

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE
CAMPUS DE SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

DOUGLAS ELEUTÉRIO CAMILO

**FILMES NANOESTRUTURADOS PARA DETECÇÃO DO ANTÍGENO
PROSTÁTICO ESPECÍFICO UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE OURO**

Sorocaba – SP
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE
CAMPUS DE SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

DOUGLAS ELEUTÉRIO CAMILO

**FILMES NANOESTRUTURADOS PARA DETECÇÃO DO ANTÍGENO
PROSTÁTICO ESPECÍFICO UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE OURO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais - Universidade Federal de São Carlos, curso de Ciência dos Materiais, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciência dos Materiais, sob a orientação da Profa. Dra. Marystela Ferreira e co-orientação da Profa. Dra. Celina Massumi Miyazaki.

Sorocaba – SP
2019

Camilo, Douglas Eleutério

Filmes nanoestruturados para detecção do antígeno prostático específico utilizando nanopartículas de ouro / Douglas Eleutério Camilo. -- 2019.
71 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador: Marystela Ferreira

Banca examinadora: Sergio Antonio Spinola Machado, Vagner Romito de Mendonça

Bibliografia

1. Filmes Layer-by-Layer. 2. Anticorpo anti-PSA ancorados em nanopartículas de ouro. 3. Detecção do antígeno PSA por técnica eletroquímica. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano – CRB/8 6979



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Douglas Eleutério Camilo, realizada em 15/02/2019:

Marystela Ferreira

Profa. Dra. Marystela Ferreira
UFSCar

Sergio Antonio Spinola Machado

Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado
IQSC/USP

Vagner Romito de Mendonça

Prof. Dr. Vagner Romito de Mendonça
UFSCar



DEDICATÓRIA

À minha família, em especial aos meus pais Antônio e Maria, ao meu irmão Carlinhos e minha namorada Flávia por sempre apoiarem e me ajudarem. Dedico também aos meus amigos da Cambada.

AGRADECIMENTOS

Embora uma dissertação seja entendida como um trabalho individual, muitas pessoas foram fundamentais para a conclusão deste projeto. Deixo aqui meus sinceros agradecimentos:

A todos os professores que participaram da minha trajetória acadêmica nesses anos, aos professores da PPGCM pelos ensinamentos e em especial a Marystela e a Celina por me guiarem, corrigirem e por investir e contribuir na minha formação acadêmica e pessoal.

Aos meus pais Antônio e Maria por sempre confiarem em mim e nas minhas escolhas. Pelo carinho, apoio e incentivo. Por toda ajuda e preocupação durante os dois anos na trajetória Itapetininga-Sorocaba. Muito obrigado Heróis!!!

Ao meu irmão Carlinhos, pelo companherismo, por sempre estar estudando ao meu lado, me ajudando e servindo como inspiração.

A minha namorada Flávia, pelo amor e carinho e principalmente pela sua compreensão e paciência nesse momento da minha vida. Você foi quem mais esteve ao meu lado e quem compartilhou de todos os momentos de tristezas, alegrias e desesperos.

A vocês, meus amigos da Cambada, Luiz Henrique, Luiz Felipe e Yasmin, Guilherme e Tatiane, Eliseu e Milena, Josenaldo, Felipe Goes e Tamiris, Carlinhos e Carol. Sem dúvidas, vocês não poderiam deixar de estar aqui!!

A todos meus colegas de laboratório do grupo GPNNS, muito obrigado pelas inúmeras ajudas que vocês me deram.

*Ao Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Jr. pela colaboração em análises no Instituto de Física de São Carlos – IFSC, da Universidade de São Paulo (USP).
Ao Prof. Dr. Flávio Makoto Shimizu, Prof. Dr. Vagner Romito de Mendonça e Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado pelas contribuições no trabalho.*

Aos órgãos de fomento Capes, CNPq, e Fapesp pelo apoio financeiro e a PPGCM pela oportunidade.

“Assim, procurei descobrir o que é o conhecimento e a sabedoria, o que é a tolice e a falta de juízo. Mas descobri que isto é o mesmo que correr atrás do vento...”

Salomão, Eclesiastes 1:17

RESUMO

CAMILO, Douglas Eleutério. *Filmes nanoestruturados para detecção do antígeno prostático específico utilizando nanopartículas de ouro*. 2019. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) – Centro de Ciências e Tecnologia para a Sustentabilidade, Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2019.

Neste trabalho foram produzidos filmes nanoestruturados para a detecção do antígeno prostático específico (PSA), uma glicoproteína produzida em quantidades anormais em caso de câncer de próstata, utilizando-se de técnicas de automontagem: a monocamada automontada (SAM) para a funcionalização do substrato, seguida da camada por camada (LbL) para a fabricação das multicamadas que compõe a unidade sensorial. Cada etapa de adsorção foi monitorada por diferentes técnicas de caracterização. O anticorpo específico do PSA (anti-PSA) foi imobilizado na superfície de nanopartículas de ouro (conjugado AuNPs-antiPSA) para a posterior montagem pela técnica LbL. As AuNPs-anti-PSA foram caracterizadas por espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis), que indicou bandas de absorção plasmônica das AuNPs em 520 nm e de absorção do triptofano presente no anti-PSA em 260 nm. Com a espectroscopia de fluorescência verificou-se a banda de emissão de fluorescência do triptofano em 367 nm. A análise da morfologia das AuNPs por microscopia eletrônica de transmissão (MET) forneceu o diâmetro médio estimado de $3,5 \pm 0,9$ nm. Os filmes foram fabricados sobre lâminas de ouro (Au) previamente limpas e funcionalizadas com ácido 11-mercaptopundecanóico (11-MUA). Os filmes LbL foram preparados com a adsorção de uma tricamada de polieletrólitos composto por poli(etilenoimina) (PEI), poli(ácido vinilsulfônico, sal de sódio) (PVS) e novamente PEI, sobre o Au funcionalizado com 11-MUA, e caracterizados por voltametria cíclica (VC). Em seguida foi imobilizado o conjugado AuNP-antiPSA e por fim, a albumina de soro bovino (BSA) foi utilizada para bloquear os sítios de ligação não específicos. Observou-se a diminuição da corrente nos picos redox de Fe(II)/Fe(III) com a adsorção sucessiva das camadas. A detecção foi realizada com diferentes concentrações de PSA (0,1, 0,5, 1,0, 4,0, 8,0, 10 e 20 ng mL⁻¹) utilizando a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). A arquitetura descrita, Au/11-MUA/PEI-PVS-PEI/AuNPs-anti-PSA/BSA/PSA, foi também caracterizada por espectroscopia de reflexão-absorção no infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS) para se identificar cada material, a interação entre eles, bem como a interação entre o antígeno e o anticorpo. A seletividade do imunossensor foi analisada através da exposição à imunoglobulina G (IgG). O limite de detecção (LD) e a faixa analítica obtidos da EIE foram, respectivamente, de 0,17 ng mL⁻¹ e 0,1-20 ng mL⁻¹. Os experimentos evidenciaram que a técnica LbL e o uso de AuNPs foram adequados para a construção de um imunossensor de baixo custo, rápido desenvolvimento e alta sensibilidade. Sendo assim, o imunossensor fabricado exibe significativo potencial para ser utilizado no diagnóstico do câncer de próstata.

Palavras-chave: Filmes camada por camada, Anticorpo anti-PSA, Antígeno Prostático Específico, Nanopartículas de Ouro, Detecção Eletroquímica.

ABSTRACT

CAMILO, Douglas Eleutério. *Nanostructured films for detection of the prostatic specific antigen using gold nanoparticles*. 2019. 71 f. Dissertation (Master's Degree in Materials Science) - Center for Science and Technology for Sustainability, Federal University of São Carlos, Sorocaba, 2019.

In the present work, nanostructured films were prepared through the self-assembly techniques for the detection of prostatic specific antigen (PSA), a glycoprotein produced in abnormal levels in case of prostate cancer. Two self-assembly approaches were used: the self-assembled monolayer (SAM) technique for the substrate functionalization and the layer-by-layer (LbL) technique for the building of the sensing unit. The specific antibody to PSA (anti-PSA) was immobilized on the gold nanoparticles surface (AuNP-antiPSA conjugate) for later assembly by the LbL technique. The AuNPs-anti-PSA conjugate was characterized by ultraviolet-visible spectroscopy indicating absorption bands at 520 and 260 nm related to the AuNP plasmons absorption and anti-PSA tryptophan absorption, respectively. The fluorescence spectrum presented a band at 367 nm attributed to the emission of tryptophan fluorescence present in the anti-PSA. The morphology analysis of AuNPs by Transmission Electron Microscopy (MET) provided an estimated average diameter of 3.5 ± 0.9 nm. The films were fabricated on gold (Au) covered glass slides previously cleaned and functionalized with 11-mercaptopundecanoic acid (11-MUA). The LbL films were prepared by the sequential adsorption of nanostructured layers of poly(ethyleneimine) (PEI), poly(vinylsulfonic acid, sodium salt) (PVS) and PEI, on the Au functionalized surface. Cyclic voltammetry (VC) confirmed the adsorption of the layers by the reduction of the current peak of Fe(II)/Fe(III) redox probe. Subsequently, bovine serum albumin (BSA) was used to block the non-specific binding sites. Detection was performed with different concentrations of PSA (0.1, 0.5, 1.0, 4.0, 8.0, 10 and 20 ng mL⁻¹) using Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS). The architecture Au/11-MUA/PEI-PVS-PEI/AuNPs-anti-PSA/BSA/PSA was also characterized by Polarization-Modulation Infrared Reflection-Absorption Spectroscopy (PM-IRRAS) to investigate the interaction between the materials, as well as the interaction between antigen and antibody. The high selectivity of the immunosensor was tested by the exposure of the sensor to a non-specific immunoglobulin G (IgG). The limit of detection (LD) and the range of detection obtained by EIS were 0.17 ng mL⁻¹ and 0.1-20 ng mL⁻¹, respectively. The experiments demonstrated that the LbL technique and the use of AuNPs were suitable for the construction of an immunosensor of low cost, rapid development and high sensitivity. Thus, the fabricated immunoassay exhibits high potential for use in the diagnosis of the early stages of prostate cancer.

Keywords: Layer-by-Layer films, anti-PSA Antibody, Prostate Specific Antigen, Gold Nanoparticles, Electrochemical detection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração da localização da próstata e células cancerosas no sistema reprodutor masculino.	2
Figura 2: Representação espacial das taxas de incidência e mortalidade estimadas em 2017 e 2014, respectivamente, para o câncer de próstata em regiões do Brasil. As taxas são referentes a cada 100 mil homens.	3
Figura 3: Representação esquemática dos componentes e elementos de um biossensor.	8
Figura 4: Evolução do número anual de artigos sobre biossensores eletroquímicos, ópticos e mecânicos de 2010 a 2018.	8
Figura 5: Representação esquemática de um imunossensor eletroquímico do tipo (A) sanduíche e (B) direto.	10
Figura 6: Principais partes da estrutura de um anticorpo do tipo IgG e as regiões de ligação específica com o antígeno.	12
Figura 7: Principais componentes da molécula de hidrocarboneto com grupo de cabeça –SH e sua conformação na superfície do ouro.	14
Figura 8: Ilustração esquemática de deposição de materiais utilizando a técnica LbL sobre um substrato sólido com densidade de carga positiva. As etapas 1 e 3 representam a adsorção dos materiais aniônicos e catiônicos, respectivamente, e as etapas 2 e 4, os processos de lavagem.	15
Figura 9: Representação da (A) relação área superficial específica e volume de cubos com tamanhos diferentes, (B) da oscilação dos plasmons de superfície de nanopartículas esféricas em resposta à interação com ondas eletromagnéticas e (C) níveis eletrônicos presentes em átomos, moléculas, pontos quânticos e corpos massivos sobre um substrato.	18
Figura 10: Métodos top-down e bottom-up de produção de nanopartículas metálicas.	19
Figura 11: Representação (A) da formação da dupla camada elétrica em uma superfície de carga positiva em uma estabilização eletrostática e, (B) do mecanismo de estabilização estérica.	21
Figura 12: Representação esquemática da absorção e transmissão da luz sob a amostra no UV-Vis.	23
Figura 13: Transições eletrônicas que originam os espectros de absorção e emissão de fluorescência.	25
Figura 14: Esquema do princípio da espectroscopia PM-IRRAS que ilustra as polarizações s e p e o ângulo de incidência (θ_i) da radiação infravermelho em relação à superfície.	26
Figura 15: (A) Esquemas simplificados dos feixes coletados para a formação da imagem no MET e (B) imagens de partículas de sílica em campo claro e campo escuro.	28
Figura 16: Representação de uma célula eletroquímica contendo o (A) contra eletrodo, (B) o eletrodo de trabalho e (C) o de referência.	29

Figura 17: Gráficos de (A) potencial aplicado em função do tempo em uma voltametria cíclica e (B) parâmetros eletroquímicos obtidos a partir de um voltamograma cíclico.	30
Figura 18: Representação do Diagrama Nyquist e o circuito elétrico equivalente de Randles.	31
Figura 19: Ilustração das estruturas químicas dos compostos 11-MUA, PEI, PVS e GSH, e as conformações estruturais do PSA e do anti-PSA.	33
Figura 20: Representação esquemática da síntese de AuNPs e imobilização do anticorpo anti-PSA.	36
Figura 21: Sequência de adsorção e lavagem dos filmes SAM, LbL, AuNP-anti-PSA e BSA sobre o eletrodo de ouro.	37
Figura 22: Arquitetura do biossensor com os filmes nanoestruturados contendo as camadas de 11-MUA, PEI, PVS, AuNPs-anti-PSA, BSA e PSA.	38
Figura 23: Espectro de absorção no UV-Vis das AuNPs (linha preta) e do conjugado de AuNPs com anti-PSA (linha vermelha).	42
Figura 24: Espectros de emissão de fluorescência de suspensões de anti-PSA e AuNPs-anti-PSA, com excitação em 280 nm. Os espectros do tampão PBS pH 7,4 e da suspensão de AuNPs são apresentados como referência.	43
Figura 25: (A) Micrografia obtida por MET e (B) histograma de distribuição de diâmetro das AuNPs.	44
Figura 26: Voltamogramas cíclicos obtidos com (a) eletrodo de ouro puro, (b) eletrodo de ouro modificado com 11-MUA, (c) Au/11-MUA/PEI-PVS-PEI (d) Au/11-MUA/PEI-PVS-PEI/AuNPs-anti-PSA e (e) Au/11-MUA/PEI-PVS-PEI/AuNPs-anti-PSA/BSA, em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol L ⁻¹ em PBS pH 7,4, com velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹	45
Figura 27: (A) Espectro de absorção no UV-Vis do filme PEI-PVS-PEI/AuNPs-anti-PSA (linha preta) e da suspensão de AuNPs-anti-PSA (linha vermelha) como referência, e (B) espectro de emissão de fluorescência, com excitação em 280 nm, do filme PEI-PVS-PEI/AuNPs-anti-PSA (linha vermelha) e do quartzo (linha preta) como referência.	47
Figura 28: Espectro de PM-IRRAS das camadas de PEI (linha preta), PEI-PVS (linha vermelha), PEI-PVS-PEI (linha verde), PEI-PVS-PEI/AuNPs-anti-PSA (linha azul). O espectro do 11-MUA foi utilizado como linha de base.	48
Figura 29: Espectros de PM-IRRAS do sensor Au/11-MUA/PEI/PVS/PEI/AuNPs-anti-PSA após a interação com 0,1 (quadrado preto), 1,0 (círculo vermelho), 8,0 (triângulo azul) e 20 ng mL ⁻¹ (verde diamante) de PSA.	49
Figura 30: (A) Diagramas de Nyquist dos espectros de impedância de 100 KHz a 0,1 Hz do eletrodo de ouro modificado com o filme 11-MUA/PEI-PVS-PEI/AuNPs-anti-PSA/BSA após interação com diferentes concentrações de PSA, obtidos em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol L ⁻¹ em PBS pH 7,4. (B) Relação entre a R _{tc} relativa e a concentração de PSA ajustada com o modelo de Langmuir-Freundlich.	50
Figura 31: Espectro de impedância relativa em função da frequência para diferentes concentrações de PSA para o filme 11-MUA/PEI-PVS-PEI/AuNPs-	

anti-PSA/BSA medido em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol L⁻¹ em PBS pH 7,4.
.....53

Figura 32: Resistência a transferência de carga (R_{tc}) para o imunossensor Au/11-MUA/PEI-PVS-PEI/AuNPs-anti-PSA/BSA (1) antes e após a interação com (2) 1 ng mL⁻¹ de PSA, (3) PBS, (4) 25 ng mL⁻¹ de IgG e (5) 20 ng mL⁻¹ de PSA.54

Figura 33: (A) Diagrama de Nyquist dos espectros de impedância de 100 KHz a 0,1 Hz do eletrodo de ouro modificado com o filme 11-MUA/EDC-NHS/anti-PSA/BSA após interação com diferentes concentrações de PSA, obtidos em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol L⁻¹ em PBS pH 7,4.....55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de potencial e corrente de picos obtidos das voltametrias cíclicas da Figura 26.	46
Tabela 2: Valores de R_{Ω} , R_{tc} , Z_w e CPE obtidos a partir do diagrama de Nyquist da arquitetura 11-MUA/PEI-PVS-PEI/AuNPs-anti-PSA/BSA após a incubação de PSA com concentrações de 0,1, 0,5, 1, 4, 8, 10, 20 ng mL ⁻¹	51
Tabela 3: Exemplos de arquiteturas e métodos de biossensores aplicados à detecção de PSA.	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Absorbância
AC	Tensão alternada
Anti-PSA	<i>Prostate Specific Antigen Antibody</i> (Anticorpo específico do antígeno prostático específico)
Au	Ouro
AuNPs	Nanopartículas de ouro
AuNPs-PAMAM	Dendrímeros de poliamidoamina ancoradas em nanopartículas de ouro
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina do Soro Bovino)
C_{dc}	Capacitância da dupla camada elétrica
Chit	<i>Chitosan</i> (chitosana)
CLIA	<i>Chemiluminescent Immunoassays</i> (quimioluminescência)
CPE	<i>Constant Phase Element</i> (elemento de fase constante)
DLVO	Teoria de Boris Derjaguin, Lev Landau, Evert Verwey e Theodor Overbeek
ECLIA	<i>Electrochemiluminescence</i> (eletroquimioluminescência)
ECS	Eletrodo de calomelano saturado
E_g	Energia de gap
EIS/EIE	Electrochemical Impedance Spectroscopy (Espectroscopia de Impedância Eletroquímica)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ensaio de imunoabsorção enzimática)
ELFA	<i>Enzyme-linked Fluorescence Assay</i> (ensaio de fluorescência ligada a enzima)
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_{pc}	Potencial de pico catódico
ΔE_p	Variação de potencial de picos anódico e catódico
EPH	Eletrodo Padrão de Hidrogênio
EQD	Eletrodo quimicamente modificado
F_{ab}	<i>Fraction Antigen-Binding</i> (fragmento de ligação com o antígeno)
F_c	Fração cristalizável
FRA	<i>Frequency Response Analysis</i> (análise de resposta em frequência)
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectrometry</i> (Espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier)
GPNS	Grupo de Pesquisa de Nanociência e Nanotecnologia Aplicada em Sensoriamento
GSH	Glutathiona
I_{pa}	Corrente anódica
I_{pc}	Corrente catódica
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina G
IL	<i>Ionic liquid</i> (líquido iônico)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
K_d	Constante de dissociação
LbL	<i>Layer-by-Layer</i> (camada por camada)

LD	Limite de detecção
LC-MS	<i>Liquid Chromatography-mass Spectrometry</i> (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa)
TEM/MET	Transmission Electron Microscopy (Microscopia eletrônica de transmissão)
11-MUA	Ácido 11-mercaptoundecanóide
MWCNT	Nanotubo de carbono de parede múltipla
NHS-EDC	N-Hidroxisuccinimida (NHS) / N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC)
NPM	Nanopartículas magnéticas
NPs	Nanopartículas
OCP	<i>Open Circuit Potential</i> (potencial de circuito aberto)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (tampão fosfato salino)
PEI	Poli(etilenoimina)
PM-IRRAS	<i>Polarization modulation-infrared reflection-adsorption spectroscopy</i> (Espectroscopia de Reflexão e Absorção no Infravermelho com Modulação da Polarização)
PSA	<i>Prostate-specific antigen</i> (antígeno prostático específico)
PVS	Poli(vinil sulfato de sódio)
PZT	<i>Piezo devices made of lead zirconate titanate</i> (dispositivos piezoelétricos de titanato de zirconato de chumbo)
R_{tc}	Resistência a transferência de carga
R_Ω	Resistência ôhmica da solução
SAM	<i>Self-assembled Monolayer</i> (monocamada automontada)
SIM	Sistema de Informação de Mortalidade
SFS	Sulfoxilato de famaldeído
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i> (ressonância plasmônica de superfície)
T	Transmitância
TOAB	Tetrabutilamônio
UV-Vis	Ultravioleta visível
VC	Voltametria cíclica
Z	Impedância
Z'	Impedância real
-Z''	Impedância imaginária
Z_w	Impedância de Warburg

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	CÂNCER DE PRÓSTATA.....	2
2.	OBJETIVOS	6
2.1	OBJETIVO GERAL	6
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
3.	FUNDAMENTOS TEÓRICOS	7
3.1	BIOSSENSOR.....	7
3.2	ANTICORPOS, ANTÍGENOS E SUAS INTERAÇÕES.....	10
3.3	MONOCAMADAS AUTOMONTADAS (SAMs).....	12
3.4	FILMES CAMADA POR CAMADA (LAYER-BY-LAYER-LBL).....	14
3.5	NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	16
3.5.1	Propriedades das nanopartículas	17
3.5.2	Síntese de nanopartículas de ouro por redução química.....	19
3.5.3	Métodos de estabilização de nanopartículas.....	20
3.6	MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS	22
3.6.1	Espectroscopia de absorção no UV-Vis.....	22
3.6.2	Espectroscopia de fluorescência	24
3.6.3	Espectroscopia de reflexão-absorção no Infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS).....	25
3.7	MÉTODO MICROSCÓPICO	27
3.7.1	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	27
3.8	MÉTODOS ELETROQUÍMICOS.....	28
3.8.1	Voltametria Cíclica (VC)	28
3.8.2	Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)	30
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1	MATERIAIS.....	32
4.2	PREPARO DE SOLUÇÕES.....	33
4.3	LIMPEZA DOS SUBSTRATOS.....	34
4.4	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E IMOBILIZAÇÃO DO ANTI-PSA.....	35
4.5	CONSTRUÇÃO DA MONOCAMADA AUTOMONTADA DE SUPORTE (SAM).....	36
4.6	CONSTRUÇÃO DOS FILMES NANOESTRUTURADOS.....	37
4.7	CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA E MICROSCÓPICA.....	39

4.8	CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA	40
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS AUNPS POR UV-VIS.....	41
5.2	CARACTERIZAÇÃO DO CONJUGADO AUNPS-ANTI-PSA POR FLUORESCÊNCIA.....	42
5.3	CARACTERIZAÇÃO DA SÍNTESE DE AUNPS POR MET	43
5.4	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES NO ELETRODO DE OURO MODIFICADO	44
5.4.1	Análises de Fluorescência e UV-Vis dos filmes	46
5.4.2	Investigação da adsorção dos filmes e da resposta antígeno- anticorpo por PM-IRRAS	47
5.5	DETECÇÃO DO BIOMARCADOR PSA.....	49
5.5.1	Seletividade do imunossensor.....	53
5.5.2	Comparação com um imunossensor convencional (Au/11- MUA/EDC-NHS/anti-PSA/BSA).....	54
5.5.3	Comparação do desempenho com outros imunossensores ..	56
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
	REFERÊNCIAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas o interesse pelo desenvolvimento de biossensores para o diagnóstico de doenças, como o câncer, tem crescido consideravelmente, tornando possível a construção de uma vasta literatura sobre o assunto, que contribui significativamente no desenvolvimento e aprimoramento de novos dispositivos^{1,2}. Esses biossensores são capazes de determinar quantidades precisas de biomarcadores de doenças permitindo seu diagnóstico em estágios iniciais.

Devido ao seu crescimento entre a população mundial, o câncer se apresenta como a doença de maior interesse clínico no que diz respeito à detecção e cura. Entre eles, o câncer de próstata representa um sério risco à saúde pública devido a sua alta taxa de incidência, considerado o câncer não-cutâneo mais comum entre os homens^{3,4}. Há diversos exames para seu diagnóstico, como exames de imagem, sangue ou biópsia, porém, esses métodos demandam tempo, necessitam de profissionais e são geralmente caros. Nesse sentido, os biossensores possuem inúmeras vantagens quando comparados com os métodos tradicionais, dentre elas, o baixo custo e facilidade em termos de desenvolvimento, alta sensibilidade e seletividade, além de serem acessíveis, portáteis e prontos para uso com resultados em intervalos de tempo relativamente curtos^{5,6}.

Dentre as técnicas para a fabricação de biossensores, monocamadas automontadas (do inglês *Self-assembled Monolayers* – SAMs) e filmes automontados camada por camada (do inglês *Layer-by-Layer* – LbL) são comumente utilizados para imobilização de biomoléculas devido a simplicidade de construção, versatilidade e capacidade de preservação da atividade biológica⁷, além de possibilitar alta organização e homogeneidade das biomoléculas⁸, o que permite a reprodutibilidade. Quando essas monocamadas são combinadas com outros materiais, o desempenho da detecção pode ser otimizado. Por exemplo, o uso de nanopartículas metálicas, como as nanopartículas de ouro (AuNPs), pode melhorar a sensibilidade e seletividade sensorial devido as suas propriedades catalíticas e biocompatíveis^{9,10}.

Devido as propriedades de otimização proporcionadas pela tecnologia dos materiais nanoestruturados e métodos de automontagem descritos neste

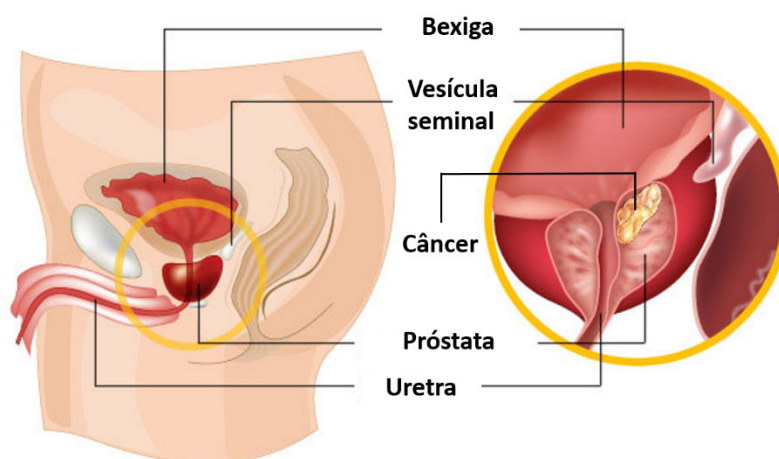
estudo, buscou-se utilizá-los para a construção de um biossensor para detecção do biomarcador PSA.

1.1 CÂNCER DE PRÓSTATA

A próstata é uma glândula fibromuscular do sistema reprodutor masculino localizada abaixo da bexiga, ilustrado na Figura 1. Sua função é de extrema importância para a preservação dos espermatozóides através da produção de 20 a 30% dos fluídos que o constituem, fornecendo assim proteção e nutrientes fundamentais para a sua sobrevivência^{11,12}. Sua massa e comprimento normal ficam em torno de 20 g e 2,5 cm, respectivamente¹³.

O câncer de próstata inicia-se com o crescimento de uma massa de tecido através da divisão irregular e multiplicação das células (Figura 1). Devido à sua capacidade metastática, esse tipo de câncer é considerado um tumor maligno, capaz de invadir outras áreas do corpo, como vesículas seminais, reto, bexiga e até mesmo os ossos; ou ainda migrar para outros órgãos através da transição das células tumorais pela corrente sanguínea¹⁴.

Figura 1: Ilustração da localização da próstata e células cancerosas no sistema reprodutor masculino.



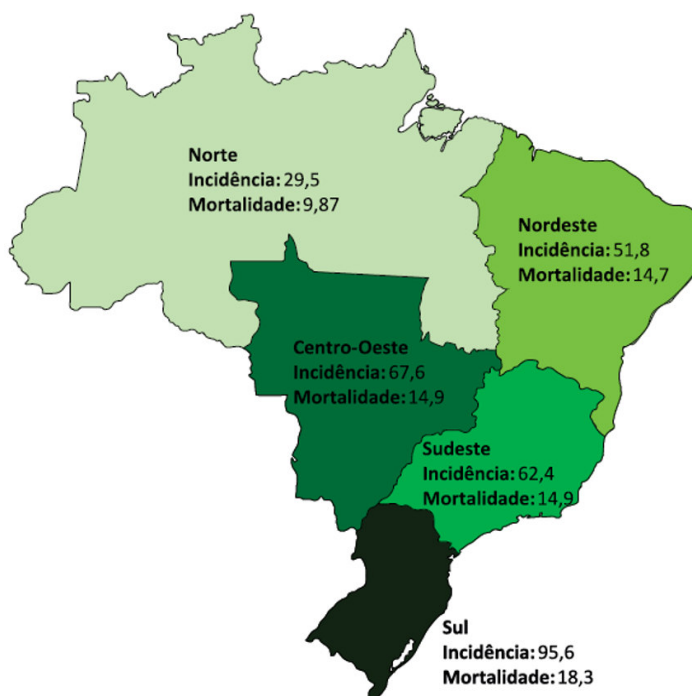
Fonte: Adaptado de Samadi, [s.d.]¹⁵.

O câncer de próstata é o segundo câncer mais comum entre os homens, depois do câncer de pele, e sua maior incidência ocorre em idades avançadas ou devido à fatores genéticos. Tem se tornado uma doença de grande relevância

clínica, não só pelas altas taxas de incidência e mortalidade, mas também pelas probabilidades de cura quando a doença é diagnosticada precocemente. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), a estimativa de novos casos para o ano de 2018 chegam a 68.220, com um número de mortes registrados em 2013 de 13.772, segundo dados do Sistema de Informação de Mortalidade (SIM) do Ministério da Saúde¹⁶. Em todo o mundo foi registrado uma estimativa de 1,4 milhão de casos diagnosticados em 2016¹⁷. A Figura 2 ilustra as taxas brutas de incidência e mortalidade em 2017 e 2014, respectivamente, para as regiões do Brasil, onde observa-se que as regiões Sul e Centro-Oeste apresentam maior número de diagnósticos e mortes causadas por câncer de próstata.

As taxas de incidência tendem a crescer ao longo dos anos para o Brasil, o que não está efetivamente relacionado com a mudança na qualidade de vida do brasileiro, obesidade ou grande quantidade de idosos no país, mas principalmente devido à maior disponibilidade de métodos de detecção, melhoria na qualidade dos registros e aumento de diagnósticos¹⁸.

Figura 2: Representação espacial das taxas de incidência e mortalidade estimadas em 2017 e 2014, respectivamente, para o câncer de próstata em regiões do Brasil. As taxas são referentes a cada 100 mil homens.



Fonte: INCA, [s.d.]¹⁸.

O câncer de próstata é uma doença assintomática, sendo diagnosticado através de exames da dosagem sérica do antígeno prostático específico (PSA). O PSA, descoberto na segunda metade do século XX¹⁹, é uma glicoproteína produzida por células normais e malignas da próstata sendo o marcador sérico mais utilizado para o diagnóstico de câncer, dentre outras anomalias na próstata^{20,21}. Embora uma certa quantidade de PSA seja normal, o mesmo se apresenta em quantias altas para pacientes com a doença; e conseqüentemente, foi estabelecido que o nível de PSA para uma pessoa saudável seria abaixo de 4 ng mL⁻¹³, enquanto que acima desse valor o paciente pode estar com a doença. É importante destacar que não é correto diagnosticar o câncer de próstata baseando-se somente em altos níveis de PSA, essa informação deve ser comprovada por outros métodos como o toque retal ou ultrassonografia pélvica. Isso se deve ao aumento dos níveis de PSA para outras patologias, entre elas, a prostatite, hiperplasia benigna, uso de medicações e até mesmo o inchamento normal da glândula prostática que ocorre com o avanço da idade²².

Existem alguns métodos convencionais utilizados para a detecção do PSA, como o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), radioensaio (RIA), quimioluminescência (CLIA), eletroquimioluminescência (ECLIA), ensaio de fluorescência ligada a enzima (ELFA) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS)^{4,23}. Entre eles, e talvez o mais prevalente, o teste ELISA é utilizado para quantificação de proteínas através de reações enzimáticas^{23,24} e possui especificidade e sensibilidade capaz de detectar baixas concentrações. Contudo, o desenvolvimento do teste, assim como os outros citados, requerem processos longos, intensivos e utilizam-se de equipamentos de alto custo^{25,26}. Nesse sentido, a principal vantagem que prioriza o desenvolvimento de biossensores é justamente o baixo custo, rapidez em obter resultados e a miniaturização do dispositivo, além de terem características superiores em sensibilidade e seletividade.

Na literatura pode-se encontrar diversas propostas de desenvolvimento de biossensores, com resultados bastante promissores, utilizando a tecnologia ótica, eletroquímica ou mecânica como mecanismos de detecção. Uludag e Tothill²⁷, fabricaram um biossensor ótico para a detecção do PSA utilizando o

princípio de ressonância plasmônica de superfície (SPR). Eles utilizaram anticorpos anti-PSA ancoradas em nanopartículas de ouro, semelhante a proposta deste trabalho. Esses conjugados de AuNPs-anti-PSA foram adsorvidos no sensor de ouro de SPR funcionalizado e modificado com ácido 11-mercaptopundecanóide (11-MUA), anticorpo anti-PSA e PSA. A variação do ângulo de SPR foi proporcional a concentração de PSA entre 0,29 e 150 ng mL⁻¹, com limite de detecção de 0,29 ng mL⁻¹. Ye *et al.*²⁸, utilizaram nanopartículas de zircônia dopada com complexo térbio (Tb³⁺), revestidas com BSA e ligadas covalentemente a estreptavidina para a detecção de PSA através do mecanismo de fluorescência. Este projeto apresentou resultado satisfatório, com respostas de detecção de 0,1 a 50 ng mL⁻¹ e limite de detecção de 0,4 ng mL⁻¹.

Para biossensores eletroquímicos que utilizam o mecanismo de transferência de carga através da oxidação-redução de espécies químicas, destaca-se o trabalho de Kavosi *et al.*²⁹ que utiliza a técnica de espectroscopia de impedância para detectar o PSA. Kavosi *et al.* desenvolveram um biossensor baseado na imobilização de anti-PSA em dendrímeros de poli(amidoamina) ancorados em nanopartículas de ouro (AuNPs-PAMAM) ligados ao nanocompósito formado por nanotubos de carbono de paredes múltiplas, líquido iônico e quitosana (MWCNTs/IL/Chit). Seus resultados apresentaram uma curva linear de detecção até 25 ng mL⁻¹, com limite de detecção de 0,5 ng mL⁻¹.

Como exemplo de biossensor mecânico, Lee *et al.*³⁰ desenvolveram um mecanismo de detecção de PSA através da fabricação de cantilevers de Pb(Zr_{0.52}Ti_{0.48})O₃ (PZT) nanomecânicos modificados com Ta/Pt/PZT/Pt/SiO₂ em uma camada de suporte de SiNx. A interação antígeno-anticorpo foi medida através da frequência de vibração do cantilever onde o anticorpo encontra-se imobilizado. A menor concentração detectável foi 0,1 ng mL⁻¹, alcançada para cantilevers de 100 µm, podendo chegar a 0,01 ng mL⁻¹ para cantilevers de 50 µm; os limites de detecção não foram descritos.

Dentre esses biossensores, os eletroquímicos surgiram como alternativa promissora devido à simplicidade, baixo limite de detecção e seletividade, alcançados através de baixos valores de potencial e corrente, além de oferecerem inúmeras análises possíveis de respostas causadas por imunorreações, como mudança de potencial, capacitância, condutância, impedância e massa³¹. Devido a isso, neste trabalho, propôs-se o

desenvolvimento de um biossensor eletroquímico utilizando a simplicidade, acessibilidade e compatibilidade da técnica LbL, juntamente com as propriedades eletrônicas, catalíticas e biocompatíveis das AuNPs.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um imunossensor para a detecção do PSA, de forma rápida e de baixo custo, através da fabricação de filmes nanoestruturados utilizando a técnica LbL e nanopartículas de ouro, e caracterização empregando métodos eletroquímicos e ópticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar nanopartículas de ouro (AuNPs) utilizando mecanismo de estabilização estérica para ancoragem do anticorpo anti-PSA.
- Caracterizar a solução de nanopartículas de ouro com anticorpo (AuNPs-anti-PSA) por Espectroscopia no Ultravioleta Visível (UV-Vis) e Espectroscopia de Fluorescência.
- Caracterizar a morfologia e tamanho das AuNPs por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).
- Fabricar filmes nanoestruturados para a imobilização do conjugado AuNPs-anti-PSA empregando SAM em ouro e filmes LbL de poli(etilenoimina) (PEI) e poli(vinil sulfato de sódio) (PVS).
- Verificar a deposição e interação dos filmes por Espectroscopia de Reflexão e Absorção no Infravermelho com Modulação da Polarização (PM-IRRAS).
- Caracterizar os filmes por espectroscopia de UV-Vis e espectroscopia de fluorescência.
- Verificar a deposição dos materiais e biomateriais sobre o eletrodo de ouro e analisar a resposta do sensor ao PSA utilizando Voltametria Cíclica

(VC) e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE), respectivamente.

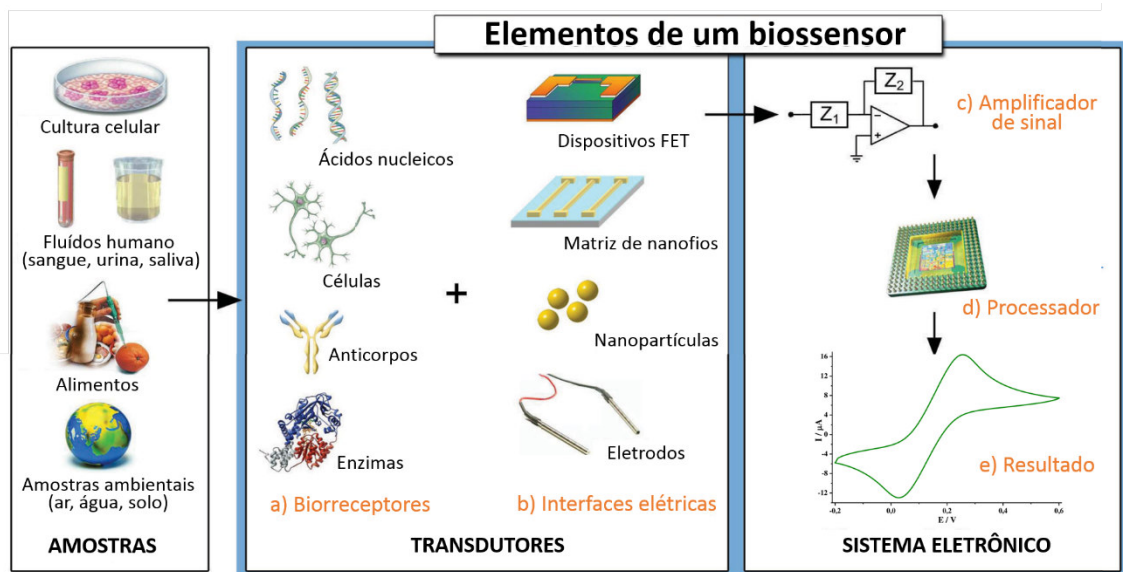
3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1 BIOSENSOR

Biossensores são dispositivos analíticos, constituídos basicamente por um biorreceptor e um transdutor físico-químico, capazes de converter respostas biológicas em sinais elétricos mensuráveis^{32,33}. O biorreceptor é um componente biológico, como tecido, microorganismo, enzima, anticorpo, ácido nucléico, entre outros, capaz de reconhecer e interagir com um determinado analito específico; o transdutor irá converter esse reconhecimento molecular em um sinal analiticamente mensurável, proporcional à concentração do analito³⁴.

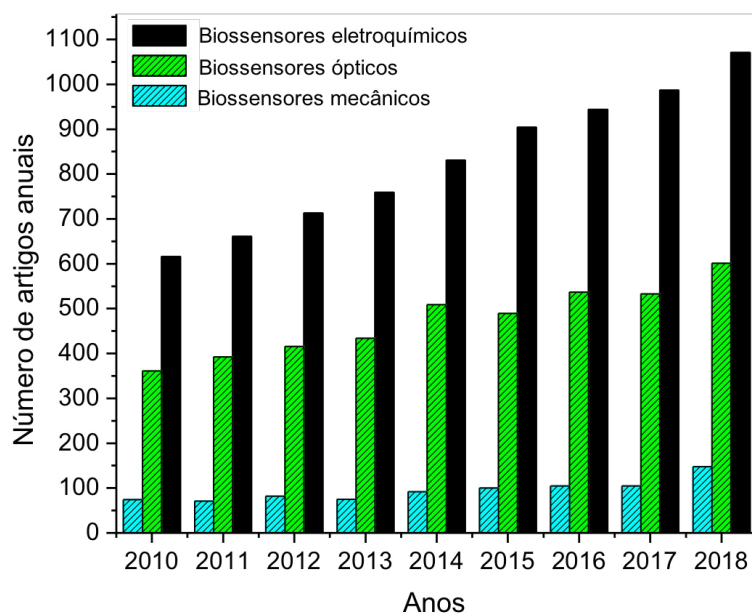
A Figura 3 ilustra um esquema de variados elementos que podem constituir um biossensor: a) os biorreceptores que irão se ligar ao analito de interesse; b) uma arquitetura de interface para transportar a informação gerada pela ligação molecular específica, dando origem a um sinal captado pelo elemento transdutor e convertido em sinal elétrico; c) amplificador do sinal eletrônico recebido através de um circuito; d) processamento do sinal amplificado através de, por exemplo, um software de computador que será convertido em parâmetros físico-químicos para gerar um e) gráfico a ser interpretado pelo operador³⁵. As amostras utilizadas para detecção podem variar desde células desenvolvidas sob condições controladas até alimentos, fluídos biológicos e amostras ambientais. Dentre os transdutores, os microssistemas mais utilizados são os eletroquímicos, mecânicos e ópticos. Comparados com os demais, os transdutores eletroquímicos têm se mostrado promissores para o desenvolvimento de biossensores, apresentando um crescente desenvolvimento nos últimos anos (Figura 4).

Figura 3: Representação esquemática dos componentes e elementos de um biossensor.



Fonte: Adaptado de Grieshaber *et al.*, 2008³⁵.

Figura 4: Evolução do número anual de artigos sobre biossensores eletroquímicos, ópticos e mecânicos de 2010 a 2018.



Fonte: Pesquisa realizada na base de dados Web of Science, 2019. Palavras-chave pesquisadas: "electrochemical biosensors", "optical biosensors" e "mechanical biosensors".

As principais características dos biossensores, que os tornam atrativos para o mercado, são sua sensibilidade, seletividade, portabilidade, simplicidade, curto tempo de análise e baixo custo. A sensibilidade é a variação de um

determinado sinal de saída com o de entrada; em outras palavras, um sensor com alta sensibilidade permite grandes variações de sinal de saída a partir de uma pequena variação de entrada. O limite de detecção é a quantidade mínima efetiva que um biossensor detecta um determinado analito com um nível de confiança declarado (geralmente 99%) e sua precisão depende do modelo utilizado. A seletividade é a capacidade de diferenciar/detectar diferentes analitos ou interferentes.

Muitos biossensores, principalmente aplicados em medicina, possuem capacidade de detectar concentrações muito baixas, da ordem de ng mL^{-1} e fg mL^{-1} , o que favorece o monitoramento de doenças em estágios iniciais. A seletividade determina o número de diferentes substâncias que um biossensor pode detectar ou, em outras palavras, a capacidade de detecção específica em amostras contendo vários aditivos e contaminantes. Um biossensor seletivo ideal é aquele que detecta apenas o seu analito de interesse e não fornece respostas significativas para qualquer outra substância. Um exemplo de alta seletividade é a interação antígeno-anticorpo². Devido às características de afinidade, avidéz e especificidade, um anticorpo em particular tem a capacidade de reagir com apenas um antígeno, o que é fundamental para se obter respostas confiáveis³⁶.

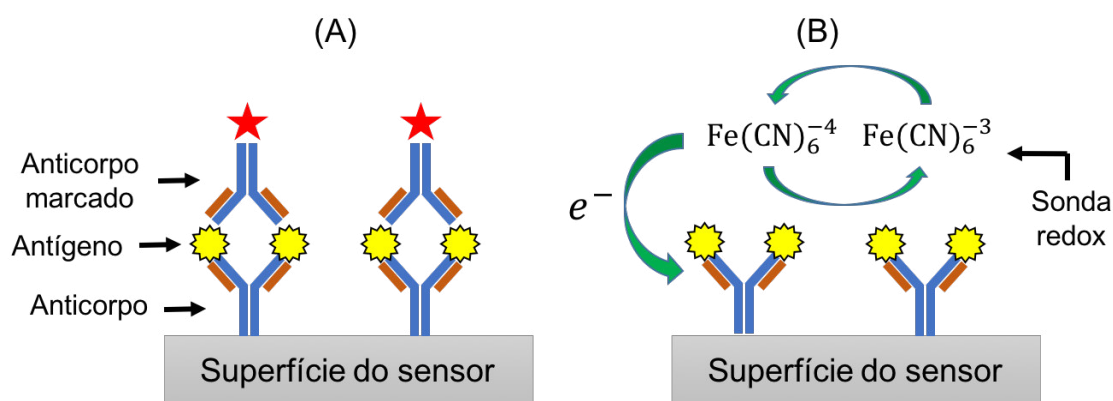
O imunossensor é um tipo de biossensor baseado na interação específica de antígenos e anticorpos. Há diversos trabalhos que se utilizam de transdutores eletroquímicos^{37,38}, ópticos^{39,40} ou mecânicos^{30,41} em imunossensores de PSA, onde todos fazem uso da interação antígeno-anticorpo, o que confere maior seletividade ao dispositivo⁴². A ligação do complexo antígeno-anticorpo ocorre por meio de interações fracas e não covalentes, como interações eletrostáticas, forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio⁴³.

Os imunossensores são divididos em classes, os tipos *sanduíche*, que utilizam *marcadores*, e os diretos, sem uso de *marcadores*. O imunossensor do tipo *sanduíche* caracteriza-se por ter dois anticorpos ligados ao antígeno, onde o primeiro anticorpo (ou anticorpo de captura) é imobilizado na superfície do eletrodo que está conectado a um transdutor; a amostra contendo o analito (antígeno) é adicionado para a formação do complexo antígeno-anticorpo, e mais anticorpos (ditos anticorpos secundários) são adicionados, conforme ilustrado na Figura 5(A). Esses últimos anticorpos são marcados com enzimas

ou moléculas coloridas ou capazes de emitir fluorescência⁴⁴, o que permite mensurar o antígeno.

Os imunossensores de ensaios diretos ou *sem marcadores* empregam apenas o primeiro anticorpo (de captura) e não necessitam de um marcador. Para tal, o sensor contendo o anticorpo é imerso em uma sonda redox e sua resposta eletroquímica é medida antes e após a interação com o antígeno⁴⁵, conforme ilustrado na Figura 5(B). A resposta do imunossensor é verificada com a mudança do sinal quando comparado com o sinal inicial (apenas com anticorpo), proporcional à concentração do analito.

Figura 5: Representação esquemática de um imunossensor eletroquímico do tipo (A) *sanduíche* e (B) direto.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os imunossensores do tipo *sanduíche* são comumente utilizados quando se deseja alcançar sensibilidades altas, o que é vantajoso para detecção de marcadores que precisam ser detectados em pequenas quantidades. Porém, os imunossensores diretos podem ser alternativas interessantes, apresentando vantagens sob os imunossensores *marcados* no que tange a economia de dinheiro e tempo; são relativamente mais simples, permitem detecção em única etapa e dispensam uso de reagentes adicionais⁴⁶. O imunossensor construído neste trabalho é do tipo direto, conforme a Figura 5(B).

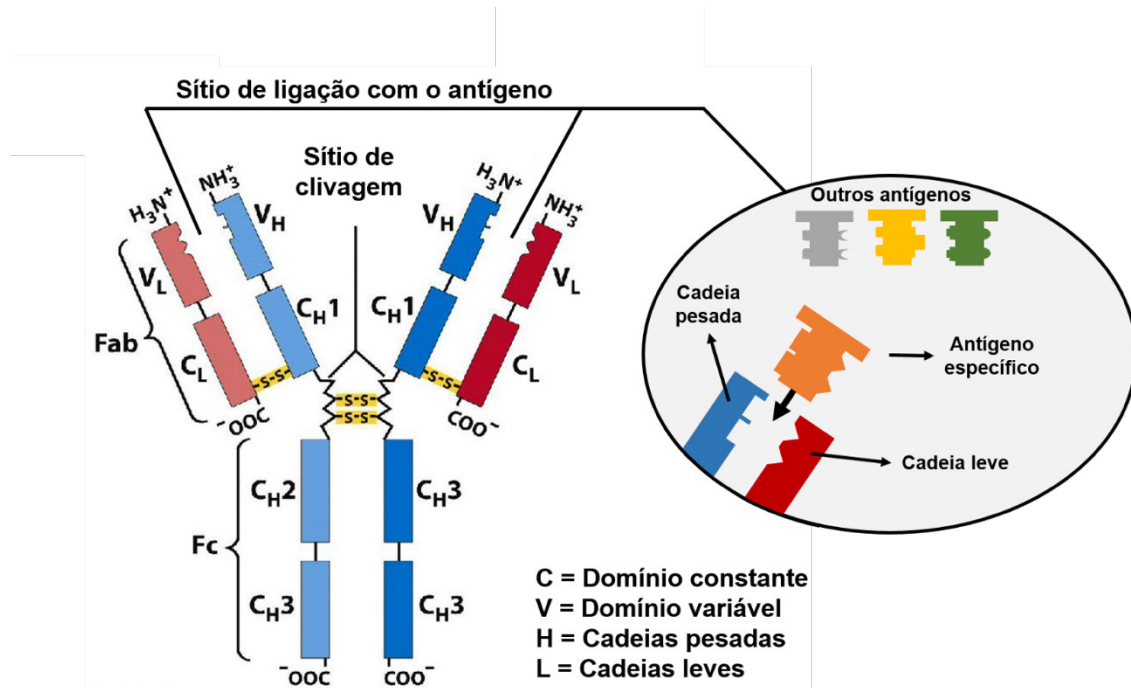
3.2 ANTICORPOS, ANTÍGENOS E SUAS INTERAÇÕES

Anticorpos pertencem à família estrutural das glicoproteínas, também chamadas imunoglobulinas (Ig), produzidas principalmente por células plasmáticas para neutralizar agentes estranhos no organismo, como bactérias e vírus. No organismo, os anticorpos podem se ligar a receptores da superfície celular, proteínas ligadas à membrana (ou associadas) ou proteínas circulantes causando vários tipos de efeitos diretos e indiretos, entre eles o recrutamento de células efectoras, modulação celular e citotoxicidade celular⁴⁷.

Os anticorpos apresentam muitas semelhanças entre si no que diz respeito a estrutura básica, mas são diferentes em propriedades físico-químicas⁴⁸. Existem diferentes classes de anticorpos, chamados isotipos, o IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, diferenciados pela forma da cadeia pesada que apresentem; esses desempenham diferentes funções no organismo conforme cada tipo de corpo estranho que interagem⁴⁹. São compostos por duas regiões distintas: uma região ou domínio constante que pode apresentar até quatro formas bioquimicamente distinguíveis; e a outra região variável que pode assumir distintas formas, o que permite a existência de uma variedade de anticorpos e, conseqüentemente, uma variedade de antígenos⁴³.

As unidades básicas de quatro cadeias (2 cadeias pesadas idênticas e 2 cadeias leves idênticas), presente na região variável do anticorpo descrita acima, são simétricas e ligadas por interações secundárias e ligações de dissulfeto⁴⁸. Essas unidades são ligadas através do sítio de clivagem que permite a flexibilidade independente dos dois braços e formam a estrutura em Y dos anticorpos, como ilustrado na Figura 6. Essa região também é chamada de fragmento F_{ab} , onde encontra-se localizado o grupo terminal amino que permite a ligação específica com o antígeno através da combinação das regiões variáveis e constantes presentes nas cadeias leves e pesadas⁴³. O fragmento constante F_c localizado na “cauda” do anticorpo, denominado fragmento cristalizável, não tem ligação específica com o antígeno, mas interage com células imunes e proteínas e é responsável por regular funções imunológicas, reconhecer e até mesmo matar patógenos. Esse fragmento corresponde aos domínios constantes CH_2 e CH_3 emparelhados e é a parte do anticorpo responsável pela mediação das suas funções efectoras⁴³.

Figura 6: Principais partes da estrutura de um anticorpo do tipo IgG e as regiões de ligação específica com o antígeno.



Fonte: Elaborado pelo autor, com base em Graça, 2016⁵⁰.

O antígeno pode ser qualquer molécula capaz de induzir uma resposta imune, como vírus, parede celular bacteriana, proteínas, carboidratos complexos, fosfolípidios ou outras macromoléculas. Como macromoléculas são maiores do que a ligação específica do anticorpo, geralmente o mesmo se liga a uma região das macromoléculas, denominadas epítopos. O reconhecimento entre complexos antígeno-anticorpo ocorre apenas quando um antígeno tem seu epítipo específico para um determinado anticorpo (representado na ampliação da Figura 6). Essa interação ocorre por meio de ligações secundárias, incluindo forças eletrostáticas, ligações de hidrogênio e forças de van der Waals.

No que tange ao desenvolvimento de imunossensores, alguns fatores podem influenciar na ligação antígeno-anticorpo, como temperatura e pH que, se inadequados, podem ocasionar o rompimento ou impedir a ligação entre antígeno-anticorpo⁵¹.

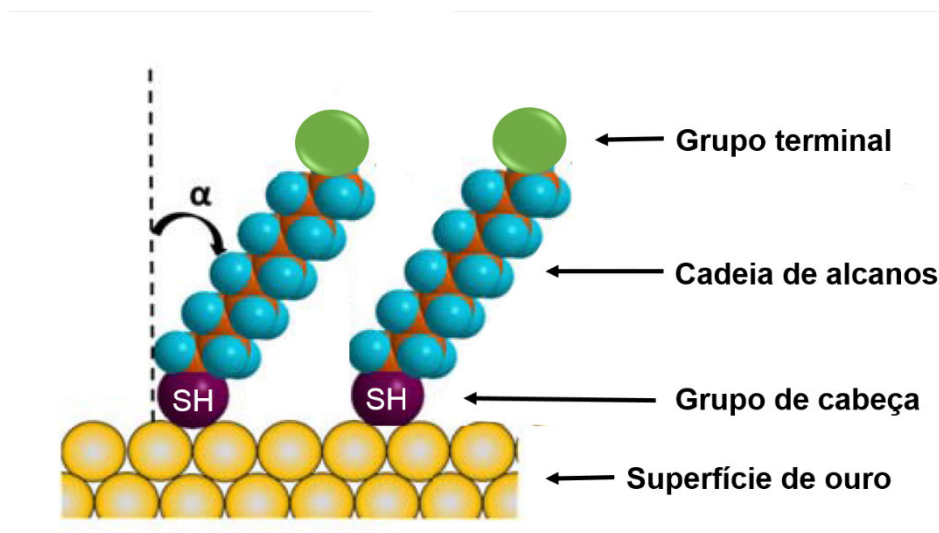
3.3 MONOCAMADAS AUTOMONTADAS (SAMs)

O uso de monocamadas automontadas (SAMs) para a funcionalização de eletrodos remontam da década de 70 com os chamados eletrodos quimicamente modificados (EQM)^{52,53}. As SAMs constituem-se por um grupo químico de cabeça, cadeia e um grupo terminal, e são montagens moleculares ordenadas que se formam espontaneamente através da imersão de uma superfície sólida em solução contendo moléculas orgânicas. A adsorção ocorre através da característica específica de seu grupo de cabeça a um substrato⁵⁴.

O desenvolvimento de biossensores apresentam limitações no que tange a adsorção de filmes e moléculas de interesse devido à falta de afinidade e interação entre substância e substrato, além de fatores como irregularidade do substrato e adsorção dos produtos ou sub-produtos da reação redox, o que pode prejudicar as propriedades e características de sensibilidade, seletividade e estabilidade⁵⁵. O emprego de SAMs surgiu como alternativa promissora para suprimir essas limitações, fornecendo várias vantagens devido a propriedades como compatibilidade biológica, resistência química, reconhecimento molecular, e utilidades como controle de transferência eletrônica, proteção de substratos a produtos químicos agressivos e suporte para ancoragem de outras moléculas (usadas principalmente em biossensores)^{56,57}.

As SAMs podem ser formadas por moléculas de alcanotióis e dissulfetos em ouro e prata, e por alquilsiloxanos em superfícies hidroxiladas, como sílica, vidro e alumina⁵⁸. São mais frequentemente utilizadas para funcionalização de superfícies de ouro através da alta afinidade ouro-enxofre que ocorre pela quimissorção do grupo sulfidril (-SH) de alcanotióis⁵⁹. Essas moléculas, quando adsorvidas, passam a ter uma estrutura altamente organizada, originada pelas interações de hidrogênio e de van der Waals entre as cadeias longas⁵⁵ e com um determinado ângulo de inclinação (cerca de 20 a 30° em relação à normal) gerada pela menor área ocupada por uma cadeia carbônica (18,4 Å²) em relação a área ocupada pelo grupo tiol adsorvido sobre a superfície de Au (21,7 Å²)⁶⁰. A Figura 7 esquematiza a conformação de uma SAM numa superfície de ouro.

Figura 7: Principais componentes da molécula de hidrocarboneto com grupo de cabeça -SH e sua conformação na superfície do ouro.



Fonte: Modificada de Wang *et al.*, 2015⁶¹.

A fabricação de biossensores utilizando SAMs tem se mostrado promissora devido à sua simplicidade e versatilidade, permitindo o aumento de seletividade, estabilidade das unidades sensoriais através do controle de variáveis que influenciam na transferência eletrônica como a natureza do elemento biológico e a distância do centro de óxido-redução em relação à superfície do eletrodo⁵⁵. Além disso, as SAMs são úteis para preparar superfícies concedendo cargas ou hidrofobicidade para que outros materiais possam ser depositados por outros métodos, como o LbL⁶² ou o Langmuir-Blodgett (LB)⁶³.

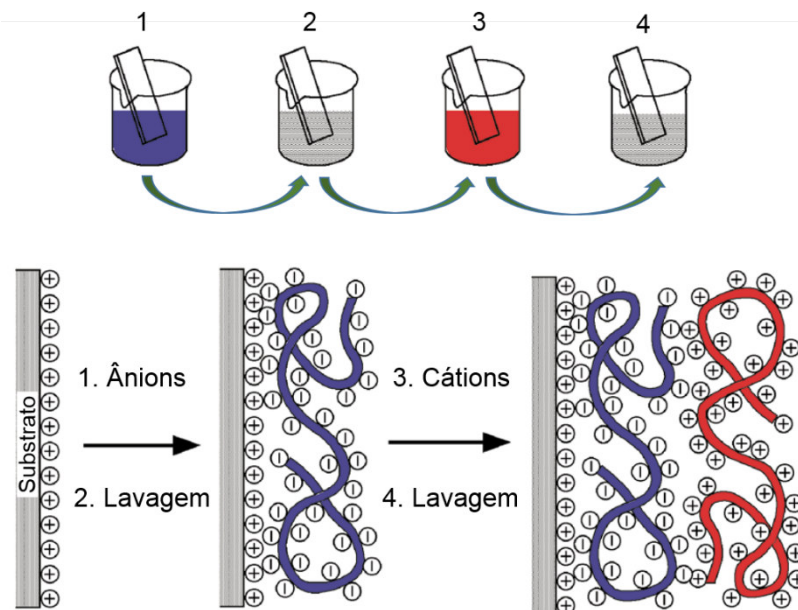
3.4 FILMES CAMADA POR CAMADA (LAYER-BY-LAYER-LBL)

A deposição via técnica LbL é um dos principais métodos de fabricação de filmes finos e revestimento de superfícies. Desenvolvido por Decher *et al.*⁶⁴, a técnica é relativamente simples, de baixo custo e pode ser feita manualmente através do uso de béqueres contendo soluções de materiais catiônicos e aniônicos. A adsorção dos materiais ocorre de forma sequencial na superfície de um substrato imergindo-o entre as diferentes soluções, conforme ilustrado na Figura 8. As etapas são descritas a seguir, considerando um substrato com densidade de carga positiva:

- i. Imersão do substrato na solução aniônica;

- ii. Imersão do substrato na solução de lavagem (primeira camada);
- iii. Imersão do substrato na solução catiônica;
- iv. Imersão do substrato na solução de lavagem (segunda camada).

Figura 8: Ilustração esquemática de deposição de materiais utilizando a técnica LbL sobre um substrato sólido com densidade de carga positiva. As etapas 1 e 3 representam a adsorção dos materiais aniônicos e catiônicos, respectivamente, e as etapas 2 e 4, os processos de lavagem.



Fonte: Adaptado de Decher, 1997⁶⁵.

O tempo de imersão em cada solução é determinado através do estudo da cinética de crescimento dos filmes, que varia dependendo das soluções utilizadas. As soluções de lavagem são utilizadas entre cada etapa para remover o excesso de material e evitar a contaminação da solução seguinte⁶⁶. Este ciclo pode ser repetido novamente até que o número de bicamadas desejado seja depositado.

Existe uma variedade de materiais que podem ser depositados utilizando a técnica LbL, incluindo polieletrólitos, sais metálicos, cerâmicas, nanopartículas e biomoléculas. Ainda, alternando entre os diferentes materiais e números de camadas é possível controlar parâmetros como espessura, permeabilidade e rugosidade dos filmes^{58,67}. A interação entre os materiais não ocorre exclusivamente por forças eletrostáticas, mas são influenciadas também por

interações fracas como interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e forças de van der Waals^{68,69}.

Filmes contendo polieletrólitos têm sido amplamente utilizados para modificar superfícies e criar biossensores, após o sucesso do trabalho de Lvov *et al.*⁷⁰ com a imobilização de várias proteínas em camadas alternadas com polieletrólitos. A técnica LbL é adequada para desenvolver nanoestruturas que empregam biomoléculas, devido a versatilidade de condições que podem ser empregadas, como controle de pH, temperatura, força iônica, entre outras que permitem a preservação da atividade biológica^{71,72}.

3.5 NANOPARTÍCULAS DE OURO

Nanopartículas metálicas (NPMs) são materiais nanoestruturados que apresentam características físico-químicas dependentes da sua composição, tamanho e forma⁷³. Há uma diversidade de metais que podem ser sintetizados em dimensões nanométricas, entre eles a prata, ouro, paládio, platina, cobre, níquel e ferro⁷⁴⁻⁷⁶, tomando variadas formas e geometrias, tais como esféricas, cúbicas, triangulares e cilíndricas⁷⁴.

A diminuição de metais a dimensões muito pequenas, entre o *bulk* (*bulk*: volume ou massa) e átomos, modifica suas propriedades, como a diminuição da densidade de estados eletrônicos e aumento da área superficial específica, que favorecem seu uso em diversas aplicações modificando propriedades mecânicas, óticas, elétricas, magnéticas e reativas⁷⁷.

Dentre as NPMs, as de ouro (AuNPs) são estudadas devido às propriedades singulares, como a sua alta estabilidade e alta absorvidade molar na região do visível⁷⁸. A primeira síntese foi registrada em 1857 com o trabalho de Michael Faraday intitulado "*The Bakerian Lecture: Experimental relations of Gold (and other metals) to Light*"⁷⁹, que descreveu a suspensão coloidal de ouro e sua interação com a luz. Faraday encontrou singularidades específicas das AuNPs quando em contato com a radiação luminosa⁸⁰. Em 1925, Richard Zsigmondy recebeu o prêmio Nobel de Química por seu trabalho no campo da química coloidal moderna, estudando a natureza heterogênea das soluções coloidais utilizando as AuNPs⁸¹. Em 1926, Theodor Svedberg recebeu o prêmio Nobel de Química pelas contribuições notáveis sobre a físico-química dos

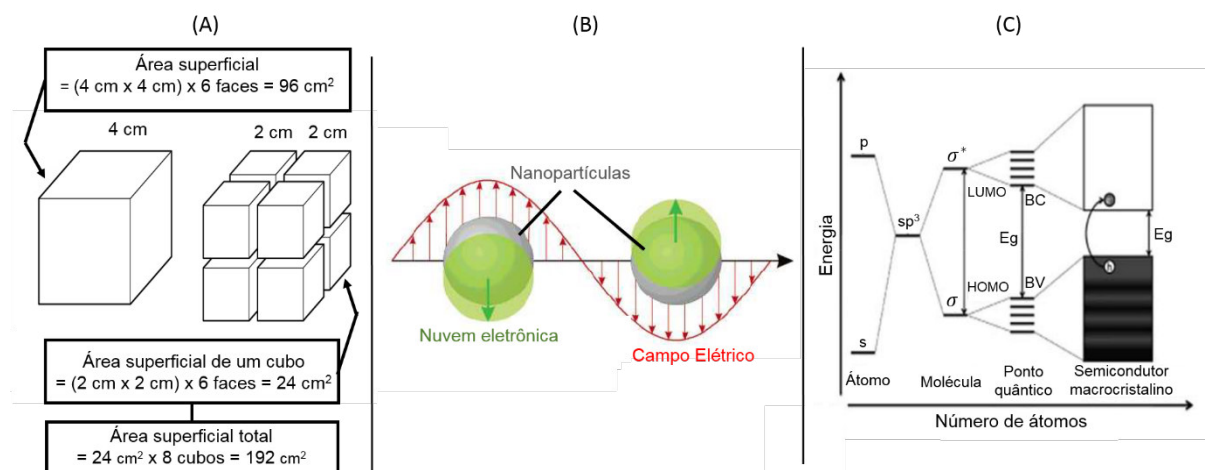
colóides, além de trabalhar com a síntese de AuNPs e desenvolver a ultracentrífuga, inventada para a separação efetiva das nanopartículas (NPs)^{82,83}.

Por conta de extensas pesquisas que evidenciaram as propriedades extraordinárias e os métodos de fabricação de NPMs, como as supracitadas, o interesse em explorar essas propriedades em aplicações tecnológicas vem crescendo e proporcionando o desenvolvimento de novos dispositivos, entre eles os sensores e os biossensores. Neste contexto, as NPs potencializam a sensibilidade e seletividade de biossensores, devido à propriedades catalíticas, alta condutividade elétrica, resistência mecânica e compatibilidade com materiais biológicos⁸⁴. Seu emprego permite ainda o desenvolvimento de dispositivos mais simples, baratos e com menores dimensões através do aumento da área superficial específica e possibilidade de ancoragem de receptores, o que favorece o aumento de sítios disponíveis para detecção⁸⁵. Segundo Baron *et al.* (2008, apud Janegitz, 2012)⁸⁶, em biossensores eletroquímicos as NPs podem ainda se comportar como nanoeletrodos, favorecendo o transporte de massa e diminuindo a razão sinal/ruído.

3.5.1 Propriedades das nanopartículas

As propriedades de NPs mais significantes para o desenvolvimento de sensores, biossensores e imunossensores são as propriedades eletrônicas, ópticas e reativas. Os materiais, quando reduzidos a escala nanométrica, adquirem propriedades diferentes da sua forma convencional (dimensões macrométricas), como a área superficial específica aumentada. A Figura 9(A), ilustra de forma simples como ocorre o aumento da área superficial específica quando um material é reduzido a escalas menores. O cubo à esquerda tem o mesmo volume que a soma dos cubos menores à direita, no entanto, a área total da superfície é maior para o conjunto de cubos menores. Essa maior área superficial específica típica dos nanomateriais os tornam excepcionais em aplicações catalíticas, servindo como aceleradores ou redutores da taxa de uma reação e multiplicadores de sítios ativos, permitindo a melhoria na seletividade, condutividade, eficiência e custos de produção de dispositivos^{77,87}.

Figura 9: Representação da (A) relação área superficial específica e volume de cubos com tamanhos diferentes, (B) da oscilação dos plasmons de superfície de nanopartículas esféricas em resposta à interação com ondas eletromagnéticas e (C) níveis eletrônicos presentes em átomos, moléculas, pontos quânticos e corpos massivos sobre um substrato.



Fonte: Adaptado de BBC News, 2014⁸⁸; Cruz, 2010⁸⁹ e Vitoreti *et al.*, 2016⁹⁰.

As propriedades ópticas dos nanomateriais podem ser muito diferentes de suas propriedades em escala macro ou micrométrica quando interagem com ondas eletromagnéticas. Quando uma onda eletromagnética, com determinado comprimento de onda, incide em uma NPM, ocorre oscilações coletivas de elétrons livres na superfície da partícula e a absorção de parte da luz, como ilustrado na Figura 9(B), o qual mostra o deslocamento da nuvem dos elétrons de condução das NPs. Este fenômeno é denominado ressonância plasmônica de superfície (do inglês *Surface Plasmon Resonance* – SPR), e depende do tamanho, forma do material e do meio. O fenômeno ocorre devido à interação do campo eletromagnético da luz incidente com os elétrons livres da partícula^{89,91}. NPMs, como ouro e prata, mostram absorções bem definidas em regiões distintas do espectro visível. A característica fundamental de resposta óptica dessas estruturas metálicas é a alta sensibilidade a mudanças em sua vizinhança local, o que favorece variadas caracterizações que se utilizam de mecanismos ópticos e o desenvolvimento de sensores⁹².

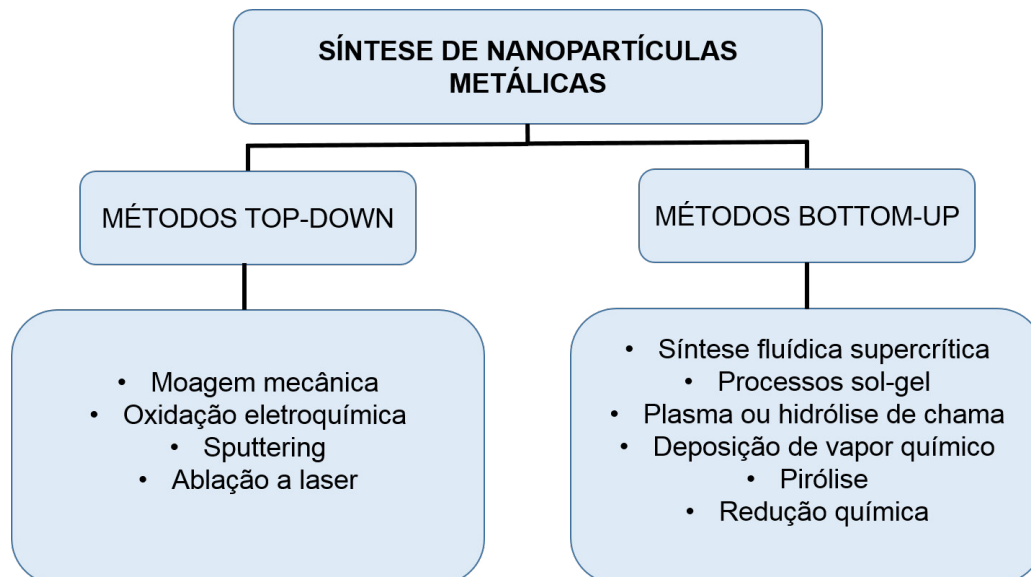
Partículas nanocristalinas apresentam um estado de matéria na região de transição entre o material *bulk* e moléculas. Com a diminuição de um material a escala nanométrica, a estrutura de banda diminui gradualmente, modificando a estrutura eletrônica desses materiais, de bandas a níveis eletrônicos discretos⁹⁰,

conforme a Figura 9(C). Em determinadas dimensões, como nos macrocristais, os elétrons podem migrar livremente ao longo da estrutura; abaixo de determinada dimensão, como nos átomos e NPs, o elétron fica confinado e a energia de *band-gap* (E_g) aumenta. Isso pode, por exemplo, modificar o comportamento de um material de metal para um semiconductor⁹³.

3.5.2 Síntese de nanopartículas de ouro por redução química

Existem vários processos e métodos de produção de NPMs, porém todos eles podem ser divididos em duas classes distintas; *top-down*, ou métodos de cima para baixo, e *bottom-up*, ou métodos de baixo para cima. O método *top-down* reduz materiais *bulk* em NPs através de processos químicos, físicos e mecânicos. O método *bottom-up* constrói NPs a partir de átomos ou moléculas individuais⁹⁴. A Figura 10 ilustra os principais métodos utilizados na síntese de NPs.

Figura 10: Métodos *top-down* e *bottom-up* de produção de nanopartículas metálicas.



Fonte: Elaborado pelo autor, com base em Castro *et al.*, 2014⁹⁵.

Dentre eles, o método de redução química é frequentemente utilizado para sintetizar NPMs, onde ocorre a redução de cátions metálicos, através de um agente redutor, para sua forma elementar⁹⁶. No que diz respeito às AuNPs,

há vários métodos de redução que usam basicamente o sal de ouro na presença de um estabilizante.

Dentre todos os esforços feitos para desenvolver um método confiável para sintetizar AuNPs, John Turkevich foi o primeiro cientista a desenvolver uma técnica de forma aprofundada, e amplamente divulgada no meio científico⁸⁰. No método, o ácido cloroáurico (HAuCl₄) é reduzido por uma pequena quantidade de solução de citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇), resultando em nanoesferas de ouro de 10-20 nm⁹⁷. Por volta de 1990, Brust e Schiffrin elaboraram outra metodologia na qual a água foi substituída por um solvente orgânico, dessa forma, o HAuCl₄ em solução de brometo de tetraoctilamônio (TOAB) é reduzido utilizando o borohidreto de sódio (NaBH₄) em solução de tolueno (C₇H₈)⁹⁸. Os agentes redutores Na₃C₆H₅O₇ e NaBH₄ são os mais comumente usados.

Outras técnicas foram desenvolvidas para sintetizar AuNPs nas quais diferentes agentes redutores são utilizados, como folhas de Centella asiática⁹⁹, oleilamina¹⁰⁰, ácido ascórbico¹⁰¹, sulfoxilato de formaldeído (SFS) e hidrato de hidrazina¹⁰², glicerol¹⁰³, entre outros.

3.5.3 Métodos de estabilização de nanopartículas

A estabilização é essencial para a eficiência de uma síntese uma vez que sem um agente estabilizante as NPMs tendem a se aglomerar. Além da contribuição das forças de van der Waals entre as NPMs, a aglomeração ocorre porque as NPs, com alta energia superficial, tendem a minimizar essa energia para que se alcance maior estabilidade termodinâmica. Esse fenômeno está relacionado com a Equação 1 da energia livre de Gibbs,

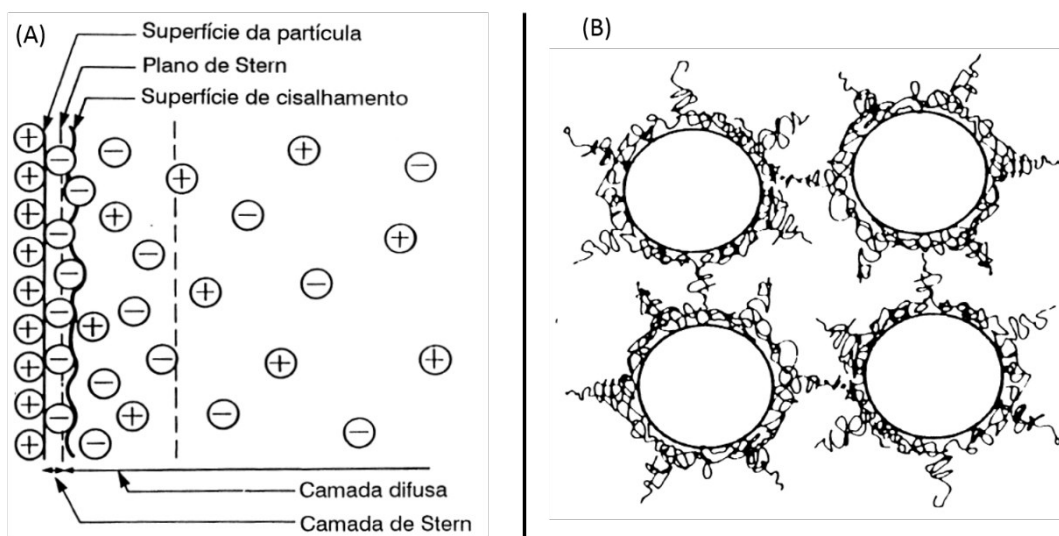
$$G = H - TS \quad \text{Equação 1}$$

onde H e T representam a entalpia e a temperatura, respectivamente, e S é a entropia. Quando se reduz partículas a tamanhos menores ocorre um aumento na sua área superficial para um mesmo volume, o que significa um aumento da troca de energia das partículas com o sistema que, devido à redução das partículas, possui menor entropia. Dessa forma as partículas tenderão a se

aglomerar para reduzir a energia livre de Gibbs do sistema. Esse fenômeno é conhecido como *Ostwald ripening*¹⁰⁴, onde o crescimento de NPs maiores é favorecido espontaneamente pela dissolução das NPs de menor tamanho, que se depositam na superfície das maiores. Essas aglomerações podem também ocorrer exclusivamente por processo de homogeneização.

Há dois métodos de estabilização de NPMs, a estabilização eletrostática e a estabilização por efeito estérico (ou polimérica). A estabilização eletrostática ocorre com o surgimento de uma dupla camada elétrica na superfície das NPMs, devido à atração de íons do solvente com carga contrária às NPs, as quais formam a camada de Stern e a camada móvel de íons ou camada difusa, ilustrado na Figura 11(A). Quando a dupla camada formada nas NPs, se aproximam ou se sobrepõem, ocorre uma força de repulsão impossibilitando a aglomeração¹⁰⁵. Essas interações são explicadas pela teoria de Boris Derjaguin, Lev Landau, Evert Verwey e Theodor Overbeek (DLVO)¹⁰⁶. Esse método é bastante simples e econômico, porém há algumas limitações, como pH, dissociação por influência de força iônica, o que o torna aplicável somente a sistemas diluídos, e impedindo seu uso a sistemas sensíveis a eletrólitos.

Figura 11: Representação (A) da formação da dupla camada elétrica em uma superfície de carga positiva em uma estabilização eletrostática e, (B) do mecanismo de estabilização estérica.



Fonte: Adaptado de Hortza, 1997¹⁰⁵.

Já a estabilização estérica ocorre por adsorção química de polímeros, surfactantes ou complexos orgânicos, com cadeias longas, à superfície da NP. Essas cadeias longas impedem as interações de van der Waals e, conseqüentemente, a aproximação das NPs umas das outras^{107,108}. A Figura 11(B) esquematiza, simplificada, como se conforma a adsorção de polímeros em NPs.

A estabilização de NPMs, especialmente as AuNPs, com grupo tiol (-SH) é mais eficaz quando comparada com outros grupos, como aminas (-NH₂) ou nitrilos (-CN), devido à afinidade do ouro com o enxofre. Um exemplo de um tipo de molécula muito utilizada para a estabilização de AuNPs é o 11-MUA¹⁰⁹. Há trabalhos na literatura que apresentam a estabilização com glutatona (GSH)^{31,110}, evidenciando alta estabilidade em AuNPs e eficiência na utilização como portadores de biomoléculas devido às propriedades fisiológicas e antioxidantes^{111,112}. Dessa forma, neste trabalho utilizou-se a estabilização com GSH (AuNPs-GSH) para ancoragem do anticorpo anti-PSA.

3.6 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

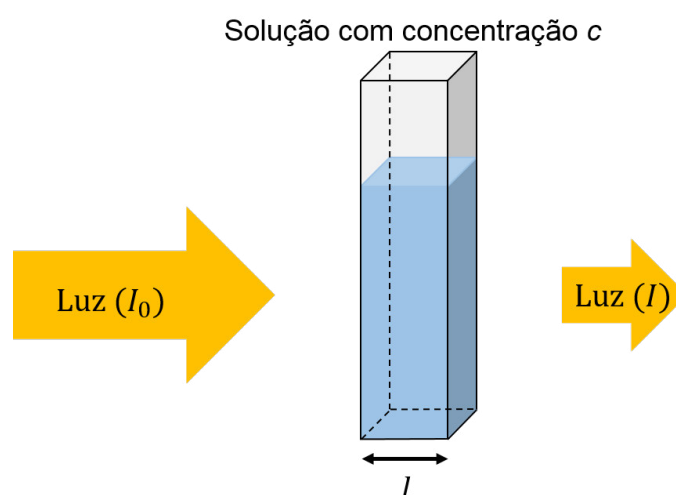
3.6.1 Espectroscopia de absorção no UV-Vis

Os espectrofotômetros são, em geral, instrumentos que permitem a medida da razão entre dois feixes de ultravioleta/visível (UV-Vis), através de um monocromador ou policromador, juntamente com um transdutor, capaz de converter a radiação em sinais elétricos¹¹³. A espectroscopia de absorção no UV-Vis utiliza a radiação para caracterizar elementos em uma variedade de amostras, (orgânicas e inorgânicas)¹¹⁴ e ainda caracterizar a formação de NPMs. Nanopartículas possuem alta absorvidade molar e suas propriedades plasmônicas permitem identificá-las devido a absorção na região do UV-Vis.

A radiação UV e visível atravessa uma amostra (armazenada numa cubeta) contendo o material a ser mensurado, e o equipamento mede a absorção ou transmissão da luz em função do comprimento de onda (geralmente variado entre 190 e 1100 nm) do espectro eletromagnético (Figura 12). Nessas faixas de energia os elétrons sofrem transições entre níveis eletrônicos. Os elétrons π ,

elétrons σ ou elétrons não ligados (elétrons n) sofrem transições para níveis eletrônicos mais elevados do estado fundamental quando são excitados pela interação com a luz ultravioleta ou visível; quanto maior for a energia absorvida para a transição (energia de $gap - E_g$), menor é o comprimento de onda da luz que forneceu essa energia¹¹⁵.

Figura 12: Representação esquemática da absorção e transmissão da luz sob a amostra no UV-Vis.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A quantidade de luz absorvida ou transmitida através da amostra é expressa como absorvância (A) ou transmitância (T)¹¹⁵, respectivamente, onde a transmitância é a razão entre a intensidade da luz que atravessou a amostra e a intensidade da luz inicial, dada pela Equação 2, e a associação destas duas grandezas físicas (A e T) pode ser dada pela Equação 3.

$$T = \frac{I}{I_0} \quad \text{Equação 2}$$

$$A = -\log T \quad \text{Equação 3}$$

Essa técnica possibilita análises qualitativas e quantitativas, como a determinação da concentração ou absorvidade molar; e permite encontrar bandas características de determinado material como, por exemplo, nanoesferas

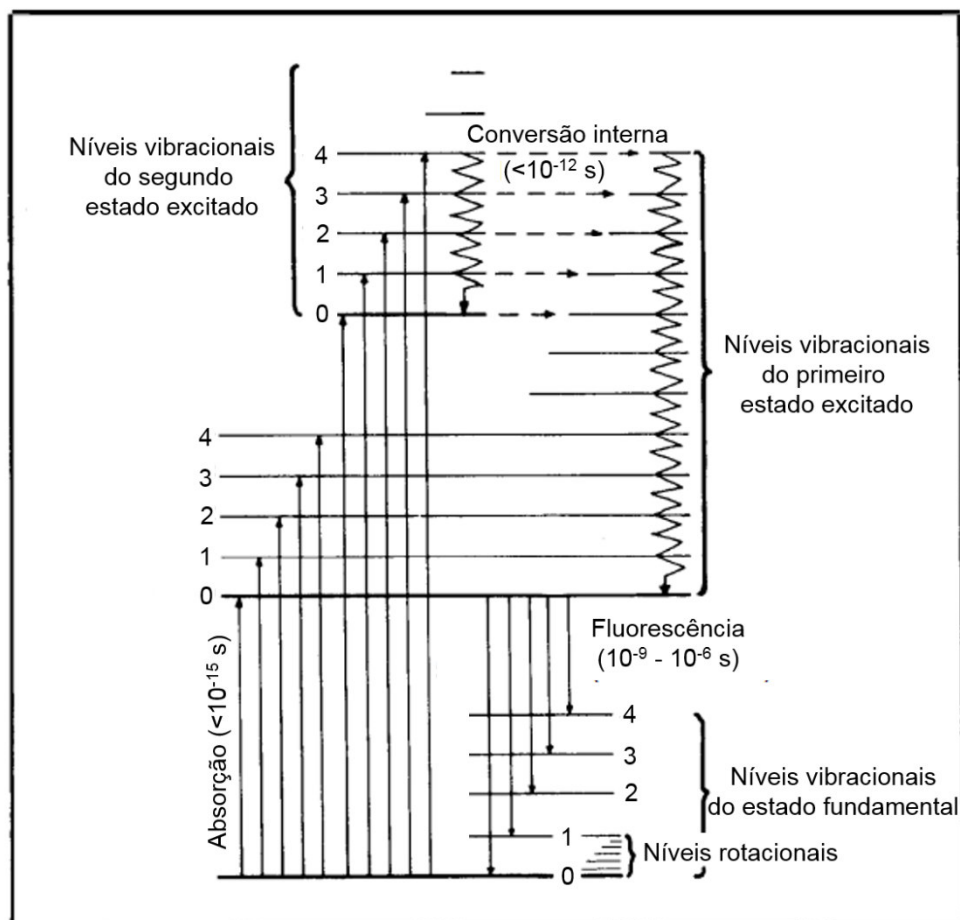
de ouro que possuem bandas de absorção dos plásmons de superfície características na região entre 500 e 600 nm⁸⁰.

3.6.2 Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência analisa a emissão de luz de compostos quando interagem com ondas eletromagnéticas (ultravioleta-visível). Essa técnica é complementar à espectroscopia no UV-Vis. Enquanto o UV-Vis mede transições do estado fundamental para o estado excitado, a fluorescência lida com transições do estado excitado para o estado fundamental¹¹⁵.

A fluorescência de um composto está relacionada com a transição de elétrons em estados eletrônicos e vibracionais. As espécies que estão sendo analisadas possuem estados eletrônicos vibracionais de baixa energia (estado fundamental) e estados vibracionais de maior energia (estado excitado) em que os elétrons são submetidos quando absorvem energia. Dentro de cada estado eletrônico existem vários estados vibracionais, representados na Figura 13. As moléculas absorvem a energia da radiação luminosa, atingem um dos níveis vibracionais mais altos de um estado excitado, perdem energia rapidamente, devido a colisões moleculares, e caem para níveis vibracionais do estado fundamental emitindo energia em forma de fluorescência¹¹⁶.

Figura 13: Transições eletrônicas que originam os espectros de absorção e emissão de fluorescência.



Fonte: Adaptado de Williams, 1981¹¹⁶.

Através da espectroscopia de fluorescência, o comprimento de onda de excitação pode ser fixado enquanto o espectro de emissão é medido. Numa medição de excitação de fluorescência, o comprimento de onda de emissão é fixo e o espectro de excitação é medido. Dessa forma é possível encontrar o comprimento de onda onde ocorre fluorescência máxima de determinado composto.

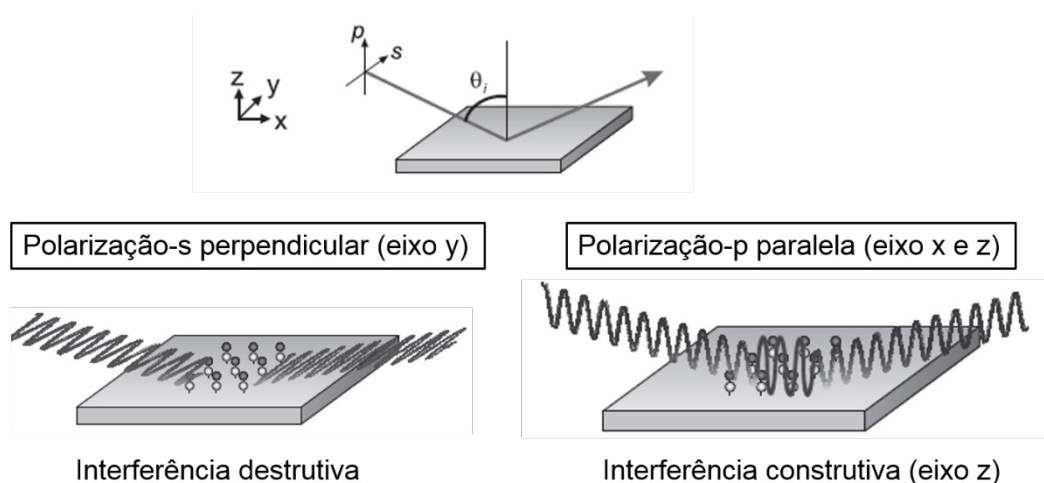
3.6.3 Espectroscopia de reflexão-absorção no Infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS)

A espectroscopia PM-IRRAS utiliza a radiação no infravermelho para analisar substâncias em pequenas quantidades, geralmente monocamadas ou filmes finos em superfícies sólidas ou líquidas. Essa técnica baseia-se na

incidência e reflexão de um feixe de radiação infravermelho sobre uma superfície contendo a amostra, onde a radiação refletida, com mesmo ângulo de incidência, atinge um detector com uma fração da luz incidente após interagir com as moléculas do substrato¹¹⁷.

O campo elétrico do feixe de luz incidente é polarizado em dois componentes ortogonais (polarização-s e polarização-p) antes de atingir a amostra. Para a polarização-s, o vetor de campo elétrico é polarizado paralelamente à superfície e perpendicular à direção de propagação, e para a polarização-p a oscilação do campo elétrico está perpendicular ao plano de incidência e a direção de propagação^{118,119}, como ilustrado na Figura 14.

Figura 14: Esquema do princípio da espectroscopia PM-IRRAS que ilustra as polarizações s e p e o ângulo de incidência (θ_i) da radiação infravermelho em relação à superfície.



Fonte: Adaptado de Urakawa *et al.*, 2006¹¹⁸.

Em superfícies metálicas a contribuição das vibrações de moléculas no sentido horizontal (polarização-s) é insignificante devido a mudança de fase de 180° para os ângulos de incidência, resultando em interferência destrutiva e sem campo elétrico próximo à superfície. Neste caso, o resultado da análise será referente a contribuição das vibrações de moléculas no sentido vertical (polarização-p), onde a interferência se torna construtiva (para $\theta_i > 80^\circ$), e o equipamento registra as informações das vibrações moleculares perpendiculares à superfície¹¹⁸. Dessa forma, pode-se obter espectros característicos de cada composto com alta sensibilidade, e estudar os efeitos

das interações entre eles, além de ser uma técnica comparável, em termos de resultados, com outras espectroscopias vibracionais, como por exemplo a espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* – FTIR).

3.7 MÉTODO MICROSCÓPICO

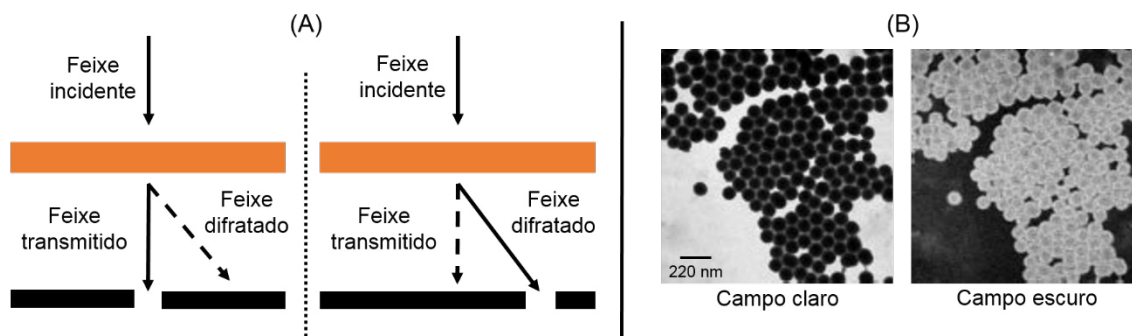
3.7.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A MET é a técnica de microscopia mais utilizada para caracterizar nanopartículas metálicas porque permite a observação direta da morfologia e estrutura em resolução atômica, bem como a determinação da distribuição de tamanhos, forma, composição, topografia e cristalografia da amostra^{120,121}.

Basicamente, a amostra depositada com uma espessura ultrafina sobre uma grade é irradiada com um feixe de elétrons com comprimento de onda de cerca de 0,01 nm, produzido pelo aquecimento de um filamento de tungstênio ou hexaboreto de Lantânio e acelerado por uma diferença de potencial¹²².

A imagem é formada em contrastes claros e escuros devido às regiões de baixa e alta densidade, respectivamente, gerados pela mudança na amplitude e na fase das ondas eletromagnéticas após a interação com a amostra¹²³. Os contrastes podem ser obtidos através da captura dos feixes difratados ou transmitidos após atingir a amostra, conforme a Figura 15(A). Se o feixe transmitido for escolhido, a imagem é chamada de campo claro, por outro lado, se o feixe difratado for escolhido, a imagem é dita de campo escuro¹²³, como ilustrado na Figura 15(B).

Figura 15: (A) Esquemas simplificados dos feixes coletados para a formação da imagem no MET e (B) imagens de partículas de sílica em campo claro e campo escuro.



Fonte: Elaborado pelo autor, com base em Leite *et al.*, 2001¹²⁴.

A MET é capaz de produzir imagens com resoluções significativas e altos níveis de detalhes quando comparados com um microscópio óptico. Isso é possível devido ao menor comprimento de onda de De Broglie associado aos elétrons, gerado a partir da sua pequena massa ($\approx 9,12 \times 10^{-22}$ μg) e alta velocidade gerada pela voltagem aplicada as bobinas da MET (próxima a velocidade da luz, na ordem de 10^8 m s^{-1}). Essa relação é inversa, conforme a Equação 4 de De Broglie,

$$\lambda = \frac{h}{mv} \quad \text{Equação 4}$$

onde h é a constante de Plank ($\approx 6,63 \times 10^{-34}$ $\text{m}^2\text{kg s}^{-1}$), λ é o comprimento de onda associado a partícula de massa m , e v é a velocidade na qual a partícula se move.

3.8 MÉTODOS ELETROQUÍMICOS

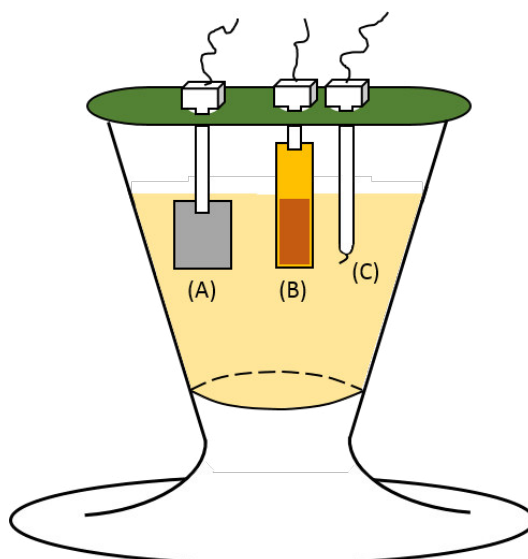
3.8.1 Voltametria Cíclica (VC)

A voltametria cíclica é utilizada para análises quantitativas e qualitativas em estudos de propriedades eletroquímicas de um analito adsorvido num eletrodo ou de um analito em solução. Esse estudo ocorre através da transferência eletrônica gerada pela redução e oxidação de espécies

moleculares quando submetido a uma diferença de potencial entre eletrodos imersos em solução condutora¹²⁵.

Normalmente, os experimentos voltamétricos são realizados em uma célula eletroquímica usando um eletrodo de trabalho (constituído pelo substrato condutor em análise), um contra eletrodo (geralmente de platina) e um eletrodo de referência (que pode ser um eletrodo de calomelano saturado (ECS), prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) ou o eletrodo padrão de hidrogênio (EPH) imersos em uma solução condutora (eletrólito)^{125,126}, como ilustrados na Figura 16.

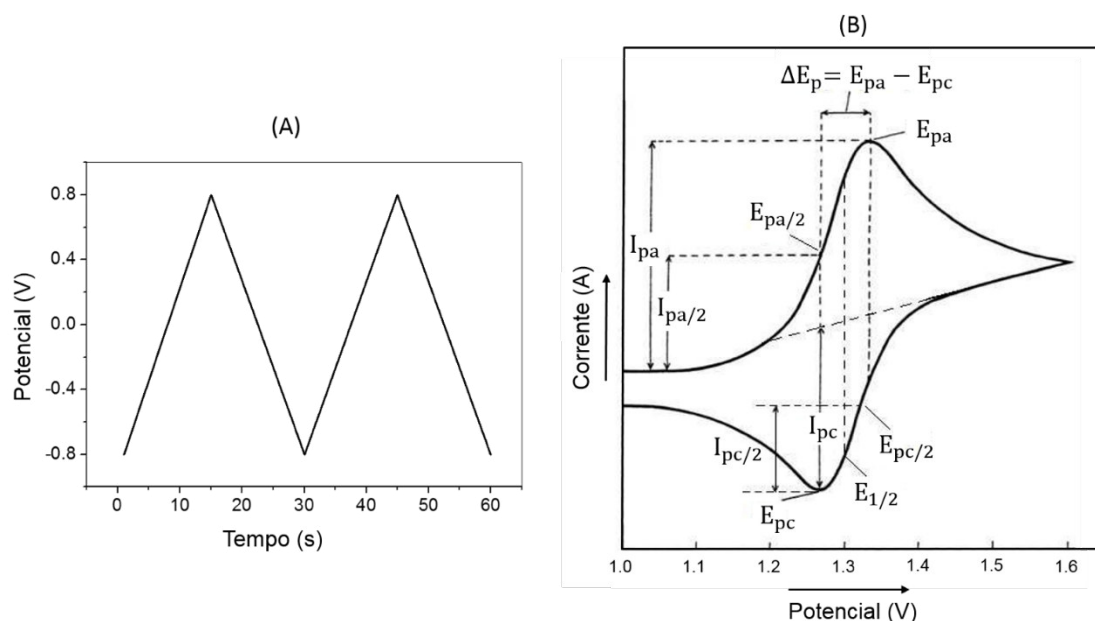
Figura 16: Representação de uma célula eletroquímica contendo o (A) contra eletrodo, (B) o eletrodo de trabalho e (C) o de referência.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Um potenciostato é acoplado à célula eletroquímica e, para obter informações do sistema, uma varredura de potencial linear é aplicada entre os eletrodos a partir de um potencial inicial E até um potencial limite maior E_f , quando a varredura é invertida e o potencial retorna ao valor inicial¹²⁷, como mostrado na Figura 17(A). Essa variação do potencial induz a oxidação de espécies constituintes do eletrólito e gera uma corrente de elétrons que se desloca ao eletrodo de trabalho. Quando o potencial é invertido os elétrons são fornecidos e as espécies eletrolíticas são reduzidas. O resultado é gerado pelo equipamento como um voltamograma, representado na Figura 17(B).

Figura 17: Gráficos de (A) potencial aplicado em função do tempo em uma voltametria cíclica e (B) parâmetros eletroquímicos obtidos a partir de um voltamograma cíclico.



Fonte: Adaptado de Souza, 2011¹²⁸.

Os parâmetros mais importantes que podem ser obtidos a partir de um voltamograma cíclico estão apresentados na Figura 17B, e são: corrente de pico anódico (I_{pa}) ou pico de oxidação, corrente de meio pico anódico ($I_{pa/2}$), corrente de pico catódico (I_{pc}) ou pico de redução, corrente de meio pico catódico ($I_{pc/2}$), potencial de pico anódico (E_{pa}), potencial de meio pico anódico ($E_{pa/2}$), potencial de pico catódico (E_{pc}), potencial de meio pico catódico ($E_{pc/2}$), potencial de meia onda ($E_{1/2}$), e diferença entre o potencial de pico anódico e de pico catódico (ΔE_p).

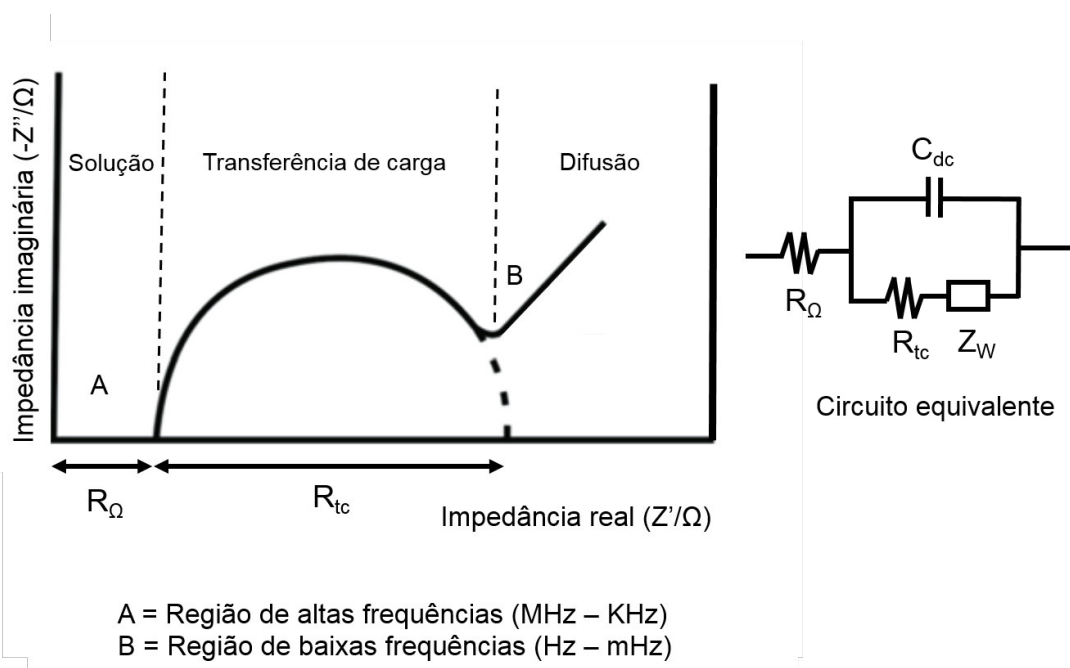
3.8.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) é utilizada para caracterização de processos de eletrodos e interfaces, devido à sua alta sensibilidade em identificar mudanças em processos interfaciais, estruturais e reacionais¹²⁹, como por exemplo, uma ligação entre antígenos e anticorpos imobilizados em um sensor, como é o caso deste trabalho.

A EIE estuda a resposta da impedância (Z) de um sistema através da aplicação de uma tensão alternada (AC) com baixa amplitude e em diferentes

frequências^{129,130}. Os resultados dessas medidas são representados em termos de impedância real (Z') e impedância imaginária ($-Z''$) em um gráfico denominado diagrama de Nyquist, ilustrado na Figura 18. A interpretação desse diagrama geralmente é feita pela correlação com um circuito elétrico equivalente, como o circuito de Randles, que representa os processos químicos que ocorrem no sistema de forma mais simples¹³¹. Com isso é possível obter várias informações do sistema, como a dupla camada elétrica, a condutividade de filmes, processos de transporte e difusão de cargas, entre outros⁵⁰.

Figura 18: Representação do Diagrama Nyquist e o circuito elétrico equivalente de Randles.



Fonte: Adaptado de Ribeiro *et al.*¹³¹; Tang *et al.*³¹ e Carvalho *et al.*¹³².

No diagrama de Nyquist (Figura 18) as regiões de altas frequências estão associadas com a resistência da solução eletrolítica. As regiões de frequências intermediárias (diâmetro do semicírculo) representam a resistência à transferência de carga na interface eletrodo-eletrólito enquanto que a região de baixas frequências está relacionada por processos de transporte de massa por difusão¹³². Os componentes do circuito de Randles, R_{Ω} , Z_W , R_{tc} e C_{dc} representam, respectivamente, a resistência ôhmica da solução eletrolítica, a impedância de Warburg resultante da difusão de íons de eletrólito para a interface do eletrodo, a resistência a transferência de carga da sonda redox e a

capacitância da dupla camada elétrica^{31,132}. Esse circuito descreve satisfatoriamente as regiões de altas frequências, contudo, em regiões de baixas frequências, mais complexas, o semicírculo deslocado (com o centro fora do eixo x) sugere um comportamento não ideal do capacitor puro (C_{dc}), sendo necessário substituí-lo por um elemento de fase constante (do inglês *Constant Phase Element* – CPE) para modelar o comportamento do “capacitor imperfeito” associado à dupla camada elétrica. Esse comportamento não ideal da dupla camada elétrica pode estar relacionado a fatores como adsorção lenta de íons e heterogeneidades químicas da superfície^{129,131}.

As informações obtidas por EIE também podem ser analisadas com outras relações entre variáveis, como o módulo de impedância (Z) e a frequência (F), ou a capacitância (C) e a frequência. Essas relações mostram com mais detalhes as respostas impedimétricas (Z vs F) ou capacitivas (C vs F) em frequências específicas, o que permite identificar, por exemplo, se as alterações na resposta eletroquímica estão relacionadas à mudança na dupla camada elétrica, capacitância parasita ou a resistência ôhmica da solução eletrolítica^{133,134}.

As medidas geralmente são realizadas através do uso de um potenciostato e um analisador de resposta de frequência (do inglês *Frequency Response Analysis* – FRA), utilizando uma célula eletroquímica com o mesmo sistema de três eletrodos descrito na seção 3.8.1. Em sistemas como o descrito neste trabalho, é utilizado também um potencial de circuito aberto (do inglês *Open Circuit Potential* – OCP), onde a impedância é registrada quando o sistema encontra o potencial de equilíbrio. A amplitude da tensão é variada normalmente entre décimos de mV e as frequências abrangem uma faixa grande entre MHz e mHz¹³⁰.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Foram utilizados o polieletrólito catiônico poli(etilenoimina) (PEI), (50% m/V em água, $M = 600.000 - 1.000.000 \text{ g mol}^{-1}$), polieletrólito aniônico poli(ácido vinilsulfônico, sal de sódio) (PVS) (25% m/V em água) e o ácido 11-

mercaptoundecanóico (11-MUA) (95% de pureza, $M = 218,36 \text{ g mol}^{-1}$), adquiridos da Sigma-Aldrich.

Foram também utilizados o anticorpo anti-PSA policlonal do tipo IgG, produzido em coelhos, 100 μg em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4, antígeno prostático específico (PSA) de sêmen humano com grau de pureza $\geq 95\%$, 25 μg em PBS pH 7,5, imunoglobulina G de soro humano com grau de pureza $\geq 95\%$ e a albumina do soro bovino (BSA) com grau de pureza $> 98\%$, adquiridos da Sigma-Aldrich.

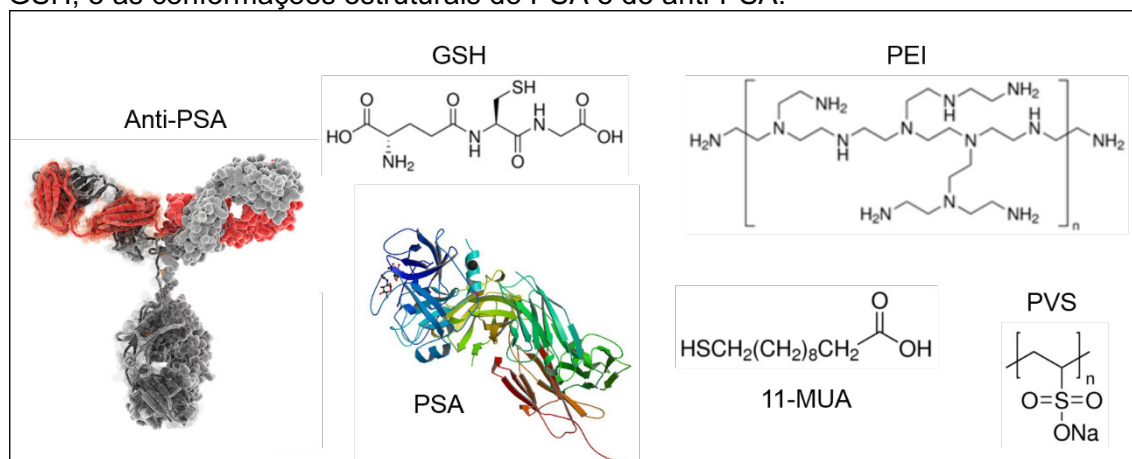
O álcool metílico, ácido acético glacial e o ferricianeto de potássio $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ foram adquiridos da Ecibra, Qhemis e Anidrol, respectivamente, todos de grau analítico.

A glutationa (GSH) ($M = 307,32 \text{ g mol}^{-1}$), o cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) ($M = 191,70 \text{ g mol}^{-1}$), e N-Hidroxisuccinimida (NHS) ($M = 115,09 \text{ g mol}^{-1}$) com grau de pureza = 98%, ácido tetracoloro-ouro III trihidrato ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (99,99%) e borohidreto de sódio (NaBH_4) com grau de pureza $\geq 98\%$, foram todos adquiridos da Sigma-Aldrich.

Utilizou-se água ultrapura de um sistema de purificação Sartorius Arium® para o preparo de todas as soluções.

A Figura 19 ilustra as estruturas químicas do 11-MUA, PEI, PVS, GSH, do PSA e do anti-PSA.

Figura 19: Ilustração das estruturas químicas dos compostos 11-MUA, PEI, PVS, GSH, e as conformações estruturais do PSA e do anti-PSA.



Fonte: Elaborado pelo autor, com base em Stefanov, 2015¹³⁵; Menez *et al.*, 2008¹³⁶ e Sigma-Aldrich, [s.d.]¹³⁷.

4.2 PREPARO DE SOLUÇÕES

Para o preparo do tampão fosfato salino (do inglês *Phosphate Buffered Saline* – PBS) com pH 7,4 e concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, foram utilizados os sais fosfato dipotássico (K_2HPO_4) $83,25 \text{ mmol L}^{-1}$, fosfato monossódico (NaH_2PO_4) $16,67 \text{ mmol L}^{-1}$ e cloreto de sódio (NaCl) 150 mmol L^{-1} , solubilizados em água ultrapura. A solução de PBS pH 7,4 foi utilizada para o preparo das soluções de PEI, PVS, NHS, EDC, PSA, anti-PSA, e ainda utilizado para a diluição da síntese de AuNPs e como solução de lavagem na fabricação dos filmes nanoestruturados e na detecção do analito.

As soluções dos polieletrólitos PEI e PVS foram preparadas com concentração de 1 mg mL^{-1} em PBS pH 7,4. A solução de anticorpo anti-PSA foi preparada com concentração de $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ em PBS pH 7,4. Esta solução foi utilizada no preparo da síntese de nanopartículas de ouro com anti-PSA descrita na seção 4.4.

O PSA foi diluído em diferentes concentrações (0,1; 0,5; 1,0; 4,0; 8,0; 10; 20 ng mL^{-1}) em tampão PBS pH 7,4. Estas soluções foram utilizadas para analisar a resposta do biossensor à cada concentração na caracterização de espectroscopia de impedância eletroquímica.

4.3 LIMPEZA DOS SUBSTRATOS

Foram utilizados substratos de quartzo para as caracterizações espectroscópicas de fluorescência e UV-Vis. Antes da utilização, os substratos foram hidrofiliados pela imersão em uma solução básica e uma solução ácida, durante 10 min cada, à uma temperatura de $80 \text{ }^\circ\text{C}$. A solução básica foi preparada com hidróxido de amônio, peróxido de hidrogênio e água ultrapura ($\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$) na proporção de 1:1:5 (V/V/V), enquanto a solução ácida foi preparada com ácido clorídrico, peróxido de hidrogênio e água ultrapura ($\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$) na razão de 1:1:6 (V/V/V). Após a hidrofilição os substratos de quartzo foram lavados com água ultrapura e secos com ar comprimido.

Os substratos de ouro foram utilizados para a fabricação do imunossensor. Antes da funcionalização, os substratos de ouro (50 mm^2 de área geométrica) foram limpos em solução piranha (70% de ácido sulfúrico (H_2SO_4) e

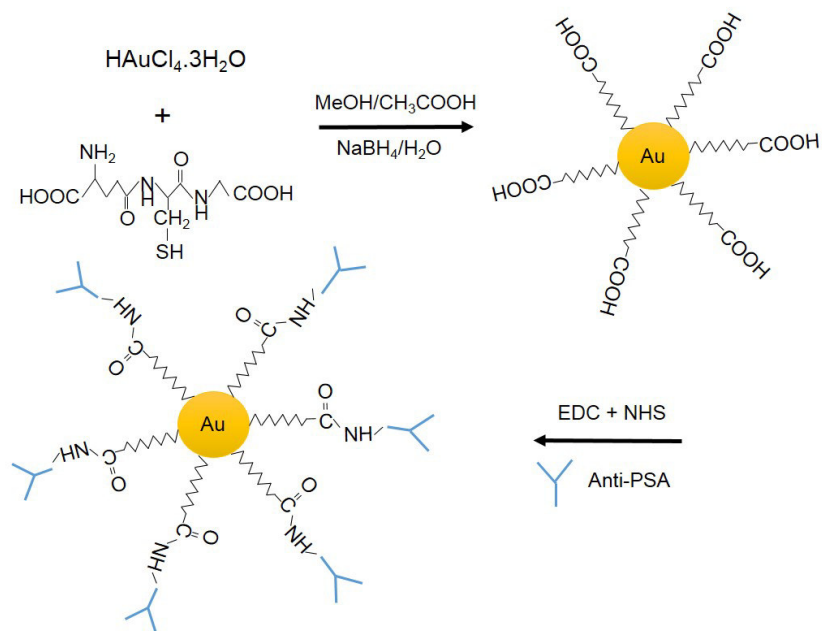
30% de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) durante 5 minutos à 60° C. Em seguida, foram lavados com água ultrapura. Para garantir que toda impureza fosse removida, o eletrodo foi imerso em álcool isopropílico e mantido por 15 minutos em banho ultrassônico. Posteriormente, os substratos de ouro foram lavados com água ultrapura e secos com ar comprimido.

4.4 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E IMOBILIZAÇÃO DO ANTI-PSA

As nanopartículas de ouro estabilizadas com glutathione (AuNPs-GSH) foram preparadas com base nos procedimentos de TANG et al.³¹. Para isso utilizou-se duas etapas, que se encontram esquematizadas na Figura 20.

Etapa 1: sob agitação, misturou-se 3 mL de metanol com 0,5 mL de ácido acético durante 5 minutos. Adicionou-se 19,7 mg de $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ e 7,7 mg de GSH e deixou-se agitando por mais 5 minutos. Durante esse tempo uma solução de 30 mg de $NaBH_4$ em 1,5 mL de água ultrapura foi gotejada na solução anterior, ainda em agitação, e mantido sob agitação por mais 2 horas. As AuNPs-GSH foram lavadas através de centrifugação à 3500 rpm por 10 minutos, ressuspensão em água ultrapura por quatro vezes e, por fim, mantido na geladeira por 2 a 3 dias com sílica para secagem.

Figura 20: Representação esquemática da síntese de AuNPs e imobilização do anticorpo anti-PSA.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O anti-PSA foi imobilizado na superfície das AuNPs por meio da ligação peptídica (ligação covalente) formada através do grupo amina do anti-PSA e o ácido carboxílico presente na GSH como descrito a seguir.

Etapa 2: adicionou-se 3,3 mg de AuNPs-GSH em 100 µL de PBS pH 7,4. Foram adicionados à solução anterior 100 µL de solução 1,0 mg mL⁻¹ de EDC e 1,0 mg mL⁻¹ de NHS em PBS pH 7,4 para acoplar grupos carboxílicos a aminas primárias. Após a homogeneização misturou-se 50 µL de anti-PSA com concentração de 50 µg mL⁻¹. A solução resultante foi mantida na geladeira durante 12 horas.

4.5 CONSTRUÇÃO DA MONOCAMADA AUTOMONTADA DE SUPORTE (SAM)

A superfície do eletrodo de ouro foi funcionalizada com uma monocamada de 11-MUA conferindo hidrofiliabilidade e cargas negativas (COO⁻) para possibilitar a deposição e homogeneidade das camadas subsequentes pelo método LbL. O eletrodo foi imerso em solução 5,0 mmol L⁻¹ 7,138 de 11-MUA em etanol durante

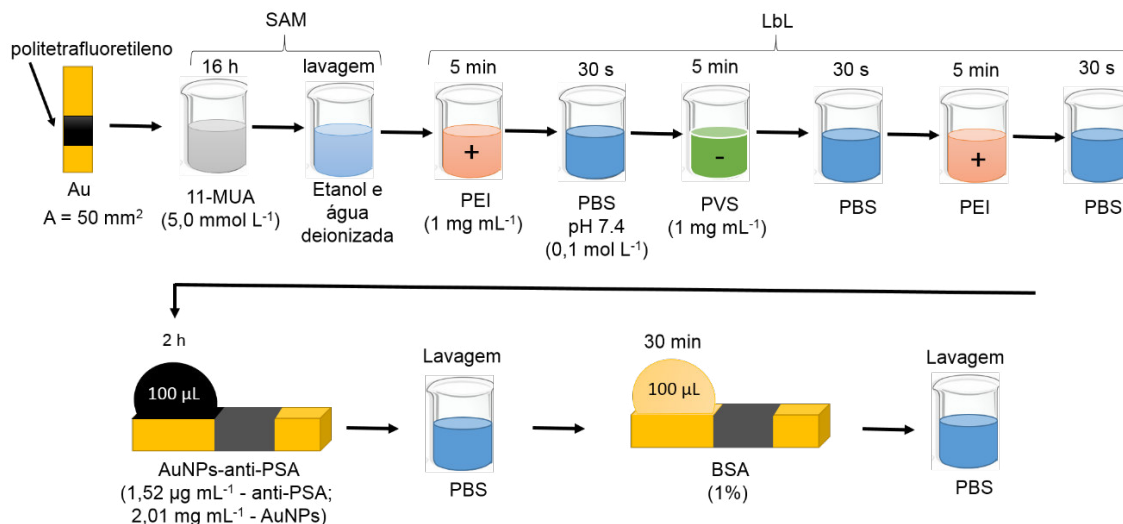
16 horas. Após esse período o eletrodo foi lavado com etanol, água ultrapura e seco com ar comprimido.

Essa funcionalização permitiu modificar a superfície do ouro de tal forma que a carga superficial se torna negativa, devido ao grupo terminal carboxílico (COO^-) do 11-MUA direcionado para fora da superfície, o que possibilita a interação de outros materiais com a superfície da SAM, seja por ligação covalente ou adsorção eletrostática.

4.6 CONSTRUÇÃO DOS FILMES NANOESTRUTURADOS

A técnica LbL foi utilizada para a construção de um filme multicamadas pela adsorção física sequencial dos polieletrólitos PEI e PVS, do conjugado AuNP-anti-PSA e BSA. Os filmes nanoestruturados foram montados sobre os eletrodos de ouro com área geométrica limitada em 50 mm^2 na seguinte sequência, conforme ilustrado na Figura 21:

Figura 21: Sequência de adsorção e lavagem dos filmes SAM, LbL, AuNP-anti-PSA e BSA sobre o eletrodo de ouro.



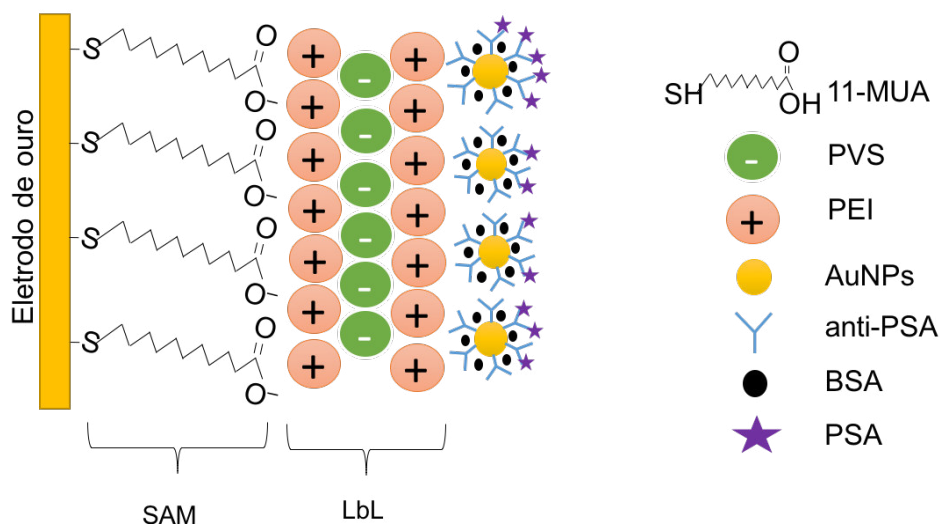
Fonte: Elaborado pelo autor.

- (1) Imersão em solução etanólica contendo $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de 11-MUA por 16 horas, seguida da lavagem do eletrodo com etanol e água deionizada para remover o excesso de material e seco em ar comprimido.

- (2) Imersão em solução catiônica $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ em PBS pH 7,4 de PEI por 5 minutos seguida da lavagem por imersão em solução de PBS pH 7,4, por 30 segundos, para remover o excesso do polieletrólito fracamente adsorvido e novamente seco com ar comprimido.
- (3) Imersão em solução aniônica $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ em PBS pH 7,4 de PVS por 5 minutos, seguida da lavagem em solução de PBS pH 7,4 por 30 segundos e seco com ar comprimido. A etapa (1) foi repetida novamente para a formação da tricamada (PEI/PVS/PEI).
- (4) Incubação por 2 horas com AuNPs-anti-PSA ($1,52 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de anti-PSA; $2,01 \text{ mg mL}^{-1}$ de AuNPs), sob temperatura controlada, para garantir a adsorção completa das nanopartículas com a última camada de PEI.
- (5) Incubação com solução 1% de BSA por 30 minutos, sob temperatura controlada, para evitar a adsorção não específica dos antígenos.

A arquitetura final do biossensor encontra-se esquematizada na Figura 22.

Figura 22: Arquitetura do biossensor com os filmes nanoestruturados contendo as camadas de 11-MUA, PEI, PVS, AuNPs-anti-PSA, BSA e PSA.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O PSA foi adsorvido em diferentes concentrações durante as caracterizações eletroquímicas, descritas na seção 4.8.

Os filmes feitos sob o substrato de quartzo para as caracterizações ópticas foram feitos seguindo as etapas (2), (3) e (4).

4.7 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA E MICROSCÓPICA

A síntese das AuNPs foi monitorada por espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis) através de um espectrofotômetro Thermo Scientific, Genesys 10uv Scanning, com resolução do comprimento de onda de 1 nm, da Universidade de Federal de São Carlos (UFSCar), campus Sorocaba. Utilizou-se uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm para a caracterização das suspensões de AuNPs-anti-PSA e uma lâmina de quartzo para a caracterização dos filmes.

A caracterização da síntese foi realizada em duas etapas: uma após a formação das AuNPs-GSH, e outra após a ancoragem do anticorpo anti-PSA na superfície das AuNPs, descritos na seção 4.4, para verificar as mudanças no espectro provenientes da ancoragem do anticorpo.

A caracterização dos filmes depositados sobre uma lâmina de quartzo foi realizada para verificar a adsorção dos polieletrólitos e das nanopartículas.

A ancoragem do anticorpo na superfície das nanopartículas foi estudada também por espectroscopia de fluorescência registrados num espectrofluorímetro RF-5301pc, Shimadzu, da UFSCar - campus Sorocaba, com resolução de 0,2 nm, comprimento de onda de excitação em 280 nm e com largura de fendas de 0,5 nm em excitação e em emissão. Foi utilizado uma cubeta de quartzo com comprimento óptico de 10 mm para a caracterização da síntese de AuNPs-anti-PSA e uma lâmina de quartzo para a caracterização dos filmes.

A espectroscopia de fluorescência foi utilizada para verificar a presença do anticorpo anti-PSA na solução contendo a síntese de AuNPs e verificar se os anticorpos estão adsorvidos nos filmes após a construção e lavagem do imunossensor, através da fluorescência do triptofano presente em anticorpos.

Os experimentos de espectroscopia de reflexão e absorção no infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS) foram realizados no instrumento KSV PMI 550, do Instituto de Física de São Carlos – IFSC, da Universidade de São Paulo (USP), com uma resolução espectral de 8 cm^{-1} e

ângulo de incidência de 80°. Foi empregado um substrato de vidro recoberto com ouro sendo que os espectros foram adquiridos após a secagem de cada camada de material, utilizando o software IRRAS 1.0.5, durante um tempo total de 300 s. A adsorção de cada camada, bem como as interações do anticorpo-antígeno, foram analisadas tomando como linha de base o Au-11MUA.

A morfologia das AuNPs foi caracterizada por MET utilizando o equipamento FEI Tecnai G2 F20 HRTEM operando em 200 KV, do Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE), do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMA) da UFSCar, campus São Carlos.

A MET foi utilizada para analisar a forma e dimensão das AuNPs. Para isso foi feito um histograma obtido pela contagem de cerca de 300 nanopartículas em diferentes regiões da grade, utilizando o software ImageJ 1.51t, com edições básicas de *bandpass filter*, *threshold* e *analyze particles*.

4.8 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

Com a voltametria cíclica (VC) caracterizou-se a arquitetura e a construção do imunossensor e verificou-se a adsorção de todas as camadas sobre o substrato de Au (11-MUA/PEI-PVS-PEI/AuNPs-anti-PSA/BSA), através da resistência a passagem de corrente proveniente da sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

A VC foi realizada num potenciostato/galvanostato Autolab, PGSTAT 204, Metrohm, do Grupo de Pesquisa de Nanociência e Nanotecnologia Aplicada em Sensoriamento (GPNNS), em 0,1 mol L⁻¹ PBS, pH 7,4, contendo 5 mmol L⁻¹ de ferrocianeto de potássio $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Utilizou-se um sistema de três eletrodos, o eletrodo de ouro modificado como eletrodo de trabalho (50 mm² de área), um eletrodo de referência de calomelano saturado (ECS) e um contra eletrodo de platina (100 mm² de área). Os parâmetros utilizados para a VC foram: potencial variando de -0,25 V à 0,80 V, em passos de 0,00244 V e com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

As medidas de EIE foram feitas no potenciostato com módulo de impedância acoplado, no mesmo meio eletrolítico descrito acima. Os dados de impedância foram registrados em OCP na faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz, com amplitude de 10 mV. A EIE foi utilizada para a detecção do analito PSA

através da exposição da unidade sensorial (descrita na seção 4.6) à diferentes concentrações de PSA (0,1, 0,5, 1,0, 4,0, 8,0, 10 e 20 ng mL⁻¹) diluídos em PBS pH 7,4. Cada concentração foi incubada durante 15 minutos, lavada com PBS pH 7,4 e seca com ar comprimido antes de cada espectro de EIE.

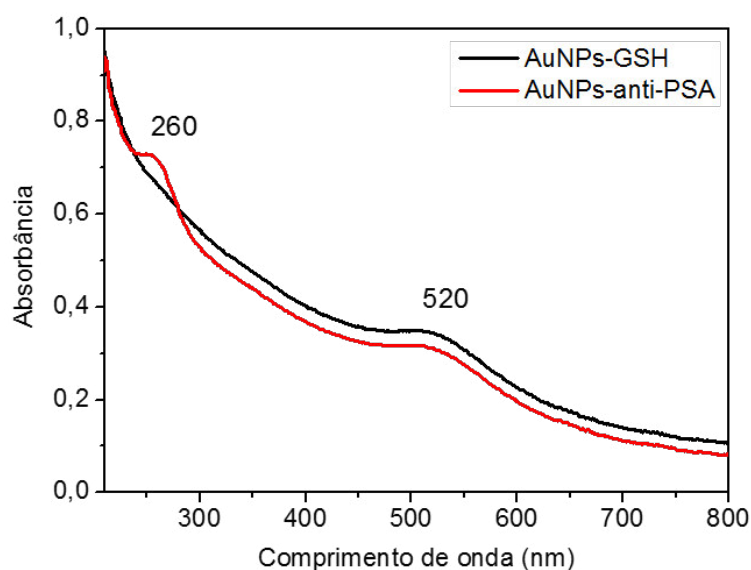
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AUNPS POR UV-VIS

O espectro de absorção no UV-vis das AuNPs, ilustrado na Figura 22 (linha preta), apresenta uma banda de absorbância em 520 nm referente à absorção dos plásmons de superfície do Au. O aumento de absorbância a medida que o comprimento de onda diminui e a banda larga são características do tamanho reduzido obtido para as AuNPs ($3,5 \pm 0,9$ nm), conforme descrito por Link e El-Sayed¹³⁹.

Após a ancoragem do anti-PSA uma nova banda de absorção surgiu em 260 nm, como ilustrada na Figura 23 (linha vermelha), que está relacionada com a absorbância do triptofano da proteína. Este resultado mostra que o anti-PSA se fixou à superfície das nanopartículas de ouro, o que está de acordo com Zhao et al.¹⁴⁰ e Ngo et al.¹⁴¹. A banda referente aos plásmons de superfície não apresentou deslocamento significativo, indicando que a presença do anticorpo não alterou o tamanho das AuNPs e nem induziu a formação de aglomerados.

Figura 23: Espectro de absorção no UV-Vis das AuNPs (linha preta) e do conjugado de AuNPs com anti-PSA (linha vermelha).

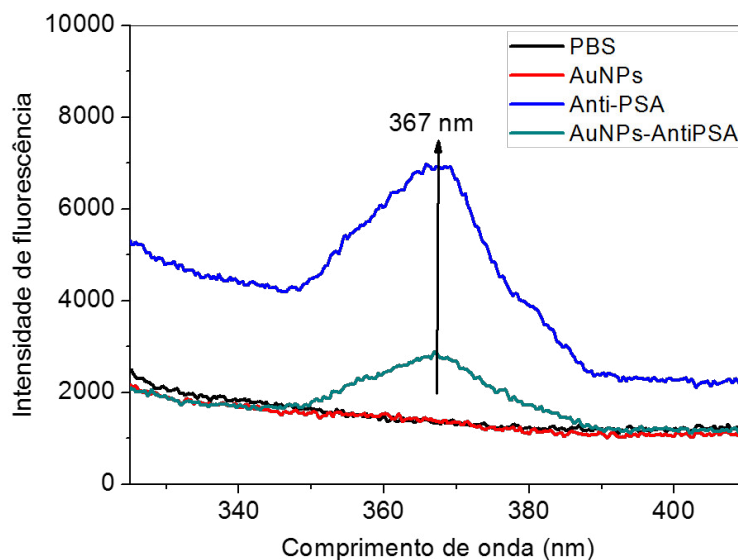


Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO CONJUGADO AUNPS-ANTI-PSA POR FLUORESCÊNCIA

A Figura 24 apresenta os espectros de emissão de fluorescência das suspensões de anti-PSA (linha azul) e de AuNPs-anti-PSA (linha verde) usando um comprimento de onda de excitação de 280 nm¹⁴². A solução de PBS (linha preta) e a suspensão das AuNPs (linha vermelha) não apresentaram nenhuma emissão, como esperado.

Figura 24: Espectros de emissão de fluorescência de suspensões de anti-PSA e AuNPs-anti-PSA, com excitação em 280 nm. Os espectros do tampão PBS pH 7,4 e da suspensão de AuNPs são apresentados como referência.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Inicialmente, foi feito um espectro do PBS pH 7,4 para verificar se o mesmo não produz nenhuma interferência no sinal. A banda gerada pela fotoluminescência do anticorpo indica emissão em um comprimento de onda máximo de 367 nm, originada pela absorção do triptofano. Como se observa, as AuNPs não apresentam nenhuma banda de emissão de fluorescência. A solução contendo AuNPs-anti-PSA apresenta a banda de emissão do triptofano, comprovando a presença do anticorpo.

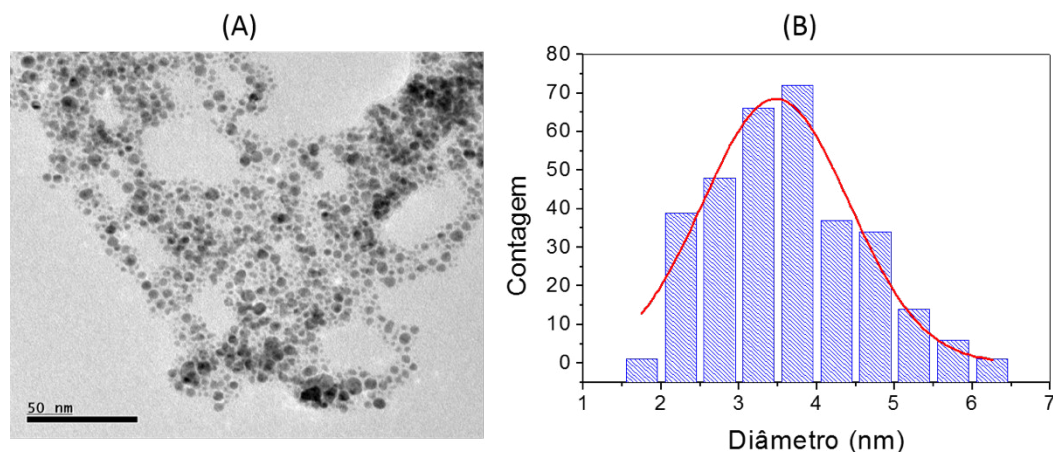
Nota-se que não houve qualquer desvio na banda referente às AuNPs-anti-PSA, o que indica que não foram alteradas a polaridade e a estrutura global da proteína após a conjugação^{143,144}. A intensidade da fotoluminescência atribuída às AuNPs-anti-PSA está justamente atenuada devido à presença das nanopartículas de ouro¹⁴⁵.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DA SÍNTESE DE AUNPS POR MET

As micrografias das AuNPs sintetizadas estão apresentadas na Figura 25(A) e mostram poucos aglomerados. As AuNPs exibiram diâmetro médio estimado em $3,5 \pm 0,9$ nm, verificado através do histograma de distribuição de tamanho, ilustrado na Figura 25(B), e mostram uma ampla faixa de distribuição

de tamanhos, com tamanhos mínimos próximos a 1,5 nm e tamanhos máximos em torno de 6,5 nm. O histograma foi obtido pela contagem de cerca de 300 nanopartículas em diferentes regiões da grade.

Figura 25: (A) Micrografia obtida por MET e (B) histograma de distribuição de diâmetro das AuNPs.



Fonte: Elaborado pelo autor.

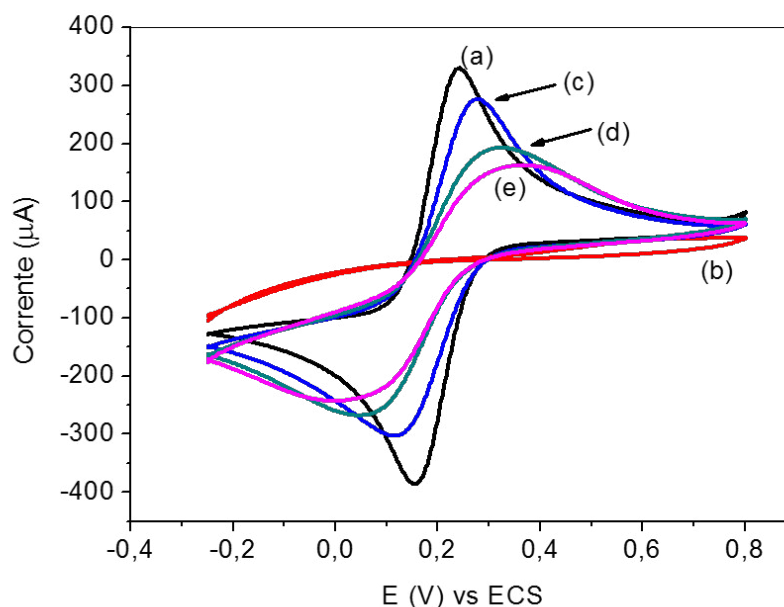
5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES NO ELETRODO DE OURO MODIFICADO

A VC foi a primeira caracterização empregada para determinar as mudanças nas propriedades eletroquímicas na superfície do eletrodo de ouro modificado com a arquitetura descrita na seção 4.6. A Tabela 1 mostra a corrente de pico anódico (I_{pa}), potencial de pico anódico (E_{pa}), potencial de pico catódico (E_{pc}) e a diferença de potencial de pico anódico e catódico (ΔE_p) extraídos dos voltamogramas cíclicos (apresentados na Figura 26) obtidos a cada etapa de construção do biossensor.

Como indicado na Figura 26, a reação redox da sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ gera uma VC reversível para o eletrodo puro (curva (a)), com ΔE_p de 80 mV, I_{pa} de 380 μA e I_{pc} de -361 μA . Quando o 11-MUA foi adsorvido no eletrodo de ouro, a corrente faradaica se extingue (curva (b)) o que pode estar relacionado com a interface aniônica gerada pelos grupos terminais de ácidos carboxílicos do 11-MUA provocando repulsão eletrostática com a sonda redox aniônica¹⁴⁶. Isso pode também estar relacionado com o aumento na distância média de

tunelamento causada pelas longas cadeias do 11-MUA, além da diminuição da área efetiva do eletrodo¹⁴⁷. Após a adsorção da tricamada dos polieletrólitos (PEI-PVS-PEI) houve um aumento na resposta faradaica com uma I_{pa} de 320 μA e I_{pc} de -258 μA (curva (c)), e o eletrodo passou a conduzir corrente elétrica devido a adsorção de cargas catiônicas do PEI, o que pode ter gerado uma aproximação dos íons $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ à interface com carga positiva¹⁴⁸. Após a incubação de AuNPs-anti-PSA, a I_{pa} e a I_{pc} diminuíram para 225 μA e -198 μA , respectivamente, (curva (d)) devido à adsorção eletrostática do conjugado AuNPs-anti-PSA (carga negativa) com o polieletrólito PEI (carga positiva). As intensidades da I_{pa} e I_{pc} diminuíram para 188 μA e -161 μA , respectivamente, com a adsorção do BSA (curva (e)), indicando que houve ligação com os sítios não específicos do antígeno.

Figura 26: Voltamogramas cíclicos obtidos com (a) eletrodo de ouro puro, (b) eletrodo de ouro modificado com 11-MUA, (c) Au/11-MUA/PEI-PVS-PEI (d) Au/11-MUA/PEI-PVS-PEI/AuNPs-anti-PSA e (e) Au/11-MUA/PEI-PVS-PEI/AuNPs-anti-PSA/BSA, em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol L⁻¹ em PBS pH 7,4, com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 1: Valores de potencial e corrente de picos obtidos das voltametrias cíclicas da Figura 26.

Curva	(a)	(c)	(d)	(e)
I_{pa} (μA)	380	320	225	188
I_{pc} (μA)	-361	-258	-198	-161
E_{pa} (mV)	238	272	307	331
E_{pc} (mV)	158	126	72	65
ΔE_p (mV)	80	146	235	266

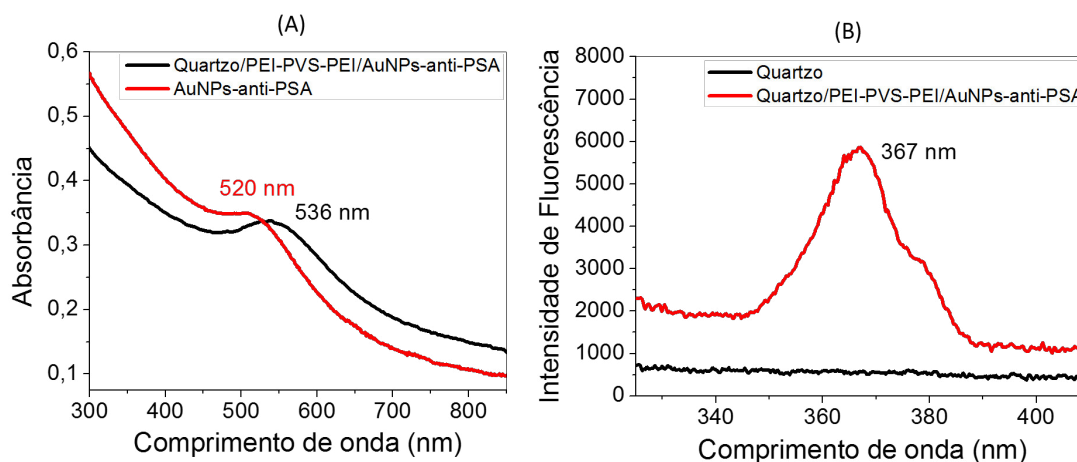
A adsorção dos filmes também é explicada pelo aumento de ΔE_p . Isso ocorre em virtude da corrente capacitiva gerada pela dupla camada elétrica presente entre a interface do eletrodo e a solução. Quando a corrente é gerada pela oxirredução das espécies eletroativas presentes na solução, ocorre um acúmulo de elétrons na superfície do eletrodo devido a adsorção dos materiais, o que aumenta a carga da dupla camada e, conseqüentemente, provoca um deslocamento dos E_{pa} e E_{pc} e um aumento da largura dos picos.

5.4.1 Análises de Fluorescência e UV-Vis dos filmes

Após a construção os filmes foram analisados por espectroscopia UV-Vis e fluorescência para verificar a adsorção das nanopartículas de ouro e do anticorpo anti-PSA. Os filmes foram depositados sob uma lâmina de quartzo (Quartzo/PEI-PVS-PEI/AuNPs-anti-PSA), descrito na seção 4.6.

A Figura 27(A) (linha preta) ilustra o espectro do filme PEI-PVS-PEI/AuNPs-anti-PSA que exibe uma banda em 536 nm referente a banda de absorção dos plásmons de superfície das AuNPs. É importante destacar que a banda de absorção de ressonância plasmônica de superfície das AuNPs em suspensão, descrita na seção 5.1 e evidente no espectro de absorbância representada pela linha vermelha da Figura 27(A), teve comprimento de onda de 520 nm. Houve um deslocamento na banda de absorção de 16 nm, o que pode estar relacionado com a ligação, aumento de tamanho, agregados ou mudança na natureza dielétrica em torno das AuNPs quando estes interagiram eletrostaticamente com o PEI presente nos filmes^{149,150}.

Figura 27: (A) Espectro de absorção no UV-Vis do filme PEI-PVS-PEI/AuNPs-anti-PSA (linha preta) e da suspensão de AuNPs-anti-PSA (linha vermelha) como referência, e (B) espectro de emissão de fluorescência, com excitação em 280 nm, do filme PEI-PVS-PEI/AuNPs-anti-PSA (linha vermelha) e do quartzo (linha preta) como referência.



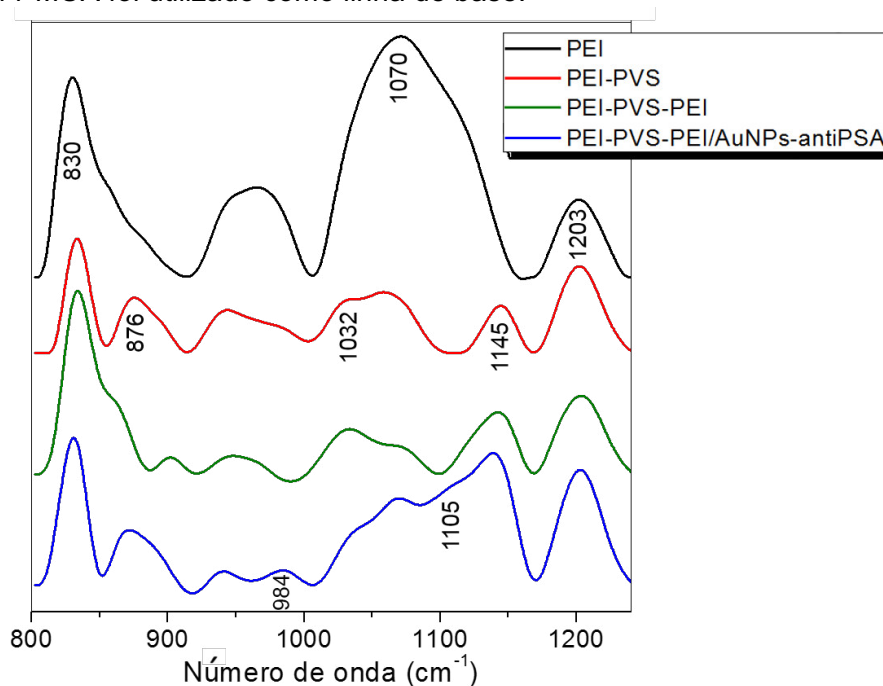
Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 27(B) indica a presença do anticorpo anti-PSA adsorvido no filme PEI-PVS-PEI/AuNPs-anti-PSA devido à banda característica de emissão do triptofano em 367 nm, conforme descrito na seção 5.2, indicando que não houve nenhuma mudança na estrutura conformacional da proteína¹⁵¹ após a adsorção nos filmes. O espectro do quartzo é apresentado como referência, sem nenhuma emissão.

5.4.2 Investigação da adsorção dos filmes e da resposta antígeno-anticorpo por PM-IRRAS

A adsorção das camadas foi monitorada utilizando a técnica PM-IRRAS através das bandas características de grupos funcionais pertencentes a cada material com o intuito de verificar a interação e comprovar a adsorção dos materiais na arquitetura do filme. Os espectros de PM-IRRAS do filme 11-MUA/PEI-PVS-PEI/AuNPs-anti-PSA adsorvido em ouro, utilizando como linha de base o 11-MUA, estão exibidos na Figura 28.

Figura 28: Espectro de PM-IRRAS das camadas de PEI (linha preta), PEI-PVS (linha vermelha), PEI-PVS-PEI (linha verde), PEI-PVS-PEI/AuNPs-anti-PSA (linha azul). O espectro do 11-MUA foi utilizado como linha de base.



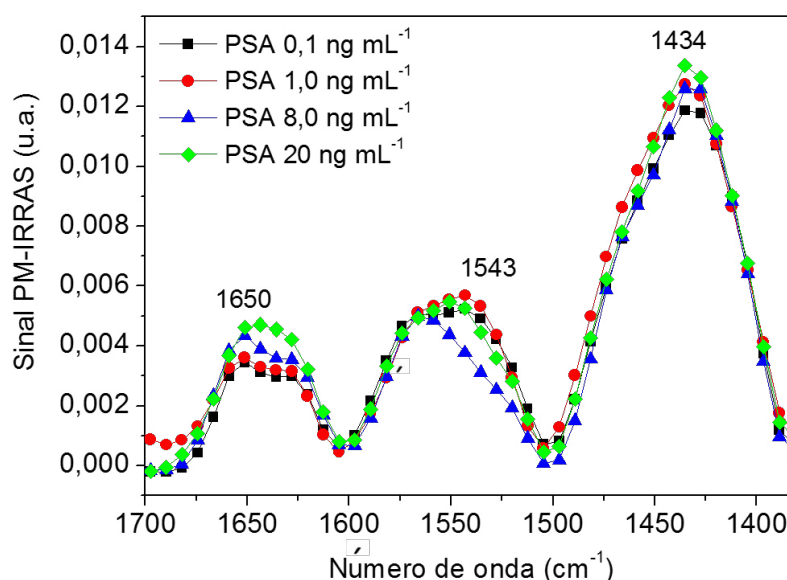
Fonte: Elaborado pelo autor.

A adsorção do PEI (linha preta) foi confirmada pelas bandas em 1203 e 1070 cm^{-1} , atribuídos ao estiramento C–N das aminas terciárias, e 830 cm^{-1} , referente à vibração de deformação de N–H das aminas primárias^{152,153}. Após a adsorção do PVS (linha vermelha) surgem duas bandas, em 1145 e 1032 cm^{-1} , associados às vibrações de estiramentos assimétrico e simétrico do S=O, respectivamente, dos grupos sulfônicos¹⁵². A banda localizada em 876 cm^{-1} pode estar associada à interação entre os grupos $-\text{NH}_3^+$ e $-\text{SO}_3^-$ ¹⁵⁴. A diminuição da intensidade e o deslocamento da banda em 1070 cm^{-1} podem estar relacionados com a interação eletrostática dos polieletrólitos PEI e PVS. Com a adsorção do conjugado AuNPs-anti-PSA (linha azul) ocorre uma mudança na região de 1010-1170 cm^{-1} , onde, possivelmente, características desse material se misturam com outros modos de vibração nessa região, ocorrendo uma sobreposição de bandas. O surgimento de uma banda sutil próxima à 1105 cm^{-1} pode estar relacionada à deformações angulares $-\text{CH}_2-$ de proteínas, enquanto a banda em 984 cm^{-1} está associada a vibrações N–H de amidas^{7,155,156}.

A Figura 29 mostra os espectros PM-IRRAS após a interação do sensor Au-11-MUA/PEI/PVS/PEI/anti-PSA com uma série de concentrações de PSA:

0,1, 1,0, 8,0 e 20 ng mL⁻¹. Os espectros apresentaram bandas de vibração de deformação angular (tesoura) CH₂ em 1434 cm⁻¹, de amida II em 1565 (deformação C – N) e 1540 cm⁻¹ (deformação N – H) e de banda amida I em 1650 cm⁻¹ (estiramento C = O)¹⁵⁷. A interação anticorpo-antígeno foi reconhecida pelo aumento da intensidade e da área da banda amida I (1650 cm⁻¹). A área variou de 0,0995, 0,1375, 0,1559 e 0,1889 cm⁻¹ com o aumento da concentração de PSA, de 0,1, 1,0, 8,0 e 20 ng mL⁻¹, respectivamente, como já foi observado em outros trabalhos^{7,157,158}.

Figura 29: Espectros de PM-IRRAS do sensor Au/11-MUA/PEI/PVS/PEI/AuNPs-anti-PSA após a interação com 0,1 (quadrado preto), 1,0 (círculo vermelho), 8,0 (triângulo azul) e 20 ng mL⁻¹ (verde diamante) de PSA.



Fonte: Elaborado pelo autor.

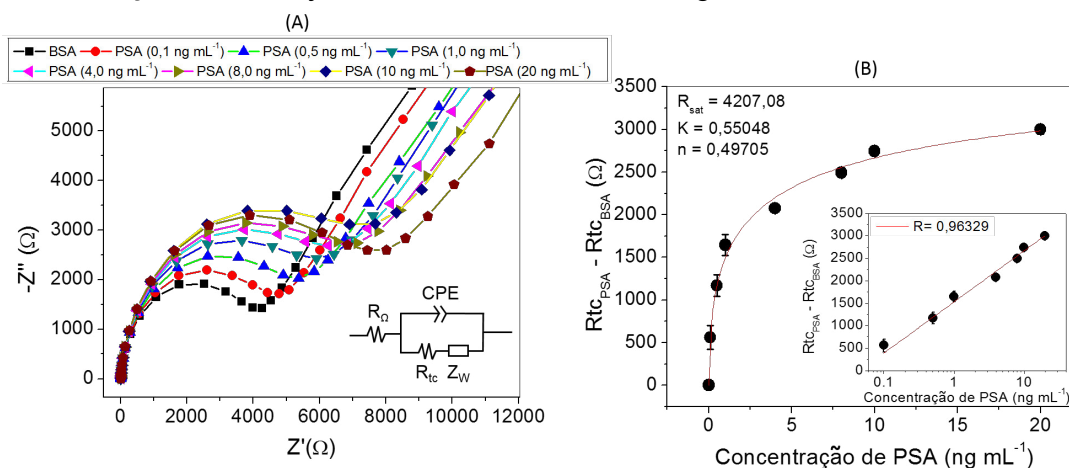
5.5 DETECÇÃO DO BIOMARCADOR PSA

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) é amplamente utilizada para diagnóstico e detecção de biomarcadores¹⁵⁹ devido à sua eficiência em fornecer informações detalhadas de fenômenos eletroquímicos que ocorrem em interfaces de eletrodos a partir de interações moleculares^{160,161}. Dessa forma, a EIE foi utilizada para estudar a interação do anticorpo anti-PSA, imobilizado na superfície do eletrodo de ouro, com o antígeno PSA através da alteração da impedância da interface eletrodo-solução.

A Figura 30(A) apresenta os diagramas de Nyquist obtidos do filme 11-MUA/PEI-PVS-PEI/AuNPs-anti-PSA/BSA após a interação com diferentes concentrações de PSA (0,1; 0,5; 1,0; 4,0; 8,0; 10 e 20 ng mL^{-1}). O aumento do diâmetro do semicírculo está diretamente relacionado com o aumento da resistência do eletrodo à transferência de carga, o que indica a ligação específica do complexo antígeno-anticorpo com a resposta progressiva do biossensor conforme se aumenta a concentração de PSA.

Uma maneira quantitativa e eficiente de analisar os diagramas de Nyquist é através da interpretação de circuitos elétricos equivalentes. O circuito de Randles $R_s(CPE[R_{tc}Z_w])$, ilustrado na Figura 30(A), apresenta a resistência associada às propriedades volumétricas da solução eletrolítica (R_Ω), difusão da sonda redox (Warburg – Z_w), a resistência a transferência de carga (R_{tc}) e um elemento de fase constante (CPE)^{162,163}. A Tabela 2 apresenta os valores de R_Ω , R_{tc} , Z_w , CPE obtidos aplicando o circuito de Randles ao diagrama Nyquist da Figura 30(A).

Figura 30: (A) Diagramas de Nyquist dos espectros de impedância de 100 KHz a 0,1 Hz do eletrodo de ouro modificado com o filme 11-MUA/PEI-PVS-PEI/AuNPs-anti-PSA/BSA após interação com diferentes concentrações de PSA, obtidos em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol L^{-1} em PBS pH 7,4. (B) Relação entre a R_{tc} relativa e a concentração de PSA ajustada com o modelo de Langmuir-Freundlich.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2: Valores de R_{Ω} , R_{tc} , Z_w e CPE obtidos a partir do diagrama de Nyquist da arquitetura 11-MUA/PEI-PVS-PEI/AuNPs-anti-PSA/BSA após a incubação de PSA com concentrações de 0,1, 0,5, 1, 4, 8, 10, 20 ng mL⁻¹.

Imunossensor	R_s (Ω)	R_{tc} (k Ω)	CPE ($\mu\text{Mho}\cdot\text{s}^N$)	N	Z_w ($\mu\text{Mho}\cdot\text{s}^{1/2}$)
BSA	13	3,52	1,94	0,968	168
PSA 0,1 ng mL⁻¹	12,9	3,98	1,98	0,964	147
PSA 0,5 ng mL⁻¹	13,2	4,60	2,05	0,959	136
PSA 1 ng mL⁻¹	12,9	5,08	2,08	0,956	117
PSA 4 ng mL⁻¹	13,5	5,46	2,10	0,955	111
PSA 8 ng mL⁻¹	12,5	5,88	2,14	0,952	118
PSA 10 ng mL⁻¹	13,0	6,24	2,15	0,950	104
PSA 20 ng mL⁻¹	12,7	6,56	2,21	0,947	150

Os valores da R_{tc} aumentaram com a concentração do PSA, como o esperado, devido ao progressivo impedimento da passagem de corrente entre os eletrodos durante a oxirredução da sonda Fe(II)/Fe(III). A Figure 30(B) apresenta a relação entre a diferença $R_{tcPSA} - R_{tcBSA}$ (i.e. R_{tc} após as incubações com PSA subtraídos da R_{tc} atribuído ao sistema 11-MUA/PEI-PVS-PEI/AuNPs-anti-PSA/BSA antes de qualquer interação com o analito) em função da concentração de PSA. A curva foi ajustada utilizando o modelo de Langmuir-Freundlich (LF)¹⁶⁴ (modelo de adsorção criado com base no modelo de Langmuir¹⁶⁵ e o modelo de Freundlich¹⁶⁶), representada na Equação 5. A curva (LF) apresenta um perfil de isoterma de adsorção típico de imuno-interação com um mecanismo de adsorção específico, na qual a quantidade de sítios disponíveis tende a zero à medida que ocorre a ligação antígeno-anticorpo. A mudança na R_{tc} foi linear em função do logaritmo da concentração de PSA.

$$q = \frac{R_{sat} (KC_{eq})^n}{(KC_{eq})^n + 1} \quad \text{Equação 5}$$

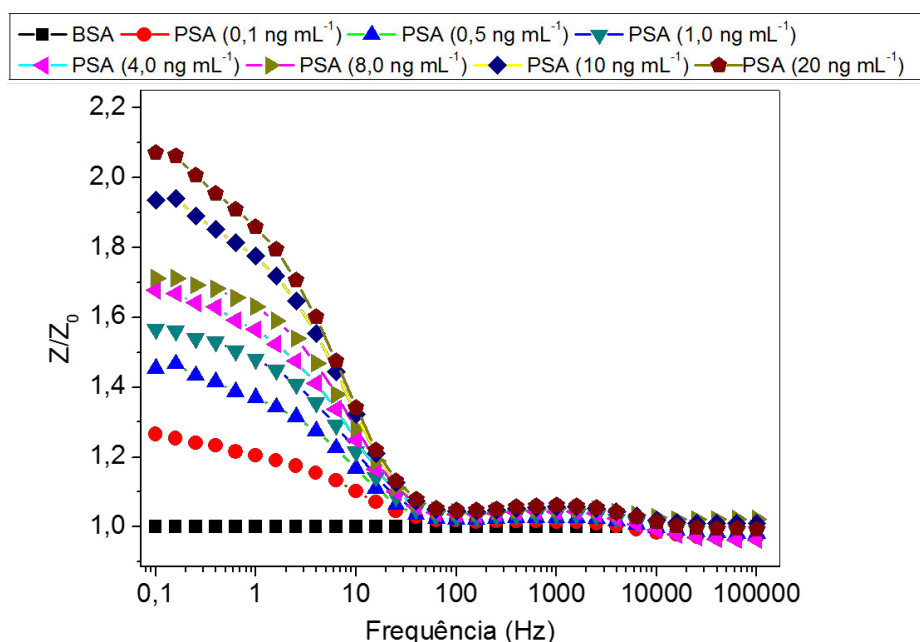
na qual q é a quantidade de material adsorvido no substrato, R_{sat} é a capacidade de adsorção, relacionada com o número de sítios disponíveis para ligação, C_{eq} é a concentração da fase aquosa em equilíbrio, K é a constante de equilíbrio para adsorção e n é o índice de heterogeneidade. O valor de n está relacionado com a cooperatividade em uma ligação, se $n = 1$ a adsorção é homogênea e

independente de outros locais de ligação; $n > 1$ indica cooperatividade positiva dos sítios de ligação de proteína e $0 < n < 1$ indica cooperatividade negativa do processo de ligação¹⁶⁷. Cooperatividade positiva significa que uma ligação em determinado local aumenta a afinidade de outros sítios enquanto que na cooperatividade negativa, diminui a afinidade de outros sítios de ligação. Dessa forma, a adsorção de PSA no imunossensor apresenta uma adsorção heterogênea e cooperatividade negativa ($n \approx 0,50$), onde as adsorções de PSA interferem na adsorção das moléculas vizinhas, o que pode explicar a rápida saturação da curva analítica. A constante $K \approx 0,55 \text{ ml ng}^{-1}$ foi similar a encontrada em outros trabalhos⁷ para interações antígeno-anticorpo. A saturação dos sítios disponíveis para ligação do PSA ocorre em $R_{\text{sat}} \approx 4207 \Omega$.

Para calcular o limite de detecção foi utilizado o método sugerido pela IUPAC ($LD = 3S_B/S$), onde S_B é o desvio padrão de 10 medidas do branco (11-MUA/PEI-PVS-PEI/AuNPs-anti-PSA/BSA) e S é a sensibilidade obtido a partir do coeficiente angular da curva de calibração (detalhe da Figura 30(B))¹⁶⁸. O sensor apresentou sensibilidade de $1136,3 \pm 90,3 \Omega \text{ mL ng}^{-1}$ e um LD de $0,17 \text{ ng mL}^{-1}$, o que seria suficiente para detectar o antígeno PSA em casos reais, já que o limite para indicar problemas na próstata é 4 ng mL^{-1} .

A Figura 31 apresenta a resposta do sensor ao PSA, em baixas e altas concentrações, através da dependência entre a razão do módulo de impedância com a frequência.

Figura 31: Espectro de impedância relativa em função da frequência para diferentes concentrações de PSA para o filme 11-MUA/PEI-PVS-PEI/AuNPs-anti-PSA/BSA medido em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol L⁻¹ em PBS pH 7,4.



Fonte: Elaborado pelo autor.

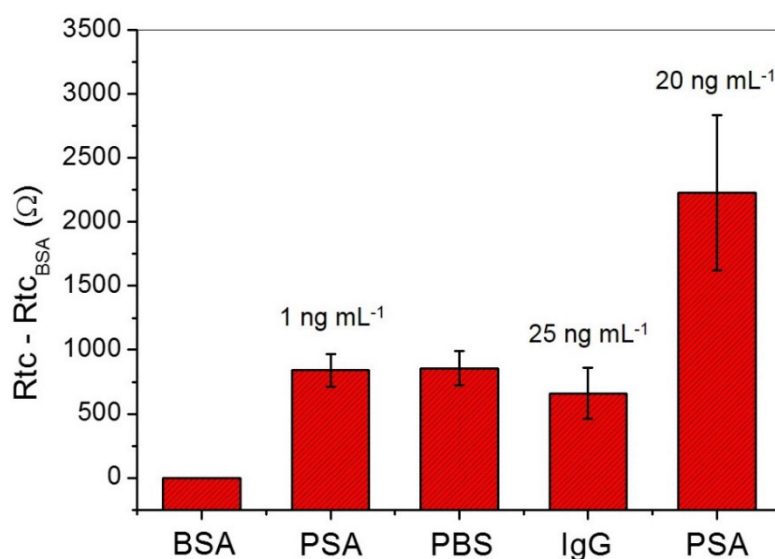
Na região de baixas frequências pode-se observar o aumento progressivo da impedância relativa com a concentração de PSA, o que indica a resposta elétrica afetada pela interação antígeno-anticorpo¹³⁴. Essa resposta, em baixas frequências (abaixo de 100 Hz) é devido à variações na dupla camada elétrica^{62,169} presente na interface entre o filme e a solução, onde ocorre o aumento da ligação antígeno-anticorpo conforme se aumenta as concentrações. Na região de frequências médias, em torno de 1000 Hz, a resposta é dominada por mudanças na estrutura dos filmes¹⁷⁰ o que fornece respostas de variações na impedância do filme. Dessa forma observa-se que nessa região também ocorre o aumento da razão do módulo de impedância com o aumento da quantidade de PSA adsorvido no anti-PSA presente nos filmes, evidenciando as contribuições mais significativas em regiões de média e baixas frequências.

5.5.1 Seletividade do imunossensor

A detecção de marcadores tumorais também pode ser afetada pela presença de outras proteínas presentes nos fluídos na qual se pretende analisar. Imunossensores eficientes e seletivos respondem apenas à interação específica

antígeno-anticorpo. Por esse motivo, a seletividade do imunossensor 11-MUA/PEI-PVS-PEI/AuNPs-anti-PSA foi verificada através da exposição à imunoglobulina G (IgG) não-específica entre as exposições ao antígeno específico PSA, apresentado na Figura 32. As incubações foram feitas utilizando o mesmo imunossensor.

Figura 32: Resistência a transferência de carga (R_{tc}) para o imunossensor Au/11-MUA/PEI-PVS-PEI/AuNPs-anti-PSA/BSA (1) antes e após a interação com (2) 1 ng mL^{-1} de PSA, (3) PBS, (4) 25 ng mL^{-1} de IgG e (5) 20 ng mL^{-1} de PSA.



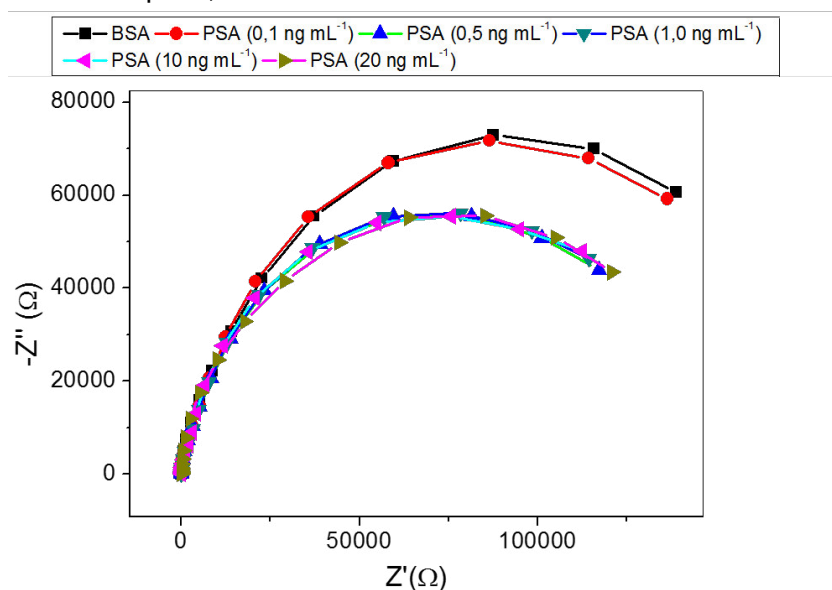
Fonte: Elaborado pelo autor.

A interação foi examinada através da alteração da R_{tc} obtida por EIE, onde o imunossensor foi exposto a 1 ng mL^{-1} de PSA, PBS, 25 ng mL^{-1} de IgG e 20 ng mL^{-1} de PSA, respectivamente. Verificou-se que o imunossensor não teve aumento significativo na R_{tc} quando exposto ao PBS e à IgG, enquanto que a interação com as concentrações de PSA causou o aumento da R_{tc} devido à adsorção específica. O resultado demonstra que o imunossensor eletroquímico apresenta alta seletividade devido à especificidade entre antígeno-anticorpo e o completo bloqueio de sítios não específicos pela BSA.

5.5.2 Comparação com um imunossensor convencional (Au/11-MUA/EDC-NHS/anti-PSA/BSA)

Para analisar a otimização fornecida pela técnica LbL e as AuNPs na fabricação do imunossensor Au/11-MUA/PEI-PVS-PEI/AuNPs-anti-PSA/BSA, foi fabricado um imunossensor utilizando a metodologia de imobilização convencional Au/11-MUA/EDC-NHS/anti-PSA/BSA, com mesma quantidade e concentração de anti-PSA ($1,52 \mu\text{g mL}^{-1}$) para efeito de comparação. Esses imunossensores, chamados aqui de convencionais, utilizam apenas de SAMs (como o 11-MUA) para a imobilização de anticorpos; é um método simples e encontrado em vários trabalhos na literatura^{138,171,172}. A Figura 33 mostra os resultados de detecção para 0,1, 0,5, 1,0, 10 e 20 ng mL^{-1} de PSA obtidos utilizando a EIE.

Figura 33: (A) Diagrama de Nyquist dos espectros de impedância de 100 KHz a 0,1 Hz do eletrodo de ouro modificado com o filme 11-MUA/EDC-NHS/anti-PSA/BSA após interação com diferentes concentrações de PSA, obtidos em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em PBS pH 7,4.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Observa-se uma queda no semi-circulo no diagrama Nyquist após a incubação de PSA e uma estabilização a partir de $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$. A partir disso, não é possível observar nenhum aumento desse semi-circulo mesmo em concentrações de 20 ng mL^{-1} , ou seja, a R_{tc} permanece a mesma, indicando que não há sítios suficientes disponíveis e que o imunossensor não responde a concentrações na faixa de $0,1 - 20 \text{ ng mL}^{-1}$.

Este resultado indicou que sem a estratégia de amplificação permitida pela formação do conjugado AuNP-anti-PSA, um sinal mensurável não é gerado usando uma quantidade tão pequena de anticorpos por um ensaio direto.

5.5.3 Comparação do desempenho com outros imunossensores

Para avaliar melhor as vantagens do imunossensor eletroquímico desenvolvido, os intervalos e limites de detecção foram comparados com outros métodos de desenvolvimento de imunossensores para detecção do PSA (Tabela 3).

Tabela 3: Exemplos de arquiteturas e métodos de biossensores aplicados à detecção de PSA.

Arquitetura do sensor	Método	Faixa de detecção (ng mL ⁻¹)	LD (ng mL ⁻¹)	Ref.
anti-PSA/AuNPs/dendrimer/AuNP modificados/PVC	Varição de potencial (eletroquímico)	0,5 – 18	0,10	[173]
HRP/Ab2/Ag/Ab1/PANI/AuNP-PNT/PGE	Cronoamperométrico (eletroquímico)	1 – 100	0,68	[4]
MWCNTs/IL/Chit/AuNPs-PAMAM/GCE	EIE (eletroquímico)	até 25	0,50	[29]
Tb ³⁺ conjugado com nanopartículas de zircônia dopada com complexo SA	Fluorescência (óptico)	0,1 – 50	0,40	[28]
AuNPs-anti-PSA/PSA-ACT-PSA/anti-PSA/Au	SPR (óptico)	0,29 - 150	0,29	[27]
Imunossensor do tipo sanduíche utilizando as MMPs revestidas com anticorpo anti-PSA e anticorpo anti-f-PSA marcado com ALP	Quimiluminescência (óptico)	0,1 – 30	0,10	[174]
AuNPs-anti-PSA/PEI-PVS-PEI/11-MUA/Au	EIE (eletroquímico)	0,1 – 20	0,17	Presente trabalho

Siglas da tabela: Cloreto de polivinila (PVC), peroxidase de rábano (HRP), anti-PSA primário (Ab1), anti-PSA secundário (Ab2), polianilina (PANI), nanotubo de peptídeo (PNT), eletrodo de grafite (PGE), nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs), líquido iônico (IL), quitosana (Chit), poliamidoamina (PAMAM), eletrodo de carbono vítreo (GCE), estreptavidina (SA), complexo α 1-antiquimotripsina-antígeno (ACI-PSA), partículas magnéticas (MMPs), anti-PSA livre (anti-f-PSA), fosfatase alcalina (ALP).

A Tabela 3 resume as faixas de concentrações e limites de detecção de imunossensores desenvolvidos para a detecção do PSA utilizando métodos ópticos e eletroquímicos, como variação de potencial, cronoamperometria, SPR, EIE, fluorescência e quimiluminescência. O método utilizado nesse trabalho

claramente apresenta grande potencial para o desenvolvimento de imunossensores de PSA com uma faixa de detecção linear considerável, baixo limite de detecção e alta sensibilidade.

O imunossensor desenvolvido foi comparável com outras matrizes que buscaram atingir a mesma faixa de detecção. Apresentou resultados semelhantes e superiores quando comparados a imunossensores do mesmo tipo, que não necessitam de marcadores^{28,173} e, em alguns casos, apresentou melhores resultados quando comparados a imunossensores do tipo *sanduíche*^{4,27,29,174}, que têm a vantagem da amplificação de sinal pela ancoragem dos anticorpos secundários.

Em geral, são necessários cerca de 10 - 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de anticorpo (ou mais) para a fabricação de imunossensores^{134,174-177}. Neste trabalho utilizou-se uma quantidade mínima de anti-PSA, com concentração de 1,52 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o que significa uma quantidade 10 a 100 vezes menor de anti-PSA comparado à valores comumente reportados na literatura^{134,174-177}.

Essa comparação mostra que o imunossensor desenvolvido pelo método direto apresenta vantagens em relação ao método *sanduíche*, uma vez que é utilizado uma quantidade muito menor de anti-PSA (o que reduz o custo de fabricação) e sem a necessidade de um marcador (o que reduz o tempo de construção). Essas vantagens se dão ao fato da utilização das AuNPs, que favorecem a condutividade eletrônica e possibilitam uma quantidade maior de anti-PSA adsorvido em sua estrutura. Suas propriedades eletrônicas e aumento da área superficial específica potencializam o sinal eletroquímico.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Fabricou-se com sucesso o imunossensor baseado em Au/11-MUA/PEI-PVS-PEI/AuNPs-anti-PSA onde utilizou-se a tecnologia dos filmes nanoestruturados e AuNPs. O método com GSH permitiu a síntese das AuNPs-anti-PSA confirmadas pelas espectroscopias UV-Vis, fluorescência e MET. Os filmes foram imobilizados na superfície do sensor de ouro, e seu crescimento foi confirmado por espectroscopia PM-IRRAS e VC, através do mecanismo de fisissorção, baseada em interações intermoleculares. A EIE permitiu detectar o PSA através do aumento da R_{tc} , proporcional ao aumento da interação antígeno-anticorpo. A relação da R_{tc} com a concentração do PSA apresentou um comportamento descrito pelo modelo de isoterma de adsorção de Langmuir-Freundlich. Foi possível detectar pequenas concentrações de PSA ($0,1 \text{ ng mL}^{-1}$) mesmo utilizando concentrações baixas de anti-PSA ($1,52 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$). O LD de $0,17 \text{ ng mL}^{-1}$ com faixa analítica de $0,1 - 20 \text{ ng mL}^{-1}$ foi obtido indicando que o imunossensor é viável para aplicações clínicas. O imunossensor também apresentou alta seletividade através do teste negativo com a IgG.

O imunossensor convencional (Au/11-MUA/anti-PSA), desenvolvido em paralelo e utilizando a mesma concentração de anti-PSA, não apresentou nenhuma resposta na R_{tc} evidenciando o desempenho potencializado com o uso das AuNPs. O imunossensor proposto aqui, de ensaio direto, também apresentou resultados comparáveis e superiores aos imunossensores do tipo *sanduíche* devido às propriedades das AuNPs, sendo uma alternativa de menor custo e mais rápida no que se refere a construção, uma vez que necessita de menor quantidade de anticorpo e não precisa de etapas adicionais para inclusão de marcadores utilizados em imunossensores do tipo *sanduíche*.

REFERÊNCIAS

1. Ongaro, M. & Ugo, P. Bioelectroanalysis with nanoelectrode ensembles and arrays. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 3715–3729 (2013).
2. Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N. & Estrela, P. Introduction to biosensors. *Essays Biochem.* **60**, 1–8 (2016).
3. Catalona, W. J. *et al.* Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **324**, 1156–1161 (1991).
4. Vural, T., Yaman, Y. T., Ozturk, S., Abaci, S. & Denkbaz, E. B. Electrochemical immunoassay for detection of prostate specific antigen based on peptide nanotube-gold nanoparticle-polyaniline immobilized pencil graphite electrode. *J. Colloid Interface Sci.* **510**, 318–326 (2018).
5. Song, S., Xu, H. & Fan, C. Potential diagnostic applications of biosensors: current and future directions. *Int. J. Nanomedicine* **1**, 433–440 (2006).
6. Mehrvar, M. & Abdi, M. Recent Developments, Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors. *Anal. Sci.* **20**, 1113–1126 (2004).
7. Soares, J. C. *et al.* Adsorption according to the Langmuir–Freundlich model is the detection mechanism of the antigen p53 for early diagnosis of cancer. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**, 8412–8418 (2016).
8. Ariga, K., Nakanishi, T. & Michinobu, T. Immobilization of Biomaterials to Nano-Assembled Films (Self-Assembled Monolayers, Langmuir-Blodgett Films, and Layer-by-Layer Assemblies) and Their Related Functions. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **6**, 2278–2301 (2006).
9. Wang, Y., Ping, J., Ye, Z., Wu, J. & Ying, Y. Impedimetric immunosensor based on gold nanoparticles modified graphene paper for label-free detection of Escherichia coli O157:H7. *Biosens. Bioelectron.* **49**, 492–498 (2013).
10. Jacobs, M., Panneer Selvam, A., Craven, J. E. & Prasad, S. Antibody-Conjugated Gold Nanoparticle-Based Immunosensor for Ultra-Sensitive Detection of Troponin-T. *J. Lab. Autom.* **19**, 546–554 (2014).
11. Huggins, C., Scott, W. W. & Heinen, J. H. Chemical composition of human semen and of the secretions of the prostate and seminal vesicles. *Am. J. Physiol.* **136**, 467–473 (1942).
12. Raad, G. *et al.* Paternal obesity: how bad is it for sperm quality and progeny health? *Basic Clin. Androl.* **27**, (2017).
13. Tanagho, E. A. & McAninch, J. W. *Smith's General Urology*. (McGraw Hill Professional, 2007).
14. Hematpour, K., Bennett, C. J., Rogers, D. & Head, C. S. Supraclavicular

lymph node: incidence of unsuspected metastatic prostate cancer. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **263**, 872–874 (2006).

15. Samadi, D. B. About Prostate Cancer. *Robotic Oncology* Available at: <http://www.roboticoncology.com/about-prostate-cancer/>. (Accessed: 5th May 2018)

16. INCA. Próstata. *Instituto Nacional de Câncer* Available at: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata>. (Accessed: 5th May 2018)

17. Global Burden of Disease Cancer Collaboration *et al.* Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.* E1–E16 (2018). doi:10.1001/jamaoncol.2018.2706

18. INCA. Monitoramento das ações de controle do câncer de próstata. *Instituto Nacional de Câncer* Available at: <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/informativo-deteccao-precoce-numero2-2017.pdf>. (Accessed: 5th May 2018)

19. Rao, A. R., Motiwala, H. G. & Karim, O. M. A. The discovery of prostate-specific antigen. *BJU Int.* **0**, 070902212121002-??? (2007).

20. Kim, D.-J. *et al.* Organic electrochemical transistor based immunosensor for prostate specific antigen (PSA) detection using gold nanoparticles for signal amplification. *Biosens. Bioelectron.* **25**, 2477–2482 (2010).

21. Stenman, U.-H., Leinonen, J., Zhang, W.-M. & Finne, P. Prostate-specific antigen. *Semin. Cancer Biol.* **9**, 83–93 (1999).

22. Shtricker, A., Shefi, S., Ringel, A. & Gillon, G. PSA levels of 4.0 - 10 ng/ml and negative digital rectal examination: antibiotic therapy versus immediate prostate biopsy. *Int. Braz. J. Urol.* **35**, 551–558 (2009).

23. Biniáz, Z., Mostafavi, A., Shamspur, T., Torkzadeh-Mahani, M. & Mohamadi, M. Electrochemical sandwich immunoassay for the prostate specific antigen using a polyclonal antibody conjugated to thionine and horseradish peroxidase. *Microchim. Acta* **184**, 2731–2738 (2017).

24. Liu, Z.-H., Zhang, G.-F., Chen, Z., Qiu, B. & Tang, D. Prussian blue-doped nanogold microspheres for enzyme-free electrocatalytic immunoassay of p53 protein. *Microchim. Acta* **181**, 581–588 (2014).

25. Chen, Y.-T. *et al.* Quantitative Analysis of Prostate Specific Antigen Isoforms Using Immunoprecipitation and Stable Isotope Labeling Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **87**, 545–553 (2015).

26. Shin, K.-S., Ji, J. H., Hwang, K. S., Jun, S. C. & Kang, J. Y. Sensitivity Enhancement of Bead-based Electrochemical Impedance Spectroscopy (BEIS) biosensor by electric field-focusing in microwells. *Biosens. Bioelectron.* **85**, 16–

24 (2016).

27. Uludag, Y. & Tothill, I. E. Cancer Biomarker Detection in Serum Samples Using Surface Plasmon Resonance and Quartz Crystal Microbalance Sensors with Nanoparticle Signal Amplification. *Anal. Chem.* **84**, 5898–5904 (2012).

28. Ye, Z., Tan, M., Wang, G. & Yuan, J. Preparation, Characterization and Application of Fluorescent Terbium Complex-Doped Zirconia Nanoparticles. *J. Fluoresc.* **15**, 499–505 (2005).

29. Kavosi, B., Salimi, A., Hallaj, R. & Amani, K. A highly sensitive prostate-specific antigen immunosensor based on gold nanoparticles/PAMAM dendrimer loaded on MWCNTS/chitosan/ionic liquid nanocomposite. *Biosens. Bioelectron.* **52**, 20–28 (2014).

30. Lee, J. H. *et al.* Immunoassay of prostate-specific antigen (PSA) using resonant frequency shift of piezoelectric nanomechanical microcantilever. *Biosens. Bioelectron.* **20**, 2157–2162 (2005).

31. Tang, H., Chen, J., Nie, L., Kuang, Y. & Yao, S. A label-free electrochemical immunoassay for carcinoembryonic antigen (CEA) based on gold nanoparticles (AuNPs) and nonconductive polymer film. *Biosens. Bioelectron.* **22**, 1061–1067 (2007).

32. Escamilla-Gómez, V., Hernández-Santos, D., González-García, M. B., Pingarrón-Carrazón, J. M. & Costa-García, A. Simultaneous detection of free and total prostate specific antigen on a screen-printed electrochemical dual sensor. *Biosens. Bioelectron.* **24**, 2678–2683 (2009).

33. Mehrotra, P. Biosensors and their applications – A review. *J. Oral Biol. Craniofacial Res.* **6**, 153–159 (2016).

34. Kazemi-Darsanaki, R., Azzadeh, A., Nourbakhsh, M., Raeisi, G. & AzizollahiAliabadi, M. Biosensors: Functions and Applications. *J. Biol. Today's World* **2**, 20–23 (2013).

35. Grieshaber, D., MacKenzie, R., Voros, J. & Reimhult, E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **8**, 1400–1458 (2008).

36. Laguna, M. *et al.* Antigen-Antibody Affinity for Dry Eye Biomarkers by Label Free Biosensing. Comparison with the ELISA Technique. *Sensors* **15**, 19819–19829 (2015).

37. Panini, N. V., Messina, G. A., Salinas, E., Fernández, H. & Raba, J. Integrated microfluidic systems with an immunosensor modified with carbon nanotubes for detection of prostate specific antigen (PSA) in human serum samples. *Biosens. Bioelectron.* **23**, 1145–1151 (2008).

38. Liu, Y. Electrochemical detection of prostate-specific antigen based on gold colloids/alumina derived sol-gel film. *Thin Solid Films* **516**, 1803–1808 (2008).

39. Choi, J.-W. *et al.* Ultra-sensitive surface plasmon resonance based

- immunosensor for prostate-specific antigen using gold nanoparticle–antibody complex. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **313–314**, 655–659 (2008).
40. Wang, X., Zhao, M., Nolte, D. D. & Ratliff, T. L. Prostate specific antigen detection in patient sera by fluorescence-free BioCD protein array. *Biosens. Bioelectron.* **26**, 1871–1875 (2011).
41. Wu, G. *et al.* Bioassay of prostate-specific antigen (PSA) using microcantilevers. *Nat. Biotechnol.* **19**, 5 (2001).
42. Rebelo, T. S. C. R. *et al.* Novel Prostate Specific Antigen plastic antibody designed with charged binding sites for an improved protein binding and its application in a biosensor of potentiometric transduction. *Electrochimica Acta* **132**, 142–150 (2014).
43. Janeway, C. A. J., Traves, P., Walport, M. & Shlomchik, M. J. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. (Garland Science, 2001).
44. Riccardi, C. dos S., Costa, P. I. da & Yamanaka, H. Imunossensor amperométrico. *Quím. Nova* **25**, 316–320 (2002).
45. Gosling, J. P. A Decade of Development in Immunoassay Methodology. *Clin. Chem.* **36**, 1408–1427 (1990).
46. Faria, R. A. D. de. Estudo para o desenvolvimento de biossensor impedimétrico não marcado para detecção de veneno ofídico. (Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia, 2017).
47. Foltz, I. N., Karow, M. & Wasserman, S. M. Evolution and Emergence of Therapeutic Monoclonal Antibodies: What Cardiologists Need to Know. *Circulation* **127**, 2222–2230 (2013).
48. Tijssen, P. The nature and structure of antibodies. in *Elsevier Science* **15**, 79–93 (1985).
49. Woof, J. M. & Burton, D. R. Human antibody–Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 89–99 (2004).
50. Graça, J. S. Filmes nanoestruturados para detecção do antígeno prostático específico. (Universidade Federal de São Carlos, Campus Sorocaba, 2016).
51. Bresolin, I. T. L., Miranda, E. A. & Bueno, S. M. A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. *Quím. Nova* **32**, 1288–1296 (2009).
52. Lane, R. F. & Hubbard, A. T. Electrochemistry of chemisorbed molecules. I. Reactants connected to electrodes through olefinic substituents. *J. Phys. Chem.* **77**, 1401–1410 (1973).
53. Lane, R. F. & Hubbard, A. T. Electrochemistry of chemisorbed molecules. II. Influence of charged chemisorbed molecules on the electrode

- reactions of platinum complexes. *J. Phys. Chem.* **77**, 1411–1421 (1973).
54. Schreiber, F. Structure and growth of self-assembling monolayers. *Prog. Surf. Sci.* **65**, 151–257 (2000).
55. Freire, R. S., Pessoa, C. A. & Kubota, L. T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. *Quím. Nova* **26**, 381–389 (2003).
56. Lud, S. Q. *et al.* Chemical Grafting of Biphenyl Self-Assembled Monolayers on Ultrananocrystalline Diamond. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 16884–16891 (2006).
57. Noyhouzer, T. & Mandler, D. Determination of low levels of cadmium ions by the under potential deposition on a self-assembled monolayer on gold electrode. *Anal. Chim. Acta* **684**, 1–7 (2011).
58. Holmes, C. & Tabrizian, M. Surface Functionalization of Biomaterials. in *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences* 187–206 (Elsevier, 2015). doi:10.1016/B978-0-12-397157-9.00016-3
59. Fowler, J. M., Wong, D. K. Y., Halsall, H. B. & Heineman, W. R. Recent developments in electrochemical immunoassays and immunosensors. in *Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications* 115–143 (Elsevier, 2008). doi:10.1016/B978-012373738-0.50007-6
60. Carvalhal, R. Desenvolvimento de sensor biomimétrico empregando monocamadas auto-organizadas de tióis sobre eletrodos de ouro. (Universidade Estadual de Campinas, 2005).
61. Wang, Z., Chen, J., Oyola-Reynoso, S. & Thuo, M. The Porter-Whitesides Discrepancy: Revisiting Odd-Even Effects in Wetting Properties of n-Alkanethiolate SAMs. *Coatings* **5**, 1034–1055 (2015).
62. Soares, A. C. *et al.* Controlled Film Architectures to Detect a Biomarker for Pancreatic Cancer Using Impedance Spectroscopy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 25930–25937 (2015).
63. Wang, H., Ohnuki, H., Endo, H. & Izumi, M. Effects of self-assembled monolayers on amperometric glucose biosensors based on an organic–inorganic hybrid system. *Sens. Actuators B Chem.* **168**, 249–255 (2012).
64. Decher, G., Hong, J. D. & Schmitt, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films* **210–211**, 831–825 (1992).
65. Decher, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* **277**, 1232–1237 (1997).
66. Oliveira Jr, O. N., Ferreira, M., Róz, A. L. D. & Leite, F. de L. Filmes nanoestruturados: Técnicas de Langmuir-Blodgett (LB) Layer-by-Layer (LbL). in *Nanostructure* 105–123 (Elsevier, 2017).

67. Richardson, J. J., Bjornmalm, M. & Caruso, F. Technology-driven layer-by-layer assembly of nanofilms. *Science* **348**, aaa2491–aaa2491 (2015).
68. Selin, V., Ankner, J. & Sukhishvili, S. Ionically Paired Layer-by-Layer Hydrogels: Water and Polyelectrolyte Uptake Controlled by Deposition Time. *Gels* **4**, 7 (2018).
69. Katov, N. A. Layer-by-Layer self-assembled: the contribution of hydrophobic interactions. *NanoStmcmred Mater.* **12**, 789-796, (1999).
70. Lvov, Y., Ariga, K., Ichinose, I. & Kunitake, T. Assembly of Multicomponent Protein Films by Means of Electrostatic Layer-by-Layer Adsorption. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 6117–6123 (1995).
71. Zhao, W., Xu, J.-J. & Chen, H.-Y. Electrochemical Biosensors Based on Layer-by-Layer Assemblies. *Electroanalysis* **18**, 1737–1748 (2006).
72. Tang, Z., Wang, Y., Podsiadlo, P. & Kotov, N. A. Biomedical Applications of Layer-by-Layer Assembly: From Biomimetics to Tissue Engineering. *Adv. Mater.* **18**, 3203–3224 (2006).
73. Resende, R. R. *Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria*. **4**, (Edgard Blücher, 2016).
74. Silva, Í. O. da. Síntese e imobilização de nanopartículas de ouro em fibras regeneradas via exaustão para potencial aplicação biomédica. (Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2015).
75. Castro, E. G. de. Nanopartículas de platina e seus nanocompósitos com nanotubos e outras formas de carbono: preparação, caracterização e propriedades. (Universidade Federal do Paraná, 2009).
76. Correia, G. B. Síntese e caracterização de nanopartículas de níquel para óptica não linear. (Universidade Federal de Pernambuco, 2008).
77. Khan, I., Saeed, K. & Khan, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arab. J. Chem.* (2017). doi:10.1016/j.arabjc.2017.05.011
78. Wagers, K., Wagers, K. & Adem, S. Effect of pH on the Stability of Gold Nanoparticles and Their Application for Melamine Detection in Infant Formula. *IOSR J. Appl. Chem.* **7**, 15–20 (2014).
79. Faraday, M. The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **147**, 145–181 (1857).
80. Abtahi, S. M. H. Synthesis and characterization of metallic nanoparticles with photoactivated surface chemistries. (Virginia Polytechnic Institute and State University, 2013).
81. Habashi, F. Purple of Cassius: Nano gold ou colloidal gold? *Eur. Chem. Bull.* **5**, 416–419 (2016).
82. Siddartha, M. Synthesis and characterization of colloidal gold nanoparticles. *Int. J. Adv. Technol. Eng. Sci.* **2**, 250–254 (2014).

83. Haw, M. D. Colloidal suspensions, Brownian motion, molecular reality: a short history. *J. Phys. Condens. Matter* **14**, 7769–7779 (2002).
84. Shah, M., Fawcett, D., Sharma, S., Tripathy, S. & Poinern, G. Green Synthesis of Metallic Nanoparticles via Biological Entities. *Materials* **8**, 7278–7308 (2015).
85. Teixeira, P. R. Estrutura e propriedades de nanopartículas de ouro sintetizadas na presença de polímeros. (Universidade de Brasília, Instituto de Química, 2016).
86. Janegitz, B. C. Desenvolvimento de biossensores utilizando nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro. (Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Química, 2012).
87. Siqueira-Batista, R. *et al.* Nanociência e nanotecnologia como temáticas para discussão de ciência, tecnologia, sociedade e ambiente. *Ciênc. Educ. Bauru* **16**, 479–490 (2010).
88. BBC. The importance of nanotechnology. *British Broadcasting Corporation* (2014). Available at: http://www.bbc.co.uk/schools/gcsebitesize/science/21c/materials_choices/nanotechnologyrev1.shtml. (Accessed: 21st May 2018)
89. Cruz, D. S. de M. G. da. Biosíntese e caracterização de nanopartículas metálicas. (Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, 2010).
90. Vitoreti, A. B. F. *et al.* Células solares sensibilizadas por pontos quânticos. *Quím. Nova* **40**, 436–446 (2016).
91. Corrêa, N. F. Estudo das propriedades ópticas de colóides de nanopartículas de pratas dispersas em BMI.BF4. (Universidade Federal de Alagoas, 2015).
92. Rocha, T. C. R. da. Nanopartículas metálicas anisotrópicas: Mecanismo de formação e aplicação ópticas. (Universidade Estadual de Campinas, 2008).
93. Simon, U., Schön, G. & Schmid, G. The Application of Au₅₅ Clusters as Quantum Dots. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **32**, 250–254 (1993).
94. Lopes, J. R. Síntese de nanopartículas de prata (NPsAg) em soluções aquosas de fribroína de seda e gelatina. (Universidade Estadual de Campinas, 2017).
95. Castro, L., Blázquez, M. L., Muñoz, J. ángel, González, F. G. & Ballester, A. Mechanism and Applications of Metal Nanoparticles Prepared by Bio-Mediated Process. *Rev. Adv. Sci. Eng.* **3**, 199–216 (2014).
96. Consolini, G. Síntese e atividade microbianas de nanopartículas metálicas. (Universidade Federal de Alfenas, 2015).
97. Turkevich, J., Stevenson, P. C. & Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* **11**,

55 (1951).

98. Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D. J. & Whyman, R. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid–Liquid system. *J Chem Soc Chem Commun* **0**, 801–802 (1994).

99. Das, R. K., Borthakur, B. B. & Bora, U. Green synthesis of gold nanoparticles using ethanolic leaf extract of *Centella asiatica*. *Mater. Lett.* **64**, 1445–1447 (2010).

100. Hiramatsu, H. & Osterloh, F. E. A Simple Large-Scale Synthesis of Nearly Monodisperse Gold and Silver Nanoparticles with Adjustable Sizes and with Exchangeable Surfactants. *Chem. Mater.* **16**, 2509–2511 (2004).

101. Ferreira, C. S. *et al.* Uso de nanobastões de ouro para o desenvolvimento de aulas práticas de nanotecnologia. *Quím. Nova* **40**, 594–601 (2017).

102. Khanna, P. K. *et al.* PVA stabilized gold nanoparticles by use of unexplored albeit conventional reducing agent. *Mater. Chem. Phys.* **92**, 229–233 (2005).

103. Parveen, R. Síntese de nanopartículas de ouro com forma e tamanho controlados utilizando glicerol como um agente de redução e estabilização ecológico e de baixo custo. (Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, 2017).

104. Niethammer, B. Effective Theories for Ostwald Ripening. in *Analysis and Stochastics of Growth Processes and Interface Models* 223–244 (Oxford University Press, 2008).

105. Hotza, D. Artigo revisão: colagem de folhas cerâmicas. *Cerâmica* **43**, 159–166 (1997).

106. Bragança, A. C. C. R. Avaliação de reagentes alternativos para substituição da cal em sistema de bombeamento de longa distância de polpa de minério de ferro. (Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia, 2008).

107. Filho, P. C. de S. & Serra, O. A. Metodologias de síntese em fase líquida para a obtenção de nanomateriais inorgânicos à base terras raras. *Quím. Nova* **XY**, 1–17 (2015).

108. Shi, J. *Steric Stabilization*. (United States of America: Center for Industrial Sensors and Measurements, Departemen Materials Science & Engineering, Group Inorganic Materials Science, The Ohio State University, 2002).

109. Costa, J. D. da S. Síntese e caracterização toxicológica de diferentes tipos de nanopartículas de ouro. (Universidade do Porto, 2015).

110. Khashayar, P., Amoabediny, G., Larijani, B., Hosseini, M. & Vanfleteren, J. Fabrication and Verification of Conjugated AuNP-Antibody Nanoprobe for

- Sensitivity Improvement in Electrochemical Biosensors. *Sci. Rep.* **7**, 8 (2017).
111. Sousa, A. A. *et al.* Biointeractions of ultrasmall glutathione-coated gold nanoparticles: effect of small size variations. *Nanoscale* **8**, 6577–6588 (2016).
112. Pongsuchart, M., Danladkaew, C., Khomvarn, T. & Sereemasum, A. Effect of Glutathione-Stabilized Gold Nanoparticles in 3T3 Fibroblast Cell. *IACSIT Press Singap.* **27**, 5 (2012).
113. Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. & Crouch, S. R. *Fundamentos de Química Analítica*. (Pioneira Thomson Learning, 2006).
114. Moura, J. R. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica aplicável ao desenvolvimento farmacotécnico de comprimidos de olanzapina. (Universidade Federal de Goiás, 2009).
115. Skoog, D. A., Holler, F. J. & Crouch, S. R. *Principles of Instrumental Analysis*. (Thomson Brooks/Cole, 2007).
116. Williams, A. T. R. *An introduction to fluorescence spectroscopy*. (Perkin-Elmer, 1981).
117. Mendelsohn, R., Mao, G. & Flach, C. R. Infrared reflection–absorption spectroscopy: Principles and applications to lipid–protein interaction in Langmuir films. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1798**, 788–800 (2010).
118. Urakawa, A., Bürgi, T. & Baiker, A. Modulation Excitation PM-IRRAS: A New Possibility for Simultaneous Monitoring of Surface and Gas Species and Surface Properties. *Chim. Int. J. Chem.* **60**, 231–233 (2006).
119. Hollins, P. Infrared Reflection–Absorption Spectroscopy. in *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (ed. Meyers, R. A.) (John Wiley & Sons, Ltd, 2006). doi:10.1002/9780470027318.a5605
120. Dumbrava, A., Ciupina, V. & Prodan, G. DEPENDENCE ON GRAIN SIZE AND MORPHOLOGY OF ZINC SULFIDE PARTICLES BY THE SYNTHESIS ROUTE. *Romanian J. Phys.* **50**, 831–836 (2005).
121. Pyrz, W. D. & Buttrey, D. J. Particle Size Determination Using TEM: A Discussion of Image Acquisition and Analysis for the Novice Microscopist. *Langmuir* **24**, 11350–11360 (2008).
122. Mamani, J. B. Estrutura e propriedades de nanopartículas preparadas via sol-gel. (Universidade de São Paulo, Instituto de Física, 2009).
123. Hull, D. & Bacon, D. J. *Introduction to Dislocations*. (Butterworths-Heinemann, 2011).
124. Leite, C. A. P., de Souza, E. F. & Galembeck, F. Core-and-Shell Nature of Stöber Silica Particles. *J Braz Chem Soc* **12**, 7 (2001).
125. Elgrishi, N. *et al.* A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *J. Chem. Educ.* **95**, 197–206 (2018).

126. Pacheco, W. F., Semaan, F. S., Almeida, V. G. K., Ritta, A. G. S. L. & Aucélio, R. Q. Voltammetry: A Brief Review About Concepts. *Rev. Virtual Quím.* **5**, 516–537 (2013).
127. Heinze, J. Cyclic Voltammetry—“Electrochemical Spectroscopy”. *New Analytical Methods*(25). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **23**, 831–847 (1984).
128. Souza, P. H. M. de. Estudos eletroquímicos de complexos de Cu(II) de antibióticos da classe das fluorquinolonas. (Universidade Federal de Minas Gerais, 2011).
129. Lasia, A. *Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications.* *Kluwer Acad. Publ.* **32**, 143–248 (1999).
130. Sacco, A. Electrochemical impedance spectroscopy: Fundamentals and application in dye-sensitized solar cells. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **79**, 814–829 (2017).
131. Ribeiro, D. V., Souza, C. A. C. & Abrantes, J. C. C. Use of Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) to monitoring the corrosion of reinforced concrete. *Rev. IBRACON Estrut. E Mater.* **8**, 529–546 (2015).
132. Carvalho, L. A. de, Andrade, A. R. de & Bueno, P. R. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. *Quím. Nova* **29**, 796–804 (2006).
133. Yagati, A. K., Min, J. & Cho, S. Electrosynthesis of ERGO-NP Nanocomposite Films for Bioelectrocatalysis of Horseradish Peroxidase towards H₂O₂. *J. Electrochem. Soc.* **161**, G133–G140 (2014).
134. Graça, J. S. *et al.* On the importance of controlling film architecture in detecting prostate specific antigen. *Appl. Surf. Sci.* **434**, 1175–1182 (2018).
135. Stefanov, Y. Antibody Immunoglobulin G (IgG). *Visual Science* (2015). Available at: <https://www.visual-science.com/projects/antibody-immunoglobulin-G/illustration/>. (Accessed: 5th June 2018)
136. Menez, R., Stura, E. & Jolivet-Reynaud, C. Crystal structure of human prostate specific antigen complexed with an activating antibody. *RCSB* (2008). Available at: <https://www.rcsb.org/structure/2ZCH>. (Accessed: 5th June 2018)
137. Sigma-Aldrich. Available at: <https://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>. (Accessed: 5th June 2018)
138. Ahmad, A. & Moore, E. Electrochemical immunosensor modified with self-assembled monolayer of 11-mercaptoundecanoic acid on gold electrodes for detection of benzo[a]pyrene in water. *The Analyst* **137**, 5839 (2012).
139. Link, S. & El-Sayed, M. A. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **103**, 4212–4217 (1999).
140. Zhao, X. *et al.* Development and evaluation of colloidal gold

immuno-chromatographic strip for detection of Escherichia coli O157. *Afr J Microbiol Res* **8**

141. Ngo, V. K. T. *et al.* Preparation of gold nanoparticles by microwave heating and application of spectroscopy to study conjugate of gold nanoparticles with antibody *E. coli* O157:H7. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* **6**, 035015 (2015).
142. Lin, C.-T., Chen, K.-J., Tseng, K.-C. & Chu, L.-K. Spatially and temporally-resolved tryptophan fluorescence thermometry for monitoring the photothermal processes of gold nanorod suspensions. *Sens. Actuators B Chem.* **255**, 1285–1290 (2018).
143. Singh, V., Nair, S. P. N. & Aradhyam, G. K. Chemistry of conjugation to gold nanoparticles affects G-protein activity differently. *J. Nanobiotechnology* **11**, 7 (2013).
144. Iosin, M., Toderas, F., Baldeck, P. L. & Astilean, S. Study of protein–gold nanoparticle conjugates by fluorescence and surface-enhanced Raman scattering. *J. Mol. Struct.* **924–926**, 196–200 (2009).
145. Courrol, L. C. & de Matos, R. A. Synthesis of Gold Nanoparticles Using Amino Acids by Light Irradiation. in *Catalytic Application of Nano-Gold Catalysts* (ed. Mishra, N. K.) (InTech, 2016). doi:10.5772/63729
146. Zhao, J., Bradbury, C. R. & Fermín, D. J. Long-Range Electronic Communication between Metal Nanoparticles and Electrode Surfaces Separated by Polyelectrolyte Multilayer Films. *J. Phys. Chem. C* **112**, 6832–6841 (2008).
147. Bradbury, C. R., Zhao, J. & Fermín, D. J. Distance-Independent Charge-Transfer Resistance at Gold Electrodes Modified by Thiol Monolayers and Metal Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **112**, 10153–10160 (2008).
148. Doan, T. T., Day, R. W. & Leopold, M. C. Optical and electrochemical properties of multilayer polyelectrolyte thin films incorporating spherical, gold colloid nanomaterials. *J. Mater. Sci.* **47**, 108–120 (2012).
149. Erenildo Ferreira de Macedo, Daniela Ducatti Formaggio, Nivia Salles Santos & Dayane Batista Tada. Gold Nanoparticles Used as Protein Scavengers Enhance Surface Plasmon Resonance Signal. *Sensors* **17**, 2765 (2017).
150. Nghiem, T. H. L. *et al.* Synthesis, capping and binding of colloidal gold nanoparticles to proteins. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* **1**, 025009 (2010).
151. Huang, C.-Y., Hsieh, M.-C. & Zhou, Q. Application of Tryptophan Fluorescence Bandwidth-Maximum Plot in Analysis of Monoclonal Antibody Structure. *AAPS PharmSciTech* **18**, 838–845 (2017).
152. Socrates, G. & Socrates, G. *Infrared and Raman characteristic group*

frequencies: tables and charts. (Wiley, 2001).

153. Colthup, N. B., Daly, L. H. & Wiberley, S. E. AMINES, C=N, AND N=O COMPOUNDS. in *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy* 339–354 (Elsevier, 1990). doi:10.1016/B978-0-08-091740-5.50014-4
154. Vinhola, L. *et al.* Self-assembled films from chitosan and poly(vinyl sulfonic acid) on Nafion® for direct methanol fuel cell. *J. Braz. Chem. Soc.* **23**, 531–537 (2012).
155. Barth, A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1767**, 1073–1101 (2007).
156. Barth, A. The infrared absorption of amino acid side chains. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **74**, 141–173 (2000).
157. Soares, J. C. *et al.* Supramolecular Control in Nanostructured Film Architectures for Detecting Breast Cancer. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 11833–11841 (2015).
158. Rodrigues, V. da C. *et al.* Analysis of Scanning Electron Microscopy Images To Investigate Adsorption Processes Responsible for Detection of Cancer Biomarkers. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 5885–5890 (2017).
159. Brett, C. Electrochemical Impedance Spectroscopy for Characterization of Electrochemical Sensors and Biosensors. in 67–80 (ECS, 2008). doi:10.1149/1.3004030
160. Szymańska, I., Radecka, H., Radecki, J. & Kaliszan, R. Electrochemical impedance spectroscopy for study of amyloid β -peptide interactions with (–) nicotine ditartrate and (–) cotinine. *Biosens. Bioelectron.* **22**, 1955–1960 (2007).
161. Long, Y., Nie, L., Chen, J. & Yao, S. Piezoelectric quartz crystal impedance and electrochemical impedance study of HSA–diazepam interaction by nanogold-structured sensor. *J. Colloid Interface Sci.* **263**, 106–112 (2003).
162. Lisdat, F. & Schäfer, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. *Anal. Bioanal. Chem.* **391**, 1555–1567 (2008).
163. Yao, Y. *et al.* Biomarkers of liver fibrosis detecting with electrochemical immunosensor on clinical serum. *Sens. Actuators B Chem.* **222**, 127–132 (2016).
164. Jeppu, G. P. & Clement, T. P. A modified Langmuir-Freundlich isotherm model for simulating pH-dependent adsorption effects. *J. Contam. Hydrol.* **129–130**, 46–53 (2012).
165. Langmuir, I. THE ADSORPTION OF GASES ON PLANE SURFACES OF GLASS, MICA AND PLATINUM. *J. Am. Chem. Soc.* **40**, 1361–1403 (1918).
166. Jaroniec, M. Adsorption on heterogeneous surfaces: The exponential equation for the overall adsorption isotherm. *Surf. Sci.* **50**, 553–564 (1975).
167. Jiang, W. & Hearn, M. T. W. Protein Interaction with Immobilized Metal

Ion Affinity Ligands under High Ionic Strength Conditions. *Anal. Biochem.* **242**, 45–54 (1996).

168. Benedito da Silva, O. & Machado, S. A. S. Evaluation of the detection and quantification limits in electroanalysis using two popular methods: application in the case study of paraquat determination. *Anal. Methods* **4**, 2348 (2012).

169. Taylor, D. M. & Macdonald, A. G. AC admittance of the metal/insulator/electrolyte interface. *J. Phys. Appl. Phys.* **20**, 1277–1283 (1987).

170. Riul Jr., A., Dantas, C. A. R., Miyazaki, C. M. & Oliveira Jr., O. N. Recent advances in electronic tongues. *The Analyst* **135**, 2481 (2010).

171. Haji-Hashemi, H., Norouzi, P., Safarnejad, M. R. & Ganjali, M. R. Label-free electrochemical immunosensor for direct detection of Citrus tristeza virus using modified gold electrode. *Sens. Actuators B Chem.* **244**, 211–216 (2017).

172. Rajesh, Sharma, V., Tanwar, V. K., Mishra, S. K. & Biradar, A. M. Electrochemical impedance immunosensor for the detection of cardiac biomarker Myoglobin (Mb) in aqueous solution. *Thin Solid Films* **519**, 1167–1170 (2010).

173. Wang, X.-L., Tao, G.-H. & Meng, Y.-H. Double-Layer Nanogold and Poly(amidoamine) Dendrimer- Functionalized PVC Membrane Electrode for Enhanced Electrochemical Immunoassay of Total Prostate Specific Antigen. *Electroanalysis* **21**, 2109–2115 (2009).

174. Liu, R. *et al.* Magnetic-particle-based, ultrasensitive chemiluminescence enzyme immunoassay for free prostate-specific antigen. *Anal. Chim. Acta* **801**, 91–96 (2013).

175. Vural, T., Yaman, Y. T., Ozturk, S., Abaci, S. & Denkbaz, E. B. Electrochemical immunoassay for detection of prostate specific antigen based on peptide nanotube-gold nanoparticle-polyaniline immobilized pencil graphite electrode. *J. Colloid Interface Sci.* **510**, 318–326 (2018).

176. Ding, L.-L. *et al.* Nanogold-functionalized g-C₃N₄ nanohybrids for sensitive impedimetric immunoassay of prostate-specific antigen using enzymatic biocatalytic precipitation. *Biosens. Bioelectron.* **85**, 212–219 (2016).

177. Kukkar, M. *et al.* Molybdenum disulfide quantum dot based highly sensitive impedimetric immunoassay for prostate specific antigen. *Microchim. Acta* **184**, 4647–4654 (2017).