

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE
DEPARTAMENTO DE FÍSICA, QUÍMICA E MATEMÁTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DOS MATERIAIS

JULIANA SANTOS GRAÇA

**FILMES NANOESTRUTURADOS PARA DETECÇÃO DO ANTÍGENO
PROSTÁTICO ESPECÍFICO**

Sorocaba
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE
DEPARTAMENTO DE FÍSICA, QUÍMICA E MATEMÁTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

JULIANA SANTOS GRAÇA

**FILMES NANOESTRUTURADOS PARA DETECÇÃO DO ANTÍGENO
PROSTÁTICO ESPECÍFICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais (PPGCM) para obtenção do título de mestre em Ciência dos Materiais.

Orientação: Prof. Dr. Marystela Ferreira

Sorocaba
2016

Graça, Juliana Santos

**Filmes nanoestruturado para a detecção do antígeno prostático específico /
Juliana Santos Graça. -- 2016.**

106 f. : 30 cm.

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

Orientador: Marystela Ferreira

Banca examinadora: Ana Lúcia Brandl, Luciano Caseli

Bibliografia

**1. Filmes Layer-by-Layer. 2. Anticorpo Anti-PSA livre e incorporado em
lipossomos. 3. Detecção do antígeno PSA por diferentes técnicas. 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)

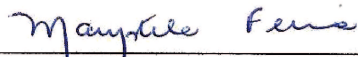
FOLHA DE APROVAÇÃO

JULIANA SANTOS GRAÇA

**“FILMES NANOESTRUTURADOS PARA DETECÇÃO DO ANTÍGENO
PROSTÁTICO ESPECÍFICO”.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais - PPGCM, para obtenção do título de mestre em Ciência dos Materiais. Área de concentração Nanociência e Nanotecnologia de Materiais, da Universidade Federal de São Carlos. Sorocaba, 08 de março de 2016.

Orientador(a)



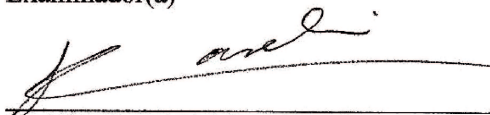
Prof (a). Dr.(a) Marystela Ferreira
UFSCar – Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba

Examinador(a)



Prof (a). Dr. (a) Ana Lúcia Brandl
UFSCar – Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba

Examinador(a)



Prof (a). Dr.(a) Luciano Caseli
Unifesp – Universidade Federal de São Paulo, campus São Paulo



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, em especial aos meus pais José e Maria que mesmo longe sempre me compreenderam e me apoiaram. Dedico também ao meu querido namorado Wesley que sempre está ao meu lado me incentivando.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir mais esta conquista e por sempre estar ao meu lado me protegendo e iluminando.

Sem dúvidas a execução deste trabalho só foi possível graças à ajuda e colaboração de muitas pessoas. Portanto, deixo aqui a minha sincera gratidão:

À minha orientadora Profa. Dra. Marystela Ferreira que desde que nos conhecemos, em 2009, acreditou em mim. Sou eternamente grata por todas as oportunidades concedidas, por sua confiança, compreensão no momento mais difícil da minha vida, por compartilhar seus conhecimentos e acima de tudo por sua amizade. Muito Obrigada Mary!!

À Dra. Marli Leite de Moraes por sua amizade, por compartilhar os seus conhecimentos e colaborar com o nosso trabalho.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa GPNNS: Celina, Daniela, Paula, Nathalia, Eduard, Michelle, Anerise e Daiane. Todos vocês de alguma maneira fizeram parte desse trabalho. Eu tenho um carinho imenso por todos vocês!!

Ao Dr. Flávio Makoto e o Dr. Diogo Volpati pela colaboração, dedicação e amizade.

À Dra. Celina Miyazaki que participou diretamente deste trabalho, obrigada por toda a ajuda, por sua companhia e amizade. Eu aprendi muito com você!!!

À todos os professores da PPGCM por seus ensinamentos.

Aos meus amigos da pós-graduação: Karina, Roberta, Caroline, Vitor e Guilherme, obrigada pela amizade e companhia durante estes dois anos.

À prima Iasmin e a amiga Beatriz que foram a minha família em Sorocaba, obrigada pela companhia e amizade.

À UFSCar-Sorocaba, IFSC da USP- São Carlos, UNESP-Araquara e UNIFESP-São José dos Campos pela oportunidade de executar o projeto de pesquisa.

À FAPESP (Processo 2013/23288-0), CAPES e CNPq.

Enfim, agradeço a todos que de alguma maneira colaboraram para a realização deste trabalho.

“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é a hora de compreender mais para temer menos.”

Marie Curie.

RESUMO

GRAÇA, Juliana Santos *Filmes nanoestruturados para detecção do antígeno prostático específico*. 2016. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) - Centro de Ciências e Tecnologia para a Sustentabilidade, Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2016.

No presente trabalho foram produzidos filmes nanoestruturados camada por camada (LbL) de anticorpo Anti-PSA na ausência e na presença de lipossomos de DPPG, a fim de estudar a detecção do antígeno prostático específico (PSA) por diferentes técnicas de caracterização. A solução de anticorpo Anti-PSA, livre e incorporado em lipossomo, foi caracterizada por espectroscopia UV-vis e Dicroísmo Circular (CD). Sendo que no primeiro caso, foram verificadas as principais bandas de absorção do anticorpo e uma possível agregação na ausência do lipossomo. As medidas de CD indicaram estruturas desordenadas do anticorpo livre e na presença do lipossomo o anticorpo manteve a sua estrutura secundária (Folha- β). Os filmes LbL de anticorpo Anti-PSA e Anti-PSA+DPPG, alternados com diferentes polycations, PAH (poli(alilamina hidrocloreada)) ou PEI (poli(etilenoimina)) foram fabricados sobre quartzo e o sensor de ouro modificado com 11-MUA e caracterizados por espectroscopia UV-vis e Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR), no qual foi constatado a deposição dos materiais nos diferentes substratos e definido o PEI como melhor polieletrólito para imobilização do anticorpo. Através das medidas de SPR também foi simulado a espessura e o índice de refração das bicamadas de filmes. Os filmes *casting* de PEI, PVS e Anti-PSA e os filmes LbL destes materiais foram caracterizados por Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), através das bandas dos espectros no modo de transmissão e reflexão verificou-se a interação entre os polieletrólitos e constatou a deposição do anticorpo no filme. Atuando como unidade de detecção do PSA os filmes de (PEI/PVS)₁/(PEI/Anti-PSA+DPPG)₅ e de (PEI/PVS)₁/(PEI/Nati-PSA)₅ foram caracterizados por voltametria cíclica (VC), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e por SPR, e, ambos sistemas foram capazes de detectar o PSA em concentrações inferiores a 4 ng.mL⁻¹ que é a concentração normal para um indivíduo saudável.

Palavras-chave: Filmes camada por camada, Anticorpo Anti-PSA, Antígeno prostático específico (PSA), Lipossomos, Detecção eletroquímica, Detecção óptica

ABSTRACT

In the present work, Layer-by-Layer films of Anti-PSA antibody in the absence and presence of DPPG liposomes were produced in order to study the detection of prostate specific antigen (PSA) by different characterization techniques. The free Anti-PSA antibody in solution and incorporated into liposome was characterized by UV-vis spectroscopy and Circular Dichroism (CD). In the first characterization, it was verified the main absorption bands of the antibody and a possible aggregation in the absence of the liposome. CD measurements indicated disordered structures of free antibody. However, its secondary structure (β -Sheet) was maintained in the presence of liposomes. The film Layer- by-Layer of free Anti-PSA antibody and incorporated into DPPG liposomes was done alternating the antibody with different polycations, PAH (poly (allylamine hydrochloride)) and PEI (poly (ethyleneimine)). The films fabricate on quartz and gold sensors were characterized by UV-vis and SPR spectroscopy. These results proved the deposition of the materials on different substrates and the PEI was the best polyelectrolyte for immobilization of the antibody. Through the SPR measures it was simulated thickness and refractive index of the film bilayers. The PEI, PVS and Anti-PSA casting film and PEI/PVS and PEI/Anti-PSA LbL films were characterized by FTIR, it was observed through the bands of the spectra the interaction between the polyelectrolyte and found the deposition of antibody in the film. Acting as PSA detection unit, the $(\text{PEI/PVS})_1/(\text{PEI/Anti-PSA+DPPG})_5$ and $(\text{PEI/PVS})_1/(\text{PEI/Nati-PSA})_5$ films were characterized by cyclic voltammetry (CV), electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and SPR and both systems were able to detect PSA at concentrations below 4 ng.mL^{-1} that is the normal concentration for a healthy individual.

Keywords: Layer-by-Layer films, Anti-PSA antibody, Prostate Specific Antigen (PSA), Liposome, Electrochemical detection, Optical detection

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração da localização da próstata e das células cancerosas.....	2
Figura 2: Representação dos componentes de um biossensor, (a) amostras de analitos, (b) elementos biorreceptores, (c) transdutor, (d) amplificador e (e) sistema eletrônico.	7
Figura 3: Ilustração das principais porções de um anticorpo e sua região de ligação com o antígeno.	8
Figura 4: Possíveis orientações do anticorpo: em (A) ligação através das regiões Fab e Fc com um sítio de ligação F _{ab} disponível, (B) ligação da região F _c , (C) ligação da região F _{ab} e (D) regiões Fab e F _c sem disponibilidade de sítios de ligação com o antígeno.	9
Figura 5: (A) Representação esquemática do processo de deposição do filme LbL sobre um substrato sólido. (B) Ilustração idealizada do filme LbL de polieletrólitos, sendo as etapas 1 e 3 a representação da adsorção do poliânion e do polication, respectivamente, e as etapas 2 e 4 os procedimentos de lavagem.	10
Figura 6: Representação do modelo da membrana celular.	11
Figura 7: Representação da estrutura do fosfolipídio e do lipossomo.	12
Figura 8: Representação das regiões do espectro eletromagnético.	14
Figura 9: Representação da banda de absorção da molécula de tirosina.	15
Figura 10: Representação esquemática dos componentes principais da lei de Beer.....	16
Figura 11: Representação dos modos vibracionais de uma molécula. Os sinais + e – indicam os movimentos perpendiculares ao plano da página.	18
Figura 12: Em (I) (A) as componentes de luz polarizada circularmente à direita (R) e à esquerda (L) com mesma magnitude resultando na luz polarizada no plano, em (B) as componentes com diferentes magnitudes e a resultando na polarização elíptica. Em (II) sinal de CD gerado com a absorção da luz.	19
Figura 13: Representação esquemática da oscilação da densidade de elétrons livres presentes em um filme metálico.	21
Figura 14: Em (A) Representação do sistema de prisma acoplado para análise por SPR, onde K_x é o vetor de onda relacionado com o ângulo de incidência e K_{sp} é a constante de propagação de PS, e em (B) varredura angular do sensor SPR mostrando o ângulo mínimo de reflexão θ_{SPR-1} e com a adsorção de uma nova camada θ_{SPR-2}	22
Figura 15: Representação de uma célula eletroquímica com três eletrodos, sendo (A) contra eletrodo, (B) eletrodo de trabalho, (C) eletrodo de referência.....	23
Figura 16: Em (A) sinal de excitação empregado em voltametria cíclica e em (B) voltamograma que representa a variação de corrente com o potencial aplicado.....	24
Figura 17: Representação de um circuito equivalente e a sua resposta, onde os processos em (A) ocorre em altas frequências e (B) em baixas frequências.	25
Figura 18: Ilustração das estruturas químicas do fosfolipídio DPPG, do antígeno PSA, do anticorpo Anti-PSA, dos polications PAH e PEI e do poliânion PVS.	27
Figura 19: Representação do processo de incorporação do anticorpo Anti-PSA em lipossomos. Em (A) fosfolipídio solubilizado em solvente orgânico, (B) evaporação do solvente, (C) formação do filme fosfolipídico, (D) adição da solução de Anti-PSA e (E) agitação ultrassônica.....	28
Figura 20: Ilustração do processo de funcionalização do eletrodo CrAu com 11-MUA.....	30

Figura 21: Representação esquemática da deposição de uma única camada de lipossomo com anticorpo Anti-PSA sobre o colchão (PAH/PVS).....	32
Figura 22: Representação esquemática do processo de fabricação dos filmes LbL. Em (A) deposição do colchão e em (B) deposição do anticorpo.....	33
Figura 23: Espectro de UV-vis da solução de anticorpo Anti-PSA livre em tampão PBS e a estrutura química do aminoácido triptofano.....	36
Figura 24: Espectros de UV-vis da solução de lipossomos de DPPG puro e com Anti-PSA incorporado.....	37
Figura 25: Espectro de CD da solução de anticorpo Anti-PSA livre em PBS, pH 7,4, e incorporado em lipossomo de DPPG.	39
Figura 26: (A) Espectros de Uv-vis para diferentes tempos de imersão do substrato de quartzo com PAH na solução contendo Anti-PSA+DPPG e (B) é a cinética de crescimento que relaciona absorvância em 280 nm em função do tempo de adsorção do Anti-PSA+DPPG.	40
Figura 27: (A) Espectros de UV-vis do filme LbL de PAH/Anti-PSA com diferentes números de bicamadas e (B) absorvância em 280 nm em função do número de bicamadas depositadas.	42
Figura 28: (A) Espectros de absorvância UV-vis do filme LbL de PEI/Anti-PSA com diferentes números de bicamadas e (B) absorvância em 280 nm em função do número de bicamadas depositadas.....	43
Figura 29: (A) Espectros de absorvância UV-vis do filme LbL de PAH/Anti-PSA+DPPG com diferentes números de bicamadas e (B) absorvância em 280 nm em função do número de bicamadas depositadas.....	44
Figura 30: Espectros de absorvância UV-vis do filme LbL de PEI/Anti-PSA+DPPG com diferentes números de bicamadas e (B) absorvância em 280 nm em função do número de bicamadas depositadas.....	45
Figura 31: Espectros FTIR no modo transmissão para o filme <i>casting</i> do PEI e do PVS depositados sobre o seleneto de zinco ZnSe. A curva vermelha representa a segunda derivada do espectro de transmissão, revelando os picos encobertos no espectro original.	46
Figura 32: Espectros FTIR no modo transmissão e reflexão para o filme LbL de PEI/PVS com 5 bicamadas. A curva vermelha representa a segunda derivada do espectro de transmissão e reflexão.	47
Figura 33: Espectros FTIR no modo transmissão e reflexão para o filme LbL de (PEI/PVS) ₅ /(PEI/Anti-PSA) e espectro de FTIR do filme <i>casting</i> do anticorpo Anti-PSA. A curva vermelha representa a segunda derivada do espectro de transmissão e reflexão.	49
Figura 34: Em (A) curva de SPR apresentando a intensidade em função do ângulo de incidência, θ_{SPR} , das bicamadas de PEI/PVS e PEI/Anti-PSA depositadas sobre o sensor de ouro modificado com 11-MUA, monitorado em tampão PBS e temperatura de 20°C. Em (B) curva de crescimento do filme PEI/Anti-PSA apresentado a variação do ângulo, $\Delta\theta_{SPR}$, em função do número de bicamadas.	50
Figura 35: Em (A) curva de SPR apresentando a intensidade em função do ângulo de incidência, θ_{SPR} , das bicamadas de PEI/PVS e PEI/Anti-PSA depositado sobre o sensor de ouro modificado com 11-MUA, monitorado em AR e temperatura de 20°C. Em (B) curva de	

crescimento do filme PEI/Anti-PSA apresentado a variação do ângulo, $\Delta\theta_{SPR}$, em função do número de bicamadas.	51
Figura 36: Simulação das curvas de SPR para o ouro modificado com 11-MUA e monitorado em AR (A) e PBS (B).	53
Figura 37: Gráfico que relaciona os valores simulados de espessura (nm) em função dos valores simulados de IR para 1 camada de PEI (A), 1 camada de PVS (B) e 1 bicamada de PEI/Anti-PSA (C).	54
Figura 38: Curva de SPR apresentando a intensidade em função do ângulo de incidência, θ_{SPR} , das bicamadas de PEI/PVS e PEI/Anti-PSA+DPPG depositado sobre o sensor de ouro modificado com 11-MUA, monitorado à 20°C e dois meios: (A) em AR e (B) em PBS.	56
Figura 39: (A) Voltamogramas cíclicos do eletrodo CrAu puro (i), CrAu-11-MUA (ii) e CrAu-11-MUA(PEI/Anti-PSA+DPPG) ₅ (iii), realizados em solução PBS contendo K ₃ Fe(CN) ₆ 5 mmol.L ⁻¹ diluído na proporção 1:1 (V/V), com velocidade de varredura de 10 mV s ⁻¹	57
Figura 40: Representação esquemática da detecção do PSA pelo filme de (PEI/PVS) ₁ /(PEI/Anti-PSA+DPPG) ₅	59
Figura 41: Voltametria Cíclica dos eletrodos, (i) CrAu puro, (ii) CrAu-11-MUA e (iii) CrAu-11-MUA/(PEI/PVS) ₁ /(PEI/Anti-PSA+DPPG) ₅ em PBS, pH 7,4 com velocidade de varredura de 10 mV.s ⁻¹	60
Figura 42: Voltamogramas cíclicos, obtidos em PBS, pH 7,4 com velocidade de varredura de 10 mV.s ⁻¹ , do eletrodo CrAu-11-MUA com o filme (PEI/PVS) ₁ /(PEI/Anti-PSA+DPPG) ₅ depositado, (A) incubado com antígeno PSA em diferentes concentrações e (B) do eletrodo modificado com o filme sem incubação de PSA.	61
Figura 43: Gráfico da variação de corrente em -0,2 V vs. ECS em função da concentração de PSA.	62
Figura 44: Voltamogramas cíclicos, obtidos em PBS, pH 7,4 com velocidade de varredura de 10 mV.s ⁻¹ , do eletrodo CrAu-11-MUA com o filme (PEI/PVS) ₁ /(PEI/Anti-PSA+DPPG) ₅ depositado e incubado com PBS.	62
Figura 45: Voltamogramas cíclicos, obtidos em PBS pH 7,4 com velocidade de varredura de 10 mV.s ⁻¹ , dos eletrodos (A) CrAu-11-MUA/PEI e (B) CrAu-11-MUA/(PEI/DPPG) ₅ após incubação com PBS e com PSA.	63
Figura 46: Em (A) Diagrama de Nyquist (-Z'' vs. Z') para os filmes (PEI/PVS) ₁ /(PEI/Anti-PSA) ₅ e (PEI/PVS) ₁ /(PEI/Anti-PSA+DPPG) ₅ antes e após incubação em solução de BSA, medidas em K ₃ [Fe(CN) ₆] 5 mmol.L ⁻¹ solubilizado em solução de KCl 0,5 mmol.L ⁻¹ e diluído em PBS, pH 7,4, na proporção 1:1 (V/V). Em (B) diagrama de Nyquist (-Z'' vs. Z') para os filmes na ausência e presença de BSA.	64
Figura 47: Em (A) Diagrama de Nyquist (-Z'' vs. Z') para o filme (PEI/PVS) ₁ /(PEI/Anti-PSA) ₅ medido em K ₃ [Fe(CN) ₆] 5 mmol.L ⁻¹ solubilizado em solução de KCl 0,5 mmol.L ⁻¹ e diluído em PBS, pH 7,4, na proporção 1:1 (V/V) e em (B) imagem ampliada.	65
Figura 48: Em (A) gráfico da resistência de transferência de carga em função da concentração de PSA e em (B) modelo de circuito elétrico equivalente ao sistema de medidas utilizado.	66
Figura 49: Em (A) razão do módulo da impedância em função da frequência para diferentes concentrações de PSA para o filme (PEI/PVS) ₁ /(PEI/Anti-PSA) ₅ medido em K ₃ [Fe(CN) ₆] 5 mmol.L ⁻¹ solubilizado em solução de KCl 0,5 mmol.L ⁻¹ e diluído em PBS, pH 7,4, na	

proporção 1:1 (V/V) e em (B) valor máximo do pico da razão do módulo da impedância em função da concentração de PSA, ajustado com o modelo de Langmuir-Freundlich.....	67
Figura 50: Em (A) diagrama de Nyquist ($-Z''$ vs. Z') para o filme (PEI/PVS) ₁ /(PEI/Anti-PSA+DPPG) ₅ medido em K ₃ [Fe(CN) ₆] 5 mmol.L ⁻¹ solubilizado em solução de KCl 0,5 mmol.L ⁻¹ e diluído em PBS, pH 7,4, na proporção 1:1 (V/V) e em (B) imagem ampliada.....	68
Figura 51: Em (A) gráfico da resistência de transferência de carga em função da concentração de PSA e (B) modelo de circuito elétrico equivalente ao sistema de medidas utilizado.....	69
Figura 52: Em (A) razão do módulo da impedância em função da frequência para diferentes concentrações de PSA para o filme (PEI/PVS) ₁ /(PEI/Anti-PSA+DPPG) ₅ medido em K ₃ [Fe(CN) ₆] 5 mmol.L ⁻¹ solubilizado em solução de KCl 0,5 mmol.L ⁻¹ e diluído em PBS, pH 7,4, na proporção 1:1 (V/V) e em (B) valor máximo do pico da razão do módulo da impedância em função da concentração de PSA, ajustado com o modelo de Langmuir-Freundlich.....	70
Figura 53: Gráfico IDMAP obtido dos dados do módulo da impedância em função da frequência para os filmes de (PEI/PVS) ₁ /(PEI/Anti-PSA) ₅ e (PEI/PVS) ₁ /(PEI/Anti-PSA+DPPG) ₅ para diferentes concentrações de PSA.....	71
Figura 54: Representação esquemática da detecção do PSA pelo filme (PEI/PVS) ₁ /(PEI/Anti-PSA) ₅ através de medidas de SPR.....	72
Figura 55: Sensograma de SPR para a ligação não específica do BSA e ligação específica do PSA com o anticorpo imobilizado no filme. No <i>inset</i> o sensograma para o filme com a adição de BSA e tampão PBS.....	73
Figura 56: Mudanças no sinal de SPR com tempo para a ligação do PSA em diferentes concentrações com o Anti-PSA presente no filme (PEI/PVS) ₁ /(PEI/Anti-SA) ₅	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estruturas secundárias e os respectivos comprimentos de onda nos espectros de CD. Dados obtidos de Greenfield, N. (1999) ^[62]	20
Tabela 2: Espessura de cada bicamada de filme PEI/PVS e PEI/Anti-PSA.	55
Tabela 3: Valores de E_{pa} , E_{pc} , I_a e I_c obtidos dos voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 40.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Absorbância
Anti-PSA	<i>Prostate Specific Antigen Antibody</i> (Anticorpo específico do antígeno prostático específico)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina do Soro Bovino)
CD	<i>Circular Dichroism</i> (Dicroísmo Circular)
CE	Contra eletrodo
CrAu	Eletrodo cromo-ouro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPG	Dipalmitoil fosfatidil glicerol
ECS	Eletrodo de calomelano saturado
EIE	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assays</i> (Ensaio de imunoabsorção enzimática)
ER	Eletrodo de referência
ET	Eletrodo de trabalho
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectrometry</i> (Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier)
F_{ab}	<i>Fraction Antigen-Binding</i> (fragmento de ligação com o antígeno)
F_c	Fração cristalizável
GPNS	Grupo de Pesquisa Nanociência e Nanotecnologia aplicada em Sensoriamento
I_a	Corrente anódica
I_c	Corrente catódica
IFSC-USP	Instituto de Física de São Carlos- Universidade de São Paulo
Ig	Imunoglobulinas
IgG	Imunoglobulina G
IR	Índice de Refração
IDMAP	<i>Interactive Documente Maps</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KLK3	<i>kallikrein-3</i> (Glicoproteína caliceína humana 3)
LB	<i>Langmuir-Blodgett</i>
LbL	<i>Layer-by-Layer</i> (camada por camada)
LUV	<i>Large Unilamellar Vesicle</i> (vesícula unilamelar grande)
MLV	<i>Multilamellar Vesicle</i> (vesícula multilamelar)
NHS-EDC	<i>N-hydroxysuccinimide/1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide</i>
11-MUA	Ácido 11- mercaptoundecanóico
OMS	Organização Mundial de Saúde
P_a	Potencial anódico
PAH	Poli(alilamina hidroclorada)
P_b	Potencial catódico
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão fosfato salino)
PEI	Poli(etilenoimina)
pI	Ponto isoelétrico

PS	Plasmon de Superfície
PSA	<i>Prostate Specific Antigen</i> (Antígeno Prostático Específico)
PVS	Poli(vinil sulfato de sódio)
SAM	<i>Self-assembled monolayer</i> (Monocamada automontada)
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i> (Ressonância Plasmônica de Superfície)
Θ_{SPR}	Ângulo de ressonância plasmônica de superfície
SUV	<i>Small Unilamellar Vesicles</i> (vesícula unilamelar pequena)
R_{tc}	Resistência a transferência de carga
T	Transmitância
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
UV-vis	Ultravioleta visível
VC	Voltametria Cíclica
Z	Impedância
Z'	Impedância real
Z''	Impedância imaginária

SUMÁRIO

CAPITULO 1	1
1 INTRODUÇÃO E MOTIVAÇÃO DO TRABALHO	1
1.1 CÂNCER DE PRÓSTATA	2
1.2 OBJETIVOS	5
1.2.1 Objetivo geral	5
1.2.2 Objetivos específicos	5
CAPÍTULO 2	6
2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS	6
2.1 BIOSSENSOR	6
2.2 FILMES CAMADA POR CAMADA OU <i>LAYER-BY-LAYER</i> (LbL).....	9
2.3 MODELOS DE MEMBRANA BIOLÓGICA E LIPOSSOMOS	11
2.4 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS	13
2.4.1 Espectroscopia	13
2.4.2 Espectroscopia de absorção UV-vis	16
2.4.3 Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier	17
2.4.4 Dicroísmo Circular	18
2.4.5 Ressonância Plasmônica de Superfície	20
2.4.5.1 Aspectos teóricos da SPR.....	21
2.5 MÉTODOS ELETROQUÍMICOS	22
2.5.1 Voltametria Cíclica (VC)	22
2.5.2 Espectroscopia de Impedância eletroquímica (EIE)	24
CAPÍTULO 3	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 MATERIAIS.....	26

3.2	SOLUÇÃO TAMPÃO PBS.....	27
3.3	SOLUÇÃO DOS POLIELETRÓLITOS	27
3.4	SOLUÇÃO DO ANTICORPO ANTI-PSA LIVRE E INCORPORADO EM LIPOSSOMOS.....	27
3.5	SOLUÇÃO DO PSA	29
3.6	LIMPEZA DOS SUBSTRATOS.....	29
3.6.1	Substrato de quartzo	29
3.6.2	Substrato de CrAu	29
3.6.2.1	Caracterizações eletroquímicas.....	29
3.6.2.2	Caracterizações por SPR.....	30
3.6.2.3	Funcionalização da superfície do ouro com 11-MUA.....	30
3.7	CARACTERIZAÇÃO POR DICROÍSMO CIRCULAR.....	31
3.8	CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO FILME NANOESTRUTURADOS.	31
3.9	FABRICAÇÃO DOS FILMES NANOESTRUTURADOS	32
3.10	CARACTERIZAÇÃO POR FTIR.....	33
3.11	CARACTERIZAÇÃO POR VOLTAMETRIA CÍCLICA	33
3.12	CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA.....	34
3.13	CARACTERIZAÇÃO POR RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE	35
CAPÍTULO 4	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA SOLUÇÃO DE ANTICORPO ANTI-PSA LIVRE E INCORPORADA EM LIPOSSOMOS POR UV-VIS	36
4.2	CARACTERIZAÇÃO DA SOLUÇÃO DE ANTICORPO ANTI-PSA LIVRE E INCORPORADO EM LIPOSSOMOS POR DICROÍSMO CIRCULAR	38
4.3	CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO FILME COMPOSTO DE PAH/ANTI-PSA+DPPG.....	39

4.4	CRESCIMENTO DOS FILMES NANOESTRUTURADOS DE ANTI-PSA E ANTI-PSA+DPPG COM PAH E PEI	40
4.5	CARACTERIZAÇÃO DO FILME DE PEI/ANTI-PSA POR FTIR	45
4.6	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DEPOSITADOS SOBRE O SENSOR DE SPR	49
4.6.1	Filme PEI/Anti-PSA	50
4.6.2	Filme PEI/Anti-PSA+DPPG	55
4.7	CARACTERIZAÇÃO DO FILME NANOESTRUTURADO DEPOSITADO SOBRE CRAU POR VOLTAMETRIA CÍCLICA (VC).....	57
4.8	DETECÇÃO DO ANTÍGENO PSA POR DIFERENTES TÉCNICAS	59
4.8.1	Voltametria Cíclica do filme (PEI/PVS)₁/(PEI/Anti-PSA+DPPG)₅	59
4.8.2	Espectroscopia de impedância eletroquímica dos filmes de (PEI/PVS)₁/(PEI/Anti-PSA)₅ e (PEI/PVS)₁/(PEI/Anti-PSA+DPPG)₅.....	63
4.8.3	Filmes de (PEI/PVS)₁/(PEI/Anti-PSA)₅ por Ressonância Plasmônica de Superfície.....	71
CAPÍTULO 5		75
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75
6	TRABALHOS PRODUZIDOS	76
	<i>Artigos publicados.....</i>	<i>76</i>
	<i>Trabalhos publicados em anais de congressos</i>	<i>76</i>
	<i>Premiações</i>	<i>77</i>
7	REFERÊNCIAS	78

CAPITULO 1

Este capítulo está dividido em subtópicos, em que são apresentadas informações sobre o câncer de próstata, o antígeno prostático específico (PSA do inglês *Prostate Specific Antigen*) que é o marcador associado a este tipo de câncer e a importância dos imunossensores como ferramenta auxiliar para o diagnóstico da doença. Serão apresentados também os objetivos do trabalho.

1 INTRODUÇÃO E MOTIVAÇÃO DO TRABALHO

Nas últimas décadas tem crescido o interesse no desenvolvimento de biossensores para diagnósticos dos mais variados tipos de doenças, sejam elas causadas por vírus, bactérias e até mesmo desenvolvidas pelo próprio organismo humano, como o câncer ^[1-5]. Estes dispositivos empregam biomoléculas específicas para realizar o reconhecimento molecular e a geração de sinal. No caso de alguns tipos de câncer, proteínas denominadas de marcador tumoral são expressas ou tem a sua concentração normal alterada no organismo, o que possibilita uso de anticorpos ou sequencias peptídicas específicas para reconhecer o analito.

O câncer é a doença que mais cresceu entre a população mundial e é também uma das que mais matam por falta do diagnóstico precoce. O diagnóstico requer uma série de exames que vão desde exames de imagem com equipamentos sofisticados a exames de sangue e biópsia. A desvantagem destes métodos é o alto custo, que dificulta o atendimento da população como um todo. Neste sentido, os imunossensores poderiam ser usados em amostras de sangue, tecidos e fluidos corporais, como uma ferramenta auxiliar, de fácil acesso e manipulação, para obtenção de um diagnóstico preciso e mais rápido.

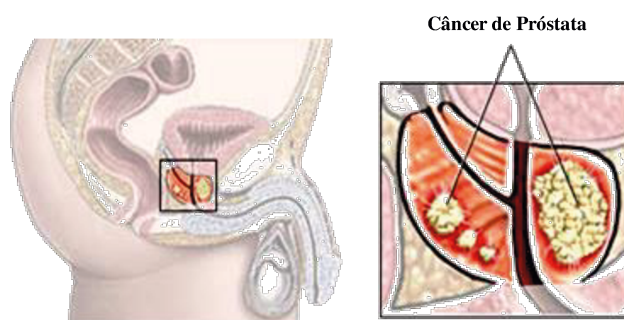
Existem várias técnicas que podem ser empregadas no desenvolvimento de imunossensores, tais como: monocamada automontada (do Inglês *self-assembled monolayer-SAM*), camada por camada (do Inglês *Layer-by-Layer – LbL*), Langmuir-Blodgett –LB.

Neste trabalho, foi utilizada a técnica LbL para imobilizar o anticorpo Anti-PSA que é específico à glicoproteína associada ao câncer de próstata (PSA). Vale ressaltar que a técnica LbL se destaca por sua simplicidade, versatilidade e por preservar a atividade biológica das biomoléculas após a imobilização na superfície sensora, um fator essencial para o bom funcionamento do dispositivo.

1.1 Câncer de próstata

A próstata é uma glândula situada abaixo da bexiga, em frente ao reto, e está ligada a uma porção da uretra masculina e sua função é produzir parte do sêmen e manter o esperma saudável ^[6,7]. A anomalia na próstata ocorre quando as suas células começam a se dividir de uma forma irregular originando uma massa de tecido ^[7], como ilustrado na Figura 1. Este tumor formado pode ser em muitos casos assintomático nas fases iniciais, o que dificulta o diagnóstico precoce e diminui as chances de cura do indivíduo.

Figura 1: Ilustração da localização da próstata e das células cancerosas.



Fonte 1: Disponível em: <<http://www.nucleuscatalog.com/conditions-indepth-prostate-cancer/view-item?ItemID=62748>>. Acessado em: 09 de Agosto de 2015.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer de próstata é a segunda neoplasia mais comum e é a sexta causa de morte entre a população mundial masculina. No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) são estimados 61.200 novos casos de câncer de próstata para o ano de 2016 ^[6]. Os principais fatores desencadeadores da doença

são: a idade avançada, uma vez que a doença acomete principalmente indivíduos a partir dos 65 anos de idade, a hereditariedade e a etnia ^[8,9].

Alguns exames são indicados para rastrear esse tipo de câncer, sendo eles, o toque retal e a dosagem sérica do antígeno prostático específico (PSA)^[10] e, no caso de alterações, recomenda-se ainda a ultrassonografia pélvica e a biópsia ^[11]. A dosagem sérica do PSA foi inicialmente empregada em 1986 ^[10] sendo este marcador tumoral uma glicoproteína da família das calicreínas glandulares, também conhecida como calicreína humana 3 (KLK3). Ao ser produzido por células epiteliais da próstata é secretado no líquido seminal em altas concentrações (0,5 a 3 mg.mL⁻¹) e no soro pode ser encontrado nas concentrações inferiores à 4 ng.mL⁻¹ ^[12]. Acima destes valores o indivíduo entra na zona de risco ^[10, 13, 14], pois a concentração do antígeno no organismo está diretamente relacionada com o aumento do volume da próstata. No entanto, além do câncer de próstata outras doenças, como prostatite e hiperplasia prostática benigna, podem alterar a concentração do PSA, e, portanto, devem ser considerados na interpretação dos resultados ^[10].

Atualmente o teste mais empregado na quantificação de marcadores de doença é o teste ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent*) ^[14, 15], contudo, este método é limitado devido a demora à realização do ensaio e o seu alto custo. Neste sentido, utilizar dispositivos capazes de medir a interação específica entre o antígeno e o anticorpo, como os imunossensores, são vantajosos por serem relativamente baratos, precisos, de resposta rápida, não invasivos e por não necessitarem de uma pessoa especializada para realizar as análises.

Em virtude destas vantagens e da necessidade de análises em tempo real tem crescido o desenvolvimento de imunossensores que utilizam nanoestruturas biológicas para a detecção de marcadores do câncer ^[15-17]. Uma das vantagens dessas nanoestruturas é que a adsorção das biomoléculas na superfície do sensor possibilita que propriedades, como especificidade e seletividade possam ser empregadas a estes dispositivos ^[18].

No que tange o desenvolvimento de imunossensores para detecção de PSA, muitos trabalhos já foram desenvolvidos [5, 19-21]. Dentre eles, pode-se citar o trabalho de Mao *et al.* [22], em que os autores construíram um imunossensor eletroquímico para a detecção do PSA, modificando a superfície do eletrodo de carbono vítreo com nanocompósito de folhas de grafeno, azul de metileno e quitosana, seguido da imobilização de anticorpo Anti-PSA. Mao *et al.* obtiveram resultados satisfatórios e o imunossensor apresentou resposta linear de 0,05 a 5,00 ng.mL⁻¹ de PSA e o limite de detecção foi de 13 pg.mL⁻¹. Arya *et al.* [23] funcionalizaram microeletrodos interdigitados de ouro com cisteamina por meio de monocamadas automontadas (SAM do inglês *self-assembled monolayer*) e ligaram covalentemente o anticorpo monoclonal Anti-PSA, para desenvolver um imunossensor que detecta o PSA a partir de impedância eletroquímica. Como resultados, o imunossensor detectou concentrações de PSA de 1,0 pg.mL⁻¹ a 100 ng.mL⁻¹ com sensibilidade de 0,444 g.mL⁻¹.

Como exemplo de imunossensor óptico para detecção de PSA, destaca-se o trabalho de Choi *et al.* [24], no qual os autores utilizaram anticorpo policlonal Anti-PSA conjugado com nanopartículas de ouro para aumentar o sinal de ressonância plasmônica de superfície (SPR do inglês *Surface Plasmon Resonance*). O sensor de ouro de SPR foi modificado com uma camada de proteína G a fim de ligar de forma orientada o anticorpo monoclonal Anti-PSA na superfície do sensor. A imunorreação que gera o sinal de SPR ocorreu com a ligação do antígeno PSA ao anticorpo monoclonal adsorvido na superfície do sensor, seguido da ligação do anticorpo policlonal Anti-PSA conjugado à nanopartícula. A variação do ângulo SPR com a concentração de PSA apresentou uma correlação linear de 300 fmol.L⁻¹ a 3 nmol.L⁻¹ com limite de detecção de 300 fmol.L⁻¹.

Tendo em vista a importância e a necessidade do diagnóstico precoce do câncer de próstata, o presente trabalho busca unir a especificidade e seletividade de biomoléculas, como os anticorpos, com a técnica camada por camada, do inglês *Layer-by-Layer* (LbL) para a

fabricação de filmes nanoestruturados de anticorpo Anti-PSA na ausência e na presença de lipossomos, além de suas caracterizações, visando o desenvolvimento de um imunossensor capaz de detectar o antígeno prostático específico (PSA). Neste trabalho, destaca-se a utilização da técnica LbL por ser uma técnica relativamente barata, de fácil manipulação e que permite o controle das condições da solução (pH, temperatura e força iônica da solução) durante o processo de imobilização do anticorpo Anti-PSA na superfície de um substrato sólido, permitindo a manutenção de água ou tampão entre as camadas e evitando a perda da atividade biológica. Além disso, a incorporação do anticorpo em lipossomos pode ajudar a preservar a sua estrutura secundária, que é essencial para o reconhecimento molecular.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Fabricar e caracterizar filmes nanoestruturados camada por camada (LbL), compostos de anticorpo Anti-PSA, na presença e na ausência de lipossomos, para detecção do antígeno prostático específico (PSA) por métodos eletroquímicos e óptico.

1.2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a solução de anticorpo Anti-PSA, na presença e ausência de fosfolipídios, por espectroscopia UV-vis;
- Analisar a conformação estrutural do anticorpo Anti-PSA livre em solução e incorporado em lipossomos de DPPG por Dicroísmo Circular;
- Fabricar filmes nanoestruturados de anticorpo Anti-PSA livre e em lipossomos, alternados com diferentes polications PEI poli(etilenoimina) ou (PAH) poli(alilamina hidroclorada) pela técnica LbL ;

- Verificar por FTIR a deposição e a interação entre os materiais no filme LbL;
- Caracterizar o crescimento dos filmes por espectroscopia UV-vis e Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR);
- Acompanhar a deposição dos biomateriais sobre o eletrodo de CrAu e verificar a interação do antígeno PSA com o anticorpo Anti-PSA imobilizados na superfície do eletrodo por Voltametria Cíclica (VC) e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS);
- Determinar a espessura das multicamadas de filmes depositadas sobre o substrato, bem como verificar a interação PSA/Anti-PSA por SPR.

CAPÍTULO 2

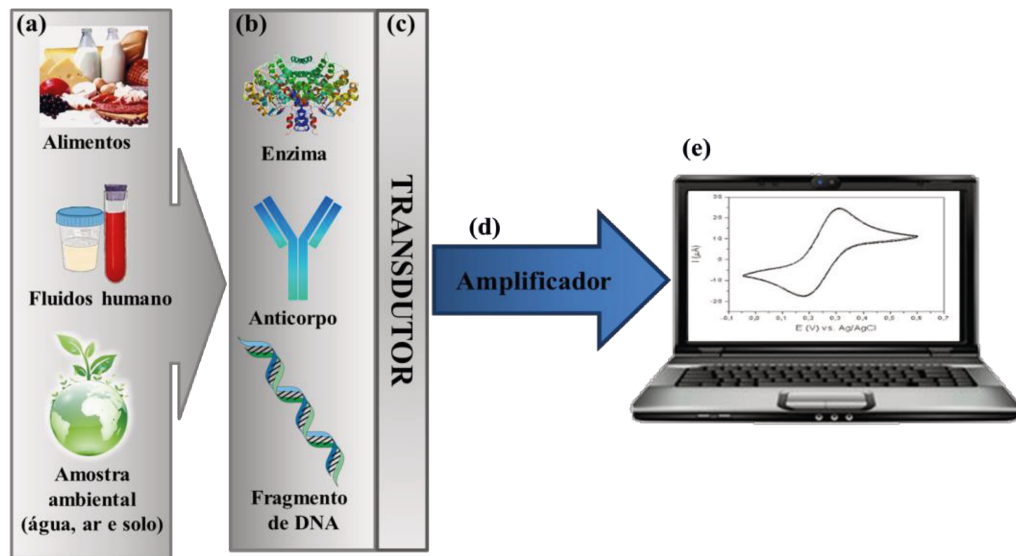
Neste capítulo serão apresentados os aspectos teóricos e uma breve revisão da literatura sobre biossensor, anticorpo e antígeno, membrana e lipossomos, a técnica de fabricação de filmes camada por camada (do Inglês *Layer-by-Layer* - LbL) e as técnicas de caracterização de filmes nanoestruturados.

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 Biossensor

Os biossensores são dispositivos analíticos, constituídos basicamente por dois componentes: um elemento biorreceptor e um transdutor físico. O elemento biorreceptor é a biomolécula capaz de reconhecer e se ligar especificamente a um determinado analito, já o transdutor converte o evento de reconhecimento em um sinal analiticamente mensurável ^[18, 25], como representado na Figura 2.

Figura 2: Representação dos componentes de um biossensor, (a) amostras de analitos, (b) elementos biorreceptores, (c) transdutor, (d) amplificador e (e) sistema eletrônico.

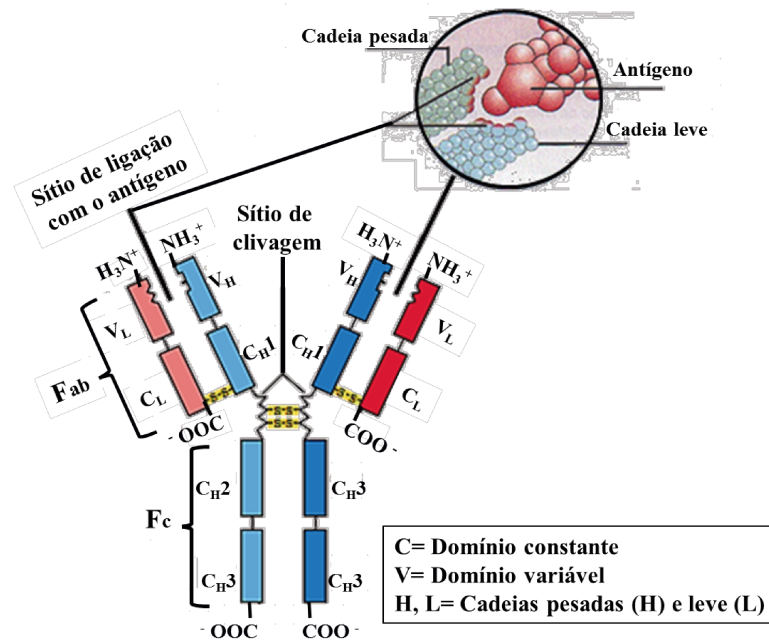


Fonte 2: Figura adaptada de Graça *et al.* [18].

O imunossensor é uma classe de biossensores que se baseiam na interação específica entre um antígeno e um anticorpo. A detecção do antígeno (analito) resulta da sua complementariedade química com o sítio de ligação do anticorpo adsorvido no transdutor [26], através de forças secundárias e da localização de grupos carregados e ligações de hidrogênio [27, 28].

Os anticorpos são constituintes fundamentais dos imunossensores e são responsáveis pela seletividade e especificidade dos dispositivos. Essas biomoléculas pertencem à classe das glicoproteínas, também denominadas imunoglobulinas (Ig) e são produzidas pelo sistema imunológico quando há exposição a agentes estranhos [27]. A estrutura do anticorpo tem formato de Y, Figura 3, e é constituída por duas porções, uma contendo um grupo amino terminal, F_{ab} (do inglês *Antigen-Binding*), responsável pela interação com o sítio de ligação do antígeno e uma porção F_c (fragmento cristalizável), que não interage com o antígeno [27, 28].

Figura 3: Ilustração das principais porções de um anticorpo e sua região de ligação com o antígeno.

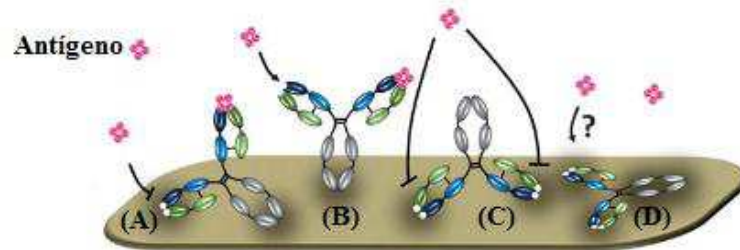


Fonte 3: Figura adaptada de [24, 29].

Alguns fatores, como a temperatura, pH, força iônica, concentração do antígeno e anticorpo e duração da incubação podem afetar a interação antígeno/anticorpo em solução [6]. Quando imobilizados na superfície do transdutor, além desses fatores, outros como a conformação estrutural e orientação adequada das biomoléculas devem ser consideradas para garantir um bom desempenho do imunossensor [18]. Segundo Trilling *et al.* [31] existem quatro possibilidades de orientação do anticorpo, sendo elas: (i) o anticorpo se ligar ao transdutor por meio da região F_c (B da Figura 4); (ii) se ligar pela região do sítio de ligação F_{ab} (C da Figura 4); (iii) se ligar lateralmente através das regiões F_{ab} e F_c (A da Figura 4); (iv) se ligar através dos dois fragmentos F_{ab} e do fragmento F_c na superfície do transdutor (D da Figura 4). Dentre as possíveis orientações, a mais adequada para o anticorpo é a primeira (i), pois mantém livre a região do sítio de ligação (F_{ab}) para interagir e se ligar ao antígeno [31]. Neste sentido, algumas estratégias podem ser empregadas para garantir a orientação do anticorpo, como a utilização das proteínas A e G que apresentam afinidade a região F_c do anticorpo [31] ou ainda,

ser ligado covalentemente através da ativação da superfície do transdutor com a mistura de NHS-EDC (N-hydroxysuccinimide/1-ethyl-3-(3-methylaminopropyl)-carbodiimide) ^[32].

Figura 4: Possíveis orientações do anticorpo: em (A) ligação através das regiões Fab e Fc com um sítio de ligação F_{ab} disponível, (B) ligação da região F_c, (C) ligação da região F_{ab} e (D) regiões Fab e F_c sem disponibilidade de sítios de ligação com o antígeno.



Fonte 4: Figura adaptada de Trilling *et. al.* ^[31].

Outras estratégias que podem contribuir para o bom funcionamento do imunossensor são: (i) a incorporação do anticorpo em lipossomos, pois estes ajudam na preservação da estrutura da biomolécula, e (ii) o uso de técnicas de adsorção que não comprometem a atividade das biomoléculas ^[3, 33, 34], como a técnica camada por camada LbL e LB.

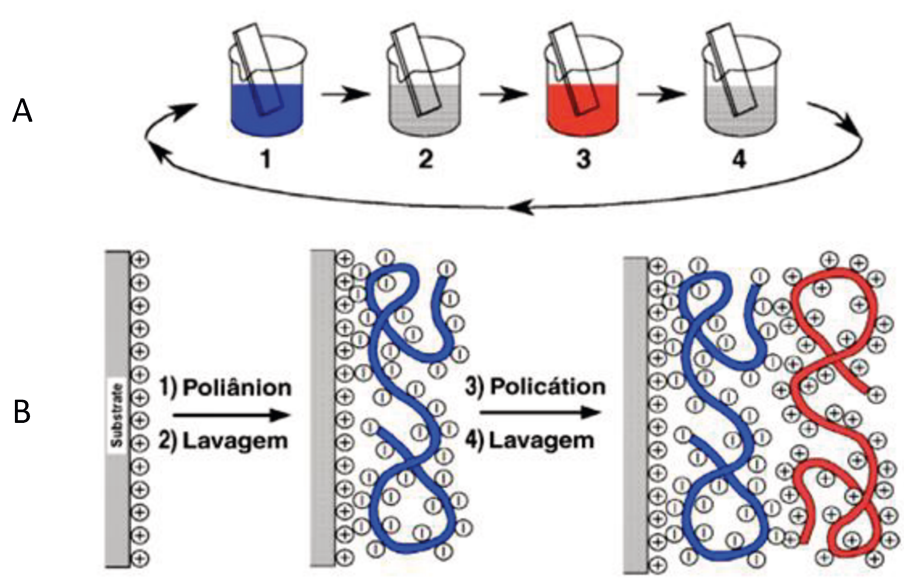
2.2 Filmes camada por camada ou *Layer-by-Layer* (LbL)

Desenvolvido por Decher e colaboradores na década de 90, a técnica se tornou um dos principais métodos para a fabricação de filmes nanoestruturados. Inicialmente se baseava na adsorção sequencial de policátions e poliânions, atualmente tem empregado uma grande variedade de espécies carregadas que vão desde espécies biológicas a espécies orgânicas e inorgânicas ^[35-39].

A fabricação das multicamadas com a técnica LbL pode ser feita manualmente e é relativamente simples, a qual requer apenas a utilização de béqueres contendo as soluções de policátion e poliânion, preferencialmente solúveis em água ^[40]. A deposição dos materiais pode ser resumida da seguinte maneira: 1) imersão do substrato na solução do poliânion, 2)

lavagem em água ultrapura e secagem (a lavagem é realizada para remover o excesso de material que não adsorveu e evitar a contaminação da solução seguinte) ^[41], 3) imersão na solução de polycation, 4) lavagem em água ultrapura e secagem. O processo pode ser repetido de acordo com a espessura e arquitetura desejada. A Figura 5 (A) ilustra o processo de deposição das multicamadas. Neste exemplo, o crescimento do filme é regido por forças coulômbicas entre o polycation e poliânion, contudo, a construção dos filmes nanoestruturados não se restringe apenas às interações eletrostáticas, a sua formação também pode ocorrer por meio de interações secundárias, tais como: ligações de hidrogênio e forças de van der Waals [41, 42].

Figura 5: (A) Representação esquemática do processo de deposição do filme LbL sobre um substrato sólido. (B) Ilustração idealizada do filme LbL de polieletrólitos, sendo as etapas 1 e 3 a representação da adsorção do poliânion e do polycation, respectivamente, e as etapas 2 e 4 os procedimentos de lavagem.



Fonte 5: Figura adaptada de Decher, G. ^[40].

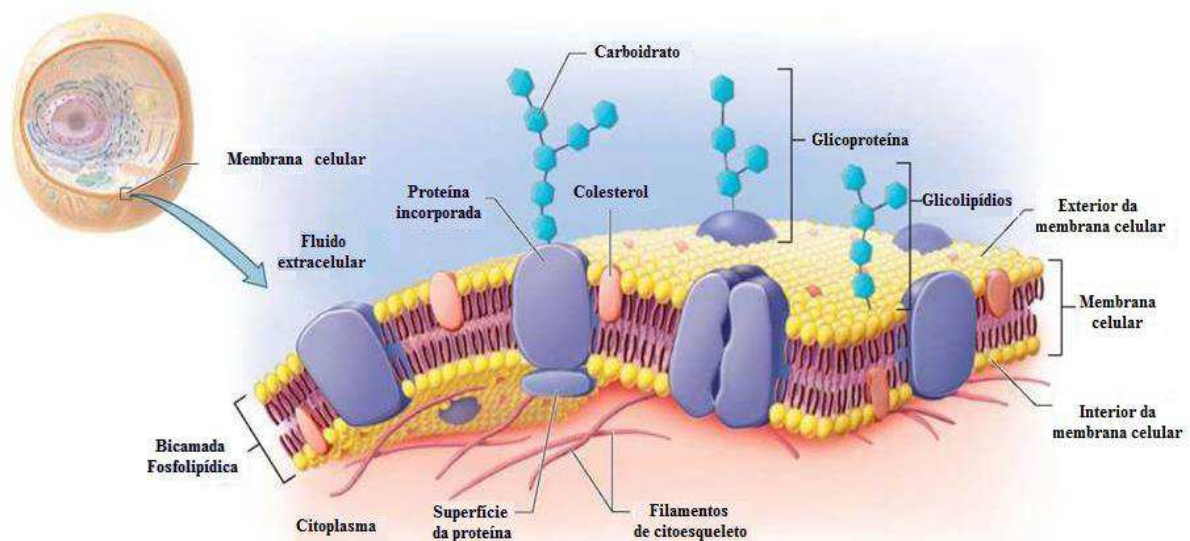
Além de ser relativamente barata, a técnica permite a combinação sinérgica entre materiais distintos e o controle da rugosidade, porosidade e espessura das multicamadas formadas, que podem variar de 5 a 100 Å, dependendo das condições de adsorção (pH, força iônica e concentração) e da massa molar dos materiais utilizados ^[43, 44]. Outra vantagem está

na sua utilização para desenvolver nanoestruturas biológicas, pois o processo de fabricação pode ser feito em condições brandas, com controle de pH, temperatura e força iônica, evitando a perda da atividade biológica de enzimas, antígenos e anticorpos, entre outros [43, 45].

2.3 Modelos de membrana biológica e lipossomos

As membranas biológicas são constituídas por uma bicamada lipídica fina que protege o interior da célula e serve como uma barreira para o transporte de algumas moléculas. O primeiro modelo de estrutura de membrana foi proposta por Singer e Nicolson, em 1972, denominado "mosaico fluido". Os principais constituintes de uma membrana biológica são: fosfolipídios, esfingolipídios e colesterol; tais constituintes não estão ligados covalentemente entre si e permitem que a membrana seja flexível [46]. Como se pode observar na Figura 6, algumas proteínas, glicoproteínas e glicolipídios podem se inserir de forma covalente ou por meio de interações intermoleculares à bicamada lipídica, garantindo a sua funcionalização [46].

Figura 6: Representação do modelo da membrana celular.

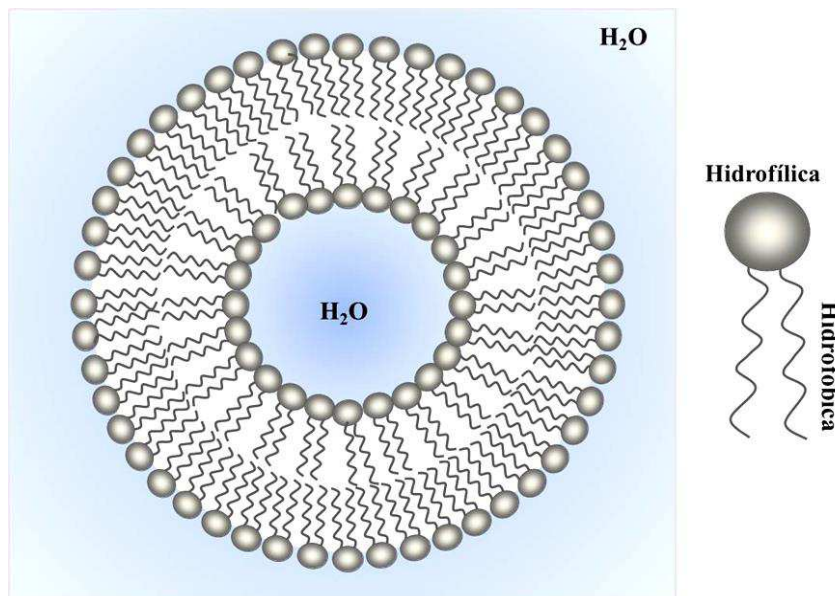


Fonte 6: Disponível em : <<http://schoolbag.info/biology/humans/4.html>>. Acessado em: 11 de Agosto de 2015.

A membrana celular é um sistema complexo e, por isto, é amplamente estudada em termos de suas propriedades físico-químicas e funcionais. Para tais estudos são desenvolvidos modelos simplificados de membranas que mimetizam a membrana celular e, dentre estes, se encontram os lipossomos ^[47].

Os lipossomos foram descobertos pela primeira vez por Alec Bangham e colaboradores, em 1964 ^[48], ao estudarem a difusão de íons através de uma membrana lipídica artificial. Tais estruturas são formadas a partir de agregados de fosfolipídios, que são moléculas com caráter anfifílico, ou seja, possuem uma região hidrofílica que pode ter cargas positivas, negativas ou possuir as duas cargas em diferentes localizações e, neste caso, o fosfolipídio é denominado zwitteriônico, e outra região hidrofóbica composta de uma cadeia de ácido graxo ^[49]. Quando estas moléculas são dispersas em solução aquosa e é fornecida energia e agitação, elas se organizam formando vesículas aquosas compostas de uma ou mais bicamadas lipídicas, como ilustrado na Figura 7.

Figura 7: Representação da estrutura do fosfolipídio e do lipossomo.



Fonte 7: Elaborada pelo autor.

Os lipossomos podem ser classificados em termos do seu tamanho e número de bicamadas, sendo estes parâmetros controláveis e dependentes do método de preparação, podendo ser: (i) vesículas multilamelares grandes (MLV, do inglês *Multilamellar Large Vesicles*), que são facilmente obtidas com a hidratação dos fosfolipídios, possuem várias bicamadas e podem variar entre 400 e 3500 nm, (ii) vesículas unilamelares grandes (LUV do inglês *Large Unilamellar Vesicles*), que apresentam uma única bicamada e seu diâmetro é superior a 100 nm e (iii) as vesículas unilamelares pequenas (SUV do inglês *Small Unilamellar Vesicles*) com diâmetro entre 20 e 50 nm ^[50, 51].

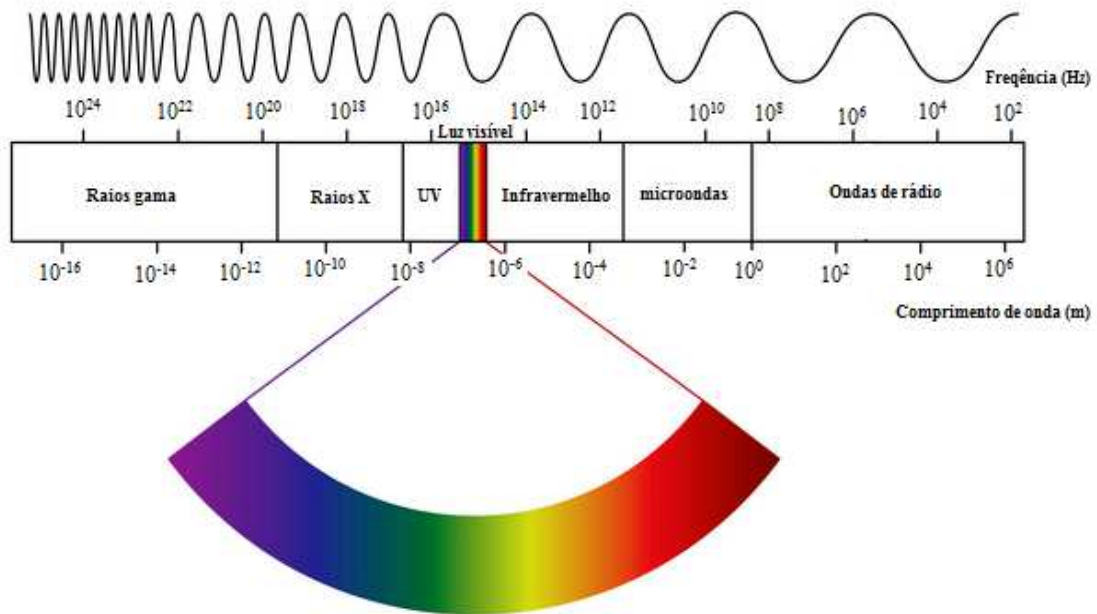
Além de estudos como modelo biomimético de membrana, os lipossomos têm sido utilizados em aplicações diversas, como transporte e liberação de fármacos, cosméticos, estabilizante de fertilizantes, entre outros ^[52-55]. A imobilização de lipossomos em superfícies sólidas também está sendo empregada na liberação de fármacos ^[52] e para estabilização de biomoléculas em biossensores ^[56, 57]. Neste último, a estabilização ajuda a manter a atividade biológica e, conseqüentemente, melhorar a seletividade e sensibilidade dos dispositivos.

2.4 Métodos espectroscópicos

2.4.1 Espectroscopia

A espectroscopia estuda as interações entre os diversos tipos de radiação e a matéria. O espectro de radiação eletromagnética abrange uma faixa de comprimentos de onda e frequências que vão desde ondas de rádio a raios gama ^[58], como ilustrado na Figura 8, e é muito empregado em técnicas de espectroscopia para caracterizar materiais a partir da interação da radiação com moléculas de interesse. Como um exemplo de aplicação, a radiação pode ser usada para monitorar a deposição de biomoléculas (enzimas, DNA, anticorpos, entre outros) em um substrato sólido ^[56, 59].

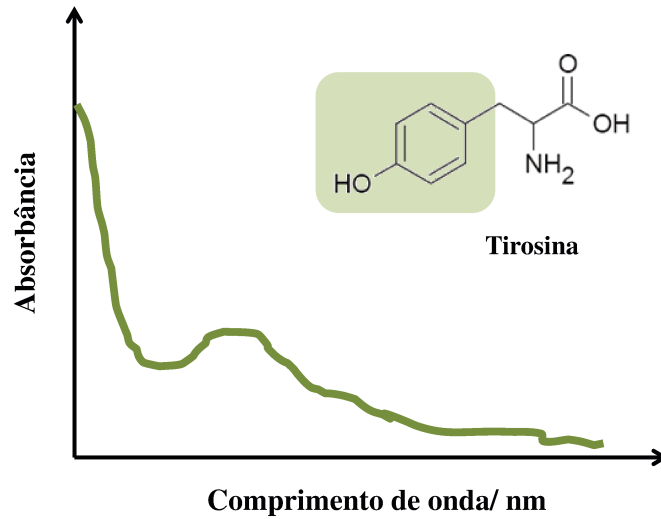
Figura 8: Representação das regiões do espectro eletromagnético.



Fonte 8: Disponível em: <<http://italpro.com.br/eletroimas-blog/entendendo-a-radiacao-eletromagnetica-parte-8>>. Acesso em 07 de Agosto de 2015.

Um dos fenômenos de interação da radiação com a matéria é a absorção, um processo pelo qual a energia da radiação eletromagnética é transferida para os átomos, íons e moléculas. Esta transferência faz com que as partículas sejam promovidas de um estado de energia mais baixo (estado fundamental) para um estado mais energético (estado excitado) [58]. De acordo com a teoria quântica, a absorção de radiação só ocorre quando a energia de um fóton incidente na amostra é equivalente à diferença de energia entre o estado fundamental e um dos estados excitados das espécies absorventes. Como essas diferenças são únicas de cada espécie, podem ser usadas para caracterizar constituintes de uma amostra, através das bandas de absorção que são geradas. Estas bandas são representadas em gráficos que relacionam a absorvância com comprimento de onda ou frequência absorvida, como ilustrado na Figura 9.

Figura 9: Representação da banda de absorção da molécula de tirosina.



Fonte 9: Elaborada pelo autor.

A energia E associada às bandas características de uma molécula é constituída pela soma das energias eletrônica ($E_{\text{eletrônica}}$), vibracional ($E_{\text{vibracional}}$) e rotacional ($E_{\text{rotacional}}$), conforme a Equação (3) ^[58].

$$E = E_{\text{eletrônica}} + E_{\text{vibracional}} + E_{\text{rotacional}}$$

Equação (1)

Em que, $E_{\text{eletrônica}}$ é a energia relacionada aos estados energéticos dos elétrons ligados da molécula, $E_{\text{vibracional}}$ é a energia associada ao número de vibrações interatômicas e $E_{\text{rotacional}}$ é a energia dos movimentos rotacionais da molécula ^[58].

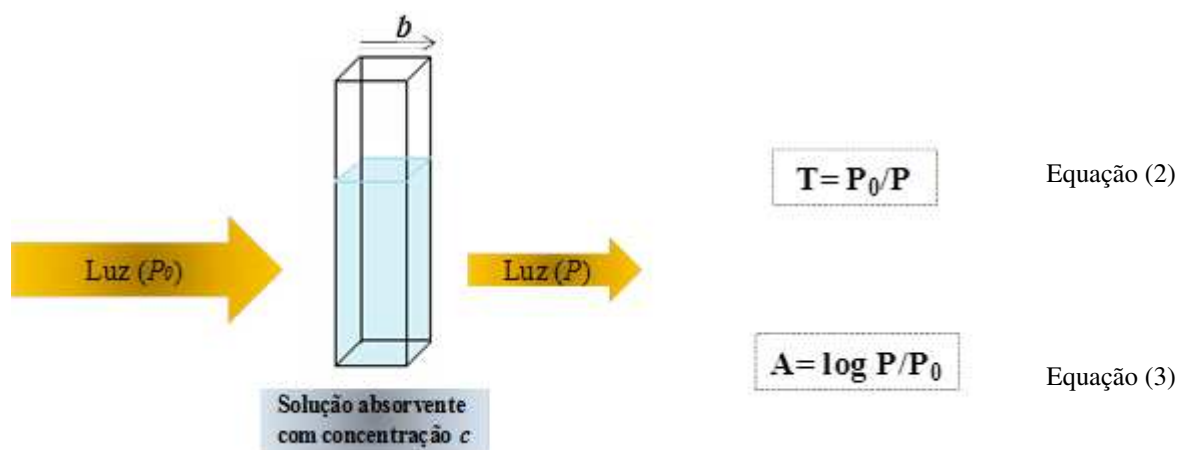
Para que ocorra uma transição eletrônica é necessário que o material seja irradiado com fótons mais energéticos, sendo geralmente empregadas radiações na região ultravioleta e visível. A seguir será apresentada a técnica de espectroscopia de absorção no ultravioleta e no visível.

2.4.2 Espectroscopia de absorção UV-vis

A espectroscopia de absorção UV-vis abrange comprimentos de ondas tanto da região do visível quanto da radiação ultravioleta (190 a 780 nm) do espectro eletromagnético ^[58]. O método de espectroscopia nesta região é amplamente utilizado para determinação quantitativa de moléculas orgânicas e inorgânicas em solução. Isto é possível porque quando a molécula absorve radiação no UV-vis ocorre uma transição eletrônica envolvendo os elétrons que participam da ligação entre os átomos (π e σ) e os elétrons que não participam da formação da ligação (n). Portanto, é necessário que a molécula contenha grupos cromóforos, grupos insaturados, como por exemplo C=C, responsáveis principalmente pelas transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ ^[58].

A absorção molecular (A) obedece a Lei de Beer, em que estão envolvidos conceitos de transmitância (T) ou caminho óptico (b) e a concentração da substância que será analisada (c). Assim, quando um feixe de luz monocromático com intensidade P_0 incide em uma cubeta com espessura b contendo a solução com concentração c , uma parte deste feixe é absorvido pelas moléculas presente na solução e a outra parte (P) atravessa a solução. A relação entre a intensidade de luz não absorvida com a intensidade absorvida (P/P_0) é a transmitância T e o logaritmo do inverso da transmitância é a absorbância (A), como esquematizado na Figura 10.

Figura 10: Representação esquemática dos componentes principais da lei de Beer.



Fonte 10: Figura adaptada de Skoog, Holler e Nieman ^[58].

De acordo com a lei de Beer (*Equação 4*) a absorvância (A) é proporcional à concentração (c) das moléculas absorventes.

$$A = \epsilon bc$$

Equação (4)

Em que ϵ é a absorvidade molar, b é o caminho percorrido pela radiação e c é a concentração da espécie absorvente.

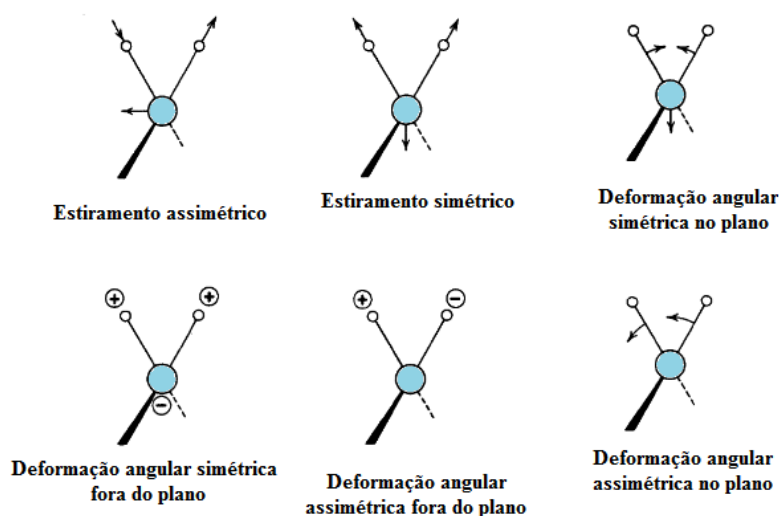
Portanto, é possível empregar a espectroscopia UV-vis para caracterizar não somente soluções, mas também verificar a adsorção de moléculas e biomoléculas em um substrato sólido, neste sentido, o método poder ser utilizado na caracterização de filmes nanoestruturados de materiais diversos.

2.4.3 Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia FTIR estuda a interação da matéria com a radiação na região do infravermelho e é uma ferramenta muito utilizada na caracterização de materiais que compõem, por exemplo, filmes. A técnica permite a identificação de grupos funcionais, a obtenção informações sobre os mecanismos de interações entre os materiais depositados e a organização molecular ^[60].

Quando uma amostra é exposta a uma radiação na região do infravermelho que pode ser absorvida, há a variação do momento de dipolo das moléculas e conseqüentemente surge um movimento de vibração ou rotação em torno das suas ligações ^[58]. Para as ligações moleculares seis modos de vibração são possíveis: estiramento simétrico, estiramento assimétrica, deformação angular simétrica no plano, deformação angular simétrica fora do plano, deformação angular assimétrica fora do plano, deformação angular assimétrica ao plano ^[58]. A Figura 11 ilustra os modos vibracionais.

Figura 11: Representação dos modos vibracionais de uma molécula. Os sinais + e – indicam os movimentos perpendiculares ao plano da página.



Fonte 11: Adaptada de Skoog, Holler e Nieman ^[58].

Dentre os instrumentos que são usados para espectroscopia no infravermelho, destaca-se o com transformada de Fourier. Neste, é empregado um processo matemático desenvolvido por Fourier que converte o interferograma (soma das amplitudes e frequências que chegam ao interferômetro) em um espectro que relaciona as intensidades com as respectivas frequências, facilitando a análise da amostra estudada ^[58].

A espectroscopia FTIR vem sendo usada na caracterização de filmes nanoestruturados para identificar os materiais constituintes do filme, bem como obter informações sobre as interações entre os materiais e a organização molecular ^[61, 62, 63, 64].

2.4.4 Dicroísmo Circular

O método de Dicroísmo Circular (CD do inglês *Circular Dichroism*) é um método de espectroscopia que se baseia na diferença de absorção entre a luz polarizada circularmente à direita (R) e a luz polarizada circularmente à esquerda (L) ^[65], como mostra a *Equação 5*.

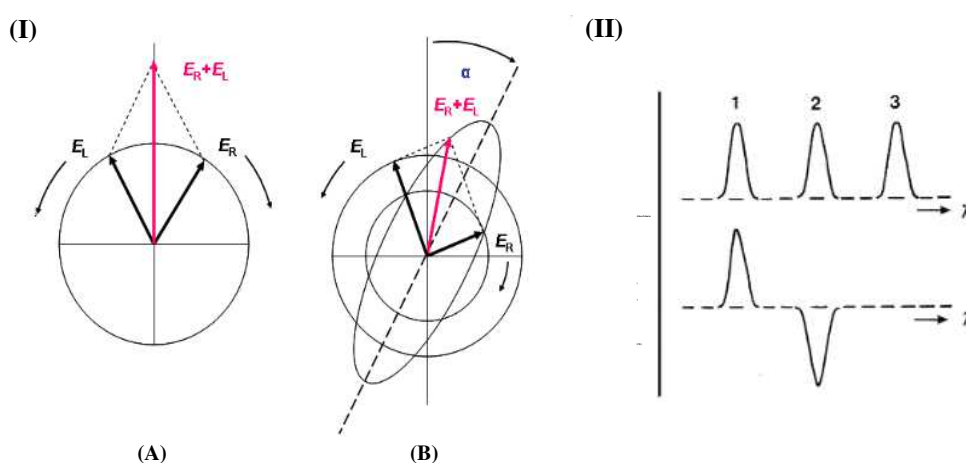
$$CD = A_R - A_L$$

Equação (5)

Em que A_R é a absorção da luz polarizada à direita e A_L a absorção da luz polarizada à esquerda.

A Figura 12 traz a representação das duas componentes circulares da luz polarizada à direita e à esquerda, bem como a resultante da interação entre as duas (I) e em (II) está a representação do sinal de CD que é gerado com a absorção da luz.

Figura 12: Em (I) (A) as componentes de luz polarizada circularmente à direita (R) e à esquerda (L) com mesma magnitude resultando na luz polarizada no plano, em (B) as componentes com diferentes magnitudes e a resultando na polarização elíptica. Em (II) sinal de CD gerado com a absorção da luz.



Fonte 12: Disponível em: < <http://qf.ff.up.pt/fa/pdf/fa-t12.pdf>>. Acessado em 08 de agosto de 2015.

A absorção da luz circular polarizada só ocorre em amostras que apresentam cromóforos com centros quirais e o sinal gerado desta absorção são bandas espectrais que caracterizam a estrutura de uma molécula. Devido a isto, o método de CD tem sido muito utilizado em estudos de estrutura de proteínas, anticorpos e peptídeos em solução [46, 66, 67] e em filmes nanoestruturados aplicados em biossensores [34, 56, 57]. Neste último caso, o método é empregado para verificar se a conformação estrutural das biomoléculas é preservada após a imobilização na superfície de um substrato.

Para as proteínas, os cromóforos de interesse são as ligações peptídicas, as cadeias laterais aromáticas dos aminoácidos e as ligações dissulfetos, pois absorvem luz em valores de comprimentos de onda específicos e geram bandas específicas no espectro de CD. A

absorção correspondente às ligações peptídicas geram bandas na região UV entre 240 a 180 nm e indicam a presença de estruturas secundárias, como mostra a Tabela 1. Já as bandas entre 320 a 260 nm indicam a presença de estruturas terciárias, e estão relacionadas à absorção da luz pelas cadeias laterais aromáticas dos aminoácidos ^[56].

Tabela 1: Estruturas secundárias e os respectivos comprimentos de onda nos espectros de CD. Dados obtidos de Greenfield, N. ^[66].

Estrutura secundária	Comprimento de onda (nm)
α-Hélice	222 e 208
Folha-β	218
Folha-β antiparalela	260

2.4.5 Ressonância Plasmônica de Superfície

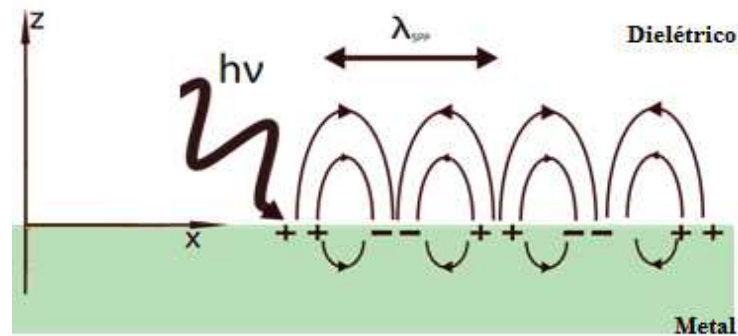
A técnica de Ressonância Plasmônica de Superfície, do inglês *Surface Plasmon Resonance* (SPR), se desenvolveu graças aos estudos dos plásmons de superfície realizadas por Wood, no século XX, e por Otto e Kretschmann, no final dos anos 60. Desde então, a técnica vem sendo utilizada em estudos de interfaces mediante o monitoramento do índice de refração e tem sido aplicada para determinar cinética de associação e dissociação, constantes de interações específicas, bem como, alterações conformacionais de biomoléculas ^[68].

Por ser uma técnica muito sensível tem despertado grande interesse por aplicações como biossensores e apresenta vantagens por possibilitar análises em tempo real sem a necessidade de marcadores moleculares ^[69]. A seguir serão descritos os princípios básicos da SPR.

2.4.5.1 Aspectos teóricos da SPR

De acordo com Damos et. al, o Plásmom de Superfície (PS) é uma onda eletromagnética que se propaga na interface entre um metal e um dielétrico ^[68], como por exemplo, metal/ar. A sua formação ocorre quando a energia da luz p-polarizada provoca uma oscilação na densidade de elétrons livres presentes em um filme metálico, como mostra a Figura 13. O filme metálico mais comum é o de ouro, mas outros metais como a prata, o cobre e o alumínio podem ser usados ^[70].

Figura 13: Representação esquemática da oscilação da densidade de elétrons livres presentes em um filme metálico.



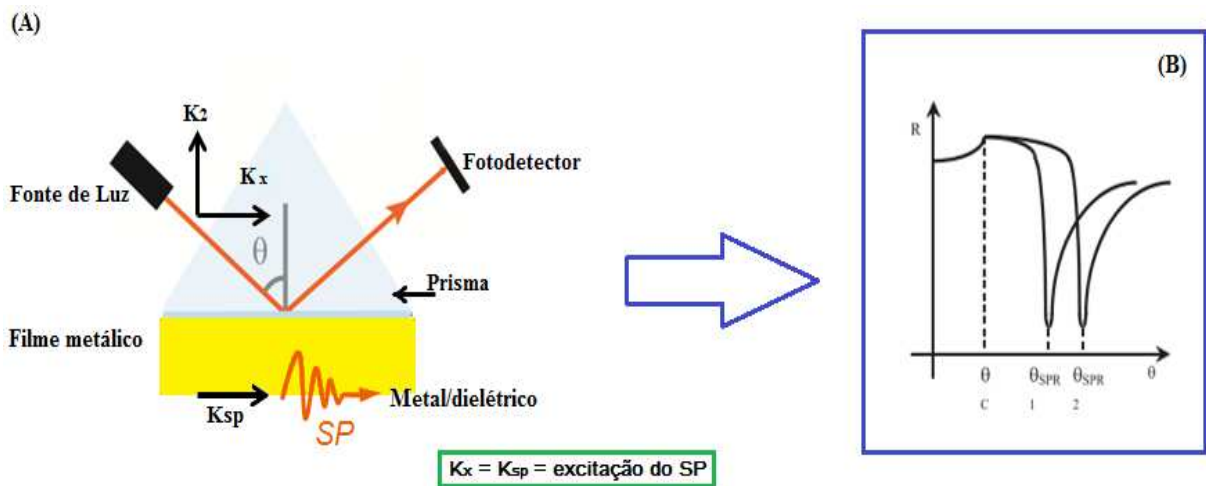
Fonte 13: Adaptada de ^[71]. Disponível em: < <http://web.iitd.aitadac.in/~kkshah/plasmonics.html> > Acesso: 12 de fevereiro de 2016.

A condição de ressonância do PS origina o fenômeno denominado ressonância plasmônica de superfície e está associada à geração de uma onda eletromagnética evanescente na superfície de um filme metálico, que ocorre quando esta superfície é excitada por um feixe de luz incidente com comprimento de onda apropriado e em um ângulo bem definido ^[72].

Para alcançar a condição de ressonância dos plásmos foram criados diferentes sistemas ópticos ^[68] e a configuração mais utilizada em instrumentos de SPR é a de *Kretschmann* que se baseia na reflexão total atenuada ^[72]. Nesta, a luz passa através do prisma de alto índice de refração e é totalmente refletida na base do prisma ^[73] e, ao atingir o filme metálico em um determinado ângulo de incidência θ , a energia radiante é transferida para os elétrons livres do

filme metálico e uma parte da luz é transferida para os plásmons de superfície que se propagam na superfície do filme, resultando em um mínimo de reflectância em um determinado ângulo de ressonância (θ_{SPR})^[74], como ilustrado na Figura 14.

Figura 14: Em (A) Representação do sistema de prisma acoplado para análise por SPR, onde K_x é o vetor de onda relacionado com o ângulo de incidência e K_{sp} é a constante de propagação de PS, e em (B) varredura angular do sensor SPR mostrando o ângulo mínimo de reflexão θ_{SPR-1} e com a adsorção de uma nova camada θ_{SPR-2} .



Fonte 14: Figura adaptada de ^[75].

O ângulo de ressonância é dependente das constantes dielétricas do metal, do prisma e do meio. Devido a esta dependência, qualquer modificação na superfície do sensor, causará mudanças no seu índice de refração, e conseqüentemente será necessária uma mudança no ângulo de incidência da radiação para que ocorra a condição de ressonância plasmônica de superfície. Portanto, é possível aplicar o fenômeno de SPR para monitorar alterações na superfície de um sensor.

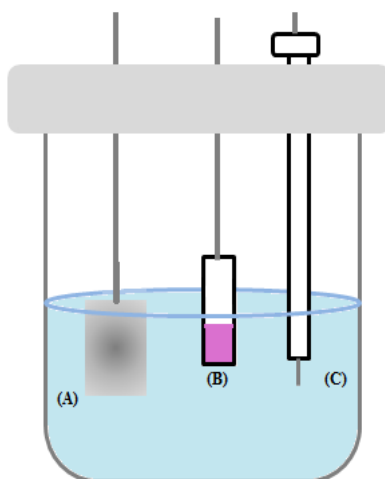
2.5 Métodos eletroquímicos

2.5.1 Voltametria Cíclica (VC)

A técnica de voltametria cíclica é uma técnica eletroquímica muito utilizada para análises qualitativas e quantitativas de determinadas espécies estudadas. As informações são

obtidas com o auxílio de uma célula eletroquímica contendo eletrodos imersos em uma solução suporte acoplados a um equipamento denominado potenciostato, como mostra a Figura 15. Tais eletrodos consistem em: (i) eletrodo de trabalho, (ii) eletrodo de referência, o qual pode ser de calomelano saturado (ECS), prata/cloreto de prata, entre outros, e (iii) contra eletrodo ^[76, 77].

Figura 15: Representação de uma célula eletroquímica com três eletrodos, sendo (A) contra eletrodo, (B) eletrodo de trabalho, (C) eletrodo de referência.

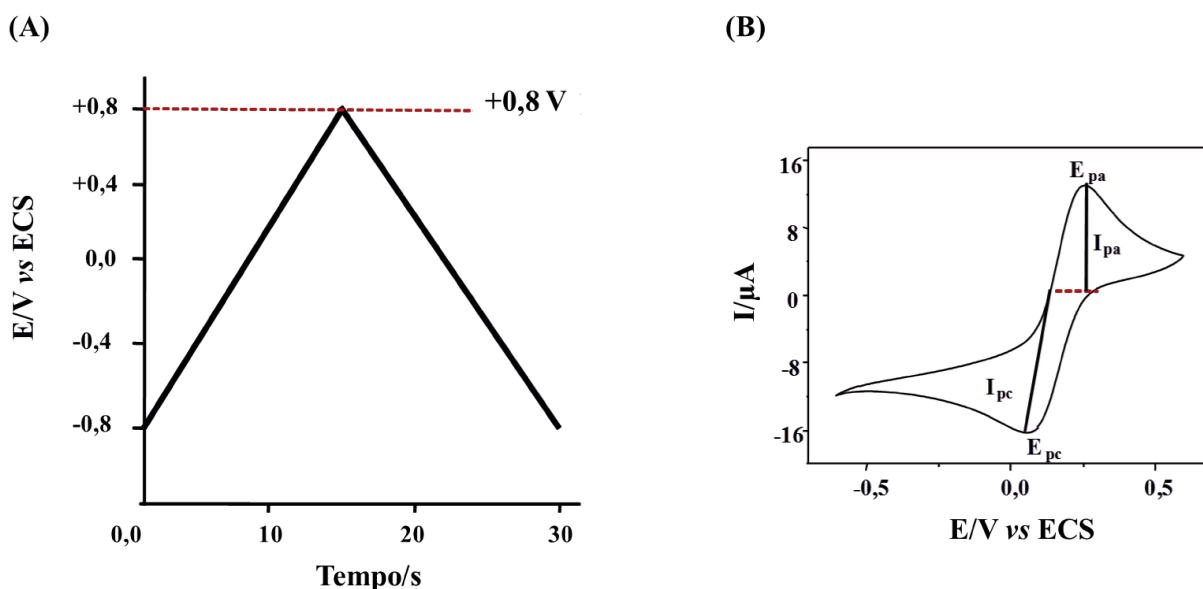


Fonte 15: Elaborada pelo autor.

Para obter informações sobre as espécies eletroativas presentes na solução é aplicada uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência e então, o sinal de resposta é a corrente que surge entre o eletrodo de trabalho e o contra eletrodo ^[77]. O potencial aplicado é varrido linearmente com o tempo no eletrodo de trabalho, como representado na Figura 16 (A). Neste caso, inicialmente é aplicada uma rampa de potencial linear, por exemplo, de $-0,8\text{V}$ a $+0,8\text{ V}$, posteriormente, ocorre a inversão na direção da varredura iniciando em $+0,8\text{ V}$ a $-0,8\text{ V}$ originando um ciclo, que pode ser repetido várias vezes. O sinal é registrado em um gráfico denominado voltamograma, como mostrado na Figura 16 (B), que relaciona a corrente gerada com o potencial aplicado, sendo possível

identificar os potenciais de oxidação e redução de espécies que sofrem reações redox, bem como, relacionar a intensidade da corrente com a concentração destas espécies ^[76].

Figura 16: Em (A) sinal de excitação empregado em voltametria cíclica e em (B) voltamograma que representa a variação de corrente com o potencial aplicado.



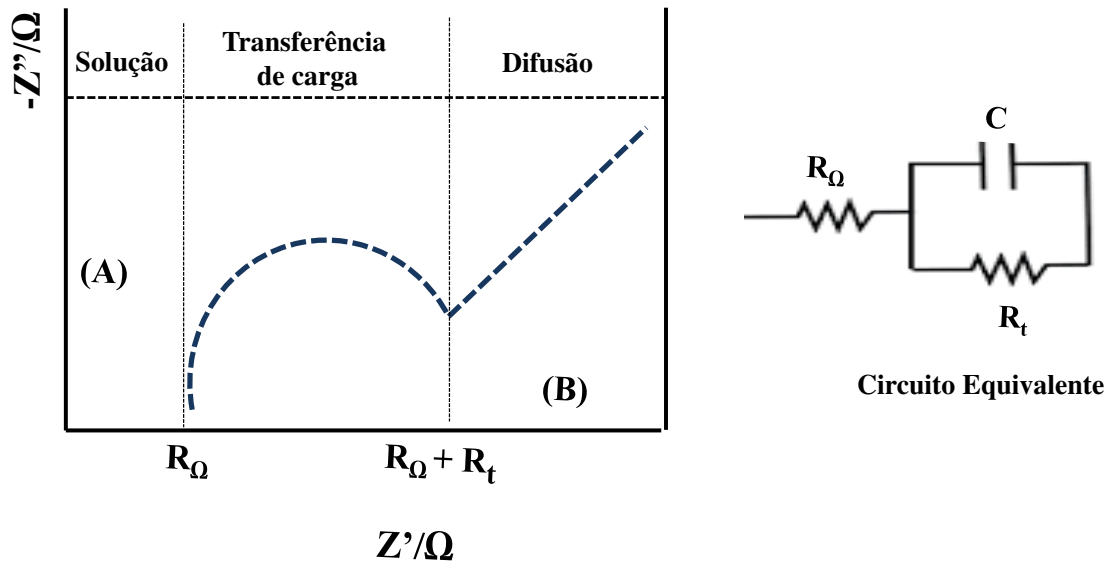
Fonte 16: Figura adaptada de Skoog, Holler e Nieman ^[76].

2.5.2 Espectroscopia de Impedância eletroquímica (EIE)

A técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (do Inglês *electrochemical impedance spectroscopy*- EIS) fornece os valores de impedância (Z) de um sistema através da aplicação de um estímulo elétrico ^[78]. No procedimento padrão, o sistema é estimulado com um potencial alternado do tipo senoidal e é medida a parte real (Z') e a parte imaginária (Z'') da impedância complexa em função da frequência ^[79, 24]. O resultado dessas medidas é representado em um gráfico denominado espectro de impedância, que também é chamado de diagrama de Nyquist, ilustrado na Figura 17. Para análise dos resultados são utilizados modelos matemáticos e modelos de circuitos elétricos, e a partir dos espectros de impedância,

é possível obter informações de processos que ocorrem no sistema, tais como: transporte de cargas, dupla camada elétrica, condutividade de filmes, difusão de cargas, entre outros [68].

Figura 17: Representação de um circuito equivalente e a sua resposta, onde os processos em (A) ocorre em altas frequências e (B) em baixas frequências.



Fonte 17: Ilustração adaptada de [80]

A técnica EIE é uma técnica eficaz para estudar as propriedades interfaciais de eletrodos modificados, pois fornece uma visão detalhada das características elétricas da interface eletrodo/solução [80, 25]. Devido a isto, tem sido amplamente empregada na caracterização de biossensores, principalmente para analisar a interação específica do analito com a biomolécula imobilizada na superfície do eletrodo como, por exemplo, a interação do antígeno e anticorpo.

CAPÍTULO 3

Neste capítulo serão apresentadas as informações sobre os materiais e a descrição da metodologia utilizada na fabricação e caracterização dos filmes nanoestruturados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

O anticorpo Anti-PSA policlonal do tipo IgG, produzido no coelho, foi adquirido comercialmente da Sigma-Aldrich, 100 µg em tampão fosfato salino (*phosphate buffered saline* - PBS), 150 mmol.L⁻¹ de NaCl, pH 7,4, com concentração de aproximadamente 1 mg.mL⁻¹.

O antígeno prostático específico (*Prostate Specific Antigen* ou PSA) de sêmen humano foi adquirido da Sigma-Aldrich com grau de pureza $\geq 95\%$, 25 µg em tampão fosfato salino, pH 7,5.

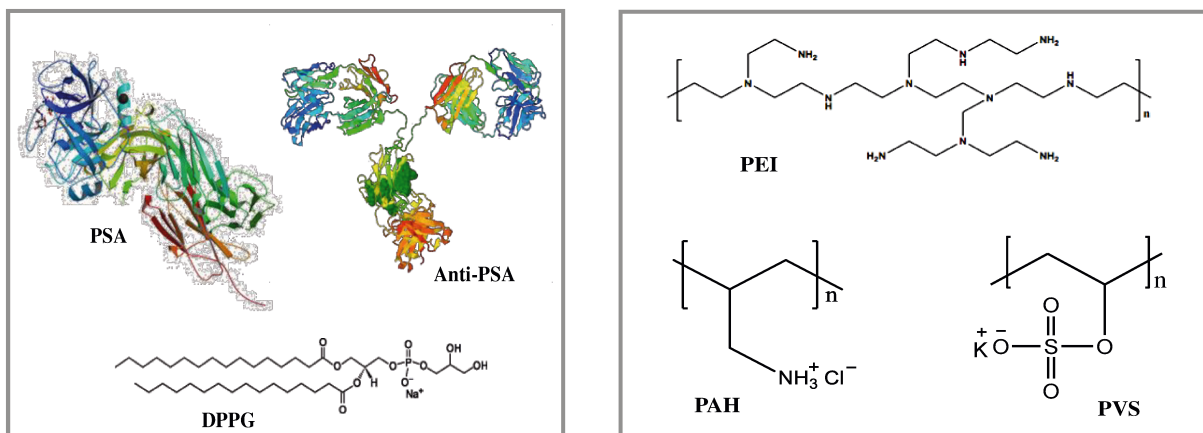
O fosfolípido de carga negativa dipalmitoilfosfatidil glicerol DPPG (*1,2-dipalmitoyl-sn-glicero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)* (*sal de sódio*) com massa molar de 744,96 g.mol⁻¹ foi obtido comercialmente da Avanti Polar Lipids com grau de pureza $> 99\%$.

Os polieletrólitos catiônicos poli(alilaminahidroclorada) (PAH), ($MW= 15.000 \text{ g.mol}^{-1}$ [60] e pKa da cadeia lateral de 8,5 – 9 [81]), o poli(etilenoimina) (PEI), (50% *m/V* em água, $MW= 600.000 - 1000.000 \text{ g.mol}^{-1}$ e pKa de 8,2 - 9,9) [82], o polieletrólito aniônico poli(vinil sulfato de sódio) (PVS) (25% *m/V* em água) e a ácido 11-mercaptoundecanóico (11-MUA) (95% de pureza, $MW= 218,36 \text{ g mol}^{-1}$), todos adquiridos da Sigma-Aldrich.

Proteína do soro bovino, (do inglês *bovine serum albumin*- BSA) obtida da Sigma-Aldrich com grau de pureza $\geq 98\%$.

A Figura 18 ilustra as estruturas químicas do fosfolípido DPPG, dos poliecátions PAH e PEI, do poliânion PVS e a estrutura do antígeno PSA.

Figura 18: Ilustração das estruturas químicas do fosfolípídio DPPG, do antígeno PSA, do anticorpo Anti-PSA, dos polycátions PAH e PEI e do poliânion PVS.



3.2 Solução tampão PBS

O tampão fosfato salino (*phosphate buffered saline* - PBS) pH 7,4 com concentração de 5 mmol.L^{-1} foi preparado com o fosfato de potássio monobásico (K_2HPO_4) $1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ juntamente com o fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) $3,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ e $7,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de cloreto de sódio (NaCl) dissolvidos em água ultrapura proveniente do sistema Sartorius (resistividade $18,2 \text{ M}\Omega$ e $\text{pH} \sim 5,7$). O tampão PBS foi utilizado para preparar todas as soluções, exceto para preparação da solução de ácido 11-mercaptoundecanóico, e também foi utilizado como solução de lavagem no processo de fabricação dos filmes nanoestruturados.

3.3 Solução dos polieletrólitos

Os polycátions PAH, PEI e o poliânion PVS foram preparados na concentração de 1 mg.L^{-1} em PBS, pH 7,4.

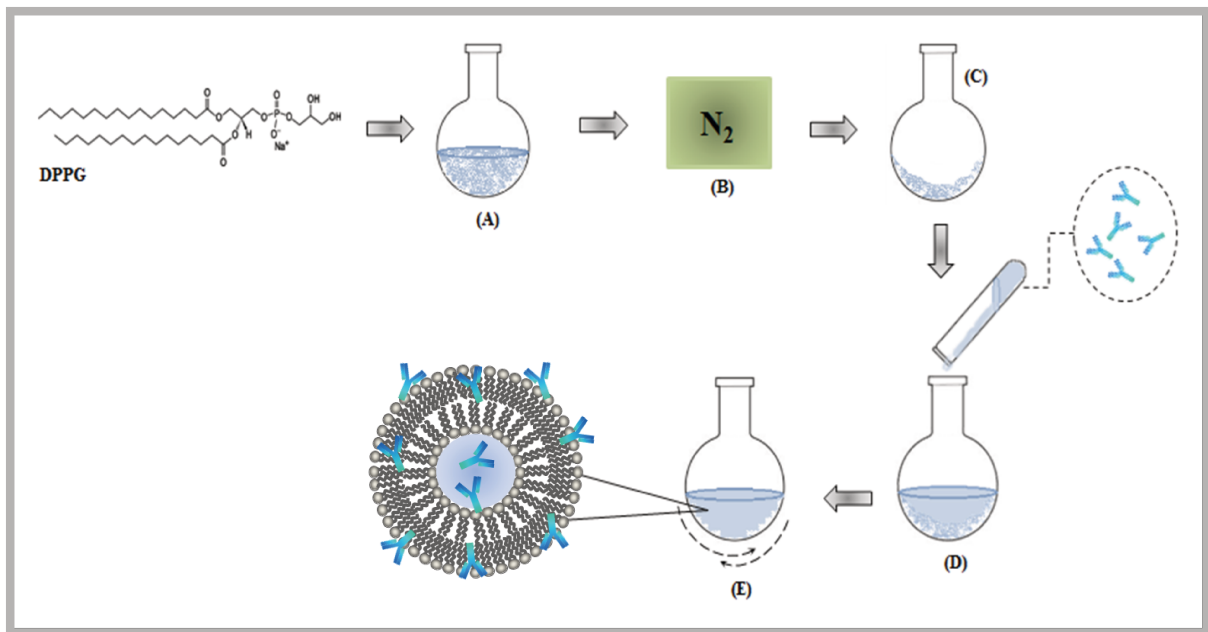
3.4 Solução do anticorpo Anti-PSA livre e incorporado em lipossomos

As soluções do anticorpo Anti-PSA foram preparadas nas concentrações de $10 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $50 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ pela diluição do anticorpo em PBS, pH 7,4.

Na incorporação do anticorpo Anti-PSA em lipossomos do tipo multilamelar (MLV), preparados pelo método de sonicação, utilizou-se o fosfolipídio DPPG na concentração de 1 mmol.L⁻¹. O lipossomo de DPPG foi escolhido não só por ser um dos mais estudados como modelo de membrana, mas também por apresentar grupos carregados negativamente em pH ~7,0, o que facilitam a fabricação dos filmes automontados.

Os lipossomos foram preparados de acordo com Moraes *et. al* [3], modificando apenas a etapa de hidratação. Para isto, o fosfolipídio foi solubilizado em metanol (QHEMIS) e clorofórmio (VETEC) na proporção 1:7 (V/V) (etapa A na Figura 19), em seguida, o solvente foi evaporado com nitrogênio (N₂) (etapa B na Figura 19). Após a evaporação do solvente, formou-se um filme fosfolipídico na parede do tubo de vidro (etapa C na Figura 19) que foi hidratado com a solução de anticorpo Anti-PSA por duas horas no ultrassom (25 kHz) (etapas D e E na Figura 19). As etapas estão ilustradas na Figura 19.

Figura 19: Representação do processo de incorporação do anticorpo Anti-PSA em lipossomos. Em (A) fosfolipídio solubilizado em solvente orgânico, (B) evaporação do solvente, (C) formação do filme fosfolipídico, (D) adição da solução de Anti-PSA e (E) agitação ultrassônica.



Fonte 18: Elaborado pelo autor.

3.5 Solução do PSA

O antígeno de PSA foi preparado em diferentes concentrações (0,25 a 25 ng.mL⁻¹) em tampão PBS, pH 7,4. A solução de PSA foi utilizada na caracterização eletroquímica, espectroscopia de impedância eletroquímica e ressonância plasmônica de superfície para verificar a interação antígeno-anticorpo.

3.6 Limpeza dos substratos

3.6.1 Substrato de quartzo

Os substratos de quartzo, utilizados nas caracterizações espectroscópicas dos filmes *LbL*, foram previamente limpos com acetona (QHEMIS), lavados em água ultrapura e submetidos a um tratamento de hidrofilição^[34], no qual foram imersos em uma solução básica composta por NH₄OH:H₂O₂:H₂O, seguindo a razão 1:1:5 (V/V/V), por 10 min à 80°C, lavados em água ultrapura, imersos em uma solução ácida composta por HCl:H₂O₂:H₂O, na razão 1:1:6 (V/V/V) por 10 min à 80°C, e lavados novamente com água ultrapura.

3.6.2 Substrato de CrAu

3.6.2.1 Caracterizações eletroquímicas

Para as caracterizações por voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica foram utilizados os substratos de vidro recoberto com cromo e ouro (CrAu). Os substratos CrAu foram preparados no Grupo de Polímeros do IFSC-USP, pela profa. Dra. Debora Terezia Balogh por meio da técnica de Sputtering. Antes de sua utilização, os substratos foram imersos em álcool isopropílico (QHEMIS), sob agitação ultrassônica (25 kHz) por 30 min, lavados com água ultrapura, submetidos à 4 ciclos de VC entre os potenciais de -0,7 a 0,7 V vs. ECS com $v=50 \text{ mV s}^{-1}$ em solução de H₂SO₄ 10 mmol L⁻¹ e, novamente lavados com água ultrapura.

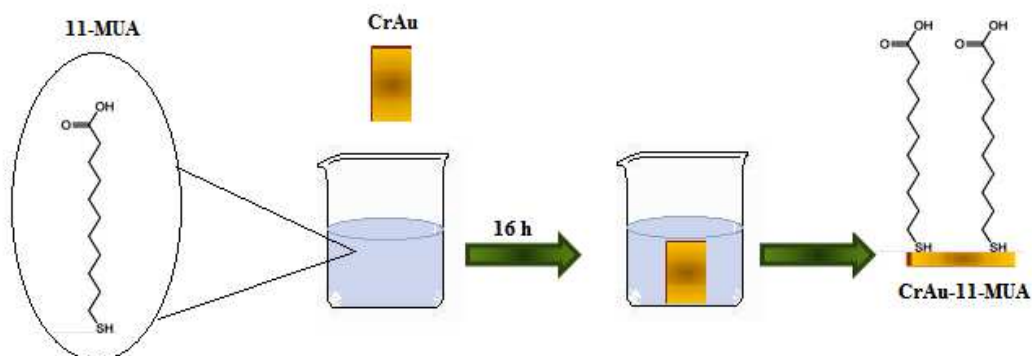
3.6.2.2 Caracterizações por SPR

O sensor de SPR foi obtido de BioNavis, constituído por um vidro recoberto com um filme fino de Au. A superfície do ouro foi hidrofílica de acordo com a metodologia de Miyazaki, et al. (2016) ^[57], usando uma solução básica composta por $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$, seguindo a razão 1:1:5 (V/V/V), por aproximadamente 15 min à 80°C, e posteriormente lavado em água ultrapura.

3.6.2.3 Funcionalização da superfície do ouro com 11-MUA

A superfície do ouro foi funcionalizada com uma monocamada automontada (SAM) de ácido 11-mercaptopundecanoico (11-MUA) a fim de se obter uma melhor deposição dos filmes nanoestruturados sobre o eletrodo CrAu e o sensor de SPR. Para isto, o eletrodo e o sensor previamente limpos foram imersos em uma solução de 11-MUA, com concentração 20 mmol.L^{-1} em etanol por aproximadamente 16 h, seguido da lavagem com etanol e água ultrapura. O esquema do processo de funcionalização está representado na Figura 20.

Figura 20: Ilustração do processo de funcionalização do eletrodo CrAu com 11-MUA.



Fonte 19: Elaborado pelo autor.

3.7 Caracterização por Dicroísmo Circular

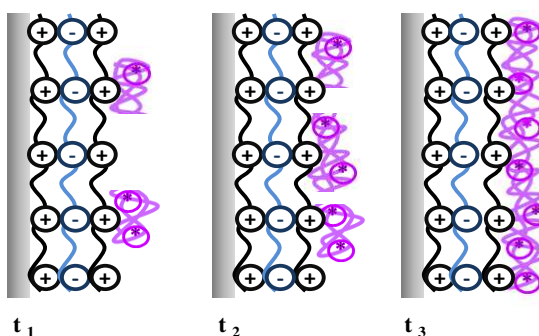
A técnica de espectroscopia de dicroísmo circular (CD) foi utilizada para analisar a estrutura do anticorpo Anti-PSA livre em PBS, pH 7,4 incorporado em lipossomos de DPPG e imobilizado como filmes nanoestruturados.

As análises de CD foram realizadas utilizando uma célula de quartzo de 1 mm de percurso óptico em um Espectrômetro de Dicroísmo Circular J-815 (Jasco Inc., Tokyo, Japão), com largura de banda de 1 nm, tempo de resposta 0,5 s e velocidade de digitalização de 100 nm.min⁻¹, no Instituto de Química IQ-UNESP Araraquara. Os espectros de CD foram obtidos através da média de oito verificações.

3.8 Cinética de crescimento do filme nanoestruturados.

O tempo máximo de adsorção dos lipossomos de DPPG contendo o anticorpo Anti-PSA incorporado foi determinado pela adsorção de uma única camada de Anti-PSA+DPPG alternado com PAH em função do tempo de imersão do substrato na solução de Anti-PSA+DPPG, como ilustra a Figura 21, que pode ser monitorado pelos espectros de absorvância do filme. Antes de iniciar a deposição, construiu-se sobre o substrato de quartzo um colchão, composto por duas bicamadas de polieletrólitos PAH e PVS alternados entre si. A adsorção das duas bicamadas de colchão se dá por meio de interação eletrostática entre as cargas positivas (NH₃⁺) do PAH e negativas (SO₄⁻) do PVS, sendo este procedimento realizado para minimizar os efeitos do substrato sobre as camadas adsorvidas ^[83]. Assim sendo, mergulhou-se o substrato na solução de PAH por 3 min, depois o mesmo foi imerso na solução de lavagem (PBS, pH 7,4) por 30 s e depois secado com gás nitrogênio. Em seguida o substrato foi imerso na solução de PVS por 3 min e depois imerso novamente na solução de lavagem por 30 s e secado.

Figura 21: Representação esquemática da deposição de uma única camada de lipossomo com anticorpo Anti-PSA sobre o colchão (PAH/PVS).



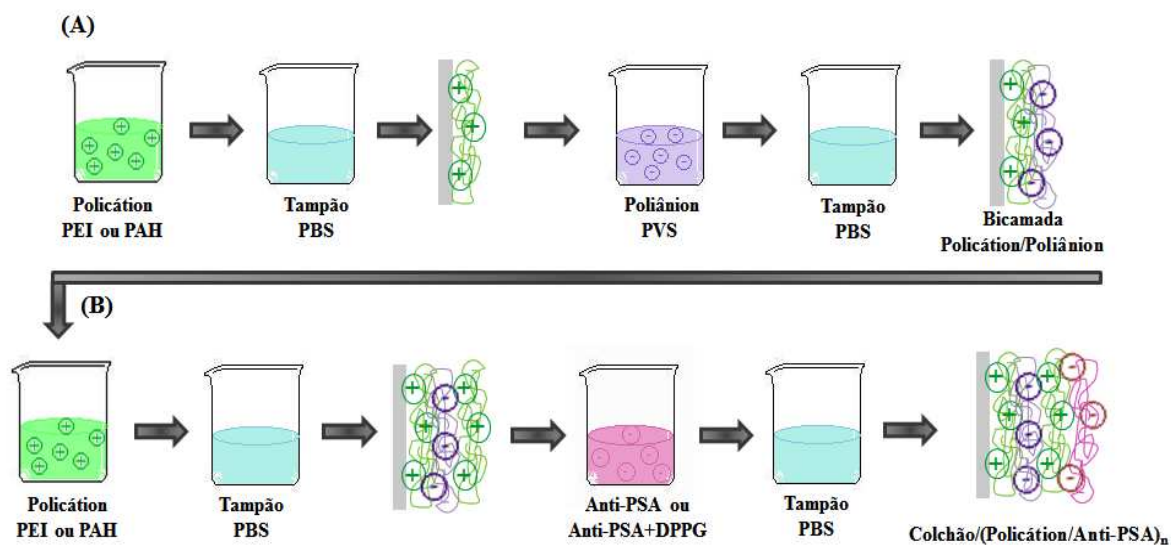
Fonte 20: Elaborado pelo autor.

3.9 Fabricação dos filmes nanoestruturados

O Anti-PSA, livre e incorporado em lipossomos de DPPG, foi imobilizado através da técnica *LbL* com diferentes polícations (PAH ou PEI), a fim de se verificar a melhor deposição do anticorpo no substrato sólido. A Figura 22 ilustra as etapas de fabricação do filme nanoestruturado: para minimizar os efeitos do substrato, depositou-se uma bicamada de colchão, alternando o polícation PAH ou PEI com o poliânion PVS (ilustrado em A). Para isto, o substrato foi imerso na solução de polícation por 3 min, depois foi lavado por 30 s PBS, pH 7,4, em seguida foi imerso na solução de poliânion por mais 3 min e lavado por 30 segundos. Em (B), após a deposição do colchão mergulhou-se o substrato na solução de polícation PAH ou PEI por 3 min, em seguida lavou-o por 30 s em PBS, pH 7,4 depois o substrato foi imerso na solução de anticorpo Anti-PSA livre ou incorporado em lipossomos por 10 min quando alternado com PEI, e por 3 min, quando alternado com PAH, e novamente imerso na solução de lavagem por 30 s. O tempo de 3 min de imersão do substrato na solução contendo anticorpo Anti-PSA em lipossomos foi determinada através da cinética de crescimento descrita no item 3.8. Já o tempo de 10 min foi baseado nos trabalhos do Grupo de Pesquisa Nanociência e Nanotecnologia Aplicada em Sensoriamento (GPNNS) [34, 52, 56, 57].

A cada camada depositada, o filme foi secado com gás nitrogênio e foram realizadas medidas no espectrofotômetro UV-vis e no SPR para verificar a deposição dos materiais.

Figura 22: Representação esquemática do processo de fabricação dos filmes LbL. Em (A) deposição do colchão e em (B) deposição do anticorpo.



Fonte 21: Elaborado pelo autor.

3.10 Caracterização por FTIR

A técnica de FTIR foi usada para estudar o crescimento dos filmes LbL de PEI/PVS e PEI/Anti-PSA. Inicialmente os materiais foram estudados separadamente em filmes *casting* sobre o substrato de seleneto de zinco (ZnSe). Para cada material estudado na forma de filme *casting*, espalhou-se 100 μL da solução sobre o substrato de seleneto de zinco (ZnSe) e a solução foi evaporada à temperatura ambiente 25°C. Os filmes LbL foram depositados sobre ZnSe como descrito no 3.9. Após a deposição dos filmes, as medidas de transmitância e reflexão foram realizadas no Grupo de Polímeros Bernhard Gross, do Instituto de Física da USP-São Carlos, em um equipamento Thermo Nicolet, modelo Nexus 470.

3.11 Caracterização por Voltametria Cíclica

A detecção do antígeno de PSA pelos filmes nanoestruturados contendo o anticorpo Anti-PSA em lipossomos foi caracterizada por voltametria cíclica (VC) através de um potenciostato Autolab modelo PGSTAT 30 acoplado a uma célula eletroquímica de 15 mL

contendo três eletrodos. Como eletrodo de referência (ER) utilizou-se calomelano saturado (ECS) $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{KCl}_{(\text{sat.})}$, como contra eletrodo (CE), uma lâmina de platina com área de 1 cm^2 e, como eletrodo de trabalho (ET), os filmes nanoestruturados depositados sobre o eletrodo de CrAu modificado com 11-MUA, com área de $0,42 \text{ cm}^2$. As medidas foram conduzidas em tampão PBS, pH 7,4, na ausência e presença de antígeno PSA. Para isto, $35 \mu\text{L}$ da solução de PSA foi espalhada sobre o eletrodo CrAu modificado com 11-MUA, contendo o filme nanoestruturado $(\text{PEI}/\text{Anti-PSA}+\text{DPPG})_5$ contendo cinco bicamadas. O antígeno foi incubado por 10 min, lavado com tampão PBS e submetido a 3 ciclos entre $-0,2$ e $0,6 \text{ V vs. ECS}$ a 10 mV s^{-1} .

3.12 Caracterização por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica foi utilizada para estudar a interação do antígeno PSA com o anticorpo Anti-PSA livre e incorporado em lipossomos de DPPG presentes nos filmes LbL.

As medidas foram realizadas no Grupo de Polímeros do IFSC-USP, em colaboração com o Pós-doutorando Flavio Makoto Shimizu. Foi utilizado um potenciostato AUTOLAB PGSTAT302N acoplado a uma célula eletroquímica contendo três eletrodos, igual a que foi descrita no item 3.10. Primeiramente realizaram-se medidas dos eletrodos contendo os filmes $(\text{PEI}/\text{Anti-PSA})_5$ e $(\text{PEI}/\text{Anti-PSA}+\text{DPPG})_5$ ausentes de antígeno e, posteriormente, incubado com diferentes concentrações de antígeno PSA. Todas as medidas foram realizadas na presença de uma solução de ferricianeto de potássio, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (10 mmol.L^{-1}) solubilizado em solução de KCl ($0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$) e diluído em tampão PBS, pH 7,4, na proporção 1:1 (V/V). Foi empregada uma variação na frequência de 0,1 Hz a 100 kHz, com amplitude de 10 mV e sob um potencial de circuito aberto (OCP).

3.13 Caracterização por Ressonância Plasmônica de Superfície

A técnica de ressonância plasmônica de superfície foi utilizada com o intuito de verificar, através da variação do ângulo de SPR (θ_{SPR}), a deposição de multicamadas de filmes LbL (PEI/Anti-PSA e PEI/Anti-PSA+DPPG) sobre o sensor de SPR. A partir das curvas de SPR, simulou-se a espessura das bicamadas usando o *software* WinSpall. Além disso, verificou-se também a interação do antígeno PSA com o anticorpo Anti-PSA presente nos filmes através do sensograma que relaciona a variação do ângulo SPR com o tempo.

As medidas foram realizadas à 20°C no equipamento SPR Navi TM 200, da BioNavis, utilizando os dois lasers de 670 e 785 nm para excitação e dois meios (Ar e PBS) variando a varredura angular de 40° – 78°.

Os filmes de PEI/Anti-PSA ou PEI/Anti-PSA+DPPG foram depositados sobre o sensor de SPR modificado com 11-MUA, como descrito no item 3.9, e a cada bicamada depositada realizaram-se medidas na interface filme/Ar e filme/PBS_(pH 7,4) empregando como fonte de radiação dois lasers.

O estudo da interação do antígeno PSA com o anticorpo Anti-PSA imobilizado nos filmes foi investigado por meio da variação do ângulo de SPR com o tempo. Para isto, foi utilizado o laser de comprimento de onda 670 nm e as seguintes etapas foram realizadas: (i) após a imobilização das bicamadas de filmes, foram desativados os sítios ativos não específicos injetando na célula de fluxo BSA na concentração 0,005 mg.mL⁻¹, usando um fluxo de 10 µL.min⁻¹; (ii) realizou-se a lavagem usando um fluxo de 10 µL.min⁻¹ de tampão PBS, pH 7,4 a fim de remover o excesso de BSA não adsorvido; (iii) injetou-se na célula de fluxo 250 µL de PSA nas concentrações 1 ng.mL⁻¹ e 3 ng.mL⁻¹.

CAPÍTULO 4

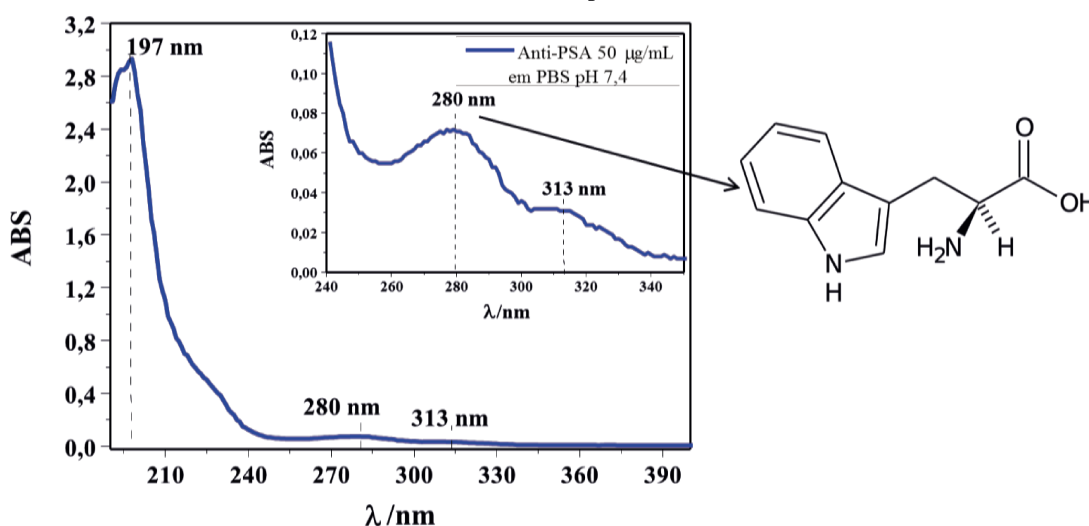
Neste capítulo serão apresentados os resultados e a análise das caracterizações espectroscópicas e eletroquímicas dos filmes nanoestruturados contendo o anticorpo Anti-PSA, livre e incorporado em lipossomos de DPPG, para a detecção do antígeno PSA.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Caracterização da solução de anticorpo Anti-PSA livre e incorporada em lipossomos por UV-vis

O anticorpo Anti-PSA possui, dentre outros aminoácidos, o triptofano, o qual apresenta uma cadeia lateral aromática capaz de absorver luz ultravioleta próximo ao comprimento de onda (λ) de 280 nm. Desta maneira, a solução do anticorpo Anti-PSA em PBS e incorporada em lipossomos e os filmes nanoestruturados contendo o anticorpo adsorvido foram caracterizados por espectroscopia UV-vis. A solução de Anti-PSA livre na concentração $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi preparada em tampão PBS, pH 7,4. A Figura 23 traz o espectro de UV-vis da solução obtido no intervalo entre 190 e 400 nm, já o encarte da figura traz uma ampliação do espectro no intervalo de 240 a 350 nm.

Figura 23: Espectro de UV-vis da solução de anticorpo Anti-PSA livre em tampão PBS e a estrutura química do aminoácido triptofano.

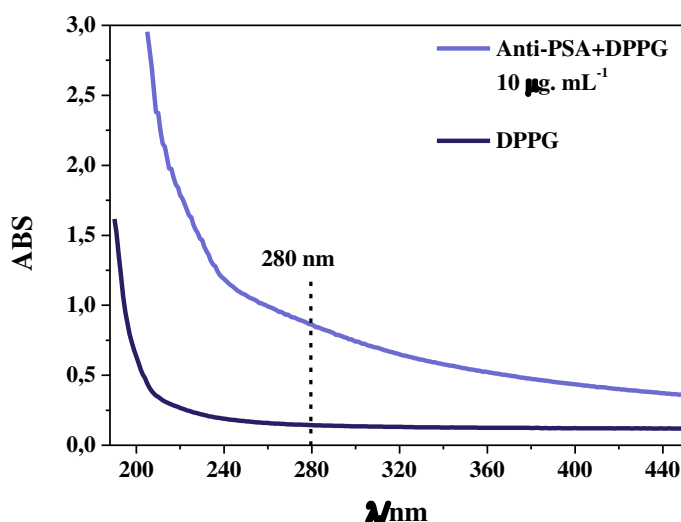


Fonte 22: Elaborado pelo autor.

Pode-se observar uma banda intensa em 197 nm que corresponde à presença de ligações peptídicas [84, 85], além de outras duas bandas: uma em comprimento de onda de 280 nm, relacionada à presença do resíduo de aminoácido triptofano [67] e outra em 313 nm, que pode estar associada à agregação do anticorpo em solução [86].

Alguns trabalhos do grupo GPNNS [34, 56, 57] e outros que estão publicados na literatura [3, 87, 88] têm mostrado que os lipossomos ajudam a preservar a conformação estrutural de biomoléculas e melhoram a sua estabilidade. Diante disto, optou-se também por estudar a solução e os filmes LbL do anticorpo Anti-PSA incorporado em lipossomos de DPPG. Na Figura 24 são apresentados os espectros da solução de lipossomos de DPPG puro, na concentração 10 mmol.L⁻¹, e com o anticorpo Anti-PSA, na concentração de 10 µg mL⁻¹, incorporado aos mesmos. O espectro da solução do anticorpo Anti-PSA incorporado aos lipossomos não apresentou as bandas observadas no espectro da solução do anticorpo livre (Figura 23), o que pode estar relacionada à baixa concentração do anticorpo na solução (10 µg.mL⁻¹) e o espalhamento de luz causado pelo lipossomo.

Figura 24: Espectros de UV-vis da solução de lipossomos de DPPG puro e com Anti-PSA incorporado.



Fonte 23: Elaborado pelo autor.

4.2 Caracterização da solução de anticorpo Anti-PSA livre e incorporado em lipossomos por Dicroísmo Circular

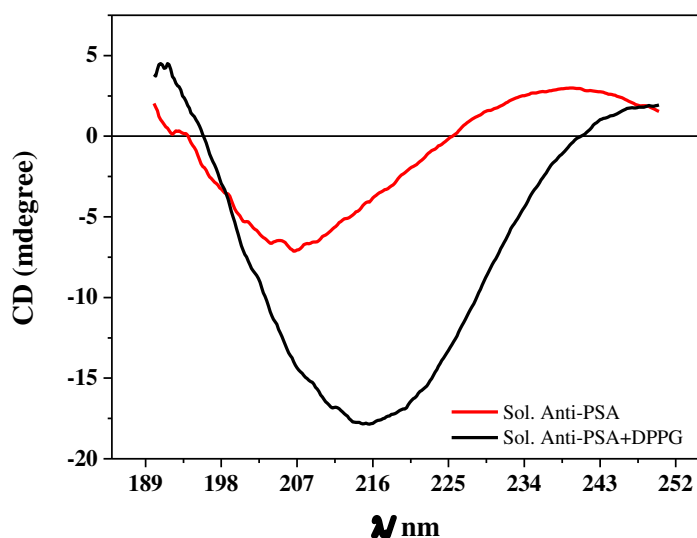
Biomoléculas como os anticorpos, podem sofrer agregação devido as influências do meio, (tempo de estocagem, temperatura e composição do tampão) ou devido ao próprio processo de obtenção, e agregação pode ser monitorada através de mudanças em suas estruturas secundárias ^[86]. Assim sendo, neste trabalho foram realizadas medidas de CD na solução e nos filmes nanoestruturados de anticorpo Anti-PSA livre e incorporado em lipossomos de DPPG, a fim de monitorar a estrutura e/ou agregação.

O anticorpo utilizado neste trabalho é uma imunoglobulina do tipo IgG e seus diferentes domínios formam estruturas globulares compactas com estruturas secundárias compostas predominantes por folhas- β antiparalelas, voltas aleatórias e estruturas folha- β (50 - 60%), porém há também uma pequena porcentagem de α -hélices (2-7%) e voltas- β ^[86].

A Figura 25 apresenta os espectros de CD para o anticorpo Anti-PSA livre em PBS, pH 7,4, e incorporado em lipossomos de DPPG. O espectro de CD do anticorpo Anti-PSA livre apresentou um mínimo em 207 nm, característico de estruturas desordenadas, possivelmente relacionadas à formação de agregados. Quando o anticorpo é incorporado nos lipossomos de DPPG observa-se um mínimo em 215 nm, comprimento de onda próximo ao característico de estruturas tipo folhas- β , cujo mínimo no espectro de CD ocorre em 218 nm ^[66, 86]. O deslocamento de 3 nm pode ser atribuído à contribuição das demais estruturas presentes no anticorpo e/ou presença de anticorpos não incorporados ao lipossomos. É interessante ressaltar que ambas as medidas foram realizadas com a mesma concentração de anticorpo ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$), e, no entanto, verificou-se mudanças bastante significativas nas “intensidades” dos espectros, o que pode ser mais um indicativo de que os lipossomos estejam favorecendo a desagregação do anticorpo, levando à um aumento da estabilidade e manutenção da estrutura do Anti-PSA.

A técnica de CD também foi usada para analisar a estrutura do anticorpo nos filmes nanoestruturados (PAH/Anti-PSA)₂₀ e (PAH/Anti-PSA+DPPG)₂₀ contendo vinte bicamadas, no entanto, não foi possível obter os espectros de CD, possivelmente devido à baixa concentração de anticorpo adsorvida na superfície do quartzo.

Figura 25: Espectro de CD da solução de anticorpo Anti-PSA livre em PBS, pH 7,4, e incorporado em lipossomo de DPPG.



Fonte 24: Elaborado pelo autor.

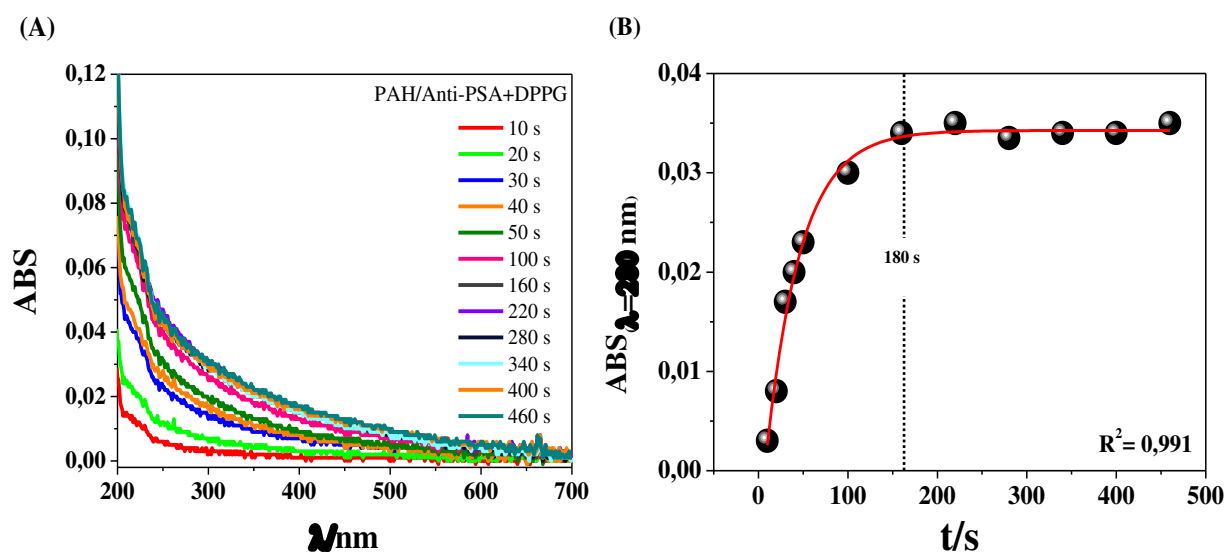
4.3 Cinética de crescimento do filme composto de PAH/Anti-PSA+DPPG

A cinética de crescimento de filmes nanoestruturados é realizada a fim de se determinar o tempo de imersão que garanta a máxima adsorção do material disperso em solução na superfície de um substrato. Desta maneira, estudou-se a cinética de crescimento para a adsorção do anticorpo Anti-PSA incorporado aos lipossomos de DPPG alternado com o polication PAH sobre um substrato de quartzo. A cinética foi monitorada por espectroscopia UV-vis, no comprimento de onda de 280 nm, característico do anticorpo Anti-PSA devido à presença do resíduo de aminoácido triptofano.

Na Figura 26 (A) são apresentados os espectros de UV-vis do filme PAH/Anti-PSA+DPPG em diferentes tempos de imersão do substrato na solução de Anti-PSA+DPPG e

na Figura 26 (B), o resultado da cinética de deposição do Anti-PSA+DPPG juntamente com o polícatión PAH, no qual foi monitorada a absorbância em 280 nm com a variação do tempo de imersão do substrato.

Figura 26: (A) Espectros de Uv-vis para diferentes tempos de imersão do substrato de quartzo com PAH na solução contendo Anti-PSA+DPPG e (B) é a cinética de crescimento que relaciona absorbância em 280 nm em função do tempo de adsorção do Anti-PSA+DPPG.



Fonte 25: Elaborado pelo autor.

Através da cinética de crescimento verificou-se que é necessário aproximadamente 180 s de imersão do substrato de quartzo na solução de Anti-PSA incorporado em lipossomos para se obter uma camada completa de Anti-PSA+DPPG, visto que a partir deste valor não há variação de absorbância. O resultado está em concordância com os obtidos por Aoki *et. al* ^[89] para adsorção dos lipossomos de DPPG puro com o polícatión PAH.

4.4 Crescimento dos filmes nanoestruturados de Anti-PSA e Anti-PSA+DPPG com PAH e PEI

A deposição do Anti-PSA livre e incorporado aos lipossomos de DPPG foi investigada com diferentes polícatións (PAH ou PEI), a fim de se verificar a melhor deposição do anticorpo sobre o substrato de quartzo. Foram utilizados diferentes tempos de imersão do

substrato nas soluções de polications, Anti-PSA livre e Anti-PSA+DPPG, como descrito no item 3.9.

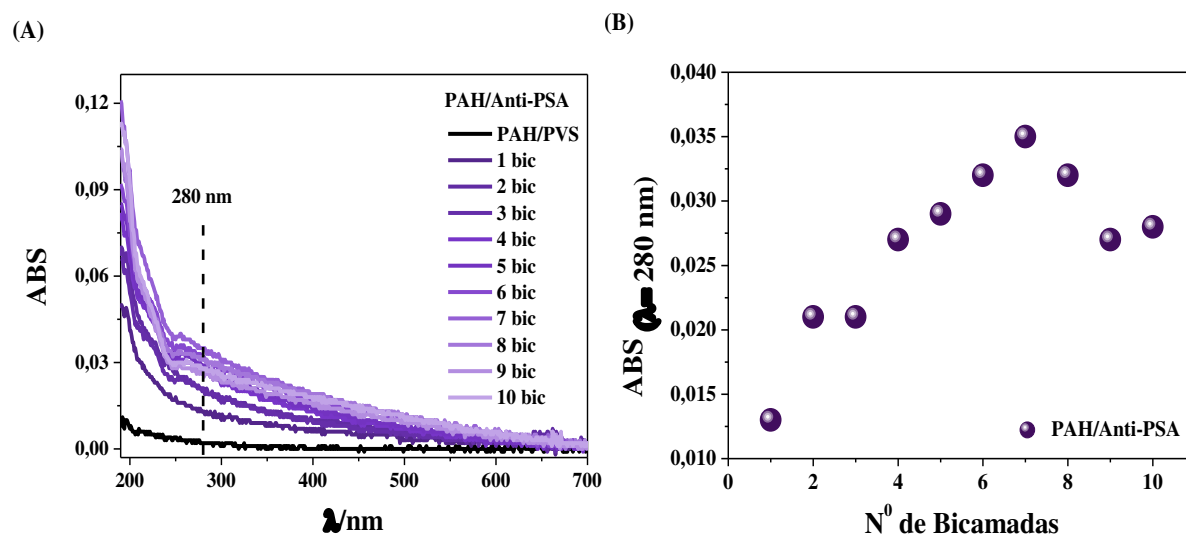
O ponto isoelétrico (pI) do anticorpo Anti-PSA está entre 5,5 a 6,9 ^[90], portanto, ao ser diluído em tampão PBS, cujo pH se encontra acima do ponto isoelétrico do anticorpo (pH_{PBS} 7,4), o Anti-PSA fica carregado negativamente, possibilitando a sua adsorção com polications, como PAH e PEI. No caso do anticorpo incorporado em lipossomo, o crescimento do filme é favorecido pelas interações entre os grupos fosfato (PO_4^{3-}) dos lipossomos com os grupos NH_3^+ dos polications ^[89]. Contudo, a formação dos filmes nanoestruturados não se restringe apenas às interações eletrostáticas, pois, no caso de biomoléculas, como anticorpos, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas podem ocorrer e reger o crescimento do filme ^[40, 81].

O tempo máximo de adsorção do lipossomo de DPPG alternado com PEI para a fabricação de filmes LbL é de 10 min. Este tempo foi determinado a partir de uma cinética de crescimento e vem sendo usado com sucesso em vários trabalhos do grupo GPNNS ^[34, 52, 56, 57]. Portanto, adotou-se este tempo para a construção dos filmes PEI/Anti-PSA+DPPG, mas para construção dos filmes PAH/Anti-PSA+DPPG o tempo máximo de imersão do substrato na solução de Anti-PSA+DPPG, quando alternado com polication PAH, foi de 3 minutos, como determinado pela cinética de crescimento, item 4.3.

A Figura 27 (A) apresenta os espectros de UV-vis do filme (PAH/Anti-PSA)₁₀ contendo 10 bicamadas depositadas sobre o substrato de quartzo e na Figura 27 (B) a absorvância em 280 nm em função do número de bicamadas adsorvidas. Nos espectros da Figura 27 (A), verifica-se a ausência da banda próxima a 280 nm (o que também é observado para as demais arquiteturas de filmes estudadas) e pode estar relacionado à baixa concentração do anticorpo. Tomando a absorvância em função do número de bicamadas, Figura (B), é possível verificar que o filme (PAH/Anti-PSA)₁₀ não apresenta um bom crescimento, uma vez que a adsorção

da biomolécula ocorre de maneira irregular. Além disso, observa-se que, a partir da sétima bicamada, ocorre um decréscimo nos valores de absorvância, o que pode indicar um possível desprendimento e saturação do filme.

Figura 27: (A) Espectros de UV-vis do filme LbL de PAH/Anti-PSA com diferentes números de bicamadas e (B) absorvância em 280 nm em função do número de bicamadas depositadas.

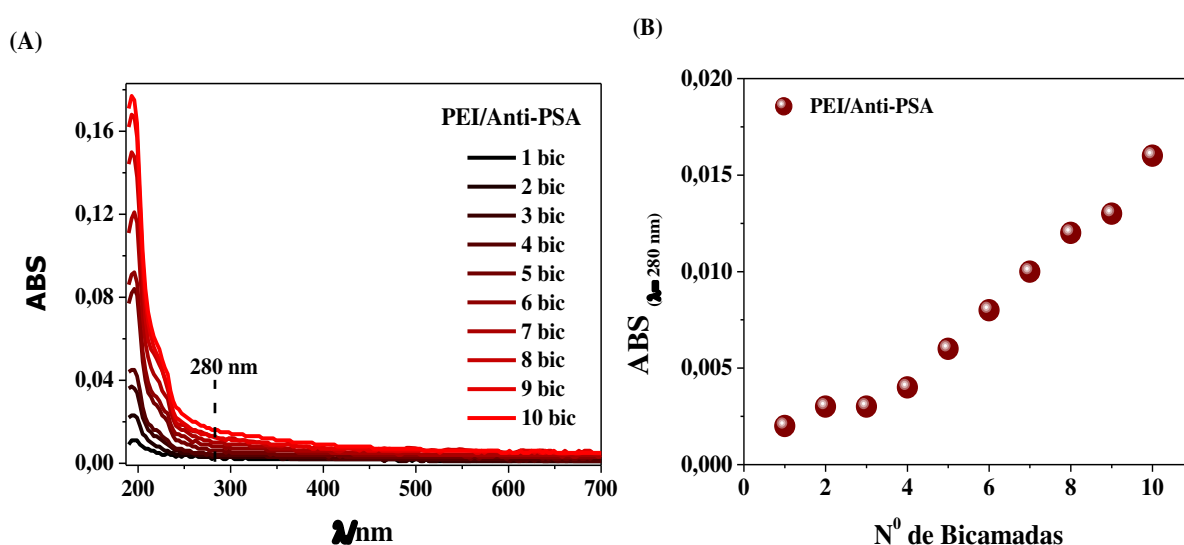


Fonte 26: Elaborado pelo autor.

A Figura 28 em (A) apresenta os espectros de UV-vis do filme nanoestruturado composto por bicamadas de PEI/Anti-PSA e em (B) o gráfico da absorvância em função do número de bicamadas do filme. Os espectros de UV-vis não apresentaram absorção em 280 nm, no entanto, apresentam um comportamento na região 190 a 230 nm semelhante ao obtido para a solução de anticorpo Anti-PSA livre (Figura 23), indicando a adsorção do anticorpo na superfície do quartzo. Analisando o crescimento do filme na Figura 28 (B), verifica-se uma baixa adsorção do anticorpo nas bicamadas iniciais, que se torna maior a partir da terceira bicamada. Provavelmente, isto ocorreu devido a pouca interação entre o polieletrólito PEI e o anticorpo nas bicamadas iniciais, e com o aumento da quantidade de material adsorvido pode ter ocorrido um aumento das interações secundárias, o que favoreceu o crescimento do filme.

Comparado com o crescimento do filme PAH/Anti-PSA, a absorvância da décima bicamada de filme PEI/Anti-PSA foi inferior ($ABS_{PEI/Anti-PSA} = 0,016$ e $ABS_{PAH/Anti-PSA} = 0,028$), contudo o filme possui um crescimento regular após a terceira bicamada e não ocorreu diminuição da absorvância nem a saturação do filme, o que permite a construção de filmes com um número maior de bicamadas.

Figura 28: (A) Espectros de absorvância UV-vis do filme LbL de PEI/Anti-PSA com diferentes números de bicamadas e (B) absorvância em 280 nm em função do número de bicamadas depositadas.

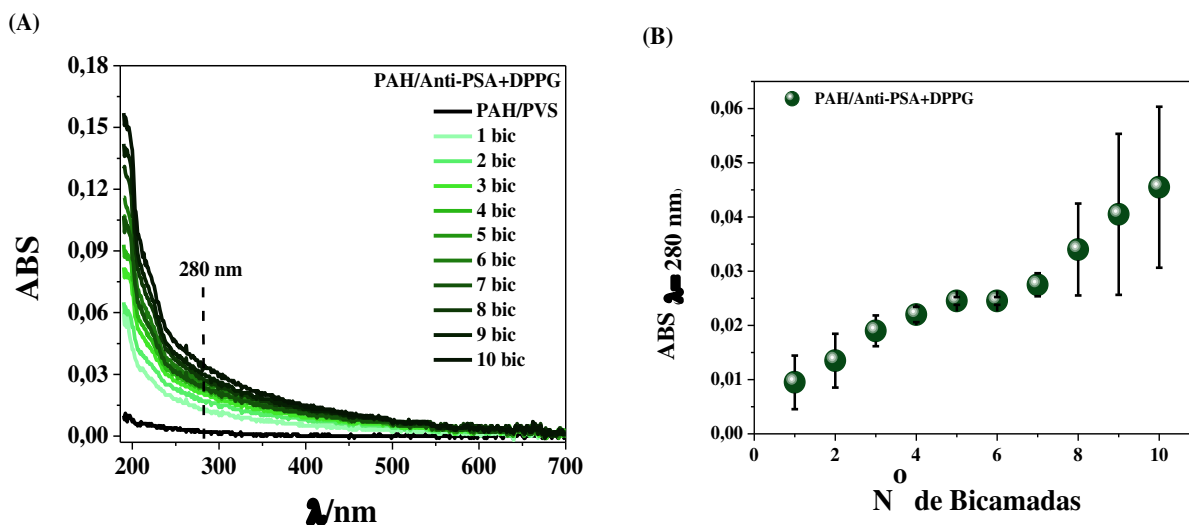


Fonte 27: Elaborado pelo autor.

A Figura 29 traz em (A) os espectros de UV-vis das 10 bicamadas de filme (PAH/Anti-PSA+DPPG)₁₀ depositadas sobre o substrato de quartzo e em (B) a absorvância em 280 nm em função do número de bicamada adsorvida.

O filme composto por PAH/Anti-PSA+DPPG apresentou dois regimes de crescimento linear, um até a quinta bicamada e outro da sétima à décima bicamada. Isto pode estar associado a um rearranjo dos materiais após a imobilização no substrato sólido, já que na formação das multicamadas *via* técnica LbL estão envolvidos também processos de relaxação e rearranjo das camadas adsorvidas ^[41]. A absorvância da décima bicamada foi de 0,045.

Figura 29: (A) Espectros de absorvância UV-vis do filme LbL de PAH/Anti-PSA+DPPG com diferentes números de bicamadas e (B) absorvância em 280 nm em função do número de bicamadas depositadas.

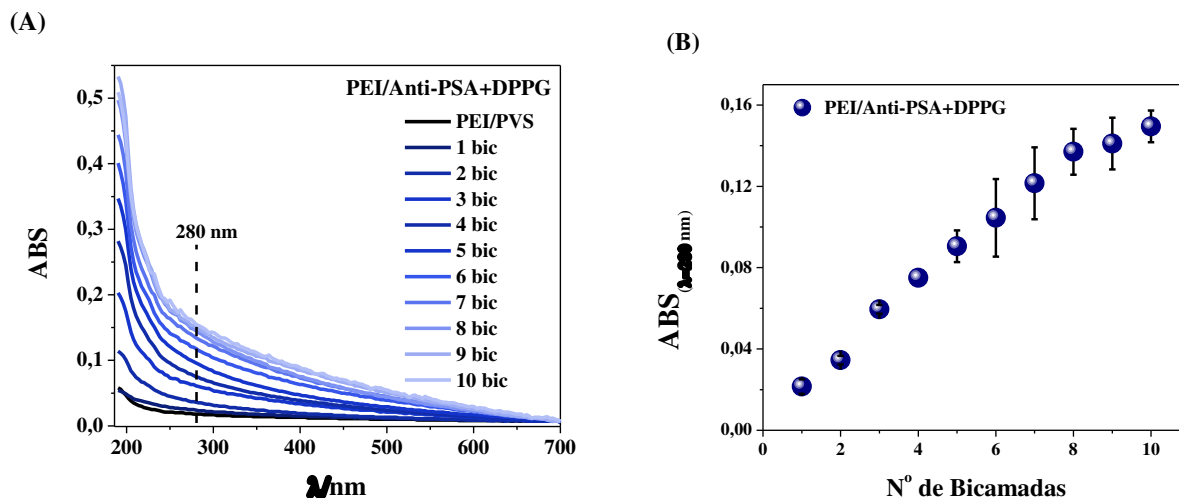


Fonte 28: Elaborado pelo autor.

Em comparação com filme PAH/Anti-PSA (Figura 27), o filme contendo o anticorpo Anti-PSA incorporado aos lipossomos de DPPG, apresentou um crescimento mais regular, com exceção da sexta bicamada. A deposição satisfatória pode ser atribuído à presença dos lipossomos de DPPG que ficam com seus grupos polares carregados negativamente e apontados para a solução em pH 7,4, o que favorece as interações eletrostáticas com o polycation e consequentemente favorece o crescimento do filme ^[91]. Segundo Aoki *et. al* ^[89], a deposição de lipossomos de DPPG alternado com PAH é facilitada pelas interações eletrostáticas entre os grupos NH_3^+ presente na estrutura do PAH e o grupo PO_4^{-3} dos fosfolipídios DPPG, possibilitando uma melhor adsorção na superfície do substrato.

A Figura 30 traz em (A) os espectros UV-vis do filme $(\text{PEI}/\text{Anti-PSA}+\text{DPPG})_{10}$ contendo 10 bicamadas e em (B) o regime de crescimento do filme que relaciona a absorvância em 280 nm com o número de bicamadas adsorvidas.

Figura 30: Espectros de absorbância UV-vis do filme LbL de PEI/Anti-PSA+DPPG com diferentes números de bicamadas e (B) absorbância em 280 nm em função do número de bicamadas depositadas.



Fonte 29: Elaborado pelo autor.

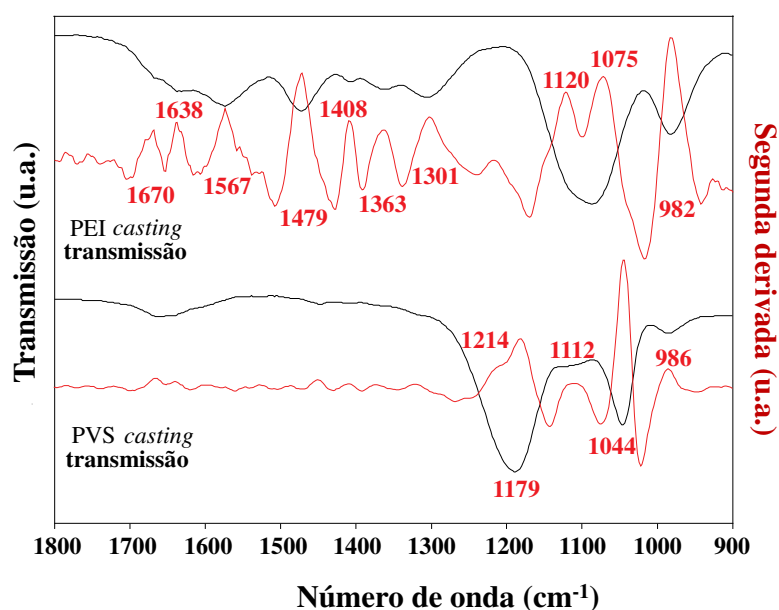
O filme PEI/Anti-PSA+DPPG apresentou crescimento regular, que tende à saturação após a oitava bicamada, a absorção da décima bicamada foi de 0,15, valor superior à do filme PAH/Anti-PSA+DPPG. Neste caso, a maior adsorção do anticorpo incorporado no lipossomo pode ser atribuída à estrutura do PEI que é ramificada, como apresentada na Figura 18, e possui vários grupos amina protonados em solução, o que ajuda a aumentar a interação com os grupos fosfato dos lipossomos.

4.5 Caracterização do filme de PEI/Anti-PSA por FTIR

Entender a forma de crescimento do filme pode melhorar o desempenho da plataforma sensorial, por isto o filme de PEI/Anti-PSA foi caracterizado por FTIR. Inicialmente os materiais foram caracterizados separadamente na forma de filmes *casting*, para determinar as bandas relacionadas a cada material utilizado na fabricação do filme, como o colchão (PEI/PVS) e a camada ativa (PEI/Anti-PSA). A Figura 31 apresenta os espectros FTIR no modo transmissão e a segunda derivada do espectro de transmissão para os filmes *casting* dos constituintes do colchão. A segunda derivada foi usada para revelar os picos encobertos no espectro original e facilitar as análises. As bandas observadas no espectro do PEI podem ser

divididas em 3 grupos ^[92]: (i) Grupo de frequências associados aos estiramentos C-N e a deformações C-H, e podem ser observados entre 900 e 1300 cm^{-1} . Como a forma de PEI utilizada apresenta um grande número de cadeias laterais também contendo aminas terciárias, é esperado o aparecimento de vários modos vibracionais acoplados ao estiramento C-N da cadeia principal; (ii) Grupo de vibrações relacionado com a deformação das ligações C-C da cadeia principal e dos grupos C-H, e abrangem a região de 1300 a 1500 cm^{-1} ; (iii) Grupo envolvendo as deformações dos grupos N-H₂ e N-H, que variam entre 1700 e 1500 cm^{-1} . São esperadas bandas de deformação das aminas primárias e secundárias mais pronunciadas devido à grande quantidade desses grupos presentes no PEI, mas como a solução foi preparada em PBS, pH 7,4, a metade destes grupos estão protonados, o que reduz o número de moléculas contribuindo para estes modos vibracionais. O filme do PVS apresentou bandas características do material. Em 1214, 1179 e 1112 cm^{-1} são observados bandas relacionadas ao estiramento dos grupos sulfônicos $-\text{SO}_3^-$, enquanto as bandas em 1044 e 986 cm^{-1} são relacionadas aos modos vibracionais de deformação do C-H da cadeia principal.

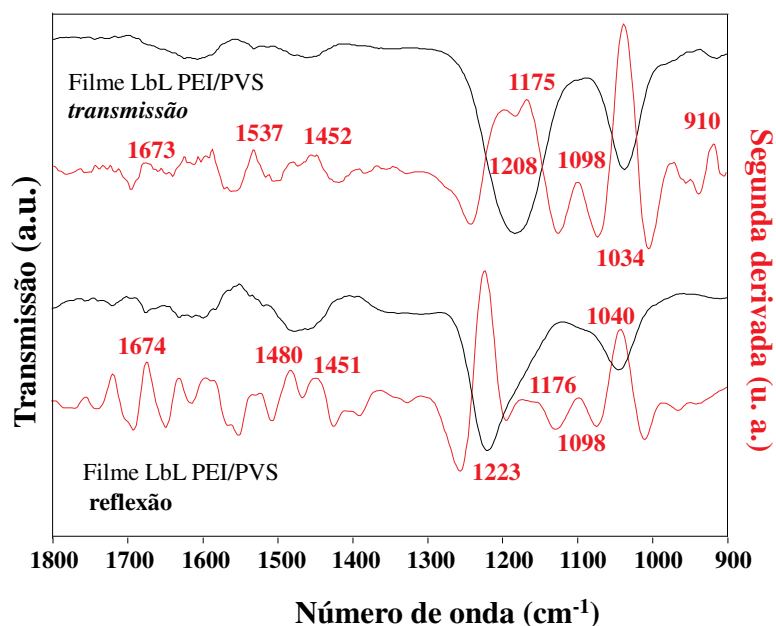
Figura 31: Espectros FTIR no modo transmissão para o filme *casting* do PEI e do PVS depositados sobre o seleneto de zinco ZnSe. A curva vermelha representa a segunda derivada do espectro de transmissão, revelando os picos encobertos no espectro original.



Fonte 30: Elaborado pelo autor.

O crescimento dos filmes LbL contendo camadas de PEI e PVS pôde ser verificado pelas alterações encontradas nas bandas relacionadas ao grupo sulfônico do PVS. A Figura 32 traz os espectros no modo de transmissão e no modo de reflexão dos filmes de PEI/PVS contendo 5 bicamadas. Este número de bicamadas foi escolhido para que houvesse sinal mensurável e com pouco ruído nas medidas de FTIR. Analisando o espectro do filme LbL PEI/PVS no modo transmissão, verifica-se as bandas em 1208, 1175 e 1098 cm^{-1} que são relacionadas ao estiramento do grupo SO_3^- , e foram deslocadas para menores valores de número de onda em comparação com o filme *casting* do PVS. Isto pode ser atribuído à interação do PVS com o PEI para o crescimento do filme LbL, o qual deve ser governado por “interações fortes” entre os polieletrólitos. No mesmo espectro, outras bandas na região de 1500 e 1700 cm^{-1} associadas ao PEI foram deslocadas para menores valores de número de onda, além do aparecimento de novas bandas, confirmando que as interações químicas governam o crescimento desses filmes.

Figura 32: Espectros FTIR no modo transmissão e reflexão para o filme LbL de PEI/PVS com 5 bicamadas. A curva vermelha representa a segunda derivada do espectro de transmissão e reflexão.

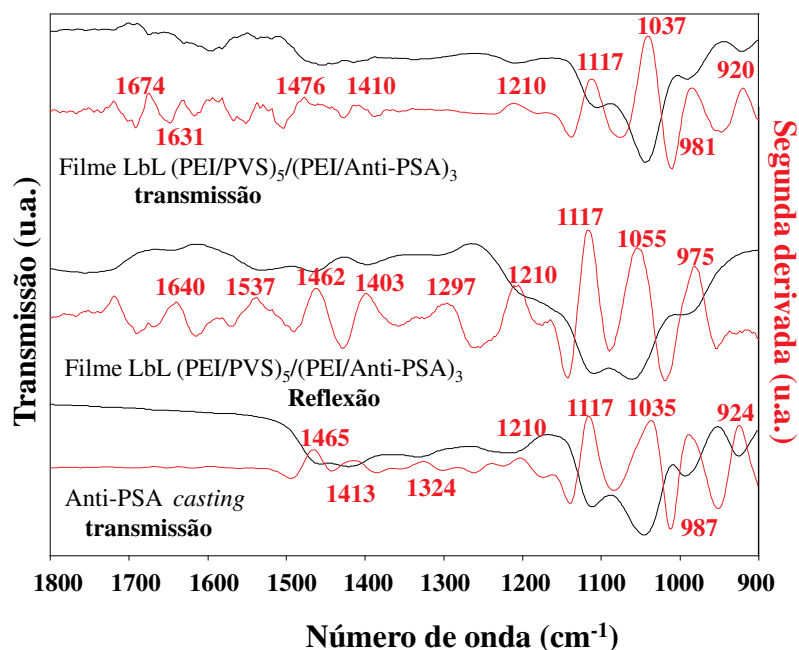


Fonte 31: Elaborado pelo autor.

O espectro no modo reflexão revela bandas que são oriundas de grupos químicos orientados preferencialmente perpendiculares ao plano do substrato, e mostra um modo vibracional do PVS em 1223 cm^{-1} até então não observado no modo de transmissão. Este modo deve ser um estiramento assimétrico do grupo SO_3^- . O espectro no modo reflexão é um espectro complementar ao modo de transmissão, portanto, confirma o aparecimento de novas bandas resultante das interações químicas entre PEI e o PVS. Sem essa complementaridade, pode-se afirmar que algumas bandas apenas trocaram de orientação no plano do substrato. Mas com esses dois espectros, fica claro que o aparecimento das novas ligações químicas governam o crescimento do filme LbL.

Os filmes LbL de PEI/PVS servem como um colchão para a camada ativa do biossensor, composta por um outro filme LbL de PEI e um anticorpo Anti-PSA. Como o Anti-PSA deve ser algo muito grande e desorganizado (da ordem de alguns nanômetros de dimensão), diferente de uma cadeia polimérica, fica difícil atribuir especificamente as bandas encontradas em seu espectro FTIR. Mas se o espectro FTIR de um filme *casting* do Anti-PSA for comparado com o espectro do material supostamente imobilizado em um filme LbL será possível saber se este material foi ou não adsorvido. A Figura 33 apresenta os espectros *casting* para o Anti-PSA no modo transmissão, e espectros no modo transmissão e reflexão para o filme LbL $(\text{PEI/PVS})_5/(\text{PEI/antiPSA})_3$. Nos espectros da Figura 33 aparece uma banda em 1117 cm^{-1} que é atribuída a algum modo vibracional do Anti-PSA. Esse modo está presente tanto no espectro de transmissão quanto no de reflexão do filme contendo Anti-PSA imobilizado, e é uma evidencia da adsorção do anticorpo no filme. Algumas outras bandas relacionadas ao filme de PEI/PVS também mudam de posição e intensidade, revelando que a adsorção do anticorpo ao filme perturba a camada de colchão previamente adsorvida.

Figura 33: Espectros FTIR no modo transmissão e reflexão para o filme LbL de (PEI/PVS)₅/(PEI/Anti-PSA)₃ e espectro de FTIR do filme *casting* do anticorpo Anti-PSA. A curva vermelha representa a segunda derivada do espectro de transmissão e reflexão.



Fonte 32: Elaborado pelo autor.

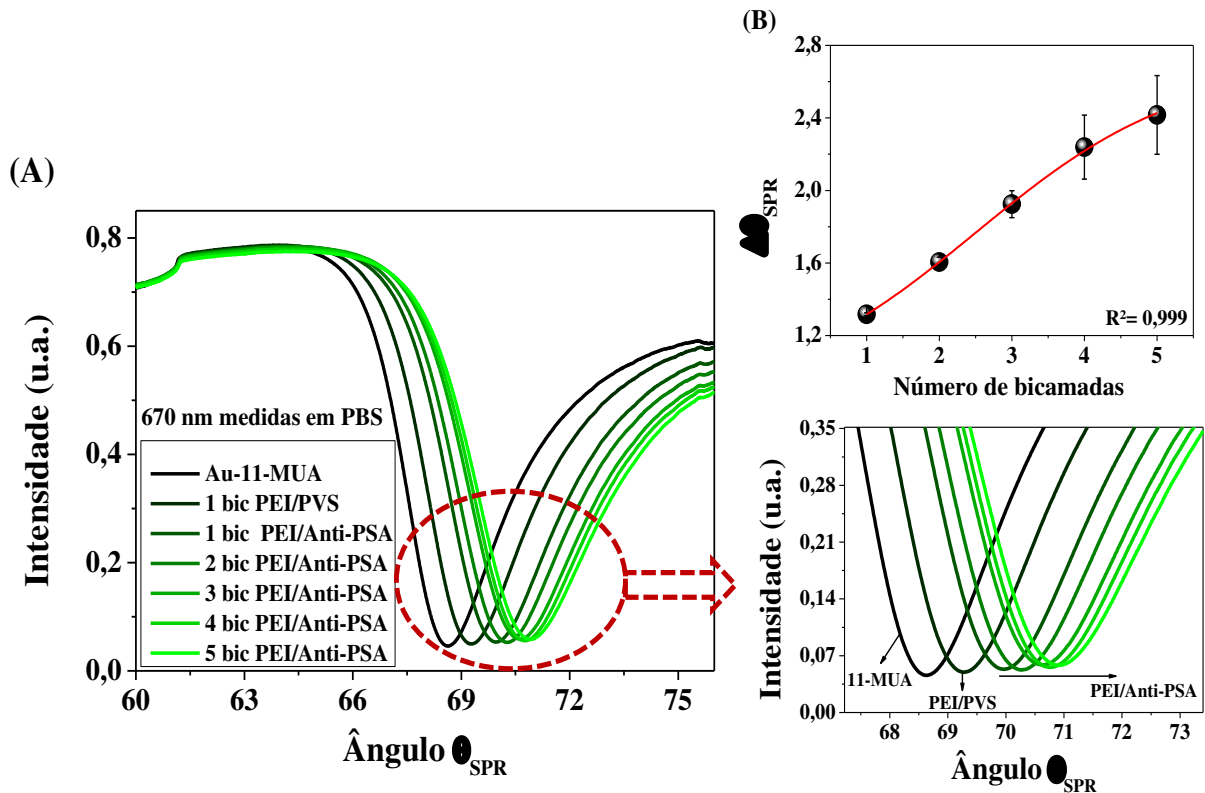
4.6 Caracterização dos filmes depositados sobre o sensor de SPR

A técnica de SPR é uma ferramenta muito sensível para estudar a modificação de superfícies, pois se ocorrer qualquer alteração no índice de refração da superfície será necessário uma mudança no ângulo de incidência da radiação para que ocorra o fenômeno de SPR. Portanto, a técnica foi utilizada para caracterizar os filmes de PEI/PVS, PEI/Anti-PSA e PEI/Anti-PSA+DPPG, a fim de verificar a deposição dos polieletrólitos, do anticorpo livre e incorporado em lipossomo sobre o sensor de SPR para um posterior teste como sensor óptico para detecção do antígeno PSA. Além disso, através das curvas de SPR que apresenta a intensidade da radiação refletida em função do ângulo de incidência, determinou-se a espessura e o índice de refração (IR) das bicamadas de filmes usando o *software* WinSpall versão 3.02.

4.6.1 Filme PEI/Anti-PSA

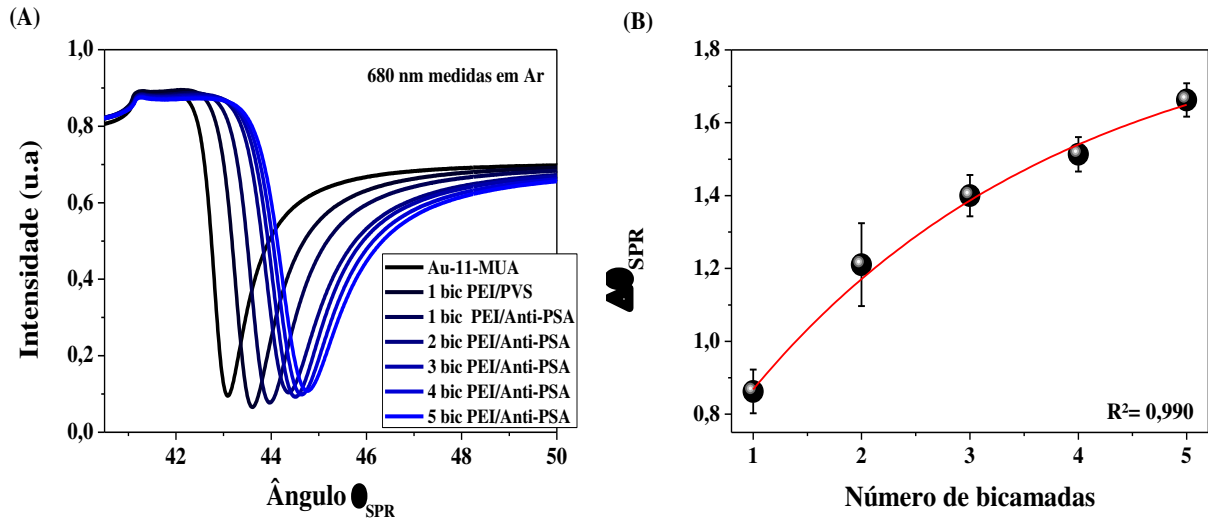
A Figura 34 (A) e a Figura 35 (A) apresentam as curvas de SPR obtidas para a superfície do ouro modificada com a monocamada automontada (SAM) de 11-MUA e para cada bicamada de filme PEI/PVS e PEI/Anti-PSA depositados e monitorados em PBS e Ar, respectivamente.

Figura 34: Em (A) curva de SPR apresentando a intensidade em função do ângulo de incidência, θ_{SPR} , das bicamadas de PEI/PVS e PEI/Anti-PSA depositadas sobre o sensor de ouro modificada com 11-MUA, monitorado em tampão PBS e temperatura de 20°C. Em (B) curva de crescimento do filme PEI/Anti-PSA apresentado a variação do ângulo, $\Delta\theta_{SPR}$, em função do número de bicamadas.



Fonte 33: Elaborado pelo autor.

Figura 35: Em (A) curva de SPR apresentando a intensidade em função do ângulo de incidência, θ_{SPR} , das bicamadas de PEI/PVS e PEI/Anti-PSA depositado sobre o sensor de ouro modificado com 11-MUA, monitorado em AR e temperatura de 20°C. Em (B) curva de crescimento do filme PEI/Anti-PSA apresentado a variação do ângulo, $\Delta\theta_{\text{SPR}}$, em função do número de bicamadas.



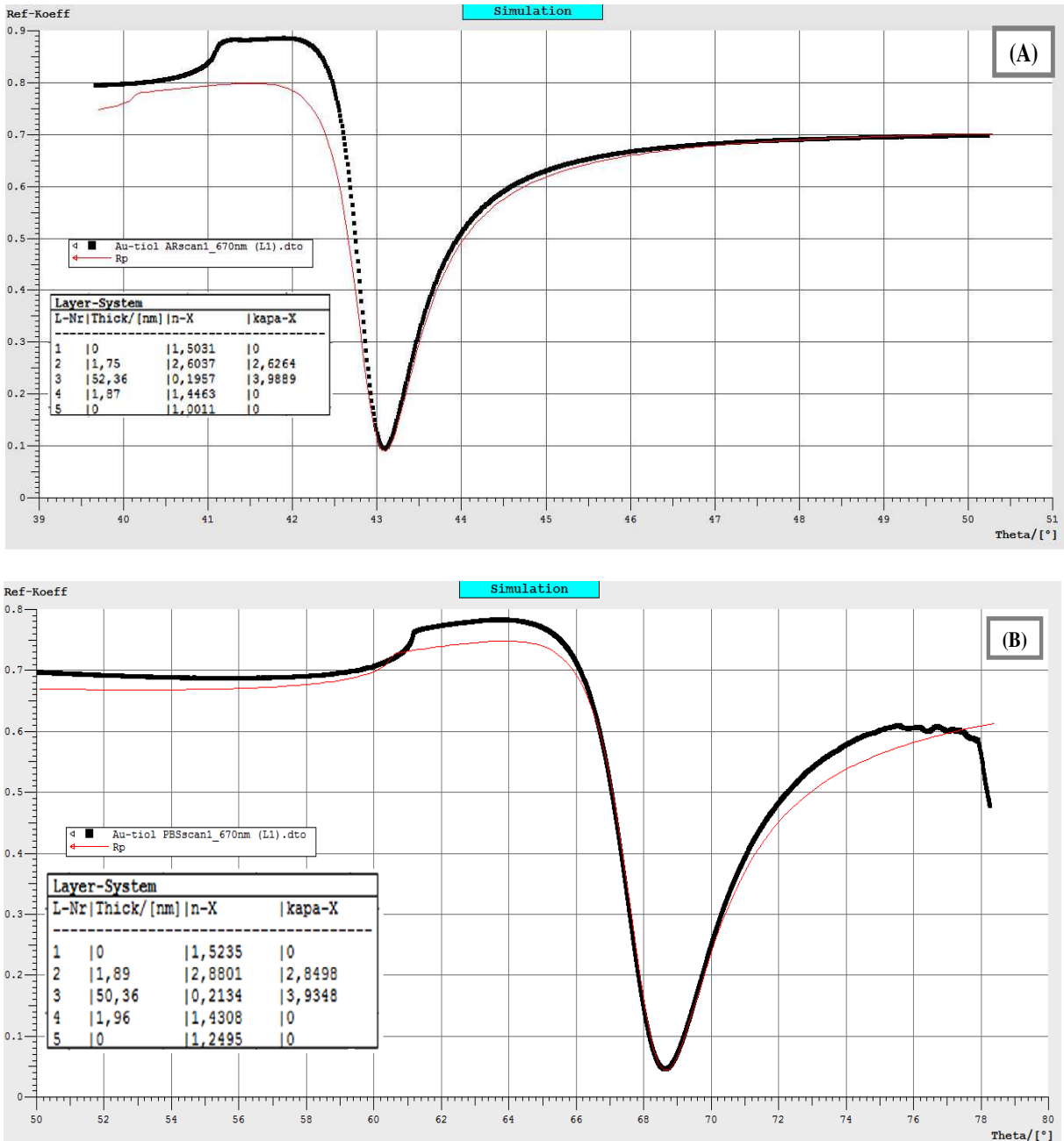
Fonte 34: Elaborado pelo autor.

A deposição da monocamada de 11-MUA provocou uma mudança no índice de refração da superfície do sensor de ouro e consequentemente causou o deslocamento do pico mínimo de intensidade para maiores valores de ângulo de incidência, θ_{SPR} . O valor foi de $68,625^\circ$ e está próximo do valor obtido por Miyazaki, et. al ($68,689^\circ$)^[57] para a medida em PBS. Já o valor de θ_{SPR} do mesmo sensor modificado e monitorado em AR foi de $43,089^\circ$ que é superior ao valor do ouro puro ($\sim 43^\circ$), comprovando a modificação da superfície do sensor com o 11-MUA. As subsequentes deposições do colchão (PEI/PVS) e das 5 bicamadas dos filmes (PEI/Anti-PSA) também provocaram mudanças no índice de refração da superfície do sensor. Através das simulações com *software* WinSpall foram obtidos valores de $\text{IR}_{\text{PEI/PVS}} = 1,41 \pm 0,03$ e $\text{IR}_{(\text{PEI/Anti-PSA})5} = 1,47 \pm 0,07$. Estas mudanças causaram o aumento do ângulo de incidência, mostrando que os polieletrólitos e o anticorpo também foram depositados sobre o sensor.

A Figura 34 (B) e a Figura 35 (B) mostram a variação do ângulo de SPR ($\Delta\theta_{\text{SPR}}$) em relação ao número de bicamadas imobilizadas. Através dos resultados foi possível verificar que em ambos os meios (Ar e tampão PBS), o filme PEI/Anti-PSA apresentou um regime de crescimento que tende a uma saturação após a terceira bicamada. Em comparação com o mesmo filme depositado sobre o quartzo e caracterizado por UV-vis, Figura 28, verifica-se regimes de crescimento diferentes para a deposição dos mesmos materiais, o que pode estar relacionado com o tipo de substrato e a presença da monocamada de 11-MUA depositada no sensor de SPR.

A partir das curvas de SPR é possível determinar o índice de refração (IR) e a espessura (d) dos materiais depositados sobre o sensor. Na literatura dois métodos vêm sendo empregados: (i) simulação das curvas de SPR obtidas dos materiais depositados e medidos em dois meios com índice de refração diferente, por exemplo, Ar e água; (ii) simulação das curvas de SPR dos materiais depositados e medidos com diferentes comprimentos de onda de radiação ^[93, 94]. Desta maneira, a espessura e o índice de refração de uma camada de filme LbL de PEI, uma camada de PVS e as bicamadas de PEI/PVS e PEI/Anti-PSA foram simuladas com *software* WinSpall usando as curvas de SPR obtidas com a excitação em 670 nm e dois meios, AR e tampão PBS. A Figura 36 (A) e (B) apresenta as curvas de SPR para o sensor de ouro modificado com 11-MUA medido em AR e tampão PBS, respectivamente, e a curva ajustada (*fitting*) pelo *software* (curva em vermelho) que foi usado como base para a simulação das curvas de SPR resultantes da deposição dos demais materiais. Também são apresentados os valores da espessura (nm), índice de refração (representado como n tabela) e o índice kapa para o prisma (1), a camada de cromo (2), o filme de ouro (3), a monocamada de 11-MUA (4) e o meio em que as medidas foram realizadas (AR ou PBS) (5). Os valores estão próximos dos especificados pela BioNavis, fornecedor dos sensor.

Figura 36: Simulação das curvas de SPR para o ouro modificado com 11-MUA e monitorado em AR (A) e PBS (B).

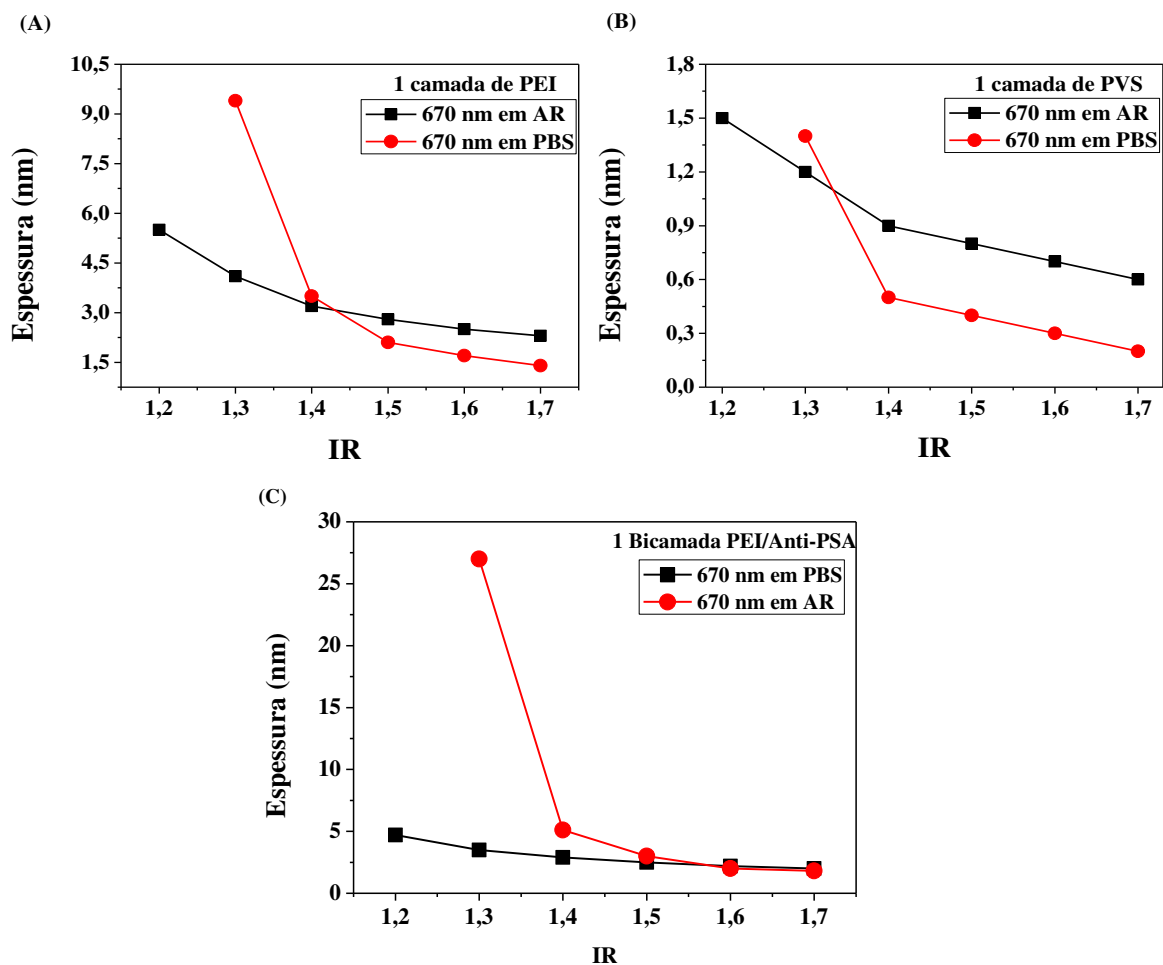


Fonte 35: Elaborado pelo autor.

Os valores obtidos com a simulação foram traçados em um gráfico que relaciona a espessura, d em nm, com índice de refração de cada camada ou bicamada depositada. Os valores de d e IR foram determinados através da intersecção das duas curvas, como mostra a Figura 37 (A) para 1 camada de filme de PEI, Figura 37 (B) para 1 camada de PVS e Figura

37 (C) para 1 bicamada de PEI/Anti-PSA. Os valores encontrados foram: $d_{PEI} = 3,08 \pm 0,08$ nm e $IR_{PEI} = 1,43 \pm 0,02$, cujo valor de IR corrobora com o obtido por SURIYANARAYANAN *et al.* para um filme *self-assembly* de PEI depositado sobre superfície do ouro modificado com 11-MUA^[95], $d_{PVS} = 1,10 \pm 0,05$ nm e $IR_{PVS} = 1,33 \pm 0,03$ e $d_{(PEI/Anti-PSA)_1} = 2,23 \pm 0,05$ nm e $IR_{(PEI/Anti-PSA)_1} = 1,57 \pm 0,06$. Foi simulado também a bicamada de PEI/PVS e o valor obtido para espessura foi $d_{PEI/PVS} = 4,11 \pm 0,10$ nm que está próximo da soma da espessura obtida para cada camada de polieletrólito depositada individualmente e índice de refração foi de $IR_{PEI/PVS} = 1,41 \pm 0,03$

Figura 37: Gráfico que relaciona os valores simulados de espessura (nm) em função dos valores simulados de IR para 1 camada de PEI (A), 1 camada de PVS (B) e 1 bicamada de PEI/Anti-PSA (C).



Fonte 36: Elaborado pelo autor.

Na Tabela 2 estão apresentados os valores de espessura de cada bicamada depositada. Foram obtidas bicamadas bem finas de material depositado, o que pode ser atribuído à técnica LbL e aos parâmetros de solução utilizados, onde os polieletrólitos (1 mg.mL^{-1}) e o Anti-PSA ($10 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram preparados em tampão PBS (5 mmol.L^{-1}) e pH 7,4. Além disso, observa-se que a partir da 3ª bicamada de PEI/Anti-PSA a espessura diminui muito em relação a primeira e a segunda bicamada, indicando que pouco material é depositado. A espessura total do filme $(\text{PEI/PVS})_1/(\text{PEI/Anti-PSA})_5$ foi de 11,43 nm.

Tabela 2: Espessura de cada bicamada de filme PEI/PVS e PEI/Anti-PSA.

	Espessura (nm)
1 Bic PEI/PVS	$4,11 \pm 0,10$
1ª Bic PEI/Anti-PSA	$2,23 \pm 0,05$
2ª Bic PEI/Anti-PSA	$2,72 \pm 0,06$
3ª Bic PEI/Anti-PSA	$0,80 \pm 0,10$
4ª Bic PEI/Anti-PSA	$0,78 \pm 0,02$
5ª Bic PEI/Anti-PSA	$0,79 \pm 0,09$
Total	11,43

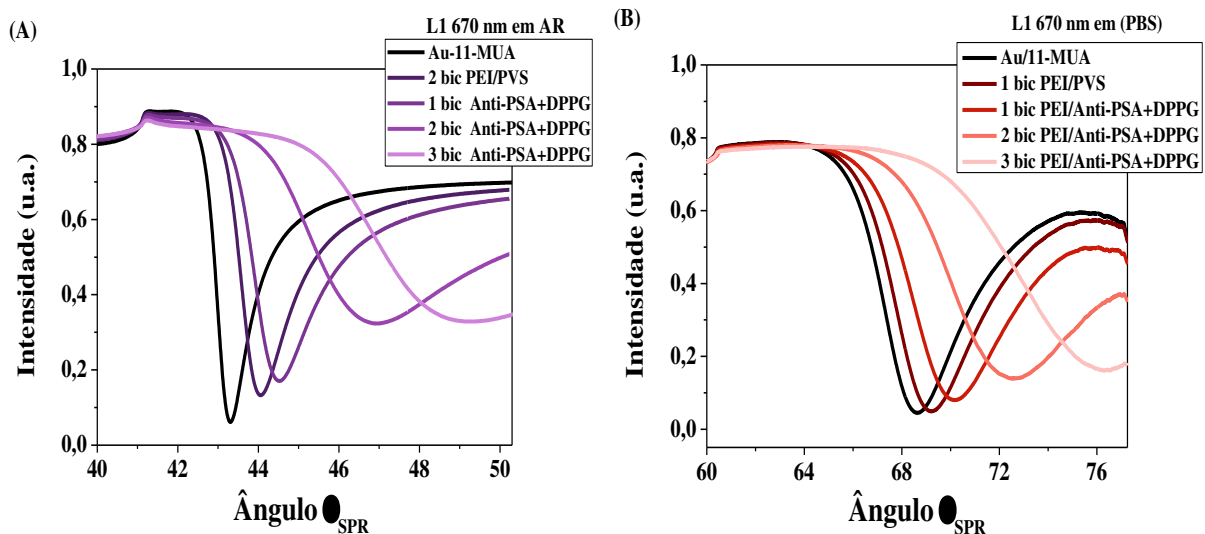
4.6.2 Filme PEI/Anti-PSA+DPPG

A Figura 38 (A) apresenta as curvas de SPR dos valores de intensidade em função do ângulo de incidência da radiação para cada bicamada de filme de PEI/PVS e PEI/Anti-PSA+DPPG depositada e monitorada em Ar e a Figura 38 (B) traz os mesmos filmes monitorados em PBS. Através dos resultados foi possível verificar o grande deslocamento do pico mínimo de intensidade para maiores valores de ângulo de incidência e o deslocamento da intensidade da curva de SPR com as sucessivas deposições das bicamadas de filme PEI/Anti-PSA+DPPG. O filme foi monitorado até a 3 bicamada, pois os lipossomos deixam o filme

opaco e a absorção e espalhamento causado por este material dificultam a ocorrência do fenômeno de SPR.

Não foi possível determinar o índice de refração e a espessura do filme de PEI/Anti-PSA+DPPG usando o *software*, no entanto, sabe-se que variação do ângulo e a variação da intensidade estão relacionadas com estes parâmetros dos materiais depositados, assim sendo, é possível inferir que o filme de PEI/Anti-PSA+DPPG é mais espesso do que o filme de PEI/Anti-PSA, e isto também pode ser atribuído à presença dos lipossomos de DPPG do tipo multilamelar que possuem diâmetros que podem variar de 100-1000 nm [96].

Figura 38: Curva de SPR apresentando a intensidade em função do ângulo de incidência, θ_{SPR} , das bicamadas de PEI/PVS e PEI/Anti-PSA+DPPG depositado sobre o sensor de ouro modificado com 11-MUA, monitorado à 20°C e dois meios: (A) em AR e (B) em PBS.

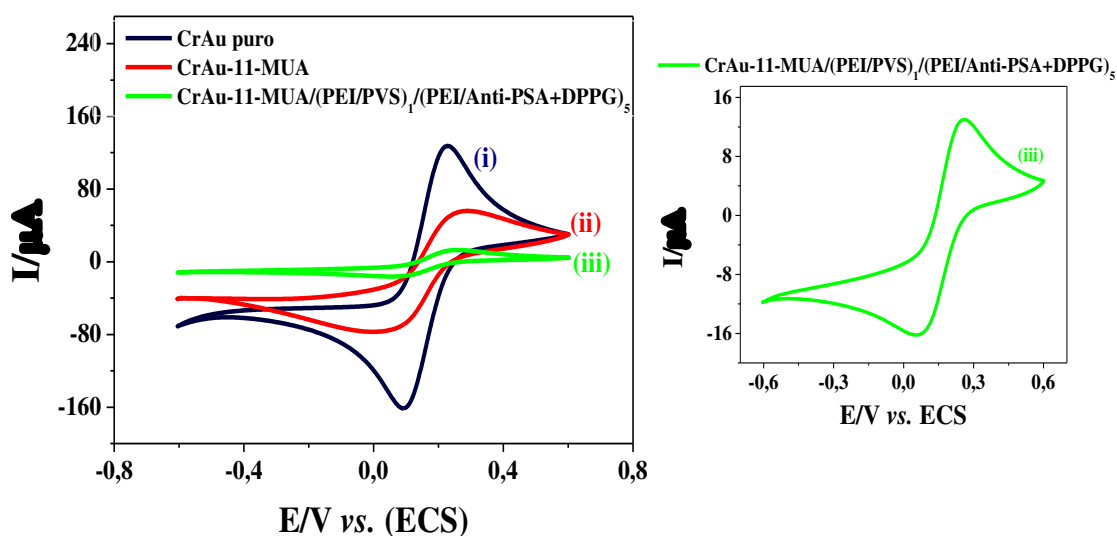


Fonte 37: Elaborado pelo autor.

4.7 Caracterização do filme nanoestruturado depositado sobre CrAu por Voltametria Cíclica (VC)

A técnica de VC pode fornecer informações importantes sobre as mudanças do comportamento eletroquímico do eletrodo após cada etapa de fabricação do imunossensor. Nesta etapa do trabalho, a técnica de VC foi utilizada com o propósito de verificar a adsorção dos materiais na superfície do eletrodo CrAu, para posterior teste como sensor eletroquímico para a detecção do PSA. Para isto, utilizou-se como mediador redox o ferricianeto de potássio, $K_3[Fe(CN)_6]$ 5 mmol.L^{-1} solubilizado em solução de KCl $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ e diluído em PBS, pH 7,4, na proporção 1:1 (V/V). Todas as medidas foram realizadas com velocidade de varredura 10 mV.s^{-1} , em uma janela de potencial de -0,7 a 0,7 V vs. ECS. A Figura 39 traz os voltamogramas cíclicos para o eletrodo CrAu puro (i), CrAu modificado com 11-MUA (ii) e CrAu-11-MUA com cinco bicamadas de filme LbL $(PEI/PVS)_1/(PEI/Anti-PSA+DPPG)_5$ (iii).

Figura 39: (A) Voltamogramas cíclicos do eletrodo CrAu puro (i), CrAu-11-MUA (ii) e CrAu-11-MUA $(PEI/PVS)_1/(PEI/Anti-PSA+DPPG)_5$ (iii), realizados em solução PBS contendo $K_3Fe(CN)_6$ 5 mmol.L^{-1} diluído na proporção 1:1 (V/V), com velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} .



Fonte 38: Elaborado pelo autor.

Através da transferência de carga do par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ na superfície do eletrodo CrAu puro é possível verificar um voltamograma cíclico reversível, com picos de oxidação e redução do ferro bem definidos, como descritos na literatura [97]. A Tabela 3 apresenta os valores de potencial dos picos anódicos e catódicos (E_{pa} e E_{pc}), bem como os valores de corrente anódica e catódica (I_a e I_c) obtidas dos voltamogramas cíclicos após cada etapa de fabricação do imunossensor.

Tabela 3: Valores de E_{pa} , E_{pc} , I_a e I_c obtidos dos voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 40.

Eletrodo de trabalho (10 mV.s⁻¹)	E_{pa} /V vs. ECS	I_a /μA	E_{pc} /V vs. ECS	I_c /μA
CrAu puro	0,23	127,50	0,09	-162,00
CrAu-11-MUA	0,28	56,90	0,05	-75,00
CrAu-11-MUA/(PEI/Anti-PSA)₅	0,23	12,00	0,10	-15,40

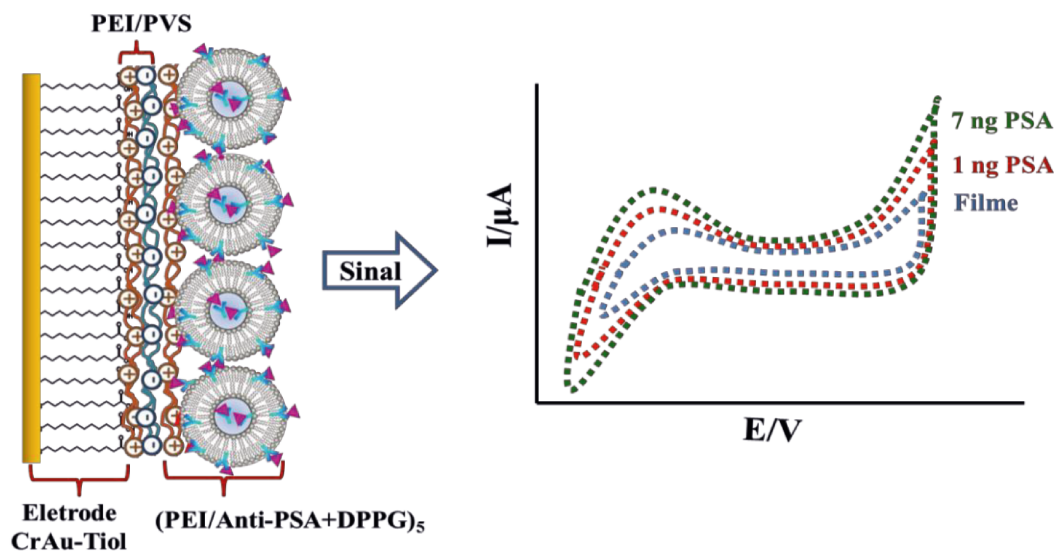
Para o eletrodo CrAu puro verificaram-se $E_{pa}= 0,23$ V e $E_{pc}=0,09$ V, vs. ECS, que correspondem, respectivamente, aos potenciais de oxidação ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) e redução do ferro ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) na superfície do eletrodo [97]. O eletrodo modificado com 11-MUA apresentou um pequeno deslocamento dos picos redox, além de uma diminuição nos valores de corrente quando comparado com o eletrodo CrAu puro. Esta diminuição foi de 44,6% para corrente anódica e 46,3% para a corrente catódica. Observou-se também que a redução no valor de corrente foi ainda maior após a imobilização do filme LbL de PEI/Anti-PSA+DPPG, correspondendo a 9,4% para corrente anódica e 12,0% para a corrente catódica, em comparação com o eletrodo puro. As diminuições nos valores de corrente indicam que tanto o 11-MUA quanto as bicamadas de filme LbL de PEI/Anti-PSA+DPPG foram adsorvidas na superfície do eletrodo CrAu e causam o bloqueio parcial da transferência de elétrons entre o par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ e o eletrodo.

4.8 Detecção do antígeno PSA por diferentes técnicas

4.8.1 Voltametria Cíclica do filme $(PEI/PVS)_1/(PEI/Anti-PSA+DPPG)_5$

O filme nanoestruturado composto por $(PEI/PVS)_1/(PEI/Anti-PSA+DPPG)_5$ foi estudado como um possível imunossensor para detecção eletroquímica do antígeno PSA. A Figura 40 mostra uma representação do sistema estudado.

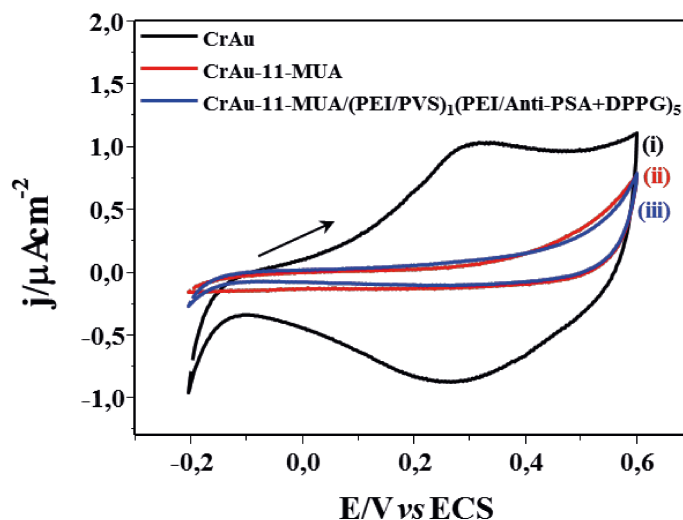
Figura 40: Representação esquemática da detecção do PSA pelo filme de $(PEI/PVS)_1/(PEI/Anti-PSA+DPPG)_5$.



Fonte 39: Elaborado pelo autor.

As medidas de VC foram realizadas como descrito no item 3.11. Inicialmente caracterizou-se os eletrodos de trabalho CrAu puro (i), CrAu modificado com 11-MUA (ii) e CrAu-11-MUA/ $(PEI/PVS)_1/(Anti-PSA+DPPG)_5$ (iii), usado como solução suporte o tampão PBS, pH 7,4, a fim de verificar o comportamento eletroquímico de cada sistema. Os resultados estão ilustrados na Figura 41.

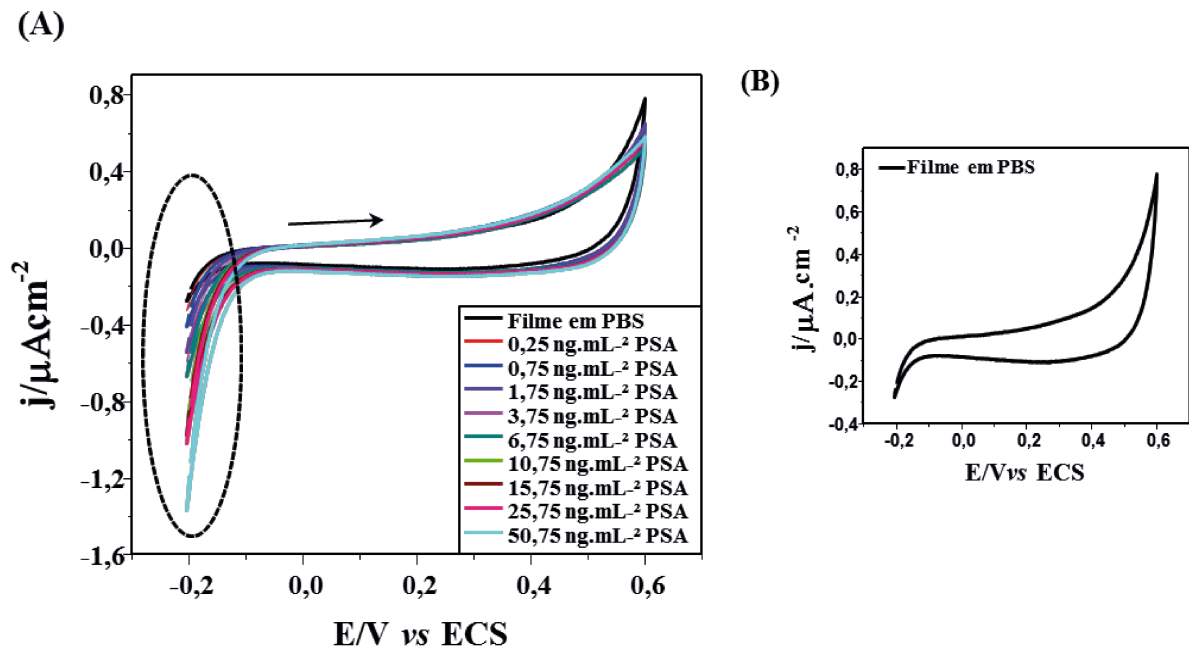
Figura 41: Voltametria Cíclica dos eletrodos, (i) CrAu puro, (ii) CrAu-11-MUA e (iii) CrAu-11-MUA/(PEI/PVS)₁/(PEI/Anti-PSA+DPPG)₅ em PBS, pH 7,4 com velocidade de varredura de 10 mV.s⁻¹.



Fonte 40: Elaborado pelo autor.

A deposição do 11-MUA e do filme com cinco bicamadas de (PEI/PVS)₁/(PEI/Anti-PSA+DPPG)₅ alteraram o comportamento eletroquímico do eletrodo CrAu puro, resultando na diminuição da área do voltamograma e na eliminação dos picos catódico e anódico em +0,26 V e +0,3 V vs. ECS, respectivamente. Estas alterações podem indicar que tanto o 11-MUA, quanto o filme nanoestruturado de (PEI/PVS)₁/(PEI/Anti-PSA+DPPG)₅ estão adsorvidos na superfície do eletrodo de CrAu e provocam o bloqueio parcial da sua superfície. Comparando o voltamograma do eletrodo contendo o filme (PEI/PVS)₁/(PEI/Anti-PSA+DPPG)₅ com o voltamograma do eletrodo CrAu-11-MUA, verifica-se uma alteração de corrente no potencial de -0,2 V vs. ECS que pode estar associada à presença do Anti-PSA adsorvido na superfície do eletrodo. A Figura 42 apresenta os voltamogramas do eletrodo modificado com (PEI/PVS)₁/(PEI/Anti-PSA+DPPG)₅ e incubado por 10 min com 35 μL de diferentes concentrações do antígeno PSA. A solução de antígeno PSA deixada em contato com o filme intensificou a corrente no potencial -0,2 V vs. ECS indicando uma possível interação entre o antígeno e o anticorpo presente no filme.

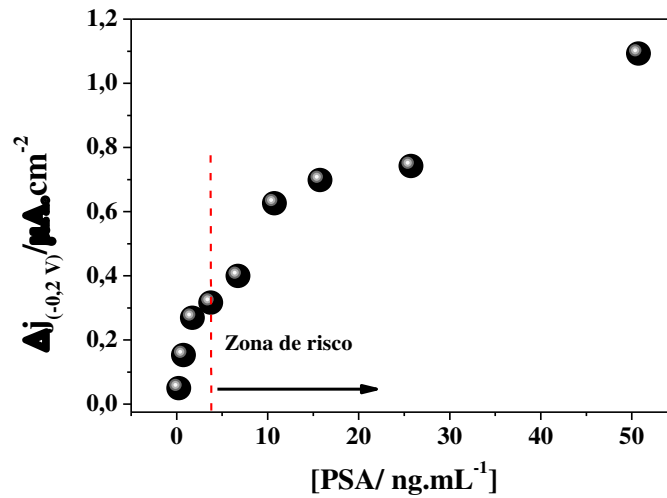
Figura 42: Voltamogramas cíclicos, obtidos em PBS, pH 7,4 com velocidade de varredura de 10 mV.s^{-1} , do eletrodo CrAu-11-MUA com o filme $(\text{PEI/PVS})_1/(\text{PEI/Anti-PSA+DPPG})_5$ depositado, (A) incubado com antígeno PSA em diferentes concentrações e (B) do eletrodo modificado com o filme sem incubação de PSA.



Fonte 41: Elaborado pelo autor.

A Figura 43 apresenta o gráfico da variação da densidade de corrente (Δj) no potencial de $-0,2 \text{ V vs. ECS}$ em função da concentração do PSA, nesta também é indicado a zona de risco (concentrações acima de 4 ng.mL^{-1}) que indicam possível diagnóstico de câncer de próstata. Verifica-se que a detecção não segue um regime linear e tende à saturação com o aumento da concentração do antígeno. No entanto, são observadas alterações na densidade de corrente para as concentrações inferiores e superiores à concentração de PSA considerada normal para um indivíduo saudável ($\sim 4 \text{ ng.mL}^{-1}$), indicando a viabilidade do sistema CrAu-11-MUA/ $(\text{PEI/PVS})_1/(\text{PEI/Anti-PSA+DPPG})_5$ como imunossensor de PSA.

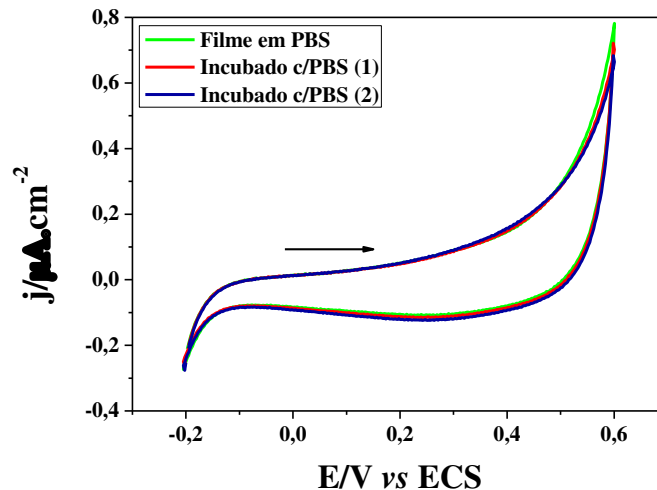
Figura 43: Gráfico da variação de corrente em $-0,2$ V vs. ECS em função da concentração de PSA.



Fonte 42: Elaborado pelo autor.

O filme $(\text{PEI/PVS})_1/(\text{PEI/Anti-PSA+DPPG})_5$ também foi "incubado" por 10 min com $35 \mu\text{L}$ de tampão PBS e, em sequência, submetido aos testes de VC, a fim de verificar se as alterações observadas poderiam ser devido à adsorção de sais na superfície do eletrodo. O resultado, mostrado na Figura 44 indica que o tampão não contribui para as alterações observadas no comportamento eletroquímico do eletrodo contendo o filme com anticorpo imobilizado.

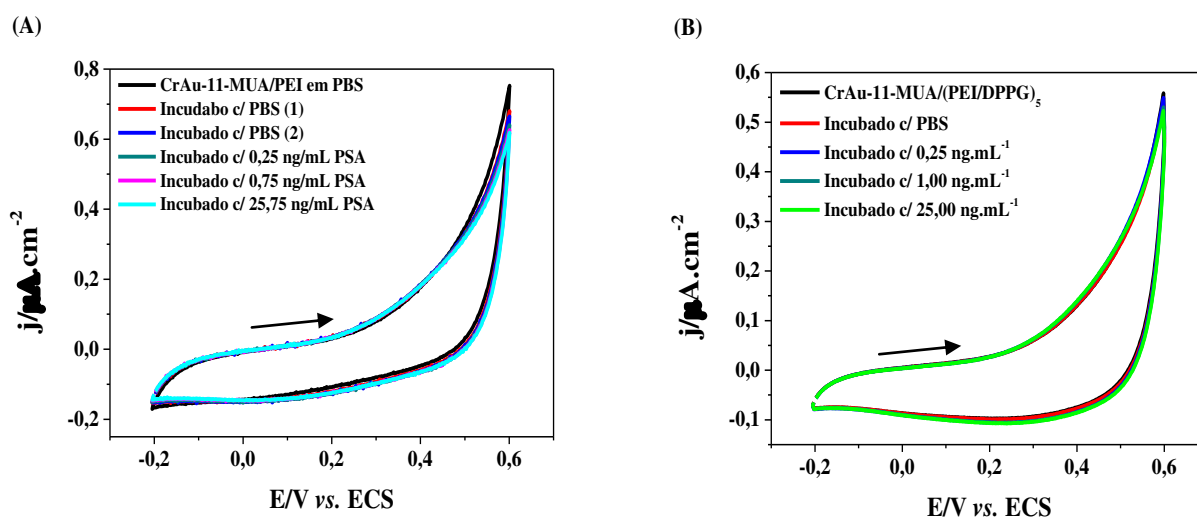
Figura 44: Voltamogramas cíclicos, obtidos em PBS, pH 7,4 com velocidade de varredura de 10 mV.s^{-1} , do eletrodo CrAu-11-MUA com o filme $(\text{PEI/PVS})_1/(\text{PEI/Anti-PSA+DPPG})_5$ depositado e incubado com PBS.



Fonte 43: Elaborado pelo autor.

Para confirmar se as alterações observadas não ocorriam devido à interação do antígeno PSA com os outros materiais que constituem o filme, PEI e lipossomo de DPPG, realizou-se testes de voltametria cíclica nos filmes CrAu-11-MUA/PEI e CrAu-11-MUA/(PEI/DPPG)₅ ausentes de anticorpo, após a incubação com 35 μ L de antígeno PSA e tampão PBS por 10 min. Os resultados apresentados na Figura 45 (A) e (B) mostram que, em ambos casos, a incubação, tanto com PSA quanto com o tampão PBS, não alteraram o comportamento eletroquímico do filme, o que mostra que as alterações de corrente no potencial -0,2 V vs. ECS só ocorrem na presença do anticorpo Anti-PSA imobilizado no filme LbL.

Figura 45: Voltamogramas cíclicos, obtidos em PBS pH 7,4 com velocidade de varredura de 10 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, dos eletrodos (A) CrAu-11-MUA/PEI e (B) CrAu-11-MUA/(PEI/DPPG)₅ após incubação com PBS e com PSA.



Fonte 44: Elaborado pelo autor.

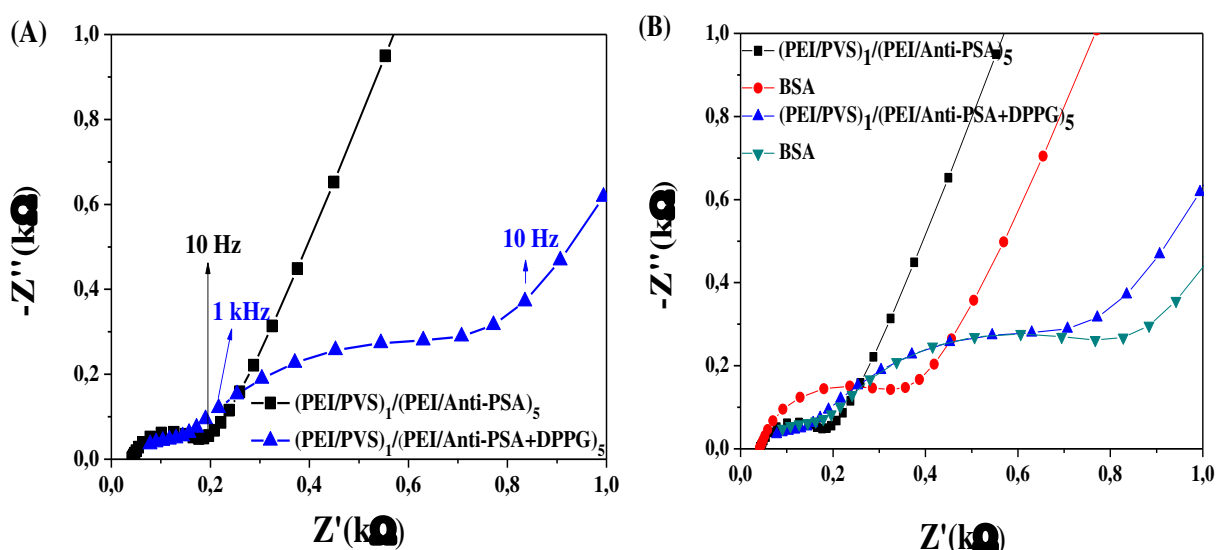
4.8.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica dos filmes de

(PEI/PVS)₁/(PEI/Anti-PSA)₅ e (PEI/PVS)₁/(PEI/Anti-PSA+DPPG)₅

Os filmes LbL de (PEI/PVS)₁/(PEI/Anti-PSA)₅ e (PEI/PVS)₁/(PEI/Anti-PSA+DPPG)₅ com cinco bicamadas depositadas sobre eletrodos de ouro modificado com 11-MUA foram caracterizados por medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) realizadas em solução de ferricianeto de potássio, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ solubilizado em solução de

KCl $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ e diluído em PBS, pH 7,4, na proporção 1:1 (V/V). Na Figura 46 (A) pode-se comparar a mudança no perfil do diagrama de Nyquist das duas arquiteturas de filmes, em que são observados dois semicírculos para o filme $(\text{PEI/PVS})_1/(\text{PEI/Anti-PSA+DPPG})_5$, sendo um deles em altas frequências (maiores que 1 kHz) que é referente a processos ôhmicos, ou seja, devido a modificação da superfície do eletrodo com o DPPG, e o segundo em frequências intermediárias (entre 10 e 1000 Hz) que representa a resistência de transferência (R_{tc}) de carga entre a interface e o analito. Os valores de R_{tc} foram obtidos no programa NOVA 1.11.1 pelo ajuste do semicírculo de cada medida. Para a arquitetura $(\text{PEI/PVS})_1/(\text{PEI/Anti-PSA})_5$ obteve-se $R_{tc} \approx 160,25 \ \Omega$ que é cerca de 10 vezes maior em relação à resposta do eletrodo de ouro puro $R_{tc} \approx 15,75 \ \Omega$ e 5,5 vezes menor em relação a $(\text{PEI/PVS})_1/(\text{PEI/Anti-PSA+DPPG})_5$ $R_{tc} \approx 887,71 \ \Omega$. Para as duas arquiteturas foram realizadas medidas antes e após a incubação com a solução de BSA ($0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$) e o resultado está apresentado na Figura 46 (B).

Figura 46: Em (A) Diagrama de Nyquist ($-Z''$ vs. Z') para os filmes $(\text{PEI/PVS})_1/(\text{PEI/Anti-PSA})_5$ e $(\text{PEI/PVS})_1/(\text{PEI/Anti-PSA+DPPG})_5$ antes e após incubação em solução de BSA, medidas em $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5 mmol.L^{-1} solubilizado em solução de KCl $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ e diluído em PBS, pH 7,4, na proporção 1:1 (V/V). Em (B) diagrama de Nyquist ($-Z''$ vs. Z') para os filmes na ausência e presença de BSA.

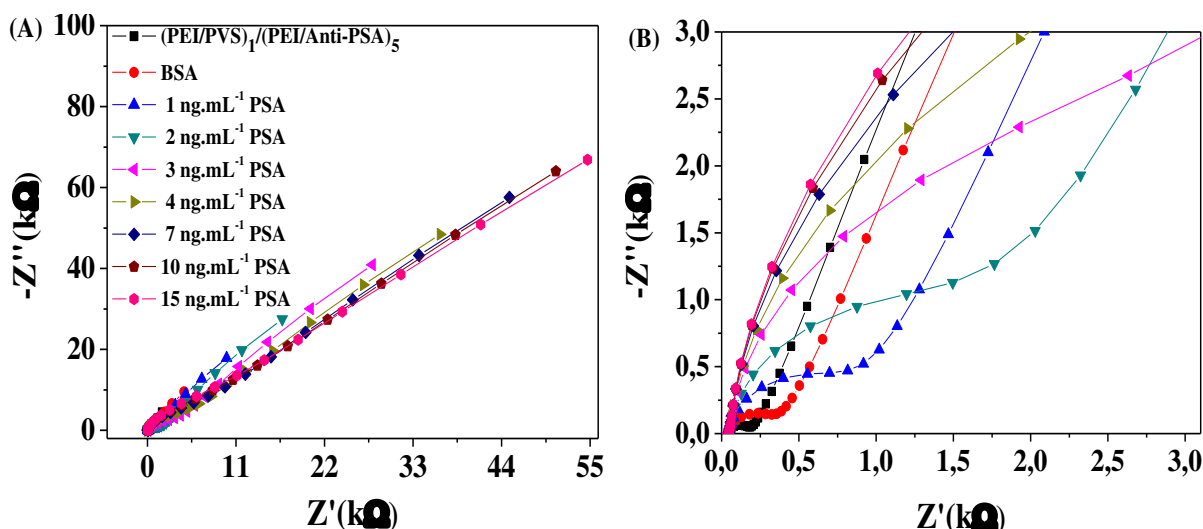


Fonte 45: Elaborado pelo autor.

A incubação com BSA foi realizada para evitar que os sítios não preenchidos pelos anticorpos Anti-PSA se mantivessem ativos, permitindo a ligação não específica do antígeno PSA. Em ambos os casos pode-se observar um aumento no semicírculo, na primeira $(\text{PEI/PVS})_1/(\text{PEI/Anti-PSA})_5$ temos um incremento para $R_{tc} \approx 359,66 \Omega$ e para a segunda $(\text{PEI/PVS})_1/(\text{PEI/Anti-PSA+DPPG})_5$ $R_{tc} \approx 948,51 \Omega$.

Após a caracterização dos filmes foram realizadas testes de detecção do antígeno PSA incubado por 10 min em diferentes concentrações (1 a 15 ng.mL^{-1}) e as medidas foram efetuadas em $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5 mmol.L^{-1} solubilizado em solução de KCl 0,5 mmol.L^{-1} e diluído em PBS, pH 7,4, na proporção 1:1 (V/V). Na Figura 47 (A) e (B) estão representados os diagramas de Nyquist e sua imagem ampliada, respectivamente.

Figura 47: Em (A) Diagrama de Nyquist ($-Z''$ vs. Z') para o filme $(\text{PEI/PVS})_1/(\text{PEI/Anti-PSA})_5$ medido em $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5 mmol.L^{-1} solubilizado em solução de KCl 0,5 mmol.L^{-1} e diluído em PBS, pH 7,4, na proporção 1:1 (V/V) e em (B) imagem ampliada.



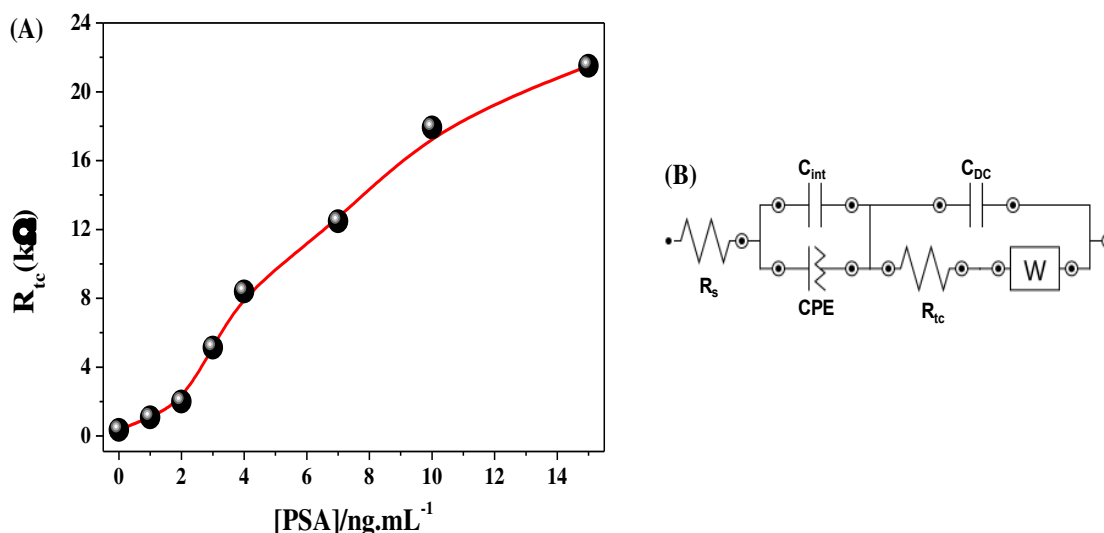
Fonte 46: Elaborado pelo autor.

Na Figura 47 (A) só é possível observar um aumento da resistência de difusão, o que pode ser explicado pelo aumento da dupla camada elétrica na interface do filme devido à ligação específica do antígeno PSA com o anticorpo Anti-PSA presente no filme, entretanto pela imagem ampliada da Figura 47 (B) pode-se notar claramente o aumento do semicírculo

da resistência de transferência de carga com a concentração de PSA, sendo este processo quase superposto devido ao aumento da dupla camada elétrica a partir da concentração de 4 ng.mL^{-1} .

Os valores de R_{tc} obtidos pelo ajuste do semicírculo são mostrados na Figura 48 (A). O gráfico apresenta um comportamento exponencial e mesmo com altas concentrações não atingiu sua saturação. Na Figura 48 (B) está representado o modelo do circuito elétrico associado ao sistema utilizado nas medidas eletroquímicas. O circuito é composto por uma resistência ôhmica (R_s), um capacitor (C_{int}) em paralelo a um elemento de fase constante (CPE) representando a camada de filme $(\text{PEI/PVS})_1/(\text{PEI/Anti-PSA})_5$, uma capacitância (C_{dc}) referente à formação de dupla camada em paralelo à uma resistência de transferência de carga (R_{tc}) que está em série à uma impedância de Warburg (W) referente ao processo de difusão de cargas.

Figura 48: Em (A) gráfico da resistência de transferência de carga em função da concentração de PSA e em (B) modelo de circuito elétrico equivalente ao sistema de medidas utilizado.

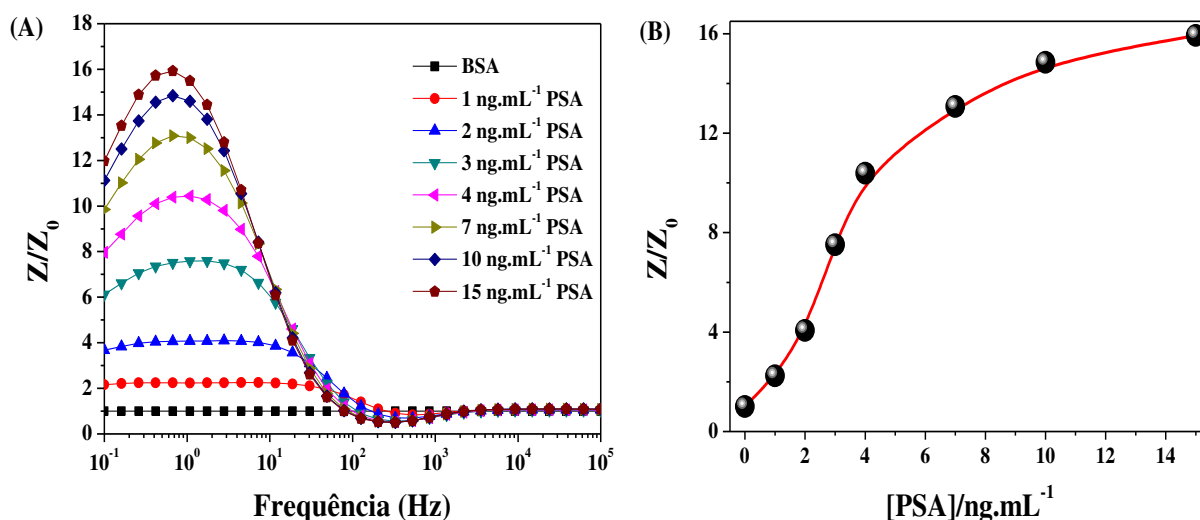


Fonte 47: Elaborado pelo autor.

Para melhor analisar os dados acima, os espectros de impedância em função da frequência foram calculados em relação à medida sem o analito, ou seja, foi calculada a razão

entre as medidas variando a concentração de antígeno e a medida obtida com o $(\text{PEI/PVS})_1/(\text{PEI/Anti-PSA})_5/\text{BSA}$. A Figura 49 (A) apresenta claramente que a região do espectro que mais contribui para a detecção do antígeno PSA é a de baixa frequência (0,1 a 10 Hz) com pequena contribuição da região intermediária, o que pode ser claramente identificado pelo aumento da dupla camada elétrica devido à adsorção do antígeno pelo anticorpo presente na superfície do eletrodo. O modelo de Langmuir-Freundlich ^[98, 99] tem sido usado como modelo para demonstrar mecanismos de adsorção em biossensores ^[99]. Portanto, o valor do máximo da razão do módulo de impedância na frequência de 1 Hz, em função da concentração de PSA incubado, foi simulado com o modelo de Langmuir e Langmuir-Freundlich, a fim de se obter um melhor ajuste para mostrar o mecanismo de adsorção do PSA. A Figura 49 (B) apresenta o gráfico, em que se observa um comportamento exponencial para adsorção tipo Langmuir-Freundlich.

Figura 49: Em (A) razão do módulo da impedância em função da frequência para diferentes concentrações de PSA para o filme $(\text{PEI/PVS})_1/(\text{PEI/Anti-PSA})_5$ medido em $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5 mmol.L^{-1} solubilizado em solução de KCl $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ e diluído em PBS, pH 7,4, na proporção 1:1 (V/V) e em (B) valor máximo do pico da razão do módulo da impedância em função da concentração de PSA, ajustado com o modelo de Langmuir-Freundlich.

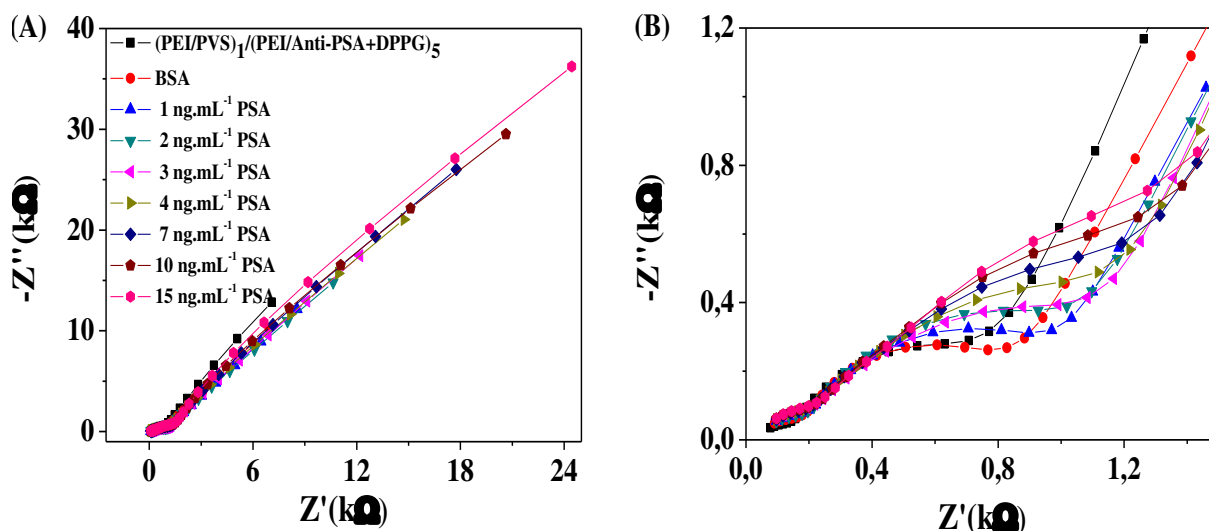


Fonte 48: Elaborado pelo autor.

Os experimentos de detecção também foram realizados para a arquitetura de $(\text{PEI/PVS})_1/(\text{PEI/Anti-PSA+DPPG})_5$ usando diferentes concentrações de PSA, entre 1 e 15

ng.mL^{-1} , e medido em solução de em $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5 mmol.L^{-1} solubilizado em solução de KCl $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ e diluído em PBS, pH 7,4, na proporção 1:1 (V/V). Na Figura 50 (A) e (B) estão representados os diagramas de Nyquist e sua imagem ampliada, respectivamente, novamente observa-se um aumento da resistência de difusão, entretanto pela imagem ampliada da Figura 50 (B), pode-se notar a existência de dois semicírculos, como já visto nos resultados da Figura 46. Neste caso ocorre um aumento apenas no semicírculo da resistência de transferência de carga com a concentração de PSA, e fica claro o efeito capacitivo da interação do antígeno/anticorpo, pois o mesmo não é superposto pelo processo de difusão de cargas.

Figura 50: Em (A) diagrama de Nyquist ($-Z''$ vs. Z') para o filme $(\text{PEI/PVS})_1/(\text{PEI/Anti-PSA+DPPG})_5$ medido em $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5 mmol.L^{-1} solubilizado em solução de KCl $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ e diluído em PBS, pH 7,4, na proporção 1:1 (V/V) e em (B) imagem ampliada.

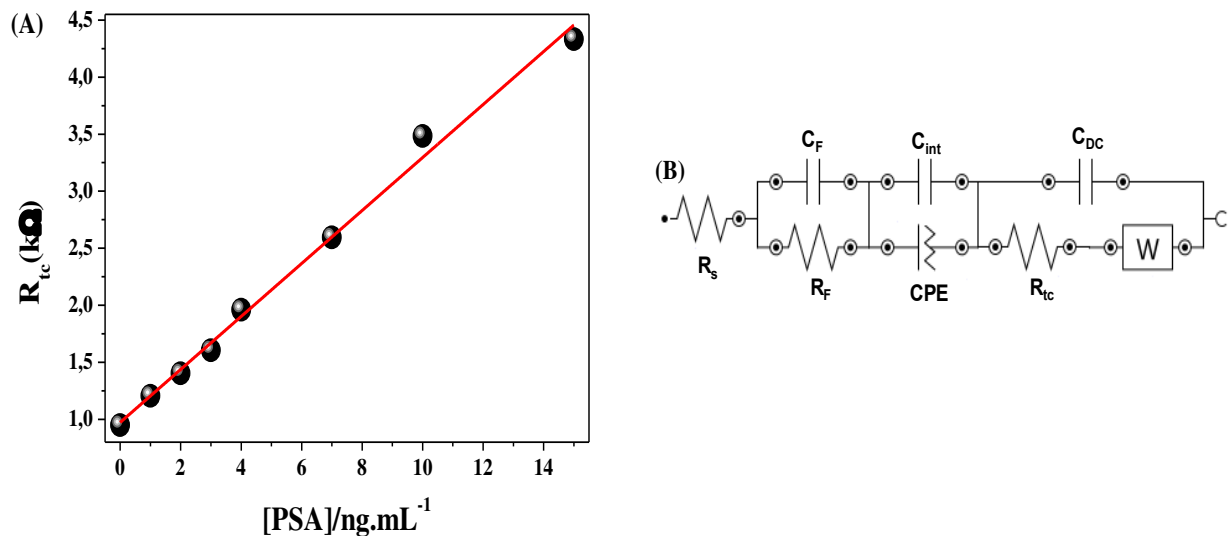


Fonte 49: Elaborado pelo autor.

Os valores de R_{tc} obtidos pelo ajuste do semicírculo são mostrados na Figura 51 (A), em função da concentração de PSA, no qual é observado um comportamento linear. Na Figura 51 (B) está representado o modelo do circuito elétrico associado ao sistema utilizado nas medidas eletroquímicas. O circuito é parecido com o proposto para a arquitetura $(\text{PEI/PVS})_1/(\text{PEI/Anti-PSA})_5$ adicionando no modelo apenas uma capacitância (C_F) em

paralelo à uma resistência (R_F) referente à presença do fosfolípido DPPG na arquitetura $(PEI/PVS)_1/(PEI/ Anti-PSA+DPPG)_5$.

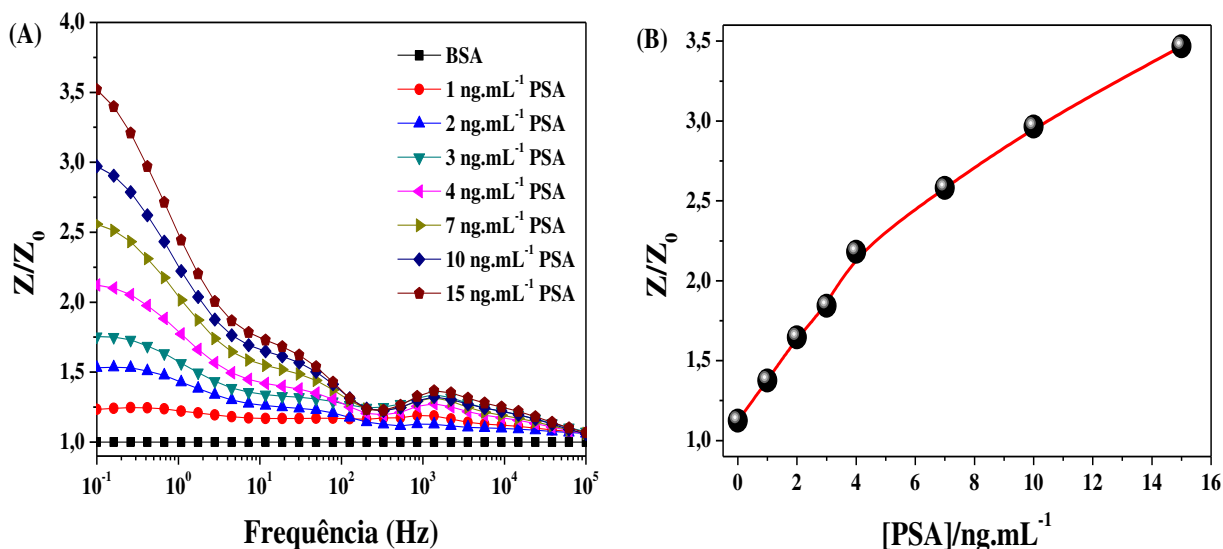
Figura 51: Em (A) gráfico da resistência de transferência de carga em função da concentração de PSA e (B) modelo de circuito elétrico equivalente ao sistema de medidas utilizado.



Fonte 50: Elaborado pelo autor.

Calculando-se a razão dos espectros do módulo da impedância na ausência e presença do antígeno PSA em função da frequência da arquitetura $(PEI/PVS)_1/(PEI/Anti-PSA+DPPG)_5/BSA$, fica evidente na Figura 52 (A) a contribuição da camada de DPPG no gráfico apresentado, onde é possível observar um pico no processo de relaxação na região de alta frequência (acima de 5 kHz). Outros dois processos de relaxação são observados e são atribuídos ao aumento na formação da dupla camada devido à ligação do antígeno PSA na superfície do filme, na região de baixas frequências (0,1 a 10 Hz) com contribuição da região intermediária na região de 10 a 100 Hz. A Figura 52 (B) apresenta o gráfico do valor máximo da razão do módulo da impedância na frequência de 0,1 Hz e, neste caso, foi observado um comportamento exponencial para adsorção tipo Langmuir-Freundlich.

Figura 52: Em (A) razão do módulo da impedância em função da frequência para diferentes concentrações de PSA para o filme $(\text{PEI/PVS})_1/(\text{PEI/Anti-PSA+DPPG})_5$ medido em $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5 mmol.L^{-1} solubilizado em solução de KCl $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ e diluído em PBS, pH 7,4, na proporção 1:1 (V/V) e em (B) valor máximo do pico da razão do módulo da impedância em função da concentração de PSA, ajustado com o modelo de Langmuir-Freundlich.

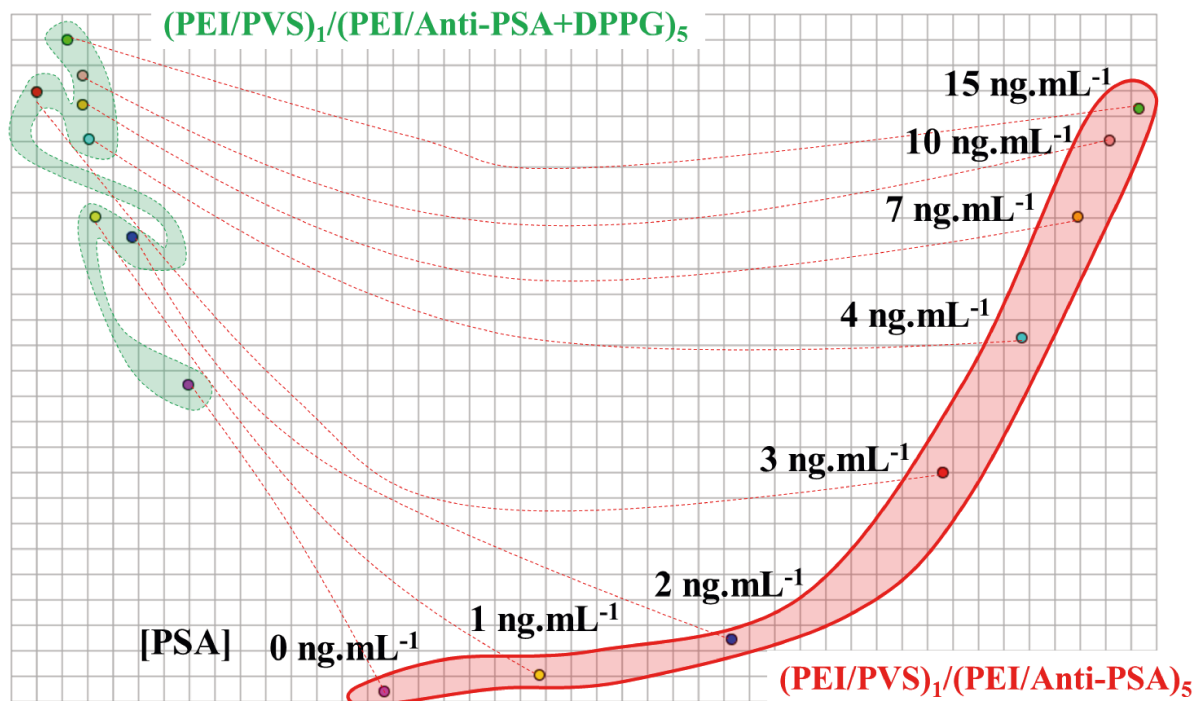


Fonte 51: Elaborado pelo autor.

Os gráficos obtidos nas Figura 49 e Figura 52 para a detecção do antígeno PSA mostram claramente o aumento na razão do módulo da impedância com a concentração, além disso, o valor máximo obtido para o filme $(\text{PEI/PVS})_1/(\text{PEI/Anti-PSA})_5$ foi cerca de 5 vezes maior do que o obtido para o filme $(\text{PEI/PVS})_1/(\text{PEI/Anti-PSA+DPPG})_5$ na concentração de 15 ng.mL^{-1} de PSA. Os dados do módulo da impedância foram analisados por técnica estatística não linear utilizando o programa gratuito *Pex-Sensors* ^[100], que implementa técnicas de projeção multidimensionais e tem sido aplicados com sucesso na análise de biossensores ^[101]. Neste trabalho, foi utilizada a técnica de projeção IDMAP (do inglês *Interactive Document Map*), empregando a técnica *Fastmap* para redução dimensional dos dados do módulo da impedância em função da frequência e normalizando os dados por coluna [0,1]. O resultado da projeção dos dados está representado na Figura 53 e mostra que o filme $(\text{PEI/PVS})_1/(\text{PEI/Anti-PSA})_5$ apresenta uma melhor distribuição dos pontos referente às concentrações detectadas em comparação com o filme $(\text{PEI/PVS})_1/(\text{PEI/Anti-PSA+DPPG})_5$, a

distância entre cada ponto pode ser medida através de cada quadrados do gráfico, pois a técnica de IDMAP calcula a distância Euclidiana entre cada instância medida. A projeção dos dados deixa clara a existência de dois sistemas que detectam de maneira diferente o PSA, e isto pode estar associada à presença do lipossomo que influencia na detecção.

Figura 53: Gráfico IDMAP obtido dos dados do módulo da impedância em função da frequência para os filmes de $(\text{PEI/PVS})_1/(\text{PEI/Anti-PSA})_5$ e $(\text{PEI/PVS})_1/(\text{PEI/Anti-PSA+DPPG})_5$ para diferentes concentrações de PSA.

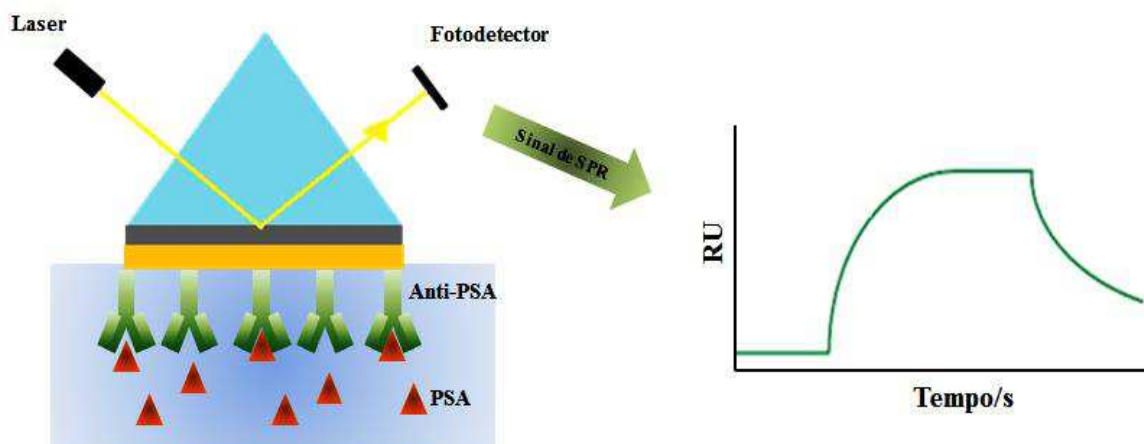


Fonte 52: Elaborado pelo autor.

4.8.3 Filmes de $(\text{PEI/PVS})_1/(\text{PEI/Anti-PSA})_5$ por Ressonância Plasmônica de Superfície.

A ligação do antígeno com anticorpo imobilizado na superfície do sensor de SPR causa uma mudança no índice de refração da superfície e, conseqüentemente, altera o sinal de SPR. A Figura 54, mostra uma representação do sistema de detecção por SPR, em que é monitorada a variação do sinal SPR em função o tempo para a ligação específica de antígeno com o anticorpo.

Figura 54: Representação esquemática da detecção do PSA pelo filme $(PEI/PVS)_1/(PEI/Anti-PSA)_5$ através de medidas de SPR.

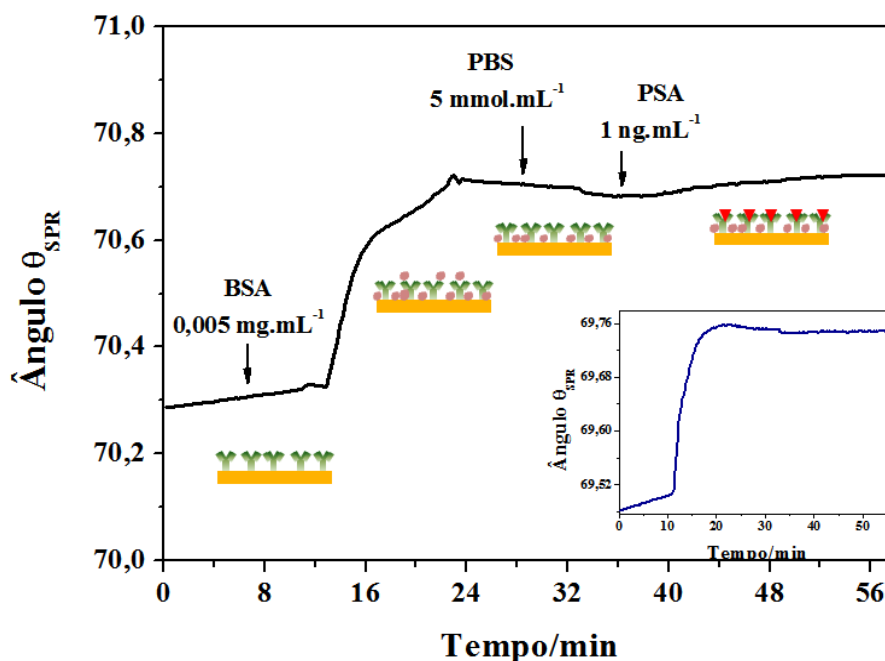


Fonte 53: Elaborado pelo autor.

Devido a sensível mudança no sinal de SPR com a ligação do antígeno com anticorpo, testes iniciais foram realizados com o filme LbL de $(PEI/PVS)_1/(PEI/Anti-PSA)_5$ contendo 5 bicamadas para verificar a detecção do antígeno PSA em tempo real usando concentrações abaixo de 4 ng.mL^{-1} . A Figura 55 apresenta a resposta obtida com adição de BSA ($0,005 \text{ mg.mL}^{-1}$) em fluxo de $10 \text{ }\mu\text{L.min}^{-1}$, depois a lavagem do filme em fluxo ($10 \text{ }\mu\text{L.min}^{-1}$) com PBS (5 mmol.L^{-1}) $\text{pH}=7,4$ e a injeção de 1 ng.mL^{-1} de PSA em um dos canais de fluxo. É importante ressaltar que ao mesmo tempo em que foi injetado o PSA em um dos canais, injetou-se também PBS em outro canal para comparação da variação do sinal de SPR (o resultado do encarte da Figura 55). A adição de BSA em fluxo nos dois canais provocou um aumento do ângulo θ_{SPR} , indicando a sua ligação à superfície do sensor. Foi necessário aproximadamente 12 minutos para o completo bloqueio dos sítios não específicos do filme de $(PEI/PVS)_1/(PEI/Anti-PSA)_5$ e o excesso de BSA fracamente adsorvido pôde ser removido com o fluxo de PBS. A injeção de 1 ng.mL^{-1} provocou um aumento do ângulo θ_{SPR} , cuja variação foi $0,04^\circ$ e ocorreu devido a ligação específica do antígeno PSA com o anticorpo

Anti-PSA presente no filme LbL. A concentração de 3 ng.mL^{-1} também foi testada em um outro sensor com o mesmo filme $(\text{PEI/PVS})_1/(\text{PEI/Anti-PSA})_5$ depositado.

Figura 55: Sensograma de SPR para a ligação não específica do BSA e ligação específica do PSA com o anticorpo imobilizado no filme. No *inset* o sensograma para o filme com a adição de BSA e tampão PBS.

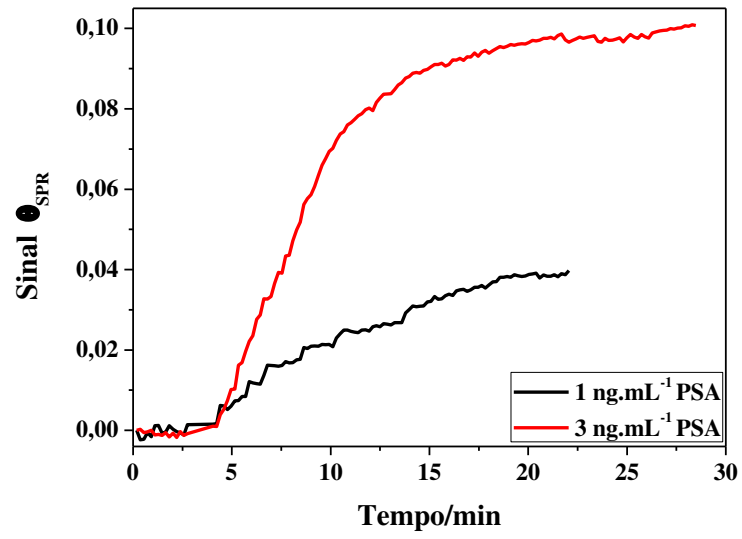


Fonte 54: Elaborado pelo autor.

O sinal de SPR obtido da ligação antígeno-anticorpo foi maior (variação de $0,1^\circ$) e é apresentada na Figura 56 em comparação com o sinal obtido gerado pela injeção de 1 ng.mL^{-1} de PSA.

Os testes iniciais mostram que é possível utilizar o filme LbL $(\text{PEI/PVS})_1/(\text{PEI/Anti-PSA})_5$ como imunossensor óptico para a detecção do PSA em concentrações inferiores a 4 ng.mL^{-1} , que é a concentração limite encontrada no soro de um indivíduo saudável. No entanto, para que este sistema possa ser usado como uma ferramenta analítica é necessário realizar testes com outras concentrações de PSA. Além disso, estudos de regeneração do imunossensor poderão ser realizados e outras arquiteturas poderão ser estudadas a fim de se obter o melhor sistema para detecção do PSA.

Figura 56: Mudanças no sinal de SPR com tempo para a ligação do PSA em diferentes concentrações com o Anti-PSA presente no filme (PEI/PVS)₁/(PEI/Anti-SA)₅.



Fonte 55: Elaborado pelo autor.

CAPÍTULO 5

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados, verificou-se que os lipossomos de DPPG evitam a agregação do anticorpo Anti-PSA em solução e ajudam a preservar a sua estrutura secundária (folhas- β). As caracterizações dos filmes por espectroscopia UV-vis mostraram que tanto o anticorpo Anti-PSA livre quanto incorporado em lipossomos de DPPG podem ser imobilizados com os polielectrolitos PAH e PEI por meio da técnica LbL. Contudo, a melhor adsorção do anticorpo foi obtida com o PEI. Os espectros de FTIR no modo de transmissão e reflexão do filme LbL de PEI/PVS, mostraram o deslocamento das bandas associadas aos modos de vibrações dos principais grupos funcionais do PEI (NH e NH₂) e do PVS (SO₃⁻) e o surgimento de uma nova banda, indicando que interações fortes entre os polieletrólitos regem crescimento deste filme. A deposição do anticorpo no filme LbL foi confirmada através do aparecimento de uma banda em 1117 cm⁻¹ associada a algum modo de vibração do Anti-PSA. Através das medidas de SPR, também foi confirmada a deposição dos materiais sobre o sensor de ouro e a espessura do filme (PEI/PVS)₁/(PEI/Anti-SA)₅, obtida a partir da simulação das curvas de SPR, foi de 11,43 nm. Além disso, o filme foi capaz de detectar 1 e 3 ng.mL⁻¹ de PSA. A detecção do antígeno PSA por VC mostrou que o filme (PEI/PVS)₁/(PEI/Anti-PSA+DPPG)₅, apresenta mudanças no comportamento eletroquímico após a incubação com o PSA, indicando a interação do antígeno com o anticorpo presente no filme. Os testes de EIE para a detecção do PSA usando os filmes de (PEI/PVS)₁/(PEI/Anti-PSA+DPPG)₅ e (PEI/PVS)₁/(PEI/Anti-PSA)₅ confirmaram a existência da interação Anti-PSA/PSA e mostraram que ambos são eficientes na detecção do marcador do câncer de próstata. Por fim, os resultados deste trabalho apontam a viabilidade dos filmes LbL contendo o Anti-PSA imobilizado para a detecção do marcador do câncer de próstata (PSA).

6 TRABALHOS PRODUZIDOS

Capítulo de livro que será publicado

MIYAZAKI, C. M.; De BARROS, A.; GRAÇA, J. S.; MASCAGNI, D. B. T.; CAMPOS, P. P.; FERREIRA, M. Self-assembly Thin Films for Sensing, Ed. Springer, 2016.

Artigos publicados

GRAÇA, JULIANA S.; FERREIRA, MARYSTELA . Liposome-Encapsulated Biomolecules: Application in Enzymatic Biosensors and Immunosensors. Revista Virtual de Química, v. 7, p. 1552-1564, 2015.

Trabalhos plicados em anais de congressos

GRAÇA, J.S.; MORAES, M. L.; FERREIRA, M.. Filmes nanoestruturados (LbL) de anticorpo Anti-PSA incorporado em lipossomos para detecção do antígeno prostático específico (PSA). III Workshop de Pesquisa e Tecnologia em Ciência dos Materiais, de 28 a 30 de Setembro de 2015, em Sorocaba/SP. (Apresentação Oral).

GRAÇA, J.S.; MORAES, M. L.; FERREIRA, M.. Filmes *Layer-by-Layer* de Anti-PSA incorporado em lipossomos para a detecção eletroquímica do antígeno prostático específico. I Congresso Regional da Sociedade Brasileira de Biofísica, de 25 a 28 de Maio de 2015, em Natal/RN. (Apresentação Painel).

GRAÇA, J.S.; MORAES, M. L.; FERREIRA, M.. Filmes *Layer-by-Layer* de Anti-PSA incorporado em lipossomos. II Workshop de Pesquisa e Tecnologia em Ciência dos Materiais, de 02 a 05 de dezembro de 2014, em Sorocaba/SP. (Apresentação Oral).

Premiações

Modalidade oral com os trabalhos:

GRAÇA, J.S.; MORAES, M. L.; FERREIRA, M.. Filmes nanoestruturados (LbL) de anticorpo Anti-PSA incorporado em lipossomos para detecção do antígeno prostático específico (PSA). III Workshop de Pesquisa e Tecnologia em Ciência dos Materiais, de 28 a 30 de Setembro de 2015, em Sorocaba/SP. (Apresentação Oral).

GRAÇA, J.S.; MORAES, M. L.; FERREIRA, M.. Filmes *Layer-by-Layer* de Anti-PSA incorporado em lipossomos. II Workshop de Pesquisa e Tecnologia em Ciência dos Materiais, de 02 a 05 de dezembro de 2014, em Sorocaba/SP. (Apresentação Oral).

7 REFERÊNCIAS

- ¹ NIDZWORSKI, D. et al. Universal biosensor for detection of influenza virus. Biosens. Bioelectron., v.59, p. 239–242, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.03.050>>. Acesso em: 5 de janeiro de 2016.
- ² FU, Y. et al. Electrochemical Immunoanalysis for Carcinoembryonic Antigen Based on Multilayer Architectures of Gold Nanoparticles and Polycation Biomimetic Interface on Glassy Carbon Electrode. Electroanalysis., v.18, p.2451-2457, 2006. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1002/elan.200603700>>. Acesso em: 5 de janeiro de 2016.
- ³ MORAES, M. L. et al. Immunosensor for HIV-1 Diagnostics Based on Immobilization of the Antigenic Peptide p24-3 Into Liposomes. J. Nanosci. Nanotechnol., v.14, p. 6638–6645, 2014. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1166/jnn.2014.9361>>. Acesso em: 5 de janeiro de 2016.
- ⁴ BRAIEK, M. et. al. An Electrochemical Immunosensor for Detection of Staphylococcus aureus Bacteria Based on Immobilization of Antibodies on Self-Assembled Monolayers-Functionalized Gold Electrode. Biosensors., v.2, p.417-426, 2012. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.3390/bios2040417>>. Acesso em: 5 de janeiro de 2016.
- ⁵ KIM, D.-J. et al. Organic electrochemical transistor based immunosensor for prostate specific antigen (PSA) detection using gold nanoparticles for signal amplification. Biosens. Bioelectron., v.25, p.2477–2482, 2010. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2010.04.013>>. Acesso em: 5 de janeiro de 2016.
- ⁶ INCA. Próstata. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata>>. Acesso em: 5 de janeiro de 2016.
- ⁷ ZANGWILL, M. Prostate cancer. Disponível em: <<http://www.nucleuscatalog.com/conditions-indepth-prostate-cancer/view-item?ItemID=62748>>. Acesso em: 15 de julho de 2015.
- ⁸ ZACCHI, S. R. et al. Associação de variáveis sociodemográficas e clínicas com o estadiamento inicial em homens com câncer de próstata. Cad. Saúde Coletiva, v.22, n.93, p.93-100 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1414-462X201400010014>>. Acesso em: 15 de julho de 2015.
- ⁹ GONÇALVES, I. R.; PADOVANI, C.; POPIM, R. C. Caracterização epidemiológica e demográfica de homens com câncer de próstata. Ciênc. Saúde Coletiva, v.13, n.4, p. 1337-1342, 2008. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232008000400031>>. Acesso em: 15 de julho de 2015.
- ¹⁰ de CASTRO, H. A. S. et.al. Contribuição da densidade do PSA para predizer o câncer da próstata em pacientes com valores de PSA entre 2, 6 e 10, 0 ng/ml. Radiol. Brasil,v.44, n.4. p. 205-209, 2011. Disponível em:< <http://www.scielo.br/pdf/rb/v44n4/v44n4a03.pdf>>. Acesso em: 15 de julho de 2015.

- ¹¹ GOMES, R.; REBELLO, L.; de ARAÚJO, F. C.; do NASCIMENTO, E. F. A prevenção do câncer de próstata: uma revisão da literatura. Cien. Saude. Colet., v.13, n.1, p. 235-246, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232008000100027>> Acesso em: 15 de julho de 2015.
- ¹² RAFIQUE, S.; BIN, W.; BHATTI, A. S. Electrochemical immunosensor for prostate-specific antigens using a label-free second antibody based on silica nanoparticles and polymer brush. Bioelectrochemistry, v. 101, p. 75–83, 2015. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2014.08.001>>. Acesso em:16 de fevereiro de 2015.
- ¹³ VERMASSEN, T. et al. Glycosylation of prostate specific antigen and its potential diagnostic applications. Clin. Chim. Acta, v. 413, p. 1500-1505, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2012.06.007>>. Acesso em: 15 de julho de 2015.
- ¹⁴ LIU, Y. Electrochemical detection of prostate-specific antigen based on gold colloids/alumina derived sol-gel film. Thin. Solid. Films., v.516, p. 1803-1808, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tsf.2007.08.048>>. Acesso em: 15 de julho de 2015.
- ¹⁵ ALTINTAS, Z.; TOTHILL, I. Biomarkers and biosensors for the early diagnosis of lung cancer. Sens. and Act. B: Chem., v.188, p. 988-998, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2013.07.078>>. Acesso em: 15 de julho de 2015.
- ¹⁶ LI, J.; LI, S.; YANG, C. F. Electrochemical Biosensors for Cancer Biomarker Detection. Electroanalysis, v.24, n.12, p. 2213-2229, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/elan.201200447>>. Acesso em: 15 de julho de 2015.
- ¹⁷ YANG, M.; YI, X.; WANG, J.; ZHOU, F. Electroanalytical and surface plasmon resonance sensors for detection of breast cancer and Alzheimer’s disease biomarkers in cells and body fluids. Analyst., v.139, n.8, p. 1814-1825, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/c3an02065g>>. Acesso em: 15 de julho de 2015.
- ¹⁸ GRAÇA, J. S.; FERREIRA, M. Encapsulação de biomoléculas em lipossomos: aplicações em biossensores enzimáticos e imunossensores. Rev. Virt. de Quím., v.7, n. 4, p. 1552-1564, 2015. Disponível em: <www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/download/1018/620>. Acesso em: 16 de julho de 2015.
- ¹⁹ LI, Y. et al. Label electrochemical immunosensor for prostate-specific antigen based on graphene and silver hybridized mesoporous silica. Anal. Biochem., v.469, p. 76-82, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2014.09.022>>. Acesso em: 15 de julho de 2015.
- ²⁰ 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., v.52, p. 20-28, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2013.08.012>>. Acesso em: 15 de julho de 2015.

- ²¹ WANG, H. et al. Label-free electrochemical immunosensor for prostate-specific antigen based on silver hybridized mesoporous silica nanoparticles. Anal. Biochem., v.434, p. 123-127, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2012.11.012>>. Acesso em: 15 de julho de 2015.
- ²² MAO, K. et al. Label-free electrochemical immunosensor based on graphene/methylene blue nanocomposite. Anal. Biochem., v.422, p. 22-24, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2011.12.047>>. Acesso em: 15 de julho de 2015.
- ²³ ARYA, S. K.; BHANSALI, S. Anti-Prostate Specific Antigen (Anti-PSA) modified interdigitated microelectrode-based impedimetric biosensor for PSA detection. Biosens. Journ., v.1, p. 1-7, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4303/BJ/H110601>>. Acessado em: 16 de julho de 2015.
- ²⁴ 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., v. 313-314, p. 655-659, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.05.057>>. Acesso em: 16 de julho de 2015.
- ²⁵ GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; Vörös, J.; REIMHULT, E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. Sensors, v.8, p. 1400-1458, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/s8031400>>. Acesso em: 16 de julho de 2015.
- ²⁶ BURCU BAHADIR, E.; KEMAL SEZGINTÜRK, M. Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics. Talanta, v.132, p. 162-174, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.08.063>>. Acesso em: 16 de julho de 2015.
- ²⁷ NELSON, D. L.; COX, M. M. Protein function. In: (Ed.). Lehninger Principles of Biochemistry. 4^a ed. W. H. Freeman, 2004. cap. 5, p.157-189.
- ²⁸ GIL, E. de S.; KUBOTA, L. T.; YAMAMOTO, Y. I. Some aspects of immunoassays applied to analytical chemistry. Quím. Nova, v. 22, n.6, 1999. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40421999000600015>. Acesso em: 16 de julho 2015.
- ²⁹ Photobucket. Antibody. Disponível em:<<http://s100.photobucket.com/user/maxaug/media/imune3.gif.html>>. Acesso em: 8 de janeiro de 2016.
- ³⁰ REVERBERI, R.; REVERBERI, L. Factors affecting the antigen-antibody reaction. Blood Transfus., v.5, p.227-240, 2007. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.2450/2007.0047-07>>. Acesso em: 16 de julho de 2015.
- ³¹ TRILLING, A. K.; BEEKWILDER, J.; ZUILHOF, H. Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview. Analyst, v.138, p. 1619-1627, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/c2an36787d>>. Acesso em: 16 de julho de 2015.
- ³² SOHN, Y.-S.; LEE, Y. K. Site-directed immobilization of antibody using EDC-NHS-activated protein A on a bimetallic-based surface plasmon resonance chip. J. Biomed. Opt., v.19, 051209, 2014. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1117/1.JBO.19.5.051209>>. Acesso em: 16 de julho de 2015.

- ³³ VISWANATHAN, S.; RANI, C.; DELERUE-MATOS, C. Ultrasensitive detection of ovarian cancer marker using immunoliposomes and gold nanoelectrodes. Anal. Chim. Acta, v.726, p.79-84, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.03.025>>. Acesso em: 16 de julho de 2015.
- ³⁴ PETRI, L.; FERREIRA, M.; MORAES, M. L. Toward Preserving the Structure of the Antigenic Peptide p17-1 from the HIV-1 p17 Protein in Nanostructured Films. J. Nanosci. Nanotechnol., v.11, n.8, p. 6705-6709, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1166/jnn.2011.4216>>. Acesso em: 16 de julho de 2015.
- ³⁵ MIYAZAKI, C. M. et al. Bending of Layer-by-Layer Films Driven by an External Magnetic Field. Int. J. Mol. Sci., v.14, p. 12953-12969, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/ijms140712953>>. Acesso em: 16 de julho de 2015.
- ³⁶ SOUZA, T. T. L.; MORAES, M. L.; FERREIRA, M. Use of hemoglobin as alternative to peroxidases in cholesterol amperometric biosensors. Sens. Actuators B Chem., v.178, p. 101-106, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2012.12.005>>. Acesso em: 16 de julho de 2015.
- ³⁷ ZHANG, B.; CUI, T. An ultrasensitive and low-cost graphene sensor based on layer-by-layer nano self-assembly. Appl. Phys. Lett., v.98, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1063/1.3557504>>. Acesso em: 16 de julho de 2015.
- ³⁸ JUN, S. et. al. Layer-by-layer Assembled Graphene/Polyaniline Nanocomposite Film and Applied in Electrochemical Sensing. Chem. J. Chin. Univ.-Chin., v.36, n.3, p. 581-588, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.7503/cjcu20140834>>. Acesso em: 16 de julho de 2015.
- ³⁹ de BARROS, A.; FERREIRA, M.; CONSTANTINO, C. J. L.; FERREIRA, M. Nanocomposites based on LbL films of polyaniline and sodium montmorillonite clay. Synth. Met., v.197, p. 119-125, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.synthmet.2014.09.001>>. Acesso em: 16 de julho de 2015.
- ⁴⁰ DECHER, G. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. Science, v. 277, n. 5330, p. 1232-1237, 1997. Disponível em: <http://www.physics.uoguelph.ca/~dutcher/nano3500/papers_for_critical_review/Science%201997%20Decher.pdf>. Acesso em: 20 de julho de 2015.
- ⁴¹ de OLIVEIRA, R. F.; XAVIER, A. C. F.; BARROS, A.; FERREIRA, M. Filmes nanoestruturados: Técnicas de Langmuir-Blodgett (LB) Layer-by-Layer (LbL). In: (Ed.) da RÓZ, A. L. et al. Nanoestruturas princípios e aplicações: Elsevier, 1ª ed. Rio de Janeiro, v.1, 2015, cap. 4, p.123- 145.
- ⁴² 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, v. 210, n. 1-2, p. 831-835. Disponível em:< <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/004060909290417A#>>. Acesso em: 20 de julho de 2015.

- ⁴³ CRESPILO, F. N.; ZUCOLOTO, V.; OLIVEIRA Jr, O. N.; NART, F. C. Electrochemistry of layer-by-layer films: a review. Int. J. Electrochem. Sci., v.1, p.192-214, 2006. Disponível em: <<http://www.electrochemsci.org/papers/1050194.pdf>>. Acesso em: 20 de julho de 2015.
- ⁴⁴ FERREIRA, M. et al. Layer-by-Layer and Langmuir-Blodgett Films from Nanoparticles and Complexes. In: (Ed.). NALWA, H. S. Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology: American Scientific Publishers, v.4, 2003, p. 441-465.
- ⁴⁵ LOURENÇO, J. M. C.; RIBEIRO, P. A.; BOTELHO do Rego, A. M.; RAPOSO, M. Counterions in layer-by-layer films—Influence of the drying process. J. Colloid Interface Sci., v.313, n.1, 2007, p.26-33. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2007.04.040>>. Acesso em: 20 de julho de 2015.
- ⁴⁶ NELSON, D. L.; COX, M. M. Membranas Biológicas e Transportadores. In: (Ed.). Lehninger Principles of Biochemistry. 4ª ed. W. H. Freeman, 2006. cap. 11, p.368-418.
- ⁴⁷ MOURITSEN, O. G. Model Answers to Lipid Membrane Questions. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. v.3, p. 1-15, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a004622>>. Acesso em: 22 de julho de 2015.
- ⁴⁸ BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. J. Mol. Biol., v.13, n.1, p. 238–252, 1965. Disponível em:<[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80093-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80093-6)>. Acesso em: 22 de julho de 2015.
- ⁴⁹ MORAES, M. L.; CASELI, L. Sistemas supramoleculares. In: (Ed.) da RÓZ, A. L. et.al. Nanoestruturas princípios e aplicações: Elsevier, 1ª ed. Rio de Janeiro, v.1, 2015, cap. 2, p.123- 145.
- ⁵⁰ SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. Lipossomas: a bala mágica acertou? Quím. Nova, v.25, n.6b, p.1181-1185, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000700019>>. Acesso em: 22 de julho de 2015.
- ⁵¹ BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. de; MAGALHAES, N. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. Braz. J. Pharm. Sci. v.43, n. 2, p. 167-179, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322007000200003>>. Acesso em: 22 de julho de 2015.
- ⁵² XAVIER, A. C. F.; de MORAES, M. L.; FERREIRA, M. Immobilization of aloin encapsulated into liposomes in Layer-by-layer films for transdermal drug delivery. Mater. Sci. Eng. C, v.33, n.3, p. 1193–1196, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2012.12.021>>. Acesso em: 22 de julho de 2015.
- ⁵³ FELICE, B.; PRABHAKARAN, M. P.; RODRÍGUEZ, A. P.; RAMAKRISHNA, S. Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective. Mater. Sci. Eng. C, v.41, p. 178-195, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.04.049>>. Acesso em: 22 de julho de 2015.

- ⁵⁴ BABU, A. et al. Delivery Systems: A Promising Technology for Detection, Diagnosis, and Treatment of Cancer. *AAPS Pharm SciTech*, v.15, n.3, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1208/s12249-014-0089-8>>. Acesso em: 22 de julho de 2015.
- ⁵⁵ PARK, J.-W. First-Leaflet Phase Effect on Properties of Phospholipid Bilayer Formed Through Vesicle Adsorption on LB Monolayer. *J. Membr. Biol.*, v.237, n.2-3, p.107-114, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00232-010-9311-0>>. Acesso em: 22 de julho de 2015.
- ⁵⁶ GRAÇA, J. S.; de OLIVEIRA, R. F.; de MORAES, M. L.; FERREIRA, M. Amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer films of microperoxidase-11 and liposome-encapsulated glucose oxidase. *Bioelectrochemistry*, v.96, p. 37–42, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2014.01.001>>. Acesso em: 22 de julho de 2015.
- ⁵⁷ MIYAZAKI, C. M. et al. Monoamine oxidase B layer-by-layer film fabrication and characterization toward dopamine detection. *Mater. Sci. Eng. C*, v.58, p. 310–315, 2016. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.042>>. Acesso em:
- ⁵⁸ SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Introducción a los métodos espectrométricos. In: (Ed.). *Principios de análisis instrumental*. 5ª ed. Espanha: McGraw-Hill, 2001. p.122-150.
- ⁵⁹ CAMPOS, P. P. et al. Amperometric Detection of Lactose Using beta-Galactosidase Immobilized in Layer-by-Layer Films. *Acs Appl. Mater. Interfaces*, v.6, n.14, p. 11657–11664, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/am5024463>>. Acesso em: 22 de julho de 2015.
- ⁶⁰ ALESSIO, P. et al. Técnicas espectroscópicas de caracterização de nanomateriais. In: (Ed.) da RÓZ, A. L. et.al. *Técnicas de Nanocaracterização*; Elsevier, 1ª ed. Rio de Janeiro, v.1, 2015, cap. 3, p.76-112.
- ⁶¹ AOKI, P. H. B. et al. Spray layer-by-layer films based on phospholipid vesicles aiming sensing application via e-tongue system. *Mater. Sci. Eng. C*, v.32, n.4, p. 862-871, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2012.02.004>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2016.
- ⁶² PAVINATTO, F. J. et al. Optimized architecture for Tyrosinase-containing Langmuir–Blodgett films to detect pyrogallol. *J. Mater. Chem.*, v.21, n.13, p. 4995-5003, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C0JM03864D>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2016.
- ⁶³ VOLPATI, D. et al. Exploiting distinct molecular architectures of ultrathin films made with iron phthalocyanine for sensing. *J. Phys. Chem. B*, v.112, n.48,p.15275-15282, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jp804159h>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2016.
- ⁶⁴ CENTURION, L. M. P. C. et al. Tailoring molecular architectures with cobalt tetrasulfonated phthalocyanine: immobilization in layer-by-layer films and sensing applications. *J. Nanosci. Nanotechnol*, v.12, n.3, p. 2399-2405, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22755065>>. Acesso em 20 de janeiro de 016.

- ⁶⁵ WOODY, R. W. Theory of circular dichroism in proteins. In: FASMAN, G. D. (Ed.). Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. 1ª ed. New York: Plenum Press, 1996. p.25-68.
- ⁶⁶ GREENFIELD, N. J. Applications of circular dichroism in protein and peptide analysis. TrAC Trends Anal. Chem., v.18, n.4, p. 236–244, 1999. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0165-9936\(98\)00112-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-9936(98)00112-5)>. Acesso em: 24 de julho de 2015.
- ⁶⁷ NELSON, D. L.; COX, M. M. Amino acids, Peptides and Proteins. In: (Ed.). Lehninger Principles of Biochemistry. 4ª ed. W. H. Freeman, cap. 2, p.75-115, 2004.
- ⁶⁸ DAMOS, F. S., MENDES, R. K.; KUBOTA, L. T. Applications of QCM, EIS and SPR in the investigation of surfaces and interfaces for the development of (bio)sensors. Quím. Nova, v.27, p.970–979, 2004. Disponível em:< <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000600023>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2016.
- ⁶⁹ HOA, X. D., KIRK, A. G.; TABRIZIAN, M. Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: A review of recent progress. Biosens. Bioelectron. v.23, p.151–160, 2007. Disponível em:< <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2007.07.001>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2016.
- ⁷⁰ SHANKARAN, D. R., GOBI, K. V. & MIURA, N. Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest. Sens. Actuators B Chem. v.121, p.158–177, 2007. Disponível em:< <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2006.09.014>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2016.
- ⁷¹ SHAH, K. Plasma, Plasmonics na NIMs. Disponível em:< <http://web.iitd.ac.in/~kkshah/plasmonics.html>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2016.
- ⁷² de CARVALHO, R. M.; RATH, S.; KUBOTA, L. T. SPR: New tool for biosensors. Quím. Nova, v.26, p.97–104, 2003. Disponível em:< <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422003000100017>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2016.
- ⁷³ HOMOLA, J. Present and future of surface plasmon resonance biosensors. Anal. Bioanal. Chem., v.377, p.528-539, 2003. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1007/s00216-003-2101-0>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2016.
- ⁷⁴ LÖFÅS, S. et al. Bioanalysis with surface plasmon resonance. Sens. Actuators B Chem., v.5, p.76-84, 1991. Disponível em:<[http://dx.doi.org/10.1016/0925-4005\(91\)80224-8](http://dx.doi.org/10.1016/0925-4005(91)80224-8)>. Acesso em: 20 de janeiro de 2016.
- ⁷⁵ Surface Plasmon Resonance basics. Disponível em:<http://www.bionavis.com/technology/spr/>. Acesso em: 20 de janeiro de 2016.
- ⁷⁶ SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Voltametria. In: (Ed.). Princípios de análise instrumental. 6ª ed. Bookman: Porto Alegre, 2009. p.730-774.

- ⁷⁷ PACHECO, F. W. et al. Voltametrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. Rev. Virt. Quím., v.5, n.4, p. 516-537, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20130040>>. Acesso em: 24 de julho de 2015.
- ⁷⁸ LISDAT, F.; SCHÄFER, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. Anal. Bioanal. Chem v.391, p.1555-156, 2008. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1007/s00216-008-1970-7>>. Acesso em: 22 de janeiro de 2016.
- ⁷⁹ CHINAGLIA, D.; GOZZI, G.; ALFARO, R.; HESSEL, R. Espectroscopia de impedância no laboratório de ensino. Rev. Bras. Ensino Física, v.30, p. 4504.1–4504.9, 2008. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1590/s1806-11172008000400013>>. Acesso em: 22 de janeiro de 2016.
- ⁸⁰ CARVALHO, L. A. DE; ANDRADE, A. R. DE; BUENO, P. R. Electrochemical impedance spectroscopy applied in the study of heterogeneous reactions at dimensionally stable anodes. Quím. Nova, v.29, p.796-804, 2006. Disponível em:<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422006000400029>. Acesso em: 22 de janeiro de 2016.
- ⁸¹ ZHANG, L.; HAYNIE, D. T. Reversibility of Structural Changes of Polypeptides in Multilayer Nanofilms. Biomacromolecules, v.9, n.1, p. 185–191, 2008. disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/bm700967k>>. Acesso em: 27 de julho de 2015.
- ⁸² VON H., A.; PETERSEN, H.; LI, Y.; KISSEL, T. Characterization of commercially available and synthesized polyethylenimines for gene delivery. J. Controlled Release, v.69, n.3, p. 309–322, 2000. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00317-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00317-5)>. Acesso em: 27 de julho de 2015.
- ⁸³ SCHÖNHOF, M. Layered polyelectrolyte complexes: physics of formation and molecular properties. J. Phys. Condens. Matter, v.15, p. R1781–R1808, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1088/0953-8984/15/49/R01>>. Acesso em: 27 de julho de 2015.
- ⁸⁴ SCHMID, F.-X. Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry. In: Encyclopedia of life sciences. John Wiley & Sons Ltd, p. 1- 4, 2001. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0003142/full>>. Acesso em: 27 de julho de 2015.
- ⁸⁵ HOFMANN, A. Spectroscopic techniques: I Spectrophotometric techniques. In: (7^a Ed.). Wilson, K. & Walker, J. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology: Cambridge University Press, cap. 12, p. 477-521, 2010. Disponível em: <<http://www98.griffith.edu.au/dspace/handle/10072/34561>>. Acesso em: 27 de julho de 2015.
- ⁸⁶ JOSHI, V.; SHIVACH, T.; YADAV, N.; RATHORE, A. S. Circular Dichroism Spectroscopy as a Tool for Monitoring Aggregation in Monoclonal Antibody Therapeutics. Anal. Chem., v.86, n.23, p. 11606–11613, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/ac503140j>> Acesso em: 28 de julho de 2015.
- ⁸⁷ GUAN, H.; ZHANG, F.; YU, J.; CHI, D. The novel acetylcholinesterase biosensors based on liposome bioreactors–chitosan nanocomposite film for detection of organophosphates

pesticides. Food Res. Int., v.49, n.1, p. 15-21, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.014>>. Acesso em: 28 de julho de 2015.

⁸⁸ VAMVAKAKI, V.; CHANIOTAKIS, N. A. Pesticide detection with a liposome-based nano-biosensor. Biosens. Bioelectron., v.22, n.12, p. 2848–2853, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2006.11.024>>. Acesso em: 28 de julho de 2015.

⁸⁹ AOKI, P. H. B. et al. Layer-by-Layer Technique as a New Approach to Produce Nanostructured Films Containing Phospholipids as Transducers in Sensing Applications. Langmuir, v.25, n.4, p. 2331–2338, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/la802696j>>. Acesso em: 29 de julho de 2015.

⁹⁰ ZHAO, X. et al. Interfacial recognition of human prostate-specific antigen by immobilized monoclonal antibody: effects of solution conditions and surface chemistry. J. R. Soc. Interface, v.9, p. 2457–2467, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2012.0148>>. Acesso em: 28 de julho de 2015.

⁹¹ KIM, J. M. et al. Spontaneous Immobilization of Liposomes on Electron-Beam Exposed Resist Surfaces. J. Am. Chem. Soc., v.127, n.7, 2005, p. 2358-2362. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/ja046169k>>. Acesso em: 30 de julho de 2015.

⁹² LAKARD, S.; HERLEM, G.; LAKARD, B.; FAHYS, B. Theoretical study of the vibrational spectra of polyethylenimine and polypropylenimine. J. Mol. Struct. THEOCHEM, v.685, p.83-87, 2004. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1016/j.theochem.2004.06.042>>. Acesso em: 2 de fevereiro de 2016.

⁹³ LIANG, H. Surface plasmon resonance instrument as a refractometer for liquids and ultrathin films. Sens. Actuators B Chem, v. 149, n.1, p. 212–220, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2010.05.048>>. Acesso em: 2 de fevereiro de 2016.

⁹⁴ GRANQVIST, N. et al. Characterizing Ultrathin and Thick Organic Layers by Surface Plasmon Resonance Three-Wavelength and Waveguide Mode Analysis. Langmuir, v.29, n.27, p. 8561-8571, 2013. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1021/la401084w>>. Acesso em: 2 de fevereiro de 2016.

⁹⁵ SURIYANARAYANAN, S. et al. Protein-resistant hyperbranched polyethyleneimine brush surfaces. J. Colloid Interface Sci., v.396, p.307-315, 2013. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2012.12.076>>. Acesso em: 2 de fevereiro de 2016.

⁹⁶ WINK, T.; VAN ZUILEN, S. J.; BULT, A.; VAN BENNEKOM, W. P. Liposome-mediated enhancement of the sensitivity in immunoassays of proteins and peptides in surface plasmon resonance spectrometry. Anal. Chem.v.70, p.827–832, 1998. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9511463>>. Acesso em: 2 de fevereiro de 2016.

⁹⁷ CALIXTO, C. M. F.; CERVINI, P.; CAVALHEIRO, É. T. G. Graphite-araldite® composite electrode: didactic applications. Quím. Nova, v.31, p. 2194–2198, 2008. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000800048>>. Acesso em: 2 de fevereiro de 2016.

⁹⁸ JEPPU, G. P.; CLEMENT, T. P. A modified Langmuir-Freundlich isotherm model for simulating pH-dependent adsorption effects. Journal of Contaminant Hydrology. v. 129, p.

46–53, 15, 2012. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconhyd.2011.12.001>>. Acesso em: 2 de fevereiro de 2016.

⁹⁹ 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.* p.27, 2016. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1039/C5CP07121F>>. Acesso em: 2 de fevereiro de 2016.

¹⁰⁰ PAULOVICH, F. V. et al. Information visualization techniques for sensing and biosensing. *Analyst*, v.236, p.1344–1350, 2011. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1039/C0AN00822B>>. Acesso em: 2 de fevereiro de 2016.

¹⁰¹ Moraes, M. L. et al. Detection of glucose and triglycerides using information visualization methods to process impedance spectroscopy data. *Sens. Actuators B Chem.*v. 231, p.166-167, 2012. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2012.02.046>>. Acesso em: 2 de fevereiro de 2016.