

# **Universidade Federal de São Carlos**

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

“Desenvolvimento de imunossensores piezelétrico e eletroquímico para detecção de amostras de interesse agrônômico e de saúde”

André Santiago Afonso\*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências.

Orientador: Luiz H. C. Mattoso

Co-Orientador: Ronaldo Censi Faria

\*bolsista CNPq

**São Carlos - SP**

**2012**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

A257ad

Afonso, André Santiago.

Desenvolvimento de imunossensores piezelétrico e eletroquímico para detecção de amostras de interesse agrônômico e de saúde / André Santiago Afonso. -- São Carlos : UFSCar, 2012.

85 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Química analítica. 2. Microbalança de cristal de quartzo. 3. Camadas auto-organizadas. 4. Nanopartículas de ouro. 5. Partículas magnéticas. I. Título.

CDD: 543 (20<sup>a</sup>)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
*Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia*  
*Departamento de Química*  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**Curso de Doutorado**

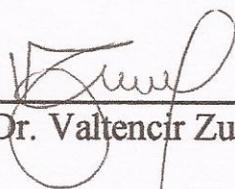
---

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de doutorado do candidato André Santiago Afonso, realizada em 23 de julho de 2012:*



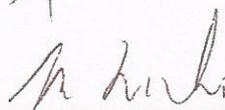
---

Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso



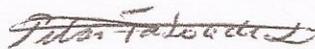
---

Prof. Dr. Valtencir Zucolotto



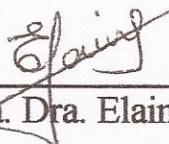
---

Prof. Dr. Marcelo Firmino de Oliveira



---

Profa. Dra. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor



---

Profa. Dra. Elaine Kikuti

## **Dedicatória**

*A minha esposa, Deyse, pelo amor e carinho. A minha querida irmã que sempre está disposta a me ouvir e dar conselhos. Aos meus pais, Joaquim e Sonia, pelo apoio, pelas palavras de incentivo e amor. Amo vocês!*

## **Agradecimentos**

*A Deus pela vida;*

*Exprimo meu profundo agradecimento ao professor Ronaldo Censi Faria do departamento de Química da UFSCar pela paciência, pelos conselhos e discussões que foram fundamentais para realização deste trabalho;*

*Ao professor Luiz H. C. Mattoso da Embrapa Instrumentação por me aceitar em seu grupo de pesquisa;*

*Ao professor Paulo Bueno da UNESP Araquara por disponibilizar seu laboratório para os experimentos com microbalança de cristal de quartzo;*

*Agradeço ao professor Arben Merkoçi do Instituto Catalão de Nanotecnologia Espanha por me aceitar em seu grupo de pesquisa e por todos os ensinamentos;*

*Ao professor Flávio Henrique Silva do Departamento de Genética e Evolução da UFSCar por fornecer as proteínas recombinantes;*

*Ao professor Osvaldo Novais Oliveira do IFSC USP por disponibilizar o PM-IRRAS para caracterização da superfície dos cristais de quartzo;*

*A Bianca e Adelita pela ajuda com os ensaios biológicos;*

*A amiga Briza Perez pelos conselhos e discussões relacionadas às nanopartículas de ouro e partículas magnéticas;*

*Aos amigos, Ailton, Mariele e Naira pelas discussões sobre microbalança e imobilização de biomoléculas;*

*Ao Conselho Nacional de desenvolvimento científico e tecnológico pela bolsa;*

*A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho muito obrigado.*

# Sumário

Introdução.....	1
1.Introdução.....	2
1.1 Apresentação.....	2
1.2 Imunoensaios.....	5
1.3 Imunossensores Piezelétricos.....	8
1.3.1 Alcanotióis na construção de imunoensensores baseados em QCM.....	14
1.3.2 Formato dos imunoensensores baseados em QCM.....	18
1.3.3 Revisão bibliográfica sobre imunossensores baseados em QCM.....	21
1.4 Imunoensensores eletroquímicos.....	25
1.4.1 AuNPs como marcadores redox em imunoensensores eletroquímicos e partículas magnéticas (MBs).....	27
1.4.2 Revisão bibliográfica de imunossensores eletroquímicos baseados em AuNPs e MBs. ....	31
1.5 Objetivos.....	38
Procedimento Experimental.....	39
2. Procedimento Experimental.....	40
2.1 Instrumentação.....	40
2.2 Materiais e Métodos.....	41
2.2.1 Limpeza dos Cristais.....	42
2.2.2 Proteína recombinante e anticorpo policlonal.....	42
2.2.3 Cepas bacterianas, preparação de inóculos.....	43
2.2.4 Síntese de nanopartículas de ouro (AuNPs).....	44
2.2.5 Avaliação de AuNPs por MET.....	44

2.2.6 Imobilização de anti-CPXaC sobre os cristais de quartzo .....	45
2.2.7 Conjugação de anticorpos anti-Salmonela secundário com AuNPs .....	46
2.2.8 Preparação das amostras MBs-SAc e MBs-SAc / S para MEV .....	46
2.2.9 Imunossensor piezelétrico .....	46
2.2.10 Magneto-imunoensaio .....	47
2.2.11 Medidas de QCM e eletroquímicas.....	47
Resultados e Discussão .....	49
3. Resultados e Discussão .....	50
3.1 Imunossensor Piezelétrico .....	50
3.1.1 Imobilização do anticorpo anti-CPXaC sobre o cristal de quartzo .....	50
3.1.2 Caracterização do imunossensor .....	54
3.1.3 Desenvolvimento do imunossensor .....	58
3.1.4 Constantes de equilíbrio e de velocidade de reação imunológica entre CPXaC e anti-CPXaC .....	60
3.1.5 Estudos de especificidade do imunossensor .....	63
3.2 Magneto imunoensaio eletroquímico.....	65
3.2.1 Princípio da detecção eletroquímica .....	65
3.2.2 Caracterização por MET de AuNPs e amostras MBs-SAc e MBs-SAc/S.....	66
3.2.3 Otimizações dos parâmetros do imunossensor .....	66
3.2.4 Resposta do Imunossensor para Salmonela .....	68
3.2.5 Estudo de especificidade para o imunossensor.....	72
3.2.6 Análise de Salmonela em amostras de leite .....	73
Conclusões .....	75

4. Conclusões .....	76
5. Referências.....	78

# Lista de Tabelas

<b>Tabela 3.1:</b> Valores de $\Delta D/\Delta f$ para interação antígeno anticorpo sobre diferentes camadas de imobilização. ....	53
<b>Tabela 3.2:</b> Ângulo de contato, $\Theta_c$ , da superfície de ouro do cristal de quartzo (Au), Au modificado com MUA (Au/MUA) e Au/MUA modificado com anti-CPXaC .....	56
<b>Tabela 3.3:</b> Média dos valores de $\Delta D$ da interação de CPXaC com anti-CPXaC após a lavagem da superfície com tampão PBS pH 7.2 na célula da QCM. ....	59
<b>Tabela 3.4:</b> Constantes cinéticas e de equilíbrio obtidas a partir das medições feitas em QCM-D para o analito CPXaC.....	63
<b>Tabela 3.5:</b> Diferentes estratégias utilizadas para detectar <i>Salmonella</i> .	69
<b>Tabela 3.6:</b> Adição e recuperação a partir de leite diluído 1/10 em PBST infectado artificialmente com <i>Salmonella</i> .....	74

# Lista de Figuras

**Figura 1.1:** Estrutura cristalográfica de raio-X de um anticorpo IgG<sup>18</sup> (a); representação esquemática da estrutura de um anticorpo (b) Fab: fragmento de ligação de antígeno e Fc: fragmento constante..... 5

**Figura 1.2:** Formatos dos imunoenaios. (Parte superior) anticorpo imobilizado sobre o substrato: (A) ensaio direto competitivo usando antígeno marcado com enzima, (B) ensaio tipo sanduíche com o anticorpo marcado com enzima; (C) ensaio direto. (Parte inferior) Antígeno imobilizado sobre o suporte: (D) ensaio competitivo direto utilizando anticorpo primário marcado com enzima; (E) ensaio competitivo indireto utilizando um anticorpo secundário marcado com enzima. (F) ensaio direto. No caso de imunossensores electroquímicos o suporte é um eletrodo de trabalho enquanto que para SPR e QCM o suporte é um chip de ouro ou um cristal de quartzo, respectivamente. Para ensaios competitivos e sanduíche (A, B, D), a marcação não é usada para medições em SPR e QCM<sup>13</sup> ..... 8

**Figura 1.3:** Gráfico da dissipação de energia de oscilação do cristal de quartzo com depósito rígido e outro com depósito viscoelástico..... 12

**Figura 1.4:** Representação esquemática da formação de uma monocamada a partir de uma solução de alcanotióis<sup>38</sup> ..... 15

**Figura 1.5:** Mecanismo de reação proposto para a formação de uma amida entre ácido carboxílico e amina em solução aquosa na presença de EDC e NHS<sup>43</sup> ..... 17

**Figura 1.6:** Esquema do ensaio tipo deslocamento. O anticorpo imobilizado é deslocado da superfície e se liga especificamente ao antígeno livre em solução resultando em um aumento da frequência. .... 19

**Figura 1.7:** Esquema do ensaio com amplificação de massa. A) Ensaio competitivo B) Ensaio tipo sanduíche. .... 21

**Figura 1.8:** (A) Representação esquemática da estratégia de imobilização do anticorpo sobre a monocamada de cistamina. (B) Deslocamento de  $f$  e  $D$  em função do tempo após injeções de diferentes concentrações de *E. coli*. (C) Curva de calibração utilizando a inclinação de  $D$  como resposta analítica. (D) X representa a injeção de *Bacillus subtilis*, a qual possui uma resposta analítica menor do que a resposta do sensor frente a diferentes concentrações de *E. coli* em diferentes circunstâncias<sup>58</sup> ..... 22

**Figura 1.9:** (A) Representação esquemática da estratégia de imobilização do anticorpo anti-IgG. (B) Resposta analítica frente a uma concentração fixa de IgG sobre imunossensor construído sobre MUA/MHO (à esquerda) ou MUA/decanotiól (à direita). Passo 1: Formação da monocamada; Passo 2: imobilização da Proteína A; Passo 3 e 4 bloqueio e imobilização anti-IgG.<sup>44</sup> ..... 23

**Figura 1.10:** (A) Representação esquemática da estratégia de imobilização do anticorpo. (B) Resposta e curva analítica frente a diferentes concentrações do analíto. (C) AFM e MEV da superfície após a modificação com nanofios de ouro.<sup>63</sup> ..... 25

**Figura 1.11:** Representação esquemática do ensaio não competitivo tipo sanduíche utilizando AuNPs. (ASV) voltametria por redissolução anódica. (W) eletrodo de trabalho.<sup>77</sup> ..... 29

**Figura 1.12:** Protocolo eletroanalítico para detecção por voltametria de pulso diferencial de AuNPs sobre a superfície de um eletrodo. (OCP) potencial de circuito aberto e (VPD) voltametria de pulso diferencial.<sup>79</sup> ..... 31

**Figura 1.13:** (A) Representação esquemática do imunoensaio eletroquímico sobre a superfície do eletrodo. (B - C) Micrografia da superfície modificada com AuNPs em diferentes escalas.<sup>82</sup> ..... 32

**Figura 1.14:** Representação esquemática do arranjo de eletrodos e do imunoensaio. a) folha de nylon, b) tinta de prata c) eletrodo auxiliar de grafite d) eletrodo de referencia Ag/AgCl e) eletrodo de grafite f) isolante elétrico.<sup>83</sup> ..... 33

**Figura 1.15:** Representação esquemática do imunoensaio eletroquímico baseado no teste imunocromatográfico e AuNPs.<sup>84</sup> ..... 34

**Figura 1.16:** Representação esquemática do imunossensor e detecção amperométrica do alvo PSA. <sup>71</sup> ..... 35

**Figura 1.17:** Células tumorais linhagem HMy2 que expressam moléculas HLA-DR na superfície comparado com uma linhagem que é negativo para o marcador AuNPs- $\alpha$ DR. a célula alvo positivo, a' célula alvo negativo. <sup>74</sup> ..... 36

**Figura 1.18:** A) Representação esquemática do procedimento experimental realizado. HBsAg capturado na superfície das MBs, incubação com soro humano contendo anticorpos IgG  $\alpha$ -HBsAg e reconhecimento com AuNPs conjugado com anticorpos de cabra IgG  $\alpha$ - humano. B) Esquema do procedimento de detecção baseada nas propriedades eletrocatalíticas de geração de hidrogênio. C) Respostas amperométricas para diferentes concentrações do alvo e D) Curva analítica obtida a partir dos valores de corrente em C. <sup>75</sup> ..... 36

**Figura 3.1:** Esquema (fora de escala) do procedimento de imobilização: Im-1 O cristal de quartzo foi modificado com MUA, depois a ativação do grupo carboxila com EDC / NHS seguida da imobilização dos anticorpos policlonais anti-CPXaC via ligação amida. Desativação dos grupos ésteres remanescentes com etanolamina e bloqueio da superfície com leite desnatado. Im-2 O cristal de quartzo foi modificado com a mistura de MUA e MHO. As etapas que seguiram foram as mesmas em Im-1. Im-3 O cristal de quartzo foi modificado com cistamina, em sequência, uma alíquota de solução anti-CPXaC e EDC/NHS foi adicionada sobre a superfície. As próximas etapas foram de acordo com Im-1 e 2. Outras informações como descrito no texto. .. 51

**Figura 3.2:** Variação em tempo real  $\Delta f$ (A) e  $\Delta D$  (B) quando  $645 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> CPXaC foi adicionado dentro da célula da QCM-D (C)  $\Delta D$  vs  $\Delta f$  depois da adição de  $645 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> CPXaC obtidos de (A) e (B). O imunossensor piezelétrico foi construído usando três diferentes procedimentos de imobilização Im - 1 sobre MUA, Im - 2 sobre MUA/MHO e Im – 3 sobre Cist. . 52

**Figura 3.3:** Espectro PM-IRRAS na região de 2000 a 1200 cm<sup>-1</sup> a) superfície de ouro modificada com MUA b) superfície de ouro modificada com MUA e anti-CPXaC imobilizada via ligação amida. .... 55

<b>Figura 3.4:</b> Etapas da construção do imunossensor sobre MUA. Etapa 1: imobilização do anticorpo anti-CPXaC. Etapa 2: desativação dos ésteres succinimida. Etapa 3: bloqueio da superfície com leite desnatado. ....	57
<b>Figura 3.5:</b> Massa estimada das etapas de imobilização pelos modelos de Sauerbrey e Voigt.....	58
<b>Figura 3.6:</b> (A) Curvas em tempo real da variação da frequência de 0 a $645 \times 10^{-9}$ mol L <sup>-1</sup> de CPXaC (curvas 1-5) em fluxo contínuo de PBS pH 7,2. (B) Curva analítica do imunossensor para CPXaC. ....	59
<b>Figura 3.7:</b> Estudo da relação $\Delta D/\Delta f$ vs. concentração de CPXaC. ....	60
<b>Figura 3.8:</b> Estudo da relação $[CPXaC]/\Delta f$ versus $[CPXaC]$ (A) e $\tau^{-1}$ versus $[CPXaC]$ (B) para calcular as constantes de velocidade cinética e de equilíbrio, respectivamente.....	63
<b>Figura 3.9:</b> (A) Variação da frequência em tempo real quando (1 e 2) $320$ e $645 \times 10^{-9}$ mol L <sup>-1</sup> CPXaC foram adicionados na célula de fluxo com cristal modificado sem anti-CPXaC. (3) Adição de $320 \times 10^{-9}$ mol L <sup>-1</sup> CPXaC dentro da célula com o cristal modificado com anti-CPXaC. (B) 1 adição de $4,15 \times 10^{-6}$ mol L <sup>-1</sup> de canecistatina; 2 adição de $3,03 \times 10^{-6}$ mol L <sup>-1</sup> BSA e 3 adição de $320 \times 10^{-9}$ mol L <sup>-1</sup> de cisteino peptidase da <i>X. fastidiosa</i> sobre o cristal modificado com anti-CPXaC. ....	64
<b>Figura 3.10:</b> Representação esquemática (fora de escala) da detecção de <i>Salmonella</i> . (A) Princípio do ensaio. Na primeira etapa ocorre a incubação de <i>Salmonella</i> (S) com esferas magnéticas (MBs) modificados com anticorpos primários específicos para as bactérias (SAC) (MBS-SAC). Durante essa etapa, <i>Salmonella</i> é capturada e permanece no complexo MBs-SAC / S. Segunda etapa o complexo MBs-SAC / S é capturado por meio da aplicação de um campo magnético permanente e lavou-se em conformidade. Terceira etapa consiste na incubação do complexo MBs-SAC / S com nanopartículas de ouro (AuNPs) modificados com anticorpos secundários (SAC-AuNPs) e novamente recolhidos através da aplicação de um campo magnético permanente e lavou-se em conformidade. (B) Detecção electroquímica por DPV de MBs-SAC/S/SAC-AuNPs (etapa 5). Outras condições experimentais foram descritas no texto. ....	65

**Figura 3.11:** MET de AuNPs que foram sintetizadas seguindo o método reportado por De la Escosura-Muniz<sup>73</sup>. As Condições experimentais foram descritas no texto ..... 66

**Figura 3.12:** MEV de MBs-SAc: Antes (A) e após (B) a incubação com  $10^5$  de CFU mL<sup>-1</sup> *Salmonella*. Outras condições experimentais foram descritas no texto. .... 67

**Figura 3.13 :** Otimização do imunossensor com resuspenções de SAc-AuNPs em PBS; PBS + BSA a 1%; PBS + BSA a 0,3%; PBST; PBST + BSA a 1% ou PBST + BSA a 0,3%. Este ensaio foi realizado com tempos de incubação de 10 (A) e 30 (B) min. Influência da concentração de SAc-AuNPs diluídas em PBS com BSA a 0,3% na resposta do imunossensor (C). Para estes ensaios,  $10^5$  CFU mL<sup>-1</sup> de *Salmonella* foram utilizados. Outras condições experimentais foram descritas no texto..... 68

**Figura 3.14:** (A) Detecção eletroquímica por DPV utilizando AuNPs (1); imunoenensaio sem *Salmonella*, (2)  $10^2$ , (3)  $10^3$ , (4)  $10^4$ , (5)  $10^5$ , (6)  $10^7$  (7),  $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup> de bactérias. (B) Os resultados obtidos no intervalo entre  $10^2$  e  $10^7$  de *Salmonella* em PBST. Linha tracejada representa LOD baseado 3 vezes o desvio padrão (n = 5) do controle (A-1), mais média do controle. As barras de erro mostram o desvio padrão para n = 3. Outras condições experimentais foram descritas no texto. .... 72

**Figura 3.15:** Estudo de especificidade para imunoenensaio realizada em PBST e leite desnatado diluído, inoculados com *E. coli* ( $10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>) e uma mistura de *E. coli* e *Salmonella* (com  $10^7$  CFU mL<sup>-1</sup> de cada bactéria). As amostras de controle correspondem aos imunoenaios sem bactérias. Outras condições experimentais foram descritas no texto..... 73

# Lista de abreviaturas

<b><math>\Delta D</math></b>	Variação da dissipação de energia
<b><math>\Delta f</math></b>	Variação da frequência
<b>Ac</b>	Anticorpo
<b>Ac:Ag</b>	Complexo antígeno-anticorpo
<b>Ag</b>	Antígeno
<b>AuNPs</b>	Nanopartículas de Ouro
<b>BSA</b>	Albumina de soro bovino
<b>CFU</b>	Unidades formadoras de colônia (em inglês colony forming unit)
<b>Cist</b>	Cistamina
<b>CPXaC</b>	Cisteína peptidase secretada pela bactéria (ORF XAC2853)
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>E. coli</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>ELISA</b>	Do inglês Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>Im</b>	Imobilização
<b>LOD</b>	Limite de detecção
<b>MBs</b>	Micropartículas magnéticas
<b>MBs-SAc</b>	Micropartículas magnéticas modificadas com anticorpo policlonal primário anti- <i>Salmonella</i>
<b>MBs-SAc/S</b>	Complexo <i>Salmonella</i> e MBs-SAc
<b>MBs-SAc/S/SAc-AuNPs</b>	Complexo, MBs-SAc/S, marcado com com SAc-AuNPs
<b>MET</b>	Microscopia eletrônica de transmissão

<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura
<b>MHO</b>	6-mercaptop-1-hexanol
<b>MUA</b>	Ácido 11-mercaptoundecanóico
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>PBST</b>	Tampão fosfato salino com Tween
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase (em inglês Polymerase Chain Reaction)
<b>PM-IRRAS</b>	Espectroscopia de absorção e reflexão no infravermelho com polarização modulada
<b>S</b>	<i>Salmonella</i>
<b>SAC-AuNPs</b>	Nanopartículas de Ouro modificadas com anticorpo policlonal secundário anti- <i>Salmonella</i>

# Resumo

## DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSORES PIEZELÉTRICO E ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE AMOSTRAS DE INTERESSE AGRONÔMICO E DE SAÚDE

No presente trabalho estudou-se o desenvolvimento de imunossensores para aplicação em amostras de interesse agronômico e de saúde. Foram desenvolvidos um imunossensor piezométrico para cisteína peptidase (CPXaC), um potencial biomarcador para *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) causadora do Cancro cítrico, e um imunossensor eletroquímico baseado em nanopartículas de ouro como marcador e utilizando partículas magnéticas para separação e pré-concentração de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium LT2 (S). O imunossensor piezométrico foi baseado em três estratégias de imobilização do anticorpo policlonal anti-CPXaC, produzido em coelho, contra CPXaC sobre a superfície de ouro do cristal de quartzo. As superfícies de imobilização foram avaliadas monitorando a variação da frequência ressonante do cristal de quartzo ( $\Delta f$ ) e o valor da dissipação de energia ( $\Delta D$ ) em tempo real adicionando  $645 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  CPXaC. A melhor relação entre resposta analítica e dissipação de energia do imunossensor foi obtida com a imobilização do anticorpo sobre ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA), o qual apresentou um limite de detecção de  $13,0 \text{ nmol L}^{-1}$ , bem como valores de constante cinética e de equilíbrio para interação antígeno-anticorpo concordantes com os da literatura. Por fim, o imunossensor apresentou boa especificidade não apresentando resposta para diferentes proteínas estudadas, incluindo outra cisteína peptidase que é usada com alvo para detectar *Xylella fastidiosa*, bactéria responsável por outra importante doença de cítrus. A detecção de *Salmonella* utilizando um magneto-imunoensaio e nanopartículas de ouro (AuNPs) como marcador foi desenvolvido utilizando um eletrodo de carbono impresso (SPCE) que incorpora um ímã permanente. Amostras de leite desnatado fortificadas com *Salmonella* foram testadas usando partículas magnéticas modificadas com anti-Salmonella (MBs-SAc), para a fase de separação e pré-concentração, e marcadas posteriormente com nanopartículas de ouro (AuNPs) modificados com anticorpo secundário anti-salmonela (SAC-

AuNPs), o qual foi detectado usando voltametria de pulso diferencial (DPV). Um limite de detecção de 143 CFU mL<sup>-1</sup> e um intervalo linear 10<sup>3</sup>-10<sup>6</sup> CFU mL<sup>-1</sup> de *Salmonella*, com um coeficiente de variação de cerca de 2,4%, foram obtidos. As recuperações do sensor em leite desnatado foram de 83 e 94% para 1,5 x 10<sup>3</sup> e 1,5 x 10<sup>5</sup> CFU mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Este trabalho demonstrou com sucesso a possibilidade do uso de imunossensores piezelétricos para detectar CPXaC, bem como um imunossensor eletroquímico para detectar *Salmonella* em amostras de leite fortificadas.

# Abstract

## DEVELOPMENT OF PIEZOELECTRIC AND ELECTROCHEMICAL IMMUNOSENSORS TO DETECT SAMPLES OF AGRONOMIC INTEREST AND PUBLIC HEALTH

This work shows development of immunosensors for agronomic interest and public health. The first was a piezoelectric immunosensor to detect a cysteine peptidase, a potential biomarker for *Xanthomonas citri* subsp. *citri* that cause a citrus Canker. Another was electrochemical immunosensor based on gold nanoparticles as a label and magnetic beads as capture phase of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium LT2 (S). The piezoelectric immunoassay was based on immobilization of polyclonal antibody against CPXaC (anti-CPXaC), produced in rabbit, onto three different monolayers that modified gold quartz crystal, which were evaluated by monitoring frequency and energy dissipation in real time when  $64.5 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> of CPXaC was added. The better relation between analytical response and energy dissipation was obtained with immobilization onto 11-mercaptoundecanoic acid which presented a detection limit of 13.0 nmol L<sup>-1</sup> as well as good values for the kinetic and equilibrium binding constant. The immunosensor showed good specificity with no response for different proteins include another cysteine peptidase that is used as a target for detects *Xylella fastidiosa* bacterium responsible for other important disease in citrus. For detection of *Salmonella* using a magneto-immunoassay and gold nanoparticles (AuNPs) as label was developed based on the use of a screen-printed carbon electrode (SPCE) that incorporates a permanent magnet underneath. *Salmonella* spiked in milk samples (i.e. skimmed milk) have been tested by using anti-Salmonella magnetic beads (MBs-SAb) as capture phase and sandwiching afterwards with AuNPs modified antibodies (SAb-AuNPs). AuNPs detection using differential pulse voltammetry (DPV) following a previous established procedure is performed. And a detection limit of 143 CFU mL<sup>-1</sup> and a linear range of from 10<sup>3</sup> to 10<sup>6</sup> CFU mL<sup>-1</sup> of *Salmonella*, with a coefficient of variation of about 2.4%, was obtained. Recoveries of the sensor by spiking skimmed milk with different quantities of *Salmonella* of about 83 and 94 % for

$1.5 \times 10^3$  and  $1.5 \times 10^5$  CFU mL<sup>-1</sup> were obtained, respectively. This work demonstrated the possibility to detect CPXaC with a piezoelectric immunosensor as well as electrochemical immunosensor to detect *Salmonella* spiked in milk samples.

# Introdução

# 1.Introdução

## 1.1 Apresentação

Atualmente, as análises clínicas não são realizadas exclusivamente em laboratórios<sup>1</sup>. Medidas de fluídos biológicos, como urina e sangue, são rotineiramente realizadas em postos de saúde e pelos próprios pacientes utilizando dispositivos portáteis denominados biossensores ou análises chamadas de point - of - care. No entanto, o emprego desses dispositivos não se limita ao diagnóstico ou confirmação de uma patologia humana. Análises de microorganismos em alimentos e as detecções de marcadores de doenças de plantas são, entre outras, possíveis aplicações dos biossensores.

Desde o desenvolvimento da tecnologia dos biossensores, por Clark e Lyons em 1962<sup>1</sup>, esta tem sido tema de estudo exaustivo por diversos grupos de pesquisa. Isso, porque, o desenvolvimento de um sistema robusto que integra todas as características analíticas tais como: seletividade, sensibilidade, especificidade, portabilidade, baixo custo, capacidade de miniaturização e rápido tempo de detecção para análise de matrizes complexas é de grande interesse para indústria de alimentos e o agronegócio nos dias de hoje.

O Brasil é um dos maiores exportadores de produtos agrícolas do mundo. Em 2010, 25% dos produtos do agronegócio em circulação no mundo eram brasileiros e, espera-se em 2030 um terço de todos estes produtos comercializados no mercado mundial sejam do Brasil<sup>2</sup>. A citricultura brasileira é responsável por grande parte dos produtos a base de citros no mercado internacional, e contribui com mais de 1,5 bilhões de dólares anuais para balança comercial<sup>3</sup>. No entanto, a produtividade da citricultura é afetada por diversas doenças, pois na maioria das vezes quando a árvore é infectada ela deve ser erradicada, assim como as árvores próximas ao foco da doença o que causa grandes perdas econômicas ao produtor. Contudo, se métodos de detecção fossem empregados no estágio inicial da doença sua proliferação poderia ser evitada, bem como as perdas econômicas ao produtor.

O cancro cítrico é uma das doenças economicamente mais importantes que atinge as espécies de citros em todo o mundo. O agente patogênico é uma bactéria gram-negativa, *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc)<sup>4</sup>, geralmente

caracterizado por notáveis lesões nas folhas, caules e frutos, deterioração e queda dos frutos e diminuição da produção<sup>5</sup>.

Atualmente os métodos de diagnóstico do Cancro são: visual, fluxo bacteriano ou reação em cadeia da polimerase (PCR). O primeiro deles baseia-se nas características típicas dos sintomas, o qual não é utilizado para emitir laudo técnico. O segundo caracteriza-se pela inspeção por microscopia óptica de um pedaço do tecido com alta concentração bacteriana no qual é possível observar o fluxo bacteriano que sai do tecido deste material, que por sua vez, é coletado e inoculado em uma placa de cultura dando colônias amareladas, características da Xcc<sup>6,7</sup>.

Não há tratamento ou prevenção para o Cancro cítrico, por isso após a detecção de uma árvore infectada, ela deve ser destruída e, ao mesmo tempo, as árvores sem sintomas expostas ao patógeno ao seu entorno a fim evitar novas infecções e maiores perdas econômicas<sup>8</sup>. A doença está presente em mais de 30 países. Os esforços para o controle e erradicação de áreas infectadas e manter as áreas livres de cancro são economicamente importantes para o mercado de citros<sup>7</sup>. Uma estratégia para prevenir e controlar as novas infecções pode ser oferecida com a detecção precoce do cancro cítrico juntamente com os métodos para evitar a sua propagação.

Recentemente, foi demonstrado que as bactérias fitopatogênicas, incluindo o gênero *Xanthomonas*,<sup>9</sup> utilizam uma cisteíno peptidase para alterar a fisiologia da planta e está relacionado com inúmeros processos biológicos. A cisteíno peptidase produzida pela Xcc (CPXaC) provavelmente está envolvida nos processos de invasão do hospedeiro, o que faz dela um potencial biomarcador para o desenvolvimento de métodos de detecção prematura, eficaz e rápido para o Cancro cítrico.

Doenças transmitidas por alimentos têm sido uma ameaça a saúde humana por vários anos e continuam sendo um problema de saúde pública<sup>10</sup>. *Salmonella* é um dos mais frequentes microorganismos encontrados em alimentos contaminados. A ingestão pode causar em humanos, diarreia, febre, vômitos, dores abdominais e se não houver uma intervenção imediata pode levar uma desidratação grave e, alguns casos a morte.

O monitoramento de *Salmonella* em alimentos, portanto, é de grande interesse devido à alta incidência desse microorganismo em alimentos contaminados. No Brasil, segundo dados da secretaria da saúde, 44% dos alimentos contaminados são procedentes de *Salmonella*<sup>11</sup>, sendo os principais veículos de origem animal como: leite, carne e ovos.

De acordo com o ministério da saúde, entre 1999 e 2008 foram mais de 1300 surtos causados somente por *Salmonella* no total de 2974. Nos Estados Unidos da América, onde dados e custo com doenças causado por *Salmonella* são relatados, há 1,4 milhões de infecções por *Salmonella* resultando em 168.000 visitas ao médico, 15.000 internações e 580 mortes anualmente. O custo total associado com *Salmonella* é estimado em US\$ 3 bilhões de dólares<sup>12</sup>.

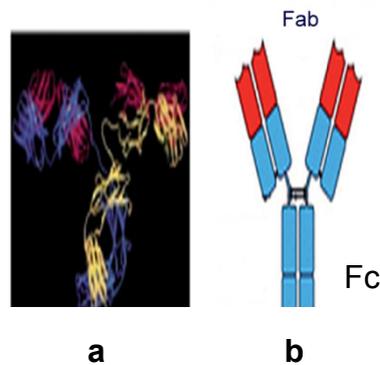
O método convencional para detectar bactérias, recomendados pelas agencias internacionais de normatização, é o método de cultura em placas com meio biológico específico para isolar e enumerar as possíveis bactérias encontradas nos alimentos. Este método é muito sensível e barato, mas requer vários dias para gerar resultados, porque a técnica é fundamentada na capacidade dos microorganismos em multiplicar-se e produzir colônias visíveis. Por exemplo, o método oficial para enumerar bactérias (ISO/DIS 6579, 2001)<sup>13</sup> envolve uma série de etapas o qual consome de 4 a 5 dias para ser concluído. São elas: a) pré-enriquecimento b) enriquecimento seletivo c) isolamento d) confirmação bioquímica e sorológica se presumíveis colônias de *Salmonella* forem desenvolver-se.

O desenvolvimento de novas metodologias com tempo de resposta mais rápido, melhor sensibilidade e seletividade e multiplexação fácil ainda é um desafio para análises clínicas, vigilância sanitária, e outros órgãos de controle. Nos últimos anos novas tecnologias têm sido desenvolvidas, a fim de melhorar o tempo de análise dos métodos padrões. Estas tecnologias baseiam-se principalmente na reação em cadeia da polimerase e imunoenaios<sup>14-17</sup>. Outra tecnologia que emerge como alternativa para dirimir as deficiências das técnicas padrões são os biossensores. Em especial os imunossensores que se baseiam na alta especificidade da interação antígeno e anticorpo.

## 1.2 Imunoensaios

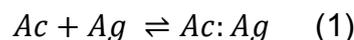
Os ensaios imunológicos ou imunoensaios atualmente são as técnicas analíticas predominantes em grupos de pesquisa ou em laboratórios de análise clínicas para detectar diversos alvos em diferentes matrizes biológicas.

A imunoglobulina g, IgG, o anticorpo (Ac) mais utilizado em imunoensaios, teve sua estrutura determinada por cristalografia de raio – X<sup>18</sup>, a qual demonstrou uma forma de Y com três porções de tamanho iguais, **Figura 1.1 (A)**. Elas são constituídas de duas cadeias de polipeptídios leves e duas pesadas ligadas por pontes de sulfetos **Figura 1.1(B)**.



**Figura 1.1:** Estrutura cristalográfica de raio-X de um anticorpo IgG<sup>18</sup> (a); representação esquemática da estrutura de um anticorpo (b) Fab: fragmento de ligação de antígeno e Fc: fragmento constante.

A região constante, Fc, é responsável pelo isotipo do anticorpo, enquanto que a região variável, uma cadeia leve e outra pesada constituí a região de ligação do antígeno, Fab. Esta região determina a especificidade do anticorpo. O antígeno (Ag), por sua vez, se liga ao anticorpo por meio do seu epítopo formando o complexo antígeno-anticorpo<sup>18</sup> de acordo com a **equação química 1**.



$$K = \frac{[Ac:Ag]}{[Ac][Ag]} \quad (2)$$

A formação do complexo *AcAg* é caracterizada pela constante de afinidade, que leva em consideração as concentração de *AcAg*, do *Ag* livre e sítios de ligação do *Ac*, **equação 2**. Valores das constantes de afinidade entre de  $10^4$  e  $10^{12}$  L mol<sup>-1</sup> decorre da alta sensibilidade dos imunoenaios<sup>19</sup>, e uma avaliação da constante de afinidade é importante para se conhecer viabilidade do anticorpo empregado nos ensaios.

A interação imunológica pode ser monitorada por diversas técnicas, por exemplo, os radiomunoensaio, Western Blotting<sup>20</sup> ou ELISA<sup>20</sup> (Enzyme-linked immunosorbent assay). Dentre elas o ELISA é sem sombra de dúvidas o mais utilizado em análises clínicas e biológicas. Essa técnica tem servido como um método importante para determinação de proteínas, sendo que, em alguns casos o seu limite de detecção pode chegar a 1 pg mL<sup>-1</sup> <sup>20</sup>. No entanto, os ensaios baseados em ELISA são difíceis de serem empregados em análises de campo ou em laboratórios remotos, além disso, possuem algumas limitações como: tempo de análise, quantidade de amostra, custo de equipamento e a necessidade de um técnico qualificado. Por outro lado, as estratégias utilizadas em ELISA são bastante úteis no desenvolvimento de imunossensores<sup>20</sup>.

Os imunossensores são um tipo de biossensor e, assim como os imunoenaios, baseiam-se na interação anticorpo e antígeno. A principal vantagem dos imunossensores frente ao ELISA é a possibilidade de uso em análise remota, além no menor consumo de amostra, menor tempo de análise e possibilidade de automação<sup>20</sup>. Nos imunossensores o antígeno ou anticorpo é imobilizado em uma superfície chamada de camada sensora a qual está conectada ao transdutor<sup>1</sup>. Este é responsável por detectar as mudanças físicas ou químicas na camada sensora ocasionada pela interação, de alta especificidade e seletividade, entre o antígeno e anticorpo e transformá-la em um sinal mensurável. Do ponto de vista analítico, a formação do complexo pode ser monitorada pelo método direto, ou seja, sem marcador ou pelo método indireto, o qual lança mão de um marcador e, esta tem sido a estratégia mais utilizada. Tanto *Ag* ou *Ac* podem ser marcados, e quando isso ocorre são denominados conjugados.

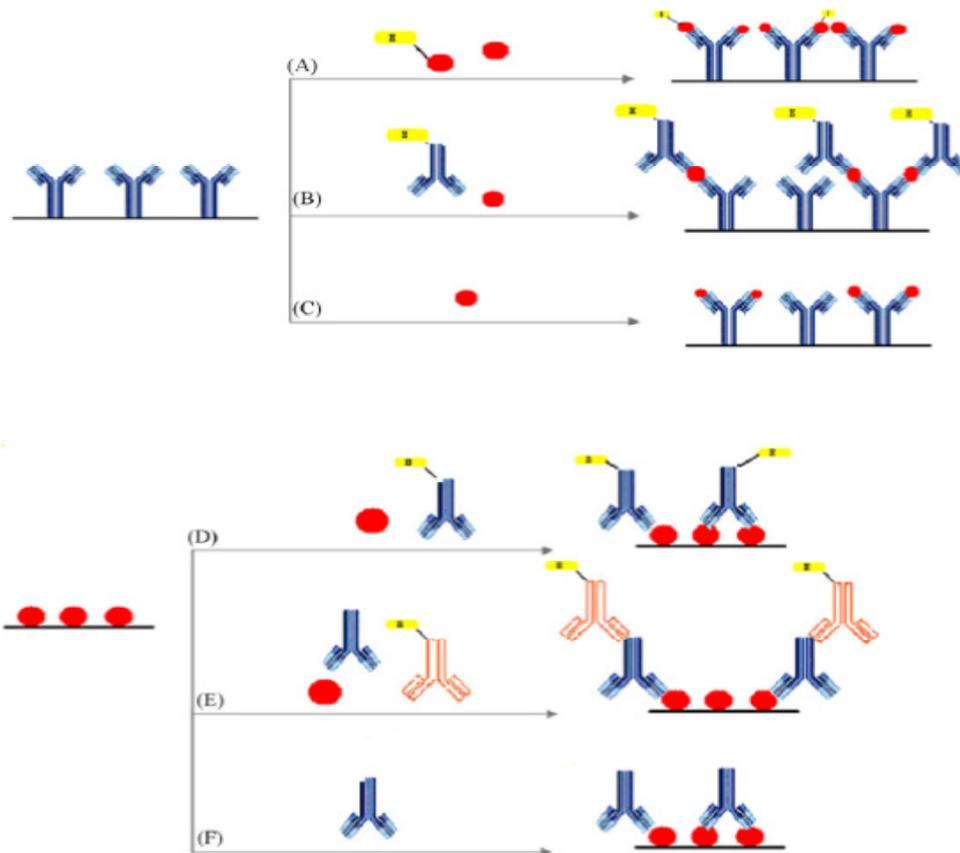
A maioria dos imunossensores desenvolvidos são baseados nos ensaios do tipo competitivo ou sanduíche, quando aplicados à detecção de moléculas

de baixa e alta massa molecular, respectivamente<sup>19</sup>. Duas estratégias definem os ensaios competitivos: A primeira delas, o Ac immobilizado reage com Ag em competição com o Ag\* marcado, em geral a marcação é feita com uma enzima redox, portanto, a formação do complexo é monitorada pelo produto da reação da enzima com substrato, **Figura 1.2 A** ou a segunda estratégia o Ag immobilizado compete com Ag livre pelo Ac\* marcado **Figura 1.2 D**. Ambas estratégias são definidas como imunensaio direto competitivo.

O segundo formato é o geralmente preferido, quando o anticorpo conjugado com a enzima (Ac\*) não está disponível para o analito estudado. Neste caso um Ac\* secundário é usado como marcador do Ac primário e este formato é conhecido com imunensaio competitivo indireto, **Figura 1.2 E**.

Em um ensaio do tipo sanduíche, o Ac é immobilizado sobre uma superfície. O Ag, então, é adicionado a fim de que ocorra a formação do complexo AcAg, depois um Ac\* é adicionado, formando assim o complexo AcAgAc\*. Esse tipo de ensaio é o mais empregado em imunossensores eletroquímicos.

Por fim, existe aquele em que a formação do complexo é detectada de forma direta não competitiva **Figura 1.2 C e F**. Nessa abordagem a simples ligação entre o Ag e Ac é suficiente para detectá-la e quantificá-la. A microbalança de cristal de quartzo (QCM), a espectroscopia de impedância eletroquímica e a ressonância plasmônica de superfície (SPR) são as técnicas mais comuns utilizadas para a detecção, sem marcação, do imunocomplexo.



**Figura 1.2:** Formatos dos imunossensores. (Parte superior) anticorpo imobilizado sobre o substrato: (A) ensaio direto competitivo usando antígeno marcado com enzima, (B) ensaio tipo sanduíche com o anticorpo marcado com enzima; (C) ensaio direto. (Parte inferior) Antígeno imobilizado sobre o suporte: (D) ensaio competitivo direto utilizando anticorpo primário marcado com enzima; (E) ensaio competitivo indireto utilizando um anticorpo secundário marcado com enzima. (F) ensaio direto. No caso de imunossensores electroquímicos o suporte é um eletrodo de trabalho enquanto que para SPR e QCM o suporte é um chip de ouro ou um cristal de quartzo, respectivamente. Para ensaios competitivos e sanduíche (A, B, D), a marcação não é usada para medições em SPR e QCM<sup>13</sup>.

### 1.3 Imunossensores Piezelétricos

Os imunossensores piezelétricos são uma classe de biossensores que exploram a interação antígeno-anticorpo. Eles são geralmente muito

específicos e sensíveis, devido o alto reconhecimento molecular entre antígeno e anticorpo combinado com a sensibilidade dos dispositivos piezelétricos<sup>21-23</sup>. Um grande número de cristais apresenta propriedades piezelétricas, no entanto, somente o quartzo possui combinação única de propriedades: mecânica, química, elétrica e térmica o que favorece sua comercialização<sup>22</sup>.

A piezeletricidade é uma propriedade de certos materiais reportada pela primeira vez por Jacques e Pierre Currie em 1880<sup>23</sup>. Segundo eles, quando uma deformação mecânica é aplicada sobre a superfície de vários cristais, entre eles os cristais de quartzo, sais de Rochelle etc, proporcionam um potencial elétrico nas faces opostas à deformação que é proporcional a intensidade da força aplicada. A propriedade só existe em materiais que não possuem eixo de simetria em sua estrutura cristalina. Assim, uma vez que o cristal sofre uma deformação mecânica, os átomos da rede cristalina se movem gerando cargas na superfície do cristal devido aos dipolos resultantes. Portanto, essa ação irá criar cargas com direções dependentes das orientações relativas dos dipolos do cristal. Por outro lado, quando um potencial elétrico é aplicado através do cristal gera um deslocamento dos átomos do cristal e, conseqüentemente, uma deformação mecânica denominada efeito piezelétrico inverso<sup>22, 23</sup>.

Sendo assim, a aplicação de uma diferença de potencial periódico no cristal piezelétrico ou oscilador, resulta em uma deformação elástica, o que proporciona uma onda acústica através do cristal. O tipo de onda, transversal ou longitudinal, depende da estrutura do cristal<sup>22</sup>. Desta forma, diferentes dispositivos foram desenvolvidos baseados nas diferenças estruturais dos materiais piezelétricos como: os osciladores de onda acústica estrutural (BAW – "*Bulk Acoustic Wave Resonators*"), osciladores de onda acústica de superfície (SAW – "*Surface Acoustic Wave Resonators*"), osciladores de onda acústica em membranas flexíveis (FPW – "*Flexural Plate Wave*"), osciladores de onda acústica em fibra (FAW – "*Fibre Acoustic Wave*"), osciladores de onda acústica em tubo (TAW – "*Tube Acoustic Wave*") e dispositivos de onda acústica transversa (TWD – "*Transverse Wave Devices*")<sup>24</sup>. Neste trabalho serão discutidos os osciladores de onda acústica estrutural (BAW) também

conhecidos como microbalança de cristal de quartzo (QCM - *quartz crystal microbalance*).

A microbalança de cristal de quartzo consiste de um fino disco de quartzo com dois eletrodos metálicos em cada lado do cristal. O eletrodo é conectado a um circuito oscilador externo, responsável por aplicar um potencial elétrico no cristal, causando, assim, uma onda acústica transversa ou, simplesmente, movimento vibracional no cristal<sup>23</sup>. A deformação mecânica proporcionada pela aplicação de potencial nas faces do cristal faz com que o cristal oscile em sua frequência ressonante ou oscilação fundamental, por exemplo, 5 MHz, a qual é dependente da sua espessura<sup>25</sup>.

Nos estudos de QCM, em geral, utiliza-se o corte com ângulo de 35,25° em relação ao eixo Z do cristal de quartzo denominado corte AT<sup>22</sup>. Nesse tipo de corte a oscilação preferencial é o de cisalhamento, ou seja, uma deformação sofrida por forças cortantes. Outra característica importante é que esse corte exhibe alta estabilidade na frequência de oscilação a temperatura ambiente e, por isso, é o mais utilizado para fins de QCM<sup>23, 25</sup>.

A importância da QCM como dispositivo analítico começou depois dos trabalhos de Sauerbery em 1959 **equação 3**. Ele descobriu que a variação da frequência ressonante ( $\Delta f$ ) do cristal de quartzo era linearmente proporcional a massa de um depósito sobre o eletrodo em fase gasosa ou no vácuo. Para isso, o filme deveria ser totalmente distribuído sobre o eletrodo e muito menor do que a massa do cristal  $\Delta f/f \ll 1$ . Além de estar rigidamente acoplado, não sofrer fricção ou deformação sobre o eletrodo durante a oscilação<sup>26</sup>.

$$\Delta f = -C_f \Delta m \quad (3)$$

$\Delta f$  é o deslocamento da frequência,  $\Delta m$  é a mudança de massa por unidade de área em g cm<sup>2</sup> e  $C_f$  é o fator de sensibilidade do cristal. Para um cristal com corte AT de 5 MHz o valor de  $C_f$  é de 17,7 Hz ng<sup>-1</sup> cm<sup>2</sup>.

Inicialmente, a técnica foi utilizada para monitorar crescimentos de filmes, desenvolvimento de sensores para avaliar taxa de oxidação e de sensores para adsorção de gás, todos eles em fase gasosa<sup>27</sup>. A extensão da técnica para fase líquida, no entanto, era impossibilitada devido à falta de um oscilador capaz de fazer com que o cristal oscilasse em líquidos, até que em

1982, Nomura e Okuhara reportaram um circuito capaz de contornar as barreiras existentes, assim, uma nova classe de ferramentas analíticas em fase líquida foi iniciada<sup>28</sup>.

Apesar dos avanços tecnológicos dos osciladores e de metodologias analíticas e bioanalíticas, os estudos de adsorção ou deposição de filme, interação de biomolécula etc, não se ajustam completamente a equação de Sauerbrey<sup>29-31</sup>. Isso se deve, principalmente, ao efeito combinado de adsorção ou aprisionamento de água entre as espécies adsorvidas e a característica viscoelástica de vários polímeros ou biomoléculas, os quais induzem a fricção do depósito sobre cristal levando amortecimento na oscilação do cristal. Quando o amortecimento do filme depositado torna-se suficientemente grande, a simples relação linear entre  $\Delta f$  e  $\Delta m$  não é mais válida. Tudo isso conduziu a novas soluções metodológicas para manter a técnica útil na área de sensoriamento.

Rodahl e colaboradores<sup>31</sup> desenvolveram um sistema capaz de obter informações não somente da variação da frequência ressonante, mas também a energia dissipada,  $D$ , do cristal causado pelo amortecimento na oscilação por um depósito viscoelástico além de teorias que ajustam a essa nova informação.

O método baseia-se no registro do decaimento de oscilação de um cristal livremente oscilante depois de uma rápida excitação ressonante, assim, a amplitude de oscilação,  $A$ , decai como uma senóide exponencial amortecida **equação 4**.

$$A_{(t)} = A_0 e^{-t/\tau} \text{sen}(\omega t + \varphi) + \text{constante } t \geq 0 \quad (4)$$

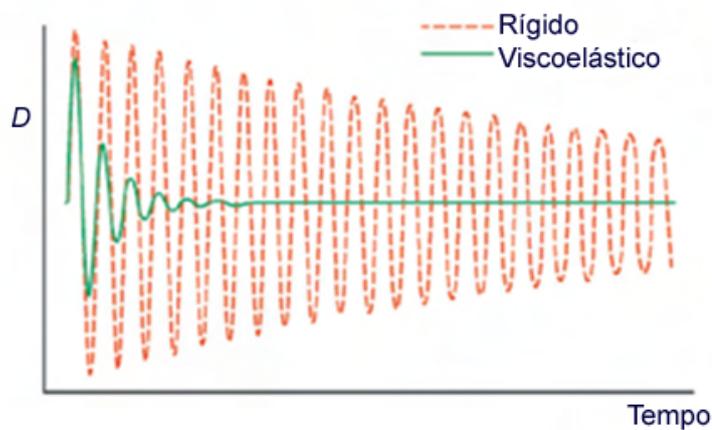
Onde  $\tau$  é a constante de tempo de decaimento e  $\varphi$  é ângulo de fase. A constante de decaimento está relacionada com  $D_{\text{total}}$  (Dissipação total) o qual é inversamente proporcional ao tempo de decaimento **equação 5**.

$$D_{\text{total}} = \frac{2}{\omega\tau} \quad (5)$$

Assim, pelo registro da amplitude de oscilação do cristal em função do tempo e por meio do ajuste da curva obtida com a **equação 4**,  $\omega$  e  $\tau$  podem ser determinados. O fator de dissipação pode, então, ser calculado a partir da

**equação 5.** A energia de dissipação também é definida pela **equação 6.** Em que  $E_{estocada}$  é a energia estocada durante a oscilação do sistema e  $E_{dissipada}$  é a energia perdida durante um período de oscilação. Uma representação gráfica da dissipação de energia em relação ao tempo está representada na **Figura 1.3.**

$$D = \frac{E_{estocado}}{2\pi E_{dissipado}} \quad (6)$$



**Figura 1.3:** Gráfico da dissipação de energia de oscilação do cristal de quartzo com depósito rígido e outro com depósito viscoelástico.

Assim sendo, a microbalança de cristal de quartzo com fator de dissipação (QCM-D) pode monitorar de forma simultânea  $f$  e  $D$ . Quando o depósito é rígido o fator de dissipação de energia é pequeno, ou seja, o decaimento da amplitude é suave,  $\tau$  grande. Por outro lado um depósito viscoelástico o fator de dissipação é grande,  $D > 1 \times 10^{-6}$ , o decaimento da amplitude de oscilação é mais acentuado,  $\tau$  pequeno **Figura 1.3.**

Dessa forma,  $\Delta f$  e  $\Delta D$  obtidos são usados para calcular as propriedades viscoelásticas do depósito baseado no modelo viscoelástico Kevin-Voigt<sup>32</sup> **equação 7.**

$$G^* = G' + iG'' \quad (7)$$

Em que  $G^*$  é o modulo de cisalhamento complexo,  $G'$  é o modulo de estocagem e  $G''$  é o modulo de perda. Um programa Q-Tools fornecido pela Q-Sense, (Goteborg, Suécia)<sup>32</sup> interpreta os valores de  $\Delta f$  e  $\Delta D$  obtidos baseados no modelo de Kevin-Voigt<sup>32</sup>, para estimar as propriedades viscoelásticas da camada adsorvida sobre o cristal, assumindo que a cobertura é homogênea e não há fricção entre o deposito e a superfície do eletrodo do cristal.

As propriedades viscoelásticas tal como: densidade, viscosidade, elasticidade e espessura da camada são correlacionadas com  $\Delta f$  e  $\Delta D$  obtidos da QCM-D baseado no modelo de Kevin-Voigt<sup>32</sup> de acordo com os estudos de Voinova e colaboradores<sup>32</sup>. A relação da resposta da QCM-D e as propriedades viscoelástica da camada adsorvida são apresentadas nas equações abaixo<sup>27, 29, 30, 33-35</sup>.

$$\Delta f \approx \frac{1}{2\pi\rho_0 h_0} \left[ \frac{\eta_3}{\delta_3} h_1 \rho_1 \omega - 2h_1 \left( \frac{\eta_3}{\delta_3} \right)^2 \frac{\eta_1 \omega^2}{\mu_1^2 + \omega^2 \eta_1^2} \right] \quad (8)$$

$$\Delta D \approx \frac{1}{\pi f \rho_0 h_0} \left[ \frac{\eta_3}{\delta_3} + 2h_1 \left( \frac{\eta_3}{\delta_3} \right)^2 \frac{\eta_1 \omega^2}{\mu_1^2 + \omega^2 \eta_1^2} \right] \quad (9)$$

Nesta equação  $\rho_0$  e  $h_0$  são a densidade e a espessura do cristal.  $\eta_3$  é a viscosidade do líquido,  $\delta_3$  é a profundidade de penetração da onda gerada pela oscilação do cristal no líquido e  $\omega$  é a frequência angular da oscilação. Nesse modelo a camada depositada é representada por quatro parâmetros: Densidade ( $\rho_1$ ), viscosidade ( $\eta_1$ ), módulo de cisalhamento ( $\mu_1$ ) e espessura ( $h_1$ ). Para camadas protéicas em ambiente aquoso o valor de  $\rho_1$  é  $1200 \text{ Kg m}^{-3}$ <sup>35</sup>.

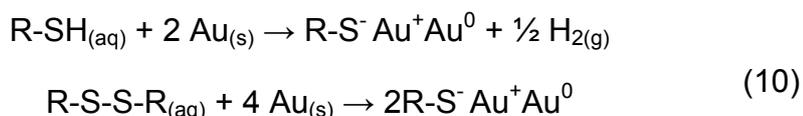
Além do modelo de Kevin-Voigt<sup>32</sup> o programa possui o modelo Sauerbrey<sup>32</sup>, o que permite relacionar os resultados entre os dois modelos a fim de verificar se há uma subestimação da massa calculada por Sauerbrey. Quando as massas obtidas entre os dois modelos são próximas podemos dizer que o modelo de Sauerbrey estima bem as massas calculadas e, portanto, o filme é rígido<sup>27</sup>. Nesse contexto, os dados obtidos podem trazer informações sobre as mudanças físicas na superfície do eletrodo e podem ser usadas para comparar diferentes superfícies adaptadas para o desenvolvimento de sensores. Portanto, a melhor estratégia para o desenvolvimento do sensor está

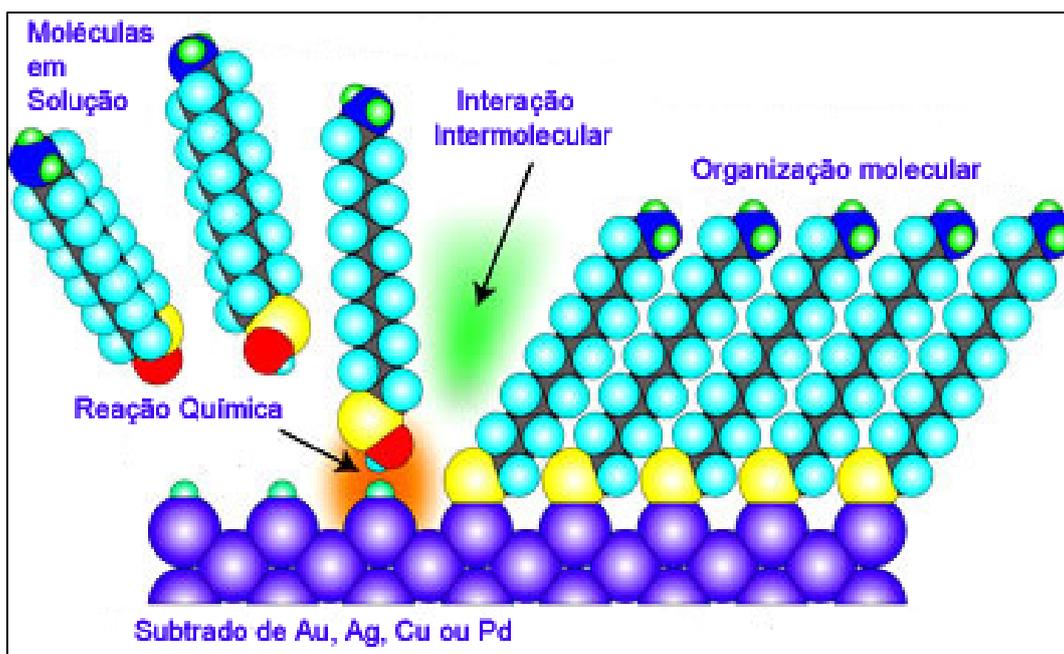
relacionada não só com a variação máxima frequência de ressonância, mas também com a menor variação no fator  $D$ .

### 1.3.1 *Alcanotióis na construção de imunoenssensores baseados em QCM*

Na seção anterior foi descrito que os sensores à base de QCM é um dispositivo sensível a variação de massa sobre a superfície dos eletrodos do cristal. No entanto, sua sensibilidade não é seletiva. Faz-se necessário, portanto, a modificação dos eletrodos sobre o cristal a fim de imobilizar um componente ou um biocomponente responsável pela sensibilidade do ensaio.

Os alcanotióis ou mercaptanas são moléculas orgânicas bastante apropriadas para esse fim e são conhecidas por formarem monocamadas auto-organizadas sobre superfícies metálicas (self assembly monolayer – SAM)<sup>36</sup>. O grupo sulfeto ou dissulfeto (-SH; S-S) em uma das extremidades da molécula adsorve quimicamente, por meio de adição oxidativa, em superfícies metálicas como Au, Ag, Cu e Pd formando tiolatos e gás hidrogênio de acordo com a **equação química 10**. Após a adsorção, as cadeias alquílicas desordenadas se auto-organizam sobre o metal por meio de interações Van de Waals, de tal forma que cada molécula forme um ângulo de 30° com a superfície, **Figura 1.4**. Assim, uma monocamada cerca de 1 a 3 nm de espessura, altamente empacotada e de estrutura cristalina é formada<sup>37</sup>.





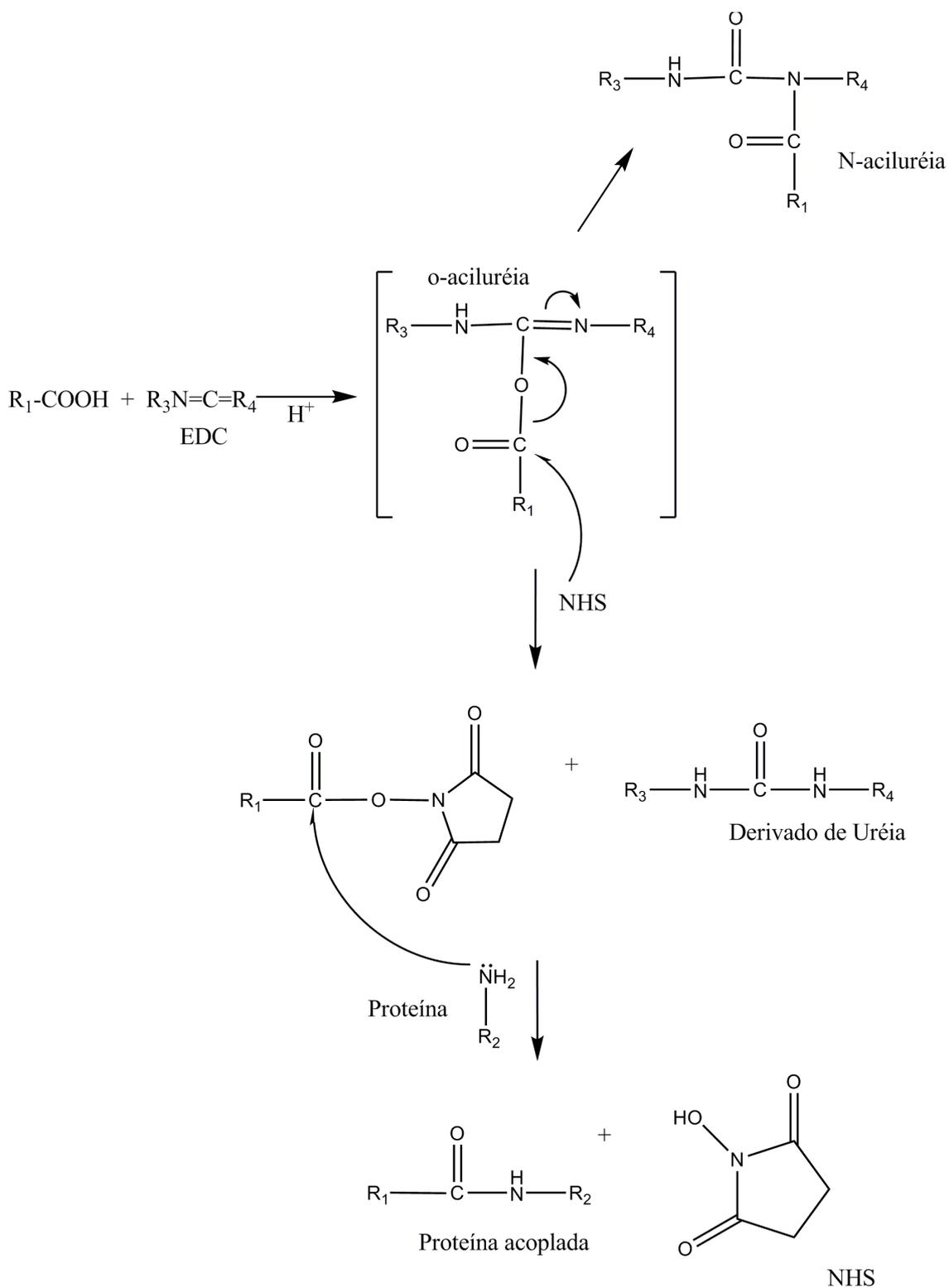
**Figura 1.4:** Representação esquemática da formação de uma monocamada a partir de uma solução de alcanotióis<sup>38</sup>.

A imobilização de biomoléculas sobre a monocamada, geralmente, é realizada por intermédio de ligação covalente<sup>39-42</sup>. Os alcanotióis com grupo carboxila são mais utilizados porque formam uma ligação amida estável com a biomolécula. Contudo, uma ativação do grupo carboxila é necessária a fim de aumentar o rendimento da reação<sup>43</sup>. Para esse propósito, utilizam-se dois reagentes: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS). A reação com o primeiro deles forma um intermediário *o*-aciluréia derivado da carbodiimida. Em seguida ocorre o ataque nucleofílico do nitrogênio do grupo amino primário ao carbono da carbonila, o que provoca a formação da ligação amida com a saída do derivado de uréia solúvel. Esse intermediário, no entanto, possui uma meia vida muito curta e, é rapidamente hidrolisado ou sofre um rearranjo formando N-aciluréia. Esse problema é contornado com uso de um segundo reativo NHS, o qual forma o ester succinimida a partir *o*-aciluréia mais estável, assim, a reação com o grupo amino da proteína é mais eficiente,<sup>43</sup> **Figura 1.5.**

Atualmente, utiliza-se para imobilizar biomoléculas uma mistura de tióis com diferentes grupos terminais. Isso é possível porque o tiol imobilizado segue a proporção estequiométrica em solução<sup>37, 44</sup>. A mistura é geralmente

constituída de um tiol de cadeia longa com um grupo carboxila terminal onde a biomolécula será imobilizada, e outro de cadeia curta com grupo terminal e fração molar diferente do primeiro, a fim de distanciar uma biomolécula da outra, dessa forma, a biomolécula estará mais livre para interagir com o analito.

De um modo geral, as monocamadas baseadas em alcanotióis fornecem uma superfície adequada para imobilização de biomoléculas devido a sua biocompatibilidade, facilidade de preparo e estabilidade. Além disso, seu alto empacotamento favorece a formação de uma superfície rígida, característica básica para o desenvolvimento de imunoenaios baseados em QCM. Sendo assim, várias estratégias foram desenvolvidas utilizando a QCM como transdutor e alcanotióis para imobilização de anticorpos ou antígenos<sup>45-57</sup>.



**Figura 1.5:** Mecanismo de re\u00e7\u00e3o proposto para a forma\u00e7\u00e3o de uma amida entre \u00e1cido carbox\u00edlico e amina em solu\u00e7\u00e3o aquosa na presen\u00e7a de EDC e NHS<sup>43</sup>.

### 1.3.2 *Formato dos imunoenssensores baseados em QCM*

O primeiro imunossensor baseado em QCM foi desenvolvido por Shons e colaboradores em 1972<sup>21</sup>. Os autores incorporaram uma camada de Neybar C, para imobilizar albumina de soro bovina (BSA) na superfície de um cristal de 9 MHz a fim de detectar anti-BSA em amostras líquidas. Os resultados em termos de sensibilidade foram comparados com procedimentos convencionais de aglutinação passiva para detectar anticorpos, com isto os autores reduziram o tempo de análise de horas para minutos.

O formato desse imunoensaio foi denominado captura direta, devido a ausência de marcadores e anticorpos secundários. Com os avanços na metodologia, encorajados pelo trabalho pioneiro de Shons<sup>21</sup>, vários formatos de imunoensaio foram desenvolvidos, os quais serão listados abaixo.

#### *Captura direta:*

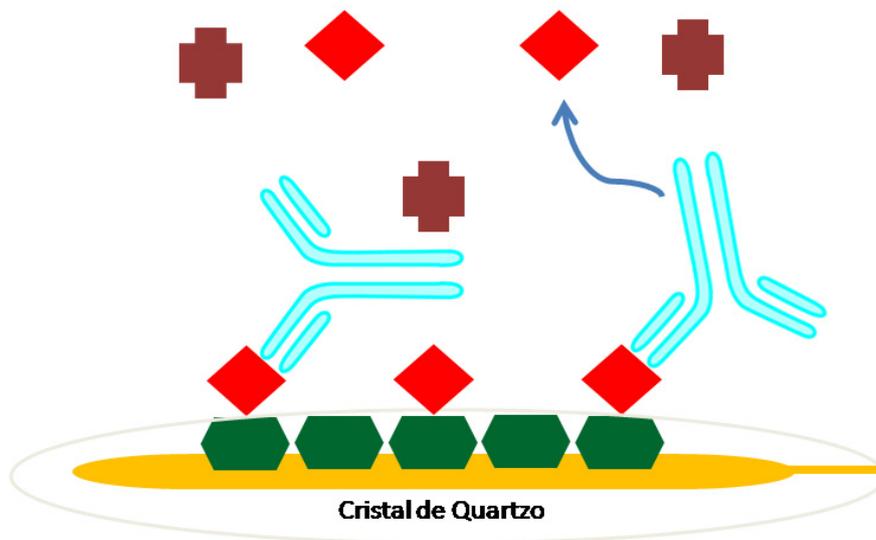
O ensaio de captura direta são os formatos de imunoensaios piezelétricos mais comuns, devido principalmente a ausência de marcadores, tempo de análise e sua simplicidade. Esse formato envolve a modificação da superfície metálica com uma camada apropriada para a imobilização do *Ac* ou *Ag*. O cristal modificado com *Ac* ou *Ag* é, então, exposto a uma solução contendo o analíto, o qual irá se ligar especificamente à superfície e causar uma variação na frequência ressonante do cristal. Na maioria dos casos, a mudança da frequência é proporcional à massa adicionada e, assim, a concentração do analíto **Figura 1.2 C**.

A principal desvantagem deste método é que a sensibilidade do ensaio é totalmente dependente da massa do analíto. Assim, a análise de analitos leves, tais como fármacos, hormônios e toxinas podem requerer outras abordagens.

#### *Deslocamento:*

O ensaio do tipo deslocamento é sempre usado em casos em que o analíto não tem massa adequada para causar mudança significativa na frequência. O cristal é modificado com uma apropriada camada de imobilização seguida pela adsorção do antígeno. O anticorpo é então adicionado, o qual irá

ligar especificamente ao antígeno immobilizado. O cristal preparado é exposto à solução contendo o antígeno, assim, o anticorpo immobilizado que tem alta afinidade pelo antígeno livre, irá deslocar-se da superfície causando um aumento na frequência devido à diminuição de massa. Dessa forma, toda mudança de massa será proporcional a concentração do analito em solução. Uma vez que o anticorpo, o qual tem massa significativa, causa à variação da frequência, boa sensibilidade é sempre atingida mesmo com analitos de baixa massa molecular, mais ainda, devido à saída do anticorpo da superfície esse ensaio tem poucos problemas com relação a ligações não específicas. Assim, a aplicação desse ensaio em amostras reais está menos sujeito a efeitos de matriz, **Figura 1.6**.



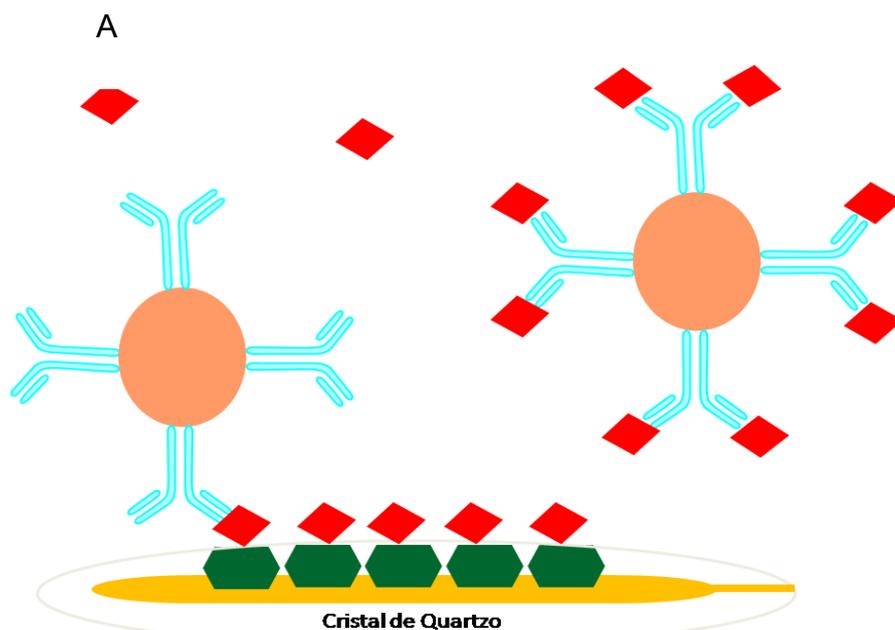
**Figura 1.6:** Esquema do ensaio tipo deslocamento. O anticorpo immobilizado é deslocado da superfície e se liga especificamente ao antígeno livre em solução resultando em um aumento da frequência.

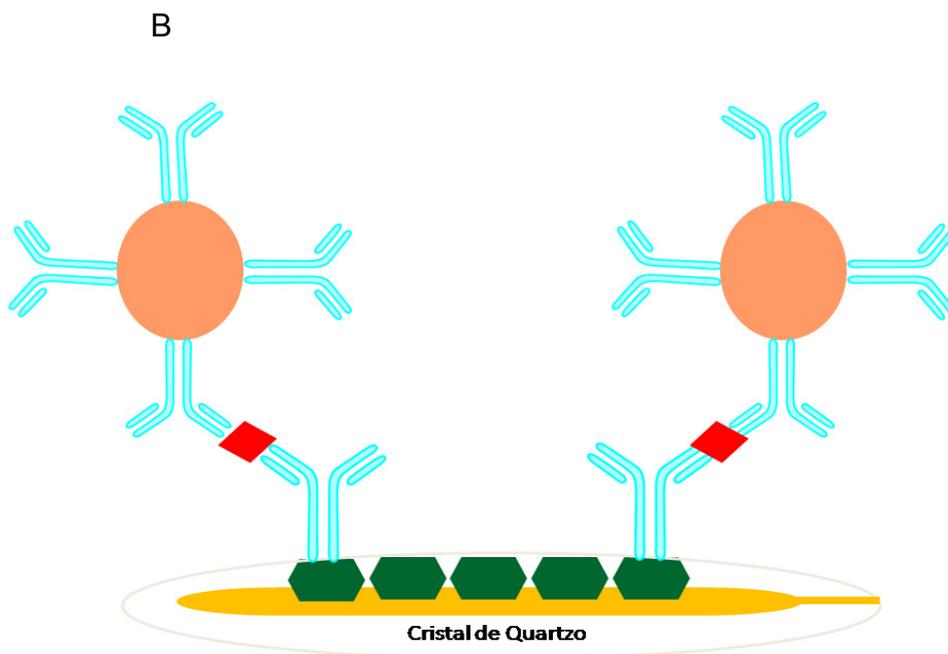
### *Ensaio com amplificação de massa:*

Este procedimento envolve o uso de partículas de elevada massa, como: AuNPs, ligadas ao anticorpo. A interação do analíto com anticorpo modificado produz uma  $\Delta f$  muito maior do que o anticorpo não modificado. Dessa forma, um ganho na resposta é observado devido ao considerável aumento de massa na superfície do cristal.

O ensaio pode ser realizado no modo competitivo **Figura 1.7 A**, neste caso o anticorpo marcado compete entre antígeno imobilizado e em solução, e a resposta é inversamente proporcional a concentração do analíto. Outra maneira de se realizar o ensaio é o modo sanduíche **Figura 1.7 B**. Nesse ensaio o anticorpo secundário é marcado e se ligará ao antígeno ligado ao anticorpo primário. Em geral, utiliza-se como marcador partículas que tenham densidade maior do que os agentes de ligação e diâmetro entre 5 - 100 nm de modo que não cause problemas espaciais de ligação. Assim sendo, nanopartículas de metais de transição ou polímeros de alta densidade são muito adequados para esse propósito.

Neste trabalho os estudos com QCM foram baseados no formato de captura direta.



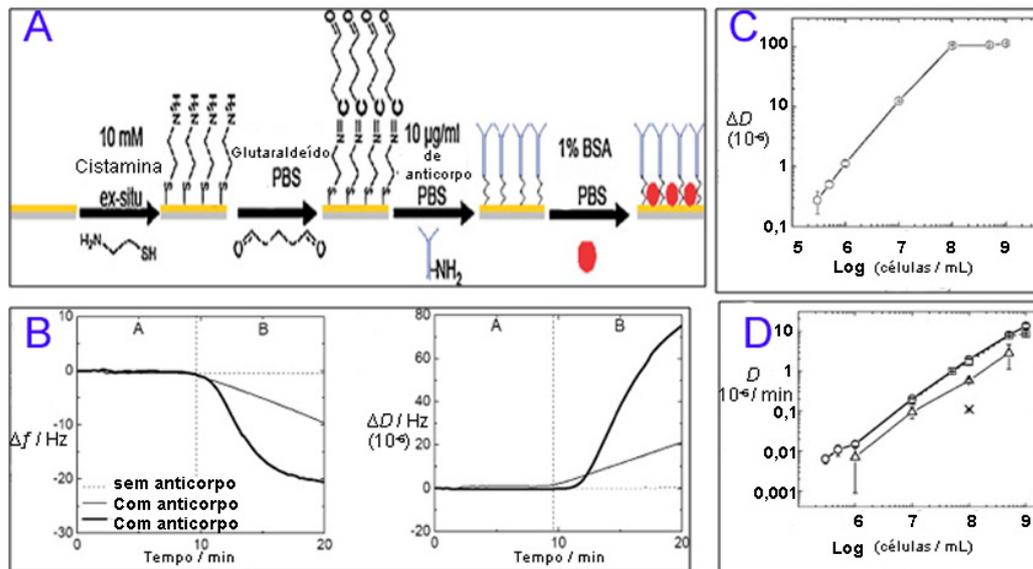


**Figura 1.7:** Esquema do ensaio com amplificação de massa. A) Ensaio competitivo B) Ensaio tipo sanduíche.

### 1.3.3 Revisão bibliográfica sobre imunossensores baseados em QCM

De acordo com que foi apresentado até o momento, será descrita abaixo uma revisão dos principais trabalhos da última década sobre imunossensores baseados em QCM.

Postras e Tufenkji<sup>58</sup> reportaram um biossensor para a detecção de *Escherichia coli* (E. coli) O157: H7 com a QCM-D em fluxo. A plataforma de detecção foi fundamentada na imobilização de anticorpos policlonais purificados sobre cristais de quartzo com eletrodos de ouro via uma monocamada auto-organizada de cistamina. Neste estudo, foram avaliados os deslocamentos de  $f$  e  $D$  após 60 min de injeção de bactérias e as respectivas inclinações das curvas no estado inicial da injeção. O melhor resultado foi obtido com a inclinação inicial da curva das medidas de  $D$ , o qual apresentou uma sensibilidade  $3 \times 10^{-5}$  CFU e uma região linear de trabalho de  $10^5$  a  $10^9$  CFU. A faixa linear de trabalho encontrado foi comparada com outros estudos com QCM para detectar bactérias e seletividade satisfatória foi demonstrada frente à *Bacillus subtilis* **Figura 1.8.**

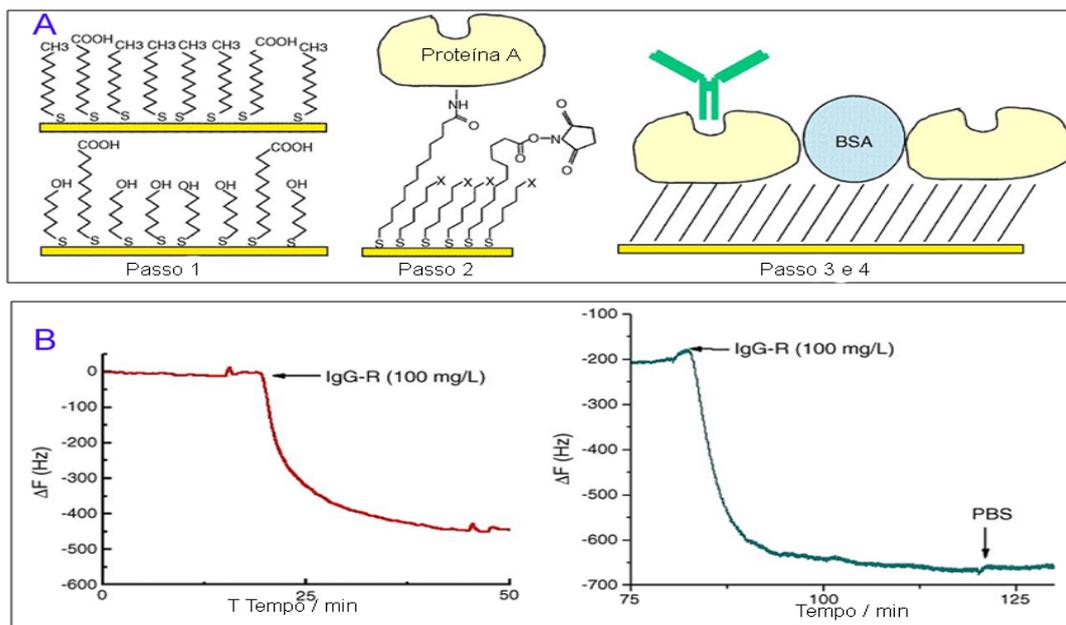


**Figura 1.8:** (A) Representação esquemática da estratégia de imobilização do anticorpo sobre a monocamada de cistamina. (B) Deslocamento de  $f$  e  $D$  em função do tempo após injeções de diferentes concentrações de *E. coli*. (C) Curva de calibração utilizando a inclinação de  $D$  como resposta analítica. (D) X representa a injeção de *Bacillus subtilis*, a qual possui uma resposta analítica menor do que a resposta do sensor frente a diferentes concentrações de *E. coli* em diferentes circunstâncias<sup>58</sup>.

Carrigan e colaboradores<sup>59</sup> desenvolveram um imunossensor piezelétrico para detectar rhIL-1ra, um biomarcador para Sepsis (Infecção geral grave). Neste estudo os autores utilizaram polietilenoimina e carboximetilcelulose para imobilização de anticorpos contra rhIL-1ra. Os anticorpos foram imobilizados diretamente sobre a superfície ou por meio da proteína A de *Staphylococcus aureus*, uma proteína conhecida por ligar na região fragmento constante do anticorpo de forma orientada. Os melhores resultados foram obtidos com a imobilização orientada do anticorpo e com a utilização do um anticorpo secundário, dessa forma, um limite de detecção de  $25 \text{ ng mL}^{-1}$  e nenhuma adsorção inespecífica frente à albumina de soro humana foram observados.

Um imunossensor piezelétrico, baseado na imobilização anti-IgG de coelho sobre mistura de alcanotóis e proteína A como agente de ligação foi desenvolvido por Briand e colaboradores<sup>44</sup>. As monocamadas consistiam de ácido mercaptoundecanóico (MUA) e 6 mercaptohexanol (MHO) ou MUA e decanotíol, formadas sobre diferentes cristais. A superfície modificada com tóis

de cadeia longa (MUA e decanotíol) apresentou uma estrutura mais ordenada e cristalina; em contrapartida, com a mistura de cadeia curta uma superfície mais desorganizada foi observada. Esse arranjo influenciou na imobilização da proteína A e, conseqüentemente, na ligação de anti-IgG. Os autores concluíram que a superfície hidrofílica favorecia a ligação ordenada do anticorpo, assim, a melhor superfície sensora para captura de IgG foi obtida com a mistura de MUA e MHO **Figura 1.9**



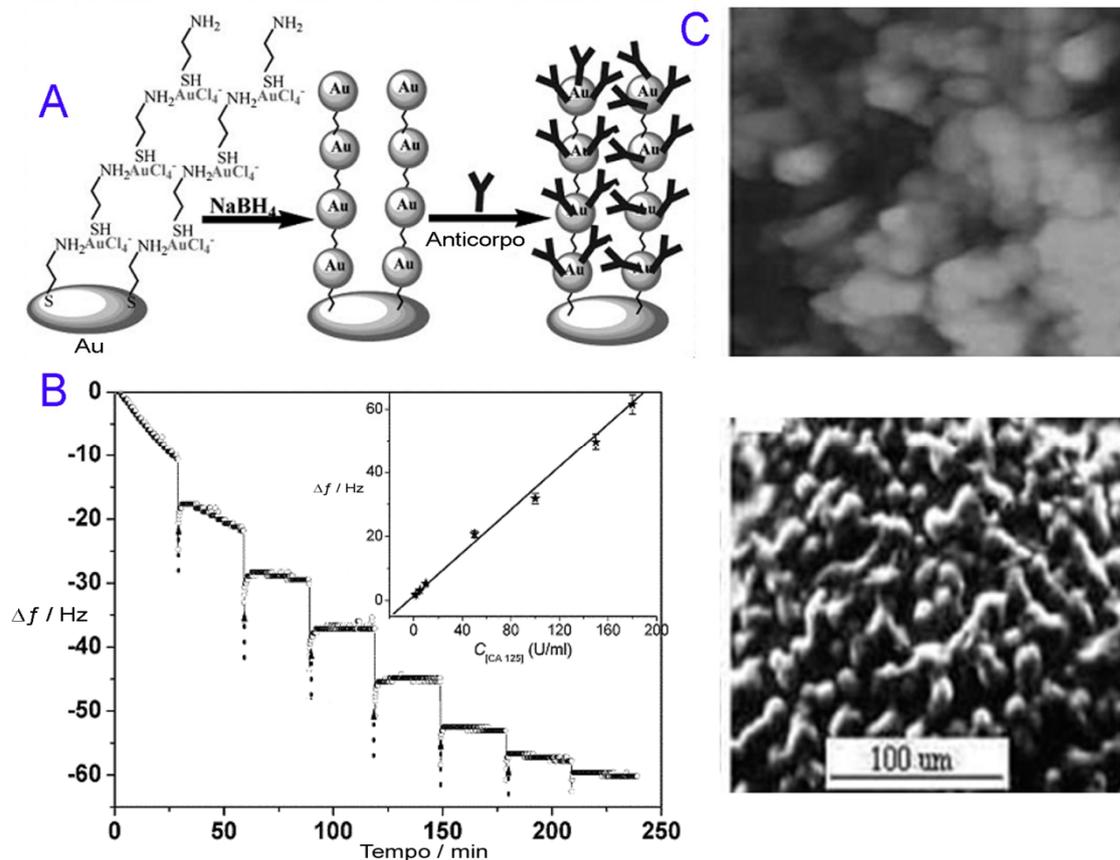
**Figura 1.9:** (A) Representação esquemática da estratégia de imobilização do anticorpo anti-IgG. (B) Resposta analítica frente a uma concentração fixa de IgG sobre imunossensor construído sobre MUA/MHO (à esquerda) ou MUA/decanotíol (à direita). Passo 1: Formação da monocamada; Passo 2: imobilização da Proteína A; Passo 3 e 4 bloqueio e imobilização anti-IgG. <sup>44</sup>

Em outro trabalho<sup>60</sup>, De Palma e colaboradores desenvolveram um imunossensor piezelétrico tipo sanduíche com partículas magnéticas como fase de captura. O eletrodo do cristal de Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> modificado com anticorpo S53 via ciano silanos permitiu a detecção indireta de S100 $\beta$ , um marcador para acidente vascular cerebral. Os autores concluíram que a captura com partículas magnéticas de 125 nm de diâmetro modificadas com anticorpo S36 foram mais efetivas. Assim, um limite de detecção 0,2 nmolL<sup>-1</sup> em soro humano e uma faixa de trabalho de duas décadas foram obtidos<sup>60</sup>.

Li e colaboradores<sup>61</sup> desenvolveram um imunossensor baseado em QCM com nanopartículas magnéticas para amplificar a detecção do vírus H5N1. Anticorpos policlonais contra os vírus H5N1 foram imobilizados sobre a superfície de ouro do cristal piezolétrico modificado com ácido mercaptohexadecanóico. O alvo, H5N1, foi capturado pelos anticorpos imobilizados sobre o cristal. Em sequência, nanopartículas magnéticas modificadas com anti-H5 foram adicionadas para amplificar o sinal de detecção. Deste modo, o imunossensaio pôde detectar 0,0128 unidades H5N1 dentro de 2 horas e 0,128 unidade do vírus em amostras de suabe traqueal, além disso, o imunossensor foi seletivo frente a outros vírus no caso H3N2, H2N2 e H4N8.

Um ensaio para detectar troponina T (TnT) em soro humano utilizando AuNPs imobilizadas sobre 1,6 hexanoditiol foi reportado por Fonseca e colaboradores<sup>62</sup>. Anti-troponina humana foi covalentemente imobilizada sobre a superfície nanoestruturada via cistamina. Dessa forma, TnT foi capturado sobre a superfície do cristal diretamente em solução. O imunossensor piezolétrico apresentou uma faixa linear de trabalho de 0,003 a 0,5 ng mL<sup>-1</sup>, coeficiente de variação de 7% e um limite de detecção 0,0015 ng mL<sup>-1</sup>, assim, alta sensibilidade e reprodutividade do ensaio foram obtidos.

Finalmente, Tang e colaboradores<sup>63</sup> utilizaram um imunossensor piezolétrico baseado em nanofios de AuNPs para detectar carcinoma antígeno 125 (CA 125). Os nanofios foram construídos por meio da adsorção de 2-aminoetanotiol (AET) sobre a superfície de ouro seguido pela formação do complexo [AuCl<sub>4</sub>]<sup>-</sup> com os grupos amino do AET. Em sequência, Au<sup>3+</sup> foi reduzidos com NaBH<sub>4</sub> formando os nanofios. Dessa forma, uma estrutura tridimensional bem definida e de grande área superficial proporcionou maior número de anti-CA125 imobilizados sobre o eletrodo. O imunossensor foi capaz de capturar diretamente em solução até 0,5 U mL<sup>-1</sup> de CA 125. Por fim, recuperação média de 103% foi obtida de amostras de soro humano fortificado com 180 U mL<sup>-1</sup> de CA 125 **Figura 1.10**.



**Figura 1.10:** (A) Representação esquemática da estratégia de imobilização do anticorpo. (B) Resposta e curva analítica frente a diferentes concentrações do analíto. (C) AFM e MEV da superfície após a modificação com nanofios de ouro.<sup>63</sup>

#### 1.4 Imunoenssensores eletroquímicos

Os imunossensores eletroquímicos baseiam-se na utilização de transdutores eletroquímicos, os quais são, principalmente, tipo sanduíche. A fundamental diferença é que o complexo  $AcAgAc^*$  está sobre a superfície do eletrodo e, portanto, o produto da reação enzimática será detectado por técnicas eletroquímicas. As principais vantagens dessas técnicas são o baixo custo de instrumentação, alta sensibilidade, facilidade de miniaturização e portabilidade<sup>1</sup>.

Entre as técnicas eletroquímicas utilizadas em imunossaios, encontra-se na literatura um vasto número de trabalhos utilizando amperometria e voltametria. Em um imunossensor deste tipo, a corrente é dependente da

concentração, cuja medida é feita aplicando-se um potencial constante (amperometria) ou variável (voltametria) no eletrodo de trabalho.

Em um imunossensor convencional, depois da captura do alvo pelo anticorpo primário imobilizado sobre a superfície do eletrodo, um anticorpo secundário marcado com uma enzima é sequencialmente introduzido para formar o complexo  $AcAgAc^*$ . Na solução, o substrato enzimático não eletroativo é convertido pela enzima em um produto eletroativo que é quantitativamente detectado por um eletrodo, aplicando-se um potencial. As correntes obtidas estão relacionadas com a quantidade de enzima, e por sua vez estão relacionadas com a concentração do analito. Enzimas como: peroxidase de raiz forte (HRP), fosfatase alcalina (ALP) e glicose oxidase (GOD) são as mais utilizadas como marcadores enzimáticos.

Nos últimos anos, os grupos de pesquisas em imunossensores têm desenvolvido novas estratégias de imunodeteção fundamentada nos avanços da ciência de materiais em especial os nanomateriais. Por exemplo, nanopartículas de ouro (AuNPs) foram utilizadas na modificação de eletrodos a fim de aumentar a transferência eletrônica, nanopartículas (NPs) têm sido utilizadas como marcadoras em substituição as enzimas, ou ainda, como carregadoras de enzimas.

Outra estratégia, acoplada a imunossaios baseada em NPs, que vem sendo utilizada é a separação imunomagnética. Fundamentada na reação imunológica sobre um substrato com propriedades magnéticas, partículas magnéticas (MBs) com diâmetro que varia de nm até poucos  $\mu\text{m}$  modificados com anticorpos, tem contribuindo para aumentar a sensibilidade e robustez dos métodos atuais de detecção.

Em suma, a revisão da literatura do item seguinte discorrerá sobre os imunossaios com nanopartículas de ouro (AuNPs) como marcadores e MBs, em sequência, os últimos avanços no que se refere a imunossaios baseados em AuNPs e MBs serão relatados.

### 1.4.1 *AuNPs como marcadores redox em imunoenssensores eletroquímicos e partículas magnéticas (MBs).*

A nanotecnologia refere-se à pesquisa e o desenvolvimento tecnológico em escala atômica, molecular e macromolecular, a qual conduziu a manipulação controlada e estudos de estruturas e dispositivos em que pelo menos uma dimensão está na ordem de 1 a 100 nm. Objetos com essa escala, tais como nanopartículas, possuem novas propriedades e funções que diferem marcadamente daqueles materiais em escala maior<sup>37</sup>.

Nanopartículas apresentam excelente compatibilidade com biomoléculas além de possuírem propriedades únicas em nível estrutural, eletrônicas, magnéticas, ópticas, catalíticas, elevada área superficial disponível e fácil funcionalização, as quais fizeram delas marcadores adequados para detectar interações entre antígeno e anticorpo utilizando diversas técnicas como: eletroquímica, microbalança de cristal de quartzo e ressonância plasmônica de superfície. Desde a antiguidade o homem tem conhecimento de materiais com nanopartículas e as nanopartículas de ouro (AuNPs), utilizada na coloração de vidros, foram objetos de estudos sistemáticos a partir de 1857 com o trabalho pioneiro de Faraday sobre a cor da suspensão de ouro coloidal<sup>64</sup>.

AuNPs são suspensões de partículas de tamanho sub-micrométrico diluídas em algum solvente, geralmente água. Essa suspensão tem usualmente uma intensa cor vermelha quando as partículas são menores que 100 nm ou amarelo quando maiores que 100 nm<sup>65</sup>. As AuNPs podem ter uma variedade de formas: esferas, discos, cubos, triângulos e elipsoidal, as quais são as mais freqüentemente observadas<sup>64, 66-68</sup>.

Michael Faraday foi o primeiro cientista a atribuir a coloração vermelha à suspensão coloidal de ouro a partículas finamente divididas e a avaliação científica moderna das AuNPs não começaram até o trabalho dele e outros trabalhos pioneiros de Turkevich e Frens<sup>65</sup>. Desde então, vários trabalhos foram<sup>69</sup> direcionados a fim de obter novas AuNPs com propriedades ópticas, catalíticas e elétricas únicas com aplicações em várias áreas do conhecimento.

As propriedades intrínsecas das NPs são completamente dependentes do tamanho, forma e cristalinidade, assim, suas características são dependentes das condições de preparo<sup>70</sup>. Para se ter AuNPs totalmente compatíveis com biomoléculas, elas são, em geral, modificadas com finas camadas orgânicas<sup>71</sup>. Esta camada possui grupos funcionais que são utilizadas para imobilizar biomoléculas por meio de ligação covalentemente ou interações eletrostáticas.

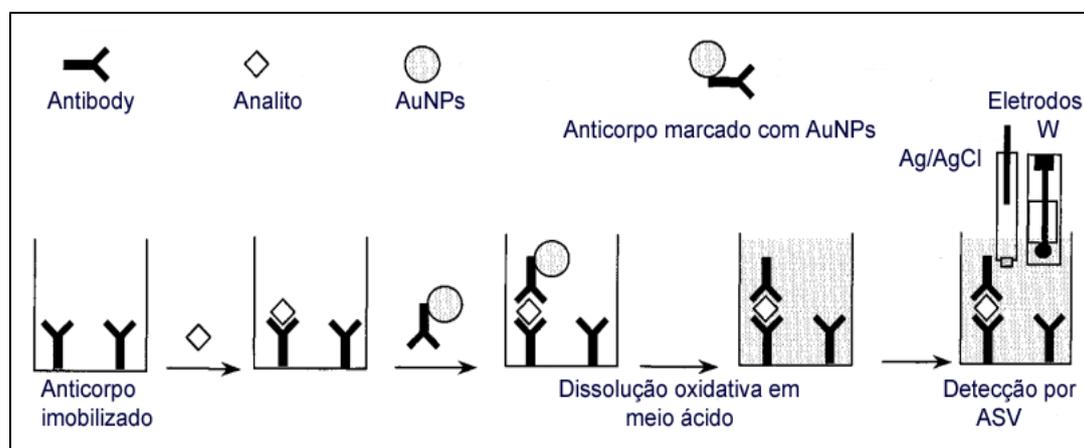
O método de Turkevich<sup>65</sup> produz AuNPs monodispersas em solução aquosa de 20 nm a partir de íons Au<sup>3+</sup> que são reduzidos a Au<sup>0</sup> na presença de citrato de sódio, o qual age como agente redutor e como camada de revestimento. Dessa forma, átomos de ouro são formados até que a solução se torne supersaturada formando partículas sub-micrométricas. Essa metodologia tem sido usada por vários trabalhos<sup>72-76</sup> para formar AuNPs utilizadas como marcadores de anticorpos em metaloimunoensaios.

Metaloimunoensaio são imunoensaios baseados na marcação por um metal, o qual foi utilizada pela primeira vez em 1970 por Cais e colaboradores<sup>77</sup> com intuito de contornar os problemas associados com os radioisótopos usados como marcadores. A marcação baseada em metais pode ser classificada de acordo com a natureza química, por exemplo, organometálicos, metaloproteínas ou suspensões coloidais metálicas.

Com relação a sua determinação quantitativa, várias técnicas analíticas são adequadas para esse fim, por exemplo: espectroscopia de absorção atômica, ressonância plasmonica de superfície, microscopia de varredura, espectroscopia de Raman e técnicas eletroquímicas como polarografia ou voltametria. Metaloimunoensaio com detecção eletroquímica oferecem várias vantagens devido ao pequeno volume utilizado nas análises, podem ser feitas eventualmente em meios turvos, baixo custo de instrumentação, alta sensibilidade e portabilidade<sup>1</sup>.

Das aplicações de AuNPs em metaloimunoensaio destaca-se o estudo efetuado por Murielle e colaboradores<sup>77</sup>, cujo trabalho desenvolvido foi baseado em um imunoensaio eletroquímico utilizando AuNPs como marcador. As nanopartículas foram determinadas indiretamente por voltametria de

redissolução anódica depois da dissolução oxidativa em meio ácido (solução de HBr e Br<sub>2</sub>). O método foi avaliado por imunensaio não competitivo tipo sanduíche **Figura 1.11** para IgG, e uma concentração tão baixa quanto  $3 \times 10^{-12}$  mol L<sup>-1</sup> foi determinada, o qual foi competitivo como os ensaios ELISA colorimétrico ou com imunensaio baseado em marcação fluorescente.



**Figura 1.11:** Representação esquemática do ensaio não competitivo tipo sanduíche utilizando AuNPs. (ASV) voltametria por redissolução anódica. (W) eletrodo de trabalho.<sup>77</sup>

A partir desse trabalho, vários estudos na literatura<sup>78</sup> reportaram a detecção de ouro com dissolução em meio de HBr e Br<sub>2</sub>. No entanto, devido a toxicidade da solução HBr e Br<sub>2</sub> Merkoçi<sup>72, 79</sup> e colaboradores desenvolveram um ensaio para detectar AuNPs sem a necessidade de dissolução em meio ácido, o qual foi utilizado neste trabalho.

O ensaio baseou-se na adsorção de AuNPs sobre a superfície do eletrodo seguido pela oxidação eletroquímica em HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> a um potencial de 1,25 V vs Ag/AgCl. Os íons tetracloroaurato gerados próximo a superfície do eletrodo foram detectados por voltametria de pulso diferencial<sup>79</sup>. Desta forma, um limite de  $1,8 \times 10^8$  AuNPs por mL nesse ensaio foi obtido **Figura 1.12**.

A detecção eletroquímica de AuNPs, em ensaios imunológicos, combinada com partículas magnéticas (MBs) tem se mostrado muito útil para a detecção de vários tipos de analitos. Isso se deve, principalmente, a versatilidade, alta área superficial, estabilidade física e química, baixa toxicidade e alta biocompatibilidade exibida pelas MBs<sup>80</sup>.

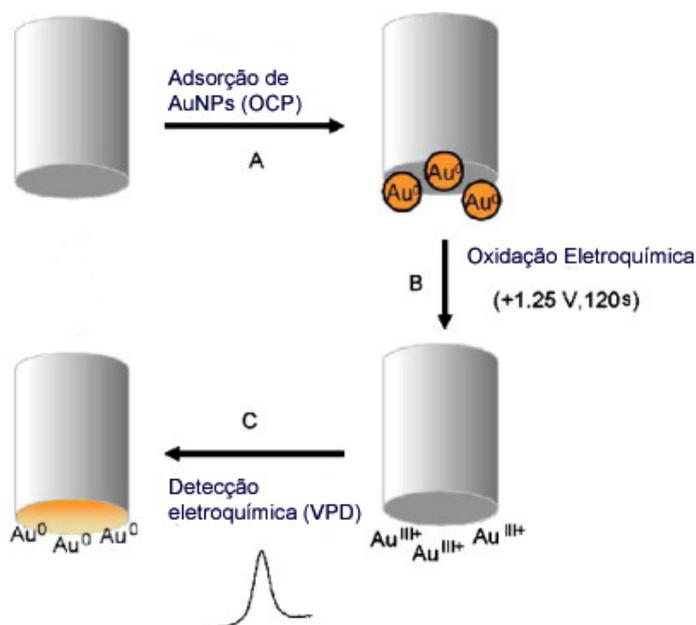
MBs consiste de um núcleo paramagnético ou superparamagnético com uma camada externa polimérica adequada para imobilização de biomoléculas. O núcleo magnético geralmente é formado por óxido de ferro, entre eles magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) ou maguemita ( $\gamma \text{Fe}_2\text{O}_3$ ), os quais se destacam pela biocompatibilidade comprovada em biomarcação e bioseparação<sup>80</sup>.

O desenvolvimento de coberturas para o núcleo magnético das MBs foi necessário devido a algumas limitações das partículas, como: alta energia de superfície que leva a agregação, elevada atividade química que favorece a oxidação, perdas das propriedades magnéticas e dispersabilidade quando expostas ao ar e biodegradação com subsequente mudança nas propriedades magnéticas. Consequentemente, camadas protetoras, compostas principalmente de agarose, celulose, sílica, silicone, vidro poroso, mica ou poliestireno foram desenvolvidas para proteger e preservar a estabilidade dos óxidos de ferro das MBs. Essa camada também permite a posterior modificação com vários tipos de moléculas e biomoléculas promovendo, assim, as MBs como sendo elementos de reconhecimento em sensoriamento químico e bioquímico em diversas matrizes. Além disso, atualmente há MBs comercialmente disponíveis<sup>81</sup> modificadas com biomoléculas o que permite o uso delas em diferentes bioensaios. Assim, MBs funcionalizadas com anticorpos, estreptavidina adequada para captura de biomoléculas biotiniladas, proteína A ou proteína G as quais se ligam a anticorpos, oligonucleotídeos, ou proteínas de afinidade podem ser compradas em diferentes companhias<sup>81</sup>.

A modificação de MBs tem resultado em uma prática importante do ponto de vista analítico devido a vários fatores, como: tempo de reação curto entre o analito dissolvido e biomolécula imobilizada na partícula a qual é favorecido pela fácil dispersão destas; fácil miniaturização do sistema experimentado usando MBs como carreador em fase sólida; redução do volume requerido de reagentes e produção de dejetos e, finalmente, baixos limites de detecção e tempo de ensaio<sup>80</sup>.

Devido a todas essas propriedades, MBs constituem uma plataforma atrativa para concepção de biossensores eletroquímicos. Assim, combinada com metaloimunoensaios, o método é visto como sendo de especial interesse

para o futuro de aplicações em análise em campo, dado a robustez do sistema eletroquímico e particularmente das NPs e MBs empregadas nos ensaios.



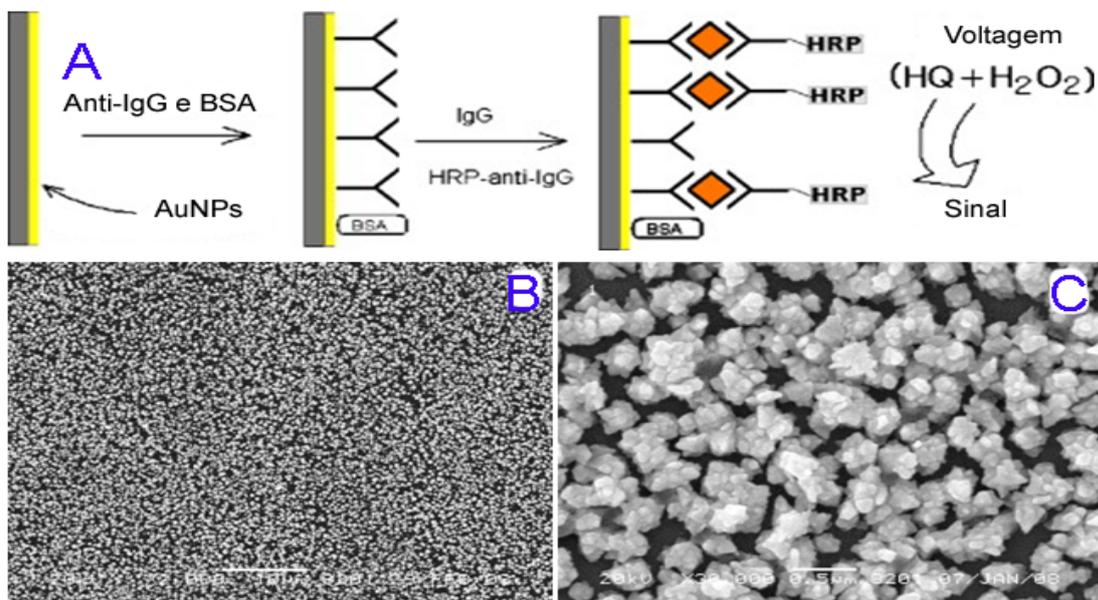
**Figura 1.12:** Protocolo eletroanalítico para detecção por voltametria de pulso diferencial de AuNPs sobre a superfície de um eletrodo. (OCP) potencial de circuito aberto e (VPD) voltametria de pulso diferencial. <sup>79</sup>.

#### 1.4.2 Revisão bibliográfica de imunossensores eletroquímicos baseados em AuNPs e MBs.

As excelentes propriedades elétricas de AuNPs permitiram a sua utilização em biossensoriamento eletroquímico com baixos limites de detecção de proteínas. Por exemplo, Wang e colaboradores<sup>82</sup> conseguiram aumentar o desempenho de um imunossensor modificando eletroquimicamente a superfície de carbono vítreo com aglomerado de nanopartículas de ouro com formato de espinhos, o qual serviu como substrato para imobilizar sondas protéicas. Depois da captura do alvo e formado o complexo com o conjugado Ac-HRP, o eletrodo foi imerso em solução de hidroquinona para medidas amperométricas. Na presença de HRP e peróxido de hidrogênio a hidroquinona é convertida em benzoquinona, a qual por sua vez é eletroquimicamente reduzida na superfície do eletrodo. Os valores de corrente obtidos foram

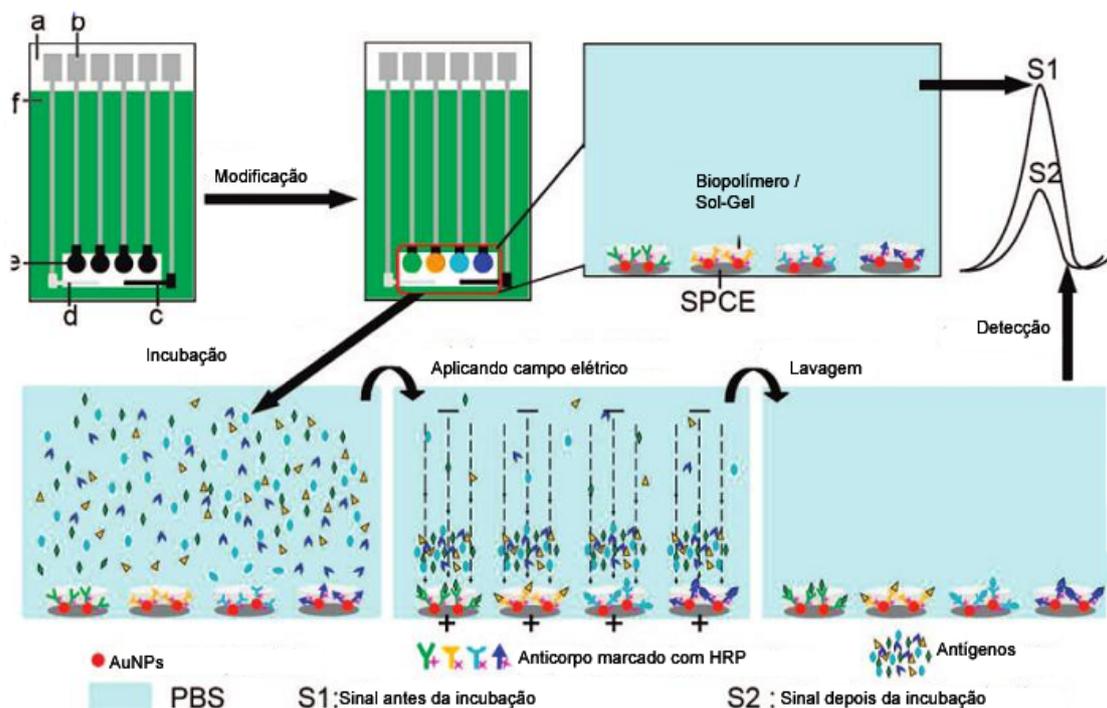
proporcionais à concentração do alvo capturado. Devido à excelente condutividade e alta área superficial da superfície modificada o imunossensor mostrou rápida resposta, larga faixa linear, boa reprodutibilidade e estabilidade

**Figura 1.13.**



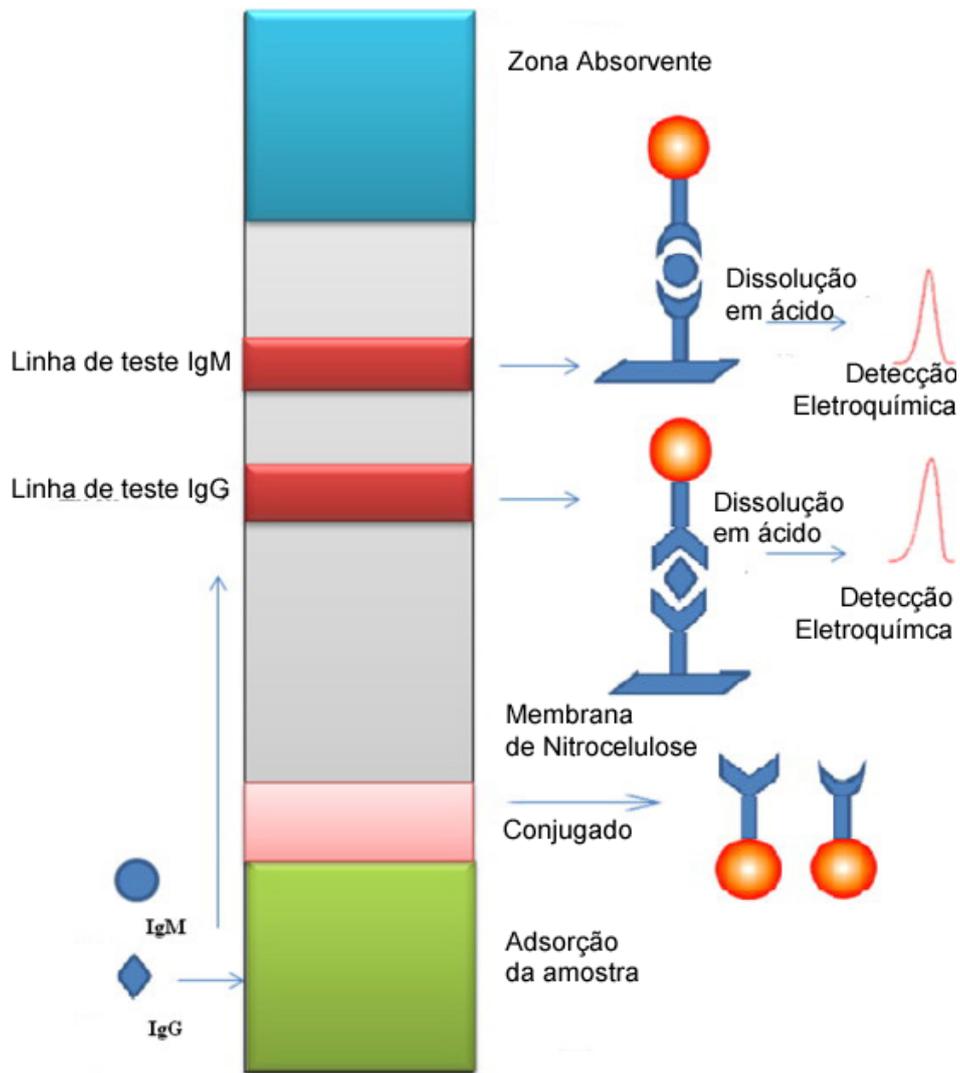
**Figura 1.13:** (A) Representação esquemática do imunoensaio eletroquímico sobre a superfície do eletrodo. (B - C) Micrografia da superfície modificada com AuNPs em diferentes escalas.<sup>82</sup>

Em outro trabalho, Wu e colaboradores<sup>83</sup> desenvolveram um novo imunossensor baseado na resposta eletroquímica direta de HRP para detectar biomarcadores de câncer. O dispositivo sensor foi preparado por meio da imobilização do conjugado Ac-HRP com AuNPs em um eletrodo modificado com biopolímero/sol-gel **Figura 1.14**. Após a formação do imunocomplexo a resposta diminuiu devido o aumento do bloqueio e da impedância da superfície. Em condições ótimas o método pôde detectar simultaneamente os antígenos 153, 125, 199 e carcinoembrionico na faixa de 0,084 a 16; 0,11 a 13 e 1,15 a 15 U mL<sup>-1</sup> e 0,16 a 9,2 ng mL<sup>-1</sup> com tempo de detecção menor que 5 min e limite de detecção de 0,06; 0,03 e 0,10 U mL<sup>-1</sup> e 0,04 ng mL<sup>-1</sup>, respectivamente.



**Figura 1.14:** Representação esquemática do arranjo de eletrodos e do imunoenensaio. a) folha de nylon, b) tinta de prata c) eletrodo auxiliar de grafite d) eletrodo de referência Ag/AgCl e) eletrodo de grafite f) isolante elétrico.<sup>83</sup>

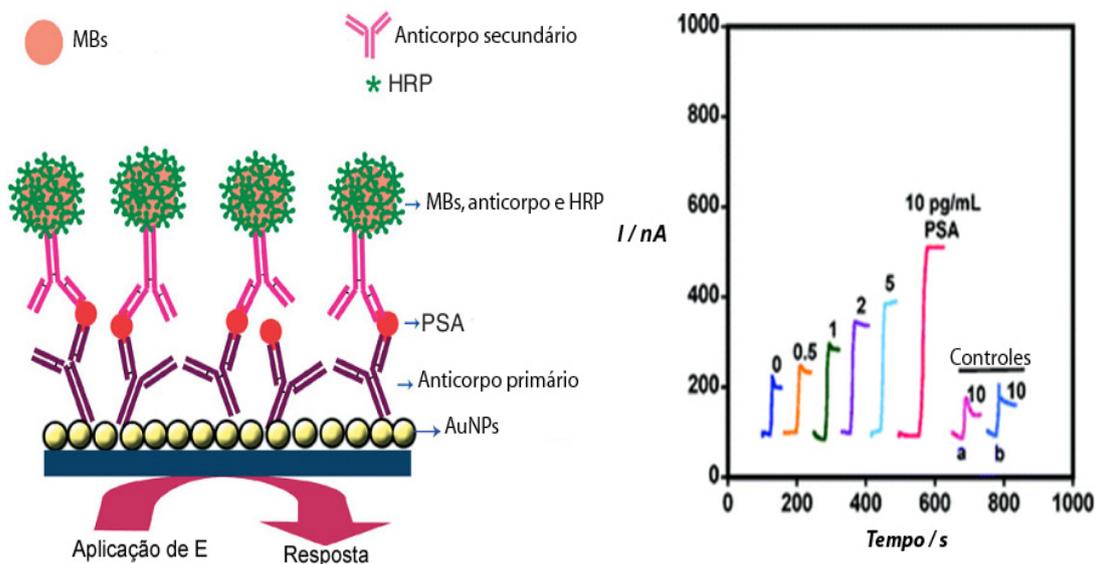
Mao e colaboradores<sup>84</sup> desenvolveram um imunoenensaio baseado em AuNPs como marcadores e tiras cromatográficas (TC) de nitrocelulose, **Figura 1.15**. IgG de coelho e IgM humano foram utilizados com alvo modelo. A estratégia foi formar o imunocomplexo AuNPs-anti-IgG/IgG/anti-IgG ou AuNPs-anti-IgM/IgM/anti-IgM sobre TC, assim, nas zonas de teste onde o complexo foi formado as NPs capturadas foram determinadas por voltametria de redissolução anódica após a formação dos íons  $Au^{3+}$  em HBR/ $Br_2$  com eletrodos de pasta de carbono. Dessa forma, limites de detecção para IgG e IgM de  $1,0$  e  $1,5 \text{ ng mL}^{-1}$  e uma faixa linear de trabalho de  $2,5$  a  $250 \text{ ng mL}^{-1}$ , foram obtidos.



**Figura 1.15:** Representação esquemática do imunoenensaio eletroquímico baseado no teste imunocromatográfico e AuNPs.<sup>84</sup>

Rusling e colaboradores<sup>71</sup> utilizaram um marcador híbrido para aumentar a sensibilidade dos imunoenaios eletroquímicos. Utilizando o efeito combinado da atividade electrocatalítica de AuNPs e a utilização de um marcador híbrido, isto é, MBs modificado com Ac secundário ( $Ac_2$ ) e HRP ( $MBs/Ac_2/HRP$ ) em uma razão 1:120, foi possível obter uma sensibilidade de  $31,5 \mu A mL ng^{-1}$  e um limite de detecção de  $0,5 pg mL^{-1}$  para antígeno específico da próstata (PSA) em soro. O protocolo do imunoenensaio consistiu **Figura 1.16** na modificação da superfície de carbono pirolítico com poli-dimetilalil amônio seguida da adsorção de AuNPs. Sobre esta superfície Ac primário ( $Ac_1$ ) foi imobilizado. A captura do alvo foi realizada expondo  $Ac_1$  em soro contendo PSA, em sequência

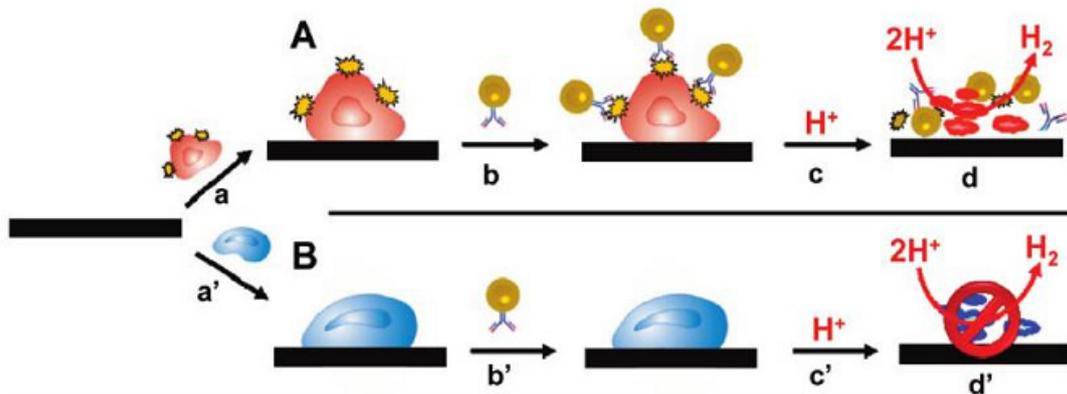
MBs/Ac<sub>2</sub>/HRP foi adicionado a fim de formar o complexo Ac<sub>1</sub>/ MBs/Ac<sub>2</sub>/HRP, neste caso as MBs serviram, exclusivamente, como carreadores protéicos.



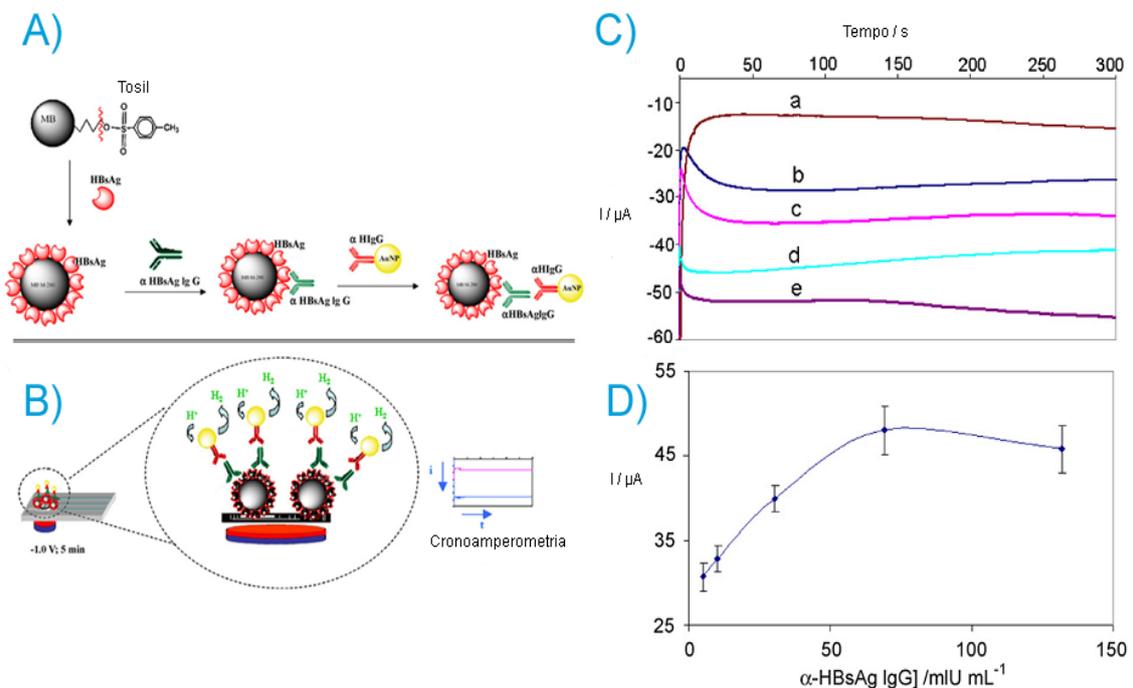
**Figura 1.16:** Representação esquemática do imunossensor e detecção amperométrica do alvo PSA.<sup>71</sup>

Escosura-Muñiz e colaboradores<sup>73, 74</sup> desenvolveram uma nova estratégia para detectar AuNPs em imunoenaios eletroquímicos, a qual foi baseada na evolução de H<sub>2(g)</sub> catalisada por AuNPs, **Figura 1.17**. Células tumorais HMy2 linhagem B que expressam moléculas HLA-DR na superfície, foram adsorvidas sobre eletrodos impressos de carbono por 24h a 37°C. O imunocomplexo AuNPs- $\alpha$ DR/HLA-DR foi formado especificamente com a células HMy2 depois de 30 min a 37 °C de incubação, em seguida, uma alíquota de HCl 1mol L<sup>-1</sup> foi adicionada à superfície do eletrodo. Posteriormente, um potencial de pré-condicionamento foi aplicado e a resposta analítica foi obtida após da aplicação de um potencial de +1,35 V por 5 min. Assim, os autores atingiram um limite de detecção de 4000 células e reprodutibilidade com desvio padrão relativo de 7%. Em outro trabalho<sup>75</sup>, os autores reportaram um imunoenasiao tipo sanduíche usando MBs como plataforma de reação imunológica e AuNPs como marcador eletroativo para detectar anticorpo anti-antígeno da superfície do vírus da hepatite B ( $\alpha$ -HBsAg). A detecção eletroquímica de AuNPs foi também baseada na evolução de

evolução  $H_2(g)$  em meio ácido, sem dissolução previa de AuNPs **Figura 1.18**. Os resultados obtidos foram promissores, segundo os autores, para um sistema de biomonitoramento totalmente integrado, além disso, limite de detecção em soro humano de  $3 \text{ mIU mL}^{-1}$  para  $\alpha\text{-HBsAg}$  e coeficiente de correlação com método padrão de 6,5 % foram obtidos.



**Figura 1.17:** Células tumorais linhagem HMy2 que expressam moléculas HLA-DR na superfície comparado com uma linhagem que é negativo para o marcador AuNPs- $\alpha$ DR. a célula alvo positivo, a' célula alvo negativo.<sup>74</sup>



**Figura 1.18:** A) Representação esquemática do procedimento experimental realizado. HBsAg capturado na superfície das MBs, incubação com soro humano contendo anticorpos IgG  $\alpha\text{-HBsAg}$  e reconhecimento com AuNPs conjugado com anticorpos de cabra IgG  $\alpha$ - humano. B) Esquema do procedimento de detecção baseada nas propriedades eletrocatalíticas de

geração de hidrogênio. C) Respostas amperométricas para diferentes concentrações do alvo e D) Curva analítica obtida a partir dos valores de corrente em C.<sup>75</sup>

Nossa intenção nesta revisão bibliográfica foi mostrar as novas estratégias desenvolvidas nos últimos anos utilizando AuNPs e MBs, seja combinado ou não, para detectar diferentes alvos. A principal importância dessas metodologias são os baixos limites de detecção, alta sensibilidade e especificidade alcançadas nos ensaios. Além disso, sistemas mais robustos são desenvolvidos quando são combinados, detecção eletroquímica, AuNPs e MBs. Dessa forma, o emprego de AuNPs e MBs no desenvolvimento de dispositivos é de fundamental importância, no que se refere a aplicação em amostras reais e análise em campo.

## 1.5 Objetivos

O objetivo deste trabalho foi desenvolver dois tipos de imunossensores aplicados em amostras de interesse agrônômico e de saúde. Para tanto serão estudados um imunossensor piezométrico para detectar uma cisteína peptidase produzida pela *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (CPXaC) utilizando um anticorpo policlonal anti-CPXaC, obtido em coelho, imobilizado sobre monocamadas auto-organizadas. Adicionalmente foi investigado um imunossensor para detectar *Salmonella* em leite utilizando nanopartículas de ouro como marcador eletroquímico e partículas magnéticas para a fase de separação e pré-concentração.

# **Procedimento Experimental**

## 2. Procedimento Experimental

### 2.1 Instrumentação

#### Microbalança de Cristal de Quartzo

O ressonador utilizado foi um cristal de quartzo com corte do tipo AT de 16 mm de diâmetro (Q-Sense, Suécia) com frequência fundamental de oscilação de 5 MHz e  $C_f$  de 17,7 Hz ng<sup>-1</sup> cm<sup>-2</sup> que continha em um dos lados da superfície um filme de ouro polido de 100 nm de espessura. As medidas foram feitas em uma microbalança de cristal de quartzo Q-SENSE E4 (Suécia) utilizando uma bomba peristáltica ISMATEC IPC (Suíça).

#### PM-IRRAS

Medidas de espectroscopia de absorção e reflexão no infravermelho com polarização modulada (PM-IRRAS) foram realizadas com um espectrofotômetro KSV PMI 550 (KSV instrument Ltd, Helsinki, Finlândia).

#### Ângulo de Contato

Para as medidas de ângulo de contato foi utilizado um equipamento da KSV modelo CAM 101 equipado com uma câmera CCD (KGV-5000). Os valores de ângulo de contato foram calculados com um programa próprio (KSV CAM 2008) do equipamento.

#### Voltametria de pulso diferencial

Os experimentos eletroquímicos foram realizados usando um potenciostato Autolab 20 (Eco-Chemie, Holanda) conectado a um computador pessoal utilizando um pacote de software GPS 4.9 (General Purpose sistema eletroquímico).

## Caracterização por microscopia eletrônica

Imagens foram obtidas com Microscópio eletrônico de transmissão (MET) Jeol JEM-2011 (Jeol Ltd, Japão) e com Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FE) (Merlin, Carl Zeiss).

## 2.2 Materiais e Métodos

Ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA), 6-mercapto-1-hexanol (MHO), dicloridrato de cistamina (Cist), etanolamina, Tween-20<sup>®</sup>, N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), ácido 4-morfolino etanosulfônico (MES) e albumina de soro bovina 99% foram da Sigma (USA). Leite desnatado (Molico, Néstle) foi adquirido no comércio local. Hidrogeno fosfato de sódio (NaHPO<sub>4</sub>), dihidrogênio fosfato de sódico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), cloreto de sódio (NaCl) cloreto de potássio (KCl) foram obtidos da J. T. Baker (USA).

Esferas magnéticas modificadas com o anticorpo policlonal primário anti-*Salmonella* MBs-SAc (Prod. N ° 710,02) foram adquiridas da Dynal Biotech ASA (Oslo, Noruega) e anticorpo policlonal secundário anti-*Salmonella* produzido em coelho (Prod. N ° 01.91.99) foi da Biogen Científica (Madrid, Espanha). *Salmonella* enterica subsp. enterica serovar Typhimurium LT2 (CECT 722T) e *Escherichia coli* K-12 (CECT 433) foram adquiridos a partir de estirpes "Colección Española de Cultivo Tipo (CECT)", HAuCl<sub>4</sub> • 3H<sub>2</sub>O, 99,9 %, citrato trissódico e borato de sódio foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Os tampões foram preparados em água deionizada: tampão PBS pH 7,2 10 mmol L<sup>-1</sup> com 2,7 mmol L<sup>-1</sup> de KCl, e 137 mmolL<sup>-1</sup> de NaCl; tampão PBST (PBS, pH 7,2 tampão com Tween 20% (m / v)). Tampão borato de sódio 50 mmol L<sup>-1</sup> pH 9,0.

As amostras, para análise em MEV, foram preparadas usando glutaraldeído e hexametildissilazano (HMDS) da Sigma-Aldrich (Espanha). Todas as soluções usadas nos procedimentos analíticos foram preparadas com

água deionizada obtidas em um sistema de purificação Milli-Q da Millipore (USA).

Para os estudos de voltametria de pulso diferencial foram utilizado eletrodos serigrafados de carbono constituídos de: eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e contra eletrodo. O tamanho total do sensor era de 29 mm × 6,7 mm e o eletrodo de trabalho de 3 mm de diâmetro fabricado em uma máquina de serigrafia semi - automática DEK248 (DEK International, Switzerland). Foram utilizados para este processo uma folha de poliéster Autostat HT5 (McDermid Autype, UK), tinta de carbono Electrodag 423SS, tinta de Ag/AgCl Electrodag 6037SS e tinta isolante 7000 Minico (Acheson Industries, The Netherlands). Foram três as etapas para fabricação do SPCE: Primeira, a camada de grafite foi impressa sobre a folha de poliéster, utilizando a máquina de serigrafia. Depois a superfície foi curada por 15 min a 95°C e uma camada de prata e cloreto de prata (Ag/AgCl) foi impressa e curada por 15 min a 95 °C. Por fim, a tinta isolante foi impressa e curada a 95 °C por 20 min.

Um ímã (3 milímetros de diâmetro,) também foi utilizado para acumular o complexo MBs-SAc/S/SAc-AuNPs sobre o eletrodo de trabalho durante as medições eletroquímicas.

### *2.2.1 Limpeza dos Cristais*

Antes dos experimentos os cristais de quartzo foram limpos com uma solução piranha recém preparada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (concentrado):H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% 3:1 (V / V) , por 1 min. Depois foram lavados com água destilada e secos mediante aplicação de fluxo de ar.

### *2.2.2 Proteína recombinante e anticorpo policlonal*

A proteína recombinante e o anticorpo policlonal utilizados foram fornecidos pelo professor Flávio Henrique Silva do departamento de Genética e Evolução. As metodologias utilizadas, para expressão da proteína e produção dos anticorpos, foram descritas a seguir.

A região de codificação para a cisteína peptidase foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando DNA extraído

de *X. citri* como Xac\_EcoRI\_F: 5'CGGAATTCCATGAACACGCACCGTTCGC TC3' e Xac\_XbaI\_R: 5'CTCTAGAGCGTACACCACGTCGGCGCCGAT 3' concebido com base na sequência depositada no GenBank (número Adesão AE011926). O produto de PCR foi purificado e digerido com as enzimas de restrição EcoRI e XbaI (sítios sublinhados) e o fragmento foi ligado ao vetor de expressão pPICZαC (Invitrogen), previamente digerido com as mesmas enzimas. O clone recombinante foi linearizado com a enzima de restrição PmeI e o DNA foi transformado em cepa de células de *Pichia pastoris* (KM71H) por electroporação. O clone KM71HHISCPXaC foi selecionado, cultivado e induzido à expressão de acordo com o manual do Kit Expression EasySelect *Pichia* (Invitrogen). O sobrenadante contendo a proteína secretada HISC PXaC foi purificado por cromatografia de afinidade em coluna de níquel Ni-NTA superfluxo (Qiagen).

A produção do anticorpo policlonal anti-CPXaC em *Oryctolagus cuniculus* (coelho) foi realizada com modificações do protocolo padrão.<sup>85</sup> Resumidamente, a primeira imunização foi realizada com a inoculação subcutânea de 100 ug da proteína recombinante purificada, juntamente com adjuvante completo de Freund. Após 7 dias, 14 e 21, as inoculações subcutâneas novas foram feitas com 50ug de CPXaC em combinação com adjuvante incompleto de Freund. Após 31 dias, 50mL de sangue intracardíaco foi recolhido, centrifugado a 4000 rpm, e o soro foi separado e armazenado a 4°C. A purificação da fração IgG do anticorpo policlonal foi realizada utilizando uma coluna cromatográfica de Adsorção Tiofílica (Clontech). O anticorpo policlonal foi, então, dialisado e quantificados com o Protein Assay Kit BCA (Pierce).

### 2.2.3 Cepas bacterianas, preparação de inóculos

Culturas de *Escherichia* e *Salmonella* liofilizadas foram reavivadas em triptona Soy Broth (TSB, Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Reino Unido). As culturas de reserva de ambas as estirpes foram preparadas em agar de soja tríplica (Oxoid), incubadas a 37 °C durante 24 h, e armazenadas a 4 °C durante um

tempo máximo de 9 semanas. As culturas de reserva foram subcultivadas em 10 mL de caldo de soja tríptica (TSB) e incubadas a 37 °C durante 20 h. Após a incubação, o caldo foi espalhado com alça descartável em placas de TSA (Trypticase Soy Agar), sendo as mesmas incubadas a 37 °C durante 20 a 24 h. Subsequentemente, as suspensões de células foram preparadas em 10 mL de PBST para se obter  $10^{9,0}$ - $10^{9,5}$  CFU mL<sup>-1</sup>. Os tubos foram colocados em um banho de água a 100 °C durante 15 min e foram arrefecidos até à temperatura ambiente antes do teste imunológico. Para determinar a concentração de células antes do tratamento térmico, diluições foram preparadas em água peptona tamponada (Oxoid). Subsequentemente, 1 mL destas diluições foi colocado para duplicar em TSA (Oxoid) e incubados a 37 °C durante 24 h.

#### *2.2.4 Síntese de nanopartículas de ouro (AuNPs)*

A síntese Turkevich leva a produção AuNPs de 20 nm e foi utilizada neste trabalho. Primeiro, uma solução de 0,510 mL HAuCl<sub>4</sub> (1% m / v) em 49,0 mL água Milli-Q foi aquecida a 150 ° C e agitou-se. Quando a solução estava a ferver, 5 mL de citrato de sódio (40 mmol L<sup>-1</sup>) foram adicionados rapidamente. Nos próximos 10 min de aquecimento e agitação a solução mudou de cor de amarelo para vermelho pálido, a qual foi agitada durante mais 15 min a 25 ° C e após esta etapa, as AuNPs estavam prontas para serem usadas. AuNPs foram protegidas da luz e armazenadas a 4 °C<sup>23</sup>.

#### *2.2.5 Avaliação de AuNPs por MET*

As análises por MET das nanopartículas de ouro foram feitas depois da adição de 4 µL da solução de AuNPs sobre um disco de cobre. As amostras foram secas a temperatura ambiente por 2 horas. Imagens obtidas foram analisadas em um programa livre de imagens, que permitiu medir o tamanho das nanopartículas.

### 2.2.6 Imobilização de anti-CPXaC sobre os cristais de quartzo

Para imobilização de anti-CPXaC sobre a superfície de ouro dos cristais de quartzo, foram utilizadas três estratégias, **Figura 3.1**. Estratégia de Imobilização 1 (Im-1): Os cristais de quartzo foram imersos em uma solução  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  de ácido 11-mercaptoundecanóico em etanol por 12 h a temperatura ambiente. Após esse tempo, os cristais foram lavados com etanol e em água ultra pura. Os grupos carboxila sobre a superfície do cristal modificado foram ativados utilizando uma solução de  $200 \text{ mmolL}^{-1}$  de EDC e  $50 \text{ mmolL}^{-1}$  de NHS em  $0,1 \text{ molL}^{-1}$  de MES pH 6,5 por 1 h a temperatura ambiente. Em seguida, as superfícies foram lavadas com tampão PBS pH 7,2 e secas com jato de  $\text{N}_{2(g)}$  e incubadas em uma solução com  $86 \mu\text{g mL}^{-1}$  da anti-CPXaC em PBS por 2 h a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  para formar ligação amida entre a superfície ativada e os grupos amino do anticorpo. Após esse tempo, os cristais foram lavados com PBS com 0,01% de Tween 20<sup>®</sup> (PBST) e adicionou-se  $100 \mu\text{L}$  de etanolamina  $100 \text{ mmolL}^{-1}$  em PBS pH 7,2 por 30 min para desativar os grupos carboxila ativado com EDC/NHS. Por fim, o cristal modificado foi exposto a uma solução 0,01% de leite desnatado por 30 min para bloquear as ligações não específicas, em seguida o cristal foi lavado com PBST, seco e estocado a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Procedimento de imobilização 2 (Im-2): Neste ensaio, o cristal de quartzo foi modificado com uma mistura de MUA e MHO. Para isto, o mesmo procedimento descrito em Im-1 foi usado com exceção da solução formadora da monocamada, a qual foi uma solução etanólica de MUA  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e  $1,0 \times 10^{-2}$  de MHO.

O procedimento de imobilização 3 (Im-3) consistiu na modificação do cristal de quartzo com Cistamina. Uma solução aquosa com  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  Cist foi colocada sobre a superfície de ouro do cristal por 12 h a temperatura ambiente. Depois da lavagem uma solução contendo  $86 \mu\text{g mL}^{-1}$  da anti-CPXaC,  $200 \text{ mmol L}^{-1}$  de EDC e  $50 \text{ mmolL}^{-1}$  de NHS em PBS foi adicionada e mantida por 2h a  $4^\circ\text{C}$ <sup>86</sup>. Em seguida, como acima descrito, o cristal foi lavado com PBST, tratado com etanolamina e leite desnatado, lavado com PBS, seco e estocado a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### *2.2.7 Conjugação de anticorpos anti-Salmonela secundário com AuNPs*

Primeiro, 100  $\mu\text{L}$  de anti-Salmonela secundário (SAC) ( $1\text{mg mL}^{-1}$ ) foi adicionado com agitação suave em 1,5 mL de suspensão de ouro coloidal com pH ajustado para 9,0 utilizando tampão de borato 50 mM. Este foi incubado durante 20 min a  $25^\circ\text{C}$  a 650 rpm e, depois disso, 100  $\mu\text{L}$  de BSA a 5% (em água Milli-Q) foi adicionado e incubado novamente durante 20 min a  $25^\circ\text{C}$  a 650 rpm. Finalmente, a suspensão de SAC-AuNP foi centrifugada durante 20 min a 14.000 rpm a  $4^\circ\text{C}$  e suspenso em 1,5 mL em PBS com BSA 0,3% de acordo com a otimização do processo de imunoensaio explicado abaixo.

### *2.2.8 Preparação das amostras MBs-SAc e MBs-SAc / S para MEV*

Após a incubação de bactérias com MBs-SAc, como descrito no item 2.2.10, a MBs-SAc / S foi mantida em suspensão em PBS e tratadas com solução de glutaraldeído, depois com etanol e ressuspensão em solução HMDS. Este protocolo é bem adequado para a fixação das bactérias em suspensão. Micrografias foram adquiridas após adição de 4  $\mu\text{L}$  de amostra em um suporte de  $\text{SiO}_2$  0,5 x 0,5mm.

### *2.2.9 Imunosensor piezelétrico*

O imunosensor piezelétrico foi realizado por adição em fluxo de diferentes concentrações da CPXaC em PBS sobre o cristal modificado com anti-CPXaC oscilando na sua frequência fundamental. Após observar a queda da frequência esperou-se a sua estabilização e deixou o sistema em repouso

por 30 min parando o fluxo. Em sequência, o fluxo foi religado para lavagem da superfície.

### 2.2.10 *Magneto-imunoensaio*

O magneto-imunoensaio (**representação esquemática na Figura 3.10 A**) foi realizado por mistura de 500  $\mu\text{L}$  de solução de diferentes CFUs de *Salmonella* mortas (diluída em PBST em tubos Eppendorf de 1,5 mL) com 10  $\mu\text{L}$  MBs-SAc. A mistura foi incubada durante 30 min a 25 °C com 700 rpm para formar a MBs-SAc / S magneto-imunoconjugado. Após isto, a MBs-SAc / S foi separada a partir do sobrenadante, colocando os tubos eppendorf em um separador magnético durante 3 min e, em seguida, o sobrenadante foi descartado. A etapa de lavagem foi realizada durante 2 min com PBST a 25 °C (700 rpm) e MBs-SAc / S foram separados a partir do sobrenadante. Depois de duas etapas de lavagem, a MBs-SAc / S magneto-imunoconjugado foi ressuspensão com 140  $\mu\text{L}$  de AuNPs modificados com anticorpo (SAc-AuNPs) e incubadas durante 35 min a 25 °C e 700 rpm. Em seguida, MBs-SAc/S/SAc-AuNPs formado foi separada magneticamente de novo, e lavados duas vezes como antes. Finalmente, MBs-SAc/S/SAc-AuNPs foi ressuspensão em 150  $\mu\text{L}$  de PBS e usadas para análise eletroquímica.

### 2.2.11 *Medidas de QCM e eletroquímicas*

CPXaC foi detectada por QCM após sua adição na célula, contendo o cristal modificado com anti-CPXaC sob fluxo de PBS a uma velocidade de 200  $\mu\text{L min}^{-1}$  a 25 °C. Os valores de frequência e dissipação de energia foram monitorados no 3º harmônico.

O MBs-SAc/S/SAc-AuNPs foi detectado usando SPCEs e a detecção eletroquímica foi baseada no sinal do marcador AuNPs (**ver figura esquemática 3.10 B**). Uma alíquota de 25  $\mu\text{L}$  de MBs-SAc/S/SAc-AuNPs e 25  $\mu\text{L}$  de HCl 0,2 molL<sup>-1</sup> foi adicionada à superfície SPCE ao aplicar um campo

magnético abaixo do SPCE. A detecção eletroquímica foi realizada com os parâmetros anteriormente otimizados por Ambrosi e colaboradores: Primeiro aplicou-se um potencial fixo de 1,25 V por 120 s. Imediatamente após a oxidação eletroquímica, os íons  $\text{Au}^{3+}$  gerados foram determinados por voltametria de pulso diferencial na faixa de 1,25 a 0 V a  $33,5 \text{ mV s}^{-1}$  (largura de pulso 10 mV e amplitude de 50 mV). O que resultou em um sinal analítico devido à redução dos íons  $\text{Au}^{3+}$ .

# **Resultados e Discussão**

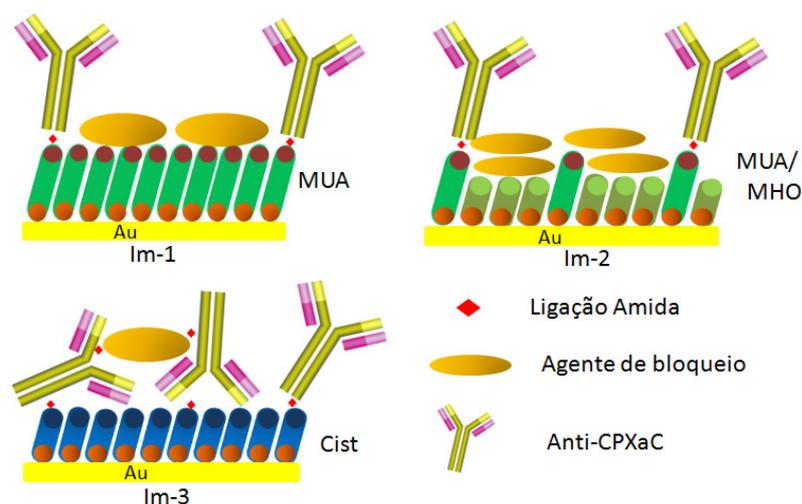
### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Imunossensor *Piezelétrico*

##### 3.1.1 *Imobilização do anticorpo anti-CPXaC sobre o cristal de quartzo*

As três estratégias para imobilização da anti-CPXaC foram avaliadas por adição de CPXaC ao cristal de quartzo modificado e monitorando a variação da frequência ressonante  $\Delta f$  e fator de dissipação de energia  $\Delta D$  em tempo real. Nesse caso o cristal modificado foi colocado dentro de uma célula sob fluxo de PBS. Após a estabilização da frequência CPXaC foi adicionada em PBS, a **Figura 3.2 (A e B)** mostra a variação da frequência ressonante e dissipação de energia em função do tempo antes e após a injeção de  $645 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  de CPXaC em diferentes cristais modificados com anti-CPXaC (Im-1, Im-2 e Im-3). Como pode ser visto, quando CPXaC foi adicionada uma diminuição da frequência ressonante foi observada em todos os cristais modificados e esta diminuição está relacionada com o processo de interação antígeno e anticorpo.

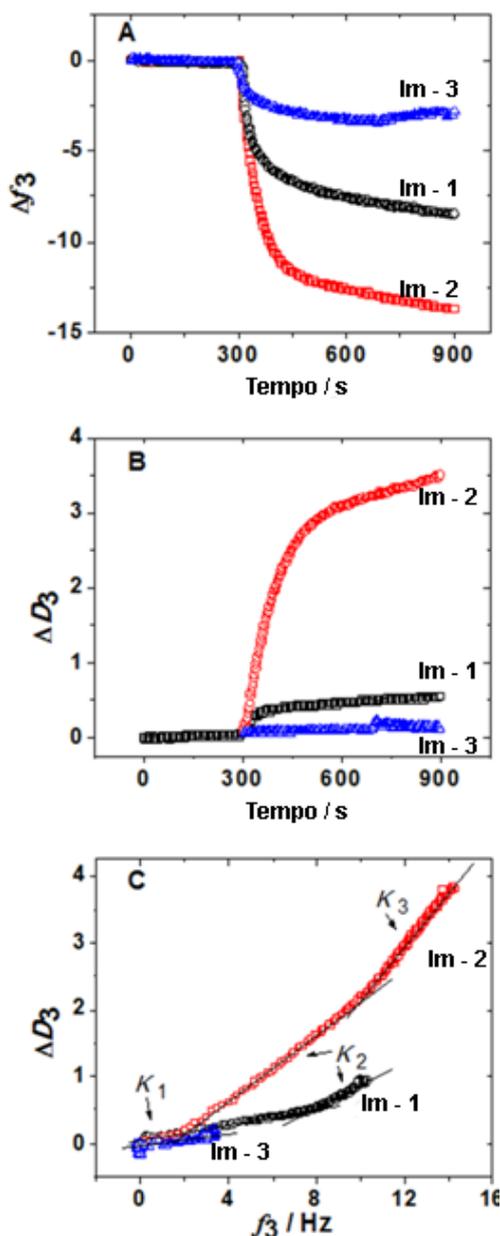
Maior diminuição na frequência ressonante foi observada em cristais modificados com MUA/MHO (Im-2) e MUA (Im-1), no entanto, menor variação na frequência ressonante foi observada para o método de imobilização Im-3, o qual consistia de cistamina e anti-CPXaC modificado com EDC/NHS.



**Figura 3.1:** Esquema (fora de escala) do procedimento de imobilização: Im-1 O cristal de quartzo foi modificado com MUA, depois a ativação do grupo carboxila com EDC / NHS seguida da imobilização dos anticorpos policlonais anti-CPXaC via ligação amida. Desativação dos grupos ésteres remanescentes com etanolamina e bloqueio da superfície com leite desnatado. Im-2 O cristal de quartzo foi modificado com a mistura de MUA e MHO. As etapas que seguiram foram as mesmas em Im-1. Im-3 O cristal de quartzo foi modificado com cistamina, em sequência, uma alíquota de solução anti-CPXaC e EDC/NHS foi adicionada sobre a superfície. As próximas etapas foram de acordo com Im-1 e 2. Outras informações como descrito no texto.

A imobilização usando uma mistura de MUA e MHO foi utilizada com objetivo de criar regiões na superfície do cristal sem anticorpo imobilizado devido à presença de tiol de cadeia curta com grupo terminal hidroxila (OH). Assim, a presença de MHO diminui o efeito do impedimento histérico do anticorpo imobilizado sobre o cristal, o deixando mais livre para interação antígeno e anticorpo sobre cristal, o que proporciona uma interação mais efetiva e consequentemente maior resposta analítica<sup>44</sup>. Comparando os procedimentos de imobilização com ou sem MHO (Im-1 ou Im-2) **Figura 3.2 (A)**, pode-se observar, com a presença do MHO, um deslocamento na frequência ressonante por volta de 70% maior do que obtido em Im-1. Isto sugere uma melhor eficiência à interação antígeno e anticorpo sobre Im-2. Entretanto, o cristal modificado por Im-3 mostrou menor deslocamento da frequência ressonante entre os métodos de imobilização utilizados. Sugerimos que isso ocorreu devido a modificação da região Fab pelo tratamento do anticorpo com EDC/NHS, uma vez que, mais de um grupo carboxila pode ser

ativado. Dessa forma o grupo ativado pode se ligar com grupo amino presente de um outro anticorpo em solução conduzindo a formação de um filme que limita a acessibilidade da região Fab do anticorpo. Por outro lado, Im-3 mostrou menor variação na dissipação de energia  $\Delta D$  quando CPXaC foi adicionada na célula. O cristal modificado por Im-3 apresentou um  $\Delta D$  de  $0,1 \times 10^{-6}$  seguido por  $0,93 \times 10^{-6}$  para Im-1 e  $3,8 \times 10^{-6}$  para Im-2 **Figura 3.2 (B)**.



**Figura 3.2:** Variação em tempo real  $\Delta f$ (A) e  $\Delta D$  (B) quando  $645 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> CPXaC foi adicionado dentro da célula da QCM-D (C)  $\Delta D$  vs  $\Delta f$  depois da adição de  $645 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> CPXaC obtidos de (A) e (B). O imunossensor piezoeletrico foi construído usando três diferentes procedimentos de imobilização Im - 1 sobre MUA, Im - 2 sobre MUA/MHO e Im - 3 sobre Cist.

A pequena variação de  $\Delta D$  para o sensor modificado por Im-3 indica que a interação antígeno-anticorpo sobre esta superfície forma um filme protéico rígido. No entanto, as interações antígeno-anticorpo sobre Im-1 e Im-2 mostraram um  $\Delta D$  maior do que a reação sobre Im-3 isto sugere uma mudança nas propriedades viscoelásticas do filme protéico.<sup>35, 87</sup>. A **Figura 3.2 (C)** representa  $\Delta D$  em função de  $\Delta f$  obtidos a partir da **Figura 3.2 (A e B)**. A inclinação,  $K$ , indica processos cinéticos com diferentes tempos de relaxação<sup>34</sup>. Como pode ser visto o imunossensor construído usando diferentes estratégias de imobilização mostraram distintos processos cinéticos com três, dois e uma inclinação para Im-2, Im-1 e Im-3 respectivamente **Tabela 3.1**. Em todos os casos  $K_1$  foram pequenos e similares, isso sugere, então, que a cinética da interação antígeno-anticorpo é rápida e conduziu, dessa forma, a um aumento de massa do filme protéico rígido, conferido pela pequena variação de  $\Delta D$ .

**Tabela 3.1:** Valores de  $\Delta D/\Delta f$  para interação antígeno anticorpo sobre diferentes camadas de imobilização.

$\Delta D/\Delta f (10^{-6} \text{ Hz}^{-1})$	Camadas de imobilização		
	Cyst	MUA	MUA/MHO
$K_1$	0,07	0,05	0,08
$K_2$	-	0,17	0,28
$K_3$	-	-	0,41

O sensor desenvolvido por Im-3 apresentou somente uma inclinação  $K_1$ , o qual está associado com a interação CPXaC e anti-CPXaC com praticamente nenhuma variação na propriedade viscoelástica do filme. Além disso, essa pequena inclinação indica uma boa correlação entre  $\Delta f$  e a massa adsorvida sobre a superfície, portanto, de acordo com a equação de Sauerbrey.

Contudo,  $\Delta f$  obtido com a reação sobre Im - 3 foi pequeno para os propósitos analíticos.

As reações sobre os cristais modificados por Im - 1 e Im - 2 mostraram valores de  $K_1$  muito parecidos, e por outro lado  $K_2$  bem diferentes. Ambos os sensores modificados quando submetidos à reação com a CPXaC mostraram pequenos valores de  $K_1$ , contudo a reação sobre Im - 2  $\Delta D/\Delta f$  muda rapidamente para altos valores de  $K_2$  e quando  $\Delta f$  atinge 10 Hz uma nova inclinação surge  $K_3$ , a qual sugere mudanças na conformação do filme protéico após a interação antígeno-anticorpo. Embora a interação antígeno-anticorpo sobre Im - 2 tenha mostrado maior  $\Delta f$ , portanto, adequado para o propósito analítico,  $\Delta f$  não pode ser completamente relacionado com a adsorção de massa, devido aos altos valores de  $\Delta D$ . Os altos valores de  $K$  podem estar relacionados com mudanças de conformação do filme protéico após a interação antígeno-anticorpo ou aprisionamento de água. No entanto, o sensor construído por Im -1 apresentou menor valor de  $K$  indicando que um filme mais rígido e compacto com bom  $\Delta f$  para o propósito analítico é formado e, assim, pode ser usado para monitorar a interação antígeno-anticorpo. Por tudo isso, os próximos estudos foram realizados com Im - 1.

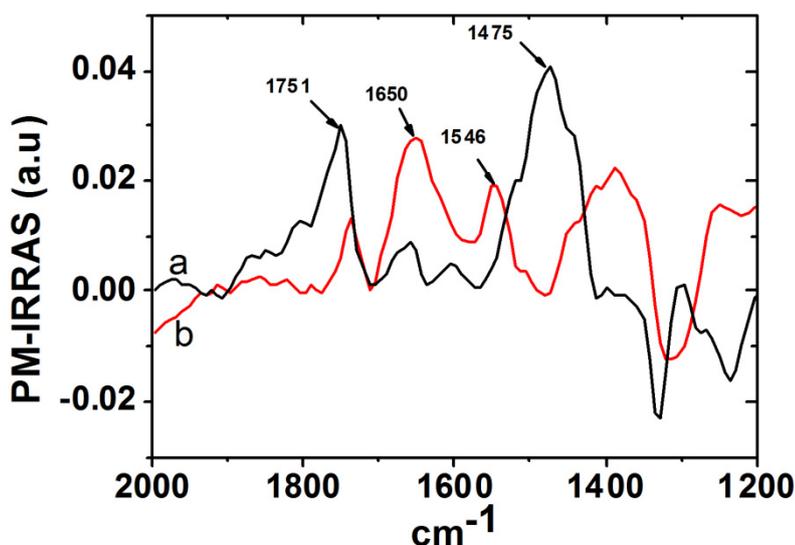
### 3.1.2 Caracterização do imunossensor

Após avaliar o melhor procedimento para imobilizar anti-CPXaC de forma a obter a maior variação de frequência bem como menor dissipação de energia frente à reação com CPXaC, a imobilização do anticorpo sobre a monocamada foi caracterizada por ângulo de contato,  $\Delta f$  em tempo real para cada etapa de imobilização (Im - 1) e espectroscopia de absorção e reflexão no infravermelho com polarização modulada (PM-IRRAS). A polarização modulada em conjunto com a espectroscopia de infravermelho foi utilizada devido à alta sensibilidade, além de minimizar irregularidades com a absorção de água e  $\text{CO}_2$ .

Para os estudos com PM-IRRAS o cristal de quartzo foi disposto de modo que o feixe de luz atingisse a superfície de ouro do cristal a um ângulo de incidência fixo de  $80^\circ$  o qual foi ajustado experimentalmente. A formação da monocamada MUA sobre o ouro do cristal de quartzo foi de acordo com Im - 1.

**Figura 3.3 (a)** mostra as bandas características para superfície modificada. A banda na região de  $1751\text{ cm}^{-1}$  é atribuída à deformação C=O do grupo carboxila e a banda na região de  $1475\text{ cm}^{-1}$  é atribuída à deformação  $\text{CH}_2$  tipo tesoura da monocamada. Em seguida, seguindo as etapas do procedimento Im - 1 a superfície foi modificada com anti-CPXaC, assim duas novas banda apareceram em  $1650$  e  $1546\text{ cm}^{-1}$ , as quais são atribuídas às bandas amida I e II (**Figura 3.3(b)**), devido à anti-CPXaC sobre a superfície<sup>88, 89</sup>

A medida do ângulo de contato foi feita para determinar a diferença da molhabilidade da superfície modificada. Em cada medida, uma gota de  $5\text{ }\mu\text{L}$  de água ultra pura foi adicionada sobre a superfície de ouro do cristal e as imagens foram automaticamente registradas em função do tempo. **Tabela 3.2** lista os valores de ângulo de contato para a superfície de ouro do cristal limpo, o cristal modificada com MUA e, por fim, anti-CPXaC imobilizado. Como esperado a superfície modificada com MUA mostrou alta hidrofobicidade devido aos grupos carboxila na superfície do cristal, enquanto que com a imobilização da anti-CPXaC foi observado um aumento da hidrofobicidade. A superfície de ouro limpa mostrou alta hidrofobicidade devido à rápida recontaminação do ouro em atmosfera ambiente. Todos esses resultados estão de acordo com trabalhos anteriores publicados na literatura<sup>90, 91</sup>.

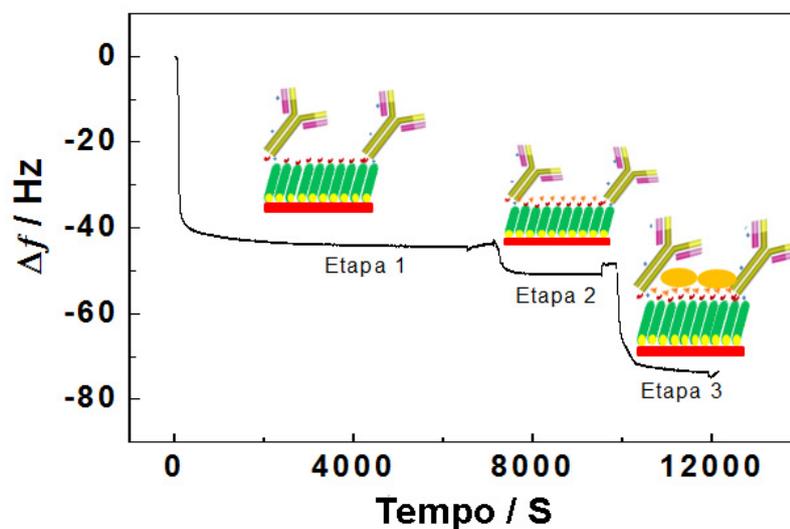


**Figura 3.3:** Espectro PM-IRRAS na região de  $2000$  a  $1200\text{ cm}^{-1}$  a) superfície de ouro modificada com MUA b) superfície de ouro modificada com MUA e anti-CPXaC imobilizada via ligação amida.

**Tabela 3.2:** Ângulo de contato,  $\Theta_c$ , da superfície de ouro do cristal de quartzo (Au), Au modificado com MUA (Au/MUA) e Au/MUA modificado com anti-CPXaC

Superfície	$\Theta_c$ (°)
Au	72,1 ± 2,3
Au/MUA	27,0 ± 3,4
Au/MUA/anti-CPXaC	44,3 ± 0,1

A monitoração em tempo real para construção do imunossensor foi realizada após adição do cristal modificado com MUA e EDC/NHS de acordo com o procedimento Im-1, na célula sob fluxo de PBS. Após a estabilização do sistema 86  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do anticorpo anti-CPXaC em PBS foi adicionado. Observou-se um rápido decréscimo de 42 Hz após adição do anticorpo, o qual está relacionado à imobilização do anticorpo sobre a superfície (**Figura 3.4** etapa 1). Em seguida, realizou-se a desativação dos ésteres succinimidas remanescentes com a adição de etanolamina 100  $\text{mmol L}^{-1}$ . Novamente observou-se um decréscimo na frequência, no entanto pequena, de aproximadamente 5 Hz, devido à menor massa molecular da etanolamina (**Figura 3.4** etapa 2) Por fim, 0,01% de leite desnatado foi adicionado a superfície como o intuito de diminuir as interações inespecíficas, tal procedimento resultou em um decréscimo acentuado de 25 Hz concluindo assim, a construção do imunossensor (**Figura 3.4** etapa 3).

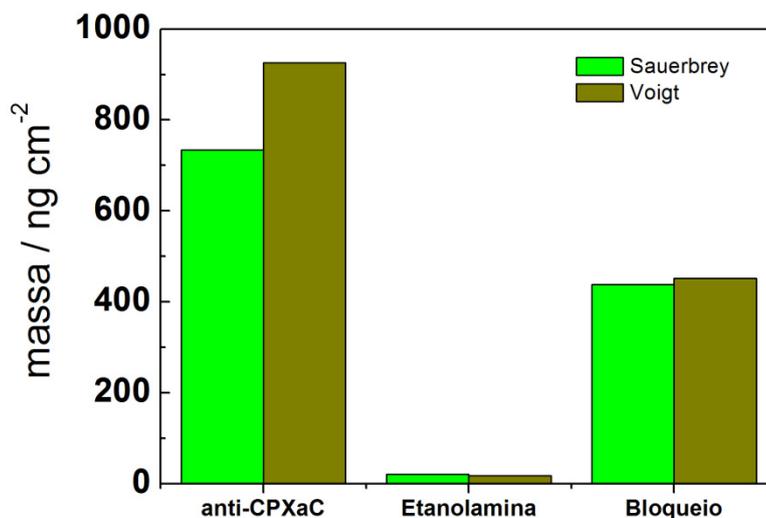


**Figura 3.4:** Etapas da construção do imunossensor sobre MUA. Etapa 1: imobilização do anticorpo anti-CPXaC. Etapa 2: desativação dos ésteres succinimida. Etapa 3: bloqueio da superfície com leite desnatado.

As curvas monotônicas obtidas da **Figura 3.4** foram usadas para calcular a variação de massa adsorvida sobre o cristal de quartzo. **Figura 3.5** mostra as variações de massa calculadas pelo modelo de Sauerbrey e o modelo viscoelástico de Voigt com o programa Q-Sense Qtools.

Uma vez que o modelo de Sauerbrey assume que o filme depositado é rígido, este estimou bem a variação de massa para etanolamina e bloqueio, no entanto, não foi observado o mesmo comportamento com a imobilização do anticorpo, e uma subestimação da massa foi dada com o modelo de Sauerbrey devido à formação de um filme protéico viscoelástico.

Mas, após a imobilização do anticorpo, o filme protéico sofreu mudanças em sua forma, porque não se observou nas etapas seguintes uma subestimação de massa pelo modelo de Sauerbrey. Esse comportamento sugere que um filme protéico formado sobre o cristal é mais rígido o que favorece o seu estudo por QCM.



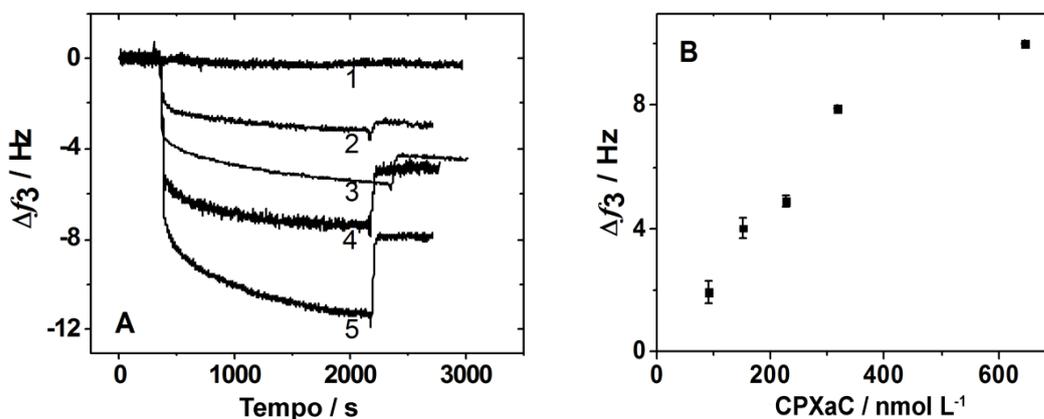
**Figura 3.5:** Massa estimada das etapas de imobilização pelos modelos de Sauerbrey e Voigt.

### 3.1.3 Desenvolvimento do imunossensor

Após a caracterização do imunossensor a curva analítica foi obtida registrando o ponto final da frequência depois da adição de diferentes concentrações de CPXaC em PBS dentro da célula da QCM – D, seguido pela injeção de PBS livre de CPXaC para lavagem da superfície **figura 3.6 (A e B)**. Como pode ser visto o deslocamento da frequência aumentou com a adição de maiores concentrações do antígeno e um deslocamento linear da frequência foi observado na faixa de concentração estudada ( $90,3; 151; 226; 320 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ ), o qual apresentou um limite de detecção de  $13,0 \text{ nmol L}^{-1}$  com um coeficiente de correlação de 0,973.

Ao mesmo tempo, o fator de variação de energia  $\Delta D$  foi avaliado, depois diferentes concentrações de CPXaC adicionada. Pequeno  $\Delta D$  significa que o filme protéico é rígido, portanto, a resposta da frequência pode ser bem descrita pela equação de Sauerbrey <sup>26</sup>. Neste estudo os pequenos valores de

$\Delta D$  sugerem um filme protéico rígido e compacto na faixa de concentração estudada **Tabela 3.3**.



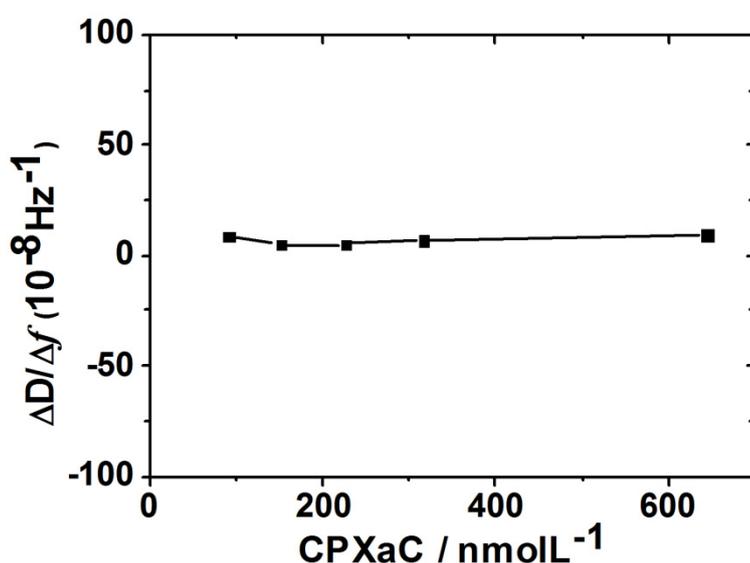
**Figura 3.6:** (A) Curvas em tempo real da variação da frequência de 0 a  $645 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  de CPXaC (curvas 1-5) em fluxo contínuo de PBS pH 7,2. (B) Curva analítica do imunossensor para CPXaC.

**Tabela 3.3:** Média dos valores de  $\Delta D$  da interação de CPXaC com anti-CPXaC após a lavagem da superfície com tampão PBS pH 7.2 na célula da QCM.

CPXaC [ $10^{-9} \text{ (mol L}^{-1})$ ]	$\Delta D$ ( $10^{-6}$ )
90,3	$0,17 \pm 0,09$
151	$0,19 \pm 0,03$
226	$0,24 \pm 0,01$
320	$0,54 \pm 0,05$
645	$0,93 \pm 0,01$

Em seguida, outro método foi usado para corroborar com os dados obtidos listados na **Tabela 3.3**. Neste estudo, foi avaliada a influência da interação antígeno-anticorpo sobre as propriedades viscoelásticas do filme pela relação  $\Delta D/\Delta f$  vs [CPXaC] de acordo com trabalhos anteriores na literatura.<sup>30, 92</sup> Esses trabalhos mostraram que grandes valores de  $\Delta D/\Delta f$  referem-se à

entrada de água ou mudanças das propriedades viscoelásticas do filme adsorvido e valores pequenos referem-se à maior rigidez do filme protéico, portanto, quanto menor essa relação maior a rigidez do filme protéico sobre o cristal<sup>29, 33</sup>. A partir desses resultados mostrados na **Figura 3.7**, foi observado que os  $\Delta D/\Delta f$  obtidos para diferentes concentrações de CPXaC foram pequenos  $< 10^{-7}$ . Isso implica que a interação antígeno-anticorpo na superfície do cristal é constituída de uma camada protéica rígida, com pouca absorção de água e, portanto, a variação da frequência está relacionada somente com a interação antígeno-anticorpo sobre a superfície, isso permitiu os estudos cinéticos por QCM, os quais serão discutidos abaixo.



**Figura 3.7:** Estudo da relação  $\Delta D/\Delta f$  vs. concentração de CPXaC.

#### *3.1.4 Constantes de equilíbrio e de velocidade de reação imunológica entre CPXaC e anti-CPXaC*

A interação entre antígeno em solução e seu complementar anticorpo seja ele imobilizado ou não sobre uma superfície é baseado em forças atrativas fracas, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Esse evento pode ser monitorado pela variação da frequência ressonante em tempo real, sob fluxo

contínuo e, por adição de diferentes concentrações do antígeno. Com a curva obtida é possível calcular as constantes de equilíbrio e cinéticas da interação antígeno-anticorpo sobre o cristal.

A determinação das constantes de equilíbrio e cinéticas é importante para avaliar a viabilidade do uso de anticorpos em biossensores.

A constante de equilíbrio  $K$  da interação antígeno-anticorpo (Ag:Ab) pode ser representada pela equação (1 e 2).

O primeiro método utilizado para determinar  $K$  foi baseado no modelo da isoterma de Langmuir. A constante  $K$  foi obtida pela medida da variação da frequência,  $\Delta f$ , após a saturação da superfície com CPXaC à diferentes concentrações, de acordo com a equação (10).

$$\frac{\Delta f}{\Delta f_{max}} = \frac{K_{aff} \times [CPXaC]}{1 + (K_{aff} \times [CPXaC])} \quad (10)$$

Em que  $\Delta f$  e  $\Delta f_{max}$  são as variações das frequências no tempo  $t$  e  $t \rightarrow \infty$ , respectivamente.  $K$  foi calculado por correlação linear entre  $[CPXaC]/\Delta f_{max}$  e  $[CPXaC]$  **Figura 3.8 (A)**.<sup>93, 94</sup>

O segundo método foi baseado no trabalho de Eddowes, 1987. Para uma reação imunológica reversível, com anticorpo imobilizado e um antígeno em solução a cinética da reação é de pseudo primeira ordem.<sup>95</sup> Portanto, a velocidade de formação de Ag:Ac, em um tempo  $t$  pode ser escrita como:

$$\frac{d[Ag:Ac]}{dt} = k_a \times [Ag] \times [Ac] - k_d \times [Ag:Ac] \quad (11)$$

Em que  $k_a$  é a constante de velocidade de associação e  $k_d$  é a constante da velocidade de dissociação.

Depois de certo tempo,  $t$   $[Ac] = [Ac]_0 - [Ac:Ag]$  sendo  $[Ac]_0$  a concentração do anticorpo no tempo,  $t = 0$ . Como o sistema comportou-se como razoavelmente rígido, a diminuição da frequência,  $\Delta f$ , é diretamente proporcional a massa adicionada. Sendo  $\Delta f_{max}$  a completa saturação do cristal com antígeno (Ag), a concentração de anticorpos livres (Ac) é proporcional a  $(\Delta f_{max} - \Delta f)$ , e a concentração do complexo Ag:Ac  $\Delta f$ . Assim, a **equação 11** pode ser expressa como:

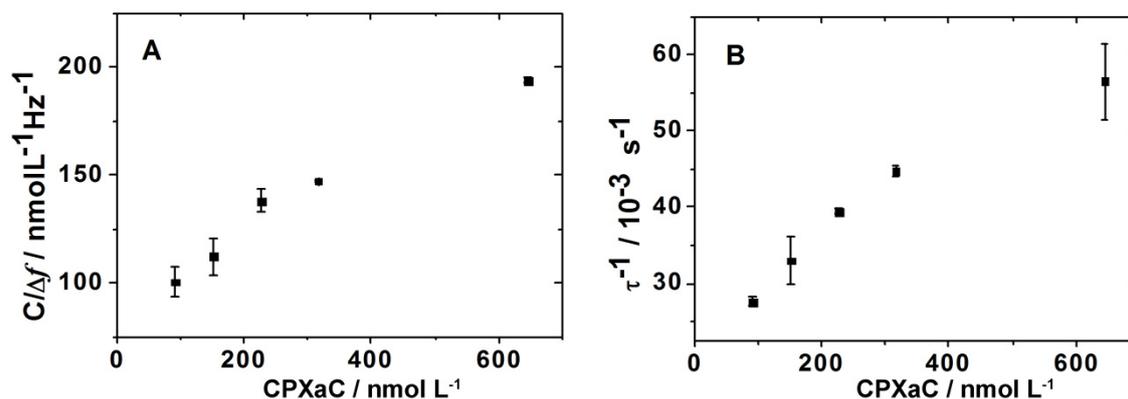
$$\frac{d[\Delta f]}{dt} = k_a \times [\Delta f_{\max} - \Delta f] \times [Ag] - k_d \times [\Delta f] \quad (12)$$

Por fim, como a [Ag] foi constante sob fluxo contínuo a integração da **equação 12** dá a equação que relaciona a cobertura da superfície em função do tempo.<sup>96, 97</sup>

$$\Delta f = \Delta f_{\max} \times (1 - e^{-(1/\tau)t}) \quad (13)$$

Em que  $\Delta f$  e  $\Delta f_{\max}$  são as mudanças na frequência no tempo  $t$  e  $t \rightarrow \infty$ , respectivamente e,  $\tau^{-1} = k_a [\text{CPXaC}] + k_d$ .  $\tau^{-1}$  foi determinado por ajuste não linear da variação da frequência ressonante para cada adição de diferentes concentrações de CPXaC. Assim,  $k_a$  e  $k_d$  foram calculadas por correlação linear entre  $\tau^{-1}$  vs [CPXaC] como pode ser visto na **Figura 3.8 (B)**. Os valores das constantes estão na **Tabela 3.4**.

As constantes de afinidade calculada foram obtidas a partir de duas metodologias. Em ambos os casos, as constantes de afinidade para interação antígeno-anticorpo com um deles imobilizado sobre a superfície e o outro em solução foram concordantes com a literatura, o que indica que o anticorpo anti-CPXaC<sup>98, 99</sup> é bom candidato para ser usado como anticorpo contra CPXaC em imunossensores. No entanto, diferenças entre as duas constantes neste trabalho são observadas, as quais estão relacionadas com os métodos utilizados. O *Método I* leva em consideração a interação de alta especificidade enquanto que o *Método II* considera as interações específica e não específica. Mesmo assim, os valores obtidos foram ligeiramente próximos com a mesma ordem de magnitude.



**Figura 3.8:** Estudo da relação  $[CPXaC]/\Delta f$  versus  $[CPXaC]$  (A) e  $\tau^{-1}$  versus  $[CPXaC]$  (B) para calcular as constantes de velocidade cinética e de equilíbrio, respectivamente.

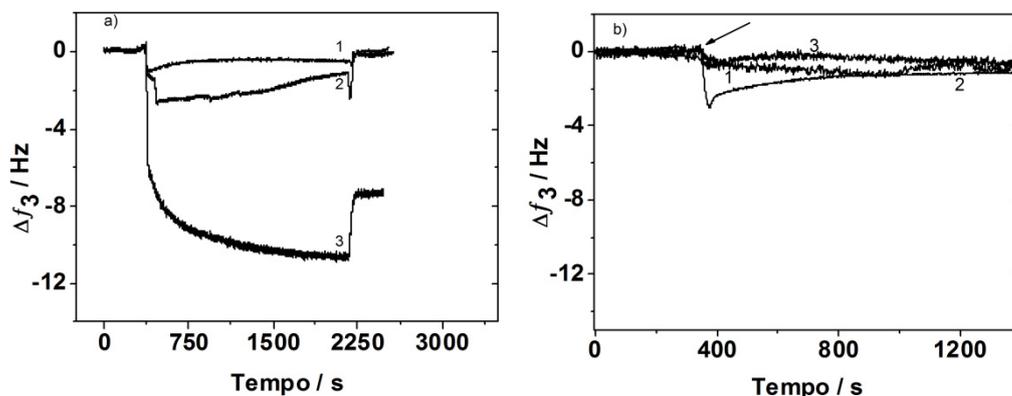
**Tabela 3.4:** Constantes cinéticas e de equilíbrio obtidas a partir das medições feitas em QCM-D para o analito CPXaC

Método avaliado	$k_a$ (L mol <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )	$K_a$ (Lmol <sup>-1</sup> )
Método I	-	-	$1,6 \pm 0,2 \times 10^6$
Método II	$7,8 \pm 0,2 \times 10^4$	$2,1 \pm 0,3 \times 10^{-2}$	$3,6 \pm 0,3 \times 10^6$

### 3.1.5 Estudos de especificidade do imunossensor

O estudo de especificidade foi avaliado de diferentes formas. Primeiro, o cristal foi modificado com Im-1 sem a imobilização do anticorpo, somente bloqueado com leite desnatado, e, então, exposto a solução de CPXaC na concentração de 32 e  $64,5 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>. A **Figura 3.9 (A)** mostra  $\Delta f$  quando CPXaC foi injetada sem anti-CPXaC (curvas 1 e 2) e com anti-CPXaC (curva 3). No cristal sem o anticorpo imobilizado o deslocamento da frequência foi observado quando CPXaC foi adicionado dentro da célula, contudo depois da lavagem com tampão PBS a frequência voltou aos valores iniciais, ou seja, não houve ligação inespecífica. Em sequência, a especificidade do anticorpo contra

diferentes proteínas inertes, tal como canacistatina, uma proteína recombinante<sup>100</sup> foram avaliadas. Por último, uma cisteíno peptidase que é um alvo para detectar *Xylella fastidiosa* uma bactéria gram-negativa responsável pela Clorose Variegada dos Citros<sup>101</sup> foi utilizada. Para cada proteína testada foi usado um novo cristal modificado e os resultados estão presentes na **Figura 3.9(B)**. O sensor foi exposto à solução de  $4,15 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de canacistatina ou  $3,03 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de BSA ou  $3,2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  de cisteíno peptidase da *X. fastidiosa*. Como pode ser observado, estas proteínas não interagiram expressivamente com o anticorpo imobilizado, uma vez que, a concentração usada foi dez vezes maior que a concentração do antígeno específico. Finalmente, a cisteíno peptidase da *X. fastidiosa* quando introduzido na célula o deslocamento da frequência foi de 0,5 Hz, ou seja, a superfície modificado com anti-CPXaC não interage com a cisteíno peptidase. Portanto, o sensor piezelétrico apresentou elevada seletividade para CPXaC, o qual não interagiu com outra cisteíno peptidase ou outras proteínas.

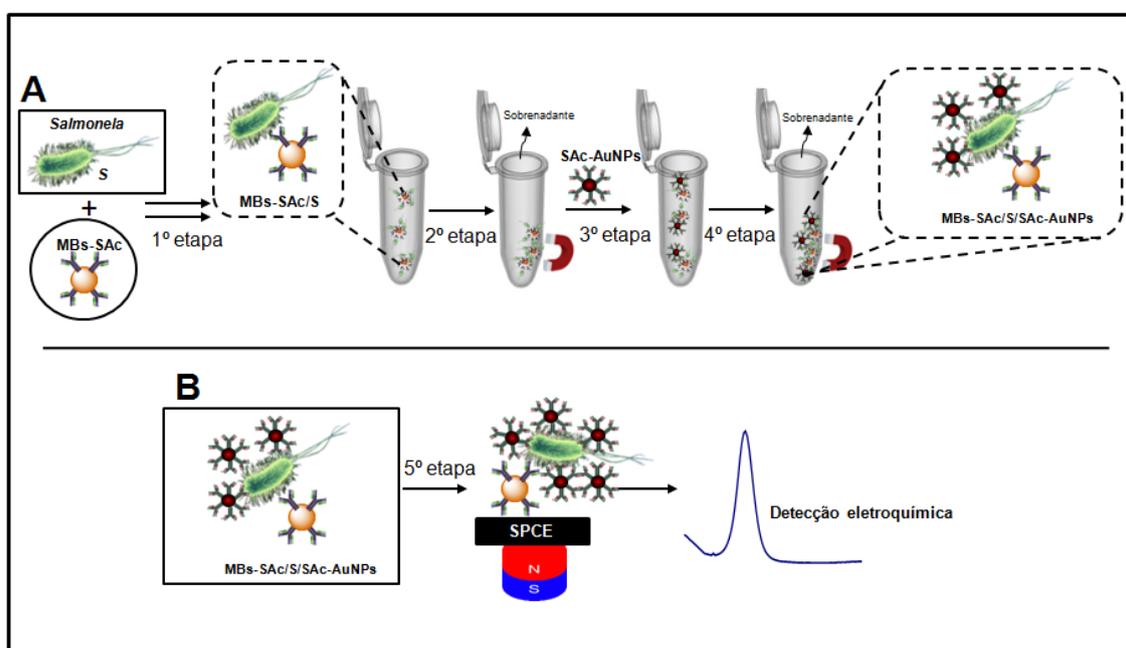


**Figura 3.9:** (A) Variação da frequência em tempo real quando (1 e 2)  $320$  e  $645 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  CPXaC foram adicionados na célula de fluxo com cristal modificado sem anti-CPXaC. (3) Adição de  $320 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  CPXaC dentro da célula com o cristal modificado com anti-CPXaC. (B) 1 adição de  $4,15 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de canecistatina; 2 adição de  $3,03 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  BSA e 3 adição de  $320 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  de cisteino peptidase da *X. fastidiosa* sobre o cristal modificado com anti-CPXaC.

## 3.2 Magneto imunoensaio eletroquímico

### 3.2.1 Princípio da detecção eletroquímica

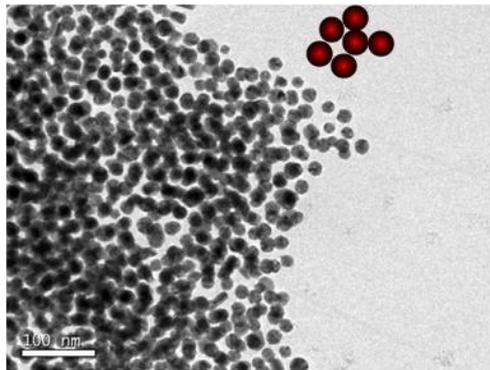
Um magneto-imunoensaio baseado na detecção electroquímica de AuNPs como marcador foi realizado para a detecção de *Salmonella* usando SPCEs. *Salmonella* foi magneto separada em PBST ou em leite desnatado por reação imunológica formando o complexo MBs-SAc / S. Depois as bactérias foram marcadas com AuNPs modificadas com anti-Salmonela (SAc-AuNPs). Finalmente, a detecção de *Salmonella* foi realizada por magneto concentração do complexo MBs-SAc/S/SAc-AuNPs sobre SPCE e a detecção foi realizada por voltametria de pulso diferencial (DPV) **Figura 3.10**.



**Figura 3.10::** Representação esquemática (fora de escala) da detecção de *Salmonella*. (A) Princípio do ensaio. Na primeira etapa ocorre a incubação de *Salmonella* (S) com esferas magnéticas (MBs) modificados com anticorpos primários específicos para as bactérias (SAc) (MBS-SAc). Durante essa etapa, *Salmonella* é capturada e permanece no complexo MBs-SAc / S. Segunda etapa o complexo MBs-SAc / S é capturado por meio da aplicação de um campo magnético permanente e lavou-se em conformidade. Terceira etapa consiste na incubação do complexo MBs-SAc / S com nanopartículas de ouro (AuNPs) modificadas com anticorpos secundários (SAc-AuNPs) e novamente recolhidos através da aplicação de um campo magnético permanente e lavou-se em conformidade. (B) Detecção electroquímica por DPV de MBs-SAc/S/SAc-AuNPs (etapa 5). Outras condições experimentais foram descritas no texto.

### 3.2.2 Caracterização por MET de AuNPs e amostras MBs-SAc e MBs-SAc/S

AuNPs depois de sintetizadas foram avaliadas por microscopias eletrônica de transmissão a fim de observar a homogeneidade e tamanho das nanopartículas formadas. De acordo com micrografia **Figura 3.11** AuNPs de formato homogêneo e de  $20 \pm 3$ nm de tamanho foram obtidas o que está de acordo com trabalhos previamente publicados<sup>73</sup>.



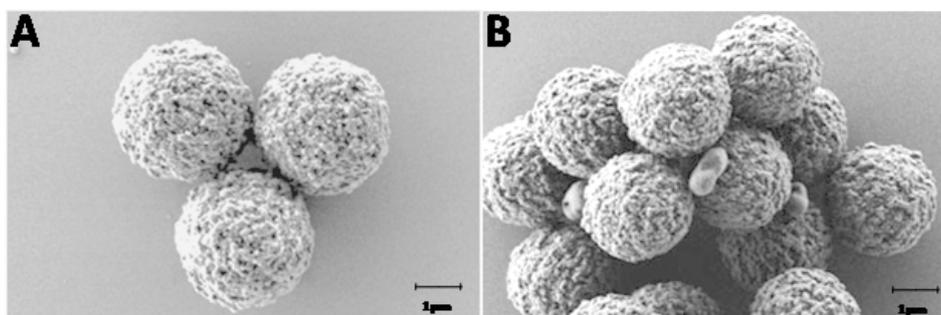
**Figura 3.11:** MET de AuNPs que foram sintetizadas seguindo o método reportado por De la Escosura-Muniz<sup>73</sup>. As Condições experimentais foram descritas no texto

As imagens da **Figura 3.12** mostram claramente a ligação imunológica das bactérias para a formação de MBs-SAc e MBs-SAc /S. A **Figura 3.12(A)** mostra o antes MBs-SAc e a **Figura 3.12 (B)**, que corresponde à incubação de MBs-SAc com  $10^5$  de CFU mL<sup>-1</sup> de *Salmonella*, mostra agregados devido à interação entre MBs-SAc e bactérias. A diferença observada nestas imagens está em concordância com o obtido durante detecção eletroquímica de *Salmonella*, mesmo na presença de *E. coli* como bactérias interferentes. É importante salientar que as micrografias de **Figura 3.12 (B)** correspondem aos fragmentos de bactérias devido ao tratamento térmico usado para matá-las.

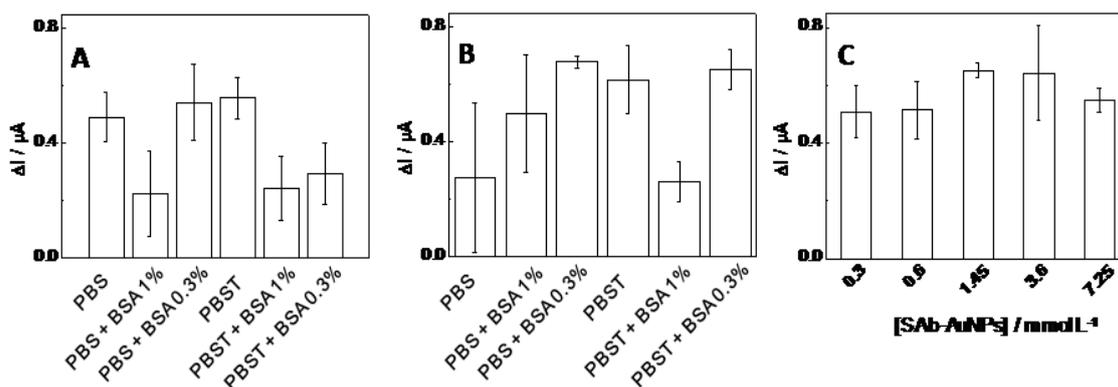
### 3.2.3 Otimizações dos parâmetros do imunossensor

A otimização dos parâmetros da magneto imunorreação foi realizada por

meio da avaliação dos tempos de incubação, agentes de bloqueio e diferentes concentrações de SAc-AuNPs (0,3; 0,6; 1,45; 3,6 e 7,21 mmol L<sup>-1</sup> SAc-AuNPs) para 10<sup>5</sup> CFU mL<sup>-1</sup> *Salmonella*. **Figura 3.13 (A e B)** mostram a otimização do tempo de incubação (a partir de 10 e 30 min, respectivamente) entre o complexo MBs-SAc / S e SAc-AuNPs (em PBS ou PBST com 0%, 0,3% e 1% de BSA). O volume de MBs-SAc para o teste imunoenzimático foi recomendado pelo fornecedor (10 µL). Embora todas as experiências realizadas tenham sido úteis para a detecção de *Salmonella* um resultado ótimo em termos de adsorção não específica, valor de sinal e o desvio padrão foi obtido usando PBS com BSA 0,3%, com um tempo de incubação de 30 min. (**Ver figura 3.13 B**). Além disso, a influência da concentração de SAc-AuNPs a ser utilizada durante a segunda imunorreação com bactérias também foi avaliada. Como mostrado na **Figura 3.13 (C)** a concentração de SAc-AuNPs ligeiramente afeta a resposta imunorreação, principalmente sobre a reprodutibilidade do método. No entanto, um sinal ótimo e confiável foi obtido para 1,45 mmol L<sup>-1</sup> de SAc-AuNPs. Assim, todas as experiências foram realizadas usando estes valores otimizados.



**Figura 3.12:** MEV de MBs-SAc: Antes (A) e após (B) a incubação com 10<sup>5</sup> de CFU mL<sup>-1</sup> *Salmonella*. Outras condições experimentais foram descritas no texto.



**Figura 3.13** : Otimização do imunossensor com resuspenções de SAC-AuNPs em PBS; PBS + BSA a 1%; PBS + BSA a 0,3%; PBST; PBST + BSA a 1% ou PBST + BSA a 0,3%. Este ensaio foi realizado com tempos de incubação de 10 (A) e 30 (B) min. Influência da concentração de SAC-AuNPs diluídas em PBS com BSA a 0,3% na resposta do imunossensor (C). Para estes ensaios,  $10^5$  CFU mL<sup>-1</sup> de *Salmonella* foram utilizados. Outras condições experimentais foram descritas no texto.

### 3.2.4 Resposta do Imunossensor para *Salmonella*

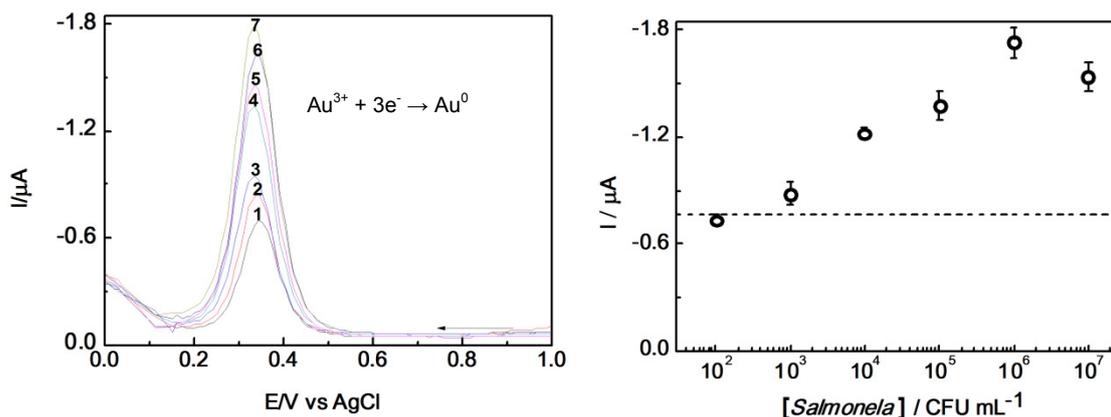
A **Figura 3.14** mostra a detecção de *Salmonella* em PBST, utilizando o sinal obtido pela marcação AuNPs. Os resultados obtidos para o imunossensor desenvolvido para concentrações crescentes do alvo ( $10^2$ - $10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>) por meio da técnica DPV mostram uma resposta linear ( $10^3$ - $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup> com  $r^2 = 0,985$ ). Para este ensaio o valor encontrado correspondente ao LOD foi estimado através do processamento de cinco amostras de controle negativo (0 CFU mL<sup>-1</sup>) que foram realizados em dois diferentes ensaios em um único dia, assim foi obtido um valor médio de 0,75  $\mu A$  ( $n = 5$ ), que corresponde a 143 CFU mL<sup>-1</sup> com o tempo total de análise de 1:30 h. A precisão do método foi avaliada testando seis amostras diferentes com  $10^5$  CFU mL<sup>-1</sup> de *Salmonella*. O coeficiente de variação (CV) obtido foi de 2,4% ( $n = 6$ ), indicando uma boa repetibilidade, nas condições descritas. A comparação desses resultados com aqueles relatados anteriormente por outros métodos, baseados em nanopartículas, mostrou uma melhoria, em geral. (Ver Tabela 3.5).

**Tabela 3.5:** Diferentes estratégias utilizadas para detectar *Salmonella*

Técnica de detecção	Marcador	Evento de bioreconhecimento	Amostra	Tempo de análise	Faixa de trabalho	LOD	Repetibilidade	Referência
Amperometria	HRP	DNA	Leite	3,5 h	-	1 CFU mL <sup>-1</sup>	-	15
	AP	Ac-Ag	Soro	1 h 15 min	-	-	8 - 13 %	102
	-	Reação enzimática	-	< 8h	-	6,5 CFU mL <sup>-1</sup>	3,4%	103
	HPR	DNA	-	Tempo real	2,8 – 75,4 fmol mL <sup>-1</sup>	-	14 - 16 %	104
	HPR	DNA (Ac-Ag)	-	-	50 - 500 fmol	60 pM	6,7 %	105
	HRP	Ac-Ag	Leite	50 min	1 - 10 <sup>7</sup> CFU mL <sup>-1</sup>	7,5×10 <sup>3</sup> CFU mL <sup>-1</sup>	-	14
EIS	-	Crescimento bacteriano	-	6 min	-	500 CFU mL <sup>-1</sup>	-	106
	-	Ac-Ag	-	40 min	10 <sup>5</sup> - 10 <sup>9</sup> CFU mL <sup>-1</sup>	10 <sup>5</sup> CFU mL <sup>-1</sup>	-	107
	-	Ac-Ag	Leite	2 h	10 <sup>2</sup> - 10 <sup>6</sup> CFU mL <sup>-1</sup>	10 <sup>5</sup> CFU mL <sup>-1</sup>	12 - 18 %	108
	-	Crescimento bacteriano	Leite	9,3 e 2,2 h	4,8 – 5,4 × 10 <sup>5</sup> CFU mL <sup>-1</sup>	1 CFU mL <sup>-1</sup>	-	109

	Au (Prata enhancement)	DNA (Ac-Ag)	-	-	0,04 e 4 fmol mL <sup>-1</sup>	-	-	110
	-	Ac-Ag	-	-	10 <sup>6</sup> - 10 <sup>10</sup> CFU mL <sup>-1</sup>	3,45×10 <sup>6</sup> CFU mL <sup>-1</sup>	-	111
EIS e Amperometria	-	Metabolismo	-	< 30 min	10 <sup>2</sup> - 10 <sup>8</sup> CFU mL <sup>-1</sup>	-	-	17
DPV	-	DNA(guanina)	-Não especificado	20 min		9,68 fmol / mL de 56 mer bases	10,15%	112
Voltametria de redissolução anódica	Au(Cobre enhancement)	Ac-Ag	Soro humano	-	1,30×10 <sup>2</sup> - 2,6×10 <sup>3</sup> CFU mL <sup>-1</sup>	98,9 CFU mL <sup>-1</sup>	<14%	113
Cronoamperometria	HRP	Ac-Ag	Carne de frango	-	10 - 10 <sup>7</sup> CFU mL <sup>-1</sup>	21 CFU mL <sup>-1</sup>	-	16
Colorimetria e Eletroquímica	AP	Ac-Ag	-	80 min	-	2 × 10 <sup>4</sup> CFU mL <sup>-1</sup> 8 × 10 <sup>3</sup> CFU mL <sup>-1</sup>	-	114
Quimioluminescência	Au (Prata enhancement)	Ac-Ag	Alimento	-	5 - 1038 CFU mL <sup>-1</sup>	5 CFU mL <sup>-1</sup>	4,7%	115

	ent)							
Visual	Au	Ac-Ag	Fezes	2 h	-	-	-	116
Absorbância a 550 nm	Au	Ac-Ag	Água	-	$10^3 - 10^7$ CFU mL <sup>-1</sup>	$10^4$ CFU mL <sup>-1</sup>	-	117
DPV	Au	Ac-Ag	Leite	1:30	$10^3 - 10^6$ CFU mL <sup>-1</sup>	143 CFU mL <sup>-1</sup>	2,4%	Este trabalho

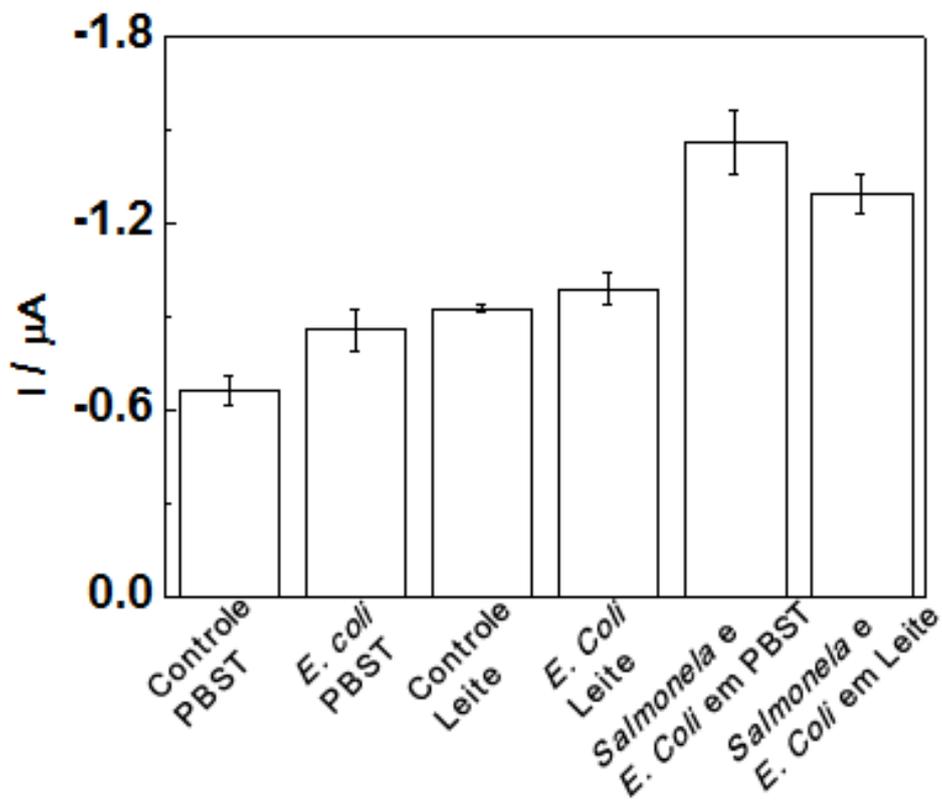


**Figura 3.14:** (A) Detecção eletroquímica por DPV utilizando AuNPs (1); imunoensaio sem *Salmonella*, (2)  $10^2$ , (3)  $10^3$ , (4)  $10^4$ , (5)  $10^5$ , (6)  $10^7$  (7),  $10^6$   $\text{CFU mL}^{-1}$  de bactérias. (B) Os resultados obtidos no intervalo entre  $10^2$  e  $10^7$  de *Salmonella* em PBST. Linha tracejada representa LOD baseado 3 vezes o desvio padrão ( $n = 5$ ) do controle (A-1), mais média do controle. As barras de erro mostram o desvio padrão para  $n = 3$ . Outras condições experimentais foram descritas no texto.

### 3.2.5 Estudo de especificidade para o imunossensor

Uma vez que a viabilidade de detecção de *Salmonella* usando AuNPs foi demonstrada, este ensaio mostra a especificidade do imunoensaio desenvolvido usando PBST e leite desnatado para se avaliar a resposta para o alvo *Salmonella* na presença de *E. coli* como possível interferente **Figura 3.15**. Como esperado, o sinal eletroquímico obtido para *E. coli* foi menor (cerca de 85%) em comparação com *Salmonella* em ambos os ensaios realizados (PBST e leite desnatado) com a obtenção de valores semelhantes (0,85 e 0,98  $\mu\text{A}$ , respectivamente) com PBST e leite desnatado (sem bactérias) (0,66 e 0,92  $\mu\text{A}$ , respectivamente). No entanto, para o ensaio avaliado em PBST um aumento da resposta de sinal de cerca de 28% para *E. coli* foi observada. Esse resultado também é explicado pelos fornecedores que pode estar relacionado com um certo grau de reatividade cruzada e ligação não específica do anticorpo utilizado<sup>24, 25</sup>. No entanto, este nível de interferência não afeta a viabilidade da detecção uma vez que a concentração utilizada de *E. coli* é muito acima do encontrado em amostras reais. Por outro lado, o resultado

obtido para uma mistura de ambos os agentes patogénicos é semelhante ao obtido para a amostra enriquecida apenas com  $10^7$  de  $\text{CFU}^{-1}$  mL *Salmonella*.



**Figura 3.15:** Estudo de especificidade para imunoensaio realizada em PBST e leite desnatado diluído, inoculados com *E. coli* ( $10^7$   $\text{CFU mL}^{-1}$ ) e uma mistura de *E. coli* e *Salmonella* (com  $10^7$   $\text{CFU mL}^{-1}$  de cada bactéria). As amostras de controle correspondem aos imunoensaios sem bactérias. Outras condições experimentais foram descritas no texto.

### 3.2.6 Análise de *Salmonella* em amostras de leite

O imunossensor foi aplicado para determinar o nível de *Salmonella* em leite desnatado. A fim de determinar a exatidão da tecnologia, leite desnatado comprado no comércio local foi enriquecida com *Salmonella* em diferentes concentrações. As recuperações de *Salmonella* na faixa de 83 e 94% (ver **Tabela 3.6**) foram calculadas. Estes resultados demonstram que o método desenvolvido pode ser uma alternativa promissora para determinar *Salmonella* em leite desnatado. O LOD obtido é muito menor do que o descrito para a

detecção de *Salmonella* em amostras líquidas. Para o leite desnatado por exemplo, o LOD para os métodos comerciais é de cerca de  $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup> <sup>26</sup>. Os resultados obtidos mostram que a tecnologia de detecção baseada em AuNPs combinado com a aplicação do campo magnético relata um limite de detecção inferior ao relatado método comercial convencional na literatura, realizado para fins de comparação, em amostras de leite desnatado.

**Tabela 3.6:** Adição e recuperação a partir de leite diluído 1/10 em PBST infectado artificialmente com *Salmonella*

Amostra	Adicionado	Encontrado	Recuperado %	Valor de corrente (µA) ± SD
Leite	$1,5 \times 10^3$ cfu mL <sup>-1</sup>	$1,23 \times 10^3$ cfu mL <sup>-1</sup>	83,0	1,01 ± 0,01
	$1,5 \times 10^5$ cfu mL <sup>-1</sup>	$1,41 \times 10^5$ cfu mL <sup>-1</sup>	94,0	1,25 ± 0,02

# Conclusões

## 4. Conclusões

Neste trabalho foi demonstrado com sucesso um imunossensor piezelétrico para detecção de CPXaC utilizando anticorpos anti-CPXaC, produzidos em coelho, imobilizado sobre a superfície do ouro do cristal de quartzo modificado com SAM. Os estudos de interação CPXaC/anti-CPXaC mostraram bons valores para constantes cinéticas e de afinidade comparados com os da literatura. O imunossensor foi estável e de interface seletiva sem interações inespecíficas para as proteínas estudadas. Portanto, estes estudos fornecem novas perspectivas sobre o uso de CPXaC como um biomarcador para um imunossensor piezelétrico altamente sensível para detecção do Cancro cístico.

A detecção eletroquímica baseada na imunoseparação magnética de *Salmonella* em amostras em alimentos utilizando AuNPs foi realizada. *Salmonella* foi capturada a partir das amostras de leite desnatado e preconcentrados por separação imunomagnética, seguido por marcação com AuNPs modificados com um anticorpo policlonal anti-*Salmonella*. O imunossensor desenvolvido é capaz de detectar até  $143 \text{ CFU mL}^{-1}$  de *Salmonella* em um tempo bastante curto (até 1:30 h). Os resultados obtidos são melhores do que os relatados anteriormente, tanto no tempo de resposta, mas também como pelo fato de AuNPs serem fáceis de ser obtidas e modificadas. A sinergia entre o imunoensaio e partículas magnéticas conduziu a um aumento da sensibilidade e remoção de interferências de outras espécies. Por fim, esta técnica de detecção é adequada para o monitoramento rápido e seletivo de *Salmonella* em amostras reais. Os resultados obtidos indicam que o imunossensor poderá ter diversas aplicações na área de alimentos, médica e ambiental onde um dispositivo rápido, de baixo custo e fácil de usar e que permite aplicações em campo.

# Referências

## 5. Referências

1. D'Orazio, P., Biosensors in clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta* **2003**, 334, (1-2), 41-69.
2. [www.ministeriodaagricultura.gov.br](http://www.ministeriodaagricultura.gov.br) Ministério da Agricultura. (03 de Dezembro de 2011).
3. Embrapa <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>. (03 de Dezembro de 2011).
4. Schaad, N. W.; Postnikovaa, E.; Lacyb, G.; Sechlara, A.; Agarkovac, I.; Stromberga, P. E.; Strombergb, V. K.; Vidaver, A. K., Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Syst. Appl. Microbiol.* **2006**, 29, 690-695.
5. Schubert, T. S.; Rizvi, S. A.; Sun, X. A.; Gottwald, T. R.; Graham, J. H.; Dixon, W. N., Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida - Again. *Plant Dis.* **2001**, 85, (4), 340-356.
6. Métodos mais precisos de diagnóstico do Cancro cítrico. [http://www.fundecitrus.com.br/Informatica/Material\\_hm/Cancro/Metodos\\_diagnostico/pagina1.htm](http://www.fundecitrus.com.br/Informatica/Material_hm/Cancro/Metodos_diagnostico/pagina1.htm) (09 de Abril 2012).
7. Golmohammadi, M.; Cubero, J.; Penalver, J.; Quesada, J. M.; Lopez, M. M.; Llop, P., Diagnosis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, causal agent of citrus canker, in commercial fruits by isolation and PCR-based methods. *J. Appl. Microbiol.* **2007**, 103, (6), 2309-2315.
8. Das, A. K., Citrus Canker- A review. *J. Appl. Hortic.* **2003**, 5, (1), 52-60.
9. Kay, S.; Hahn, S.; Marois, E.; Wieduwild, R.; Bonas, U., Detailed analysis of the DNA recognition motifs of the *Xanthomonas* type III effectors AvrBs3 and AvrBs3 Delta rep16. *Plant J.* **2009**, 59, (6), 859-871.
10. WHO Food safety and foodborne illness. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/> (03 de Dezembro de 2011),
11. Saúde, P. d. Dados Epidemiológicos - DTA período de 2000 a 2011. [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados\\_epidemiologicos.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_epidemiologicos.pdf) (03 de Abril de 2012).
12. WHO Drug-resistant salmonella. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/> (03 de Abril de 2012).
13. Ricci, F.; Volpe, G.; Micheli, L.; Palleschi, G., A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis. *Anal Chim Acta* **2007**, 605, (2), 111-129.
14. Liebana, S.; Lermo, A.; Campoy, S.; Cortes, M. P.; Alegret, S.; Pividori, M. I., Rapid detection of *Salmonella* in milk by electrochemical magneto-immunosensing. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, 25, (2), 510-513.
15. Liebana, S.; Lermo, A.; Campoy, S.; Barbe, J.; Alegret, S.; Pividori, M. I., Magneto Immunoseparation of Pathogenic Bacteria and Electrochemical Magneto Genosensing of the Double-Tagged Amplicon. *Anal. Chem.* **2009**, 81, (14), 5812-5820.
16. Salam, F.; Tothill, I. E., Detection of *Salmonella typhimurium* using an electrochemical immunosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, 24, (8), 2630-2636.
17. Mata, D.; Bejarano, D.; Botero, M. L.; Lozano, P.; Constanti, M.; Katakis, I., Screen-printed integrated microsystem for the electrochemical detection of pathogens. *Electrochim. Acta* **2010**, 55, (14), 4261-4266.

18. de la, E.-M., Immunosensing using nanoparticles *Materials Today* **2010**, 13, (9), 13-13.
19. dos Santos Riccardi, C.; da Costa, P. I.; Yamanaka, H., Amperometric immunosensor. *Quimica Nova* **2002**, 25, (2), 316-320.
20. Rusling, J. F.; Kumar, C. V.; Gutkind, J. S.; Patel, V., Measurement of biomarker proteins for point-of-care early detection and monitoring of cancer. *Analyst* **2010**, 135, (10), 2496-2511.
21. Su, X. D.; Chew, F. T.; Li, S. F. Y., Design and application of piezoelectric quartz crystal-based immunoassay. *Analytical Sciences* **2000**, 16, (2), 107-114.
22. Janshoff, A.; Galla, H. J.; Steinem, C., Piezoelectric mass-sensing devices as biosensors - An alternative to optical biosensors? *Angewandte Chemie-International Edition* **2000**, 39, (22), 4004-4032.
23. Buttry, D. A.; Ward, M. D., Measurement of Interfacial Processes at Electrode Surface With Electrochemical Quartz Crystal Microbalance. *Chemical Reviews* **1992**, 92, (6), 1355-1379.
24. Damos, F. S.; Mendes, R. K.; Kubota, L. T., Applications of QCM, EIS and SPR in the investigation of surfaces and interfaces for the development of (BIO)sensors. *Quimica Nova* **2004**, 27, (6), 970-979.
25. Martin, S. J.; Granstaff, V. E.; Frye, G. C., Characterization of a Quartz Crystal Microbalance with simultaneous Mass and Liquid Loading. *Anal. Chem.* **1991**, 63, (20), 2272-2281.
26. Sauerbrey, G. Z., Verwendung Von Schwingquarzen Zur Wagung Dunner Schichten und Zur Mikrowagung. *Z. Phys* **1959**, 155, (2), 206-222.
27. Steinem, C.; Janshoff, A.; Cooper, M. A.; Daikhin, L.; Johannsmann, D.; Dickert, F. L.; Eichelbaum, F.; Furusawa, H.; Gileadi, E.; Guibalt, G. G.; Heitmann, V.; Höök, F.; Janshoff, A.; Kasemo, B.; et al., *Piezoelectric Sensors*. first ed.; Springer Berlin Heidelberg: New York, 2003; Vol. 1, p 483.
28. Nomura, T.; Okuhara, M., Frequency shifts of piezoelectric quartz crystals immersed in organic liquids. *Anal. Chim. Acta* **1982**, 142, 281-284.
29. Höök, F.; Kasemo, B., Variations in Coupled Water, Viscoelastic Properties, and Film Thickness of a Mefp-1 Protein Film during Adsorption and Cross-Linking: A Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring, Ellipsometry, and Surface Plasmon Resonance Study. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 5796-5804.
30. Hook, F.; Rodahl, M.; Brzezinski, P.; Kasemo, B., Measurements using the quartz crystal microbalance technique of ferritin monolayers on methyl-thiolated gold: Dependence of energy dissipation and saturation coverage on salt concentration. *Colloid Interface Sci.* **1998**, 208, (1), 63-67.
31. Rodahl, M.; Höök, F.; Krozer, A.; Brzezinski, P.; Kasemo, B., Quartz crystal microbalance setup for frequency and Q-factor measurements in gaseous and liquid environments. *Rev. Sci. Instrum.* **1995**, 66, (7), 3924-3930.
32. Voinova, M. V.; Rodahl, M.; Jonson, M.; Kasemo, B., Viscoelastic acoustic response of layered polymer films at fluid-solid interfaces: Continuum mechanics approach. *Phys. Scr.* **1999**, 59, (5), 391-396.
33. Höök, F.; Vörös, J.; Rodahl, M.; Kurrat, R.; Böni, P.; Ramsden, J. J.; Textor, M.; Spencer, N. D.; Tengvall, P.; Gold, J.; Kasemo, B., A comparative study of protein adsorption on titanium oxide surfaces using in situ ellipsometry, optical waveguide lightmode spectroscopy, and quartz crystal microbalance/dissipation. *Colloids Surf., B* **2002**, 24, 155-170.

34. Hook, F.; Rodahl, M.; Brzezinski, P.; Kasemo, B., Energy dissipation kinetics for protein and antibody-antigen adsorption under shear oscillation on a quartz crystal microbalance. *Langmuir* **1998**, 14, (4), 729-734.
35. Rodahl, M.; Hook, F.; Fredriksson, C.; Keller, C. A.; Krozer, A.; Brzezinski, P.; Voinova, M.; Kasemo, B., Simultaneous frequency and dissipation factor QCM measurements of biomolecular adsorption and cell adhesion. *Faraday Discuss.* **1997**, 107, 229-246.
36. Ulman, A., Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chemical Reviews* **1996**, 96, (4), 1533-1554.
37. 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* **2005**, 105, (4), 1103-1169.
38. <http://nimet.ufl.edu/nanomed.asp> Medical & Biological Applications. (18 de Maio de 2012)
39. Grabarek, Z.; Gergely, J., Zero-Length Cross Linking Procedure With the Use of Active Esters. *Analytical Biochemistry* **1990**, 185, (1), 131-135.
40. Liu, Y. C.; Wang, C. M.; Hsiung, K. P., Comparison of different protein immobilization methods on quartz crystal microbalance surface in flow injection immunoassay. *Analytical Biochemistry* **2001**, 299, (2), 130-135.
41. Frey, B. L.; Corn, R. M., Covalent attachment and derivatization of poly(L-lysine) monolayers on gold surfaces as characterized by polarization-modulation FT-IR spectroscopy. *Analytical Chemistry* **1996**, 68, (18), 3187-3193.
42. Patel, N.; Davies, M. C.; Hartshorne, M.; Heaton, R. J.; Roberts, C. J.; Tendler, S. J. B.; Williams, P. M., Immobilization of protein molecules onto homogeneous and mixed carboxylate-terminated self-assembled monolayers. *Langmuir* **1997**, 13, (24), 6485-6490.
43. Sehgal, D.; Vijay, I. K., A METHOD FOR THE HIGH-EFFICIENCY OF WATER-SOLUBLE CARBODIIMIDE-MEDIATED AMIDATION. *Analytical Biochemistry* **1994**, 218, (1), 87-91.
44. Briand, E.; Salmain, M.; Herry, J. M.; Perrot, H.; Compere, C.; Pradier, C. M., Building of an immunosensor: How can the composition and structure of the thiol attachment layer affect the immunosensor efficiency? *Biosens. Bioelectron.* **2006**, 22, (3), 440-448.
45. Tanahashi, M.; Matsuda, T., Surface functional group dependence on apatite formation on self-assembled monolayers in a simulated body fluid. *Journal of Biomedical Materials Research* **1997**, 34, (3), 305-315.
46. Huang, E.; Satjapipat, M.; Han, S. B.; Zhou, F. M., Surface structure and coverage of an oligonucleotide probe tethered onto a gold substrate and its hybridization efficiency for a polynucleotide target. *Langmuir* **2001**, 17, (4), 1215-1224.
47. Naumann, R.; Schiller, S. M.; Giess, F.; Grohe, B.; Hartman, K. B.; Karcher, I.; Koper, I.; Lubben, J.; Vasilev, K.; Knoll, W., Tethered lipid Bilayers on ultraflat gold surfaces. *Langmuir* **2003**, 19, (13), 5435-5443.
48. Yang, M. L.; Zhang, Z. J., Impediment to heterogeneous electron transfer reactions of redox-active species by alkanedithiol self-assembled monolayers with and without an adlayer of Au nanoparticles. *Electrochimica Acta* **2004**, 49, (28), 5089-5095.
49. Briand, E.; Salmain, M.; Compere, C.; Pradier, C. M., Immobilization of Protein A on SAMS for the elaboration of immunosensors. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2006**, 53, (2), 215-224.

50. Han, D. X.; Xu, X. Y.; Peng, H.; Yang, G. F.; Li, N.; Zhao, J. W., Self-assembling process of alkanethiol monolayers on gold surface via underpotential deposition. *Chemical Research in Chinese Universities* **2006**, 22, (6), 783-786.
51. Abe, T.; Li, X. H., Dual-channel quartz-crystal microbalance for sensing under UV radiation. *Ieee Sensors Journal* **2007**, 7, (3-4), 321-322.
52. Cao, Z.; Gu, N.; Gong, F. C., Stripe domain analysis of alkanethiol and alkynethiol monolayers self-assembled on the surfaces of gold grains. *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems* **2007**, 27, (4), 773-780.
53. Newman, J. D. S.; Blanchard, G. J., Investigation of the interactions between alkanethiol self-assembled monolayers and a liquid overlayer using impedance spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2007**, 9, (46), 6142-6149.
54. Sato, S.; Ono, Y.; Mochiyama, Y.; Sivaniah, E.; Kikkawa, Y.; Sudesh, K.; Hiraishi, T.; Doi, Y.; Abe, H.; Tsuge, T., Polyhydroxyalkanoate Film Formation and Synthase Activity During In Vitro and In Situ Polymerization on Hydrophobic Surfaces. *Biomacromolecules* **2008**, 9, (10), 2811-2818.
55. Encarnacao, J. M.; Baltazar, R.; Stallinga, P.; Ferreira, G. N. M., Piezoelectric biosensors assisted with electroacoustic impedance spectroscopy: a tool for accurate quantitative molecular recognition analysis. *Journal of Molecular Recognition* **2009**, 22, (2), 129-137.
56. Buchatip, S.; Ananthanawat, C.; Sithigorngul, P.; Sangvanich, P.; Rengpipat, S.; Hoven, V. P., Detection of the shrimp pathogenic bacteria, *Vibrio harveyi*, by a quartz crystal microbalance-specific antibody based sensor. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2010**, 145, (1), 259-264.
57. Rodenhausen, K. B.; Duensing, B. A.; Kasputis, T.; Pannier, A. K.; Hofmann, T.; Schubert, M.; Tiwald, T. E.; Solinsky, M.; Wagner, M., In-situ monitoring of alkanethiol self-assembled monolayer chemisorption with combined spectroscopic ellipsometry and quartz crystal microbalance techniques. *Thin Solid Films* **2011**, 519, (9), 2817-2820.
58. Poitras, C.; Tufenkji, N., A QCM-D-based biosensor for *E. coli* O157:H7 highlighting the relevance of the dissipation slope as a transduction signal. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, 24, 2137-2142.
59. Carrigan, S. D.; Scott, G.; Tabrizian, M., Real-time QCM-D immunoassay through oriented antibody immobilization using cross-linked hydrogel biointerfaces. *Langmuir* **2005**, 21, (13), 5966-5973.
60. De Palma, R.; Reekmans, G.; Laureyn, W.; Borghs, G.; Maes, G., The optimization of magnetosandwich assays for the sensitive and specific detection of proteins in serum. *Analytical Chemistry* **2007**, 79, (19), 7540-7548.
61. Li, D. J.; Wang, J. P.; Wang, R. H.; Li, Y. B.; Abi-Ghanem, D.; Berghman, L.; Hargis, B.; Lu, H. G., A nanobeads amplified QCM immunosensor for the detection of avian influenza virus H5N1. *Biosensors & Bioelectronics* **2011**, 26, (10), 4146-4154.
62. Fonseca, R. A. S.; Ramos-Jesus, J.; Kubota, L. T.; Dutra, R. F., A Nanostructured Piezoelectric Immunosensor for Detection of Human Cardiac Troponin T. *Sensors* **2011**, 11, (11), 10785-10797.
63. Tang, D. P.; Yuan, R.; Chai, Y. Q., Quartz crystal microbalance immunoassay for carcinoma antigen 125 based on gold nanowire-functionalized biomimetic interface. *Analyst* **2008**, 133, (7), 933-938.

64. Castaneda, M. T.; Alegret, S.; Merkoci, A., Electrochemical sensing of DNA using gold nanoparticles. *Electroanalysis* **2007**, 19, (7-8), 743-753.
65. Rao, C. N. R.; Kulkarni, G. U.; Thomas, P. J.; Edwards, P. P., Metal nanoparticles and their assemblies. *Chemical Society Reviews* **2000**, 29, (1), 27-35.
66. Kim, F.; Song, J. H.; Yang, P. D., Photochemical synthesis of gold nanorods. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, (48), 14316-14317.
67. Shankar, S. S.; Bhargava, S.; Sastry, M., Synthesis of gold nanospheres and nanotriangles by the Turkevich approach. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2005**, 5, (10), 1721-1727.
68. Tsung, C. K.; Hong, W. B.; Shi, Q. H.; Kou, X. S.; Yeung, M. H.; Wang, J. F.; Stucky, G. D., Shape- and orientation-controlled gold nanoparticles formed within mesoporous silica nanofibers. *Advanced Functional Materials* **2006**, 16, (17), 2225-2230.
69. Daniel, M. C.; Astruc, D., Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical Reviews* **2004**, 104, (1), 293-346.
70. Miscoria, S. A.; Barrera, G. D.; Rivas, G. A., Enzymatic biosensor based on carbon paste electrodes modified with gold nanoparticles and polyphenol oxidase. *Electroanalysis* **2005**, 17, (17), 1578-1582.
71. Mani, V.; Chikkaveeraiah, B. V.; Patel, V.; Gutkind, J. S.; Rusling, J. F., Ultrasensitive Immunosensor for Cancer Biomarker Proteins Using Gold Nanoparticle Film Electrodes and Multienzyme-Particle Amplification. *Acs Nano* **2009**, 3, (3), 585-594.
72. Ambrosi, A.; Castaneda, M. T.; Killard, A. J.; Smyth, M. R.; Alegret, S.; Merkoci, A., Double-codified gold nanolabels for enhanced immunoanalysis. *Analytical Chemistry* **2007**, 79, (14), 5232-5240.
73. de la Escosura-Muniz, A.; Sanchez-Espinel, C.; Diaz-Freitas, B.; Gonzalez-Fernandez, A.; Maltez-da Costa, M.; Merkoci, A., Rapid Identification and Quantification of Tumor Cells Using an Electrocatalytic Method Based on Gold Nanoparticles. *Analytical Chemistry* **2009**, 81, (24), 10268-10274.
74. de la Escosura-Muniz, A.; Maltez-da Costa, M.; Sanchez-Espinel, C.; Diaz-Freitas, B.; Fernandez-Suarez, J.; Gonzalez-Fernandez, A.; Merkoci, A., Gold nanoparticle-based electrochemical magnetoimmunosensor for rapid detection of anti-hepatitis B virus antibodies in human serum. *Biosensors & Bioelectronics* **2010**, 26, (4), 1710-1714.
75. de la Escosura-Muniz, A.; Parolo, C.; Merkoci, A., Immunosensing using nanoparticles. *Materials Today* **2010**, 13, (7-8), 17-27.
76. de la Escosura-Muniz, A.; Ambrosi, A.; Merkoci, A., Electrochemical analysis with nanoparticle-based biosystems. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **2008**, 27, (7), 568-584.
77. Dequaire, M.; Degrand, C.; Limoges, B., An electrochemical metalloimmunoassay based on a colloidal gold label. *Analytical Chemistry* **2000**, 72, (22), 5521-5528.
78. Guo, S. J.; Wang, E. K., Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles. *Analytica Chimica Acta* **2007**, 598, (2), 181-192.
79. Pumera, M.; Aldavert, M.; Mills, C.; Merkoci, A.; Alegret, S., Direct voltammetric determination of gold nanoparticles using graphite-epoxy composite electrode. *Electrochimica Acta* **2005**, 50, (18), 3702-3707.

80. Kuramitz, H., Magnetic microbead-based electrochemical immunoassays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, 394, (1), 61-69.
81. Palecek, E.; Fojta, M., Magnetic beads as versatile tools for electrochemical DNA and protein biosensing. *Talanta* **2007**, 74, (3), 276-290.
82. Wang, S. P.; Wu, Z. S.; Qu, F. L.; Zhang, S. B.; Shen, G. L.; Yu, R. Q., A novel electrochemical immunosensor based on ordered Au nano-prickle clusters. *Biosensors & Bioelectronics* **2008**, 24, (4), 1020-1026.
83. Wu, J.; Yan, Y. T.; Yan, F.; Ju, H. X., Electric field-driven strategy for multiplexed detection of protein biomarkers using a disposable reagentless electrochemical immunosensor array. *Analytical Chemistry* **2008**, 80, (15), 6072-6077.
84. Mao, X.; Baloda, M.; Gurung, A. S.; Lin, Y. H.; Liu, G. D., Multiplex electrochemical immunoassay using gold nanoparticle probes and immunochromatographic strips. *Electrochemistry Communications* **2008**, 10, (10), 1636-1640.
85. Sambrook, J.; Russel, D. W., *Molecular cloning: a laboratory manual*. third ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 2001.
86. Mendes, R. K.; Carvalhal, R. F.; Stach-Machado, D. R.; Kubota, L. T., Surface plasmon resonance immunosensor for early diagnosis of Asian rust on soybean leaves. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, 24, (8), 2483-2487.
87. Zhou, C.; Friedt, J. M.; Angelova, A.; Choi, K. H.; Laureyn, W.; Frederix, F.; Francis, L. A.; Campitelli, A.; Engelborghs, Y.; Borghs, G., Human immunoglobulin adsorption investigated by means of quartz crystal microbalance dissipation, atomic force microscopy, surface acoustic wave, and surface plasmon resonance techniques. *Langmuir* **2004**, 20, (14), 5870-5878.
88. E., C.; Jordan, B. L.; Frey, S. K.; Corn, R. M., Characterization of Poly-L-lysine Adsorption onto Alkanethiol-Modified Gold Surfaces with Polarization-Modulation Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Surface Plasmon Resonance Measurements. *Langmuir* **1994**, 10, 3642-3648.
89. Robert, V. D.; Corn., R. M., Amide and Ester Surface Attachment Reactions for Alkanethiol Monolayers at Gold Surfaces As Studied by Polarization Modulation Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Anal. Chem.* **1992**, 64.
90. Tlili, A.; Abdelghani, A.; Ameer, S.; Jaffrezic-Renault, N., Impedance spectroscopy and affinity measurement of specific antibody-antigen interaction. *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems* **2006**, 26, (2-3), 546-550.
91. Frederix, F.; Bonroy, K.; Laureyn, W.; Reekmans, G.; Campitelli, A.; Dehaen, W.; Maes, G., Enhanced performance of an affinity biosensor interface based on mixed self-assembled monolayers of thiols on gold. *Langmuir* **2003**, 19, (10), 4351-4357.
92. Dolatshahi-Pirouz, A.; Rechendorff, K.; Hovgaard, M. B.; Foss, M.; Chevallier, J.; Besenbacher, F., Bovine serum albumin adsorption on nano-rough platinum surfaces studied by QCM-D. *Colloids Surf., B* **2008**, 66, (1), 53-59.
93. Ebara, Y.; Okahata, Y., A Kinetic Study of Concanavalin A Binding to Glycolipid Monolayers by Using a Quartz-Crystal Microbalance. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, (25), 11209-11212.
94. Pedroso, M. M.; Watanabe, A. M.; Roque-Barreira, M. C.; Bueno, P. R.; Faria, R. C., Quartz Crystal Microbalance monitoring the real-time binding of lectin with carbohydrate with high and low molecular mass. *Microchem. J.* **2008**, 89, (2), 153-158.

95. Eddowes, M. J., Direct Immunochemical Sensing: Basic Chemical Principles and Fundamental Limitations. *Biosensors* **1987**, 3, (88), 1-15.
96. Pesquero, N. C.; Pedroso, M. M.; Watanabe, A. M.; Goldman, M. H. S.; Faria, R. C.; Roque-Barreira, M. C.; Bueno, P. R., Real-time monitoring and kinetic parameter estimation of the affinity interaction of jArtinM and rArtinM with peroxidase glycoprotein by the electrogravimetric technique. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, 26, (1), 36-42.
97. Mao, Y. A.; Wei, W. Z.; He, D. L.; Nie, L. H.; Yao, S. Z., Monitoring and kinetic parameter estimation for the binding process of berberine hydrochloride to bovine serum albumin with piezoelectric quartz crystal impedance analysis. *Analytical Biochemistry* **2002**, 306, (1), 23-30.
98. Albrechta, C.; Fechnera, P.; Honcharenkob, D.; Baltzerb, L.; Gauglitza, G., A new assay design for clinical diagnostics based on alternative recognition elements *Biosens. Bioelectron.* **2010**, 25, 2302–2308.
99. Glaser, R. W.; Hausdorf, G., Binding kinetics of an antibody against HIV p24 core protein measured with real-time biomolecular interaction analysis suggest a slow conformational change in antigen p24. *J. Immunol. Methods* **1996**, 189, (1), 1-14.
100. Soares-Costa, A.; Beltramini, L. M.; Thiemann, O. H.; Henrique-Silva, F., A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity. *Biochem Biophys Res Commun* **2002**, 296, (5), 1194-1199.
101. Nogaroto, V.; Tagliavini, S. A.; Gianotti, A.; Mikawa, A.; Barros, N. M. T.; Puzer, L.; Carmona, A. K.; Costa, P. I.; Henrique-Silva, F., Recombinant expression and characterization of a *Xylella fastidiosa* cysteine protease differentially expressed in a nonpathogenic strain. *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**, 261, (2), 187-193.
102. Rao, V. K.; Rai, G. P.; Agarwal, G. S.; Suresh, S., Amperometric immunosensor for detection of antibodies of *Salmonella typhi* in patient serum. *Anal. Chim. Acta* **2005**, 531, (2), 173-177.
103. Morales, M. D.; Serra, B.; de Prada, A. G. V.; Reviejo, A. J.; Pingarron, J. M., An electrochemical method for simultaneous detection and identification of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella choleraesuis* using a glucose oxidase-peroxidase composite biosensor. *Analyst* **2007**, 132, (6), 572-578.
104. Lermo, A.; Campoy, S.; Barbe, J.; Hernandez, S.; Alegret, S.; Pividori, M. I., In situ DNA amplification with magnetic primers for the electrochemical detection of food pathogens. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, (9-10), 2010-2017.
105. Marques, P.; Lermo, A.; Campoy, S.; Yamanaka, H.; Barbe, J.; Alegret, S.; Pividori, M. I., Double-Tagging Polymerase Chain Reaction with a Thiolated Primer and Electrochemical Genosensing based on Gold Nanocomposite Sensor for Food Safety. *Anal. Chem.* **2009**, 81, (4), 1332-1339.
106. Nandakumar, V.; La Belle, J. T.; Reed, J.; Shah, M.; Cochran, D.; Joshi, L.; Alford, T. L., A methodology for rapid detection of *Salmonella typhimurium* using label-free electrochemical impedance spectroscopy. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, 24, (4), 1039-1042.
107. Laczka, O.; Baldrich, E.; Munoz, F. X.; del Campo, F. J., Detection of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* using interdigitated microelectrode capacitive immunosensors: The importance of transducer geometry. *Anal. Chem.* **2008**, 80, (19), 7239-7247.
108. Mantzila, A. G.; Maipa, V.; Prodromidis, M. I., Development of a faradic impedimetric immunosensor for the detection of *Salmonella typhimurium* in milk. *Analytical Chemistry* **2008**, 80, (4), 1169-1175.

109. Yang, L. J.; Li, Y. B.; Griffis, C. L.; Johnson, M. G., Interdigitated microelectrode (IME) impedance sensor for the detection of viable *Salmonella typhimurium*. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, 19, (10), 1139-1147.
110. Bonanni, A.; Pividori, M. I.; Campoy, S.; Barbe, J.; del Valle, M., Impedimetric detection of double-tagged PCR products using novel amplification procedures based on gold nanoparticles and Protein G. *Analyst* **2009**, 134, (3), 602-608.
111. Yang, L. J., Electrical impedance spectroscopy for detection of bacterial cells in suspensions using interdigitated microelectrodes. *Talanta* **2008**, 74, (5), 1621-1629.
112. Erdem, A.; Pividori, M. I.; Lermo, A.; Bonanni, A.; del Valle, M.; Alegret, S., Genomagnetic assay based on label-free electrochemical detection using magneto-composite electrodes. *Sens. Actuators, B* **2006**, 114, (2), 591-598.
113. Dungchai, W.; Siangproh, W.; Chaicumpa, W.; Tongtawe, P.; Chailapakul, O., *Salmonella typhi* determination using voltammetric amplification of nanoparticles: A highly sensitive strategy for metalloimmunoassay based on a copper-enhanced gold label. *Talanta* **2008**, 77, (2), 727-732.
114. Gehring, A. G.; Crawford, C. G.; Mazonko, R. S.; VanHouten, L. J.; Brewster, J. D., Enzyme-linked immunomagnetic electrochemical detection of *Salmonella typhimurium*. *J. Immunol. Methods* **1996**, 195, (1-2), 15-25.
115. Wang, Z. P. W. Z. P.; Duan, N.; Li, J. Q.; Ye, J.; Ma, S. F.; Le, G. W., Ultrasensitive chemiluminescent immunoassay of *Salmonella* with silver enhancement of nanogold labels. *Luminescence* **2009**, 26, (2), 136-141.
116. Fang, S. B.; Tseng, W. Y.; Lee, H. C.; Tsai, C. K.; Huang, J. T.; Hou, S. Y., Identification of *Salmonella* using colony-print and detection with antibody-coated gold nanoparticles. *J. Microbiol. Methods* **2009**, 77, (2), 225-228.
117. Wang, S. G.; Singh, A. K.; Senapati, D.; Neely, A.; Yu, H. T.; Ray, P. C., Rapid Colorimetric Identification and Targeted Photothermal Lysis of *Salmonella* Bacteria by Using Bioconjugated Oval-Shaped Gold Nanoparticles. *Chem.--Eur. J.* **2010**, 16, (19), 5600-5606.