UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

LUANA BENDO

Estudo da imobilização do receptor tireoidiano humano TRβ1 em filmes finos nanoestruturados e aplicações em detecção de hormônios tireoidianos.

São Carlos
2010

LUANA BENDO

Estudo da imobilização do receptor tireoidiano humano TRβ1 em filmes finos nanoestruturados e aplicações em detecção de hormônios tireoidianos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais , da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Área de concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.
Orientador: Prof. Dr. Valtencir Zucolotto

São Carlos

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Bendo, Luana
Estudo da imobilização do receptor tireoidiano humano TRβ1 em filmes finos nanoestruturados e aplicações em detecção de hormônios tireoidianos./ Luana Bendo; orientador Valtencir Zucolotto.--São Carlos, 2010.
113 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Interunidades Ciência e Engenharia de Materiais. Área de Concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais) – Escola de Engenharia de São Carlos, Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. Hormônios tireoidianos. 2. Receptor nuclear tireiodiano humano. 3. Imobilização. 4. Biossensor. I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luana Bendo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Área de Concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.

Aprovado(a) em 07.06.2010

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a). Pietro Ciancaglini

Instituição: FFCLRP/USP Assinatura_____

Prof(a). Dr(a). Cristina Kurachi

Instituição: IFSC/USP Assinatura_____

Prof(a). Dr(a). Valtencir Zucolotto

Instituição: IFSC/USP Assinatura_____

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria e Luiz Santos, aos irmãos lindos: a Tati (que me orientou para a Química) e o Luigi. Também dedico, claro, ao meu grande Pai, Deus.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao apoio de meus pais e de meus irmãos.

À Carol Vasques.

Ao Guilherme, um presente precioso.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Polímeros Bernhard Gross, dentre os quais Angelo, Francisco, Junior, Marli, Valquíria, Vanessa, Thaís, Thiers, Clarissa, Alexandre, Washington, Giovani, Ronny e Felipe.

Aos funcionários e técnicos, Victor, Rosângela, Débora Balogh, Níbio, Bertho e Ademir, pelo auxílio e amizade.

À Luana Magalhães, companheira de pesquisa experimental.

À Bel.

À Moni, Lilian, Valéria, Thaty e ao Elias.

À Juliana, pela amizade e pelo grande apoio.

À Sofia.

Ao Israel.

Ao pessoal do grupo de Cristalografia, dentre os quais Carol Figueira, Alessandro, Prof. Dr. Igor Polikarpov, Viviane e os técnicos Susana, Bianca, Maria e Kelven.

Ao Grupo de Polímeros Bernhard Gross e ao Grupo de Biofísica Molecular, pela estrutura física utilizada no desenvolvimento do presente projeto.

Ao Instituto de Física de São Carlos e ao Programa Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de parte da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

E, principalmente, ao Prof. Dr. Valtencir Zucolotto.

“A matéria, o tecido do universo, desenvolveu-se tentativamente,

tenuemente, por uma lenta e improvável transformação,

tornando-se uma forma tão complexa e organizada,

que pode compreender sua própria história, e, mesmo que

de forma deplorável, planeja seu próprio futuro”.

Brian L. Silver em “A Escalada da Ciência”.

RESUMO

BENDO, L. **Estudo da imobilização do receptor tireoidiano humano TRβ1 em filmes finos nanoestruturados e aplicações em detecção de hormônios tireoidianos.** 2010. 113 p. Dissertação (mestrado) – Ciência e Engenharia de Materiais, Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A manipulação de materiais em escala nanométrica representa uma das fronteiras em nanociência e nanotecnologia, devido à possibilidade de controle de propriedades específicas do material. No caso de materiais biológicos, em particular, a manipulação e imobilização na forma de filmes ou camadas ultrafinas é crucial para seu emprego em dispositivos biotecnológicos. Neste trabalho, objetivou-se o estudo de detecção de diferentes hormônios tireoidianos (HTs) e análogos a partir da imobilização da região LBD do receptor de hormônio tireoidiano humano TRβ1 em um eletrodo interdigitado, para o desenvolvimento de um biossensor capacitivo. Este sistema consiste em um arranjo estrutural na forma de filme fino capaz de distinguir a interação específica receptor-ligante de outras interações possivelmente interferentes, visando a quantificação dos níveis de HTs. Para isto, a técnica de SAMs (*Self-Assembled Monolayers*) foi empregada, por permitir um alto controle da espessura e ordenamento molecular dos filmes, assim como a preservação das atividades das biomoléculas. Análises espectroscópicas e morfológicas foram realizadas para o estudo de adsorção das biomoléculas no filme. As interações específicas receptor-ligante foram avaliadas por meio de respostas elétricas (impedância) do biossensor contendo o TRβ1-LBD imobilizado em um filme orgânico ultrafino, e também por SPR (*Surface Plasmon Resonance*). Os resultados mostraram a capacidade dos eletrodos contendo TRβ1-LBD de detectar e diferenciar entre diferentes HTs em concentrações da ordem de nM, compatível com níveis fisiológicos, evidenciando o grande potencial de aplicação para este sistema no diagnóstico e tratamento de disfunções tireoidianas.

Palavras-chave: Hormônios tireoidianos, Receptor nuclear tireoidiano humano, Imobilização, Biossensor, Nanomedicina.

ABSTRACT

BENDO, L. **Immobilization and Sensing Ability of Human Thyroid Nuclear Receptor in Nanostructured Thinf Films.** 2010. 113 p. Dissertação (mestrado) – Ciência e Engenharia de Materiais, Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Manipulation of materials at the nanoscale represents one of the frontiers in nanoscience and nanotechnology, mainly due to the possibility of specific controlling, improved properties, not observed if conventional "bulk" processing is applied. For biomolecules, in particular, processing via immobilization in the form of nanostructured films has allowed their use in biotechnological applications and devices. In this master dissertation, we aimed at investigating the immobilization of the LBD domain of human thyroid hormone receptor TRβ1 on interdigitated electrodes, to be used as capacitive biosensors for thyroid hormones (THs) and analogues detection. The nuclear receptors were immobilized via SAMs (Self-Assembled Monolayers), since this technique allows a high control of molecular order and thickness of the films, as well as the preservation of biological activities. Spectroscopic and morphological analyses were performed to investigate the adsorption of biomolecules on the nanostructured film. The interactions between receptor - ligand were also evaluated by means of electrical response (impedance) and SPR (Surface Plasmon Resonance). The bioelectrodes containing immobilized TRβ1 were capable of detecting and distinguishing among different HTs, including T3, T4, TRIAC and GC-1 at concentrations down to nM, compatible with physiological levels. The latter results point to the possibility of applications of the bioelectrodes in the diagnosis and treatment of thyroid dysfunctions.

Keywords: Thyroid hormones, Human thyroid nuclear receptor, Protein immobilization, Biosensor, Nanomedicine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-. Modelo de interação entre o poro αHL e a cadeia de PEG modificada, e estreptavidina nos lados *cis* e *trans* da bicamada lipídica. Figura adaptada de Movileanu e colaboradores (2000)[20]. 36

Figura 2. Representação esquemática do funcionamento de um típico instrumento de SPR. Adaptado de Green e colaboradores (2000)[31]. 42

Figura 3. Descrição de maneira ilustrativa de um sistema de biossensoriamento termistor enzimático. Figura adaptada de Scheper e colaboradores (1991)[36]. 45

Figura 4. Figura adaptada e extraída de Berggren e colaboradores (2001)[37] onde (A) representação esquemática de um biossensor baseado em afinidade sobre um eletrodo interdigitado e (B) Sensor de afinidade capacitivo baseado em duas placas metálicas. 47

Figura 5. Diagrama esquemático para a coleta de dados espectroscópicos de impedância elétrica de suspensões de células bacteriais em água deionizada e em solução-tampão PBS. Figura adaptada de Yang (2008)[38]. 48

Figura 6. Exemplos de funcionalização de superfícies de substratos para a imobilização de moléculas de interesse. Figura adaptada de Green e colaboradores (2000)[31]. 51

Figura 7. Esquemas de automontagem alternada de polímeros catiônicos/aniônicos: (A) lineares; (B) polímero iônico linear com proteína de carga oposta; (C) polímero iônico linear e placas de cerâmica. A e B são as camadas de cada carga, enquanto AB indica a bicamada que pode ser repetida *n* vezes do filme. Figura extraída de Lvov e colaboradores (1996)[42]. 52

Figura 8. Monocamadas auto-organizadas são formadas pela simples imersão de um substrato específico junto a uma solução contendo o reagente que irá ativar a superfície deste. Figura adaptada de Ulman (1996)[48]. 54

Figura 9. Diagrama esquemático ideal de uma simples estrutura cristalina de SAM. As monocamadas são formadas por moléculas de tióis junto a uma superfície de ouro com textura (111). Neste esquema, adaptado de Love e colaboradores (2005)[50], a anatomia e as características das SAMs foram destacadas. 55
Figura 10. Domínios comuns aos RNs contendo algumas funções indicadas. Figura adaptada de Robinson-Rechavi; Garcia; Laudet (2003)[55]. Nesta figura, a conformação *apo* é aquela em que a molécula assume antes da entrada do ligante, enquanto que após a ligação é denominada *holo*. 58
Figura 11. Estrutura primária das diferentes isoformas codificadas pelos genes TRβ e TRα. Figura adaptada de Barra e colaboradores (2004)[3]. 59
Figura 12. Representação do domínio de ligação do ligante do receptor hormonal tireoidiano. O TRβ1 LBD está complexado com o ligante, ilustrando como o ligante fica "dentro" da molécula de proteína[4]. 60
Figura 13. Estrutura dos hormônios tireoidianos T3 e T4, e dos análogos TRIAC e GC-1. Figura extraída de Brenta; Danzi; Klein (2007)[64]. 62
Figura 14. Ilustração das características físicas do eletrodo interdigitado utilizado para as medidas de impedância elétrica. Nesta figura, estão destacadas as dimensões do sistema. Este dispositivo também foi usado para as medidas voltamétricas. 67
Figura 15. Estruturas moleculares de (A) Octadecilsilano e (B) 11-AMU. 68
Figura 16. Representação esquemática para o estudo de interações receptor-ligante a partir da funcionalização múltipla do eletrodo interdigitado com silano e tiol. 69
Figura 17. Espectros de absorção para soluções de TRβ1-LBD 3,5 μM, dos hormônios tireoidianos T3, T4, e dos análogos sintéticos TRIAC e GC-1, todos a 100 μM. 75
Figura 18. Voltamogramas cíclicos de segunda varredura do processo de oxidação resultantes do eletrodo interdigitado na (—) ausência de SAM e na (---) presença de SAM 1,0 mM de 11-AMU. 77

Figura 19. Espectros de infravermelho referentes a: SAM de tiol sobre o substrato de vidro recoberto com ouro (AUSH); região LBD da molécula de TRβ1 sobre substrato de vidro recoberto com ouro (AuTR) e SAM de tiol sobre o substrato de vidro recoberto com ouro contendo TRβ1 LBD imobilizada sobre esta (AUSHTR).....79
Figura 20. Espectros de infravermelho para os filmes nanoestruturados contendo TRβ1-LBD (adsorvidos sobre monocamada de tiol), novamente ilustrado, e após interagir com HTs: Legenda: AuSHTR – superfície de ouro e monocamada de tiol contendo TRβ1-LBD imobilizado, AuSHTRT3 – AuSHTR contendo o ligante T3, AuSHTRT4 – AuSHTR contendo o ligante T4, AuSHTRTRIAC – AuSHTR contendo o ligante TRIAC e AuSHTRGC-1 – AuSHTR contendo o ligante GC-1.....82
Figura 21. Imagens bidimensionais obtidas por AFM das superfícies de (A) AuSH, (B) AuSHTR, (C) AuSHTRT3, (D) AuSHTRT4 e (E) AuSHTRTRIAC. 85
Figura 22. Sensorgrama obtido da injeção de TRβ1-LBD 8,6 µM sobre o sensor funcionalizado COOH, ACX Nomadics®. 88
Figura 23. Sensorgrama obtido pela análise das soluções de 8,6 µM TRβ1-LBD e das soluções 50,0 nM, 500,0 nM e 50,0 µM de T3 na superfície do sensor. 89
Figura 24. Curvas de capacitância obtidas pela imersão dos eletrodos (A) limpo, (B) contendo SAMs de silano e tiol - “silatiol” e (C) biossensor em soluções de diferentes concentrações de T4. 91
Figura 25. Gráficos de *Loadings* a (A) 100 Hz e (B) 1 KHz resultantes da análise dos três sistemas de eletrodos: eletrodo limpo, “silatiol” e biossensor. Todas as combinações são relativas aos quatro tipos de hormônios e análogos, T3, T4, TRIAC e GC-1, na concentração de 50 nM. Tratamento obtido pelo software Pirouette®.....93
Figura 26. Gráficos de *Loadings* a (A) 100 Hz e (B) 1 KHz resultantes da análise binária dos eletrodos limpo e “silatiol”. Todas as combinações são relativas aos quatro tipos de hormônios e análogos, T3, T4, TRIAC e GC-1, bem como suas

concentrações, 2,5 nM, 50,0 nM, 500,0 nM e 50,0 µM. Tratamento obtido pelo software Pirouette®.....94
Figura 27. Gráficos de *Loadings* a (A) 100 Hz e (B) 1 KHz resultantes da análise binária dos eletrodos limpo e biossensor. Todas as combinações são relativas aos quatro tipos de hormônios e análogos, T3, T4, TRIAC e GC-1, bem como suas concentrações, 2,5 nM, 50,0 nM, 500,0 nM e 50,0 µM. Tratamento obtido pelo software Pirouette®.....95
Figura 28. Gráficos de *Loadings* a (A) 100 Hz e (B) 1 KHz resultantes da análise binária dos eletrodos "silatiol" e biossensor. Todas as combinações são relativas aos quatro tipos de hormônios e análogos, T3, T4, TRIAC e GC-1, bem como suas concentrações, 2,5 nM, 50,0 nM, 500,0 nM e 50,0 µM. Tratamento obtido pelo software Pirouette®.....96
Figura 29. Gráficos de PCA obtidos a 100 Hz a partir dos valores de capacitância e nas concentrações de 2,5 nM, 50,0 nM e 500,0 nM para GC-1, T3, T4 e TRIAC. Tratamento obtido pelo software MatLab®.....97
Figura 30. Gráficos de PCA obtidos a 1 KHz a partir dos valores de capacitância e nas concentrações de 2,5 nM, 50,0 nM e 500,0 nM para GC-1, T3, T4 e TRIAC. Tratamento obtido pelo software MatLab®.....98
Figura 31. Gráficos de PCA obtidos a 100 Hz a partir dos valores de capacitância e nas concentrações de 2,5 nM, 50,0 nM e 500,0 nM para T3, T4 e TRIAC. Tratamento obtido pelo software MatLab®.....99
Figura 32. Gráficos de PCA obtidos a 1 KHz a partir dos valores de capacitância e nas concentrações de 2,5 nM, 50,0 nM e 500,0 nM para T3, T4 e TRIAC. Tratamento obtido pelo software MatLab®.....100
Figura 33. Gráficos de PCA obtidos para a concentração definida de 50,0 nM de GC-1, T3, T4 e TRIAC a frequências de (A) 100 Hz e (B) 1 KHz. Tratamento obtido pelo software MatLab®. 101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atribuição proposta para as bandas referentes às SAMs de AuTR, AuSH, AuSHTR, AuSHTRT3, AuSHTRT4 e AuSHTRTRIAC[76,78]. 83

Tabela 2. Valores de rugosidade para as amostras contendo o método de imobilização de funcionalização de substrato recoberto com ouro. 84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RN	Receptor Nuclear
TR	Receptor Tireoidiano (*Thyroid Receptor*)
LBD	Domínio de Ligação do Ligante (*Ligand Binding Domain*)
TRβ1	Isoforma β1 do Receptor Tireoidiano
HT	Hormônio Tireoidiano (*Hormone Thyroid*)
T3	3,5,3'-triiodotironina
T4	3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina ou tiroxina
TRIAC	3,5,3'-ácido triiodotiroacético
GC-1	Ácido 3,5-dimetil-4-(4'-hidróxi-3'-isopropilbenzil)-fenóxi acético
SAM	Monocamadas Auto-organizadas (*Self-Assembled Monolayers*).
PCA	Análise das Componentes Principais (*Principal Component Analysis*)
pI	Ponto Isoelétrico
BSA	Albumina do Soro Bovino (*Bovine Serum Albumin*)
PVC	Poli(Cloreto de Vinila)
SPR	Ressonância de Plasma de Superfície (*Surface Plasmon Surface*)
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ITO	Óxido de estanho–índio (*Indium Tin Oxide*)
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
CT	Toxina da Cólera (*Cholera Toxin*)
FIA	Análise por injeção em fluxo (*Flow Injection Analysis*)
MCQ	Microbalança de Cristal de Quartzo
CNT	Nanotubos de Carbono (*Carbon Nanotubes*)
αHL	α-Hemolisina
PEG	Poli(Etileno Glicol)
Anti-EGFR	Anticorpos monoclonais do receptor do fator de crescimento epitelial (*Epithelial Growth Factor Receptor*)
TR-FIA	*Time-Resolved-Fluoroimmunoassay*

F	Constante de Faraday
A	Área
C	Concentração
D	Coeficiente de Difusão
pH	Potencial Hidrogeniônico
Δf	Variação de frequência
Δm	Variação de massa
f_0	Frequência fundamental
ρ_q	Densidade do cristal de quartzo
μ_q	Módulo de cisalhamento do cristal de quartzo
ε	Constante dielétrica
ε_0	Permissividade do vácuo (8,85419 $pF.m^{-1}$)
EIS	Espectroscopia de Impedância Elétrica (*Electrical Impedance Spectroscopy*)
PBS	Solução-tampão fosfato (*Phosphate Buffer Solution*)
DBD	Domínio de Ligação ao DNA (*DNA-Binding Domain*)
HRE	Elementos Responsivos a Hormônios (*Hormone Response Elements*)
TRβ2	Isoforma β2 do receptor tireoidiano
TRα1	Isoforma α1 do receptor tireoidiano
TRα2	Isoforma α2 do receptor tireoidiano
11-AMU	Ácido 11-Mercaptoundecanóico
DTT	Ditiotreitol
UV-VIS	Ultravioleta-Visível
N_2	Nitrogênio
AuTR	Superfície recoberta de ouro contendo SAM de TRβ1-LBD
AuSHTR	Superfície recoberta de ouro contendo SAMs de tiol e TRβ1-LBD
AuSHTRT3	Superfície recoberta de ouro contendo SAMs de tiol, TRβ1-LBD e T3
AuSHTRT4	Superfície recoberta de ouro contendo SAMs de tiol, TRβ1-LBD e T4
AuSHTRTRIAC	Superfície recoberta de ouro contendo SAMs de tiol, TRβ1-LBD e TRIAC

AuSHTRGC-1	Superfície recoberta de ouro contendo SAMs de tiol, TRβ1-LBD e GC-1
FTIR	Região do Infravermelho com Transformada de Fourier
AFM	Microscopia de Força Atômica (*Atomic Force Microscopy*)
UR	Unidades de Resposta
K_a	Constante de associação
K_d	Constante de dissociação
K_D	Constante de equilíbrio de dissociação
Silatiol	Eletrodo interdigitado funcionalizado com silano e tiol
PC	Componentes Principais (*Principal Components*)
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
Phe	Fenilalanina
Rpm	Rotações por minuto
Anti-IGF1	Anticorpos para receptor de fator de crescimento tipo 1
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 29

2 OBJETIVOS 31

2.1 Objetivo geral 31

2.2 Objetivos específicos 31

3 REVISÃO DA LITERATURA 32

3.1 Biossensores 32

3.1.1 Biossensores enzimáticos 33

3.1.2 Biossensores de membrana 35

3.1.3 Biossensores baseados em células 37

3.1.4 Sensores baseados em biofinidade 39

3.2 Técnicas de detecção 40

3.2.1 Técnicas ópticas 40

3.2.2 Técnicas eletroquímicas 42

3.2.3 Técnicas massa-sensíveis e piezoelétricas 43

3.2.4 Técnicas termométricas 45

3.2.5 Os biossensores capacitivos 46

3.3 Imobilização de biomoléculas em biossensores 49

3.3.1 Imobilização de proteínas a partir de interações não-covalentes 49

3.3.2 Imobilização de biomoléculas a partir de interações covalentes 53

3.4 Receptores nucleares 56

3.4.1 O receptor de hormônios tireoidianos 59

3.5 Os hormônios tireoidianos 61

3.6 Detecção de hormônios tireoidianos 63

4 EXPERIMENTAL 65

4.1 Materiais 65

4.2 Metodologia 65

4.2.1 Preparação das soluções de biomoléculas. 66

4.2.2 Modificação dos eletrodos interdigitados com SAMs 67

4.2.3 Funcionalização das lâminas de vidro. 69

4.3 Técnicas de caracterização e detecção 70

4.3.1 Espectroscopia na região do ultravioleta- visível (UV-VIS) 70

4.3.2 Medidas voltamétricas 70

4.3.3 Detecção dos HTs utilizando-se Espectroscopia de Impedância Elétrica (EIS, *Electrical Impedance Spectroscopy*) 70

4.3.4 Espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) modo reflexão 71

4.3.5 Microscopia de Força Atômica (AFM, *Atomic Force Microscopy*) 71

4.3.6 Ressonância de Plasma de Superfície (SPR, *Surface Plasmon Resonance*) 72

4.3.7 Análise das Componentes Principais (PCA, *Principal Component Analysis*) 72

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES 74

5.1 Espectroscopia na região do ultravioleta-Visível - UV-VIS 74

5.2 Medidas eletroquímicas 76

5.3 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier - FTIR 78

5.4 Microscopia de Força Atômica - AFM 84

5.5 Ressonância de Plasma de Superfície - SPR 87

5.6 Detecção de HTs através de Espectroscopia de Impedância Elétrica - EIS 90

6 CONCLUSÕES 103

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 104

REFERÊNCIAS[1] 105

1 INTRODUÇÃO

A habilidade de reconhecimento de substâncias biológicas em organismos é muito ampla. Com o uso de biorreceptores desenvolvidos a partir de organismos ou receptores biológicos, pesquisadores podem desenvolver novos meios de análises químicas de alta seletividade para o reconhecimento de sistemas biológicos[1]. Estes elementos de biorreconhecimento combinados com diferentes métodos de transdução auxiliam no desenvolvimento nas áreas e tecnologias relacionadas às bioanálises, como os biossensores.

Os biossensores podem ser definidos, de maneira geral, como dispositivos constituídos de um sistema de reconhecimento biológico, frequentemente chamado de biorreceptor, e um transdutor[2]. O biorreceptor é uma camada constituída de espécies moleculares biológicas que utilizam um mecanismo bioquímico para reconhecimento. Esta camada atua de acordo com interações antígeno-anticorpo, interações de ácidos nucléicos, interações enzimáticas, ou aquelas entre uma molécula–alvo e seu receptor, como é o caso dos hormônios tireoidianos (HTs) e seu receptor nuclear específico (TR).

Os hormônios tireoidianos são as moléculas-alvo para os TRs e exercem importante influência no sistema fisiológico humano[3,4]. Em doses fisiológicas normais, os HTs são reguladores da temperatura corporal e atuam no crescimento, diferenciação e maturação dos tecidos. Agem como reguladores do metabolismo de carboidratos e gorduras, diminuindo a ação da insulina e acelerando a sua degradação e, no caso dos lipídeos, promovendo a degradação do colesterol em ácidos biliares. Porém, quando em excesso, os HTs podem elevar a concentração de glicose sanguínea, aumentar o consumo de oxigênio, diminuindo o rendimento energético, aumentar o catabolismo das proteínas e das gorduras, produzir desmineralização óssea e influenciar nas taxas de batimentos cardíacos.

Disfunções tireoidianas são doenças endócrinas muito comuns, e recursos consideráveis são destinados para monitorar e diagnosticar os seus tratamentos. Dentre as doenças tireoidianas mais comuns pode-se citar hipotireoidismo, hipertireoidismo, nódulos tireoidianos, bócio, câncer, tireoidite, entre outras. O monitoramento dos níveis de HTs é realizado pela detecção destes em ensaios laboratoriais. Geralmente são utilizados radioimunoensaios[5,6] para medir os níveis hormonais em análises clínicas, mas existem também outros estudos na literatura onde os métodos são baseados em fluorescência[7] e ensaios de sensoriamento amperométrico[8].

Neste trabalho de mestrado, foi investigado o processo de imobilização do receptor tireoidiano humano para atuar como o biorreceptor de diferentes hormônios e análogos, dentre eles T3, T4, e os análogos TRIAC e GC-1. A camada biorreceptora estudada é constituída da região de domínio de ligação ao ligante (LBD, *Ligand Binding Domain*) da isoforma β1 do receptor hormonal tireoidiano humano (TRβ1) imobilizada pela a técnica de monocamadas auto-organizadas (SAMs, *Self-Assembled Monolayers*). Este estudo de biossensoriamento é inédito na literatura, onde a camada biorreceptora é ancorada em um substrato previamente funcionalizado com moléculas de silano e tiol. O substrato consiste de um eletrodo interdigitado contendo trilhas de ouro, que age como um capacitor em um ensaio de impedância elétrica. Esta arquitetura é inovadora e permite a detecção de hormônios tireoidianos e análogos, pela análise das curvas de capacitância resultantes da interação receptor-ligante. Além disso, a transdução é realizada através de medidas capacitivas, resultando em uma análise de alta sensibilidade e seletividade.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um biossensor capacitivo baseado em afinidade para a detecção de hormônios tireoidianos.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar o processo de imobilização da região LBD do receptor humano tireoidiano TRβ1;
- Analisar a interação específica entre TRβ1-LBD e diferentes hormônios tireoidianos, como T3, T4 e os análogos TRIAC e GC-1;
- Avaliar a reposta receptor-ligante por meio de medidas de impedância elétrica com o uso de um eletrodo interdigitado;
- Averiguar a resposta de detecção e diferenciação entre os hormônios com o uso da ferramenta estatística de Análise das Componentes Principais (PCA, *Principal Component Analysis*).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Biossensores

A imobilização de biomoléculas em filmes ultrafinos nanoestruturados pode ser empregada para a construção de biossensores que, por sua vez, possibilitam grandes avanços nas áreas biológicas, alimentícias, médicas e na agricultura, devido à capacidade de caracterização e quantificação de analitos específicos. A força diretriz para o desenvolvimento de biossensores surgiu do crescente interesse na miniaturização, particularmente para aplicação em diagnósticos.

Um biossensor é um tipo particular de sensor químico que utiliza propriedades de reconhecimento de componentes biológicos em uma camada sensorial imobilizada sobre um transdutor[9]. O sistema de reconhecimento é frequentemente chamado de biorreceptor[1], que é uma camada constituída de espécies moleculares biológicas, como antígenos, anticorpos, ácidos nucléicos, enzimas, entre outras, que utilizam um mecanismo bioquímico para reconhecimento.

Existem vários tipos de biossensores baseados nas características acima citadas. De acordo com a IUPAC[10] (*International Union of Pure and Apllied Chemistry*), um biossensor (eletroquímico) é um dispositivo integrado capaz de fornecer informações analíticas quantitativas ou semiquantitativas específicas utilizando um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico) o qual é retido fisicamente em contato direto com o elemento de transdução eletroquímica. A interação do analito com o biorreceptor gera um efeito que será captado pelo transdutor, o qual converte este efeito em uma informação mensurável, como um sinal elétrico ou óptico. A transdução do efeito obtido por estas interações pode ser realizada através de medidas ópticas (luminescência, absorção, ressonância de plasma de superfície, etc), medidas eletroquímicas, medidas de massa, medidas de capacitância, entre outras.

O atrativo dos sensores baseados na afinidade entre biomoléculas a partir dos tipos de transdução previamente citados está na determinação direta do analito. Porém, um dos problemas associados à afinidade destes biossensores consiste em ligações não específicas, pois há dificuldade em atribuir os sinais medidos de interações específicas e não específicas.

Deste modo, o transdutor deve ser sensível às mudanças conformacionais do sítio de ligação do receptor ou às mudanças de carga que ocorrem em torno deste. Para isso, é importante que a superfície do transdutor contenha uma camada biorreceptora capaz de reduzir os efeitos de ligações não específicas.

O maior desafio na construção de um biossensor é assegurar que a camada química seletiva gere um sinal com boa intensidade, quando da interação com o analito de interesse, e que nenhum sinal seja gerado devido a outras interações ou condições não-específicas[9]. Moléculas biológicas têm sido empregadas com sucesso em camadas seletivas, particularmente proteínas como anticorpos, enzimas, lectinas e receptores moleculares. Em organismos vivos, estas proteínas ligam-se quimicamente em ambientes internos e externos, resultando na produção de vários sinais químicos. Estes sinais químicos podem ser convertidos para sinais eletrônicos, altamente apropriados para uso em biossensores.

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o mecanismo de interação específica, incluindo: bioafinidade, catalíticos ou enzimáticos, membrana, e sensores de células[11], mesmo que frequentemente os dois últimos atuem por princípios catalíticos ou de afinidade.

3.1.1 Biossensores enzimáticos

Os biossensores enzimáticos utilizam a bioespecificidade de uma reação enzimática ocorrendo próxima a um eletrodo, que gera sinais de corrente elétrica ou de diferença de potencial, para análises quantitativas. Por exemplo, a oxidação da glicose produz peróxido de hidrogênio, o qual, por sua vez, gera elétrons através de sua oxidação pelo eletrodo. A intensidade de corrente é usada como medida da quantidade de glicose na amostra[12].

As enzimas são catalisadoras, moléculas especializadas em acelerar a velocidade de uma reação sem, no entanto, participar dela como reagente ou produto[13]. Estas biomoléculas atuam ainda como reguladoras de conjuntos complexos de reações, sendo consideradas as unidades fundamentais do metabolismo celular. A atividade catalítica fornecida pelas enzimas permite a obtenção de limites de detecção muito baixos em relação a outras técnicas de interação mais comuns. Esta atividade depende da integridade conformacional da proteína nativa[1].

Basicamente, todos os sensores enzimáticos trabalham a partir da imobilização de enzimas sobre um transdutor. Existem diversas formas de imobilizar destas moléculas em substratos para a detecção de espécies biológicas de interesse, promovendo a conversão de interações ou reações químicas em sinais mensuráveis. Otimizações de sensores *in vitro* para glicose e outros analitos como a lactose, a qual é de interesse em fluidos corporais e na área alimentícia, são baseadas principalmente em novas técnicas de imobilização que permitem uma transferência eletrônica direta para o eletrodo[1,11,14,15].

Enzimas podem ser imobilizadas juntamente com nanopartículas de ouro (AuNPs) devido às atrativas propriedades físico-químicas destas últimas, com o intuito de monitorar alguma reação de interesse. Em um trabalho de Dong e colaboradores (2010)[16], um biossensor para a detecção de compostos fenólicos foi desenvolvido baseado no método de supressão de luminescência de nanopartículas híbridas. Estas nanopartículas híbridas são resultado de uma reação enzimática entre nanopartículas de ouro contendo N-acetil-L-cisteína e tirosinase. Desta forma, a supressão de luminescência dos compostos intermediários produzidos nesta reação de oxidação catalítica enzimática, as quinonas, é avaliada fornecendo um gráfico de emissão relativa *versus* concentração de quinona.

Como aplicação no auxílio de diagnóstico, e consequente tratamento de doenças, o uso de enzimas é amplamente explorado pela comunidade científica, como o estudo reportado por Omole e colaboradores (2009)[17]. Estes autores desenvolveram um imunossensor eletroquímico para o monitoramento de biomarcadores de dor, dentre os quais ciclo-oxigenase 2 (COX-2), que participa dos processos inflamatórios, indicativos de disfunções no organismo. Para isso, anticorpos de COX-2 foram imobilizados junto a um eletrodo previamente funcionalizado e medidas amperométricas foram coletadas com detecção das enzimas COX-2. Este biossensor enzimático oferece o suporte para acompanhar patofisiologias de dor, inflamação e proliferação de células nos processos relacionados ao câncer.

Em um estudo de Lin e colaboradores (2007)[15] um biossensor amperométrico enzimático foi desenvolvido com o intuito de monitorar a detecção seletiva de glicose a partir da interação de nanotubos de carbono (CNTs) funcionalizados. Os CNTs foram funcionalizados com enzimas glicose oxidase e depositados sobre um substrato para atuar como o eletrodo de trabalho, em uma célula eletroquímica, juntamente com o eletrodo de referência prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) e o eletrodo auxiliar de platina. Neste sistema, injeções de solução de glicose contendo alguns interferentes comuns (acetaminofeno e ácidos úrico e ascórbico) foram adicionados ao sistema para avaliar os níveis de glicose detectados

da interação específica com os CNTs funcionalizados. O biossensor propiciou picos catódicos e anódicos bem definidos para o analito, neste caso, glicose, identificando-o dentre os demais interferentes.

A importância de sensores de glicose, em virtude do diagnóstico de diabetes, continua direcionando em grande escala a confecção destes biossensores baseados em glicose oxidase em um sensor eletroquímico. Sensores implantáveis estão sendo estudados para uso clínico, baseados em eletrodos movidos a reações enzimáticas[11].

3.1.2 Biossensores de membrana

Membranas baseadas em fosfolipídios são usadas como matrizes onde moléculas receptoras naturais podem ser reconstituídas. Sistemas analíticos desta natureza podem ser úteis para a agricultura, meio ambiente e análises clínicas.

Em uma solução aquosa, fosfolipídios auto-organizados formam uma membrana bicamada lipídica esférica, que contém uma cavidade aquosa, produzindo uma estrutura conhecida como lipossomo. Moléculas fosfolipídicas são constituídas de um grupo polar terminal com cadeia hidrofóbica, a qual é composta por duas cadeias hidrocarbônicas. A formação de lipossomos, assim como de micelas, é energeticamente favorável e tende a formar associações com a porção hidrofóbica de moléculas, a fim de reduzir a interação com o meio aquoso[18].

A incorporação de moléculas em lipossomos é capaz de originar um sistema de reconhecimento biológico[2,19]. Os lipossomos possuem duas formas distintas que podem ser alteradas quimicamente: a membrana bicamada e a cavidade aquosa interior. Componentes hidrofóbicos e anfipáticos podem ser inseridos junto à estrutura de bicamada ou imobilizados sobre a superfície. A cavidade aquosa interior pode ser usada para a entrada e transporte de moléculas solúveis em água, as quais podem ter detecção direta, ou serem liberadas após o rompimento do lipossomo.

Em estudos de Movileanu e colaboradores (2000)[20], um tipo de biossensor membrânico foi desenvolvido para detecção de proteínas em solução com concentrações da ordem de nanomolar. Estes autores desenvolveram uma estrutura protéica na qual uma cadeia polimérica funcionalizada simples foi anexada a um sítio definido. Este foi alocado dentro da

cavidade central de um poro transmembrânico auto-organizado de subunidades de α-hemolisina (αHL), uma toxina secretada por *Staphylococcus aureus*. Esta toxina origina poros heptaméricos com formato de cogumelo nas bicamadas lipídicas. Uma cadeia polimérica simples de poli(etileno glicol) (PEG) foi previamente biotinilada em sua extremidade dentro do lúmen do poro de αHL. Medidas de corrente elétrica passando através do poro permitiram o monitoramento da dinâmica estrutural da cadeia polimérica. Assim, puderam ser capazes de detectar o aparecimento da biotina em ambos os lados da membrana, *cis* e *trans*, durante um simples experimento de captura distinta de estreptavidina, conforme mostrado na Figura 1. A frequência e a natureza do evento de captura foram usadas para identificar e quantificar proteínas em solução.

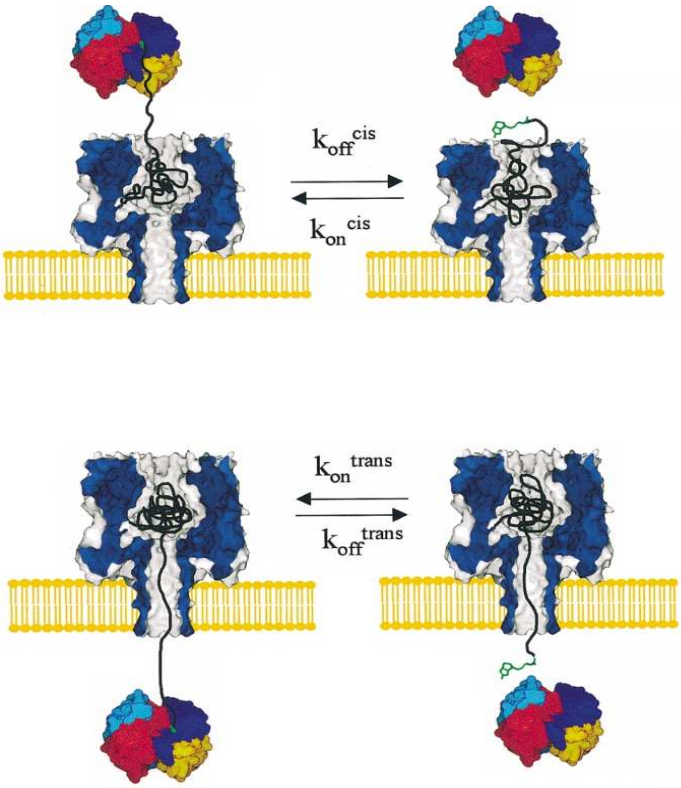

Figura 1-. Modelo de interação entre o poro αHL e a cadeia de PEG modificada, e estreptavidina nos lados *cis* e *trans* da bicamada lipídica. Figura adaptada de Movileanu e colaboradores (2000)[20].

Membranas oriundas de bicamadas lipídicas foram utilizadas para a detecção da toxina produzida pela bactéria causadora de cólera, CT (C*holera Toxin*). Este estudo foi realizado por Phillips e Cheng (2005)[21], os quais utilizaram as membranas de bicamadas lipídicas

tratadas com fosfatidilcolina como o suporte para moléculas receptoras de CT. Com o auxílio de um dispositivo de poli(dimetilsiloxano) baseado em microfluídica puderam realizar um imunoensaio para a obtenção de CT a baixos limites de detecção. As moléculas receptoras da toxina CT foram anexadas à bicamada lipídica, as quais serviam de suporte para a captura das moléculas de CT na membrana, ocasionando a variação na intensidade de fluorescência.

O biossensoriamento de moléculas de DNA também tem sido amplamente estudado. Zhou e colaboradores (2008)[22] desenvolveram um biossensor para detectar DNA incorporando moléculas de oligonucleotídeos junto a superfície de membranas de bicamadas lipídicas. Os dados foram confirmados por medidas de voltametria linear de varredura e espectroscopia na região de infravermelho com transformada de Fourier.

Atualmente já se podem obter membranas com longo tempo de estabilidade, de acordo com as metodologias aplicadas. No último exemplo, as membranas formadas de acordo com o método de Zhou e colaboradores (2008)[22] apresentaram estabilidade por até 24 h, sem propensão a romperem-se por choques mecânicos ou elétricos.

3.1.3 Biossensores baseados em células

Biossensores baseados em células utilizam as respostas fisiológicas de células vivas para detectar a atividade de espécies biológicas. Como detectores, estes biossensores exploram a sensibilidade envolvida nos diferentes sistemas biológicos a partir de uma ampla gama de estímulos bioquímicos. Receptores, enzimas e outras espécies que podem ser sensíveis a um analito são mantidas em um modo fisiológico pelo ambiente celular nativo.

Os biossensores baseados em células possuem aplicabilidade nas áreas que requerem análise funcional de espécies desconhecidas, como no monitoramento do ambiente de interesse, poluentes, ou mesmo descoberta de novas drogas. Neste tipo de biossensor, muitos são os métodos de detecção resultantes da transdução dos sinais sensoriais de células, os quais incluem medidas de fluorescência celular, metabolismo, medidas ópticas e elétricas. Na área alimentícia já existem inúmeros trabalhos relacionados ao biossensoriamento baseados em diferentes métodos, buscando a detecção de agentes tóxicos. Por exemplo, resíduos de micotoxina estrogênica foram detectados por meio de bioluminescência, em um biossensor baseado em um modelo de célula eucariótica[23]. Neste trabalho, o objetivo foi a detecção do

analito micotoxina em amostras de leite, onde a contaminação de humanos e animais com esta toxina pode gerar problemas de saúde como intoxicação, imunossupressão e aumento no risco de câncer.

A fim de avaliar e diagnosticar células cancerígenas epiteliais orais, El-Sayed; Huang e El-Sayed (2005)[24] utilizaram técnicas de espalhamento e espectroscópicas de SPR como biossensoriamento molecular. Para isso, investigaram a ação de colóides de nanopartículas de ouro conjugadas com anticorpos monoclonais do receptor do fator de crescimento epitelial (anti-EGFR) em meios de cultura celular, os quais continham uma linhagem de células epiteliais não-malignas e duas diferentes linhagens de células epiteliais orais malignas. Com base nos resultados, os autores puderam averiguar que as nanopartículas conjugadas com o anticorpo anti-EGFR ligaram-se especificamente e homogeneamente à superfície das células cancerígenas. A afinidade desta ligação foi superior a 600 % em relação às células não-cancerígenas, constituindo, desta forma, uma técnica potencialmente útil no diagnóstico de câncer.

Solanki e colaboradores (2009)[25] exploraram a afinidade entre enzima e triglicerídeo para a construção de um biossensor. Para isso, imobilizaram a enzima lipase via interações eletrostáticas em um filme de óxido de cério nanoestruturado fabricado sobre um substrato de óxido de estanho-índio (ITO, *Indium Tin Oxide*). A resposta do biossensor foi monitorada em diferentes concentrações do triglicerídeo tributirina usando a técnica de voltametria cíclica. Os autores obtiveram boa linearidade e sensibilidade no método bem como baixo limite de detecção. A análise cinética confirmou a afinidade do biossensor contendo lipase imobilizada por tributirina. A afinidade explorada neste estudo de biossensoriamento é de interesse para a área médica, uma vez que disfunções nos níveis de triglicerídeos podem acarretar em doenças coronárias, hiperlipidemia, diabetes, entre outras.

3.1.4 Sensores baseados em biofinidade

Os sensores baseados em bioafinidade compreendem uma ampla faixa de dispositivos, incluindo sensores para DNA (a partir de ácidos nucléicos), sensores antígeno-anticorpo, receptor-ligante, e enzima-inibidor, os quais vêm proporcionando, nas últimas décadas, várias aplicações em diagnósticos médicos. Muitos elementos baseados em bioafinidade estão sendo usados na construção de biossensores. Dentre eles estão os anticorpos, receptores, materiais biomiméticos e ácidos nucléicos. A relação estequiométrica entre estes elementos e seus ligantes, a área superficial finita de um transdutor, a imobilização e a orientação espacial, constituem fatores importantes no *design* e construção deste tipo de dispositivo[19].

Em um estudo de reconhecimento molecular realizado por Yang e colaboradores (2009)[26] a molécula fotossensível meso-tetrakis(4-hidroxifenil) porfirina foi imobilizada em um eletrodo de ouro modificado de microbalança de cristal de quartzo (MCQ) para detecção de hemoglobina. Com um sistema de análise por injeção em fluxo, FIA (*Flow Injection Analysis*), estes autores puderam mostrar que o sensor de ouro contendo meso-tetrakis(4-hidroxifenil) porfirina imobilizada exibiu sensibilidade e interação específica com as moléculas de hemoglobina.

A imobilização de anticorpos pode ser realizada por meio de ligações covalentes, ligações cruzadas (ou *crosslinking*), adsorção física e também pelo uso de proteínas, como proteína A ou proteína G. Nestes casos, a orientação randômica dos anticorpos imobilizados é limitante para que ocorra a interação efetiva com o antígeno desejado.

Anticorpos específicos para a proteína C reativa foram imobilizados sobre a superfície de eletrodos interdigitados contendo trilhas de ouro[27] para a detecção desta proteína, que é uma espécie biológica que influencia em doenças cardiovasculares e inflamações. Os anticorpos foram imobilizados sobre uma SAM de tiol via ligações covalentes, e medidas de impedância elétrica foram coletadas com a imersão deste eletrodo biossensor em soluções a diferentes concentrações do antígeno, a proteína C reativa. Os resultados de detecção mostraram-se dependentes das concentrações e das frequências adotadas na análise elétrica.

Em comparação aos anticorpos, os receptores biológicos são consideravelmente mais diversos em estrutura e função. Dependendo do sistema receptor desejado, estas proteínas podem ser imobilizadas via ligação covalente (com um grupo quimicamente reativo na superfície do sensor), adsorção física, ou reconstituição junto a uma membrana de bicamada lipídica.

Existem alguns trabalhos que abordam a imobilização de moléculas receptoras a fim de monitorar a interação com determinados ligantes. Células provenientes de câncer de mama foram monitoradas por meio de um biossensor contendo espécies receptoras específicas, em trabalho reportado por Teker (2008)[28]. Este autor utilizou substratos de silício modificados com dois sistemas: um recoberto com nanotubos de carbono conjugados com anticorpos não específicos para as células cangerígenas mamárias, e outro recoberto por nanotubos de carbono conjugados com o receptor anti-IGF1 (anticorpos para receptor de fator de crescimento 1). Foram coletados valores de condutância para os dois sistemas, onde aquele que continha o receptor específico para as células em estudo apresentou ampla variação de condutância com o tempo, enquanto para o sistema não específico não foi observada variação considerável. Este sistema mostrou a capacidade de detecção pelo dispositivo utilizado, podendo ser aplicado para outros antígenos celulares.

3.2 Técnicas de detecção

Os biossensores também podem ser classificados de acordo com o método de transdução empregado[1,9,11]. Estes métodos constituirão as diferentes técnicas de detecção a serem adotadas para a obtenção de dados referentes ao analito. As principais formas de transdução são baseadas em métodos de detecção óptica, detecção eletroquímica, detecção de massa e piezoelétrica, além de detecção termométrica e impedanciométrica. Cada método contém subclasses, originando uma grande variedade para estudos concernentes à detecção de moléculas biológicas de interesse.

3.2.1 Técnicas ópticas

A transdução óptica oferece o maior número de subcategorias em relação às demais técnicas de detecção. Isto ocorre porque os biossensores ópticos podem ser usados por muitos tipos de espectroscopias (absorção, fluorescência, refração, Raman, etc.) com o registro de diferentes propriedades espectroquímicas, e também usados em ressonância de plasma de

superfície (SPR, *Surface Plasmon Resonance*)[1,29]. Nestes sensores, a quantidade de analito é determinada pela medida de índice de refração, propriedades de absorbância e fluorescência das moléculas do analito, e por outros meios de transdução químico-ópticos.

As medidas de índice de refração são normalmente obtidas por meio do uso de SPR. A ressonância de plasma de superfície é uma oscilação de densidade de carga que pode existir na interface de dois meios com constantes dielétricas de sinais opostos, onde um é metal e o outro, um dielétrico. O metal a ser usado deve exibir comportamento de elétrons livres, portanto, os mais adequados são prata, ouro, cobre e alumínio, dentre os quais os mais empregados são o ouro e a prata[30].

Geralmente, um sensor de SPR é compreendido por um sistema óptico, um meio de transdução que contém os domínios ópticos e bioquímicos, e um sistema eletrônico que suporta os componentes optoeletrônicos do sensor, que permitem o processamento dos dados[29].

O sistema de excitação do plasma de superfície desenvolvido por Kretschmann[30] é o princípio mais usado nos instrumentos de SPR[*] (1975 apud de Carvalho e colaboradores, 2003). A configuração de Kretschmann é baseada no fenômeno de reflexão interna total. Isto ocorre quando a radiação que está atravessando um meio opticamente denso (o vidro, por exemplo) atinge uma interface entre este meio e um meio de menor densidade óptica (o ar, por exemplo), e é refletido de volta ao meio mais denso. Embora a radiação incidente seja totalmente refletida internamente, uma componente desta radiação, a onda ou campo evanescente, penetra na interface do meio de menor densidade a uma distância de um comprimento de onda. A reflexão interna total desta radiação resulta em um fenômeno de campo evanescente capaz de excitar as moléculas localizadas próximo à interface, por exemplo, vidro-líquido[31].

Para esta técnica de SPR, uma fonte monocromática e polarizada de radiação é utilizada, e a interface entre os dois meios opticamente densos é recoberta com um fino filme metálico. Uma representação esquemática deste fenômeno está ilustrada na Figura 2.

Assim, a onda evanescente desta fonte de radiação é capaz de interagir com os elétrons livres que oscilam no filme metálico a um ângulo específico de incidência.

---

[*] KRETSCHMANN, E.; KROGER, E. Reflection and transmission of light by a rough surface, including results for surface-plasmon effects. **Journal of the Optical Society of America**, v. 65, p. 150-154, 1975.

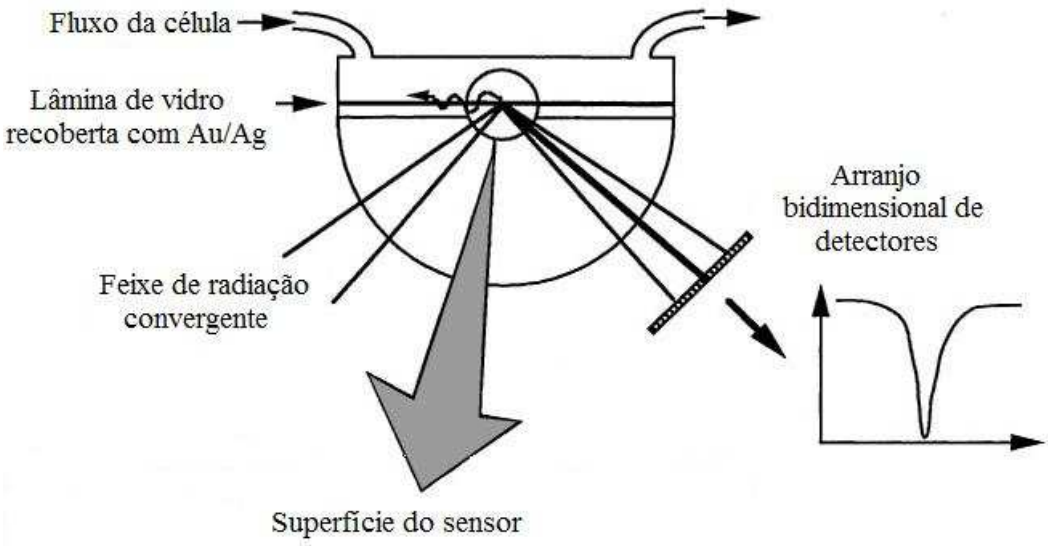

Figura 2. Representação esquemática do funcionamento de um típico instrumento de SPR. Uma lâminade vidro recoberta com ouro ou prata é acoplada sob um prisma, através do qual um feixe convergente de radiação é focado abaixo do filme de ouro/prata (Au/Ag), e então refletido para o arranjo de detecção. Soluções de analito são conduzidas através da célula de fluxo à temperatura e velocidade previamente definidas. A superfície do filme de Au/Ag pode ser funcionalizada a fim de apresentar uma variedade de superfícies de sensor para análises específicas, conforme exemplificado na Figura 6. Adaptado de Green e colaboradores (2000)[31].

Esta interação com o filme metálico gera perda de energia da radiação incidente, resultando na redução da intensidade da radiação refletida, a qual pode ser detectada por um arranjo bidimensional de fotodiodos.

3.2.2 Técnicas eletroquímicas

Os sistemas eletroquímicos representam os dispositivos mais antigos e melhor conhecidos em aplicações sensoriais, e compreendem técnicas como amperometria, condutimetria, potenciometria, entre outras. Um típico biossensor eletroquímico consiste de um eletrodo contendo uma espécie seletiva, que podem ser anticorpos, enzimas, receptores biológicos, DNA, entre outros. Estas espécies representam a interface para um dispositivo capaz de receber os sinais biológicos e convertê-los em unidades de medidas, como um eletrodo iônico seletivo, ou um eletrodo de platina.

Reações catalisadas por enzimas, por exemplo[19], que resultam em uma alteração de concentração de dióxido de carbono ou em uma espécie iônica, podem ser potenciometricamente determinadas. A formação catalítica de produtos eletroquimicamente ativos, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e fenóis, pode ser medida amperometricamente.

Concentrações de espécies químicas também podem ser obtidas cronoamperometricamente. Neste caso, a corrente que flui através do eletrodo de trabalho pode ser determinada como função do tempo em um potencial constante[32]. A equação de Cottrell, Equação 1, onde o fluxo de corrente é correlacionado com a variação de concentração das espécies oxidadas ou reduzidas na superfície do eletrodo de trabalho, permite o estudo deste tipo de sistema:

$$i = n\,F\,A\,D\frac{C}{\sqrt{\pi\,D\,t}} = \frac{n\,F\,A\sqrt{D}}{\sqrt{\pi\,t}} \times C \qquad (1)$$

onde: *i* é a corrente no tempo *t*, *n* é o número de elétrons, *F* é a constante de Faraday, *A* é a área do eletrodo, *C* é a concentração das espécies oxidadas e *D* é o coeficiente de difusão das espécies oxidadas.

Alguns cuidados devem ser tomados no emprego destas técnicas de detecção eletroquímicas, pois podem apresentar susceptibilidade a ruído elétrico, necessidade de eletrodos de referência estáveis, adsorção não-seletiva, e oclusão da superfície, comprometendo a atividade superficial do sensor. Além disso, são bastante sensíveis a alterações na força iônica, temperatura e pH.

3.2.3 Técnicas massa-sensíveis e piezoelétricas

Os dispositivos piezoelétricos são geralmente baseados em cortes especiais de cristal de quartzo, os quais podem oscilar mecanicamente quando submetidos a um potencial elétrico alternado. A oscilação mecânica do cristal (usualmente na ordem de MHz) pode ser muito

homogênea, e pode ser perturbada por mudanças mínimas de massa ou de microviscosidade causadas pelas reações de ligações seletivas na superfície do cristal. Mudanças de frequência menores que 1 Hz podem algumas vezes apresentar reprodutibilidade na medida, fornecendo uma sensibilidade na ordem de nanogramas em relação à superfície do dispositivo[11]. A microbalança de cristal de quartzo (MCQ) opera segundo este princípio.

Em aplicações eletroquímicas, o cristal de quartzo é recoberto com uma camada de ouro em forma de disco, em ambos os lados do cristal. Um dos lados fica exposto à solução na célula eletroquímica, enquanto o outro lado fica exposto ao ar. Dados voltamétricos são colhidos utilizando o disco recoberto com ouro como eletrodo de trabalho. Deste modo, a MCQ permite a medida simultânea de massa e de corrente neste tipo de experimento.

A MCQ utiliza as qualidades piezoelétricas do cristal de quartzo para medir mudanças de massa resultantes da interação com a superfície do cristal. Estas mudanças geram uma variação de frequência (Δf) no sistema, e podem ser relacionadas com a variação de massa (Δm), assumindo-se que esta esteja fina, uniforme e rigidamente aderida à superfície do cristal. A equação de Sauerbrey, Equação 2, expressa a relação entre Δf e Δm:

$$\Delta f = \frac{-2\Delta m f_0^2}{A\sqrt{\rho_q \mu_q}} = -\frac{2f_0^2}{A\sqrt{\rho_q \mu_q}}\Delta m \qquad (2)$$

onde Δf é a variação de frequência de ressonância no cristal de quartzo, em Hz, A é a área geométrica piezoeletricamente ativa dada em cm^2, f_0 é a frequência fundamental do cristal, Δm é a variação de massa ocasionada pela ressonância do cristal, ρ_q é a densidade do cristal de quartzo (2,648 $g.cm^{-3}$) e μ_q é o módulo de cisalhamento do cristal de quartzo (2,95 x 10^{11} $g.cm^{-1}.s^{-2}$)[33-35].

A detecção massa-sensível por MCQ possibilita novas aplicações no campo de diagnóstico médico, com o uso de sistemas biológicos antígeno-anticorpo, enzima-inibidor e receptor-ligante. O uso desta técnica oferece vantagens por não requerer soluções de analito opticamente transparentes e, por conseguinte, podem ser usados analitos como o sangue e a urina.

3.2.4 Técnicas termométricas

Sensoriamento calorimétrico ou sensoriamento termométrico envolvendo biocatalisadores imobilizados têm diversificado diversas áreas de aplicações biológicas[19]. Em princípio, um processo químico ou biológico é monitorado e quantificado pelas mudanças nas características térmicas de espécies em reação. Das leis fundamentais que regem as reações moleculares, praticamente todas estas reações estão associadas pela absorção ou liberação de calor. Muitas reações enzimáticas, por exemplo, estão associadas com a liberação de calor. Isto leva ao desenvolvimento de muitas gerações de calorímetros capazes de monitorar reações biológicas para posteriormente serem aplicadas em estudos de imobilização de biomoléculas.

Scheper e colaboradores (1991)[36] utilizaram um sistema de biossensoriamento termistor enzimático para o monitoramento simultâneo de açúcares, como glicose, lactose, maltose e sacarose. Na Figura 3 está ilustrado o sistema de biossensor termistor de maneira simplificada, adaptada à figura original destes autores.

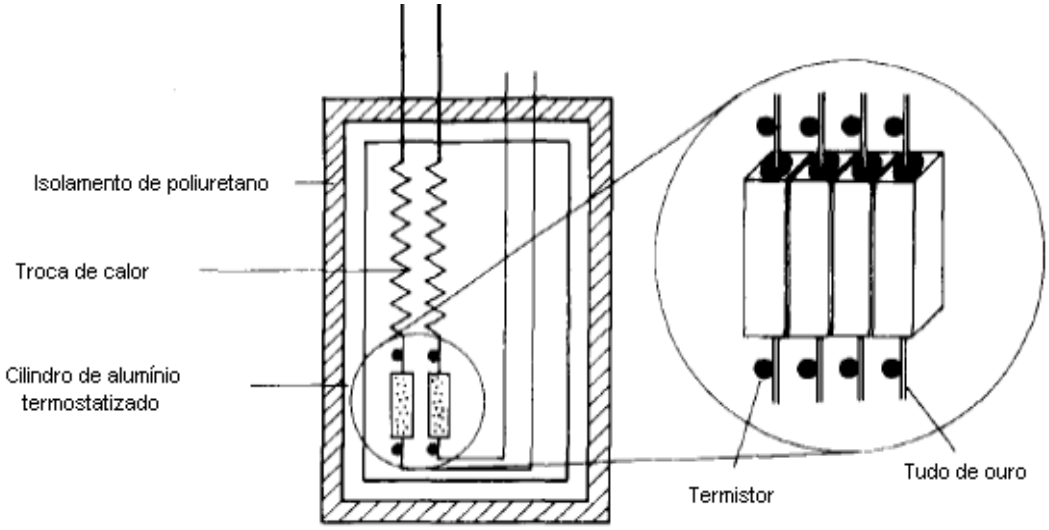

Figura 3. Descrição de maneira ilustrativa de um sistema de biossensoriamento termistor enzimático. Figura adaptada de Scheper e colaboradores (1991)[36].

Este estudo permite avaliar características dos processos de fermentação destas moléculas, a partir da observação da atividade enzimática e da variação de parâmetros como concentração e temperatura.

3.2.5 Os biossensores capacitivos

Os biossensores baseados em afinidade capacitivos podem ser construídos a partir de imobilização de elementos de reconhecimento em camadas ultrafinas sobre um eletrodo ou entre dois eletrodos, onde o analito é detectado a partir da medida das alterações nas propriedades dielétricas do sistema quando ocorre a interação com o antígeno[37]. Estas alterações também podem ser induzidas quando uma macromolécula é deslocada por uma pequena molécula de analito. Mudanças na conformação de proteínas sobre uma superfície, ocasionadas após a ligação ou interação de um ligante, também podem ser detectadas por medidas de capacitância.

Um capacitor é constituído de duas placas metálicas paralelas separadas por uma determinada distância e um dielétrico, podendo ser descrito pela Equação 3:

$$C = \varepsilon\varepsilon_0 A/d \qquad (3)$$

Onde ε é a constante dielétrica do meio entre as placas, ε_0 = 8,85419 $pF.m^{-1}$ (permissividade do vácuo), *A* é a área das placas e *d*, a distância entre elas. Desta forma, quando há uma mudança nas propriedades dielétricas no material entre as placas (Figura 4-A), também haverá uma mudança na capacitância do sistema.

Um típico sistema de detecção por medidas de capacitância foi publicado por Berggren e colaboradores (2001)[37], o qual foi adaptado na Figura 4. Estes autores exemplificaram uma aplicação deste sistema onde Bresler e colaboradores[†] (1992 apud Berggren e colaboradores, 2001) mediram bolhas de oxigênio em um eletrodo interdigitado

[†] Bresler, H. S.; LENKEVICH, M. J.; MURDOCK JR., J. F.;NEWMAN, A. L.; ROBLIN, R. O. Application of Capacitive Affinity Biosensor – HIV Antibody and Glucose Detection. **American Chemical Society Symposium**, v. 511, n. 9, p. 89-104, 1992.

para a obtenção de medidas indiretas de anticorpos HIV e glicose. Neste trabalho, amostras contendo anticorpos HIV ligaram especificamente a antígenos HIV imobilizados na superfície do sensor e, em um segundo estágio, eram ligados a um anticorpo conjugado com catalase. O eletrodo era então exposto a peróxido de hidrogênio, H_2O_2, o qual era convertido em oxigênio pela ação da catalase. A quantidade de bolhas de oxigênio era assim, uma medida da quantidade de anticorpos HIV. Glicose foi determinada de maneira similar com o uso de concavalina A como elemento de resposta, ou seja, camada biorreceptora.

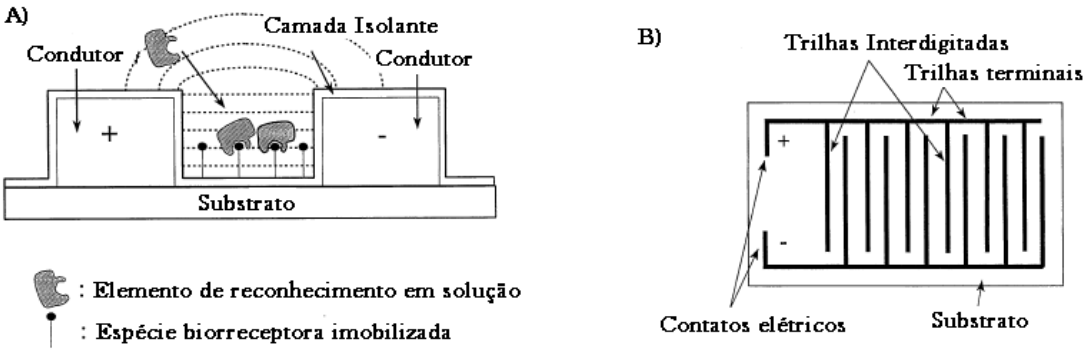

Figura 4. Figura adaptada e extraída de Berggren e colaboradores (2001)[37] onde (A) representação esquemática de um biossensor baseado em afinidade sobre um eletrodo interdigitado e (B) Sensor de afinidade capacitivo baseado em duas placas metálicas.

Yang (2008)[38] avaliou um método baseado nas propriedades de espectroscopia de impedância elétrica (EIS, *Electrical Impedance Spectroscopy*) para estudar suspensões de células bacteriais, com o uso de microeletrodos interdigitados. Para isso, utilizou suspensões de células *Salmonella* em água deionizada e solução-tampão fosfato (PBS, *Phosphate Buffer Solution*) em um intervalo amplo de frequências. A um determinado intervalo de frequência, obteve a relação entre a impedância da suspensão e a concentração celular, o que pôde possibilitar uma alternativa para a quantificação de células bacteriais de forma simples e de baixo custo. A Figura 5 ilustra o biossensor para células bacteriais em suspensão. Este sistema de biossensoriamento pode auxiliar na detecção e quantificação de bactérias patogênicas transmitidas por alimentos evitando a ocorrência de doenças relacionadas.

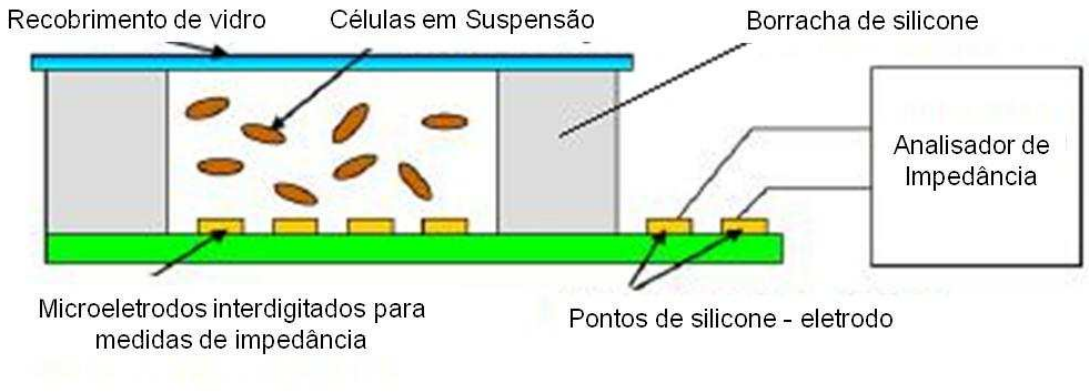

Figura 5. Diagrama esquemático para a coleta de dados espectroscópicos de impedância elétrica de suspensões de células bacteriais em água deionizada e em solução-tampão PBS. Figura adaptada de Yang (2008)[38].

Medidas de impedância elétrica foram utilizadas para detectar e caracterizar a adesão de dois diferentes tipos de cepas bacterianas. Bayoudh e colaboradores (2008)[39] avaliaram a caracterização elétrica por meio do monitoramento da variação dos valores de impedância elétrica, em um amplo intervalo de frequência, antes e após duas horas de adesão bacteriana. Estes autores utilizaram um substrato semicondutor de ITO em uma câmara de fluxo, podendo explicar as propriedades de interface eletrodo/bactéria/eletrólito em função das curvas de resistência. Uma câmara de fluxo baseada em EIS combinada a um sistema hidrodinâmico proporcionou a obtenção de medidas espectroscópicas de impedância eletroquímica, simultaneamente à deposição bacteriana no substrato de ITO.

O sistema eletroquímico desenvolvido foi baseado em uma câmara de fluxo de duas placas paralelas em condições hidrodinamicamente controladas, e um microscópio óptico, para observação da cinética do processo de adesão das bactérias em tempo real. Os autores observaram que a magnitude da impedância observada para os dois sistemas de bactérias decai exponencialmente com o aumento do número de células aderidas ao substrato. Desta forma, puderam definir a velocidade de adesão relativa às duas cepas de bactérias estudadas. Verificaram também que a detecção elétrica é mais sensível à intensidade de adesão, quando comparada à detecção óptica para este sistema.

3.3 Imobilização de biomoléculas em biossensores

Em várias aplicações tecnológicas, incluindo em biossensores, há necessidade de imobilização de biomoléculas. Em geral, as matrizes de imobilização podem atuar puramente como um suporte, ou então podem também ser tratadas como mediadoras do mecanismo de um sinal de transdução associado com o analito[9]. As técnicas de imobilização podem ser classificadas em imobilização física por uma membrana inerte, adsorção física ou química, ligação junto a um suporte funcionalizado e imobilização em uma membrana "ativa", considerando-se a natureza das interações químicas intermoleculares envolvidas.

3.3.1 Imobilização de proteínas a partir de interações não-covalentes

As interações responsáveis pela ligação entre as proteínas e seus ligantes ocorrem, principalmente, por forças de van der Waals, as quais são capazes de coordenar as conformações das mesmas. Essas mudanças conformacionais ocasionam a exposição de sítios ativos das proteínas, proporcionando a vulnerabilidade à ligação específica com o ligante. As numerosas interações não-covalentes (hidrofóbicas, adsorção física e ligação iônica)[9] são essenciais para compreender o ambiente em que a biomolécula está inserida, pois são estas forças que ditam a conformação nativa estável das proteínas, e permitem a flexibilidade necessária para o exercício da função biológica dessas macromoléculas. Estas interações são necessárias para a interação crítica dos pares complementares de bases nos ácidos nucléicos, ou para a interação de um hormônio ou fator de crescimento com seu respectivo receptor[13].

Em um sistema heterogêneo, a ligação da proteína a um substrato ou interface pode ocasionar mudanças conformacionais, que consequentemente, afetam a atividade dos outros sítios da proteína. O estudo das espécies que podem originar monocamadas estáveis é fundamental para a imobilização de proteínas de interesse.

Um fator muito importante para a imobilização de proteínas em diferentes superfícies é o ponto isoelétrico (pI). Este ponto indica o pH característico onde a macromolécula possui carga elétrica total nula, sendo que, ao alterar este valor, um caráter positivo ou negativo pode ser adquirido[13]. Portanto, a manipulação do pH do meio em que o sistema está inserido poderá

proporcionar interações eletrostáticas eficazes entre proteína-proteína ou proteína-superfície. É importante notar que existem numerosas exceções, como outros tipos de interações capazes de atuar com este mesmo propósito.

Considerando que as interações eletrostáticas entre proteína e superfície podem influenciar a adsorção protéica, as proteínas podem ser subdivididas em dois grupos de acordo com seu comportamento de adsorção eletrostática[40]. Para proteínas providas de ampla mudança conformacional durante a adsorção (também denominadas *"soft" proteins*), forças não-eletrostáticas também contribuem significativamente na adsorção. Ou seja, o efeito é gerado também por interações de van der Waals e hidrofóbicas, além de mudanças entrópicas oriundas da conformação estrutural induzidas pela adsorção. Para proteínas sem mudanças conformacionais interfaciais (*"hard" proteins*), por outro lado, a adsorção tende a ocorrer majoritariamente devido a interações eletrostáticas. Para estas proteínas, há geralmente uma relação entre interações eletrostáticas e hidrofóbicas.

A retenção física em matrizes poliméricas possui ampla aplicabilidade na imobilização de enzimas e células vivas por meio de ligações cruzadas, originando uma matriz em forma de gel onde as espécies receptoras são fisicamente retidas. Um típico material para sensores seletivos de íons e sensores que utilizam a resposta iônica é o poli(cloreto de vinila) (PVC). Moléculas receptoras macrocíclicas são dissolvidas em um solvente plastificante e retidas dentro da matriz polimérica que, quando em condições estáveis, constituem um método sensitivo e seletivo para imunoensaios[9].

A imobilização em matrizes também pode fornecer sistemas com propriedades de transdução. Quando se trata de membranas para biossensores amperométricos uma membrana isolante depositada sobre eletrodo dificilmente auxiliará no transporte eletrônico e na sensibilidade do sinal. Porém, este método ainda será apropriado se o analito e as espécies geradas na reação forem permeáveis na membrana. Contudo, um biossensor recoberto por uma membrana pode imobilizar uma enzima na superfície ou no seu interior. O potencial benefício de um transporte de carga reforçado através da membrana foi, provavelmente, a força diretriz original para a investigação da deposição eletroquímica de polímeros condutores como matrizes de imobilização.

Os primeiros estudos de imobilização de glicose oxidase[9] em polipirrol estimularam o uso de outros polímeros. Estes podem ser eletrodepositados em meio aquoso, desde que a imobilização da biomolécula seja alcançada simplesmente por um aprisionamento físico, devido à sua presença na solução de polimerização.

Atualmente existem várias formas de imobilização empregando-se uma arquitetura de matriz de filmes finos, como exemplificado em Green e colaboradores (2000)[31]. Desta forma, são originadas superfícies contendo filmes ultrafinos capazes de imobilizar moléculas de interesse por meio de matrizes de dextrana, bicamadas lipídicas, monocamadas auto-organizadas, ou filmes poliméricos. Estes exemplos estão ilustrados na Figura 6.

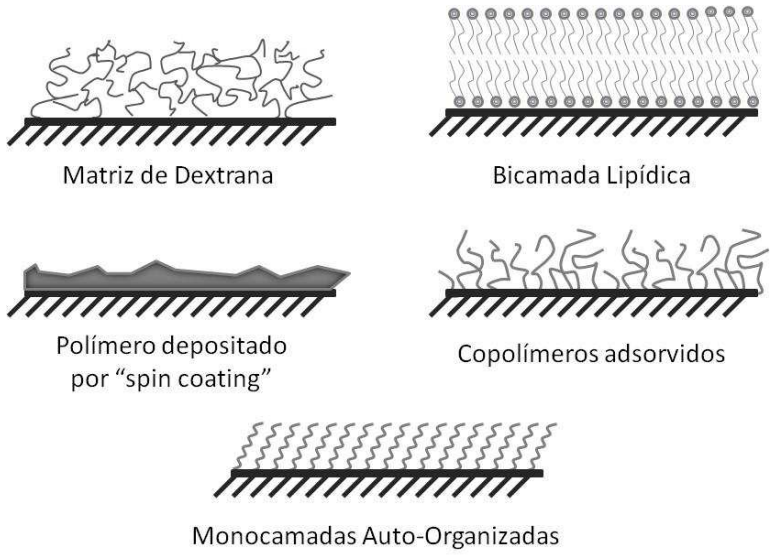

Figura 6. Exemplos de funcionalização de superfícies de substratos para a imobilização de moléculas de interesse. Dependendo da natureza do substrato podem ser produzidos filmes ultrafinos a partir de matrizes de dextrana, bicamadas lipídicas, SAMs ou filmes poliméricos. Figura adaptada de Green e colaboradores (2000)[31].

Similarmente a outras macromoléculas, a adsorção de proteínas não depende apenas das interações proteína-superfície, mas de uma combinação destas interações de proteínas, superfície e também do solvente. Neste caso, a afinidade da proteína, seja pela superfície em questão, seja pelo solvente, é imprescindível. Se o intuito é a adsorção da proteína em determinada superfície, a afinidade por esta deve ser maior em relação ao solvente utilizado no sistema; caso contrário, a proteína vai "preferir" o solvente e a adsorção não ocorrerá.

Uma técnica bastante explorada na obtenção de filmes é a técnica de automontagem, baseada na adsorção sequencial de espécies opostamente carregadas, resultando na formação de um filme multicamadas[41,42]. Esta técnica permite um alto controle sobre parâmetros como espessura e arquitetura molecular dos filmes, além disso, permite a imobilização de várias moléculas biológicas em conjunto com polieletrólitos convencionais, com preservação da

atividade biológica. A Figura 7 ilustra três esquemas de automontagem que podem ser adotados em diferentes aplicações.

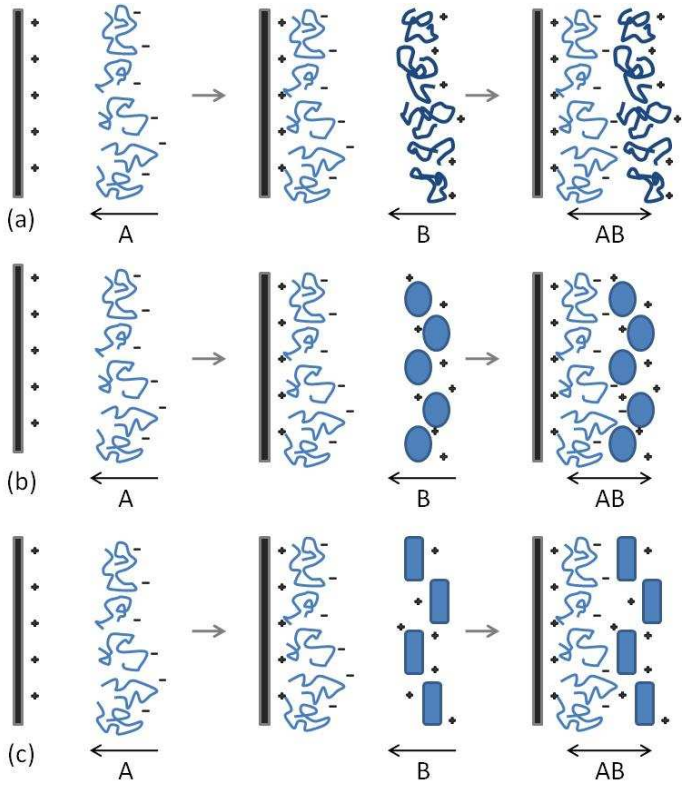

Figura 7. Esquemas de automontagem alternada de polímeros catiônicos/aniônicos: (A) lineares; (B) polímero iônico linear com proteína de carga oposta; (C) polímero iônico linear e placas de cerâmica. A e B são as camadas de cada carga, enquanto AB indica a bicamada que pode ser repetida *n* vezes do filme. Figura extraída de Lvov e colaboradores (1996)[42].

Esta técnica oferece a vantagem de baixo custo, viabilizando a produção de filmes finos com simplicidade experimental, sendo uma alternativa para diferentes aplicabilidades, de acordo com os materiais empregados.

3.3.2 Imobilização de biomoléculas a partir de interações covalentes

Imobilização de biomoléculas em superfícies sólidas também pode ocorrer por meio de ligações covalentes via grupos químicos reativos (hidroxi, amino, carboxi, epóxi, tiol, entre outros) presentes na molécula, ou sobre a superfície do substrato. Como muitos materiais não são intrinsecamente reativos, muitas técnicas para a ativação de substratos têm sido desenvolvidas, como a modificação de superfícies de vidro ou sílica utilizando reagentes silanizados[43,44], ativação da superfície de ouro com tiol[45.46] e ativação de superfícies poliméricas com agentes químicos[47]. A escolha destes agentes ativadores é feita de acordo com a camada protéica subsequente, podendo ser utilizado um agente funcionalizado para promover uma melhor adsorção da proteína.

A técnica de SAM é um exemplo de estratégia para imobilização protéica a partir de uma camada funcionalizada[48]. As SAMs constituem uma técnica geral, pois são baseadas em uma combinação de monocamadas de tipos substrato-agente ativador (vidro-alcano, ouro-tiol, entre outros), agente ativador-proteína, e interações proteína-proteína[44,49].

Esta técnica, ilustrada na Figura 8, oferece uma metodologia relativamente simples para o preparo de uma plataforma funcionalizada, onde monocamadas moleculares bem definidas e organizadas são depositadas pela imersão do substrato em uma solução diluída (aproximadamente, 1,0 mM) do adsorbato à temperatura ambiente.

Diversos fatores como a natureza e a rugosidade do substrato, solvente, temperatura e concentração do adsorbato podem afetar a formação e a densidade de empacotamento das monocamadas no filme.

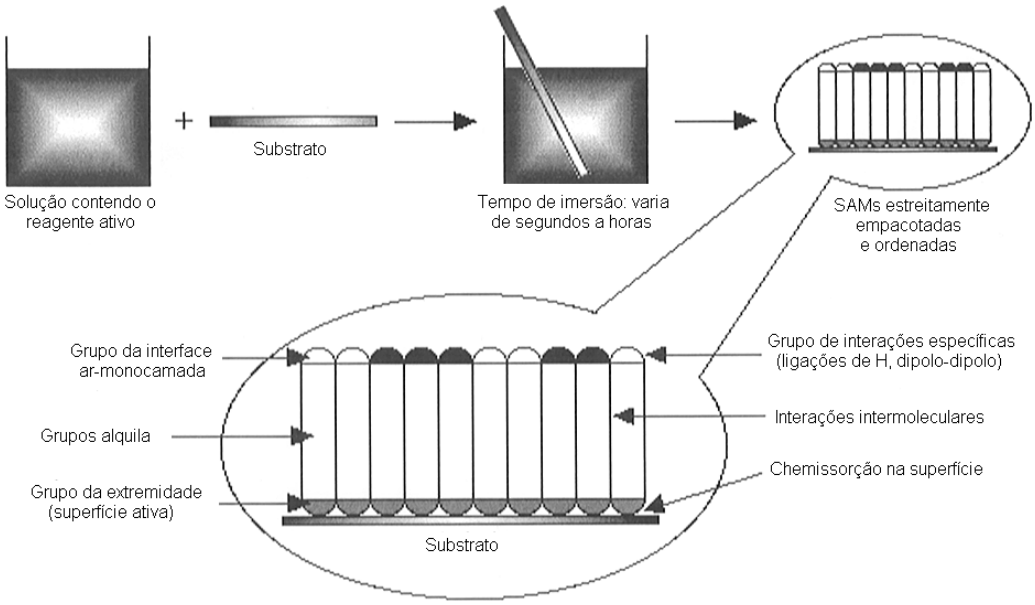

Figura 8. Monocamadas auto-organizadas são formadas pela simples imersão de um substrato específico junto a uma solução contendo o reagente que irá ativar a superfície deste. As forças que regem a formação espontânea destas monocamadas em forma bidimensional são baseadas em ligações químicas entre as moléculas contidas na solução e a superfície do substrato. Além disso, interações intermoleculares contribuem de maneira significativa para a estabilidade e formação das SAMs. Figura adaptada de Ulman (1996)[48].

Para a escolha das moléculas a serem utilizadas na formação de SAMs, devem ser considerados vários fatores, incluindo a seleção de moléculas com grupos funcionais distintos, os quais permitem um melhor controle na arquitetura do filme desejado.

O comprimento da cadeia é outro parâmetro importante, pois comprimentos de cadeia correspondentes a um número de metilenos superior a 10 (nos casos de silanos ou alcanotióis), podem oferecer um maior empacotamento das cadeias e, consequentemente, maior homogeneidade da monocamada.

Um esquema ideal para a formação de SAMs com o uso de tióis foi ilustrado por Love e colaboradores (2005)[50] em um exemplo de construção de monocamadas altamente nanoestruturadas, capazes de apresentar várias propriedades de interesse, como mostrado na Figura 9.

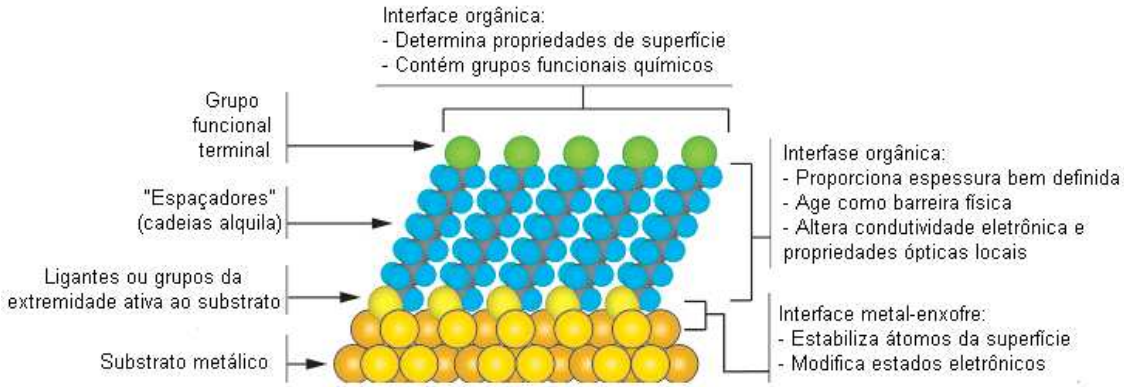

Figura 9. Diagrama esquemático ideal de uma simples estrutura cristalina de SAM. As monocamadas são formadas por moléculas de tióis junto a uma superfície de ouro com textura (111). Neste esquema, adaptado de Love e colaboradores (2005)[50], a anatomia e as características das SAMs foram destacadas.

As monocamadas podem ser caracterizadas por meio de métodos físicos (ângulo de contato e molhabilidade), métodos espectroscópicos (infravermelho e raios-X), métodos morfológicos (microscopia eletrônica de varredura, MEV, e microscopia de força atômica, AFM), entre outros. Mais especificamente, técnicas eletroquímicas como voltametria cíclica e medidas de impedância[51], são especialmente úteis para o monitoramento da qualidade da monocamada em biossensores.

Dentre as vantagens que a técnica de SAMs oferece, podemos destacar:

- Fácil ordenamento das moléculas e estabilidade das monocamadas;
- Membranas mimetizando meio celular podem ser depositadas sobre uma superfície contendo SAM, conveniente para imobilização de biomoléculas;
- Flexibilidade na escolha do *design* da superfície, bem como de seu caráter hidrofóbico ou hidrofílico, a partir da escolha de moléculas com diferentes grupos terminais funcionais;
- Soluções diluídas são requeridas, ou seja, quantidades mínimas de biomoléculas são necessárias para o ensaio;
- Estabilidade por um período relativamente extenso, permitindo confiabilidade em diversas medidas;
- Habilidade em proporcionar informações a nível molecular sobre fenômenos como adsorção de proteínas, hibridização de DNA, interações antígeno-anticorpo, etc.

Alterações no pH, força iônica e temperatura podem comprometer a qualidade da monocamada e suas propriedades, pois estes parâmetros podem ocasionar a perda da atividade biológica da espécie de interesse.

Outro método bastante utilizado na promoção de interação covalente proteína-proteína é o uso de sistemas biotina – avidina[52]. A avidina é uma proteína muito utilizada em SAMs para a construção de biossensores, pois possui alta afinidade pela biotina e possui uma forma estrutural tetramérica, com quatro sítios de ligação, aumentando a possibilidade de interação com outras proteínas[43,44]. É possível a imobilização de biomoléculas como anticorpos e receptores junto a uma superfície funcionalizada com biotina. Esta superfície constitui um suporte para a ancoragem das macromoléculas de interesse, baseada na adsorção de moléculas biotiniladas.

Glutaraldeído também pode ser utilizado como intermediador em imobilização de biomoléculas, frequentemente atuando como formador de ligações cruzadas. Em um estudo realizado por Park e Krull (2006) [53] em imobilização de DNA, glutaraldeído serviu como uma base para a ligação com alguns oligômeros do DNA, a partir da cadeia de silano com a extremidade amino ligada ao substrato de ITO.

É importante ressaltar que não existe um método considerado o melhor para a imobilização de proteínas, e que possa ser aplicado a todas estas espécies. Portanto, há a necessidade de se avaliar diferentes processos de imobilização considerando-se densidade, conformação e função das biomoléculas.

3.4 Receptores nucleares

Receptores são proteínas responsáveis pela regulação da transcrição gênica a partir da ligação com moléculas ligantes específicas. Existem receptores do tipo transmembrânicos, os quais estão localizados na superfície das células-alvo. Outro grupo de receptores está localizado no núcleo das células onde, por meio da regulação da transcrição de genes específicos, são responsáveis pela realização de diversas funções fisiológicas no organismo. Dentre algumas destas funções, podem ser citadas homeostase, reprodução, desenvolvimento e metabolismo[3]. Como estes receptores estão localizados no interior das células, os ligantes (moléculas sinalizadoras) devem ser moléculas pequenas e hidrofóbicas o suficiente para

difundirem através da membrana plasmática e alcançar a proteína no núcleo celular. Estes receptores que recebem os sinais no interior das células são denominados **receptores nucleares**[54].

Os receptores nucleares (RNs) são compostos por proteínas geralmente entre 50 e 100 KDa. Estas proteínas são mediadoras dos efeitos pleiotrópicos dos hormônios lipofílicos nas células por meio da regulação da transcrição de genes-alvo. Essas macromoléculas estão intimamente relacionadas a diversas disfunções no organismo, como câncer, osteoporose e diabetes, constituindo assim uma promissora ferramenta para o desenvolvimento de fármacos e novas terapias. A superfamília de RNs inclui receptores para moléculas hidrofóbicas como hormônios esteróides (por exemplo, estrogênio e vitamina D), ácidos retinóicos, hormônios tireoidianos, ácidos graxos e prostaglandinas.

A estrutura modular dos RNs[55], ilustrada na Figura 10, compreende 5 a 6 domínios conservados e com diferentes funções[56,57]. A região N-terminal (domínio A/B) é altamente variável e contém a região de ativação autônoma AF-1, a qual, ao interagir com os domínios de ligação ao DNA, pode ativar a transcrição de maneira constitutiva. Esta região pode conter menos de 50 a até mais de 500 aminoácidos, sua estrutura tridimensional ainda é desconhecida e faltam detalhes moleculares para compreender o funcionamento desta região. Sua função é conferir especificidade à célula, ao DNA e aos promotores[54].

A região mais conservada da molécula é o domínio de ligação ao DNA, DBD (*DNA-Binding Domain*) ou domínio C, conferindo especificidade para o reconhecimento de sequências-alvo de elementos responsivos a hormônios – HREs (*Hormone Response Elements*). Esta região foi muito estudada, desde a estrutura tridimensional até suas propriedades de dimerização.

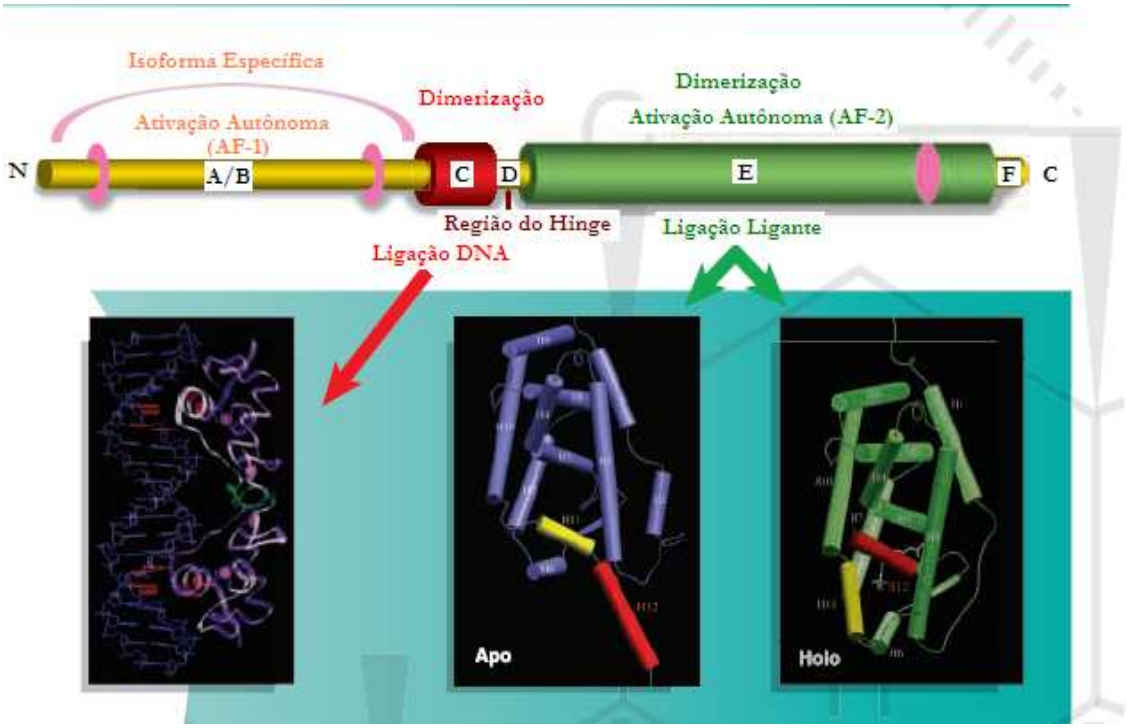

Figura 10. Domínios comuns aos RNs contendo algumas funções indicadas. Figura adaptada de Robinson-Rechavi; Garcia; Laudet (2003)[55]. Nesta figura, a conformação *apo* é aquela em que a molécula assume antes da entrada do ligante, enquanto que após a ligação é denominada *holo*.

Entre os domínios de ligação ao DNA e o de ligação ao ligante está o domínio D, conhecido como *hinge*, ou dobradiça. Esta região é pouco conservada, confere mobilidade entre os domínios bem estruturados C e E, e está associada com a localização nuclear do receptor[55,57].

O domínio E é o domínio de ligação ao ligante, também chamado LBD (*Ligand-Binding Domain*), e contém a sequência de aminoácidos moderadamente mais conservada. Esta região é responsável por diversas funções, dentre as quais a ligação do receptor ao hormônio. Este domínio participa de muitas outras atividades além da ligação ao hormônio, como homo e/ou heterodimerização, e ativação e repressão transcricional. A ligação ao hormônio induz mudanças conformacionais na molécula do receptor, influenciando no controle das propriedades da molécula e na expressão gênica. Estas mudanças conformacionais que acompanham a transição entre as formas ligada e não ligada, *holo* e *apo*, respectivamente, do receptor de hormônio nuclear afetam sua afinidade por outras proteínas.

Os RNs podem ou não conter o domínio F na região C-terminal. Este domínio possui uma sequência extremamente variável de aminoácidos e sua estrutura e função ainda não são bem conhecidos.

3.4.1 O receptor de hormônios tireoidianos

Dentre as subclasses de receptores nucleares estão os receptores tireoidianos, TRs (*Thyroid Receptors*). A análise da estrutura e das funções dos TRs exibe algumas diferenças nos domínios funcionais da estrutura modular, originando diferentes isoformas destes receptores em função da decodificação de genes específicos no genoma humano, as quais estão mostradas na Figura 11. Estas diferenças ocorrem principalmente na extremidade amino, originando as isoformas TRβ1 e TRβ2 (codificadas pelo gene TRβ), e na região carboxi-terminal, originando as isoformas TRα1 e TRα2 (codificadas pelo gene TRα)[3].

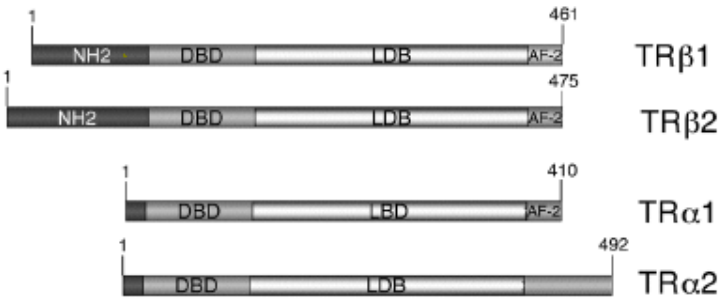

Figura 11. Estrutura primária das diferentes isoformas codificadas pelos genes TRβ e TRα. Figura adaptada de Barra e colaboradores (2004)[3].

As diferentes isoformas dos TRs respondem de maneira distinta, conferindo funções específicas aos mesmos. Por exemplo, ambos os receptores TRβ1 e TRβ2, além de isoformas α, respondem ao hormônio tireoidiano T3, porém de formas diferentes[58].

A estrutura tridimensional do domínio LBD destas isoformas é constituída basicamente por 12 α-hélices, e uma espécie de grampo formada por 3 a 4 fitas-β, conectando voltas de distintos tamanhos[4], como apresentado na Figura 12. Com a ligação do ligante, a

molécula do TR sofre uma mudança de conformação, descrita como mecanismo “ratoeira”: o ligante entra na estrutura da proteína. Antes da entrada do ligante a conformação é denominada *apo*, e após a ligação, *holo*, conforme ilustrado anteriormente na Figura 10.

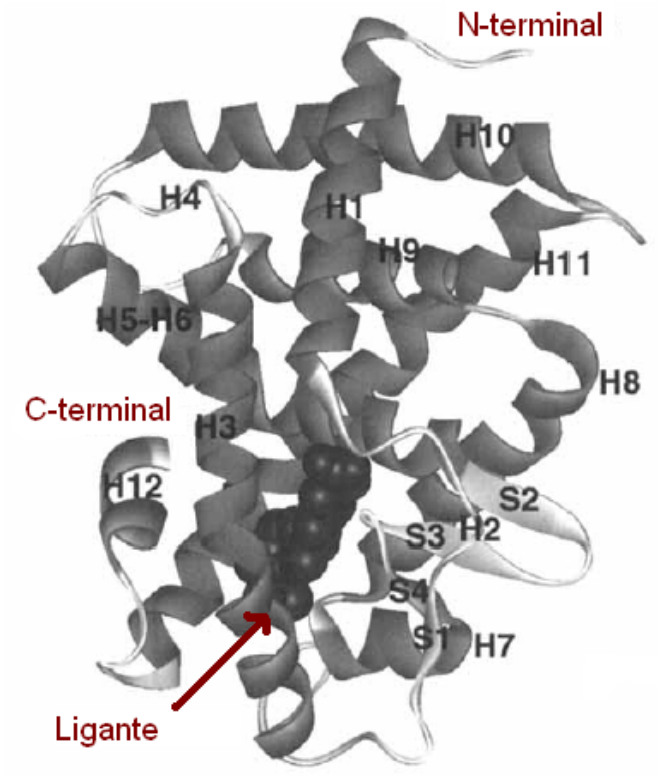

Figura 12. Representação do domínio de ligação do ligante do receptor hormonal tireoidiano. O TRβ1 LBD está complexado com o ligante, ilustrando como o ligante fica “dentro” da molécula de proteína[4].

A região LBD possui uma cavidade hidrofóbica específica para a entrada e o encaixe do ligante requerido, com forma e volume apropriados. Ressalta-se que, neste trabalho, foi utilizado apenas a região LBD do TRβ1, pois constitui o domínio de interesse uma vez que é a região onde ocorre a ligação específica com os ligantes, os hormônios tireoidianos. Além disso, experimentalmente esta é uma região com maior estabilidade e maior facilidade de manipulação em relação à molécula completa da proteína.

3.5 Os hormônios tireoidianos

Hormônios tireoidianos (HTs) possuem extensa influência no sistema fisiológico humano. São responsáveis pela diferenciação, desenvolvimento, e vários processos metabólicos no adulto, como desenvolvimento do sistema nervoso central, sistema cardíaco, níveis de colesterol, sistema renal e metabolismo de tecidos conectivos[3,4]. O maior hormônio secretado pela glândula tireóide é o 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina (tiroxina ou T4), em menor quantidade é secretado o 3,5,3'-triiodotironina (T3). O total plasmático de T4 é, aproximadamente, 45 vezes superior que o de T3 (90 nM *versus* 2 nM)[3]. Entretanto, em tecidos periféricos há uma quantidade considerável de desiodação de T4 gerando T3. A quantificação destes HTs é de grande relevância para a saúde humana, em função das atividades que eles desenvolvem no organismo. Portanto, seus níveis devem ser monitorados periodicamente em pessoas normais e, principalmente, em pacientes que já sofrem de alguma doença relacionada.

O hormônio análogo ao T3, o 3,5,3'-ácido triiodotiroacético (TRIAC), liga-se aos TRs com afinidade maior em relação ao T3, embora tenha um tempo de residência mais curto nos TRs que o primeiro. A seletividade superior por TRβ1, por exemplo, sugere que TRIAC apresente um potencial terapêutico considerável para o tratamento de TRs mutantes. O estudo deste hormônio é importante, pois pode auxiliar no tratamento de distúrbios hormonais, como na terapia da resistência ao hormônio tireoidiano[59], de bócio eutireóideo[60] e no tratamento de atrofia da pele ocasionada por uso prolongado de corticóides[61]. TRIAC é comercialmente conhecido como "Tiratricol", e é usado para induzir o emagrecimento[62]. Seu uso indevido, administrado sozinho ou combinado a outros componentes, como adrenalina, antidepressivos, entre outros, causa efeitos colaterais como aumento nos batimentos cardíacos e da pressão arterial, além de efeitos neurológicos.

Um análogo sintético dos hormônios tireoidianos é o GC-1 [ácido 3,5-dimetil-4-(4'-hidróxi-3'-isopropilbenzil)-fenóxi acético], o qual possui seletividade de ligação e funções de ativação preferencialmente por TRβ1 em relação ao TRα1. O análogo contém muitas mudanças estruturais quando comparado com o hormônio natural T3, dentre as quais podem ser citadas a substituição de três átomos de iodo por grupos metila e isopropila. GC-1 liga-se ao TRβ1 com a mesma afinidade que o T3, porém liga-se ao TRα1 com uma afinidade 10 vezes menor, também em relação ao T3[63]. Este análogo foi desenvolvimento para auxiliar no tratamento de disfunções hormonais tireoidianas, como em hipotireoidismo. Os efeitos de

GC-1 no sistema nervoso central, no tecido adiposo e na metamorfose de girinos são fortes evidências do uso desta molécula em tratamentos e manutenção dos níveis hormonais normais[63].

As estruturas dos hormônios tireoidianos citados estão ilustradas na Figura 13.

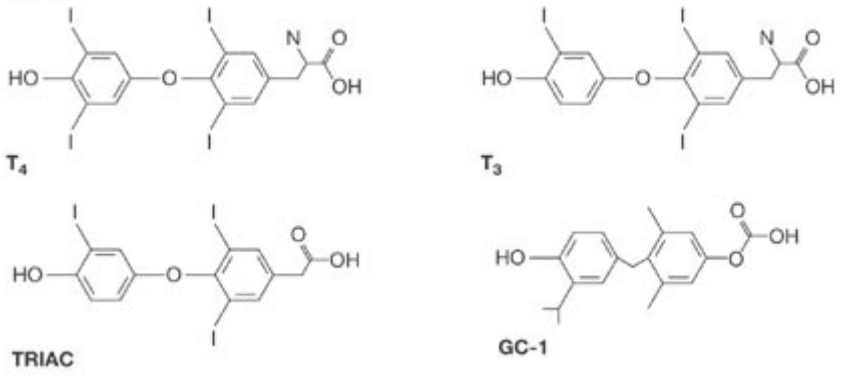

Figura 13. Estrutura dos hormônios tireoidianos T3 e T4, e dos análogos TRIAC e GC-1. Figura extraída de Brenta; Danzi; Klein (2007)[64].

Fisiologicamente, os HTs circulam no sangue transportados por proteínas carregadoras, devido ao caráter hidrofóbico, até seus tecidos-alvo. Após, o hormônio livre, por meio de difusão passiva ou após ligar-se a um receptor específico na membrana celular, atinge o citoplasma e se liga a proteínas receptoras específicas no núcleo. A respeito do mecanismo de ação dos hormônios tireoidianos a nível molecular, esta ligação desencadeia alterações na conformação estrutural das proteínas receptoras, permitindo a interação com sequências regulatórias do DNA[13].

Os HTs são moléculas responsáveis pelo regulamento da temperatura corporal e também são importantes para o crescimento, diferenciação e maturação dos tecidos. Atuam como reguladores do metabolismo de carboidratos e gorduras, diminuindo a ação da insulina e acelerando a sua degradação e, no caso dos lipídeos, promovendo a degradação do colesterol em ácidos biliares. Porém, quando em excesso, os HTs podem ser hiperglicemiantes (o poder que os HTs têm para elevar a concentração de glicose sanguínea - açúcar no sangue), aumentar o consumo de oxigênio diminuindo o rendimento energético,

aumentar o catabolismo das proteínas e das gorduras, produzir desmineralização óssea e influenciar nas taxas de batimentos cardíacos.

Disfunções tireoidianas são doenças endócrinas muito comuns, de modo que grande apoio financeiro é destinado para monitorar e diagnosticar os seus tratamentos. Desta forma, os exames laboratoriais contribuem de maneira considerável nestes custos. Dentre as doenças tireoidianas mais comuns e que necessitam de monitoramento e diagnóstico terapêutico, pode-se citar hipotireoidismo, hipertireoidismo, nódulos tireoidianos, bócio, câncer, tireoidite, entre outras.

3.6 Detecção de hormônios tireoidianos

Os métodos mais comumente usados para o monitoramento nos níveis de HTs são baseados em radioimunoensaios, técnicas fluorimétricas e medidas amperométricas. Radioimunoensaio[65] é uma técnica bastante sensível que utiliza marcadores radioativos para a análise de quantificação de espécies em reações antígeno-anticorpo. É uma técnica empregada há muitos anos, com diferentes tipos de ensaios. Stafford, Lees e Watson (1976)[5], por exemplo, determinaram os níveis de T3 em uso clínico com base em dois radioimunoensaios distintos: um ensaio baseado em extração alcoólica, e outro por uso de etilmercuritiosalicilato sódico (Mertiolate®). Estes métodos são realizados comercialmente com o uso de kits[66-68], mas possuem a desvantagem de um custo de análise relativamente alto.

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica também bastante explorada para o estudo quantitativo dos HTs. É vantajosa em relação ao radioimunoensaio, por exemplo, por apresentar maior sensibilidade com melhor limite de detecção. Em ensaios baseados em fluorescência[69-71], comumente chamados fluoroimunoensaios, o analito é ligado covalentemente a espécies fluorescentes, de modo a manter sua reatividade específica com o antígeno. Uma técnica baseada neste princípio, a TR-FIA (*Time-resolved fluoroimmunoassay*) foi utilizada para a determinação de T3[7], como uma alternativa aos métodos até então utilizados.

Moléculas de L-T4, D-T4 e L-T3 foram determinadas simultaneamente em um aparato experimental utilizado por Stefan e colaboradores (2004)[8], que consiste em um sistema de injeção sequencial. Este sistema é um sensor eletroquímico, onde um imunossensor

amperométrico detecta L-T4 e L-T3 e um biossensor amperométrico detecta D-T4. O imunossensor amperométrico consiste de pasta de carbono modificada quimicamente com anti-L-T4 e anti-L-T3, enquanto o biossensor amperométrico foi obtido da adição de L-amino oxidase à pasta de carbono. A resposta dos três sensores foi determinada utilizando técnica de cronoamperometria em solução-tampão fosfato, que revelou intervalos de concentração linear para os três analitos, além de boa estabilidade e reprodutibilidade no método.

Biossensores eletroquímicos também têm sido explorados para detecção de hormônios, como o estrogênio[72] e os HTs. Murata e colaboradores (2003)[73] desenvolveram um biossensor baseado em afinidade usando um eletrodo de ouro modificado com TR, com o objetivo de avaliar a detecção e quantificação relativa de ligantes. Para isso, imobilizaram TR-LBD (com fusão de 10 resíduos consecutivos de histidina na região N-terminal) em um eletrodo de ouro modificado com tiol via complexação com níquel. Voltametria cíclica e de pulso diferencial foram realizadas para avaliar a presença do receptor imobilizado na superfície do eletrodo, como também para monitorar a interação desta camada biorreceptora com o ligante de interesse, neste caso, T3.

4 EXPERIMENTAL

4.1 Materiais

Para o estudo de imobilização da região LBD de TRβ1 em SAMs foram utilizados octadecilsilano, tetracloreto de carbono, 99,9 %, hexadecano, ≥ 99 %, clorofórmio, ≥ 99 % e ácido 11-mercaptoundecanóico (11-AMU), obtidos de Sigma-Aldrich. Foram utilizados também álcool etílico, 95% PA-ACS (Quemis), reagentes hexacianoferrato (II) de potássio trihidratado ($K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$) e ácido sulfúrico P.A., da marca Mallinckrodt e Reagen, respectivamente.

O receptor tireoidiano humano TRβ1 (região LBD contendo cauda de histidina, 29,7 KDa), os hormônios tireoidianos T3 (3,5,3'-triiodotironina), T4 (3,5,3,5'-tetraiodo-L-tironina), os análogos TRIAC (3,5,3'-ácido triiodotiroacético) e GC-1 [ácido 3,5-dimetil-4-(4'-hidróxi-3'-isopropilbenzil)-fenóxi acético], e ditiotreitol (DTT) foram cedidos pelo grupo do prof. Igor Polikarpov, do IFSC – USP.

Uma solução-tampão 20 mM Hepes pH 8,0, 50 mM NaCl e 5% glicerol foi utilizada para a preparação de todas as soluções que continham TRβ1-LBD, os HTs e seus análogos sintéticos. Estas soluções foram utilizadas nas análises de UV-VIS, preparação dos filmes para FTIR e AFM, experimento de SPR e na preparação dos analitos para as medidas elétricas. A solução-tampão 20 mM Hepes, 50 mM NaCl e 5% glicerol também foi utilizada no experimento de SPR, nos dois canais de análise.

4.2 Metodologia

As proteínas TRβ1-LBD foram imobilizadas sobre eletrodos interdigitados, após prévia funcionalização, utilizando-se SAMs de silano e tiol. A ideia foi baseada na modificação das trilhas condutoras de cromo/ouro (Cr/Au) com tiol, e o vidro (região no *gap*

entre as trilhas) com silano. Dessa maneira, obteve-se uma plataforma bastante apropriada à adsorção protéica. Esse processo é discutido com mais detalhes nas seções seguintes.

4.2.1 Preparação das soluções de biomoléculas.

Para análises de espectroscopia na região do ultravioleta-visível, UV-VIS, foram preparadas soluções de 3,5 µM de TRβ1-LBD e soluções 100,0 µM para os HTs e análogos, todos em solução-tampão 20 mM Hepes pH 8,0, 50 mM NaCl e 5% glicerol.

Nas análises espectroscópicas, ópticas, morfológicas e elétricas foram utilizadas soluções de TRβ1-LBD na concentração de 8,6 µM, em solução-tampão 20 mM Hepes pH 8,0, 50 mM NaCl e 5% glicerol. A esta solução foi adicionado 1 mM de DTT. O DTT é um forte agente redutor capaz de manter a cadeia polipeptídica aberta, por meio do rompimento das pontes dissulfeto que se formam nas proteínas. O intuito é deixar a cadeia protéica aberta, permitindo que se torne mais vulnerável à ligação com o ligante. Após a adição de DTT, a solução foi centrifugada a 10 °C, durante 10 min a 10.000 rpm. As soluções contendo os HTs e análogos sintéticos foram preparadas a partir de alíquotas-estoque. Estas soluções foram diluídas em solução-tampão 20 mM Hepes pH 8,0, 50 mM NaCl e 5% glicerol até atingir concentrações de 2,5 nM, 50,0 nM, 500,0 nM e 100,0 µM.

Nos experimentos de SPR, foram utilizadas soluções-tampão previamente degasadas. Para isso, a solução-tampão 20 mM Hepes pH 8,0, 50 mM NaCl e 5% glicerol foi transferida para um kitassato acoplado a um sistema de vácuo. Este sistema ficou em ultrassom durante cerca de 12 min ou até observar-se a ausência de microbolhas na solução. Esta solução-tampão degasada foi utilizada no canal do analito, no canal de referência dos experimentos de SPR e na preparação das soluções dos analitos.

4.2.2 Modificação dos eletrodos interdigitados com SAMs.

As medidas de detecção foram realizadas utilizando-se eletrodos interdigitados, com trilhas de Cr/Au depositadas sobre vidro. Uma ilustração esquemática dos eletrodos é mostrada na Figura 14. O eletrodo contém 80 pares de trilhas com distância de 20 µm entre trilhas.

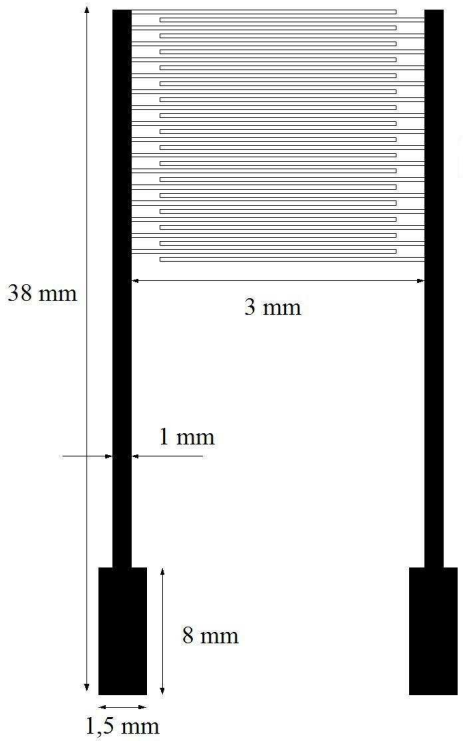

Figura 14. Ilustração das características físicas do eletrodo interdigitado utilizado para as medidas de impedância elétrica. Nesta figura, estão destacadas as dimensões do sistema. Este dispositivo também foi usado para as medidas voltamétricas.

O eletrodo interdigitado foi utilizado para as medidas de impedância elétrica. A superfície do eletrodo foi funcionalizada primeiramente com silano (Figura 15)[74]. Para isso, o solvente utilizado para a reação de silanização foi composto de 80 % hexadecano, 12 % tetracloreto de carbono e 8 % clorofórmio. O silano foi rapidamente adicionado a esta mistura para evitar exposição ao ar, e não polimerizar. Após imersão na mistura, os eletrodos foram lavados em clorofórmio sob ultrassom, em triplicata, a fim de remover o excesso de silano

que não interagiu com a superfície do substrato. Em seguida, os substratos foram lavados com água ultrapura e secos sob fluxo de nitrogênio, N_2. Os substratos silanizados foram reservados durante 24 h para concluir o processo de funcionalização.

A SAM de tiol foi obtida por imersão dos eletrodos interdigitados em solução etanólica de 11-AMU, na concentração de 1,0 mM, durante 12 h. Em seguida, o eletrodo foi removido da solução de tiol, enxaguado com etanol (para remoção das moléculas fisicamente adsorvidas) e em seguida com água ultrapura[24]. A secagem foi realizada sob fluxo brando de N_2. As estruturas moleculares correspondentes às monocamadas estão ilustradas na Figura 15.

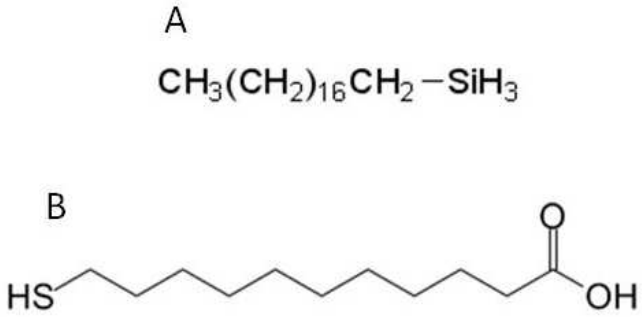

Figura 15. Estruturas moleculares de (A) Octadecilsilano e (B) 11-AMU.

As SAMs estão representadas de forma esquemática na Figura 16, a fim de melhor elucidar o sistema de monocamadas no eletrodo interdigitado. Como descrito, as SAMs de silano estão localizadas entre as trilhas de ouro, enquanto que as SAMs de tiol podem estar localizadas em toda a área superficial de ouro.

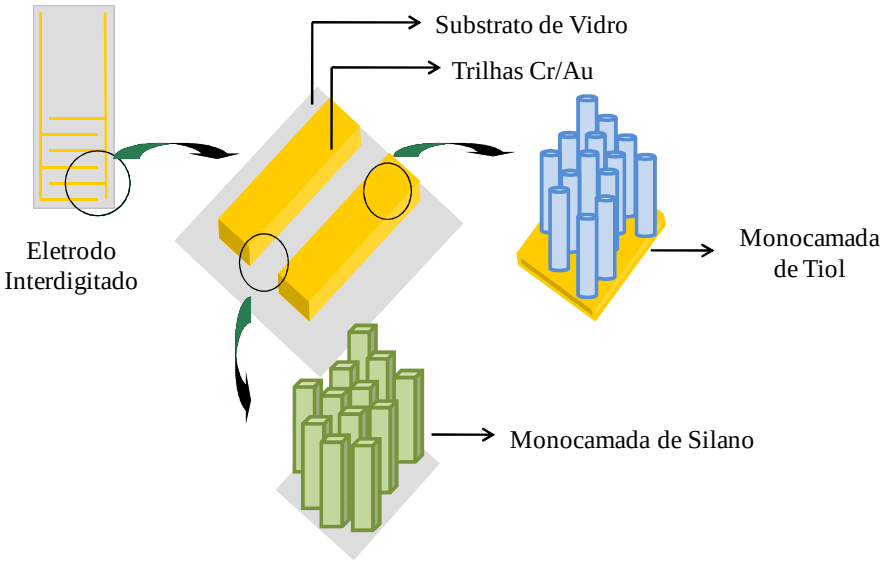

Figura 16. Representação esquemática para o estudo de interações receptor-ligante a partir da funcionalização múltipla do eletrodo interdigitado com silano e tiol.

O sistema biossensor foi preparado a partir desta funcionalização "silatiol", onde a solução 8,6 µM de TRβ1-LBD foi depositada via *casting* sobre as SAMs de silano e tiol, com tempo de deposição de 1 h. Em seguida, o eletrodo interdigitado foi enxaguado com solução-tampão, depois com água ultrapura e então seco sob brando fluxo de N_2.

4.2.3 Funcionalização das lâminas de vidro.

Para os estudos de caracterização espectroscópica e morfológica, foram utilizados lâminas de vidro metalizadas com Cr/Au, posteriormente funcionalizadas com uma SAM de tiol, de maneira a simular o filme obtido nos eletrodos interdigitados. É importante ressaltar que esse procedimento foi necessário, pela impossibilidade de caracterização das multicamadas diretamente nos eletrodos, devido às suas reduzidas dimensões.

As lâminas de vidro foram pré-recobertas com 30 nm de cromo para promover a eficiente adesão de ouro, e em seguida recobertas com 70 nm de ouro. Ambos os metais foram depositados por evaporação com cadinho de molibdênio a 10^{-6} Torr.

O substrato funcionalizado para os estudos de SPR é o eletrodo contendo grupos COOH, produzido pelo fabricante ICX Nomadics.

4.3 Técnicas de caracterização e detecção

4.3.1 Espectroscopia na região do ultravioleta- visível (UV-VIS)

Espectroscopia no UV-VIS foi utilizada para averiguar qualitativamente a região de absorção das espécies biológicas em solução. Foi utilizado um equipamento Hitachi, modelo U2001.

4.3.2 Medidas voltamétricas

Medidas de voltametria foram utilizadas para inferir sobre a eficiência do processo de funcionalização dos eletrodos. Foi utilizada uma cela de vidro de borosilicato de 25,0 mL e tampa de Teflon®, a qual contém orifícios de encaixe para três eletrodos e para a desaeração com N_2. Todos os voltamogramas foram coletados com Ag/AgCl (saturado com KCl) sendo o eletrodo referência, um eletrodo de platina como contra-eletrodo e o eletrodo interdigitado, contendo a monocamada de tiol, utilizado como eletrodo de trabalho. Como eletrólito foi utilizada uma solução ácida de 4,0 $mmol.L^{-1}$ de $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$, preparada com água ultrapura imediatamente antes do uso. Durante as medidas, o potencial foi variado de -100 a 700 mV. Foram coletados voltamogramas antes e depois da funcionalização dos eletrodos. A diminuição da corrente de oxidação mostrou que a superfície metálica do eletrodo foi bloqueada pela SAM. Foi utilizado um equipamento potenciostato /galvanostato PGSTAT302 da AutoLab®.

4.3.3 Detecção dos HTs utilizando-se Espectroscopia de Impedância Elétrica (EIS, *Electrical Impedance Spectroscopy*)

A técnica de espectroscopia de impedância elétrica consiste na análise da impedância de uma amostra em função da frequência de um sinal AC aplicado. A resposta elétrica

(principalmente a capacitância) dos eletrodos interdigitados foi analisada em uma faixa de frequência de 50 Hz a 10 KHz, utilizando-se um equipamento Solartron SI 1260.

Para as medidas de detecção, foram utilizados três sistemas diferentes, a saber, i) eletrodo interdigitado sem modificação e sem filme orgânico (eletrodo limpo), ii) eletrodo contendo SAMs de silano e tiol (eletrodo *silatiol*) e iii) eletrodo funcionalizado com "silatiol" contendo o TRβ1-LBD imobilizado (denominado eletrodo *biossensor*). A ideia é a investigação da eficiência dos três sistemas na detecção e separação dos HTs, e melhorar a eficácia do sistema de detecção combinando-se os dados dos três eletrodos.

As medidas de capacitância foram realizadas com os eletrodos imersos em solução-tampão, e em solução-tampão contendo os analitos T3, T4, TRIAC e GC-1, nas concentrações de 2,5 nM, 50,0 nM, 500,0 nM e 50,0 µM. Os dados foram coletados à temperatura de 18 °C. Antes de cada medida, esperou-se um tempo de 20 min com os eletrodos imersos nas soluções de analitos, para estabilização do sinal.

4.3.4 Espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) modo reflexão

Espectroscopia de FTIR no modo de reflexão foi utilizada para o estudo da interação química entre as monocamadas do filme utilizando um equipamento Nicolet 470 Nexus. Os dados foram coletados de 3500 a 800 cm^{-1} com 200 varreduras.

Os substratos utilizados eram compostos por lâminas de vidro recobertas com ouro, modificadas com SAM de tiol. Sobre esses substratos foi imobilizado o TRβ1-LBD, de maneira similar à descrita acima na preparação dos eletrodos interdigitados. Foram investigados também substratos contendo HTs, TRIAC e GC-1, adsorvidos via *casting* (por período de 1 h), sobre a camada de TRβ1-LBD.

4.3.5 Microscopia de Força Atômica (AFM, *Atomic Force Microscopy*)

A microscopia de força atômica, AFM, é uma técnica capaz de obter imagens a partir da interação de forças eletromagnéticas entre superfícies e a ponta de um *cantilever* (em uma

escala de comprimento de 10^{-11} a 10^{-7} m). As amostras analisadas por AFM foram do mesmo tipo daquelas utilizadas para as análises de FTIR. Foi utilizado um equipamento SPM Multimode – Nanoscope III, da Digital Instruments. As imagens foram adquiridas utilizando o modo intermitente por meio do uso de um *cantilever* de silício com constante de mola 70 $N.m^{-1}$.

4.3.6 Ressonância de Plasma de Superfície (SPR, *Surface Plasmon Resonance*)

Fenômenos de superfície podem ser estudados por meio da ressonância de plasma de superfície. Esta técnica baseia-se nas propriedades ópticas de soluções, com monitoramento da variação do índice de refração, ocasionado, por exemplo, pela ligação de uma camada orgânica à superfície do metal, podendo ser utilizada para a caracterização de interações biomoleculares[10]. Neste estudo foi utilizado um equipamento SensiQ, contendo um sensor metálico de ouro. Foi utilizado um sensor funcionalizado com ácido carboxílico, típico para análises biológicas, do tipo COOH, ICX Nomadics. As soluções utilizadas foram preparadas conforme descrito no procedimento experimental. Os experimentos de SPR foram conduzidos a um fluxo de 5,0 $\mu L.mim^{-1}$, com injeções de 40,0 µL das soluções de TR, HTs, e seus análogos, a 18 ^{o}C. A solução de TRβ1-LBD foi primeiramente injetada sobre a superfície do sensor a fim de proporcionar a interface receptora para o estudo de interação com os analitos.

4.3.7 Análise das Componentes Principais (PCA, *Principal Component Analysis*)

Para melhorar a visualização dos dados de detecção obtidos por medidas de capacitância, os dados foram correlacionados estatisticamente utilizando-se a técnica de Análise das Componentes Principais (PCA), uma análise exploratória de dados multivariados. Nesta análise é possível reduzir variáveis através de critérios objetivos, permitindo a construção de gráficos bidimensionais contendo maior informação estatística que, por sua vez, possibilita o agrupamento entre as amostras de acordo com suas similaridades. O tratamento

dos dados para a obtenção dos PCAs foi realizado com o auxílio dos softwares Pirouette® e MatLab®.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste trabalho, utilizou-se como receptor protéico a região LBD da molécula do receptor nuclear humano tireoidiano TRβ1, por ser uma região mais estável e de fácil manipulação. Além disso, para a otimização da expressão da proteína e sua purificação, esta parte da molécula foi expressa com cauda de seis histidinas posicionada antes da hélice H1, na região N-terminal. O sítio de ligação da proteína, região essencial para o desenvolvimento da atividade da proteína, está localizado no centro da região LBD, sendo que a região C-terminal (H12) se "fecha" sobre este sítio após a ligação com o ligante. Considerando a importância deste requisito para a ligação com o ligante, é desejado que o grupo N-terminal interaja com a SAM de tiol (através da interação dos grupamentos carboxila do tiol e amino da proteína).

5.1 Espectroscopia na região do ultravioleta-Visível - UV-VIS

Proteínas podem absorver luz em comprimentos de onda característicos, em torno de 280 nm, correspondente aos resíduos triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e, fenilalanina (Phe)[13]. Foram avaliadas as soluções de tampão puro, solução contendo TRβ1-LBD na concentração 3,5 μM e soluções contendo os HTs e análogos, separadamente, a 100 μM cada solução. Os espectros de absorção estão apresentados na Figura 17. A banda em 280 nm indica a presença de uma espécie protéica, neste caso, a região LBD do TRβ1, referente à absorção dos resíduos de aminoácidos. Compostos contendo ácidos e amidas podem apresentar absorção em comprimentos de ondas superiores a 300 nm, em transições de média intensidade. Além disso, bandas de média intensidade situadas em comprimentos de onda superiores a 200 nm são indicativas da presença de sistemas aromáticos, mostrando que os HTs e análogos absorvem na região entre 250 e 350 nm. A presença de um substituinte hidroxila no anel aromático pode ocasionar absorção em aproximadamente 270 nm, o que também está relacionado às estruturas destas moléculas hormonais[75].

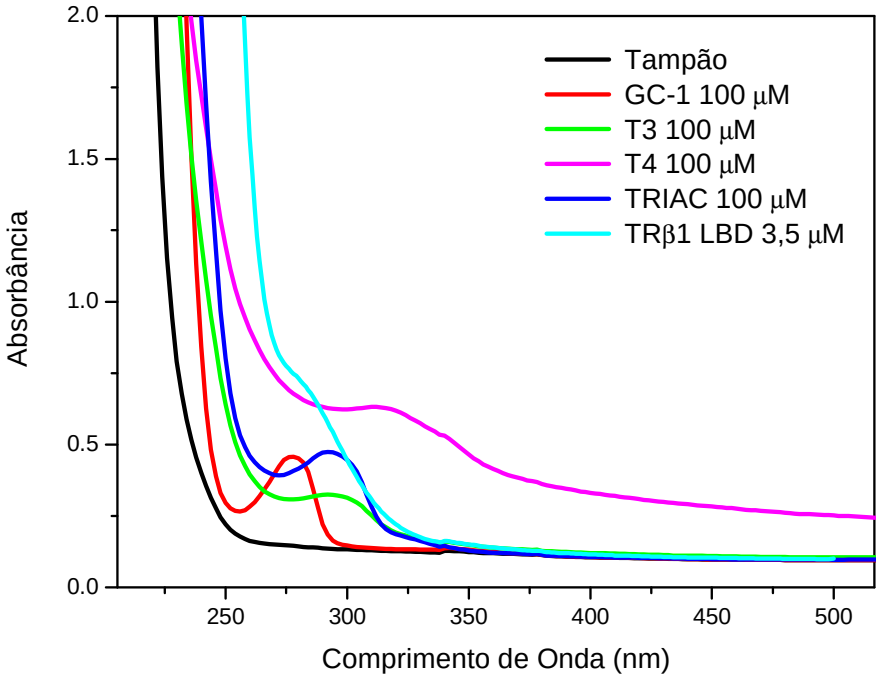

Figura 17. Espectros de absorção para soluções de TRβ1-LBD 3,5 μM, dos hormônios tireoidianos T3, T4, e dos análogos sintéticos TRIAC e GC-1, todos a 100 μM.

Pela Figura 17, é possível observar um ombro centrado em cerca de 280 nm, referente à absorção da proteína. O hormônio T3 e o análogo sintético TRIAC, por terem estruturas moleculares similares, apresentaram as bandas de absorção similares, por volta de 290 nm. Esta absorção é devida à transição n-π[75]. O hormônio T4 apresenta banda de absorção em maiores comprimentos de onda, em torno de 340 nm, pois possui um número maior de átomos de iodo em sua estrutura, conforme ilustrado previamente na Figura 13Os átomos de iodo contêm elétrons não ligantes n capazes de interagir com os elétrons π do anel aromático. Estas interações acarretam um efeito aparente de estabilizar o estado excitado destes elétrons, com consequente diminuição de energia, resultando em um deslocamento batocrômico, ou seja, para maiores comprimentos de onda.

O GC-1 apresentou banda de absorção centrada em 270 nm, com um deslocamento para menores comprimentos de onda em relação aos demais ligantes. Tal deslocamento pode ter ocorrido devido à ausência de átomos de iodo em sua estrutura molecular, e da ausência de oxigênio conectando os anéis aromáticos, onde os efeitos de transição eletrônica são majoritariamente direcionados pelos elétrons π dos anéis aromáticos.

Como os hormônios possuem anéis aromáticos em suas estruturas, geralmente apresentam bandas intensas e bem definidas, devido à superposição de transições eletrônicas com as transições vibracionais. No entanto, a presença de substituintes e do solvente aquoso minimizou este efeito, reduzindo as estruturas finas e produzindo bandas mais largas[75], conforme observadas na Figura 17.

Uma das limitações da análise de absorção eletrônica de materiais biológicos é a necessidade de se trabalhar em solvente, que geralmente é constituído de água tamponada a um pH próximo de 7,0, contendo quantidades suficientes de eletrólitos para simular as condições *in vivo*. Este fator pode influenciar na análise espectroscópica porque a água e muitos tampões biológicos absorvem na região de 170-200 nm.

5.2 Medidas eletroquímicas

Devido à espessura extremamente reduzida das SAMs de tiol e silano adsorvidas sobre os eletrodos interdigitados, sua posterior caracterização através de medidas espectroscópicas é bastante limitada. Dessa maneira, medidas de voltametria cíclica foram realizadas como uma maneira indireta de monitorar a adsorção da camada de tiol sobre as trilhas do eletrodo. A ideia é que após a adsorção, ocorre a passivação das trilhas, e o sinal da corrente referente aos processos redox é diminuído, dependendo da extensão da camada bloqueadora sobre as trilhas. Para monitorar a adsorção do tiol sobre as trilhas dos eletrodos, foram realizadas as medidas de voltametria antes e depois da adsorção, na presença de uma solução eletrolítica de 4,0 mM de ($K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$). O meio ácido em pH 3 foi escolhido para evitar a ocorrência de interações eletrostáticas entre a SAM e a espécie redox $[Fe(CN)_6]^{4-}$.

Os voltamogramas para o eletrodo interdigitado antes e depois da imobilização da SAM de 11-AMU são mostrados na Figura 18. Para maior clareza, apenas a parte referente à oxidação é mostrada.

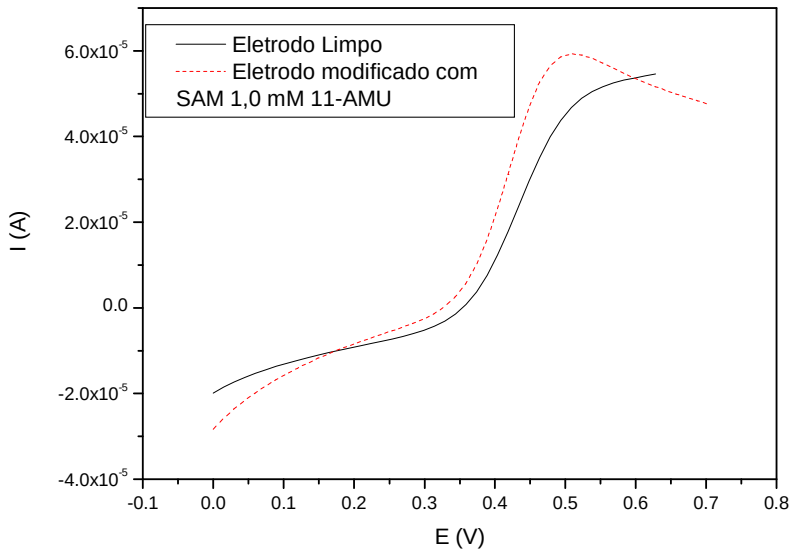

Figura 18. Voltamogramas cíclicos de segunda varredura do processo de oxidação resultantes do eletrodo interdigitado na (—) ausência de SAM e na (---) presença de SAM 1,0 mM de 11-AMU.

Como pode ser observado, o perfil voltamétrico obtido para o eletrodo interdigitado na ausência de SAM está condizente com um mecanismo de transferência eletrônica entre as trilhas de ouro do eletrodo e as espécies redox presentes na solução[51]. Porém, após a adsorção da SAM formada pelo tiol 11-AMU, o processo de oxidação é diminuído, confirmando o processo de adsorção, e a existência de uma monocamada de tiol. O fato de não ter sido observado a completa extinção do sinal de oxidação pode estar relacionado à defeitos na formação da monocamada de tiol, ou, mais provavelmente, à não adsorção de tiol na região lateral da trilha, logo acima do vidro, que é de cromo.

5.3 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier - FTIR

O espectro de infravermelho pode ser utilizado para a identificação de moléculas, como uma impressão digital[76]. Os aminoácidos, constituintes das proteínas, existem como íons dipolares (também chamados *zwitterions*), pois contêm um grupo básico ($-NH_2$) e um grupo ácido (-COOH)[18]. Logo, estes compostos exibem espectros contendo combinações de grupos carboxilatos e aminas primárias. Aminoácidos podem apresentar vibrações de estiramentos NH_3^+, deformações angulares N-H (assimétrica/simétrica) e estiramentos COO^- (assimétrico/simétrico). Grupamentos também importantes para o estudo espectral das proteínas são as amidas. As bandas de amida, principalmente amidas primárias, podem contribuir de maneira essencial para a informação estrutural contida nas bandas de infravermelho[77]. Estas informações são úteis para o estudo de interações de proteínas, pois o aparecimento e desaparecimento das bandas, assim como a variação de intensidade e deslocamento podem fornecer informações relevantes para o entendimento de fenômenos de interesse.

No sistema receptor-ligante utilizado neste trabalho, foram coletados espectros de infravermelho no modo de reflexão. Os espectros de reflectância podem fornecer informações tanto qualitativas quanto quantitativas. Para este trabalho, o estudo é essencialmente qualitativo em virtude da dificuldade da análise precisa das interações receptor-ligante, resultantes do aparecimento e deslocamento das bandas dos grupos presentes nas moléculas avaliadas, como será exposto a seguir. É importante mencionar novamente que os filmes adsorvidos são extremamente finos, daí a dificuldade em se obter espectros com boa relação sinal/ruído.

Na Figura 19 é possível observar as bandas de reflexão dos espectros referentes à SAM de tiol sobre o substrato de vidro recoberto com ouro (AuSH), à monocamada de TRβ1-LBD diretamente sobre a superfície de ouro (AuTR) e à monocamada de TRβ1-LBD sobre a SAM de tiol (AuSHTR). Nesta figura estão destacadas algumas bandas, as quais também são descritas na Tabela 1. No espectro AuSH é possível observar que não ocorrem bandas de grande intensidade, o que é coerente com a literatura[76,78]. Para compostos contendo o grupamento S-H, as fracas reflexões podem ocorrer em 2590 - 2540 cm^{-1}. O grupo metileno ligado ao átomo de enxofre (CH_2-S) pode originar bandas, também de fraca intensidade, referentes a estiramentos simétricos (2878 - 2846 cm^{-1}) e assimétricos (2948 - 2922 cm^{-1}) e

também a deformações angulares (1435 - 1410 cm^{-1}). Para o espectro de AuTR, foram observadas as bandas características de amida dos resíduos de aminoácidos que compõem a região protéica LBD de TRβ1, conforme destacadas na Figura 19. Geralmente[76], amidas primárias e secundárias apresentam bandas largas referentes às reflexões C=O na faixa de 1640 - 1620 cm^{-1}. Desta forma, pode ocorrer sobreposição ("*overlap*") das bandas referentes a este grupamento juntamente com deformações angulares N-H, neste caso, em torno de 1800 cm^{-1}. Estiramentos N-H são observados por volta de 3475 cm^{-1}, os quais também foram destacados, juntamente com estiramentos C-N em 1400-1500 cm^{-1}.

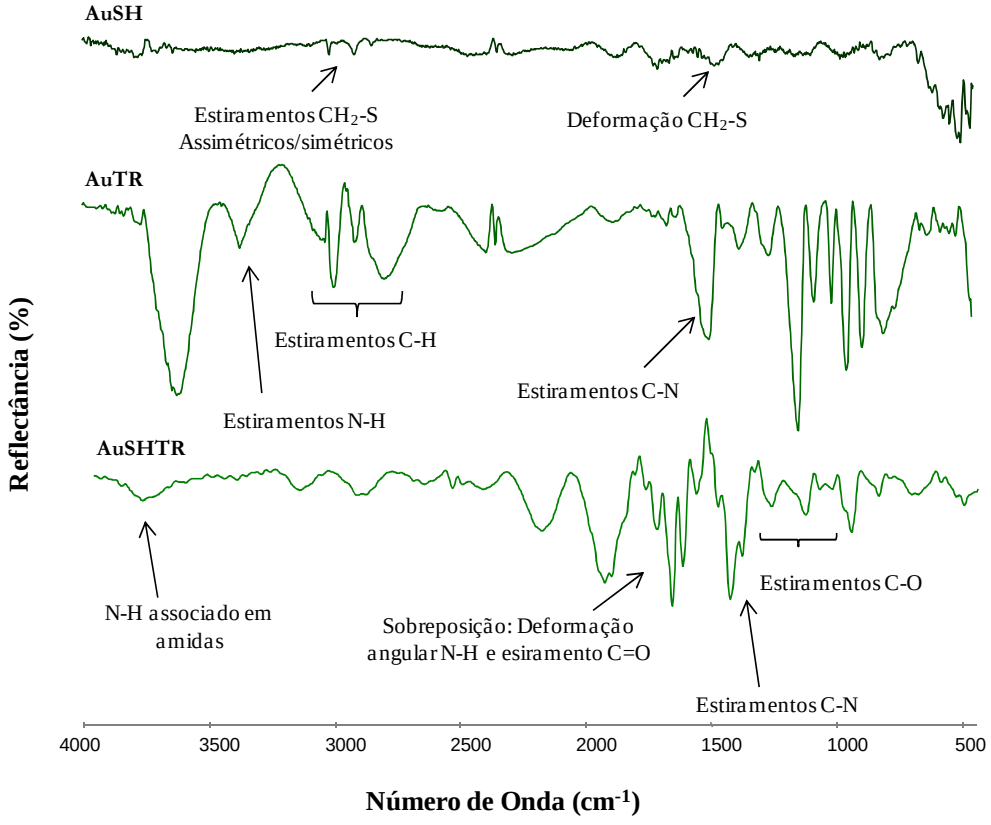

Figura 19. Espectros de infravermelho referentes a: SAM de tiol sobre o substrato de vidro recoberto com ouro (AUSH); região LBD da molécula de TRβ1 sobre substrato de vidro recoberto com ouro (AuTR) e SAM de tiol sobre o substrato de vidro recoberto com ouro contendo TRβ1 LBD imobilizada sobre esta (AUSHTR).

A imobilização de TRβ1-LBD foi realizada como ilustrado na Figura 16, ou seja, após a preparação do substrato com a SAM de tiol (11-AMU), uma solução da proteína foi

depositada sobre o substrato por *casting* (durante 1 h). O espectro de FTIR oriundo desta imobilização é o AuSHTR, mostrado na Figura 19. Comparando-se os espectros da região LBD-TRβ1 imobilizados diretamente sobre a superfície de ouro (AuTR) e sobre ouro funcionalizado com tiol (AuSHTR), foi possível constatar variações nas intensidades dos sinais vibracionais, além da maior definição no aparecimento das bandas referentes às interações intra e intermoleculares.

Ainda para o espectro de AuTR, foi possível observar o aparecimento de bandas características de estiramentos C-H na região de 3050 – 2600 cm^{-1}, as quais não tiveram as mesmas intensidades no espectro de AuSHTR. Isso ocorre em função da quantidade de material que interagiu com a superfície do substrato. A adsorção da região LBD da proteína TRβ1 é maior na ausência da monocamada de tiol, uma vez que há maior quantidade de átomos de Au disponíveis na superfície do substrato responsáveis pelas interações não específicas com a proteína. Estas interações resultam da atração entre resíduos de aminoácidos contendo átomos de enxofre, e os átomos de ouro presentes no substrato. Com a funcionalização da superfície, a molécula de TRβ1-LBD, embora aparentemente interaja com menor intensidade com o substrato, interage fortemente com a SAM de tiol, o que ocorre preferencialmente pela cauda de histidina, com os grupos carboxílicos do tiol. Esse efeito possivelmente confere à molécula uma orientação, melhorando o acesso do ligante ao sítio ativo da proteína. Além disso, a funcionalização minimiza as interações não-específicas, aumentando a seletividade nas medidas de detecção dos HTs, como será discutido adiante.

Dentre as bandas de maior intensidade para a proteína imobilizada, cabe ressaltar a sobreposição de bandas ocorrida na região entre 1700 e 2000 cm^{-1}, e também os estiramentos C-N das amidas em torno de 1500 cm^{-1}. As diferenças dos espectros referentes à região LBD de TRβ1 ancorado sobre ouro, ou sobre a monocamada de tiol podem indicar diferenças conformacionais da biomolécula ancorada.

A análise da Figura 19 revela ainda um deslocamento da banda atribuída aos estiramentos C-N. Essa banda, localizada em cerca de 1500 cm^{-1} para AuTR, parece deslocar para 1400 cm^{-1} no AuSHTR, indicando o efeito que a SAM de tiol exerce sobre a estrutura da proteína. Também para o espectro de AuTR a banda referente aos estiramentos N-H aparece em aproximadamente 3380 cm^{-1}, sendo suprimida no espectro de AuSHTR. Esta característica também é observada para as bandas na região entre 2800 e 3000 cm^{-1} resultantes dos estiramentos C-H, que apresentam menor intensidade no espectro de AuSHTR em relação ao AuTR.

Os espectros contendo os ligantes específicos adsorvidos sobre a superfície de TRβ1-LBD estão apresentados na Figura 20. Estes sistemas foram designados como AuSHTRT3, AuSHTRT4, AuSHTRTRIAC e AuSHTRGC-1, dependendo do ligante que interagiu com a camada receptora de TRβ1-LBD. Os espectros de reflexão obtidos para estes sistemas não possuem boa relação sinal/ruído, impossibilitando uma análise mais precisa acerca da natureza das interações envolvidas.

Os espectros do receptor nuclear TRβ1-LBD (AuSHTR) imobilizado, e aqueles contendo os ligantes específicos adsorvidos, permitiram analisar diferenças de reflexão de radiação indicando a interação receptor-ligante. Os estiramentos N-H exibem reflexões referentes a deformações angulares N-H entre 1540 e 1640 cm^{-1}, de intensidade média a forte, para aminas e amidas primárias, ou entre 1490 e 1580 cm^{-1}, de intensidade fraca a ausente para aminas e amidas secundárias. Estas bandas não foram observadas claramente nos espectros da Figura 20, provavelmente por serem suprimidas pela banda em 1560 cm^{-1} de anéis aromáticos dos HTs e dos análogos TRIAC e GC-1.

A região em torno de 1700 cm^{-1} apresenta várias bandas, as quais estão destacadas na Figura 20 como sobreposição das deformações angulares N-H e estiramentos C=O, típicos dos aminoácidos. Ressalta-se que o grupo C=O está presente também nas moléculas de ligantes, nos grupos carboxila. Para os filmes contendo os ligantes, um leve deslocamento para maiores números de onda são observados para o C=O, quando comparado ao espectro de AuSHTR. Para este último, foi evidenciada na figura a banda localizada em 1680 cm^{-1}, a qual equivale a, aproximadamente, 1700 - 1710 cm^{-1} nos espectros contendo os ligantes. Este deslocamento é outro indício da interação dos HTs e dos análogos sintéticos à molécula receptora TRβ1.

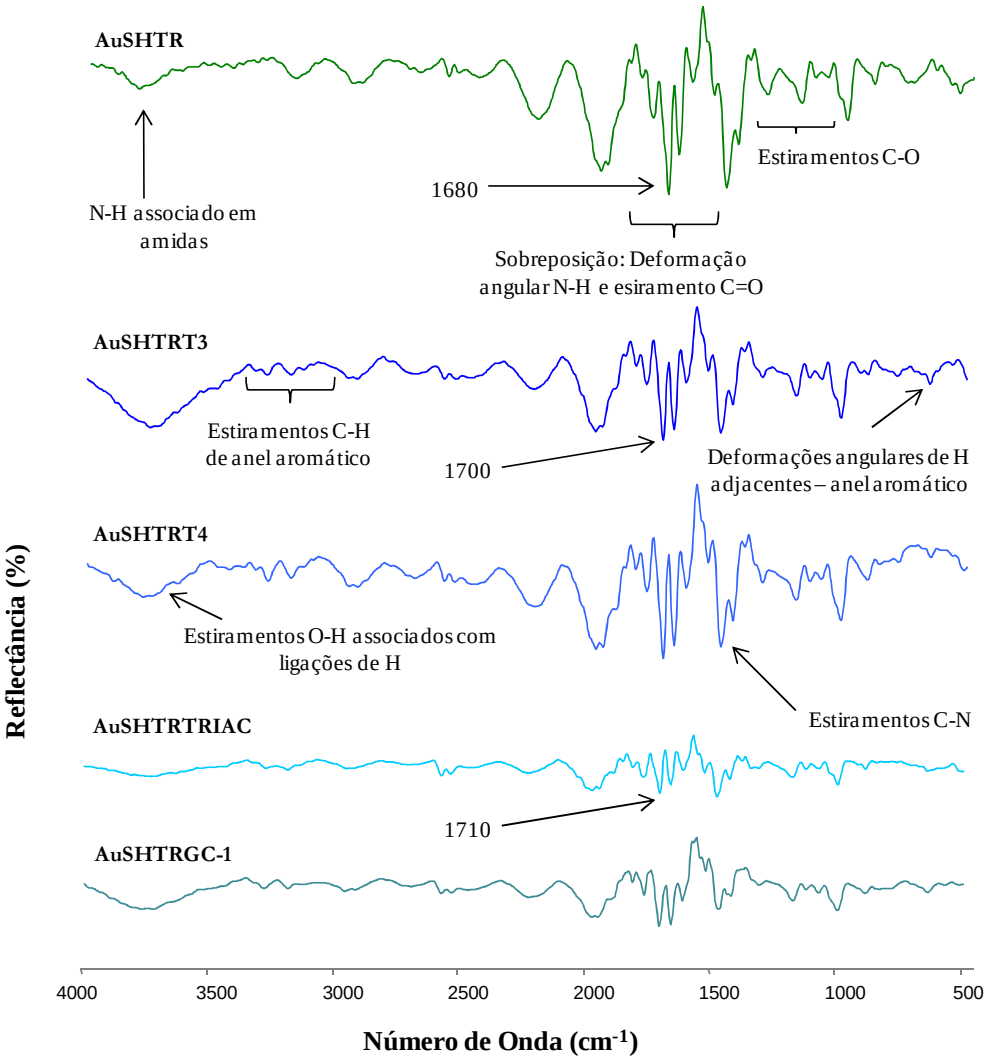

Figura 20. Espectros de infravermelho para os filmes nanoestruturados contendo TRβ1-LBD (adsorvidos sobre monocamada de tiol), novamente ilustrado, e após interagir com HTs: Legenda: AuSHTR – superfície de ouro e monocamada de tiol contendo TRβ1-LBD imobilizado, AuSHTRT3 – AuSHTR contendo o ligante T3, AuSHTRT4 – AuSHTR contendo o ligante T4, AuSHTRTRIAC – AuSHTR contendo o ligante TRIAC e AuSHTRGC-1 – AuSHTR contendo o ligante GC-1.

Outro indício da presença das moléculas de ligantes adsorvidas sobre a camada biorreceptora, e talvez o mais importante para esta análise, é a região em 3100 cm^{-1}, a qual é característica de estiramentos C-H originados pelas vibrações típicas de anel aromático. Esta região aparece bastante diferenciada quando comparada ao espectro de AuSHTR, na ausência dos HTs e dos análogos sintéticos. Vale ressaltar ainda que para os filmes contendo os HTs T3 e T4 ocorre um aumento da intensidade da banda em 3700 cm^{-1} referente aos grupos OH, que podem ser oriundos tanto dos grupos fenólicos (do ligante), quanto dos grupos

carboxílicos (dos ligantes ou da proteína). A Tabela 1 sumariza as bandas de reflexão dos compostos analisados, juntamente com suas respectivas atribuições.

Tabela 1. Atribuição proposta para as bandas referentes às SAMs de AuTR, AuSH, AuSHTR, AuSHTRT3, AuSHTRT4 e AuSHTRTRIAC[76,78].

Número de Onda (cm^{-1})	Atribuição proposta das bandas
3600	Estiramentos de O-H de álcool, pertencente a grupo fenol, sobrepostos com estiramentos O-H de ácido
3475	Estiramentos do grupo N-H
3100	Estiramentos C-H de anel aromático
3050 – 2600	Estiramentos C-H
2948 - 2922	Estiramentos assimétricos do grupo CH_2-S
2878 - 2846	Estiramentos simétricos do grupo CH_2-S
1700 – 2000	Sobreposição de bandas referentes às reflexões C=O (1.640 - 1.620 cm^{-1}) com deformações angulares N-H, (1.800 cm^{-1})
1600 - 1450 e 690 - 800	Estiramentos C=C de compostos aromáticos
1500	Estiramentos C-N
1435 - 1410	Deformações angulares do grupo CH_2-S
1420 e 1300 - 1200	Estiramentos de C-O devido a ácidos carboxílicos resultantes do acoplamento da deformação angular no plano da ligação O-H e a deformação axial de C-O
1400-1500	Estiramentos do grupo C-N

Os espectros para o receptor nuclear TRβ1-LBD imobilizado (AuSHTR) e aqueles contendo os ligantes específicos adsorvidos (AuSHTRT3, AuSHTRT4, AuSHTRTRIAC e AuSHTRGC-1) comprovam a presença do receptor no filme. Para o caso dos HTs e dos análogos sintéticos, a relação sinal-ruído dos espectros não foi boa, devido à pequena quantidade de material adsorvido. Além disso, a reflexão para amostras sólidas, neste caso um filme, não é um fenômeno exclusivamente de superfície, mas uma síntese de espalhamento, transmissão e interações de absorção da radiação no volume de filme. A superfície do filme

também influencia nestes parâmetros, pois não é homogênea, contendo regiões orientadas aleatoriamente, ocasionando a reflexão da radiação em todas as direções[75]. Estes parâmetros, associados à natureza monocamada do filme, dificultam um estudo mais preciso deste sistema receptor-ligante, através de espectroscopia de FTIR.

5.4 Microscopia de Força Atômica - AFM

As amostras utilizadas nos estudos de AFM foram substratos previamente recobertos com ouro e funcionalizados com o tiol 11-AMU. A estas superfícies funcionalizadas foram imobilizadas primeiramente a monocamada de TRβ1-LBD e, em seguida, o ligante. A partir das imagens, ilustradas na Figura 21, foram estimadas as rugosidades de cada monocamada depositada, apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Valores de rugosidade para as amostras contendo o método de imobilização de funcionalização de substrato recoberto com ouro.

Amostra	Rugosidade (nm)
Au	6,25*
AuSH	2,04
AuSHTR	1,56
AuSHTRT3	2,24
AuSHTRT4	2,36
AuSHTRTRIAC	2,50

Legenda: Au – substrato de vidro recoberto com ouro, AuSH – superfície de ouro contendo monocamada de tiol (11-AMU), AuSHTR – superfície de ouro e monocamada de tiol contendo TRβ1-LBD imobilizado, AuSHTRT3 – AuSHTR contendo o ligante T3, AuSHTRT4 – AuSHTR contendo o ligante T4 e AuSHTRTRIAC – AuSHTR contendo o ligante TRIAC. * Imagem não mostrada.

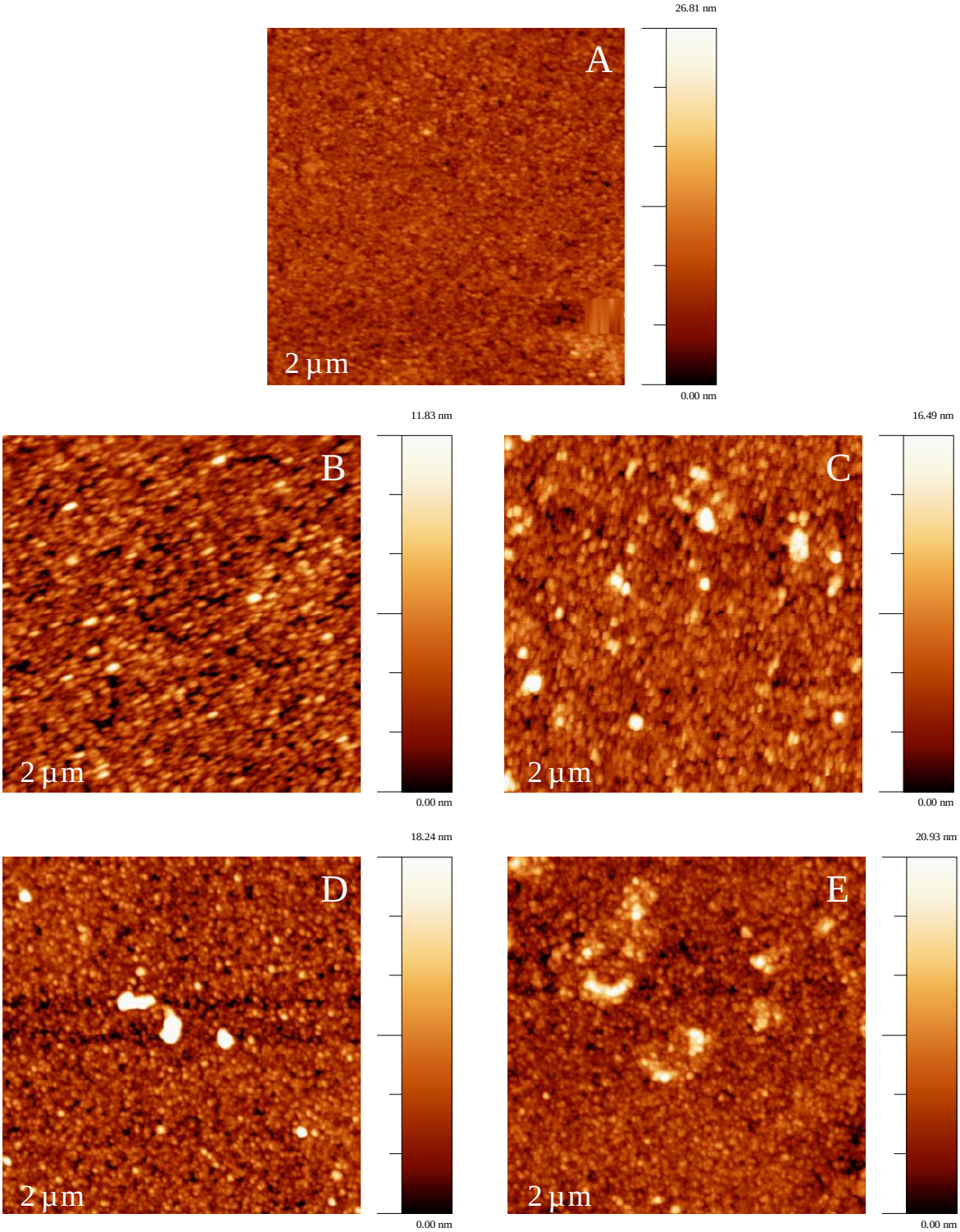

Figura 21. Imagens bidimensionais obtidas por AFM das superfícies de (A) AuSH, (B) AuSHTR, (C) AuSHTRT3, (D) AuSHTRT4 e (E) AuSHTRTRIAC.

Não foram observadas diferenças de morfologia entre a superfície de ouro antes (não mostrado) e após a deposição da monocamada de tiol. Isso se deve ao fato da camada de 11-AMU ser extremamente fina, que não modifica completamente a morfologia anterior. Apesar

de sua pequena espessura, no entanto, a camada de 11-AMU pode ser identificada por AFM, através da análise dos valores de rugosidade (2,04 nm para a camada de 11-AMU), menor que aquela apresentada apenas pela superfície do ouro (6,25 nm). Provavelmente, a monocamada adsorvida de 11-AMU preenche os espaços vazios da camada de ouro, diminuindo a rugosidade superficial.

A imagem contendo TRβ1-LBD imobilizado sobre a monocamada de tiol apresentou alguns glóbulos de maior intensidade (pontos mais claros), indicando que houve deposição da proteína, que não são observados no substrato sem deposição, este último ilustrado na Figura 21-A (AuSH). Os pontos mais claros e menores, em relação àqueles que constituem as proteínas, podem ser resíduos salinos da solução-tampão. Nas imagens 21-C, 21-D e 21-E, correspondentes aos ligantes T3, T4 e TRIAC, respectivamente (adsorvidos à monocamada de TRβ1-LBD) aparecem glóbulos maiores em relação à imagem contendo apenas o receptor tireoidiano (Figura 21-B). A morfologia destes glóbulos assemelha-se a aglomerados, resultado da interação específica dos hormônios com a região de ligação do receptor previamente imobilizado.

No geral, há o aparecimento de uma morfologia heterogênea, associada às adsorções das biomoléculas. Observa-se que há uma diferença na intensidade nos pontos das regiões claras das imagens, que provavelmente correspondem à interação receptor-ligante. Na imagem 21-B, referente ao TRβ1-LBD imobilizado, as regiões claras são mais escassas e menores. Após a adsorção dos HTs e do análogo, estas regiões aparecem maiores, formando aglomerados. Vale ressaltar que as magnitudes das interações do receptor com os hormônios e o análogo podem ser diferentes, como tem sido relatado por vários estudos a respeito da afinidade de ligação dos HTs com os TRs, em virtude de suas estruturas moleculares[4,79,80].

Como pôde ser observado na Tabela 2, o valor de rugosidade da amostra que contém o TRβ1-LBD imobilizado, é menor quando comparado às amostras contento os ligantes hormonais. Tal fato corrobora o processo de adsorção dos ligantes.

5.5 Ressonância de Plasma de Superfície - SPR

Sensores baseados em SPR são capazes de detectar interações moleculares pela variação do índice de refração de uma camada de transdução. Neste trabalho, a técnica de SPR foi utilizada para investigar as interações dos HTs T3 e T4 e dos análogos sintéticos TRIAC e GC-1 com o receptor TRβ1-LBD. Foi utilizado um sensor de SPR funcionalizado com COOH, ACX Nomadics, o qual possui moléculas previamente imobilizadas contendo grupos carboxila na superfície. Isso possibilita uma melhor interação entre o sensor e a molécula de TRβ1-LBD.

Um fator importante a considerar nas análises de SPR é o baixo peso molecular das moléculas dos hormônios (algumas dezenas de Daltons). Este valor é muito baixo quando comparado ao peso molecular da região LBD do receptor, em torno de 29,7 KDa, podendo afetar a resposta do sensor. Desta forma, é desejável que a concentração do receptor seja da ordem de micromolar, pois este atuará como o "ancorador", enquanto as soluções posteriores de hormônios a serem introduzidas no sistema de reconhecimento atuarão como analitos. Consequentemente, um experimento com este tipo de interação requer quantidades saturadas de receptor, auxiliando na obtenção de uma resposta instrumental satisfatória[81].

A curva de SPR obtida durante a adsorção da monocamada do receptor sobre a superfície carboxilada do sensor (COOH/TRβ1-LBD) está mostrada na Figura 22. É possível observar o processo de adsorção do receptor sobre o sensor através do incremento do sinal de resposta. Pode ser verificado também que a adsorção completa de uma camada de TRβ1-LBD leva cerca de 300 s, onde o sinal atinge saturação. Após a adsorção, é injetada solução-tampão, e observa-se o processo de dessorção das biomoléculas não efetivamente adsorvidas. Essa dessorção é bastante rápida e o sinal estabiliza-se novamente após certo tempo, voltando a um novo patamar. Esse sinal residual é indicativo da eficiência da adsorção das moléculas de TRβ1 sobre a superfície sensora.

Após a formação de uma camada de TRβ1-LBD sobre a superfície sensora, foi analisada a adsorção dos HTs sobre essa camada de receptor. Como mencionado, esse processo não é de fácil visualização em medidas de SPR devido ao baixo peso molecular dos analitos.

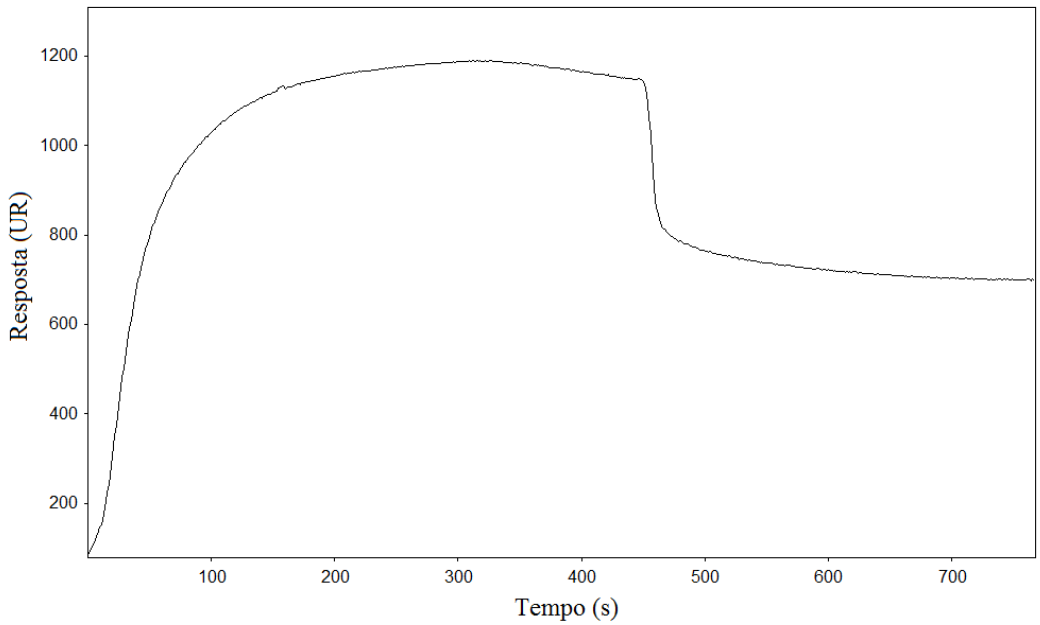

Figura 22. Sensorgrama obtido da injeção de TRβ1-LBD 8,6 µM sobre o sensor funcionalizado COOH, ACX Nomadics®.

De fato, em um trabalho de revisão realizado por Homola e colaboradores (1999)[29], é ressaltado que o aumento no índice de refração produzido pela adsorção de moléculas pequenas pode não ser suficiente para uma detecção direta. Estes autores ainda indicam o uso de novos ensaios para melhor investigar estas reações, por exemplo, os ensaios "sanduíche", onde o analito é ligado entre dois anticorpos primários: o anticorpo de captura, e o anticorpo de detecção[10]. Esta limitação também é mencionada por outros autores, como em Rich e Myszka (2008)[82], os quais analisaram os trabalhos publicados no ano de 2007 que envolveram a aplicação em biossensores ópticos.

No presente trabalho, esta limitação foi comprovada. Os experimentos não foram satisfatórios e, embora em alguns casos tivessem apresentado variações no sinal de resposta, esse sinal era provavelmente devido à agregação dos HTs, pois eram de grande intensidade, incompatível com uma variação no sinal causada pela adsorção de HTs em relação a seus receptores imobilizados. Um exemplo está ilustrado na Figura 23, referente aos sensorgramas obtidos para o sistema com T3, com os quais foram obtidos os melhores resultados. Ressalta-se que apesar de não ser possível inferir sobre parâmetros cinéticos a partir dessas medidas, pelas limitações discutidas acima, os gráficos podem servir para ilustrar o tempo necessário para o sistema atingir saturação. É possível observar a associação entre as moléculas de

TRβ1-LBD e a superfície do sensor, pela variação de seu índice de refração, ao longo do tempo. O formato das injeções 2 e 3, no entanto, é bastante diferente daquele observado para a injeção 4 (50 µM). Tanto para as injeções 2 e 3, e principalmente para a injeção 4, não é esperada uma variação tão grande do sinal de resposta, a qual, muito provavelmente é devida à agregação dos HTs na superfície do eletrodo. Moléculas contendo anéis aromáticos são frequentemente auto-organizadas através de interações π. Desta forma, pode haver este efeito de interação entre as moléculas de hormônio, as quais são compostas por dois anéis aromáticos e alguns substituintes reativos, como iodo, hidroxila e carboxila[83,84].Vale ressaltar que podem ocorrer também interações não específicas.

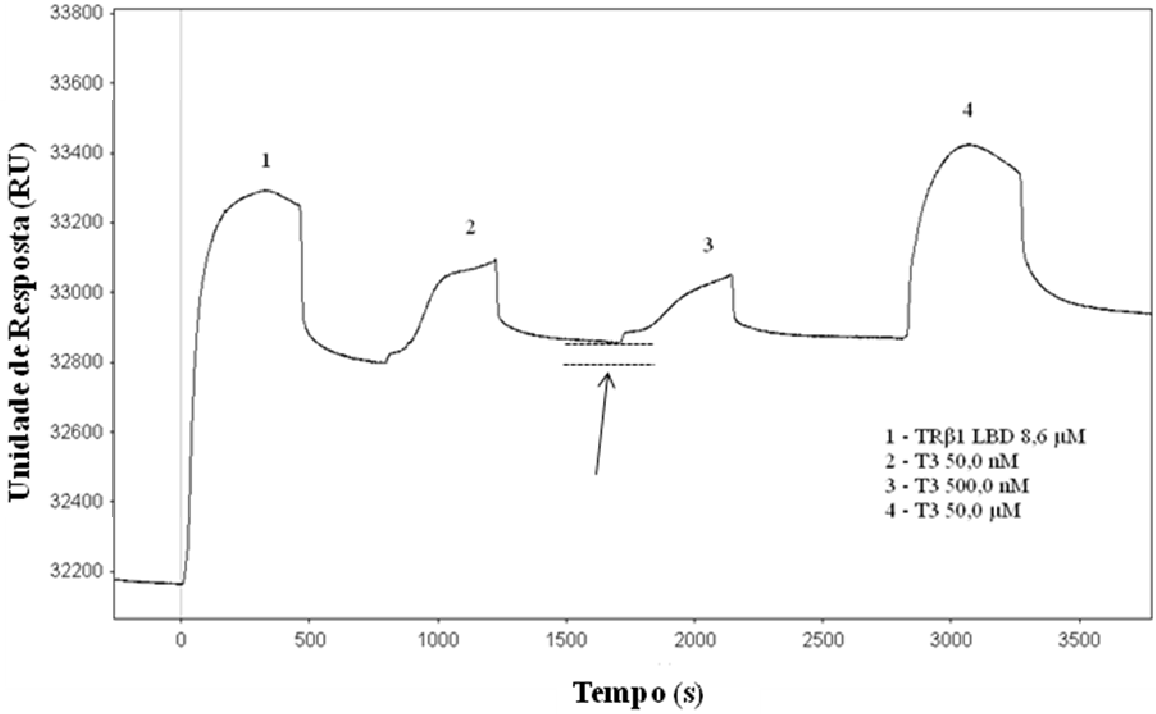

Figura 23. Sensorgrama obtido pela análise das soluções de 8,6 µM TRβ1-LBD e das soluções 50,0 nM, 500,0 nM e 50,0 µM de T3 na superfície do sensor.

Devido à possível agregação dos HTs na superfície dos sensores, não foram realizados ajustes nas curvas para obtenção de parâmetros cinéticos, como constantes de associação (K_a) e dissociação (K_d). Contudo, vale mencionar alguns estudos reportados recentemente, acerca desses parâmetros. Por exemplo, Huber e colaboradores (2003)[85] investigaram a cinética de ligação de T3 a duas regiões LBD deste mesmo receptor, Ala 317 Thr e Arg 316 His. Foi observado valores de ligações entre os dois tipos de TRβ1-LBD [Ala

317 Thr e Arg 316 His, com valores a 4,0 °C de constantes de dissociação de equilíbrio aparente K_D, 4,7 (±0,9) x 10^{-9} e 2,0 (±0,3) x 10^{-9}, respectivamente] e o hormônio T3 menores quando comparados à ligação entre este mesmo hormônio e a molécula nativa de TRβ1, o qual possui K_D no valor de 5,7 (±5,0) x 10^{-11}.

5.6 Detecção de HTs através de Espectroscopia de Impedância Elétrica - EIS

A funcionalização múltipla dos eletrodos interdigitados, realizada nesse trabalho, teve por objetivo promover uma melhor ancoragem das moléculas protéicas sobre os eletrodos. SAMs de silanos e tióis[46] de cadeias longas (com doze ou mais carbonos) formam um meio isolante separando o receptor da superfície metálica, minimizando a transferência eletrônica na interface eletrodo/SAM/solução de analito (meio dielétrico). Medidas de espectroscopia de impedância elétrica foram realizadas para os hormônios T3 e T4 e para os análogos sintéticos TRIAC e GC-1. Nesse caso, nenhuma modelagem acerca dos parâmetros envolvidos na resposta elétrica dos eletrodos foi realizada. O intuito primário deste estudo foi de avaliar as mudanças causadas nas curvas de capacitância AC dos eletrodos, em função do tipo de solução de HTs utilizada como analito. O interesse em avaliar os efeitos destes análogos na camada biorreceptora está relacionado ao potencial terapêutico destas moléculas nas disfunções endócrinas, como abordado anteriormente na revisão da literatura.

Foram analisados simultaneamente três sistemas diferentes, similar ao reportado por Zucolotto e colaboradores (2006)[86], ou seja, foram avaliadas as respostas elétricas de um mesmo eletrodo em três situações: eletrodo limpo, eletrodo contendo as SAMs de silano e de tiol ("silatiol") e o eletrodo contendo TRβ1-LBD imobilizado (eletrodo biossensor). Todos os eletrodos foram imersos nas soluções de HTs, de TRIAC e de GC-1 a diferentes concentrações, seguido da coleta dos valores de capacitância na faixa de frequência mencionada na seção experimental. Os dados de capacitância foram analisados utilizando-se PCA, e os resultados e as discussões sobre a capacidade de detecção dos eletrodos serão descritas considerando-se os gráficos desta análise. Como ilustração, no entanto, a Figura 24 mostra uma curva típica de capacitância *vs* frequência para o hormônio T4, considerando-se os três eletrodos utilizados.

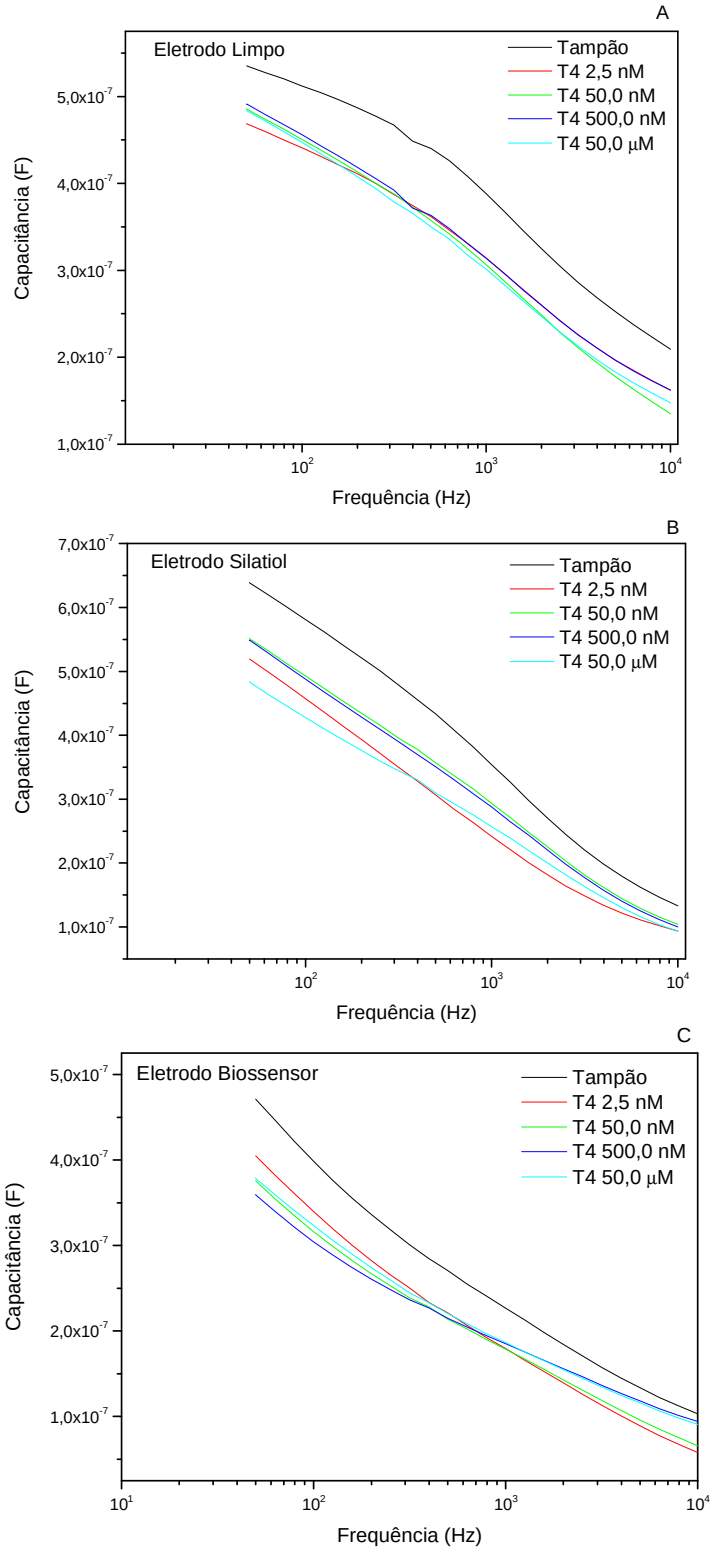

Figura 24. Curvas de capacitância obtidas pela imersão dos eletrodos (A) limpo, (B) contendo SAMs de silano e tiol - "silatiol" e (C) biossensor em soluções de diferentes concentrações de T4.

Pela análise da Figura 24 é possível observar que para o eletrodo limpo, há uma variação do sinal da capacitância quando este é imerso em solução-tampão. Contudo, não são observadas variações significativas para as soluções de T4 a diferentes concentrações. Este efeito evidencia que o eletrodo limpo (sem nenhum filme orgânico) diferencia entre a solução-tampão e as demais soluções, mas não é capaz de distinguir entre as diferentes concentrações do analito. Quando o eletrodo contendo as SAMs é utilizado ("silatiol"), observa-se uma variação dos valores da capacitância em função das diferentes concentrações de T4. Esta diferenciação já era esperada, justamente pela presença do filme orgânico. Nesse caso, não são esperadas interações específicas entre o analito e a camada de SAM. Para o eletrodo biossensor, que contém o TRβ1-LBD imobilizado, observa-se também uma boa separação entre as soluções utilizadas, principalmente em regiões de baixa frequência, por volta de 100 Hz. Uma explicação para a variação da capacitância em função da concentração do analito não é trivial[86]. Contudo, é sabido que com a adsorção das moléculas de analito no material imobilizado no eletrodo, ocorre um rearranjo iônico localizado, que pode alterar a constante dielétrica localmente, resultando na variação da capacitância.

Os valores de capacitância obtidos em função da concentração dos HTs e dos análogos sintéticos, para os três eletrodos, foram tratados utilizando-se PCA. A ideia central da utilização da análise por PCA é agrupar as variáveis correlacionadas, gerando uma nova classe de variáveis usualmente chamadas Componentes Principais (PCs, *Principal Components*). As PCs são resultados de combinações lineares das variáveis originais e têm propriedades importantes na correlação destas variáveis. Em uma análise gráfica bidimensional, as PCs constituem as coordenadas, onde a variação dos dados é maximizada ao longo dos eixos. Os gráficos gerados como *output* da PCA contêm informações sobre as espécies analisadas, permitindo a visibilidade de similaridade, agrupamentos e diferenças entre os dados. Foram escolhidos dois valores de frequência para explorar a variabilidade dos dados: 100 Hz e 1 KHz.

Inicialmente foram plotados os gráficos de *Loading*, utilizando-se o software Pirouette®. Nessa análise, é possível observar como os eletrodos estão correlacionados entre si, a um dado valor de concentração, com base nas variáveis consideradas, ou seja, os tipos de eletrodos, os tipos de hormônios e as concentrações. Os gráficos de *Loadings* relativos à concentração de 50 nM de HTs e análogos estão mostrados nas Figuras 25 A (para 100 Hz) e 25 B (para 1 KHz).

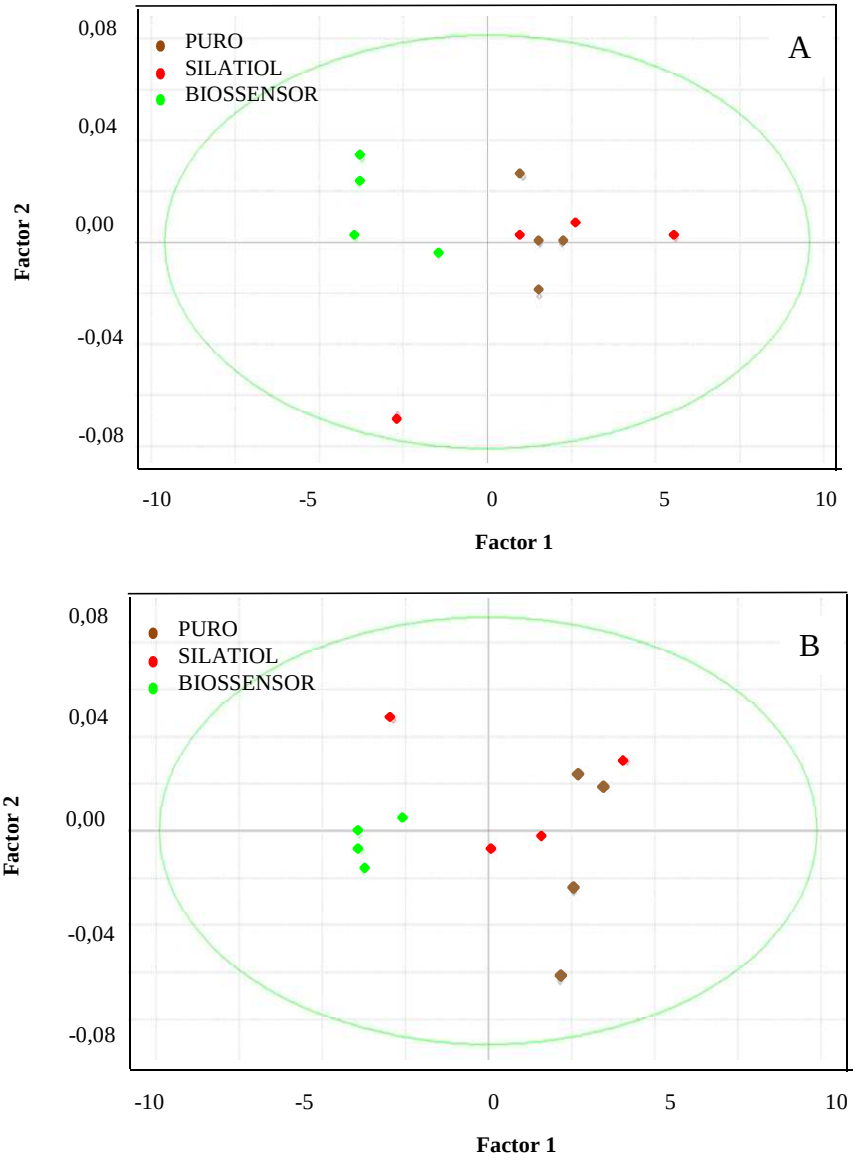

Figura 25. Gráficos de *Loadings* a (A) 100 Hz e (B) 1 KHz resultantes da análise dos três sistemas de eletrodos: eletrodo limpo, "silatiol" e biossensor. Todas as combinações são relativas aos quatro tipos de hormônios e análogos, T3, T4, TRIAC e GC-1, na concentração de 50 nM. Tratamento obtido pelo software Pirouette®.

Pelos gráficos de *Loadings* da Figura 25 é possível avaliar a influência do tipo de eletrodo na identificação e separação dos diferentes HTs e análogos sintéticos, para a concentração de 50 nM, escolhida pela proximidade com os níveis encontrados fisiologicamente. Como pode ser verificado, o eletrodo biossensor sempre se localiza do lado esquerdo do gráfico, com os pontos agrupados. Esse fato não é observado para os outros eletrodos, cujos dados estão "embaralhados", o que mostra que realmente o eletrodo biossensor interage de maneira diferente com os HTs e análogos, e essa interação gera um

padrão de resposta bastante característico a esse sistema. Ou seja, o eletrodo biossensor é fundamental para a análise e separação das amostras.

Para melhor visualizar o efeito que cada eletrodo exerce sobre a análise de biossensoriamento, foram também estudadas combinações binárias. Foram analisadas as combinações do eletrodo limpo e "silatiol", limpo e biossensor, e "silatiol" e biossensor. Na Figura 26 está mostrado o *Loading* para a combinação dos eletrodos limpo e "silatiol" para as frequências de 100 Hz e 1 KHz.

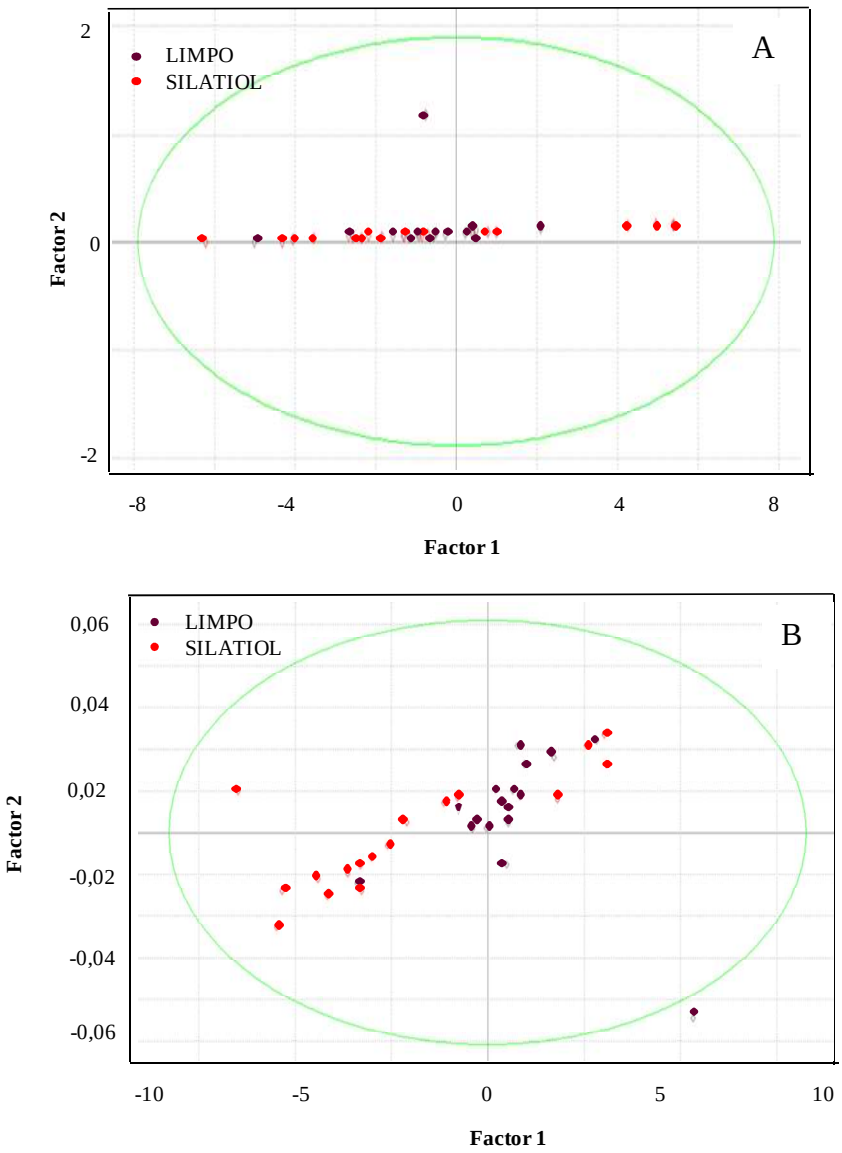

Figura 26. Gráficos de *Loadings* a (A) 100 Hz e (B) 1 KHz resultantes da análise binária dos eletrodos limpo e "silatiol". Todas as combinações são relativas aos quatro tipos de hormônios e análogos, T3, T4, TRIAC e GC-1, bem como suas concentrações, 2,5 nM, 50,0 nM, 500,0 nM e 50,0 µM. Tratamento obtido pelo software Pirouette®.

Com pode ser verificado, não ocorre uma boa separação dos dados para a combinação de eletrodos mostrados na Figura 26, para os eletrodos não específicos para o sistema receptor-ligante de interesse. A 100 Hz, Figura 26-A, este efeito é mais evidenciado, uma vez que neste caso não é possível diferenciar-se dados comuns em regiões específicas do gráfico. Mesmo a 1 KHz, a resposta ainda não é satisfatória.

As combinações contendo o eletrodo de interesse (biossensor) são mostradas nas Figuras 27 e 28.

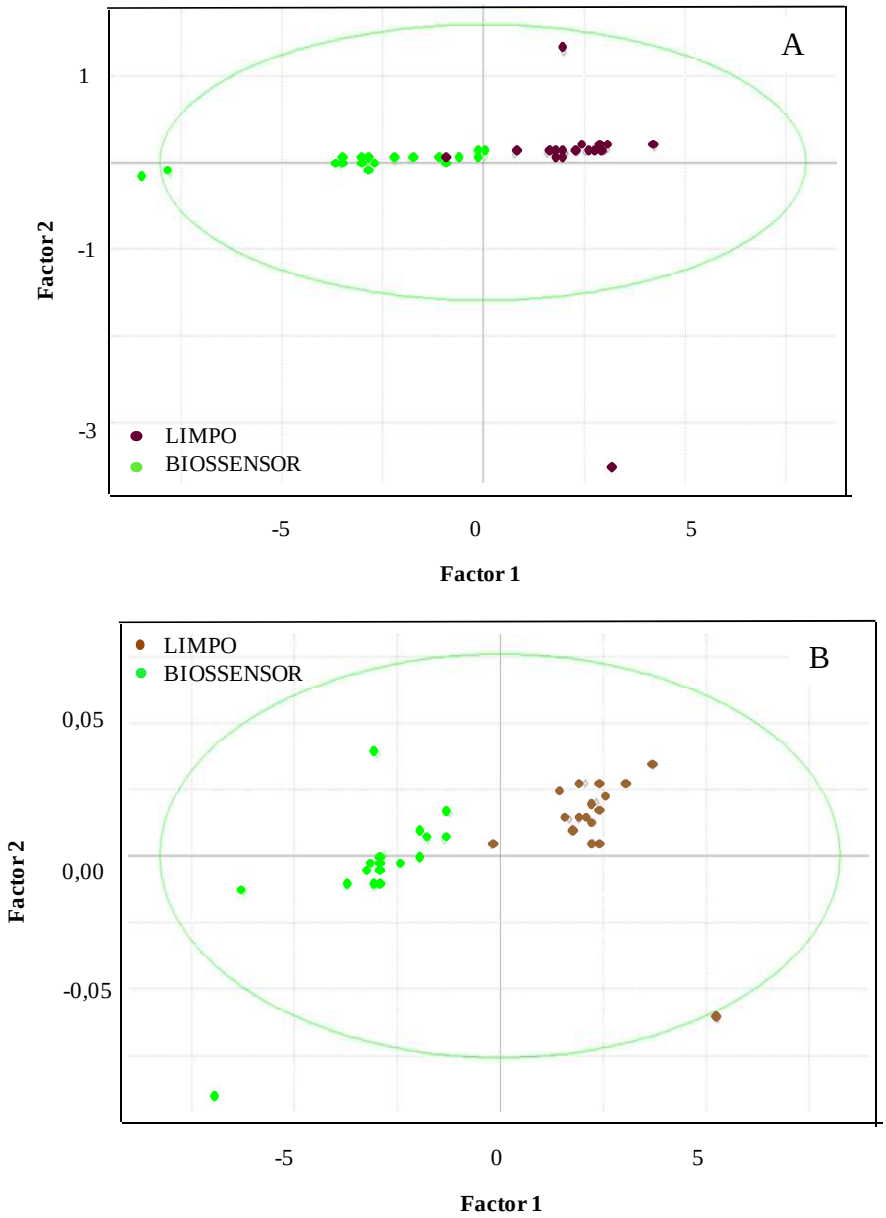

Figura 27. Gráficos de *Loadings* a (A) 100 Hz e (B) 1 KHz resultantes da análise binária dos eletrodos limpo e biossensor. Todas as combinações são relativas aos quatro tipos de hormônios e análogos, T3, T4, TRIAC e GC-1, bem como suas concentrações, 2,5 nM, 50,0 nM, 500,0 nM e 50,0 µM. Tratamento obtido pelo software Pirouette®.

Essas figuras contêm os *Loadings* para as combinações eletrodo limpo-eletrodo biossensor e eletrodo “silatiol”-eletrodo biossensor, respectivamente, nas frequências de 100 Hz e 1 KHz. De fato, a natureza de cada eletrodo é comprovada pela localização definida dos dados no gráfico. Nestas combinações binárias observa-se claramente que o eletrodo biossensor é capaz de diferenciar-se em relação aos demais.

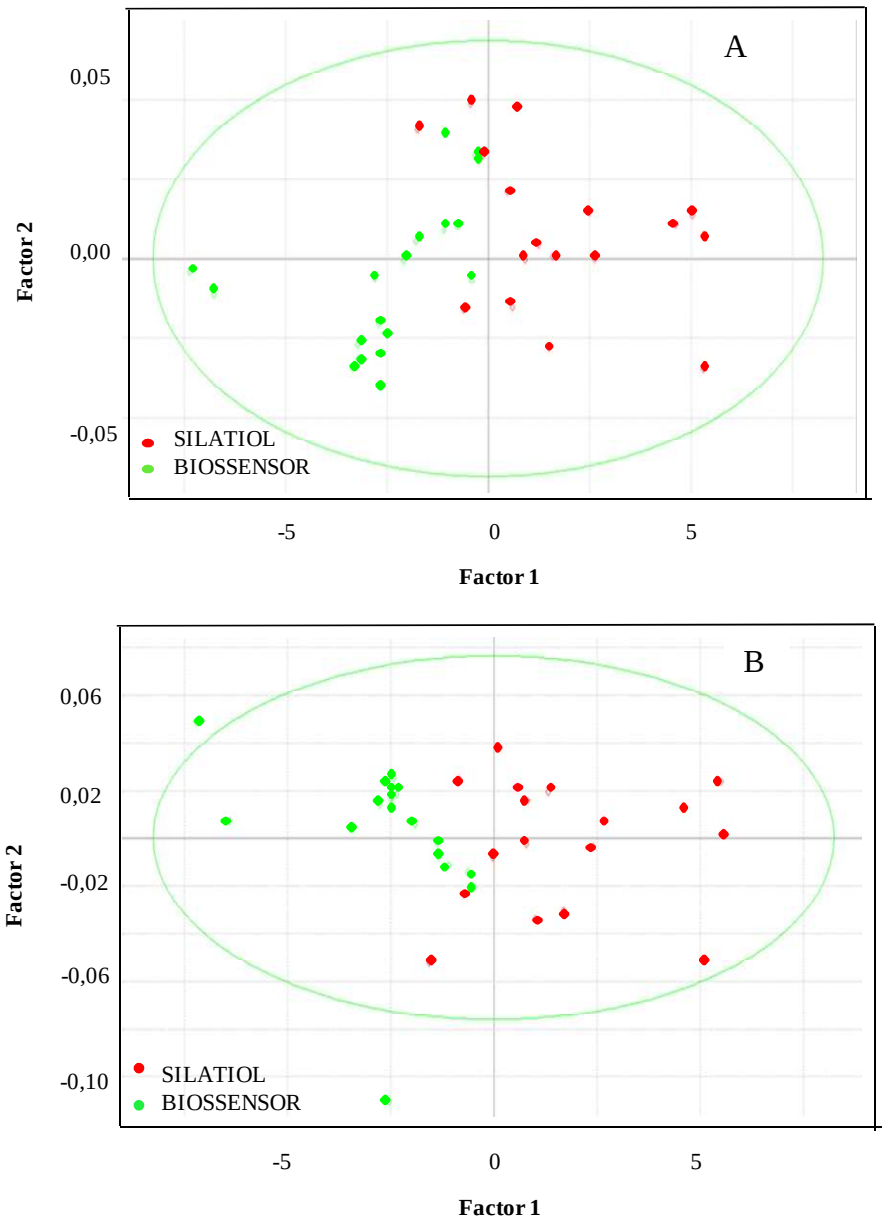

Figura 28. Gráficos de *Loadings* a (A) 100 Hz e (B) 1 KHz resultantes da análise binária dos eletrodos “silatiol” e biossensor. Todas as combinações são relativas aos quatro tipos de hormônios e análogos, T3, T4, TRIAC e GC-1, bem como suas concentrações, 2,5 nM, 50,0 nM, 500,0 nM e 50,0 µM. Tratamento obtido pelo software Pirouette®.

De forma geral, como pode ser verificado nas Figuras 27 e 28, os pontos referentes ao eletrodo biossensor aparecem sempre melhor organizados e separados, à esquerda dos gráficos. Isto é resultado da ação dos ligantes, os quais são os responsáveis pela interação específica com o eletrodo biossensor, classificando-o de modo a distingui-lo dos demais eletrodos. Desta forma, combinando os três eletrodos, como previamente ilustrado na Figura 25, ou mesmo de forma binária (Fig. 26 a 28), a tendência perceptível é a de que o eletrodo biossensor adquira certa peculiariedade de distinção quando comparado aos demais eletrodos.

Além disso, nas combinações binárias observa-se que a separação entre o eletrodo biossensor e os demais é mais evidenciada na frequência de 1 KHz.

Uma vez confirmada a influência do eletrodo biossensor na distinção entre as amostras, os dados de capacitância obtidos para os três eletrodos para as frequências de 100 Hz e de 1 KHz foram utilizados como sinal de entrada nas análises de PCA. Foram utilizados os dados referentes às concentrações de 2,5 nM, 50,0 nM e 500,0 nM. A Figura 29 ilustra o gráfico de PCA a 100 Hz originado pela análise dos quatro ligantes: T3, T4, TRIAC e GC-1 nas concentrações acima citadas.

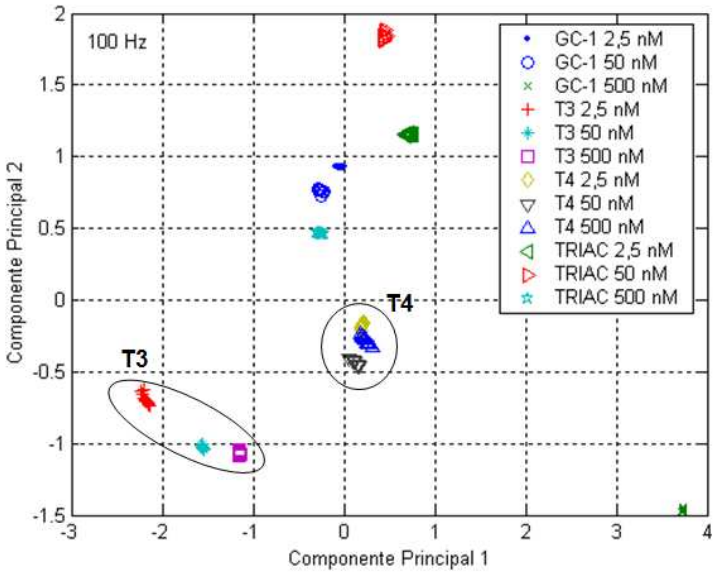

Figura 29. Gráficos de PCA obtidos a 100 Hz a partir dos valores de capacitância e nas concentrações de 2,5 nM, 50,0 nM e 500,0 nM para GC-1, T3, T4 e TRIAC. Tratamento obtido pelo software MatLab®.

Ressalta-se que não foram utilizados os dados para a concentração a 50 μM, pois quando essa concentração era utilizada na análise, não era possível observar separação entre os dados (os dados mantinham-se “embaralhados” no *plot* do PCA). Uma possível explicação

para esse fato é de que a concentração de 50 μM é muito alta, o que satura os sítios de ligação da camada biorreceptora, levando a dados incoerentes. O fato de não utilização dessa concentração de 50 μM, contudo, não é preocupante, uma vez que em sistemas e amostras fisiológicas reais, os HTs nunca estarão presentes em concentrações tão altas.

Pela análise da Figura 29, observa-se que mesmo sem utilizar a concentração de 50 μM, os dados podem ser apenas parcialmente separados. Observa-se uma boa separação para os HTs T3 e T4, que se localizam em *clusters* separados dos outros dados, como evidenciado nesta figura. Contudo, para TRIAC e GC-1, não houve boa separação. Ou seja, quando os dados referentes ao análogo sintético GC-1 são plotados no mesmo gráfico, ocorre pouca diferenciação entre este e os dados oriundos do hormônio TRIAC. Este é um resultado positivo acerca da interação de TRβ1 com os hormônios T3 e T4, afinal estes são os dois metabólitos naturais de maior interesse neste trabalho, pois variações nos níveis normais destes dois HTs podem acarretar sérias disfunções no organismo humano.

Esta tendência pode ser observada também à frequência de 1 KHz, conforme ilustra a Figura 30. Porém, neste caso, houve maior embaralhamento de dados, não sendo observada separação entre o T4, TRIAC e GC-1. Apenas o hormônio T3 apresentou ótima distinção entre os demais ligantes, reforçando sua característica de separação para este sistema.

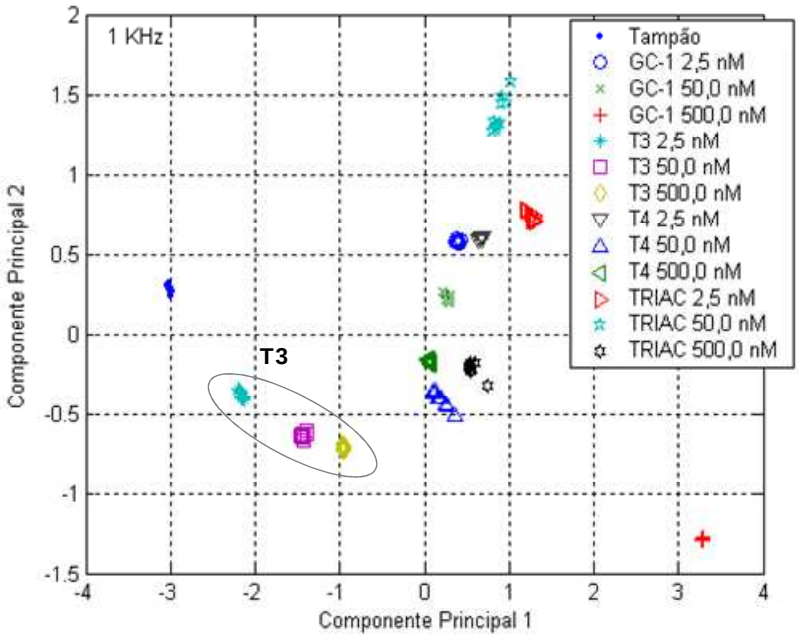

Figura 30. Gráficos de PCA obtidos a 1 KHz a partir dos valores de capacitância e nas concentrações de 2,5 nM, 50,0 nM e 500,0 nM para GC-1, T3, T4 e TRIAC. Tratamento obtido pelo software MatLab®.

Vale ressaltar, de acordo com a Figura 30, que os dados referentes aos ligantes T4, TRIAC e GC-1 estão situados à direita do gráfico, em contraste com o T3 que em geral mostra-se à esquerda dos gráficos de PCA, no quadrante inferior. De acordo com os eixos expostos destes gráficos de PCA, a localização dos dados em relação aos quadrantes também pode ser analisada. A posição dos dados nos gráficos de PCA também pode ser importante. Por exemplo, a posição de T3 é a mais definida, cujos dados estão localizados sempre no quadrante esquerdo, para todos os gráficos de PCA avaliados.

Considerando a pouca eficiência na separação entre os HTs e análogos, como mostrado acima, as análises foram refeitas, na ausência do análogo sintético GC-1. Esta decisão foi baseada no fato de que este análogo não é presente em fluidos biológicos e não comprometerá o biossensoriamento de amostras reais. De acordo com o exposto anteriormente para a concentração de 50 µM, foram obtidos gráficos de PCA a partir dos dados de capacitância dos três eletrodos, nas concentrações de 2,5 nM, 50,0 nM e 500,0 nM, para os HTs T3, T4 e o análogo TRIAC. Nesse caso, foram adicionados também os dados referentes à solução-tampão. Os gráficos foram obtidos a 100 Hz e 1 KHz, como mostrados nas Figuras 31 e 32.

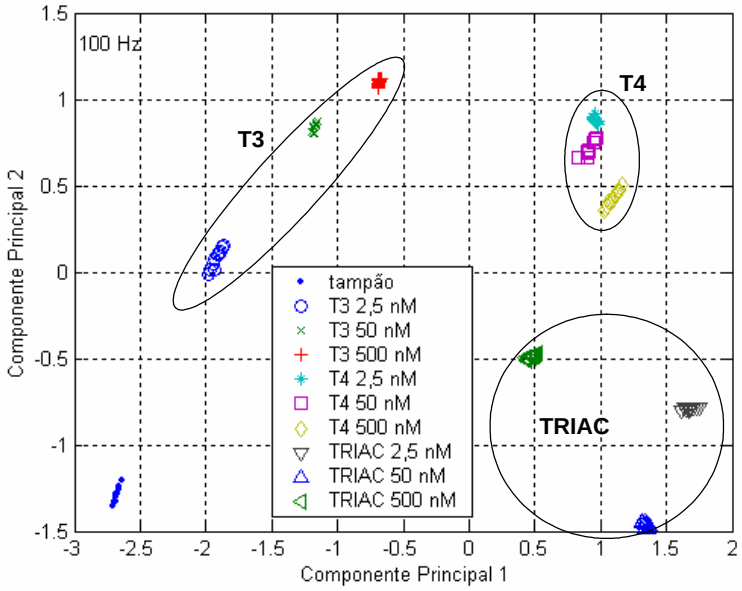

Figura 31. Gráficos de PCA obtidos a 100 Hz a partir dos valores de capacitância e nas concentrações de 2,5 nM, 50,0 nM e 500,0 nM para T3, T4 e TRIAC. Tratamento obtido pelo software MatLab®.

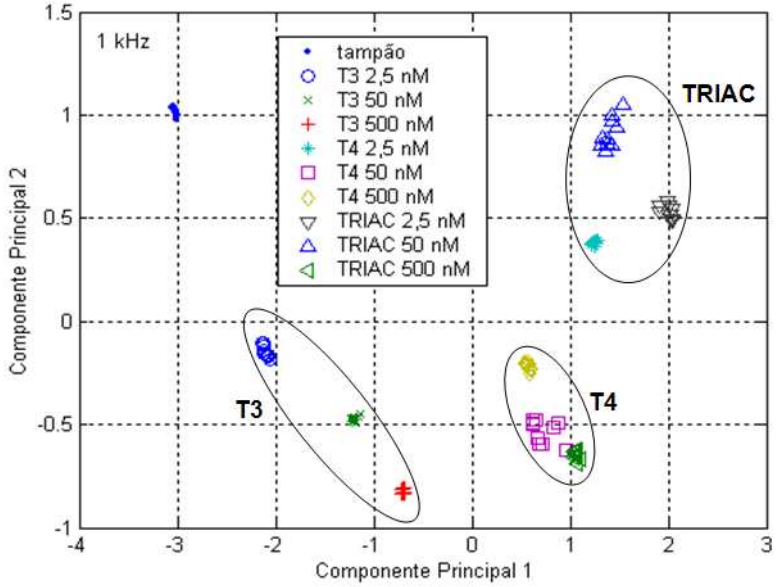

Figura 32. Gráficos de PCA obtidos a 1 KHz a partir dos valores de capacitância e nas concentrações de 2,5 nM, 50,0 nM e 500,0 nM para T3, T4 e TRIAC. Tratamento obtido pelo software MatLab®.

Torna-se possível observar nas Figuras 31 e 32 uma separação bastante satisfatória entre os HTs T3, T4 e TRIAC à concentrações nanomolares, tanto a 100 Hz, quanto a 1 KHz. Nota-se ainda que a separação entre as diferentes concentrações para um dado HT é melhor visualizada nos gráficos a 100 Hz. Outro fator importante a considerar é a maior separação dos dados, tanto em 100 Hz, quanto a 1 KHz, para o hormônio T3. Esse fato pode ser explicado pela alta afinidade desse hormônio pela camada receptora imobilizada no eletrodo biossensor (TRβ1-LBD). Os dados nestas figuras mostram também que o sistema é sensível à solução-tampão, cujos dados localizaram-se sempre afastados dos sinais dos hormônios, mesmo em concentrações muito baixas como as utilizadas aqui.

De maneira geral, a separação dos dados referentes aos diversos HTs deve-se ao fato desses hormônios interagirem com diferentes intensidades com o receptor, resultando em variações das propriedades dielétricas da camada receptora, o que altera o sinal da capacitância. Em ambos os gráficos a 100 Hz e 1 KHz, os dados referentes aos hormônios T4 e TRIAC permaneceram localizados à direita. Para o hormônio T3, no entanto, os dados são localizados à esquerda. A localização destes dados, representada nestes gráficos bidimensionais, está intimamente relacionada à natureza e magnitude das interações dos HTs com a superfície dos eletrodos. Nota-se que mesmo para diferentes concentrações, cada

analito manteve-se agrupado dentro de seu *cluster*. É importante observar também a localização dos pontos referentes à solução-tampão. Em nenhum momento estes dados cruzaram com os dos hormônios, mesmo estes sendo diluídos em solução de mesma natureza.

Em uma concentração definida de 50,0 nM (próxima à encontrada em amostras fisiológicas), o sistema de detecção apresentou uma ótima separação, com todos os hormônios bastante separados no gráfico de PCA, como mostrado na Figura 33, para as frequências de 100 Hz e 1 KHz. Ressalta-se que, neste caso, foram considerados inclusive os dados referentes ao GC-1, e mesmo assim o sistema foi capaz de separar e diferenciar entre os HTs.

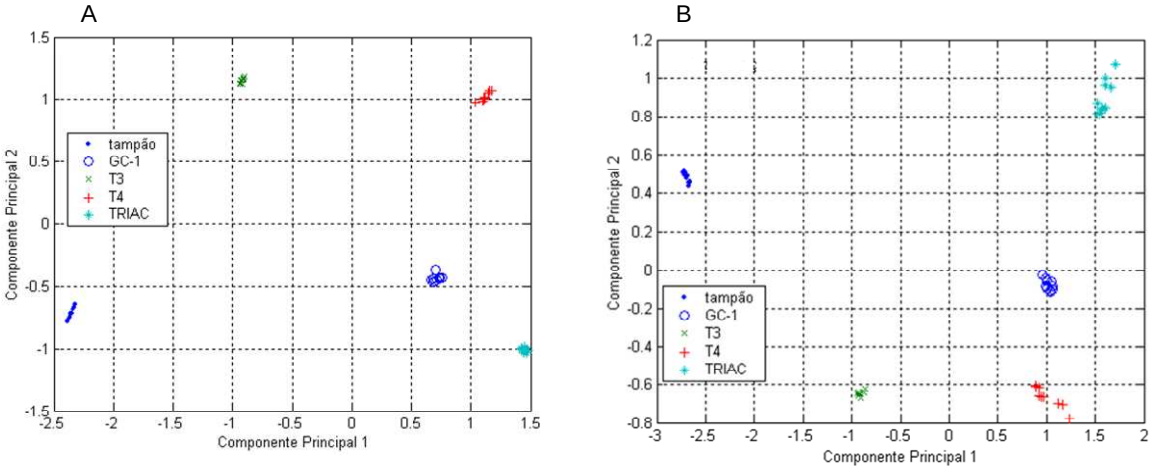

Figura 33. Gráficos de PCA obtidos para a concentração definida de 50,0 nM de GC-1, T3, T4 e TRIAC a frequências de (A) 100 Hz e (B) 1 KHz. Tratamento obtido pelo software MatLab®.

O uso de um intervalo ou valor de concentração definido torna possível a avaliação tanto dos HTs quanto de seus análogos. Este fato está completamente relacionado à afinidade destas moléculas pelo receptor TRβ1, pois estando à mesma concentração estas moléculas irão interagir com TRβ1 de acordo com sua natureza estrutural. Como reportado na literatura[3,61], e discutido anteriormente, a afinidade dos hormônios e análogos pelo receptor é específica para cada espécie, logo, os valores de capacitância obtidos serão diferentes. Deste modo, os dados de capacitância com pouca variação entre si formaram grupamentos que, por sua vez, diferenciaram-se de acordo com a natureza da amostra analisada. Estes resultados são bastante atraentes para a distinção em uma concentração definida de solução ou,

possivelmente, a uma faixa próxima de concentração. Desta forma, um estudo quali e/ou quantitativo pode ser desenvolvido acerca da detecção dos diferentes hormônios e análogos. Novamente, o hormônio T3 aparece sempre na parte esquerda dos gráficos de PCA.

De maneira geral, é mostrada a utilização da técnica de espectroscopia de impedância, mais especificamente, do sinal da capacitância dos eletrodos, a qual é vantajosa e pode ser aplicada com grande eficiência à detecção e separação dos HTs e análogos sintéticos, em concentrações extremamente baixas. Essa capacidade de distinção baseada nas medidas de capacitância é amplificada com o uso das análises por PCA.

6 CONCLUSÕES

O maior desafio para o presente trabalho foi o desenvolvimento de um biossensor capacitivo para a detecção de hormônios tireoidianos e análogos sintéticos, o que é inédito na literatura, na área de biossensores e diagnóstico molecular. Para isso foi utilizado uma arquitetura de filmes ultrafinos contendo um receptor nuclear TRβ1-LBD imobilizado sobre eletrodos interdigitados. Essa nova arquitetura de imobilização utilizou SAMs de silano e tiol, e o processo foi investigado passo a passo utilizando-se diferentes técnicas espectroscópicas e morfológicas.

A etapa de deposição das SAMs foi confirmada através de medidas de voltametria, na qual foi observada a diminuição significativa da corrente de oxidação de uma espécie redox pelo eletrodo de ouro, após a deposição das SAMs, indicando o bloqueio, ao menos parcial, da superfície. Posteriormente, a etapa de imobilização do TRβ1-LBD foi comprovada por meio de espectroscopia de FTIR e pela análise morfológica de AFM. Estas duas técnicas confirmaram também a presença dos HTs e dos análogos sobre a camada de TRβ1-LBD imobilizada.

O sistema de biossensoriamento foi desenvolvido com base nas ligações específicas dos HTs e de análagos pelo seu receptor TRβ1-LBD, imobilizado em um eletrodo interdigitado contendo trilhas de ouro, o qual pôde avaliar a sua capacidade de ligação por detecção direta. Foram analisadas as variações da capacitância dos três tipos de eletrodos utilizados (limpo, “silatiol” e biossensor) quando imersos em diferentes concentrações dos HTs e dos análogos sintéticos. Para melhor visualização, os dados referentes às medidas de capacitância dos eletrodos, a frequências definidas, foram estatisticamente correlacionados utilizando-se análise por PCA. Como resultados, foram gerados gráficos bidimensionais que possibilitaram identificar e separar entre os diferentes HTs utilizados a concentrações muito baixas, próximas a 2,5 nM. Esses resultados confirmaram a habilidade dos sistemas aqui desenvolvidos de detecção e distinção dos diferentes HTs.

O sistema de detecção desenvolvido neste trabalho é um recurso potencialmente útil para o biossensoreamento de diversos HTs, e pode encontrar aplicações em tratamentos clínicos que envolvem distúrbios nos níveis hormonais tireoidianos. Além disso, poderá servir de ferramenta para outros sistemas de reconhecimento biológico, diagnósticos clínicos e até mesmo descoberta de novas drogas.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Possíveis alternativas podem ser ainda exploradas para o melhoramento e continuação do desenvolvimento do biossensor para detecção de hormônios tireoidianos e análogos sintéticos, como a seguir:

- O uso de um método mais brando para o procedimento de silanização.
- Realização de um estudo detalhado acerca da imobilização das biomoléculas, utilizando-se técnicas mais sofisticadas e sensíveis, como elipsometria ou XPS.
- Utilização de novas ferramentas para correlação dos dados de capacitância e visualização dos dados, utilizando-se a faixa completa de frequências.
- Utilização do mesmo princípio de detecção para outros sistemas receptor-ligante.

REFERÊNCIAS[‡]

1. VO-DIHN, T.; CULLUM, B. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 366, n. 6-7, p. 540-551, 2000.

2. SCHELLER, F.; SCHUBERT, F. **Biosensors –** technique and instrumentation in analytical chemistry. New York: Elsevier Science Publishing Company Inc., 1992.

3. BARRA, G. B.; VELASCO, L. F. R.; PESSANHA, R. P.; CAMPOS, A. M.; DIAS, S. M. G.; POLIKARPOV, I.; RIBEIRO, R. C. J.; SIMEONI, L. A.; NEVES, F. A. R. Mecanismo molecular da ação do hormônio tireoidiano. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, n. 1, p. 25-39, 2004.

4. APRILETTI, J. W.; RIBEIRO, R. C. J.; WAGNER, R. L.; FENG, W.; WEBB, P.; KUSHNER, P. J.; WEST, B. L.; NILSSON, S.; SCANLAN, T. S.; FLETTERICK, R. J.; BAXTER, J. D. Molecular and structural biology of thyroid hormone receptors. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 25, n. S1, p. S2-S11, 1998.

5. STAFFORD, J. E.; LEES, S.; WATSON, D. Serum triiodothyronine determination in clinical use. **Journal of Clinical Pathology**, v. 29, n. 7, p. 642-647, 1976.

6. MIDGLEY, J. E. M. Direct and indirect free thyroxine assay methods: theory and practice. **Clinical Chemistry**, v. 47, n. 8, p. 1.353-1.363, 2001.

7. WANG, G.; YUAN, J.; HAI, X.; MATSUMOTO, K. Homogenous time-resolved fluoroimmunoassay of 3,5,3’-triiodo-L-thyronine in human serum by using europium fluorescence energy transfer. **Talanta**, v. 70, n. 1, p. 133-138, 2006.

8. STEFAN, R-I; VAN STADEN, J. F.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Simultaneous determination of L-thyroxine (L-T4), d-thyroxine (D-T4), and L-triiodothyronine (L-T3) using a sensors/sequential injection analysis system. **Talanta**, v. 64, n. 1, p. 151-155, 2004.

9. VELIKY, I. A.; MCLEAN, R. J. C. **Immobilized biosystems** – theory and practical applications. New York: Blackie Academic & Professional, 1994.

10. IUPAC – INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Disponível em: ‹http://www.iupac.org›. Acesso em: 13 out. 2009.

[‡] De acordo com a Associação de Normas Técnicas. NBR 6023.

11. ZIEGLER, C.; GOPEL, W. Biosensor development. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 2, n. 5, p. 585-591, 1998.

12. EDELMAN, P. G.; WANG, J. **Biosensors and chemical sensors**: optimizing performance through polymeric materials. Washington, DC: American Chemical Society, 1992.

13. NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger -** principles of biochemistry. 4ed. New York: Sarvier, 2005. p. 696-700, 846-879.

14. DAVIS, J.; VAUGHAN, D. H.; CARDOSI, M. F. Elements of biosensor construction. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 12, p. 1030-1035, 1995.

15. LIN, Y.; LU, F.; TU, Y.; REN, Z. Glucose biosensors based on carbon nanotube nanoelectrode ensembles. **Nano Letters**, v. 4, n. 2, p. 191-195, 2004.

16. DONG, W.; DONG, C.; SHUANG, S.; CHOI, M. M. F. Near-infrared luminescence quenching method for the detection of phenolic compounds using n-acetyl-l-cysteine-protected gold nanoparticles-tyrosinase hybrid material. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 5, p. 1043-1048, 2010.

17. OMOLE, M. A.; NOAH, N.; ZHOU, L.; ALMALETTI, A.; SADIK, O. A.; ASEMOTA, H. N.; WILLIAM, E. S.; GILCHRIST, J. Spectroelectrochemical characterization of pain biomarkers. **Analytical Biochemistry**, v. 395, n. 1, p. 54-60, 2009.

18. SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química orgânica 2**. 7ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002.

19. ROGERS, K. R.; MULCHANDANI, A. **Affinity biosensors**: techniques and protocols. v. 7. New Jersey: Humana Press, 1998.

20. MOVILEANU, L.; HOWORKA, S.; BRAHA, O.; BAYLEY, H. Detecting protein analytes that modulate transmembrane movement of a polymer chain within a single protein pore. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 10, p. 1091-1095, 2000.

21. PHILLIPS, K. S.; CHENG, Q. Microfluidic immonoassay for bacterial toxins with supportes phospholipid bilayer membranes on poly(dimethysiloxane). **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 1, p. 327-334, 2005.

22. ZHOU, H.; LIU, N.; GAO, Z.; WANG, H.; FANG, Y. A novel one-step method to incorporate ss DNA into bilayer lipid membranes supported on an agar electrode. **Electrochemistry Communications**, v. 10, n. 5, p. 787-790, 2008.

23. VÄLIMAA, A-L.; KIVISTÖ, A. T.; LESKINEN, P.I.; KARP, M. T. A novel biosensor for the detection of zearalenone family mycotoxins in milk. **Journal of Microbiological Methods**, v. 80, n. 1, p. 44-48, 2010.

24. EL-SAYED, I. H.; HUANG, X.; EL-SAYED, M. A. Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: applications in oral cancer. **Nano Letters**, v. 5, n. 5, p. 829-834, 2005.

25. SOLANKI, P. R.; DHAND, C.; KAUSCHIK, A.; ANSARI, A. A.; SOOD, K. N.; MALHOTRA, B. D. Nanostructured cerium oxide filme for triglyceride sensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 141, n. 2, p. 551-556, 2009.

26. YANG, Y.; LONG, Y.; LI, Z.; LI. N.; LI, K.; LIU F. Real-time molecular recognition between protein and photosensitizer of photodynamic therapy by quartz crystal microbalance sensor. **Analytical Biochemistry**, v. 392, n. 1, p. 22-27, 2009.

27. QUERSHI, A.; GURBUZ, Y.; KANG, W. P.; DAVIDSON, J. L. A Novel interdigitated capacitor based biosensor for detection of cardiovascular risk marker. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 4, p. 877-882, 2009.

28. TEKER, K. Bioconjugated carbon nanotubes for targeting cancer biomarkers. **Materials Science Engineering: B**, v. 153, n. 1-3, p. 83-87, 2008.

29. HOMOLA, J.; YEE, S. S.; GAUGLITZ, G. Surface plasmon resonance sensors: review. **Sensors and Actuators B**, v. 54, n. 1-2, p. 3-15, 1999.

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

31. GREEN, R. J.; FRAZIER, R. A.; SHAKESHEFF, K. M.; DAVIES, M. C.; ROBERTS, C. J.; TENDLER, S. J. B. Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. **Biomaterials**, v. 21, n. 18, p. 1823-1835, 2000.

32. FERREIRA, R. Q.; AVACA, L. A. Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante de sucos de frutas industrializados usando o CRAC *assay*. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2169-2173, 2008.

33. RODAHL, M.; KASEMO, B. On the measurement of thin liquid overlayers with the quartz-crystal microbalance. **Sensors and Actuators A**, v. 54, n. 1-3, p. 448-456, 1996.

34. BABA, A.; KANEKO, F.; ADVINCULA, R. C. Polyelectrolyte adsorption process characterized in situ using the quartz crystal microbalance technique: alternate adsorption properties in ultrathin polymer films. **Colloids and Surfaces A:** physicochemical and engineering aspects, v. 173, n. 1-3, p. 39-49, 2000.

35. CARUSO, F.; RINIA, H. A.; FURLONG, D. N. Gravimetric monitoring of nonionic surfactant adsorption from nonaqueous media onto quartz crystal microbalance electrodes and colloidal silica. **Langmuir**, v. 12, n. 9, p. 2145-2152, 1996.

36. SCHEPER, T.; BRANDES, W.; GRAU, C.; HUNDECK, H. G.; REINHARDT, B.; RUTHER, F.; PLOTZ, F.; SCHELP, C.; SCHUGERL, C.; SCHNEIDER, K. H.; GIFFHORN, F.; REHR, B. SAHM, H. Applications of biosensor systems for bioprocess monitoring. **Analytica Chimica Acta**, v. 249, n. 1, p. 25-34, 1991.

37. BERGGREN, B.; BJARNASON, B.; JOHANSON, G. Capacitive biosensors. **Electroanalysis**, v. 13, n. 3, p. 173-180, 2001.

38. YANG, L. Electrical impedance spectroscopy for detection of bacterial cells in suspensions using interdigitated microelectrodes. **Talanta**, v. 74, n. 5, p. 1621-1629, 2008.

39. BAYOUDH, S; OTHMANE, A.; PONSONNET, L.; OUADA, H. B. Electrical detection and characterization of bacterial adhesion using electrochemical impedance spectroscopy – based flow chamber. **Colloids and Surfaces A:** physicochemical and engineering aspects, v. 318, n. 1-3, p. 291-300, 2008.

40. LVOV, Y.; MÖHWALD, H. **Protein architecture**. New York: Dekker, 2002.

41. DECHER, G.; HONG, J. D.; SCHIMDT, J. Buidup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. **Thin Solid Films**, v. 210-211, n. 2, p. 831-835, 1992.

42. LVOV, Y.; ARIGA, K.; ICHINOSE, I.; KUNITAKE, T. Molecular film assembly via layer-by-layer adsorption of oppositely charged macromolecules (linear polymer, protein and clay) and concanavalin A and glycogen. **Thin Solid Films**, v. 284-285, p. 797-801, 1996.

43. HUANG, T.T.; STURGIS, J.; GOMEZ, R.; GENG, T.; BASHIR, R.; BHUNIA, A. K.; ROBINSON, J. P.; LADISCH, M. R. Composite surface for blocking bacterial adsorption on protein biochips. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, p. n. 5, 618-624, 2003.

44. MOONEY, J.F.; HUNT, A. J.; MCINTOSH, L.R.; LIBERKO, C.A.; WALBA, D.M.; ROGERS, C. T. Patterning of functional antibodies and other proteins by photolithography of silane monolayers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 22, p. 12287-12291, 1996.

45. PORTER, M. D.; BRIGHT, T. B.; ALLARA, D. L.; CHIDSEY, C. E. D. Spontaneously organized molecular assemblies. 4. Structural characterization of *n*-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared spectroscopy, and electrochemistry. **Journal of the American Chemical Society**, v. 109, n. 12, p. 3559-3573, 1987.

46. MOTESHAREI, K.; MYLES, D. C. Molecular recognition on functionalized self-assembled monolayers of alkanethiols on gold. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 29, p. 7328-7336, 1998.

47. DE QUEIROZ, A. A. A. Surface studies of albumin immobilized onto pe and PVC films. **Journal of the Biomaterials Science Polymer**, v. 8, n. 9, p. 667-681, 1997.

48. ULMAN, A. Formation and structure of self-assembled monolayers. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 4, p. 1533-1554, 1996.

49. SCHLENOFF, J. B.; LI, M.; LY, H. Stability and self-exchange in alkanethiol monolayers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 50, p. 12528-12536, 1995.

50. LOVE, J. C.; ESTROFF, L. A.; KRIEBEL, J. K.; NUZZO, R. G.; WHITESIDES, G. M. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 4, p. 1103-1169, 2005.

51. CANCINO, J. C. **Eletrodos modificados com monocamadas auto-organizadas de tióis**: uma abordagem sobre a transferência eletrônica. 2008. 109 p. Dissertação (Mestrado), Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

52. CHAPMAN-SMITH, A.; CRONAN JR., J. E. The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptiol specificity. **Trends in Biochemical Science**, v. 24, n. 9, p. 359-363, 1999.

53. PARK, S. H.; KRULL, U. A Spatially resolved nucleic acid biochip based on a gradient of density of immobilized probe oligonucleotide. **Analytica Chimica Acta**, v. 564, n. 2, p. 133-140, 2006.

54. FIGUEIRA, A. C. M. **Oligomerização**, **estruturas à baixa resolução, ligação DNA e ao ligante dos receptores de hormônios tireoidianos**. 2008. 190 p. Tese (Doutorado em Ciências), Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

55. ROBINSON-RECHAVI, M.; GARCIA, H. E.; LAUDET, V. The nuclear receptor superfamily. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 4, p. 585-586, 2003.

56. DIAS, S. M. G. **Estudos estruturais dos receptores nucleares humanos dos hormônios tireoidianos isoforma β1 (hTR β1) e do ácido retinóico 9-*cis* isoforma α (hRXRα)**. 2004. 275 p. Tese (Doutorado em Ciências), Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

57. YEN, P. M. Physiological and molecular basis of thyroid hormones action. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 3, p. 1097-1142, 2001.

58. LAUDET, V.; GRONEMEYER, H. **The nuclear receptors facts book**. 2ed. London: Academic Press, 1009.

59. TAKEDA, T.; SUZUKI, S.; LIU, R-T.; DEGROOT, L. J. Triiodothyroacetic acid has unique potencial for therapy of resistance to thyroid hormone. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabology**, v. 80, n. 7, p. 2033-2040, 1995.

60. BRENTA, G.; SCHNITMAN, M,; FRETES, O.; FACCO, E.; GURFINKEL, M.; DAMILANO, S.; PACENZA, N.; BLANCO, A.; GONZALEZ, E.; PISAREV, M. A. Comparative efficacy and side effects of the treatment of euthyroid goiter with levo-thyroxine or triiodothyroacetic acid. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabology**, v. 88, n. 11, p. 5287-5292, 2003.

61. YAZDANPARAST, P.; CARLSSON, B.; OIKARINEN, A.; RISTELI, J.; LAVIN, T.; FAERGEMANN, J. Action of topical thyroid hormone analogue, triiodothyroacetic acid in reversing glucocorticoid-induced skin atrophy in humans. **Thyroid**, v. 16, n 11, p. 1157-1162, 2006.

62. ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em: ‹http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/validados/tb_ntvisa.htm›. Acesso em: 13 fev. 2010.

63. FREITAS, F. R. S.; CAPELO, L. P.; O'SHEA, P. J.; JORGETTI, V.; MORISCOT, A. S.; SCANLAN, T. S.; WILLIAMS, G. R.; ZORN, T. M. T.; GOUVEIA, C. H. A. The thyroid receptor β-specific agonist GC-1 selectively affects the bone development of hypothyroid rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 20, n. 2, p. 295-304, 2005.

64. BRENTA, G.; DANZI, S.; KLEIN, I. Potential therapeutic applications of thyroids hormone analogs. **Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism**, v. 3, n. 9, p. 632-640, 2007.

65. RADIOIMUNOENSAIOS. Disponível em: ‹http://www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/LinkAula/MyFiles/radioimunoensaios.htm›. Acesso em 13 fev. 2010.

66. BAYDAS, B.; MERAL, I. Effects of melatonin on lipid peroxidation and ati-oxidant enzyme activity in rats with experimentally induced hyperthyroidism. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 32, n. 7, p. 541-544, 2005.

67. WAGNER, M. S.; WAJNER, S. M.; DORA, J. M.; MAIA, A. L. Regulation of *Dio*2gene expression by thyroid hormones in normal and type 1 deiodinase-deficient C3H mice. **Journal of Endocrinology**, v. 193, n. 3, p. 435-444, 2007.

68. RODINI, D. C.; FELIPPE, C. G.; OLIVEIRA, C. A. Measurement of thyroid hormones (thyroxine, T4; triiodothyronine, T3) in captive nondomestic felids. **Journal of Zoo Wildlife Medicine**, v. 38, n. 1, p. 125-126, 2007.

69. KESSLER, D.; ROTH, P. J.; THEATO, P. Reactive surface coating based on polysilsesquioxanes: controlled functionalization for specific protein immobilization. **Langmuir**, v. 25, n. 17, p. 10068-10076, 2009.

70. WU, F.; HAN, S.Q.; XU, T.; HE, Y. F. Sensitive time-resolved fluoroimmunoassay for simultaneous detection of serum thyroid-stimulating hormone and total thyroxin with Eu and Sm as labels. **Analytical Biochemistry**, v. 314, n. 1, p. 87-96, 2003.

71. MAYILO, S.; KLOSTER, M. A.; WUNDERLICH, M.; LUTICH, A.; KLAR, T. A.; NICHTL, A.; KURZINGER, K.; STEFANI, F. D.; FELDMANN, J. Long-range fluorescence quenching by gold nanoparticles in a sandwich immunoassay for cardiac troponin T. **Nano Letters**, v. 9, n. 12, p. 4558-4563, 2009.

72. MURATA, M.; GOUDA, C.; YANO, K.; KUROKI, S.; SUZUTANI, T.; KATAYAMA, Y. Piezo electric sensor for endocrine-disrupting chemicals using receptor-co-factor interaction. **Analytical Sciences**, v. 19, n. 10, p. 1355-1357, 2003.

73. MURATA, M.; YANO, K.; KUROKI, S.; SUZUTANI, T.; KATAYAMA, Y. Protein-immobilized electrode for rapid and convenient sensing of thyroid hormone receptor-ligand interaction. **Analytical Sciences**, v. 19, n. 12, p. 1569-1573, 2003.

74. SAGIV, J. Organized monolayers by adsorption. 1. Formation and structure of oleophobic mixed monolayers on solid surfaces. **Journal of the American Chemical Society**, v. 102, n. 1, p. 92-98, 1980.

75. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

76. PAVIA, D. J.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introducton to spectroscopy**. 3ed. EUA: Brooks/Cole, 2001.

77. BARTH, A.; ZSCHERP, C. What vibrations tell us about proteins. **Quarterly Review of Biophysics**, v. 35, n. 4, p. 369-430, 2002.

78. COLTHUP, N. B.; DALY, L. H.; WIBERLEY, S. E. **Introduction to infrared and raman spectroscopy**. 3ed. San Diego: Academic Press, 1990.

79. MORENO, M.; LANGE, P.; LOMBARDI, A.; SILVESTRI, E.; LANNI, A.; GOGLIA, F. Thyroid economy-regulation, cell biology, thyroid hormone metabolism and action: the especial edition: metabolic effects of thyroid hormones derivates. **Thyroid**, v. 18, n. 2, p. 239-253, 2008.

80. WAGNER, R. L.; HUBER, B. R.; SHIAU, A. K.; KELLY, A.; LIMA, S. T. C.; SCANLAN, T. S.; APRILETTI, J. W.; BAXTER, J. D.; WEST, B. L.; FLETTERICK, R. J. Hormone selectivity in thyroid hormone receptors. **Molecular Endocrinology**. v. 15, n. 3, p. 398-410, 2001.

81. ADAMCZYK, M.; MOORE, J. A.; YU, Z. Application of surface plasmon resonance toward studies of low-molecular-weight antigen-antibody binding interactions. **Methods**, v. 20, n. 3, p. 319-328, 2000.

82. RICH, R. L.; MYSZKA, D. G. Survey of the year 2007 commecial optical biosensor literature. **Journal of Molecular Recognition**, v. 21, n. 6, p. 355-400, 2008.

83. WHEELER, S. E.; HOUK, K. N. Origin of substituent effects in edge-to-face aryl-aryl interactions. **Molecular Physics**, v. 107, n. 8-12, p. 749-760, 2009.

84. LEE, E. C.; KIM, D.; JURECKA, P.; TARAKESHWAR, P.; HOBZA, P.; KIM, K. S. Understanding of assembly phenomena by aromatic-aromatic interactions: benzene dimer and the substituted systems. **Journal of Physical Chemistry**, v. 111, n. 18, p. 3446-3457, 2007.

85. HUBER, B. R.; SANDLER, B.; WEST, B. L.; LIMA, S. T. C.; NGUYEN, H. T.; APRILETTI, J. W.; BAXTER, J. D.; FLETERRICK, R. J. Two resistance to thyroid hormone mutants with impaired hormone binding. **Molecular Endocrinology**, v. 17, n. 4, p. 643-652, 2003.

86. ZUCOLOTTO, V.; PINTO, A. P. A.; TUMOLO, T.; MORAES, M. L.; BAPTISTA, M. S.; RIUL JR, A.; ARAÚJO, A. P. U.; OLIBEIRA JR, O. N. Catechol biosensing using a nanostructured layer-by-layer film containing Cl-catechol 1,2-dioxygenase. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 7, p. 1320-1326, 2006.