$

onde *m* é o coeficiente angular da reta obtida da curva, s_b a estimativa do desvio padrão da curva e *k*, uma constante estatística. O uso de *k = 3* permite um nível de confiança de 99,8%, para uma medida assumindo distribuição normal. Para o cálculo do desvio padrão do branco, utilizou-se cerca de cem valores de refletividade da tabela de dados (refletividade em função do tempo) e, calculou-se a média e o desvio padrão (tabela 1). O limite de detecção foi calculado através das equações das retas, obtidas das curvas analíticas (Miller & Miller, 1993).

Tabela 1. Valores obtidos dos cálculos da média de variação de refletividade e desvio padrão do branco (Gráficos das figuras 39 e 45).

Valores para o cálculo do LOD	*Sensor de Membrana*	*Sensor de BSA*
Média de cem valores de refletividade	45,0914	45,7933
Desvio padrão do branco	0,8017	0,5318

3.10 Cálculo das espessuras das camadas e quantidade de material adsorvido

É possível obter a espessura e a quantidade de material adsorvido por SPRi, através das relações das variáveis de mudança de reflectância d(%R) em função da concentração (dc) [d(%R)/dc], e da variação do índice de refração em função da concentração (dn/dc). Para isso é necessário que a refletividade seja convertida em índice de refração (Ivanov, 1988).

Suraniti et al., (2007) e Tumolo, (2008) calcularam curvas de calibração monitorando diferentes concentrações de sacarose (utilizada como padrão, já que a mesma não se liga no ouro). Obtiveram o valor de d(%R)/dc = 421,87 cm3.g^{-1}. A razão entre valores de d(%R)/dc da sacarose e dn/dc do analito em questão, resulta em um parâmetro de calibração igual a Δ(%R)/Δn. Este valor pode ser utilizado na conversão dos valores de reflectância obtidos no SPRi em valores de índice de refração, e dessa maneira, proceder com os cálculos para obtenção da espessura do filme e quantidade de material adsorvido.

Calculou-se inicialmente o valor de (l_d), a extensão de decaimento característico do campo eletromagnético evanescente, através da equação 3. O comprimento de onda do feixe luminoso no SPRi é de 635 nm. O valor de (l_d) foi

calculado em cada experimento, uma vez que o mesmo varia conforme a espécie que esta sendo analisada. A obtenção dos valores de espessura (*d*) das camadas é possível pela equação 5.

$$d = -\left(\frac{l_d}{2}\right)\ln\left(1 - \frac{n_{eff} - n_b}{n_a - n_b}\right) \quad \textbf{(5)}$$

A quantidade de material adsorvido (Γ) (em $mg.m^{-2}$, $ng.mm^{-2}$ ou moléculas. cm^{-2}) foi obtida utilizando-se a equação 6 (De Feijter & Benjamins, 1978).

$$\Gamma = d * [(n_a - n_b) / (dn/dC)] \quad \textbf{(6)}$$

Onde (*d*) é a espessura da camada adsorvida (em nm), (n_a) é o índice de refração do adsorbato, (n_b) é o índice de refração do solvente ou tampão, (n_{eff}) é o valor de índice de refração monitorado pelo equipamento de SPR e o d*n*/dC é a variação do índice de refração em função da concentração.

De acordo com a (tabela 2), aplicou-se os referidos valores nas equações mencionadas acima, para a obtenção das espessuras e quantidades de material adsorvido.

Tabela 2. Valores de Índice de refração (*n*) e dn/dC obtidos na literatura.

Amostra	Índice de refração (n)	dn/dC (g/cm3)
Tampão Acetato [a]	1,3336	----
Tampão Hepes [a]	1,3335	----
Tampão Fosfato [a]	1,3333	----
Quitosana [b]	1,5	0,154
BSA[f]	1,52	0,183
Fosfolipídeos [c]	1,46	0,182
Estreptoavidina [d]	1,52	0,185
Anti Cit c [e]	1,5	0,183
Citocromo c [e]	1,62	0,180

a) Medzon et al., (1971).
b) Huang et al., (2003), Sorlier et al., (2003), Fujimoto et al., (2002).
c) Lingler et al., (1997), Plant, (1995), Richter et al., (2003), Ross et al., (2001).
d) Herron et al., (1992), Swann et al.,(2004), Stayton et al., (1999).
e) Weast et al., (1979), (Yeung et al., (1999).
f) Fasman, (1976).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção de um suporte hidrofílico, com base na modificação da superfície com biopolímero

Durante o período de desenvolvimento de uma nova metodologia para funcionalizar superfícies metálicas e, com o objetivo de desenvolver um biosensor de membranas, foram analisadas várias estratégias com a finalidade de se encontrar um suporte adequado que se ligasse na superfície de ouro e que oferecesse sustentação e estabilidade para a bicamada de fosfolipídeo biotinilado.

Considerando estratégias conhecidas da literatura e também do nosso grupo a aplicação de alquil-tióis de cadeia longa (Tumolo e Baptista, 2008), ligação da proteína Albumina de Soro Bovino (do inglês *Bovine Serum Albumin – BSA*) (Gobi et al., 2004), de dendrímeros PAMAM (Zucolotto et al., 2005) e de poli-lisina (Benìtez et al., 2002), (Suraniti et al., 2007), não se mostraram adequados para os nossos objetivos; pois esses sistemas ou formavam uma bicamada de membrana mista (do inglês Hybrid Mambrane Bilayer - HBM) ou multicamadas e agregados lipídicos (Walter, Steer e Blumenthal, 1986). Optou-se por fazer testes com a quitosana, já que a mesma possui grupos químicos que podem interagir com fosfolipídeos, porém sem carga residual em pH ~ 7.0, dificultando a formação de multicamadas e facilitando a formação de uma bicamada acima do filme de quitosana.

Nas figuras 24 e 25 são mostrados os espectros de infravermelho em pastilha de KBr, e em seguida os espectros de infravermelho na lamínula de ouro, com quitosana adsorvida.

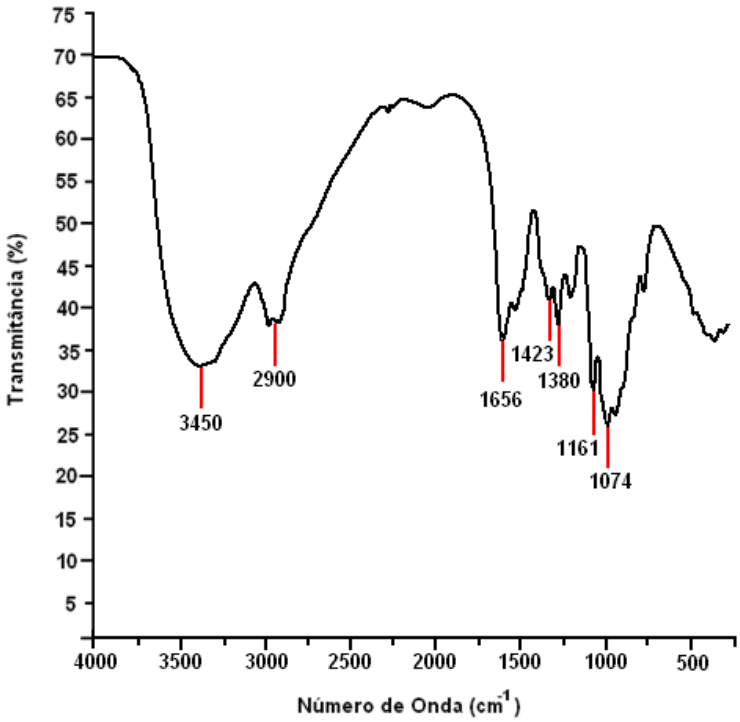

Figura 24 – Espectro de infravermelho da quitosana em pastilha de KBr. *A intensidade é dada em porcentagem de transmitância em função do número de onda.*

O espectro da figura 24 apresenta uma banda característica do biopolímero quitosana em 3450 cm^{-1} como conseqüência dos grupos OH ligados na estrutura, e as ligações intra e intermoleculares presentes na própria cadeia e entre cadeias. A banda de 2900 cm^{-1} refere-se à deformação axial do grupo CH_2. Outra absorção comum da quitosana é uma banda forte em 1074 cm^{-1}, que é atribuída à deformação axial C—O—C do anel glicopiranosídeo. A absorção referente à ligação beta glicosídica entre os carbonos 1 e 4 ocorre em 1161 cm^{-1}. As absorções em 1423 e 1380 cm^{-1} representam a deformação angular de CH_2 e CH, respectivamente. A banda denominada de amida I, com número de onda em 1656 cm^{-1}, indica a deformação axial de C=O e N—H associados a pontes de hidrogênio. A intensidade de absorção dessa banda está diretamente ligada ao grau de desacetilação do biopolímero (Silverstein et al., 2000).

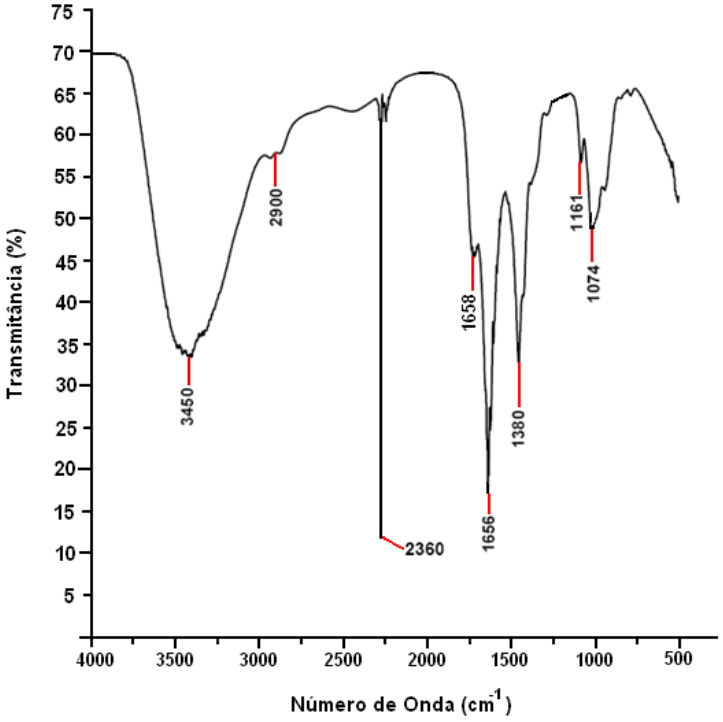

Figura 25 – Espectro de infravermelho da quitosana adsorvida sobre a lamínula de ouro. *A intensidade é dada em porcentagem de transmitância em função do número de onda.*

O espectro da figura 25 confirma a estrutura química da quitosana em forma de filme fino sobre a lamínula de ouro, com apenas algumas diferenças, principalmente na forma e intensidade dos picos. A banda de OH, em 3450 cm^{-1}, se torna mais intensa (absorbância em 1,56 u.a.) devido à presença de grupos OH remanescentes da água da diluição com ácido acético. A banda fina que aparece em 2360 cm^{-1} é característica de gás CO_2 (Silverstein et al., 2000). Segundo (Müller et al., 1998) e (Pavia et al. 2000) o aumento de intensidade de absorbância (2,3 u.a.) em 1656 cm^{-1} se deve a possível formação de pontes de hidrogênio do grupo N—H da amida I com OH remanescente da umidade da água junto ao ácido acético que dissolveu a quitosana. As outras bandas ratificam a presença de moléculas de quitosana na superfície de ouro da lamínula.

Análises qualitativas do filme de quitosana em lamínulas de ouro foram realizadas utilizando a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV. As figuras 26 e 27 mostram, respectivamente, as micrografias obtidas das lamínulas; (o branco) e a lamínula com quitosana depositada (protocolo 3.4.3).

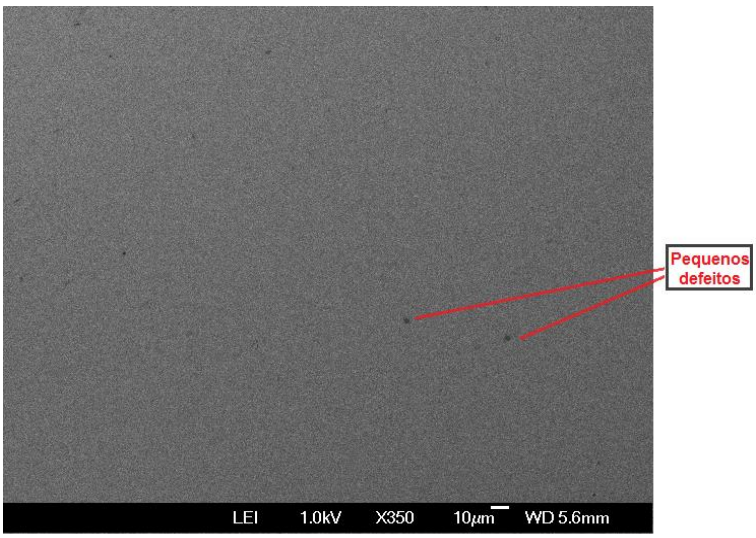

Figura 26 – Micrografia eletrônica de varredura. *A imagem mostra uma lamínula de ouro utilizada como amostra branca (branco). Notam-se pequenos defeitos de nível atômico na superfície durante a deposição do ouro por Sputtering.*

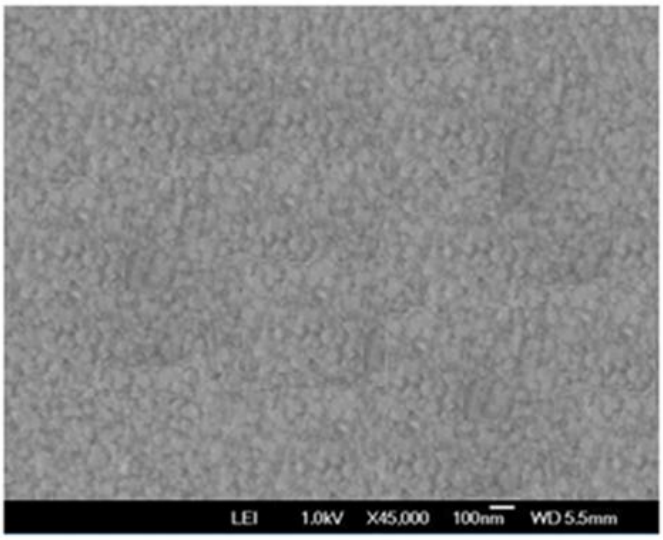

Figura 27 – Micrografia eletrônica de varredura. *Lamínula de ouro coberta com um filme de quitosana. Nota-se a formação de uma superfície nanoporosa, em forma de montanhas e vales.*

A superfície de quitosana encontrada é formada por núcleos parcialmente circulares distribuídos ao longo do filme configurando uma estrutura do tipo “montanhas e vales”. Esses núcleos são provavelmente, aglomerados de cadeias poliméricas resultantes da interação em meio aquoso e da subseqüente deposição conjunta sobre o substrato sólido de ouro. Segundo Claesson (Claesson et al., 1992), uma característica comum deste filme em escala nanométrica é uma topografia irregular e nanoporosa.

Após a identificação da adsorção de quitosana na superfície metálica, partiu-se para os testes com a técnica de SPRi, com o intuito de se obter informações das interações do biopolímero, com filme nanomolecular. A figura 28 mostra a cinética de adsorção da quitosana em superfície de ouro, de acordo com o protocolo 3.4.5.

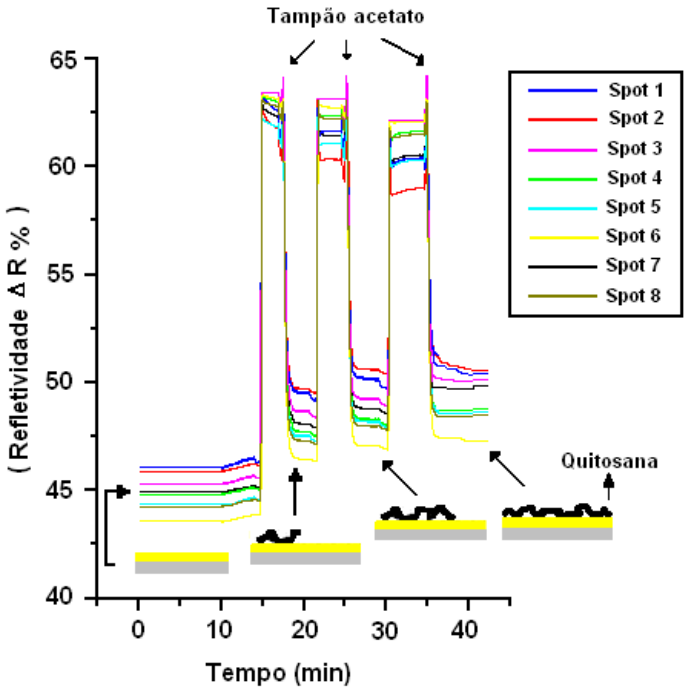

Figura 28 – Variação da refletividade em função do tempo de adsorção de quitosana. *São indicados os momentos de injeção da quitosana (10mg/mL). As injeções de tampão indicadas referem-se ao tampão Acetato 50 mM em pH 4,0.*

Pode-se observar na figura 28, que a injeção das soluções de quitosana em meio ácido, causam mudança na refletividade da superfície de ouro/tampão. Na faixa de pH entre 3,5 a 4,0, os grupos amino (NH_2) estão protonados (NH_3^+) e portanto, essas cargas fazem com que o biopolímero assuma uma determinada conformação molecular estendida, lhe conferindo muitos pontos de interação com a superfície e consequentemente maior eficiência de adsorção (Oss, Van Good & Chaudhury, 1986).

Nas imagens de SPRi, o clareamento (aumento de refletividade) de uma determinada região em comparação com outra, indica a ocorrência de adsorção. As imagens da figura 29 mostram que, do momento anterior à injeção da quitosana (imagem A) até 25 minutos após o início da adsorção (imagem C) ocorrem variações na imagem, que é mais clara em (C) do que em (A).

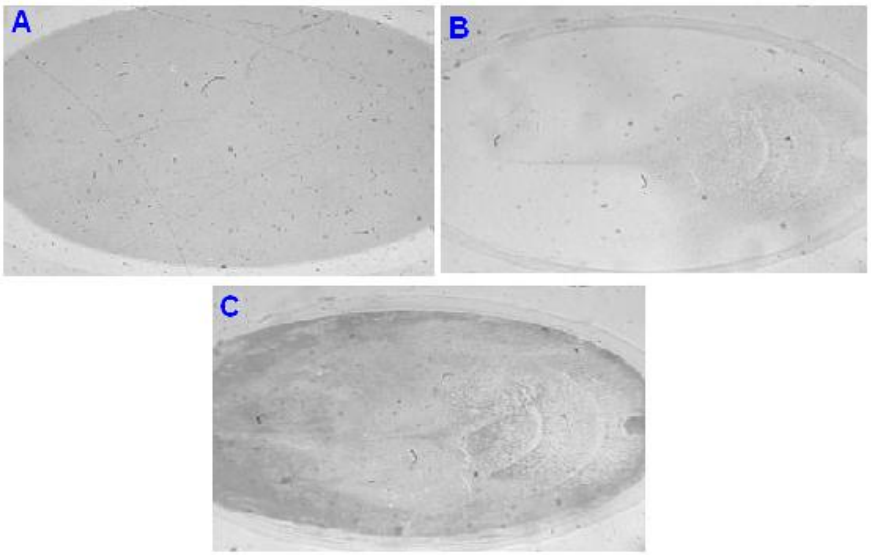

Figura 29 – Imagens obtidas por SPRi na adsorção de quitosana sobre o eletrodo de ouro. *(A) Prisma antes da injeção de quitosana, (B) Prisma após 10 minutos de adsorção da quitosana, (C) Prisma após a última lavagem com tampão acetato.*

Utilizando as equações 5 e 6 no cálculo da espessura da camada de quitosana e quantidade de material adsorvido, em meio ácido, e admitindo-se os

valores de (Δ(%R) = 4,0), (Δ(%R)/Δn = 2739,41), (n_{eff} = 1,3350), (*nb* = *nAcetato 50mM* = 1,3336) e (*na* = *nQuitosana* = 1,50 (Huang et al., (2003), Sorlier et al., (2003) e Fujimoto et al., (2002)) calculou-se que a monocamada de quitosana tinha 9,0 Å (0,9 nm) de espessura e a quantidade de material adsorvido era de 1,001 ng/mm^2 (tabela 3).

Tabela 3. Valores obtidos na formação de uma monocamada de quitosana.

Spot 7 (Preto)	Monocamada de Quitosana
Δ(%R)	4,0
Δ(%R)/Δn	2739,41
n_{eff}	1,3350
nb = nAcetato 50mM	1,3336
na = nQuitosana	1,5
Espessura (nm ou Å)	0,9 nm ou 9,0 Å
Quantidade de material adsorvido (ng/mm^2)	1,01 ng/mm^2

Consultando a literatura, verificou-se que os valores de espessura e quantidade de material adsorvido obtidos neste trabalho, são compatíveis com uma monocamada de quitosana. Outros trabalhos publicados indicam espessuras variando de 7 Å a 10Å para uma monocamada de quitosana, dependendo do grau de desacetilação (Huang et al., (2003), Sorlier et al., (2003) e Fujimoto et al., (2002)).

4.2 Formação de camadas fosfolipídicas sobre uma superfície de ouro modificada: um sistema mimético de membranas biológicas

A camada de quitosana ligada na superfície do ouro proporciona um suporte para acomodação dos lipossomos e uma “blindagem” à superfície de ouro, de forma a prevenir o contato direto entre as biomoléculas a serem estudas (como as proteínas anti cit c e cit c) e a superfície metálica. Após a modificação da superfície

de ouro, foi então, estudado se ocorre, e de que maneira acontece, a ligação entre a quitosana e os fosfolipídeos. A eficácia desse sistema multicamadas (quitosana/fosfolipídeos) na adsorção de vesículas foi descrito anteriormente (Fäldt, Bergenstähl & Claesson (1993); Oss, Van, Good & Chaudhury (1986)). No entanto, é importante fazer uma caracterização considerando os lipídeos e a quitosana que serão empregados neste projeto. Desta forma, testamos a viabilidade de utilização da quitosana como suporte para adsorção de lipossomos constituídos de 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-Biotinil (N-Biotinil PE) e L-α-Fosfatidil-DL-Glicerol (PG), para formação de mono ou bicamadas miméticas. Foram realizados experimentos qualitativos e quantitativos através das técnicas de FT-IR e SPRi, respectivamente.

Inicialmente foi obtido o espectro de infravermelho, do fosfolipídeo em pastilha de KBr, preparado de acordo com o protocolo 3.4.4, como mostra a figura 30. As bandas entre 3450 e 3224 cm^{-1} representam a deformação axial de OH associada a pontes de hidrogênio. As absorções na faixa de 2931 a 2854 cm^{-1} estão associadas à deformação axial de C—H alifático. A banda em 2360 cm^{-1} é característica de gás CO_2. A banda em 1735 cm^{-1} é representado pela deformação axial de grupos ésteres alifático, tal como, C=O e C—O. A absorção em 1647 cm^{-1} refere-se à deformação axial de intensidade fraca da ligação insaturada de grupos etilenos C=C. A banda de absorção em 1465 cm^{-1} destaca a deformação angular dos grupos C—H e CH_2. Duas absorções de extrema importância são as que ocorrem em 1245 cm^{-1} e entre 723 e 817 cm^{-1}, pois representam a deformação axial de grupos fosfatos alifático P=O, P—O e P—O—C, respectivamente; característicos de fosfolipídeos. As bandas em 1064 cm^{-1} e 1020 cm^{-1}, representam respectivamente, a deformação

axial de C—O—C e a deformação axial de amina primária C—N (Silverstein et al., 2000).

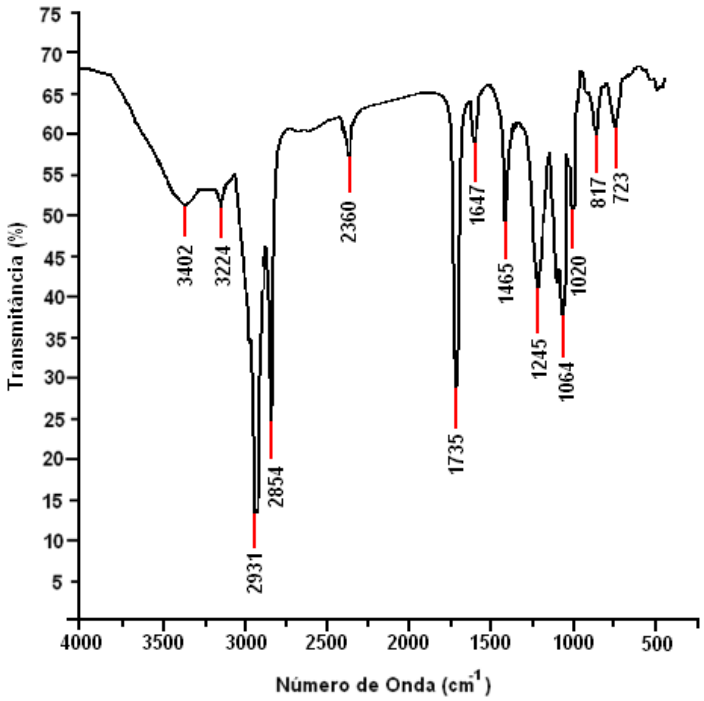

Figura 30 – Espectro de infravermelho da pastilha de KBr de PG /N-Biotinil PE. *A intensidade é dada em porcentagem de transmitância em função do número de onda.*

O espectro de infravermelho apresentado na figura 31 demonstra a formação das camadas moleculares de quitosana e lipídeo, de acordo com o protocolo 3.4.4. A banda de 3450 cm^{-1} representa as hidroxilas associadas a pontes de hidrogênio, tanto da quitosana quanto do fosfolipídeo. A absorção em 2927 cm^{-1} e 2854 cm^{-1} referem-se à deformação axial de C—H do fosfolipídeo e da quitosana, respectivamente. Em 2360 cm^{-1}, esse número de onda indica absorção do gás CO_2. Duas bandas importantes que representam o fosfolipídeo foram identificadas em 1735 cm^{-1}, que se refere à deformação axial de ésteres alifáticos C=O e C—O, e a outra em 821 cm^{-1}, que se refere à deformação axial de P—O—C. Também a banda em 1458 cm^{-1}, relativo à deformação axial de C—H e CH_2, ratifica a presença do

fosfolipídeo. As bandas de amida I, números de onda 1656 cm^{-1} e 1650 cm^{-1} com deformação axial de C=O e N—H, e a do anel glicopiranosídeo, em 1074 cm^{-1}, com deformação axial de C—O—O, e a ligação C—C—N, em 1380 cm^{1}, confirmam a presença da quitosana (Silverstein et al., 2000).

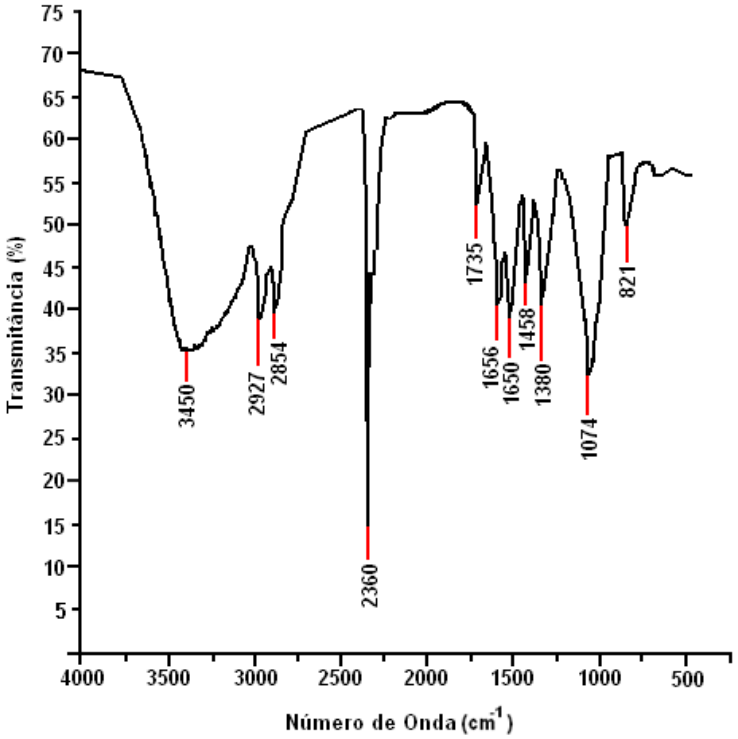

Figura 31 – Espectro de infravermelho caracterizando a adsorção do fosfolipídeo na quitosana, tendo como substrato uma lamínula de ouro. *A intensidade é dada em porcentagem de transmitância em função do número de onda.*

As formas e intensidades das bandas do filme de quitosana e fosfolipídeo podem ser explicadas pelo modo de adsorção durante a formação das mesmas na superfície de ouro. O micro ambiente é altamente influenciado por um arranjo geométrico dos principais grupos funcionais que compõem essas biomoléculas, tais como, amida, amina, fosfato, hidroxila; que sofrem fenômenos chamados de “efeitos de vizinhança”, caracterizados por forças intra e intermoleculares, determinando

assim suas conformações e orientações moleculares Fang et al., (2001); Chittur et al., (1986); e Müller et al., (2001)).

Após a comprovação da formação das camadas de quitosana e fosfolipídeo, determinou-se quantitativamente, através da técnica de SPRi, a adsorção do fosfolipídeo sobre a quitosana. O gráfico da figura 32 esboça a cinética de adsorção do polissacarídeo e dos fosfolipídeos, de acordo com o protocolo 3.4.5. Nota-se que ocorre uma grande variação da refletividade quando uma solução de fosfolipídeo composta por lipossomos de N-Biotinil PE / PG entra em contato com a camada de quitosana. Verifica-se que mesmo após a lavagem com tampão, a camada de fosfolipídeo mantém-se ligada na quitosana. De acordo com Richter & Brisson (2003) e Naumann et al. (2003) ocorrem interações eletrostáticas entre as moléculas de quitosana e o fosfolipídeo aniônico presente nas vesículas. Huang et al., (2003), Sorlier et al., (2003), Fang et al., (2001) definem que os policátions, como a quitosana, não só induzem a agregação de vesículas compostas, no mínimo de 10% de lipídio aniônico, tal como, o Fosfatidil Glicerol – PG, como também, promovem a fusão destas vesículas. Estes autores relataram também as condições necessárias para que cada um destes processos ocorra, sendo que o mecanismo de interação passa pela desintegração, se houver sítios suficientes nos lipossomos para interagirem com uma quantidade também suficiente de quitosana, e haverá a fusão se a neutralização de cargas ocorrer.

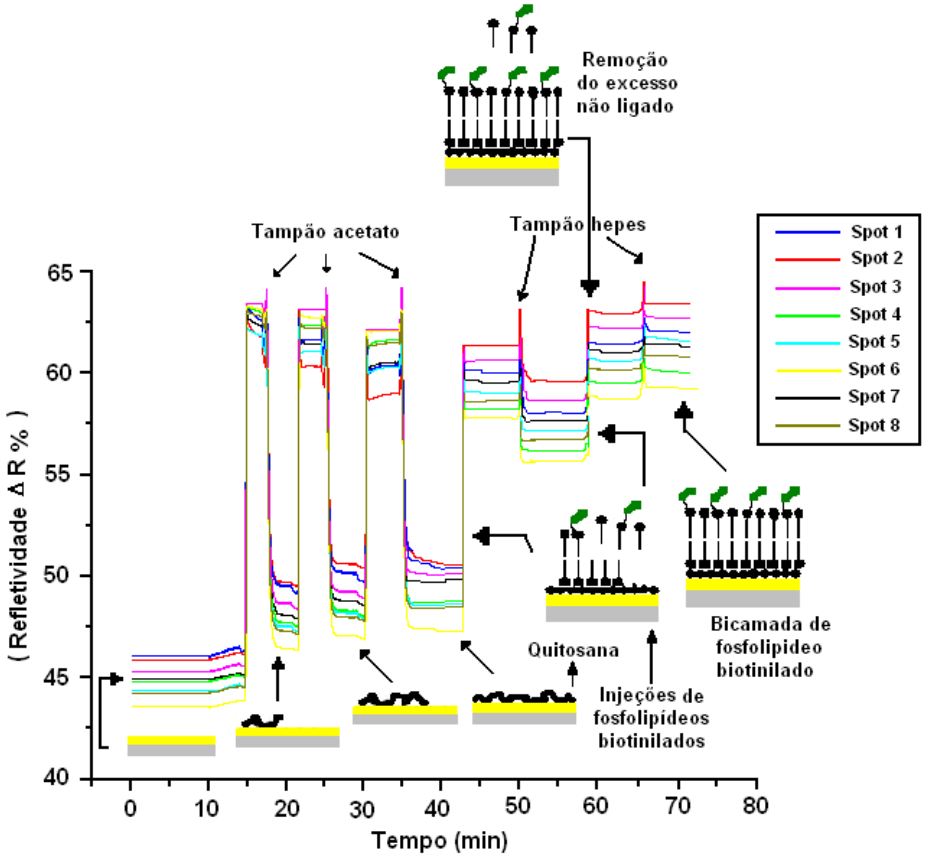

Figura 32 – Variação da refletividade em função do tempo durante a adsorção dos fosfolipídeos formados por PG / N-Biotinil PE em meio tamponado sobre monocamada de quitosana. *São indicados os momentos das adsorções dos fosfolipídeos. As injeções de tampão indicadas referem-se ao tampão Hepes 5 mM em pH 7,4 .*

Através das equações 5 e 6 foram calculados, a espessura da camada de fosfolipídeo e a sua quantidade adsorvida (tabela 4). Obtém-se o valor de 34,5 Å (3,45 nm) para a espessura e 2,399 ng/mm^2 para a quantidade de material adsorvido.

Tabela 4. Valores obtidos para uma bicamada de fosfolipídeos.

Spot 3 (Rosa)	Bicamada de Fosfolipídeos
(%ΔR)	8,0
(%ΔR)/Δn	2317,96
n_{eff}	1,3368
nb = nHepes 5mM	1,3335
na = nFosfolipídeos	1,46
Espessura (nm ou Å)	3,45 nm ou 34,5 Å
Quantidade de material adsorvido (ng/mm^2)	2,399 ng/mm^2

Consultando a literatura verificou-se que as espessuras das monocamadas de fosfolipídeos têm valores variando de 16 Å a 19 Å. O valor da espessura do filme de lipídeo em 34,5 Å é compatível com a formação de uma bicamada (Williams et al, (1997), Lingler et al. (1997), Plant (1995) e Richter & Brisson (2003)).

Conclui-se através dos resultados obtidos e de consultas na literatura, que o sistema escolhido e caracterizado [quitosana + fosfolipídeo (N-Biotinil PE / PG)] resulta na formação de uma monocamada de quitosana sobre o eletrodo de ouro, e de uma bicamada de fosfolipídeo adsorvido na quitosana. Esse sistema apresenta vantagens perante outros modelos na formação de um ambiente mimético de membrana celular, tais como, aqueles descritos por Benitez & Jimenez (2002), Tumolo e Baptista (2008), nos quais, utilizaram filmes de poli-eletrólitos (Poli-lisina + Heparina + Poli-lisina) e ao final, verificaram que ocorre a agregação descontrolada das vesículas na camada de Poli-lisina, prejudicando a formação de monocamadas ou bicamadas lipídicas. Comparativamente às HBMs, essa construção também apresenta vantagens, pois se trata de uma bicamada lipídica, e não de uma híbrida (tiol hidrofóbico/fosfolipídeo), sendo assim, um modelo mais próximo ao real.

4.3 Estudo da adsorção e desorção de estreptoavidina em fosfolipídeos marcados com biotina

Após desenvolver uma metodologia para funcionalizar o sensor com a bicamada de fosfolipídeo, buscou-se uma estratégia para quantificar a concentração do citocromo c. Quimicamente essa estratégia constitui-se de utilizar a grande afinidade entre a biotina e a estreptoavidina ((Green et al., (1990-2000) e Herron et al., (1992)).

O lipídeo contendo biotina liga a estreptoavidina, que age como um ligante da próxima monocamada, pois a estreptoavidina têm quatro sítios ligantes equivalentes para a biotina, permitindo a construção de mais camadas moleculares (Jung et al., 2000). O complexo biotina-estreptoavidina possui uma constante de afinidade de 10^{15} L/mol. O grande valor dessa constante deve-se a um reconhecimento molecular, mediado por pontes de hidrogênio, forças de Van der Waals e efeito hidrofóbico entre as cadeias laterais de aminoácidos específicos, que compõem as duas proteínas (Herron et al., 1992). Esta é uma estratégia muito utilizada na literatura para a construção de filmes moleculares (Stayton et al., 1999). Sendo assim, dando sequência na construção do biosensor, foram realizados experimentos injetando-se estreptoavidina sob a bicamada de fosfolipídeo biotinilado, como descrito no protocolo 3.5.

Observe na figura 33 que depois da injeção de estreptoavidina, 73 minutos após o início, há aumento na refletividade, indicando que houve ligação nas moléculas de biotina dos fosfolipídeos.

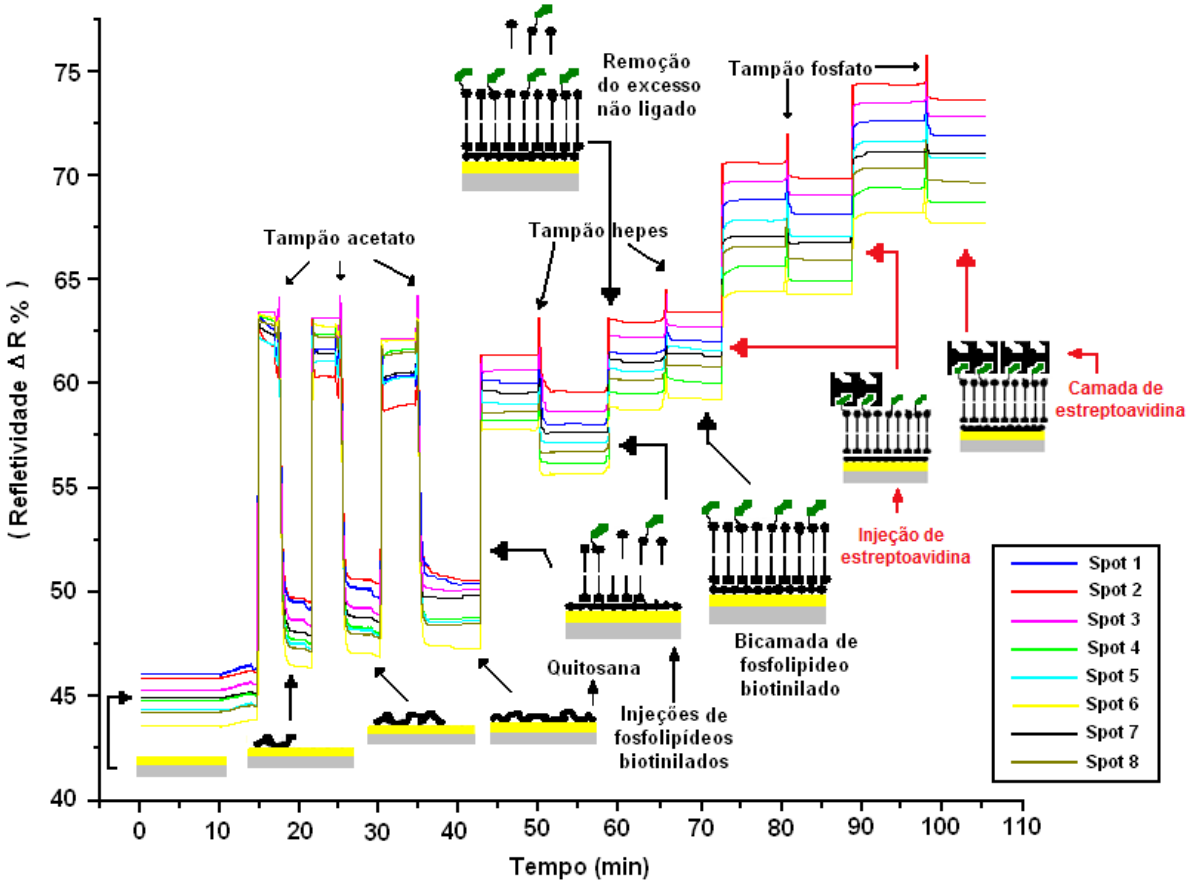

Figura 33 – Variação da refletividade em função do tempo de adsorção para cada um dos componentes do sistema multicamadas formado por quitosana / PG : N-Biotinil PE / estreptoavidina, em meio tamponado. *São indicados os momentos das adsorções de cada componente. Na última etapa ocorre a saturação da monocamada de estreptoavidina. As injeções de tampão indicadas referem-se aos tampões Acetato 50mM em pH 4,0, Hepes 5 mM em pH 7,4 e Fosfato 50mM em pH 7,4 .*

Aplicando as equações 5 e 6 foram calculados a espessura da camada e a quantidade de material adsorvido de estreptoavidina, obtendo-se o valor de 48,9 Å (4,89 nm) para a espessura e 3,089 ng/mm^2 de quantidade de material adsorvido (tabela 5). Este valor de espessura corresponde a uma monocamada, de acordo com os trabalhos de (Paudler & Riegler (1992)), os quais indicam espessuras variando de 45 a 50 Å para uma monocamada de estreptoavidina.

Tabela 5. Valores obtidos para uma camada de estreptoavidina.

Spot 2 – (Vermelho)	Monocamada de Estreptoavidina
(%ΔR)	10,0
(%ΔR)/Δn	2280,37
n_{eff}	1,3376
nb = nFosfato 50mM	1,3333
na = nEstreptoavidina	1,45
Espessura (nm ou Å)	4,89 nm ou 48,9 Å
Quantidade de material adsorvido (ng/mm^2)	3,089 ng/mm^2

Para comprovar a especificidade da interação com a biotina, foi realizado um estudo com fosfolipídeos não marcados com biotina, que está apresentado no gráfico mostrado na figura 34.

Analisando o resultado obtido na ausência de fosfolipídeo biotinilado (figura 34), observa-se que ocorre um aumento na refletividade, após a injeção de solução de estreptoavidina 0,15mM (90 minutos). Entretanto, visualiza-se que após a lavagem com tampão fosfato (100 minutos), a refletividade decresce ao patamar anterior à injeção de estreptoavidina. Isso comprova que a estreptoavidina não interage com lipídeo que não possui biotina. Portanto, pode-se concluir que a presença da biotina marcada no fosfolipídeo é de fundamental importância para a interação com estreptoavidina e para a continuidade no desenvolvimento do biosensor.

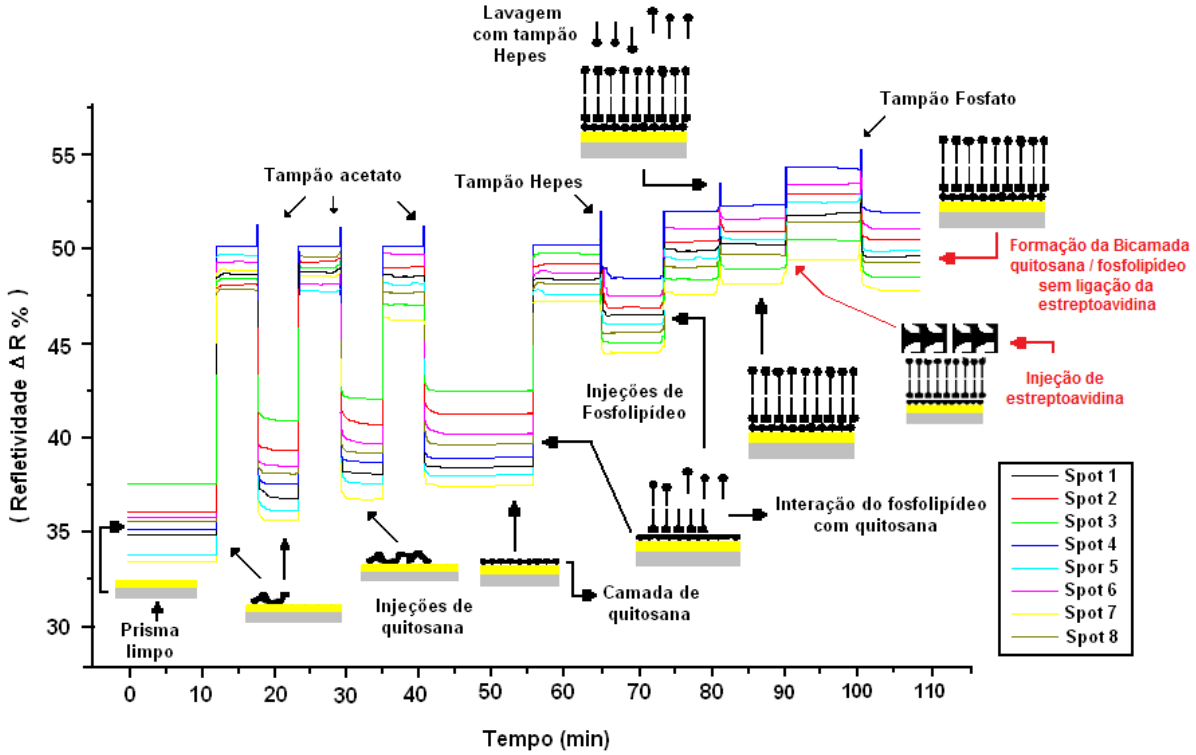

Figura 34 – Variação da refletividade em função do tempo de adsorção para cada um dos componentes do sistema multicamadas formado por Quitosana / N, N-Dimetil PE : PG / Estreptoavidina em meio tamponado. *São indicados os momentos das adsorções de cada componente. Neste experimento, o fosfolipídeo não está marcado com biotina. As injeções de tampão indicadas referem-se aos tampões Acetato 50mM em pH 4,0, Hepes 5 mM em pH 7,4 e Fosfato 50mM em pH 7,4 .*

4.4 Imunosensor Anti Cit c, marcado com biotina, imobilizado por estreptoavidina

O gráfico da figura 35 ilustra a cinética de adsorção do anti cit c na estreptoavidina, de acordo com o protocolo experimental 3.6. Nos tempos de 104 e 120 minutos, as injeções de anti cit c, causam aumento de refletividade caracterizando sua adsorção na monocamada de estreptoavidina. Após a lavagem com tampão fosfato (127 minutos), observa-se a formação da camada de anti cit c.

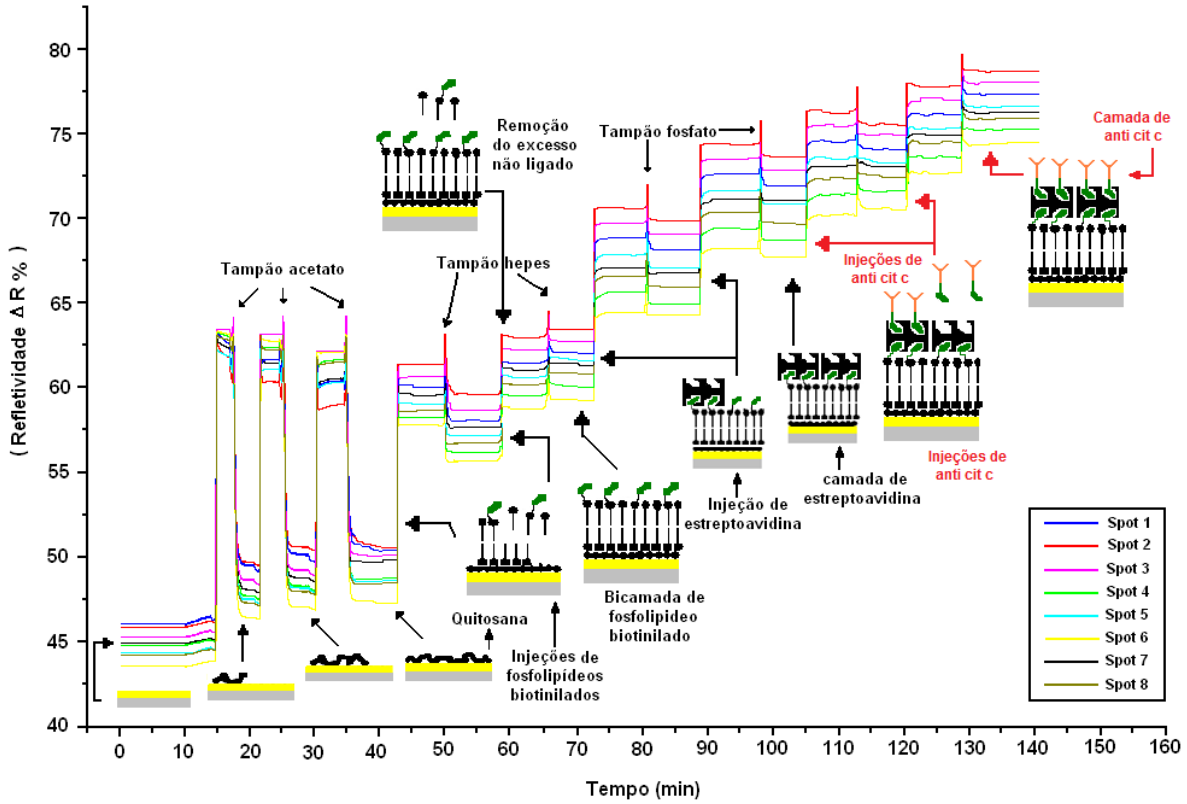

Figura 35 – Variação da refletividade em função do tempo de adsorção para cada um dos componentes do sistema multicamadas formado por Quitosana / N-Biotinil PE : PG / Estreptoavidina / Anti Cit c, todos em meio tamponado. *São indicados os momentos das adsorções de cada componente. As injeções de tampão indicadas referem-se aos tampões Acetato 50mM em pH 4,0, Hepes 5 mM em pH 7,4 e Fosfato 50mM em pH 7,4 .*

Calculou-se a variação de refletividade para cada injeção de anti cit c, em que na primeira obteve-se $(\%\Delta R_1)_=$ 2,0 e na segunda $(\%\Delta R_2)_=$ 3,0, totalizando um $(\%\Delta R_{Total})_=$ 5,0. Através desses valores de variação de refletividade, calculou-se a quantidade de anti cit c adsorvido para cada etapa, em que $(\Delta R\%_1)$ $\Gamma_{1=}$ 0,57 ng/mm^2, $(\Delta R\%_2)$ $\Gamma_{2=}$ 0,94 ng/mm^2 obtendo-se um total de $(\%\Delta R_{Total})$ $\Gamma_{Total=}$ 1,51 ng/mm^2. A tabela 6 demonstra os valores descritos anteriormente.

Tabela 6. Valores obtidos de variação de refletividade e quantidade de material adsorvido.

Spot 7 – (Preto)	Anti cit c [10mg/mL]
(%ΔR_1) 1ª Injeção	2,0
(%ΔR_2) 2ª Injeção	3,0
(%ΔR) Total	5,0
Quantidade de material adsorvido (Γ) (ng/mm^2) 1ª Injeção	0,57
Quantidade de material adsorvido (Γ) (ng/mm^2) 2ª Injeção	0,94
Quantidade de material adsorvido (Γ) (ng/mm^2) Total	1,51

Conclui-se que a estratégia desenvolvida para imobilizar o anticorpo sobre a bicamada lipídica, mantendo-o afastado da superfície de ouro foi alcançada; finalizando desse modo, a construção do biosensor. O anti cit c irá reconhecer o cit c, detectando a sua concentração mínima por reconhecimento bioquímico, através da técnica espectroscópica de SPRi.

4.5 Estudo da associação do antígeno cit c, com sensor de membrana, contendo anticorpo anti cit c ligado através da interação biotina/estreptoavidina

Nesta etapa, apresentam-se as cinéticas de adsorção de todas as etapas de construção do biosensor, descritas previamente, incluindo também a parte final na qual o cit c é injetado com concentrações variando de 50nM a 0,001nM.

Estão apresentadas na figura 36 as mudanças de refletividade após a injeção de cit c 50 nM nos tempos 150 minutos, 167 minutos e 182 minutos. Observa-se que após cada injeção, a linha base mantém-se em um patamar de refletividade acima da linha base anterior, caracterizando a ligação irreversível das duas proteínas. Note também que, a variação de refletividade de cit c varia de acordo com a injeção, sendo que, na primeira fica em torno de (%ΔR_1)$_=$ 2,5, na segunda em torno de

$(\%\Delta R_2)_=$ 1,25 e a terceira também em torno de $(\%\Delta R_3)_=$ 1,25. No total, tem-se aproximadamente um $(\%\Delta R_{Total})_=$ 5,0, com pequena variação entre os diferentes spots. Esses valores são equivalentes a adsorção de cit c ($\Delta R\%_1$) $\Gamma_{1=}$ 0,76 ng/mm^2, ($\Delta R\%_2$) $\Gamma_{2=}$ 0,38 ng/mm^2, ($\%\Delta R_3$) $\Gamma_{3=}$ 0,38 ng/mm^2 e ($\%\Delta R_{Total}$) $\Gamma_{Total=}$ 1,52 ng/mm^2 respectivamente. A tabela 7 ilustra os valores acima descritos. Comparando-se os valores de quantidade de material adsorvido da primeira e terceira injeção da tabela 7, nota-se que o valor da terceira injeção cai pela metade do valor da primeira. Isso ocorre provavelmente devido à saturação dos sítios de ligação do anti cit c.

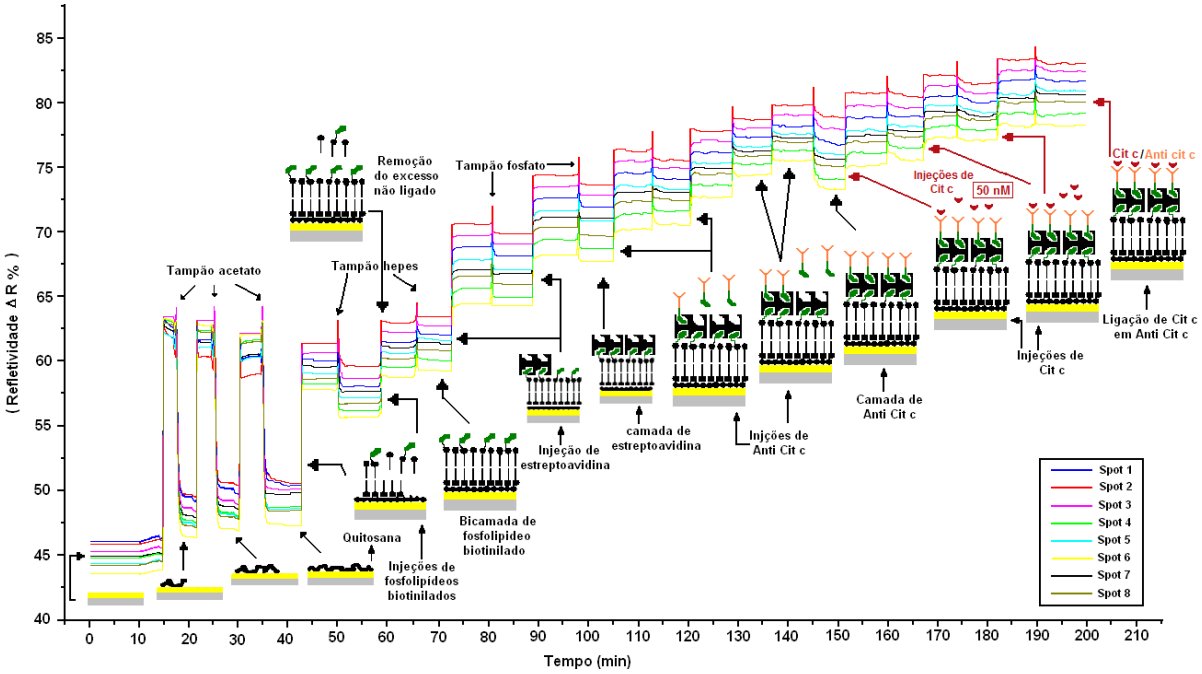

Figura 36 – Variação da refletividade em função do tempo de adsorção para cada um dos componentes do sistema formado por quitosana / fosfolipídeo biotinilado / estreptoavidina / anti cit c / cit c 50nM, todos em meio tamponado. São indicados os momentos das adsorções de cada componente.

Tabela 7. Valores obtidos de variação de refletividade e quantidade de material adsorvido.

Spot 8 – (Verde Musgo)	Cit c [50nM]
(%ΔR_1) 1ª Injeção	2,5
(%ΔR_2) 2ª Injeção	1,25
(%ΔR_3) 3ª Injeção	1,25
(%ΔR) Total	5,0
Quantidade de material adsorvido (Γ) (ng/mm^2) 1ª Injeção	0,76
Quantidade de material adsorvido (Γ) (ng/mm^2) 2ª Injeção	0,38
Quantidade de material adsorvido (Γ) (ng/mm^2) 3ª Injeção	0,38
Quantidade de material adsorvido (Γ) (ng/mm^2) Total	1,52

Repetiu-se o mesmo experimento, porém utilizando 1nM de concentração de cit c (figura 37). Obteve-se os valores de (%ΔR_1)$_=$ 1,5, (%ΔR_2)$_=$ 1,0 e (%ΔR_3)$_=$ 0,5; no total, tem-se aproximadamente um (%ΔR_{Total})$_=$ 3,0. Após os tempos de injeção (157 minutos, 174 minutos e 190 minutos) observa-se, uma diferença nos patamares das linhas bases, antes e depois das injeções, sinalizando a ligação das biomoléculas. A tabela 8 mostra os valores de cit c adsorvido. Note que a concentração de cit c adsorvida quando se injeta 1 nM (0,87ng/mm^2) é apenas 57% inferior a concentração de cit c que se adsorve após a injeção de solução 50 vezes mais concentrada (50nM) de cit c (1,52ng/mm^2). A falta de proporcionalidade é comum em análises quantitativas dependentes de anticorpos e é devido às altas constantes de afinidades e facilidade em saturar os sítios de ligação na superfície.

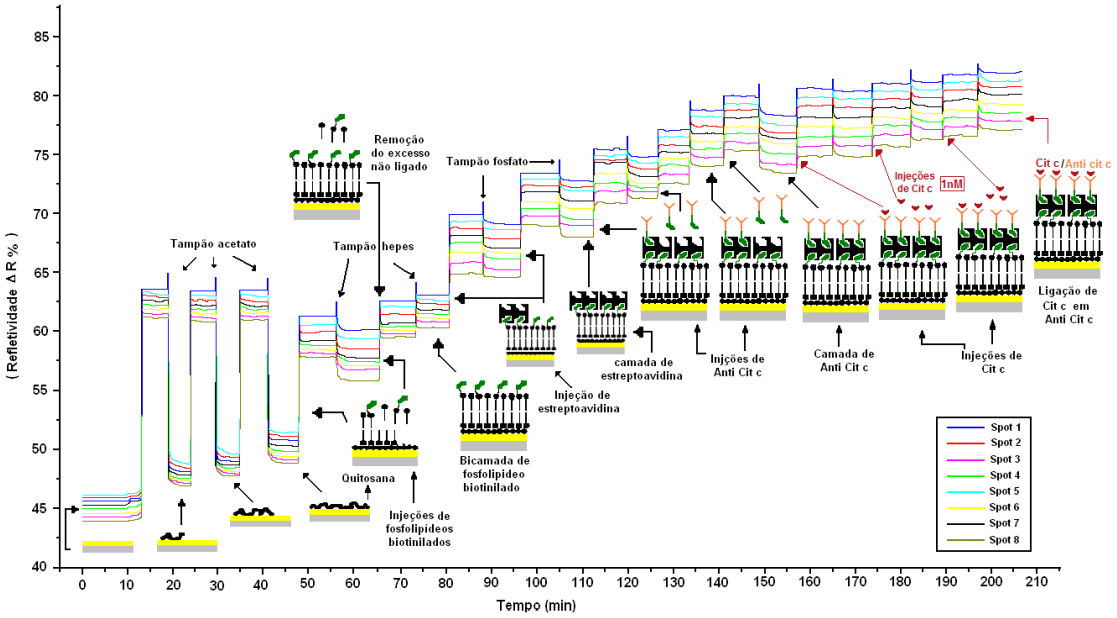

Figura 37 – Variação da refletividade em função do tempo de adsorção para cada um dos componentes do sistema formado por quitosana / fosfolipídeo biotinilado / estreptoavidina / anti cit c / cit c 1nM, todos em meio tamponado. *São indicados os momentos das adsorções de cada componente.*

Tabela 8. Valores obtidos de variação de refletividade e quantidade de material adsorvido.

Spot 4 – (Verde claro)	**Cit c [1nM]**
(%ΔR_1) 1ª Injeção	1,5
(%ΔR_2) 2ª Injeção	1,0
(%ΔR_3) 3ª Injeção	0,5
(%ΔR) Total	3,0
Quantidade de material adsorvido (Γ) (ng/mm^2) 1ª Injeção	0,44
Quantidade de material adsorvido (Γ) (ng/mm^2) 2ª Injeção	0,29
Quantidade de material adsorvido (Γ) (ng/mm^2) 3ª Injeção	0,14
Quantidade de material adsorvido (Γ) (ng/mm^2) Total	0,87

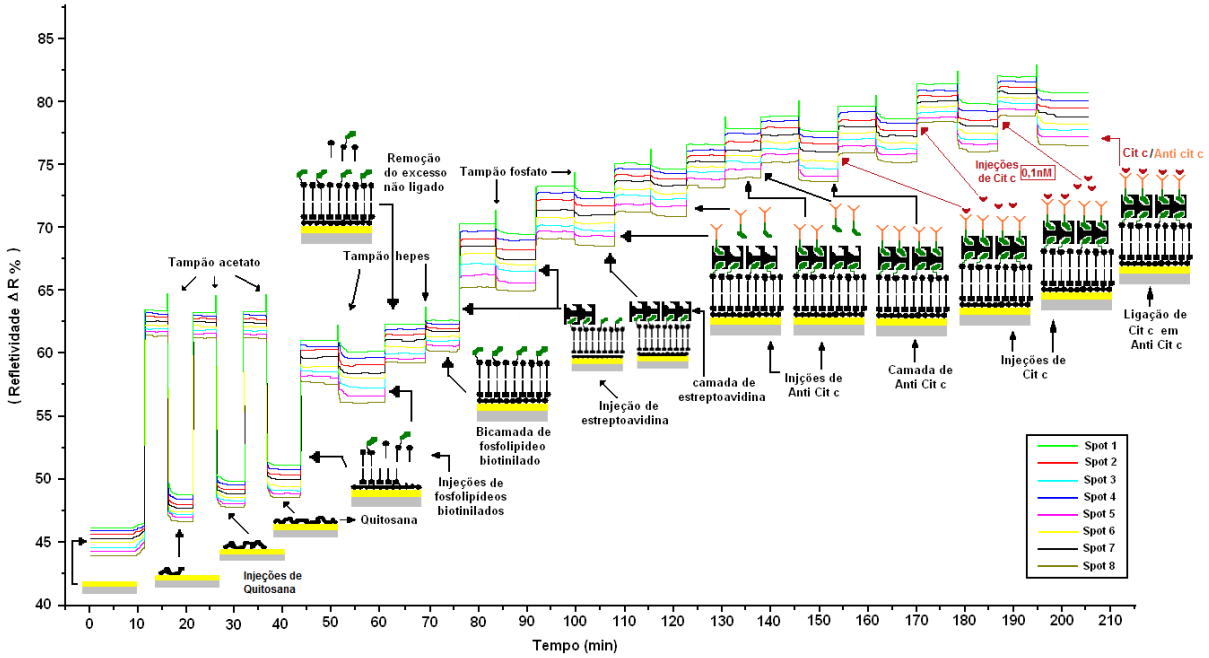

Figura 38 – Variação da refletividade em função do tempo de adsorção para cada um dos componentes do sistema formado por quitosana / fosfolipídeo biotinilado / estreptoavidina / anti cit c / cit c 0,1nM, todos em meio tamponado. *São indicados os momentos das adsorções de cada componente.*

Diminuindo-se ainda mais a concentração de cit c (0,1nM), observa-se pelo gráfico da figura 38 que houve mudanças dos valores de ΔR%, após as injeções nos tempos 155 minutos, 170 minutos e 186 minutos. Alcançou-se os valores $(\%\Delta R_1)_=$ 1,25, $(\%\Delta R_2)_=$ 1,0 e $(\%\Delta R_3)_=$ 0,5; no total, tem-se aproximadamente um $(\%\Delta R_{Total})_=$ 2,75. A tabela 9 demonstra os valores de cit c adsorvido no biosensor.

Tabela 9. Valores obtidos de variação de refletividade e quantidade de material adsorvido.

Spot 8 – (Verde musgo)	**Cit c [0,1nM]**
(%ΔR) 1ª Injeção	1,25
(%ΔR) 2ª Injeção	1,0
(%ΔR) 3ª Injeção	0,5
(%ΔR) Total	2,75
Quantidade de material adsorvido (Γ) (ng/mm^2) 1ª Injeção	0,37
Quantidade de material adsorvido (Γ) (ng/mm^2) 2ª Injeção	0,29
Quantidade de material adsorvido (Γ) (ng/mm^2) 3ª Injeção	0,14
Quantidade de material adsorvido (Γ) (ng/mm^2) Total	0,80

Observa-se na figura 39 nos tempos 153 minutos, 166 minutos e 177 minutos, onde se efetuou as injeções de cit c 0,01nM, que ainda ocorreu uma diferença de refletividade. Obteve-se os valores de variação de refletividade $(\%\Delta R_1)_=$ 1,25, $(\%\Delta R_2)_=$ 0,5 e $(\%\Delta R_3)_=$ 0,25; no total, tem-se aproximadamente um $(\%\Delta R_{Total})_=$ 2,0, totalizando a adsorção de 0,58ng/mm^2 de cit-c. A tabela 10 ilustra os valores de cit c adsorvido no biosensor.

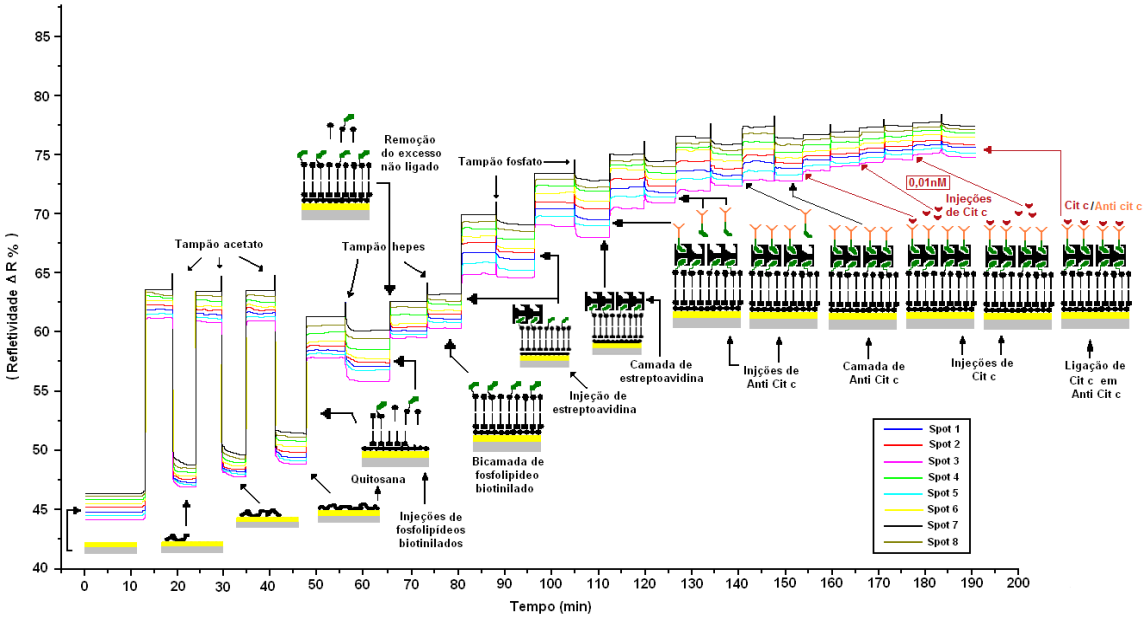

Figura 39 – Variação da refletividade em função do tempo de adsorção para cada um dos componentes do sistema formado por quitosana / fosfolipídeo biotinilado / estreptoavidina / anti cit c / cit c 0,01nM, todos em meio tamponado. *São indicados os momentos das adsorções de cada componente.*

Tabela 10. Valores obtidos de variação de refletividade e quantidade de material adsorvido.

Spot 8 – (Verde musgo)	**Cit c [0,01nM]**
(%ΔR) 1ª Injeção	1,25
(%ΔR) 2ª Injeção	0,5
(%ΔR) 3ª Injeção	0,25
(%ΔR) Total	2,0
Quantidade de material adsorvido (Γ) (ng/mm^2) 1ª Injeção	0,37
Quantidade de material adsorvido (Γ) (ng/mm^2) 2ª Injeção	0,14
Quantidade de material adsorvido (Γ) (ng/mm^2) 3ª Injeção	0,07
Quantidade de material adsorvido (Γ) (ng/mm^2) Total	0,58

Diminui-se mais dez vezes a concentração e de cit c injetando-se (0,001nM). Nota-se na figura 40 que até o tempo 148 minutos, instante esse que antecede as duas injeções de cit c, ocorre às adsorções das biomoléculas, porém após as lavagens com tampão fosfato (tempos 156 minutos e 166 minutos após a injeção) a refletividade diminui até um patamar abaixo da linha base anterior das injeções; indicando que não ocorreram interações fortes suficientes para manter o cit c ligado ao anti cit c por longos períodos de tempo.

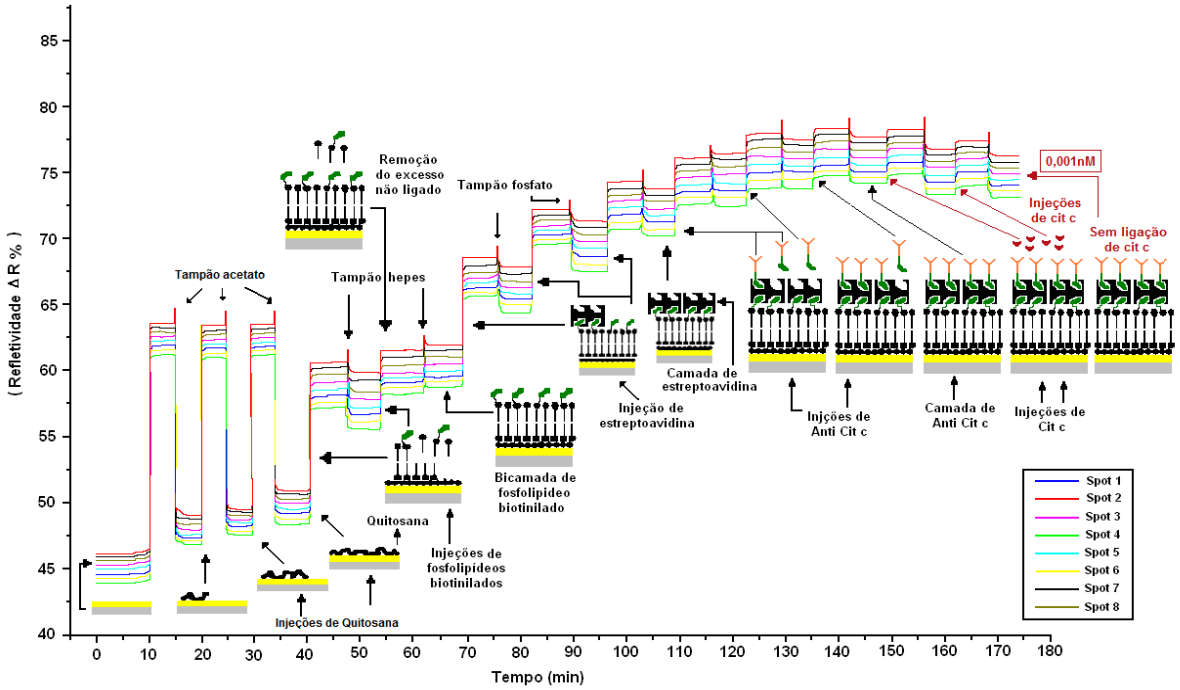

Figura 40– Variação da refletividade em função do tempo de adsorção para cada um dos componentes do sistema formado por quitosana / fosfolipídeo biotinilado / estreptoavidina / anti cit c / cit c 0,001nM (1pM), todos em meio tamponado. *São indicados os momentos das adsorções de cada componente.*

A figura 41 apresenta um gráfico de regressão linear (escala de ln no eixo x) dos valores de variação de refletividade em função da concentração de cit c para o sensor de membrana. Apresenta também, uma equação linear onde se obteve o valor da sensibilidade do sensor; e através do protocolo 3.9, calculou-se o limite de

detecção. A tabela 11 mostra os valores calculados do limite de detecção e sensibilidade para o sensor de membrana. Devido à característica do sensor baseado em superfície com anticorpo saturável, foi necessário graficar os dados na escala ln para se obter uma curva linear. O valor de LOD calculado considerando a medida de desvio padrão do branco em 0,8017 em unidades de refletividade (materiais e métodos) foi de 7 $nmol.L^{-1}$. Esta medida de LOD subestima a capacidade de detecção do cit c e ocorre devido à saturação dos anticorpos da superfície. Note que este valor é muito maior do que a concentração de 10^{-11} $mol.L^{-1}$, que foi claramente medida no sensor com resposta de 2 unidades de reflectância. Sendo assim, a melhor estimativa do limite de detecção do sensor nas condições testadas é o próprio valor de 10^{-11} $mol.L^{-1}$ de cit c. Pela mesma razão é importante também considerar, como medida comparativa da capacidade analítica do sensor, a concentração de cit c que se ligou no sensor na menor concentração injetada. Para o sensor de membrana este valor foi de 0.58 $ng.mm^{-2}$, ou 5,3 x 10^{-14} $mols.mm^{-2}$, na injeção de $10^{-11}mol.L^{-1}$ de cit c.

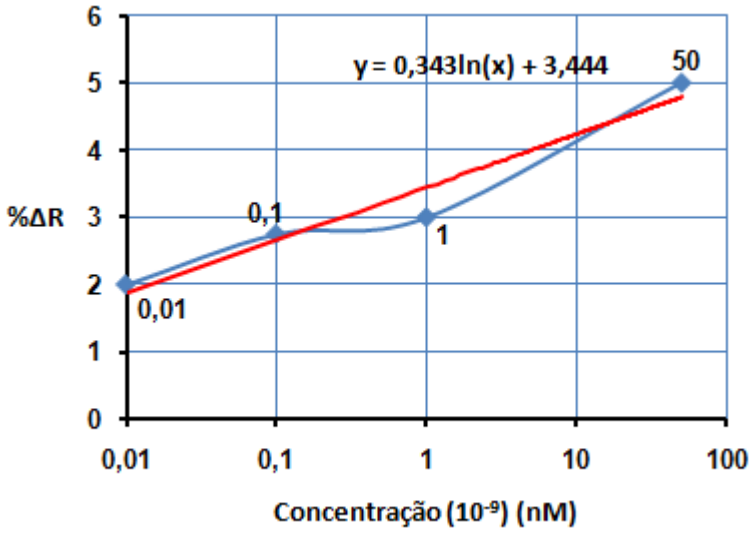

Figura 41 – Valores linearizados (ln) de concentração de cit c em função da variação de refletividade (%ΔR) (Sensor de membrana). Cit c [50nM] = (%ΔR) 5,0), cit c [1nM] = (%ΔR) 3,0, cit c [0,1nM] = (%ΔR) 2,75, cit c [0,01nM] = (%ΔR) 2,0. *Os valores de refletividade foram obtidos através das cinéticas de adsorção de cit c nos gráficos das figuras 36 a 39. Não se considerou o gráfico da figura 40, já que não houve adsorção de cit c.*

Tabela 11. Valores obtidos de limite de detecção (LOD) e sensibilidade.

Biosensor	Sensibilidade (nmol $^{-1}$L)	Limite de Detecção (LOD) (nmol.L^{-1} ou nM)
Sensor de membrana	0,343	7,01

4.6 Biosensor alternativo construído pela interação eletrostática de anti cit c com BSA.

Com o intuito de se testar um biosensor alternativo onde o desenho molecular fosse simplificado, decidiu-se testar a detecção de citocromo c pelo seu anticorpo, adsorvido diretamente sobre uma camada de BSA que neutraliza o filme de ouro e também liga anti cit c por interação eletrostática (figura 42). Nesta construção, a interação do anticorpo com a superfície ocorre ao acaso, e não é garantido a

posição preferencial do anticorpo com relação à superfície, ao contrario da construção anterior onde a interação anti cit c com a superfície é direcionada pela interação estreptoavidina/biotina. BSA na faixa de pH 7,4 é carregada negativamente, podendo interagir com a proteína anti cit c por interação eletrostática (Norde & Lyklema, (1978), Haynes, Sliwinski & Norde (1994) e Norde (1986)). BSA interage fortemente com a superfície de ouro, através de ligações covalentes dos átomos de enxofre (--S--) dos grupos cisteínas (Fasman, (1976), Nori & Hanawa, (2004) e Hirayama et al., (1990)). Há 35 resíduos de cisteína na cadeia de BSA, sendo 17 ligações dissulfeto, fazendo com que essa proteína grande tenha afinidade pela superfície de ouro (Nori e Hanawa, (2004); Hirayama et al., (1990)).

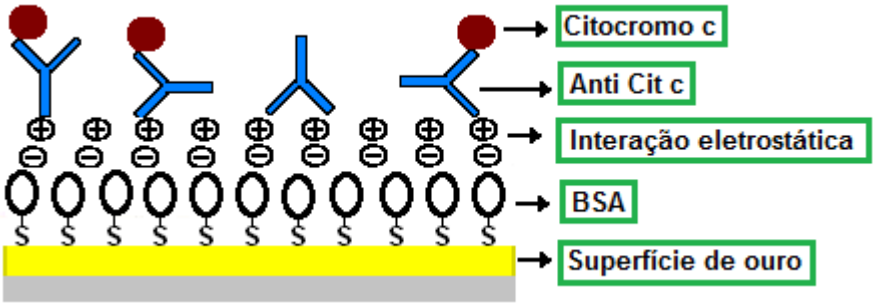

Figura 42 – Desenho esquemático da adsorção dos átomos de enxofre (--S--) através das pontes dissulfeto da cadeia de BSA com a superfície de ouro; e da BSA com as imunoproteínas anti cit c e cit c, todas em meio fosfato tamponado com pH 7,4. *Notam-se as cargas do campo elétrico formado durante as interações.*

Para facilitar a visualização dos resultados obtidos, referentes aos experimentos realizados com BSA, Anti Cit c e Cit c, os gráficos e tabelas a seguir, foram escalonados por ordem de concentração de cit c, do maior para o menor (50nM até 0,001nM). Os valores de concentração de BSA (10mg/mL) e anti cit c (10mg/mL) mantiveram-se sempre os mesmos.

Observa-se na figura 43, que ocorre variação nos valores de ΔR, após as três injeções da solução de BSA, a qual está relacionada à ocorrência de adsorção da

mesma na superfície de ouro. Nota-se que mesmo com as injeções de tampão fosfato, não há perda de BSA. Com as duas injeções da solução de anti cit c, nos tempos 28 e 38 minutos, verifica-se a variação de ΔR, indicando que houve interação entre as duas proteínas. Mesmo com a lavagem com tampão fosfato (33 e 43 minutos), para remoção de moléculas de anticorpo não ligadas, não houve perda significativa de anticorpo. Note que a quantidade de anti cit c adsorvido na superfície (1,22 $ng.mm^{-2}$) foi um pouco menor (24%) do que aquela medida para o sensor de membrana (1,51 $ng.mm^{-2}$, tabela 6, p. 77). Nos tempos 48 e 57 minutos foram realizados duas injeções de 500µL de cit c. Os valores de adsorções obtidos para cada proteína são mostrados na tabela 12.

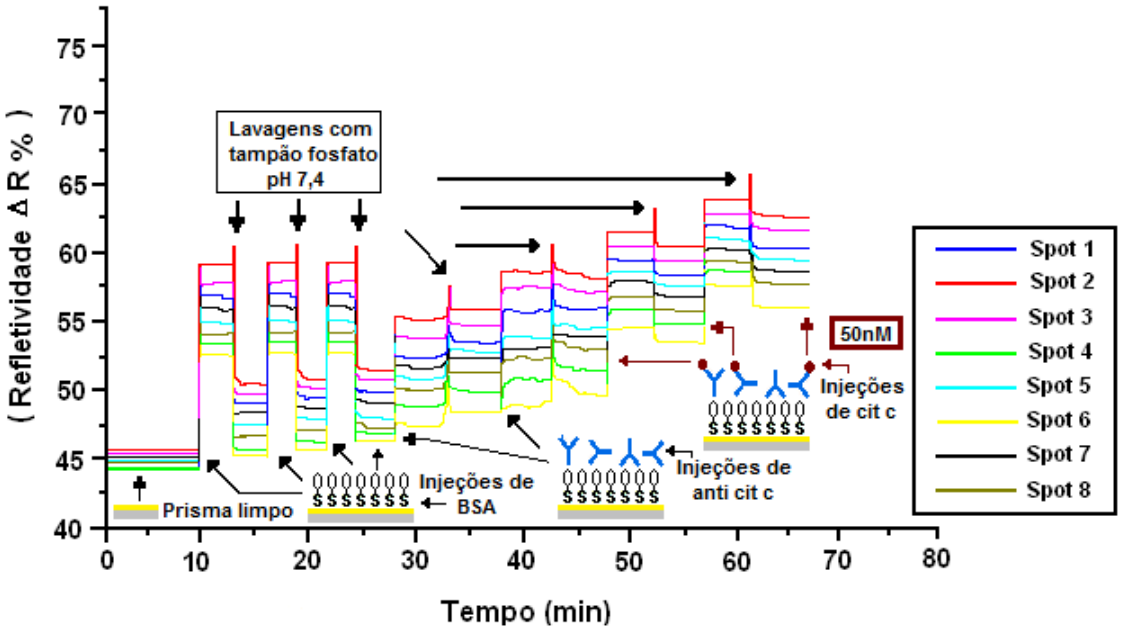

Figura 43 – Variação da refletividade em função do tempo de adsorção para cada um dos componentes do sistema formado por BSA / Anti Cit c / Cit c (50nM), todos em meio tamponado com pH 7,4. *São indicados os momentos das adsorções de cada componente. Nota-se a diferença de refletividade para o cit c ao final do experimento.*

Tabela 12. Valores das adsorções obtidos para cada proteína.

Spot 7 – Preto	*Monocamada de BSA [10mg/mL]*	*Adsorção de saturação de Anti Cit c [10mg/mL]*	*Adsorção de saturação de Cit c [50nM]*
Variação de Refletividade (%ΔR)	3,0	4,0	4,0
Quantidade de material adsorvido (Γ) (ng/mm^2)	1,10	1,22	1,27
Espessura (nm ou Å)	0,92 nm ou 9,2 Å	----------	----------

A tabela 13 ilustra uma comparação entre os dois biosensores, de valores de variação de refletividade e de adsorção do anti cit c e do cit c. Note que os valores obtidos para as duas imunoproteínas estão próximos, indicando que a interação eletrostática também é capaz de ligar e manter as moléculas de anti cit c. No entanto, tanto a quantidade de anti cit c, quanto de cit c adsorvido após a injeção de 50 nmol.L^{-1} é ~25% superior no caso do sensor de membrana.

Tabela 13. Valores comparativos das cinéticas de adsorção das duas imunoproteínas entre os dois biosensores.

Sensor de membrana X Sensor de BSA	*Anti cit c [10mg/mL] Sensor de membrana (Spot 8)*	*Anti cit c [10mg/mL] Sensor de BSA (Spot 7)*	*Cit c [50nM] Sensor de membrana (Spot 8)*	*Cit c [50nM] Sensor de BSA (Spot 7)*
Variação de Refletividade (%ΔR)	5,0	4,0	5,0	4,0
Quantidade de material adsorvido (Γ) (ng/mm^2)	1,51	1,22	1,52	1,27

A figura 44 apresenta a cinética de adsorção das três proteínas para uma concentração de 1nM de cit c. Observa-se que nos tempos 10, 17, 22, 28 e 38 minutos, ocorrem variações na refletividade, após as injeções de BSA e anti cit, respectivamente. Nos tempos 48 e 57 minutos, registram-se as injeções de cit c, e a diferença de refletividade. Nota-se que ocorreu adsorção entre anti cit c e cit c. A

tabela 14 mostra os resultados de quantidade de material adsorvido para cada biomolécula.

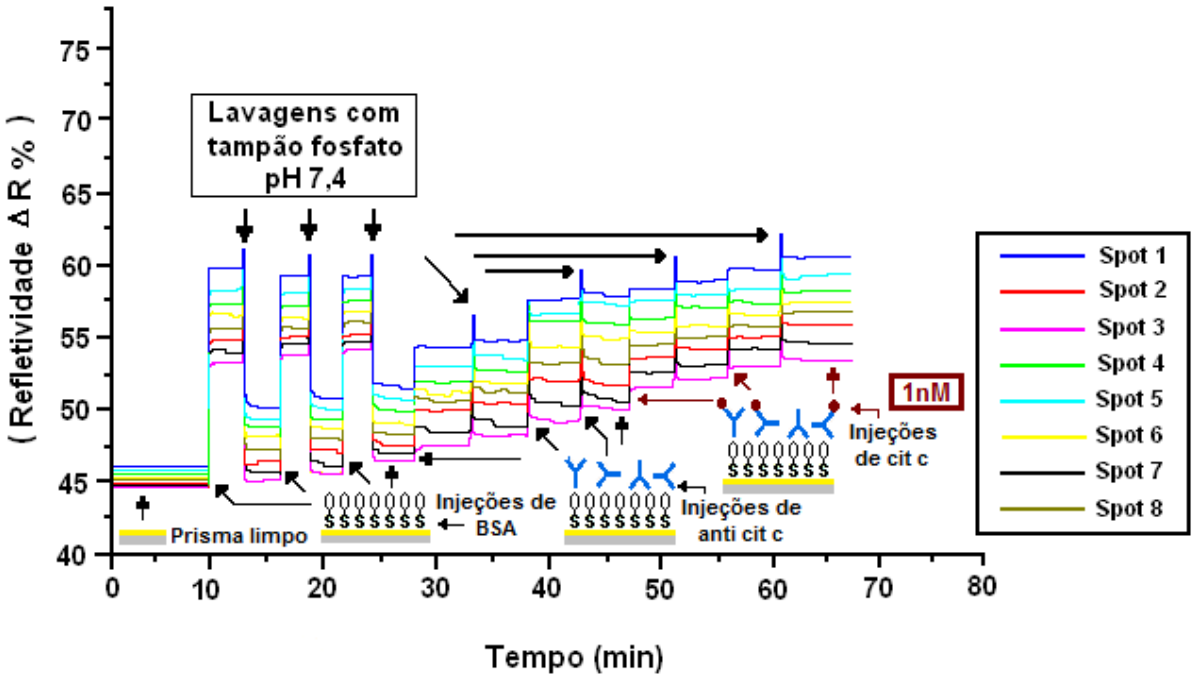

Figura 44 – Variação da refletividade em função do tempo de adsorção para cada um dos componentes do sistema formado por BSA / Anti Cit c / Cit c (1nM), todos em meio tamponado. *São indicados os momentos das adsorções de cada componente. Nota-se a diferença de refletividade para o cit c ao final do experimento.*

Tabela 14. Valores das adsorções obtidas para cada proteína.

Spot 7 – Preto	*Monocamada de BSA [10mg/mL]*	*Adsorção de saturação de Anti Cit c [10mg/mL]*	*Adsorção de saturação de Cit c [1nM]*
Variação de Refletividade (%ΔR)	3,0	4,0	3,0
Quantidade de material adsorvido (Γ) (ng/mm²)	1,10	1,22	0,87
Espessura (nm ou Å)	0,92 nm ou 9,2 Å	----------	----------

Os valores comparativos de variação de refletividade e adsorção para o anti cit c e o cit c, obtidos entre os dois biosensores, estão apresentados na tabela 15.

Note que ambos os sensores reconhecem cit c de maneira equivalente, apresentando uma variação de refletividade igual (%ΔR= 3,0).

Tabela 15. Valores comparativos das cinéticas de adsorção de cit c (1nM) entre os dois biosensores.

Sensor de membrana X Sensor de BSA	*Cit c [1nM] Sensor de membrana (Spot 8)*	*Cit c [1nM] Sensor de BSA (Spot 7)*
Variação de Refletividade (%ΔR)	3,0	3,0
Quantidade de material adsorvido (Γ) (ng/mm²)	0,87	0,87

Testou-se também a resposta à concentração de cit c de 0,1 nmol.L^{-1}. Observa-se no gráfico da figura 45, nos tempos 48 e 58 minutos, as duas injeções de 500µL de solução de cit c, em que houve diferença de refletividade e posterior adsorção de cit c. A tabela 16 mostra os valores obtidos de variação de refletividade e adsorção.

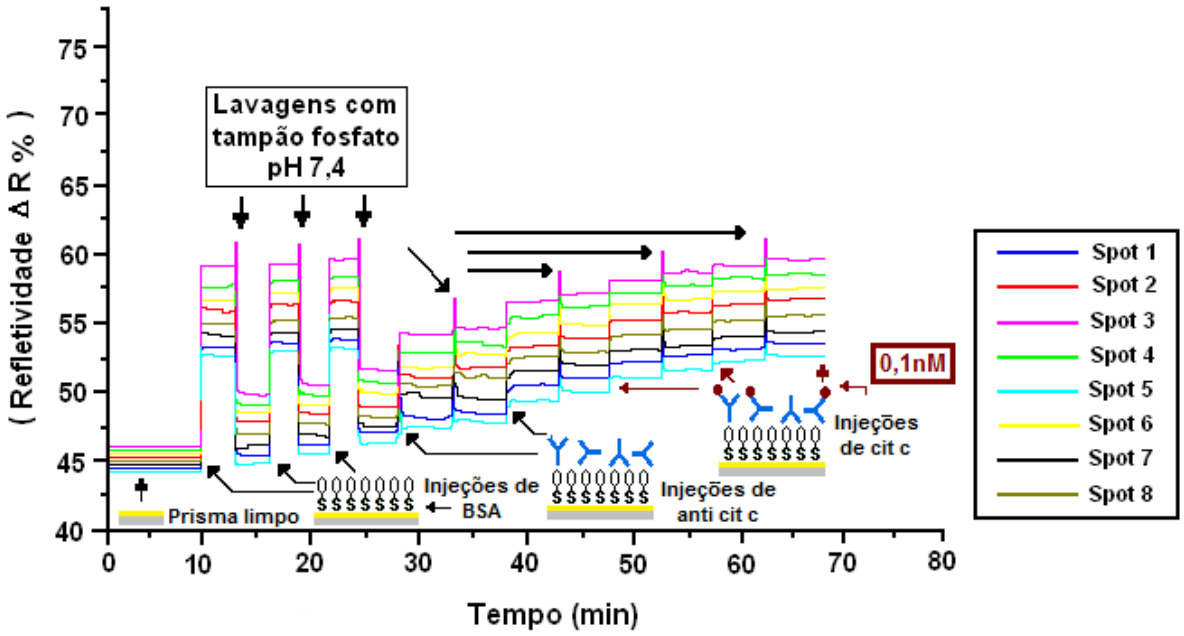

Figura 45– Variação da refletividade em função do tempo de adsorção para cada um dos componentes do sistema formado por BSA / Anti Cit c / Cit c (0,1nM), todos em meio tamponado. *São indicados os momentos das adsorções de cada componente. Nota-se a diferença de refletividade para o cit c ao final do experimento.*

Tabela 16. Valores das adsorções obtidas para cada proteína.

Spot 2 – Vermelho	*Monocamada de BSA [10mg/mL]*	*Adsorção de saturação de Anti Cit c [10mg/mL]*	*Adsorção de saturação de Cit c [0,1nM]*
Variação de Refletividade (%ΔR)	3,0	4,0	2,0
Quantidade de material adsorvido (Γ) (ng/mm^2)	1,10	1,22	0,58
Espessura (nm ou Å)	0,92 nm ou 9,2 Å	----------	----------

Pode-se verificar, na tabela 17, os valores de variação de refletividade e quantidade de material adsorvido para cit c. Observa-se a quantidade de cit c adsorvido no sensor de membrana é substancialmente (38%) maior do que no sensor de BSA.

Tabela 17. Valores comparativos das cinéticas de adsorção das duas imunoproteínas entre os dois biosensores

Sensor de membrana X Sensor de BSA	*Cit c [0,1nM] Sensor de membrana (Spot 8)*	*Cit c [0,1nM] Sensor de BSA (Spot 2)*
Variação de Refletividade (%ΔR)	2,75	2,0
Quantidade de material adsorvido (Γ) (ng/mm^2)	0,80	0,58

No gráfico da figura 46 apresenta-se nos tempos 51 e 62 minutos as duas injeções de 0,01nmol.L^{-1} cit c. Verifica-se que após os referidos tempos, ainda ocorre diferença de refletividade (%ΔR= 1,0), comprovando que houve ligação entre o anti cit c e cit c. Os valores de adsorções obtidos para cada proteína são mostrados na tabela 18, e os valores de (%ΔR) e (Γ) para cit c, entre os dois biosensores estão ilustrados na tabela 19. Note que o sensor de membrana apresentou um sinal duas vezes maior do que o de BSA após a injeção de 0,01 nmol.L^{-1} de cit c.

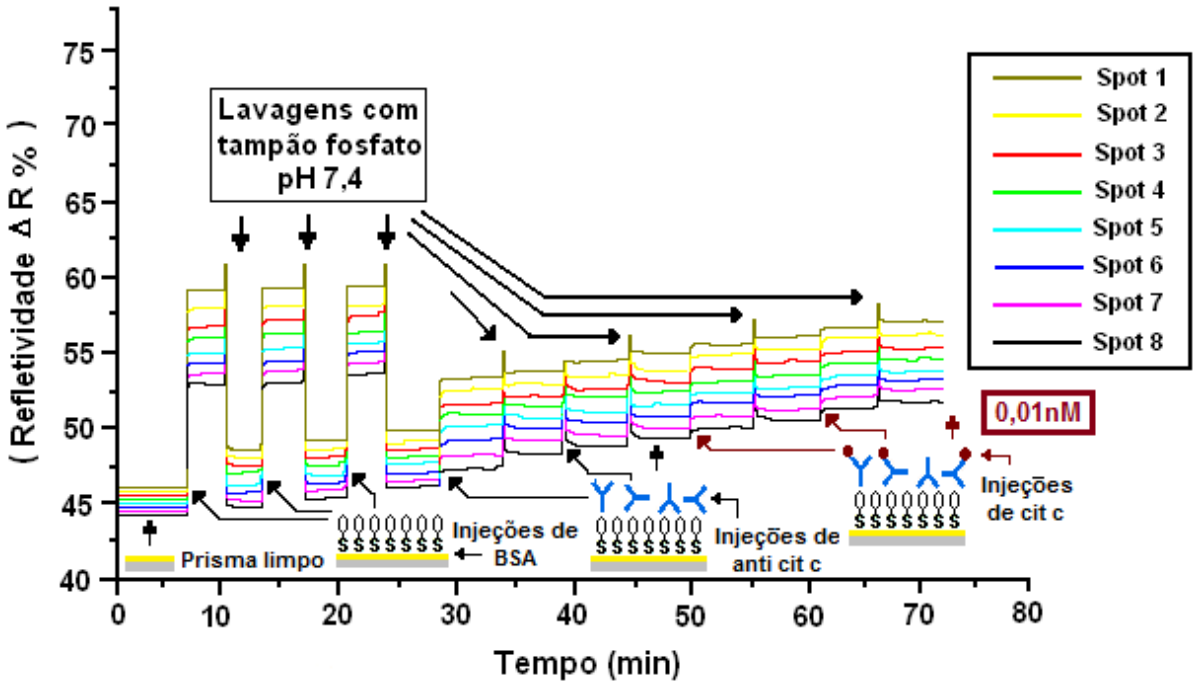

Figura 46 – Variação da refletividade em função do tempo de adsorção para cada um dos componentes do sistema formado por BSA / Anti Cit c / Cit c (0,01nM), todos em meio tamponado. *São indicados os momentos das adsorções de cada componente. Nota-se a diferença de refletividade para o cit c ao final do experimento.*

Tabela 18. Valores das adsorções obtidas para cada proteína.

Spot 2 – Vermelho	*Monocamada de BSA [10mg/mL]*	*Adsorção de saturação de Anti Cit c [10mg/mL]*	*Adsorção de saturação de Cit c [0,01nM]*
Variação de Refletividade (%ΔR)	3,0	4,0	1,0
Quantidade de material adsorvido (Γ) (ng/mm²)	1,10	1,22	0,29
Espessura (nm ou Å)	0,92 nm ou 9,2 Å	----------	----------

Tabela 19. Valores comparativos das cinéticas de adsorção de cit c entre os dois biosensores

Sensor de membrana X Sensor de BSA	*Cit c [0,01nM] Sensor de membrana (Spot 8)*	*Cit c [0,01nM] Sensor de BSA (Spot 2)*
Variação de Refletividade (%ΔR)	2,0	1,0
Quantidade de material adsorvido (Γ) (ng/mm²)	0,58	0,29

A figura 47 apresenta um gráfico de regressão linear dos valores de variação de refletividade em função da concentração de cit c para o sensor de BSA. Apresenta também, uma equação linear onde se obteve o valor da sensibilidade do sensor; e através do protocolo 3.9, calculou-se o limite de detecção utilizando o valor de 0,5318 como desvio padrão do branco (tabela 1). A tabela 20 mostra os valores calculados do limite de detecção e sensibilidade para o sensor de BSA. Devido ao fato do desvio padrão do branco ser consideravelmente menor no sensor de BSA (pelo menos nesta medida que foi realizada), o LOD calculado foi menor para o sensor de BSA (4,53 comparado com 7,01). No entanto, este valor de LOD é também muito maior do que a concentração de cit c (0,01nmol.L^{-1}), que foi injetada e que teve resposta clara e reprodutível no sensor de BSA. A razão desta disparidade é a mesma daquela citada para o sensor de membrana, ou seja, saturação dos anticorpos da superfície que afetam a linearidade da curva analítica. Sendo assim, utilizou-se como LOD o valor obtido, que na prática foi a menor concentração detectável, que é igual ao do sensor de membrana (0,01nmol.L^{-1}).

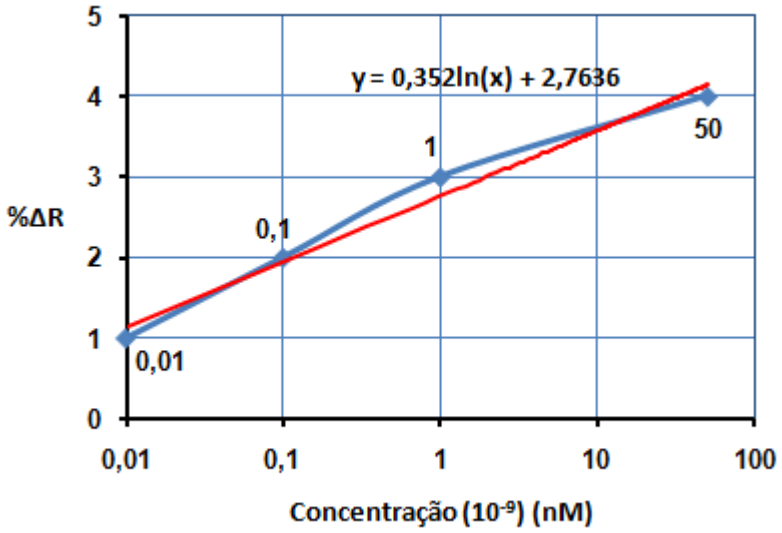

Figura 47 – Valores linearizados (ln) de concentração de cit c em função da variação de refletividade (%ΔR) (Sensor de BSA). Cit c [50nM] = (%ΔR) 4,0), cit c [1nM] = (%ΔR) 3,0, cit c [0,1nM] = (%ΔR) 2,0, cit c [0,01nM] = (%ΔR) 1,0. *Os valores de refletividade foram obtidos através das cinéticas de adsorção de cit c nos gráficos das figuras 42 a 45.*

Tabela 20. Valores obtidos de limite de detecção (LOD) e sensibilidade.

Biosensor	Sensibilidade (nmol/L ou nM)	Limite de Detecção (LOD) (nmol/L ou nM)
Sensor de BSA	0,352	4,53

Analisando as figuras 43, 44, 45 e 46 nota-se a similaridade dos resultados obtidos para o sensor de membrana e de BSA. Em todos os resultados experimentais apresentados as curvas seguem um padrão característico de variação de refletividade e adsorção, indicando sua reprodutibilidade. Porém, quando se efetua uma análise comparando as variações de refletividade e quantidades adsorvidas de cit c, entre os dois biosensores (tabelas 11, 15 e 17), observa-se que o sensor de membrana consegue ligar mais cit c do que o sensor de BSA. De fato, o sensor de membrana apresentou sinal proporcionalmente maior quanto menor foi a concentração de cit c injetado. Por exemplo, na concentração de 0,01nmol.L^{-1} de cit c injetado a resposta obtida no sensor de membrana foi o dobro daquela obtida no sensor de BSA. O fato da resposta do sensor de membrana comparada à resposta do sensor de BSA ser proporcionalmente maior quanto menor a concentração de cit c injetado, indica a superioridade do sensor de membrana e pode estar relacionado com a maior quantidade de anti-cit c adsorvido, bem como, com a melhor organização do anticorpo no caso do biosensor de membrana. No entanto, ambos os sensores funcionam adequadamente e a utilização de um ou de outro depende de questões de custo benefício, uma vez que o sensor de BSA é menos custoso. É importante enfatizar que ambos os sensores apresentam uma resposta consideravelmente melhor do que o teste normalmente utilizado para detectar cit c (western blotting, ~nmol.L^{-1}). Desta forma, no caso dos sensores de SPR poder-se-ia

utilizar uma quantidade de células 100 vezes menor do que aquela que se utiliza para normalmente fazer dosagens de cit c.

5 CONCLUSÕES FINAIS

Verificamos que a metodologia desenvolvida para detectar cit c é válida, de acordo com os resultados obtidos, e aqueles disponíveis na literatura para imunoensaios.

Através de estudos físico-químicos de superfície, demonstramos que a estrutura química do carboidrato quitosana tende a adsorver facilmente sobre a superfície de ouro, de acordo com o pH, formando uma monocamada nanoporosa. Ainda nesse estudo, identificamos uma estratégia de sustentação para uma bicamada fosfolipídica contendo lipídeo biotinilado, íntegra e homogênea, revelando uma vantagem sobre sistemas multicamadas de polieletrólitos e de membranas de bicamada híbrida (HBMs). A adsorção de estreptoavidina sobre o fosfolipídeo marcado com biotina, e a adsorção do anticorpo marcado com biotina sobre a estreptoavidina, possibilitou a construção de um biosensor estável e sensível.

Dois sensores de cit c foram construídos, um sensor de membrana e o outro de BSA. O estudo da sensibilidade de cit c por SPRi com as duas construções, mostrou a sensibilidade e reprodutibilidade da técnica, e também, a sua vantagem sobre os demais métodos analíticos utilizados em imunoensaios. Para os dois sensores o limite de detecção de cit c atingido foi de 10^{-11} mol/L, já que os experimentos executados com cit c com concentração de 10^{-12} mol/L, mostraram que não houve ligação entre o antígeno e anticorpo. Os valores de LOD obtidos encontram-se dentro dos padrões descritos na literatura para SPR, 10^{-8} mol/L até 10^{-12} mol/L (Luo & Huang, (2009) e (Song et al., (2004)). O estudo de adsorção e desorção de cit em anti cit c indicou que o sensor de membrana apresenta resposta superior (2x), especialmente na menor concentração injetada. Esta resposta

diferenciada foi justificada pela maior densidade superficial de anticorpo e melhor organização do mesmo no sensor de membrana.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agayn, V.; Walt, D. R. Fiber-Optic Immunosensors Based on Continuous Reagent Delivery. Immunomethods. **1993**; 3: 112-121.

Akcelrud, L. Fundamentos da ciência dos polímeros. **2007**; Editora Manole Ltda. 1ª edição. Barueri-SP.

Assis, O. B. G.; Alves, H. C. Metodologia mínima para a produção de filmes comestíveis de quitosanas e avaliação preliminar de seu uso como protetor em maças cortadas. Empraba Instrumentação Agropecuária. **2002**; 5p.

Baldwin, E. A.; Nisperos, M.O.; Chen, X.; Hagenmaier, R. D.; Improving storage life cut apple and potato with edible coating. Postharvest Biology and Technology. **1995**; 30:151-163.

Benitez, M. J.; Jimenez, J. S. A method of reversible biomolecular immobilization for the surface plasmon resonance quantitative analysis of interacting biological macromolecules. Analytical Biochemistry. **2002**; 302: 161-8.

Berquand, A.; Mazeran, P. E.; Pantigny, J.; Proux-Delrouyre, V.; Laval, J. M.; Bourdillon, C. Two-step formation of streptavidin-supported lipid bilayers by PEG-triggered vesicle fusion: fluorescence and atomic force microscopy characterization. Langmuir. **2003**; 19:1700-7.

Bertrand, P.; Jonas, A.; Laschewsky, A.; Legras, R. Ultrathin polymer coatings by complexation of polyelectrolytes at interfaces: suitable materials, structure and properties. Macromolecular Rapid Communications. 2000; 21: 319-348.

Bouffartigues, E.; Leh, H.; Anger-Leroy, M.; Rimsky, S.; Buckle, M. Rapid coupling of Surface Plasmon Resonance (SPR and SPRi) and Protein ChipTM based mass spectrometry for the identification of proteins in nucleoprotein interactions. Nucl Acids Res **2007**; 35(e39):1–10.

Brecht, A.; Piehler, J.; Lang, G.; Gauglitz, G. A Direct Optical Immunosensor for Atrazine Detection Analytica. Chimica. Acta. **1995**. 311: 289-299.

Brockman, J. M.; Nelson, B. P.; Corn, R. M. Surface plasmon resonance imaging measurements of ultrathin organic film. Annual Review of Physical Chemistry. **2000**; 51: 41-63.

Burtis, C. A.; Ashwood, E. R.; Bruns, D. E. Tietz Fundamentos de Química Clínica. **2008**; 992.

Cárdenas, G.; Anaya, P.; Plessing, C. V.; Rojas, C.; Sepulveda, J. Chitosan composite films. Biomedical applications. Journal of Mater Science: Mater Med. **2008**; 19:2397–2405.

Caruso, F.; Vukusic, P. S.; Matsuura, K.; Urquhart, R. S.; Furlong, N.; Okahata, Y. Investigation of immuno-reactions in a flow-injection system using surface plasmon resonance. Colloids Surf A: Physico Chemistry Eng Asp. **1995**; 103:147-157.

Cheng, S. S.; Scherson, D. A.; Sukenik, C. N.; Langmuir. **1995**; 11: 1190.

Cherif, B.; Roget, A.; Villiers, C. L.; Calemczuk, R.; Leroy, V.; Marche, P. N.; Livache, T.; Villiers, M. B. Clinically related protein–peptide interactions monitored in real time on novel peptide chips by surface plasmon resonance imaging. Clinical Chemistry. **2006**; 52: 255-62.

Chittur, K. K.; Fink, D. J.; Hutson, T. B.; Gendreau, R. M.; Jakobsen, R. J.; Leininger R. I. Fourier Transform Infrared Spectroscopic and Attenuated Total Reflectance Studies of Protein Adsorption in Flowing Systems. Journal of Colloid Interface Science **1986**, 111: 419.

Choi, S.; Swanson, J. M. Interaction of cytochrome c with cardiolipin: an infrared spectroscopic study. Biophysical Chemistry Journal. **1995**; 54:271-78.

Claesson, P. M.; Ninham, B. W. pH-dependent interactions between adsorbed chitosan layers. Langmuir. **1992**; 8 (5), 1406-1412.

Davies, R. J., Pollard-Knight, D.; An optical biosensor system for molecular interaction studies. American Biotechnology Laboratory **1993**. July, 1.

De Feijter, J. A.; Benjamins, J.; Veer, F. A. Ellipsometry as a tool to study the adsorption of synthetic and biopolymers at the air-water interface. Biopolymers. **1978**; 17:1759-72.

Decher, G.; Hong, J. D.; Schimitt, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. Thin Solid Films. **1992**; 210-211: 831-835.

Dufrene, Y. F.; Lee, G. U. Advances in the characterization of supported lipid films with the atomic force microscope. Biochimica Biophysica Acta – Biomembranes **2000**; 1509:14-41.

Fäldt, P.; Bergenstähl, B.; Claesson, P. M. Stabilization by chitosan of soybean oil emulsions coated with phospholipid and glycocholic acid. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. **1993**; 71: 187-195.

Fang, N.; Chan, V.; Mao, H. Q.; Leong, K. W. Interactions of Phospholipid Bilayer with Chitosan: Effect of Molecular Weight and pH. Biomacromolecules. **2001**; 2: 1161-1168.

Fang, N.; Chan, V.; Mao, Hai-Quan.; Leong, K. W. Interactions of Phospholipid Bilayer with Chitosan: Effect of Molecular Weight and pH. Biomacromolecules. **2001**; 2: 1161-1168.

Fasman, G. D. Handbook of Biochemistry: Section A Proteins, Volume III. CRC 3th Edition. **1976**; 656p.

Fatibello, O.; Capelato, M. D. Biosensores. Química Nova. **1992**; 1: 28-39.

Fujimoto, J.; Reis, E. A. O.; Petri, D. F. S. Formation of polysaccharides and protein multilayers. Química Nova. **2002**; 25:757:761.

Glasmastar, K.; Larsson, C.; Hook, F.; Kasemo, B. Protein adsorption on supported phospholipid bilayers. Journal of Colloid and Interfaces Sciences . **2002**; 246:40-7.

Gobi, K. V.; H. Tanaka, Y.; Shoyama, N. Continuous Flow Immunosensor for Highly Selective and Real-time Detection of Sub-ppb Levels of 2-Hydroxybiphenyl by Using

Surface Plasmon Resonance Imaging Biosensors and Bioelectronics. **2004**; 20: 350-357.

Green, D. R.; Reed, J. C. Mitochondria and Apoptosis. Science. **1998**; 281: 5381-1309.

Green, M. J. Electrochemical Immunoassays. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. **1987**. 316: 135-142.

Grosjean, L.; Cherif, B.; Mercey, E.; Roget, A.; Levy, Y.; Marche, P. N.; Villiers, M. B.; Livache, T. A polypyrrole protein microarray for antibody–antigen interaction studies using a label-free detection process. Analytical Biochemistry. **2005**; 347: 193-200.

Hanken, D. G.; Jordan, C.E.; Frey, B. L.; Corn, R. M. Surface plasmon resonance measurements of ultrathin organic films at electrode surfaces. In: Bard, A.J.; Rubinstein, I. editors. Electroanalytical Chemistry, a serie of advances. 1st ed. New York: Marcel Dekker; **1998**. v.20, p. 142-152.

Haynes, C. A.; Norde, W. Globular proteins at solid–liquid interfaces. Journal of Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces. **1994**; 2: 517–566.

Haynes, C. A.; Sliwinski, E.; Norde, W. Structural and electrostatic properties of globular proteins at a polystyrene–water interface. Journal of Colloid Interface and Interface Science. **1994**; 164: 394– 409.

Hegner, D.; Schummer, U.; Schnepel, G. H. The effect of calcium on the temperature-induced phase changes in liquid-crystalline cardiolipin structure. Biochim Biophys Acta – Biomembranes. **1973**; 307:452-8.

Herron, J. N.; Mueller, W.; Paudler, M.; Riegler, H.; Ringsdorf, H.; Suci, P. A. Specific recognition-induced self-assembly of a biotin lipid/streptavidin/Fab fragment triple layer at the air/water interface: ellipsometric and fluorescence microscopy investigations. Langmuir. **1992**; 8 (5), 1413-1416.

Hirayama K, Akashi S, Furuya M, Fukuhara K. Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and Frit-FAB LC/MS. Biochem. Biophys. Res. Commun. **1990**; 173: 639-646.

Homola, J. Electromagnetic Theory of Surface Plasmons in Surface Plasmon Resonance Based Sensors. 1st ed. New York: Springer-Verlag; **2006**. p. 3-44.

Hu, Y.; Benedict, M. A.; Ding, L.; Núñez, G. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. Nature. **1999**; 13: 3586-95.

Huang, H.; Xiurong, Y. Chitosan mediated assembly of gold nanoparticles multilayer. Colloids and Surfaces A: Physicochemistry. Eng. Aspects. **2003**; 226: 77–86.

Immunoassay Based on Highly Dispersed Flow Immunoelectrode. Analytical Letters. **1996**. 29: 2615-2631.

Itzhak, R. Dicionário Houaiss de Física. Rio de Janeiro. Editora Objetiva Ltda. **2005**. 248p.

Ivanov, B. Thin Liquid Films: Fundamentals and Applications. **1988**; CRC, 1st Edition Press USA.

Jackson, T. M.; Ekins, R. P. Theoretical limitations on immunoassay sensitivity: current practice and potential advantages of fluorescent Eu^{+3} chelates as nonradioisotopic tracers. Journal of Immunological Methods. **1986**. 87: 13-20.

Jung, L. S.; Campbell, C. T.; Chinowsky, T. M.; Mar, M. N.; Yee, S. S. Quantitative interpretation of the response of surface plasmon resonance sensors to adsorbed films. Langmuir. **1998**; 14:5636-48.

Jung, L. S.; Shumaker-Parry, J. S.; Campbell, C. T.; Yee, S. S.; Gelb, M. H. Quantification of Tight Binding to Surface-Immobilized Phospholipid Vesicles Using Surface Plasmon Resonance: Binding Constant of Phospholipase A2. Journal of American Chemical Society. **2000**; 122: 4177-4184.

Keller, C. A.; Kasemo, B. Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance. Biophysical Journal. **1998**; 75:1397-402.

Kosslinger, C.; Uttenhalter, E.; Drost, S.; Aberl, F.; Wolf, H.; Brink, G. Stanglmaier, A.; Sackmann, E. Comparison of the QCM and the SPR methos for surface studies and immunological applications. Sensors and Actuator B: Chemical **1995**; 24: 107-112.

Kretschmann, E.; Reather, H. Radioactive decay of nonradioactive surface plasmon excited by light. Zeitschrift Naturforchung. **1968**; 23A: 2135-2136.

Krishnan, R.; Ghindilis, A. L.; Wilkins, E. Development of an Amperometric Immunoassay Based on Highly Dispersed Immunoelectrode. Analytical Letters*,* **1996**; 29: 2615-2631.

Kukanskis, K.; Elkind, J.; Melendez, J.; Murphy, T.; Miller, G.; Garner, H. Detection of DNA Hybridization Using the TISPR-1 Surface Plasmon Resonance Biosensor. Analytical Biochemistry.**1999**; 274: 7-17.

Kunz, U.; Katerkamp, A.; Renneberg, R.; Spener, F.; Cammann, K. Sensing fatty acid binding protein with planar and fiber-optical surface plasmon resonance spectroscopy devices. Sensors and Actuators*,* B*.* **1996**; *32*, 149.

Li, J.; Wang, Y. B.; Qiu, J. D.; Sun, D. C.; Xia, X. H. Biocomposites of covalently linked glucose oxidase on carbon nanotubes for glucose biosensor. Analytical Bioanalytical Chemistry. **2005**; 38: 918.

Liedberg, B.; Lundstrom, I.; Stenberg, E. Principles of biosensing with an extended coupling matrix and surface plasmon resonance. Sensors Actuators B. **1993**; 11:63-72.

Liedberg, B.; Nylander, C.; Lundström, I. Biosensing with surface plasmon resonance – How it all started. Biosensors and Bioeletronics. **1995**; 10: i-ix.

Ligler, F. S. Fiber-optic Biosensor for the detection of Hazardous Materials. ImmunoMethods*.* **1993**. 3(2); p. 122-127.

Lingler, S.; Rubinstein, I.; Knol,l. W.; Offenhausser, A. Fusion of small unilamellar lipid vesicles to alkanethiol and thiolipid self-assembled monolayers on gold. Langmuir. **1997**;13:7085-91.

Lori, J. A.; Hanawa, T. Adsorption characteristics of albumin on gold and titanium metals in Hanks' solution using EQCM . Journal of Spectroscopy. **2004**. 18: 545-552.

Luo, D.; Huang, J. Determination of Cytochrome c and Other Heme Proteins Using the Reduction Wave of Mercury Protoporphyrin IX Groups Generated by a Hydroxylamine Induced Replacement Reaction. Analytical Chemistry. **2009**; 81: (5) 2032-2036.

Lvov,Y.; Onda, M.; Ariga, K. Kunitake, T. Journal of Biomaterials – Science of Polymers. **1998**; Ed. 9 345.

Ma, C.; Srinivasan, M. P.; Waring, A. J.; Lehrer, R. I.; Longo, M. L.; Stroeve, P. Supported lipid bilayers lifted from the substrate by layer-by-layer polyioncushions on self-assembled monolayers. Coll Surf B: Biointerfaces. **2003**; 28:319-29.

Makower, A.; Barmin, A.; Morzunova, T.; Eremenko, A.; Kurochkin, I.; Bier, F.; Scheller, F. Analytica Chimica Acta. **1997**. 357: 13.

Mano, E. B.; Mendes, L. C. Introdução a polímeros. **1999**; Editora Edgard Blücher Ltda. Rio de Janeiro-RJ.

Manuel, M.; Vidal, B.; Lopez, R.; Alegret, S.; Alonso-Chamarro, J.; Garces, I.; Mateo, J. Determination of probable alcohol yield in musts by means of an SPR optical sensor. Sensors and Actuators B: Chemical **1993**; 11: 455-459.

Marsh, D. Handbook of Lipid Bilayers. Editor. CRC Boca Raton:CRC Press; **1990**. 400 p.

Mattei, B.; Borch, J.; Roepstorff, P. Biomolecular interaction analysis and MS. Analytical Chemistry. **2004**; 76: 19A-25A.

Medzon, E.L.; Gedies, A. Substitution of 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane sulfonic acid (HEPES) for bicarbonate in protein-free animal cell culture medium: application to vaccinia virus quantitation and fluorogenic acetylesterase assay in living LM cells. Canadian Journal of Microbiol. **1971**; 17:651-3.

Micelli, S.; Gallucci, E.; Meleleo, D.; Stipani, V.; Picciarelli, V. Mitochondrial porin incorporation into black lipid membranes:ionic and gating contribution to the total current. Bioelectrochemistry. **2002**; 57:97-106.

Miller, J. C.; Miller, J. N.. Statistics for analytical chemistry, **1993**; 3rd edition. 233 p. Ellis Horwood, PTR Prentice Hall Analytical Chemistry Series.

Müller, M.; Rieser, T.; Dubin, P. L.; Lunkwitz, K. Selective Interaction Between Proteins and the Outermost Surface of Polyelectrolyte Multilayers: Influence of the Polyanion Type, pH and Salt. Macromolecular Rapid Communications. **2001;** Vol. 22, 390–395.

Müller, M.; Rieser, T.; Lunkwits, K.; Berwald, S.; Meier-Haak, J.; Jehnichen, D. An in-situ ATR-FTIR study on polyelectrolyte multilayer assemblies on solid surfaces and their susceptibility to fouling. Macromolecules Rapid Communication. **1998**; 19: 333.

Nantes, I. L.; Zucchi, M. R.; Nascimento, O. R; Faljoni-Alario, A. Effect of heme iron valence state on the conformation of cytochrome *c* and its association with membrane interfaces. Journal of Biological Chemistry. **2001**; 276:153-8.

Naumann, R.; Schiller, S. M.; Giess, F.; Grohe, B.; Hartman, K. B.; Kärcher, I.; Köper, I.; Lübben, J.; Vasilev, K.; Knoll, W. Tethered Lipid Bilayers on Ultraflat Gold Surfaces. Langmuir; **2003**, 19: 5435–5443.

Nelson, D. L; Cox, M. M. Lehninger - Princípios de Bioquímica. 3rd ed. São Paulo: Sarvier. **2002**. p. 280-339.

Nettles, D. L.; Elder, S. H.; Gilbert, S. H. Potential use of chitosan as a cell scaffold material for cartilage tissue engineering. Tissue Engineering. **2002**; 8(6):1009-16.

Norde, W. Adsorption of proteins from solution at the solid–liquid interface. Journal of Colloid and Interface Science. **1986**, *25*: 267–340.

Norde, W.; Anusiem, A. C. I. Adsorption, desorption and re-adsorption of proteins on solid surfaces. Journal of Colloids and Interface Science. **1992**; 66: 299–306.

Norde, W.; Lyklema, J. The adsorption of human plasma albumin and bovine pancreas ribonuclease at negatively charged polystyrene surfaces. IV. The charge distribution in the adsorbed state. Journal of Colloid and Interface Science. **1978**; 66: 285–294.

Oliveira, G.; Yamanaka, H. Enzimas e materiais biológicos imobilizados. Química Nova. **1998**; 114: 432-435.

Oss, C. J. Van.; Good, R. J.; Chaudhury, M. K. The Role of Van der Waals Forces and Hydrogen Bonds in “Hydrophobic Interactions” between biopolymers and Low Energy Surfaces. Journal of Colloid and Interface Science. **1985**; Vol. III. Nº 2.

Otto, A. Excitation of nonradioactive surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. Zeitschrift Physik. **1968**; 216: 398-410.

Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan J. A.; Introduction to Spectroscopy **2000**, Brooks/Cole Pub Co: 3-12.

Pedano, M. L.; Martel, L.; Desbrieres, J.; Defrancq, E.; Dumy, P.; Coche-Guerente, L.; Labbé, P.; Legrand, J.; Calemczuc, R.; Rivas, G. A. Layer-by-Layer Deposition of Chitosan Derivatives and DNA on Gold Surfaces for the Development of Biorecognition Layers. Analycal Letters. **2004**; 2235 – 2250.

Petronilli, V.; Penzo, D.; Scorrano, L.; Bernardi, P.; Di Lisa, F. The Mitochondrial Permeability Transition, Release of Cytochrome c and Cell Death. Journal of Biological Chemistry. **2001**; 276: 12030-12034.

Pinheiro, T. J.; Duer, M. J.; Watts, A. Phospholipid head group dynamics in DOPG-d5-cytochrome c complexes as revealed by 2H and 31P NMR: the effects of a peripheral protein on collective lipid fluctuations. Solid State Nuclear Magnetic Resonance. **1997**; 8:55-64.

Plant, A. L. Brigham-Burke, M.; Petrella, E. C.; O’Shannessy, D. J. Phospholipid/alkanethiol bilayers for cell-surface receptor studies by surface plasmon resonance. Analytical Biochemistry. **1995**; 226: 342-8.

Puu, G.; Gustafson, I. Planar lipid bilayers on solid supports from liposomes: factors of importance for kinetics and stability. Biochimica Biophysics Acta – Biomembranes **1997**; 1327:149-61.

Rapuano, R.; Carmona-Ribeiro, A. M. Physical adsorption of bilayer membranes on silica. Journal of Colloid and Interfaces Sciences. **1997**; 193:104-11.

Ravi Kumar, M. N. V. Chitin and Chitosan fibres: A review. Bull. Mater. Science. **1999**; 22: 905-915.

Reeves, S.G.; Rule, G.S.; Roberts, M.A.; Edwards, A.J.; Durst, R.A.; Flow-injection liposome immunoanalysis (FILIA) for alachlor. Analytical Chemistry Laboratories. **1994**. Oct; 41(10): 1747-53.

Richter, R. P.; Brisson, A. Characterization of lipid bilayers and protein assemblies supported on rough surfaces by atomic force microscopy. Langmuir. **2003**;19:1632-40.

Richter, R. P.; Brisson, A. R. Following the formation of supported lipid bilayers on mica: a study combining AFM, QCM-D and ellipsometry. Biophysical Journal. **2005**; 88:3422-33.

Richter, R. P.; Mukhopadhyay, A.; Brisson, A. Pathways of lipid vesicle deposition on solid surfaces: a combined QCM-D and AFM study. Biophysical Journal. **2003**; 85:3035-47.

Ross, E. E.; Bondurant, B.; Spratt, T.; Conboy, J. C.; O´Brien, D. F.; Saavedra, S. S. Formation of self-assembled, air-stable lipid bilayer membranes on solid supports. Langmuir **2001**; 17:2305-7.

Rytomaa, M.; Mustonen, P.; Kinnunen, P. K. Reversible, nonionic, and pH-dependent association of cytochrome *c* with cardiolipin-phosphatidylcholine liposomes. Journal of Biological Chemistry.**1992**; 267:22243-8.

Salamon, Z.; Tollin G. Surface plasmon resonance studies of complex formation between cytochrome *c* and bovine cytochrome *c* oxidase incorporated into a

supported planar lipid bilayer: inbding of cytochrome *c* to oxidase-containing cardiolipin/phosphatidylcholine membranes. Biophysical Journal. **1996b**; 71:858-67.

Santandreu, M., Cespedes, F., Alegret, S., Martínez-Fàbregas, E. Amperometric immunosensors based on rigid conducting immunocomposites. Analical Chemistry. **1997**. 69: 2080.

Shahidi, F.; Arachchi, J. K. V.; Jeon, Y. J. Food applications of chitins and chitosans. Trends in Food Science Technology. **1999**; 10p: 37-51.

Shen, H; Aspinwall, C. A; Kennedy, R. T. Dual microcolumn immunoassay applied to determination of insulin secretion from single islets of Langerhans and insulin in serum. Journal of Chromatograph B. **1997**. 689- 295.

Silverstein, R. M.; Kiemle, D. J.; Webster, F. X. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. **2000**; LTC: 60-74.

Song, J. M.; Kasili, P. M.; Griffin, G. D.; Vo-Dinh, Tuan. Detection of Cytochrome c in a Single Cell Using an Optical Nanobiosensor. Analytical Chemistry. **2004**, 76: (9), 2591-2594.

Sorlier, P.; Hartmann, D. J.; Denuzière, A.; VIton, C.; Domard, A. Preparation and development of anti-chitosan antibodies. Journal of Biomedical Materials Research Part A. **2003**; 3: 766–774.

Stayton, P. S.; Freitag, S.; Klumb, L. A.; Chilkoti, A.; Chu, V.; Penzotti, J. E.; To, R.; Hyre, D.; Trong, I. L.; Lybrand, T. P.; Stenkamp, R. E. Streptavidin–biotin binding energetic. Biomolecular Engineering. **1999**; 16: 39–44.

Sundberg, E. J.; Mariuzza, R. A. Molecular recognition in antibody-antigen complexes. Advances in Protein Chemistry. **2003**. 61.

Suraniti, E.; Tumolo, T.; Baptista, M. S.; Livache, T.; Calemczuk, R. Construction of hybrid bilayer membrane (HBM) biochips and characterization of the cooperative binding between cytochrome c and HBM. Langmuir**. 2007**; 23:6835-42.

Swann, M. J. Peel, L. L.; Carrington, S.; Freeman, N. J. Dual-polarization interferometry: an analytical technique to measure changes in protein structure in real time, to determine the stoichiometry of binding events, and to differentiate between specific and nonspecific interactions. Analytical Biochemistry. **2004**; 329: 190-198.

Swrizawa, T.; Yamaguchi, M.; Akashi, M. Macromolecules. **2002**; 35: 8656.

Tanford, C. The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes. 2ª edition. **1991**. Malabar: Krieger Publishing Company.

Tumolo T, Angnes L, Baptista MS. Determination of the refractive index increment (dn/dc) of molecule and macromolecule solutions by surface plasmon resonance. Analytical Biochemistry **2004**; 333: 273-9.

Tumolo, T. C. M. C.; *Desenvolvimento de biosensores de membranas e caracterização da interação entre citocromo c e bicamadas híbridas por ressonância plasmônica de superfície*. **(2008)**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas (Bioquímica)) - Universidade de São Paulo. *Orientador:* Mauricio da Silva Baptista.

Voet, D. Voet, J.G. Biochemistry 3th edition. New York: John Wiley & Sons. **2008**.

Walter, A.; Steer, C. J.; Blumenthal, R. Polylysine induces pH-dependent fusion of acidic phospholipid vesicles: a model for polycation-induced fusion. Biochimi Biophys Acta Biomembranes. **1986**; 861: 319-30.

Weast, R. C.; Editor. CRC Handbook of Chemistry and Physics. **1979**; 59th edition. Cleveland: CRC Press.

Williams, L. M.; Evans, S. D.; Flynn, T. M.; Marsh, A.; Knowles, P. F.; Bushby, R. J.; Boden, N. Kinetics of formation of single phospholipid bilayers on self-assembled monolayer supports, as monitored by surface plasmon resonance. Supramolecular Science. **1997a**; 4:513-7.

Williams, L. M.; Evans, S. D.; Flynn, T. M.; Marsh, A.; Knowles, P. F.; Bushby, R. J.; Boden, N. Kinetics of the unrolling of small unilamellar phospholipid vesicles onto self-assembled monolayers. Langmuir **1997b**; 13:751-7.

Wood, R. W. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum. Philosophic Magazine. **1902**; 4:396-402.

Yaxiong, L.; Wanzhi, W. Detection of cytochrome c at biocompatible nanostructured Au-lipid bilayer-modified electrode. Analytical Sciences. **2008**; 24 (11): 1431-6.

Yeatman, E. M. Biosensensors and Bioelectronics. **1996**, 11, 635-649.

Yeung, C.; Purves, T.; Kloss, A. A.; Kuhl, T. L.; Sligar, S.; Leckband, D. Cytochrome c recognition of immobilized, orientation variants of cytochrome b5: direct force and equilibrium binding measurements. Langmuir **1999**; 15: 6829-6836.

Zucolotto, V.; Gattas-Asfura, K. M.; Tumolo, T.; Perinotto, A. C.; Antunes, P. A; Constantino, C. J. L.; Baptista, M. S.; Leblanc, R. M.; Oliveira, Jr. O. N. Nanoscale manipulation of CdSe quantum dots in layer-by-layer films: influence of the host polyelectrolyte on the luminescent properties. Applied Surface Science. **2005**; 246: 397-402.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Rodrigo Matias Trolise
Nascido aos 25 de Janeiro de 1980 em São Paulo-SP

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2007 – 2010
Mestrado em Ciências Biológicas (Bioquímica)
Instituto de Química
Universidade de São Paulo – USP, São Paulo-SP, Brasil

1998-2002
Graduação em Engenharia Química
Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUC/PR, Curitiba-PR, Brasil
Monografia apresentada como trabalho de conclusão: *Processo de Produção e Purificação de Ácido Fosfórico (Fosbrasil S.A – Grupo Bunge).*

RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

- Trolise, R. M.; Baptista M. S. Novos miméticos de membranas biológicas, 2009. 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ); Fortaleza-CE, 2009.

CURSOS MINISTRADOS E MONITORIAS EM DISCIPLINAS

- Curso de Verão de Bioquímica e Biologia Molecular (2009).

- Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina QBQ 211 Bioquímica: Estrutura de Biomoléculas e Metabolismo, ministrada aos alunos de graduação do curso de Química do IQ-USP. (2008)

- Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina QBQ 215 Bioquímica: Estrutura de Biomoléculas e Metabolismo, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da FCF-USP. (2009)

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

2009-Atual – STEQ COMÉRCIO E REPRESENTAÇÕES LTDA.

Cargo: Especialista de Produto (H_2O_2).
Principais Atividades: Responsável pelo gerenciamento e execução de projetos de serviços de bio-descontaminação de ambientes em laboratórios e indústria farmacêutico-biotecnológica.

2007-2009 – FARMA SERVICE BIOEXTRACT LTDA.

Cargo: Pesquisador e Analista da Qualidade.
Principais atividades: Pesquisa e Desenvolvimento (P&D). Estudo da interação de extratos naturais e bioativos em superfícies de miméticos de membranas celulares e fio de cabelo.

2005-2006 – TECFLEX INDUSTRIAL LTDA.

Cargo: Engenheiro de Aplicações.
Principais atividades: Responsável pela coordenação e planejamento de serviços de limpeza e descontaminação.