UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

DÊNIO EMANUEL PIRES SOUTO

DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSENSOR PELA TÉCNICA DE RESSONÂNCIA DE PLÁSMONS DE SUPERFÍCIE PARA DETECÇÃO EM TEMPO REAL DE ANTICORPOS ANTI - *LEISHMANIA INFANTUM*

DIAMANTINA - MG
2012

DÊNIO EMANUEL PIRES SOUTO

DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSENSOR PELA TÉCNICA DE RESSONÂNCIA DE PLÁSMONS DE SUPERFÍCIE PARA DETECÇÃO EM TEMPO REAL DE ANTICORPOS ANTI - *LEISHMANIA INFANTUM*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de Concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Flávio Santos Damos
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

DIAMANTINA – MG
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
2012

Ficha Catalográfica - Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

S728d

Souto, Dênio Emanuel Pires
Desenvolvimento de um Imunosensor pela técnica de Ressonância de Plásmons de Superfície para detecção em tempo real de anticorpos anti-*Leishmania infantum* / Dênio Emanuel Pires Souto. – Diamantina: UFVJM, 2012.
78p.

Orientador: Flávio Santos Damos
Coorientadora: Helen Rodrigues Martins

Dissertação (Mestrado - Curso de Pós Graduação em Química) - Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

1. Ressonância de Plásmons de Superfície. 2. Monocamada Auto-Organizada. 3. Imunosensor. 4. Leishmaniose Visceral. 5. Anti – *L. Infantum*. I. Título II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 543

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSENSOR PELA TÉCNICA DE RESSONÂNCIA DE PLÁSMONS DE SUPERFÍCIE PARA DETECÇÃO EM TEMPO REAL DE ANTICORPOS ANTI-LEISHMANIAINFANTUM

Dênio Emanuel Pires Souto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, nível de Mestrado, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

APROVADA EM 10 / 02 / 2012

Prof. Rodrigo Alejandro Abarza Munoz – IQ/UFU
Membro

Profª. Rita de Cássia Silva Luz – UFVJM
Membro

Profª. Helen Rodrigues Martins – UFVJM
Co-orientadora

Prof. Flávio Santos Damos – UFVJM
Presidente

DIAMANTINA
2012

"Quando recebemos um ensinamento devemos receber como um valioso presente e não como uma dura tarefa. Eis aqui a diferença que transcende".

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

- Ao divino mestre (Deus), pela saúde e paz a mim concedidas durante esta caminhada.
- Agradeço aos meus irmãos Diego e Luana e aos meus cunhados Dalva e Carlos pelos constantes incentivos.
- À minha família e aos amigos de Rio Preto, obrigado pelo carinho.
- Agradeço ao meu pai pelos conselhos espirituosos sempre decisivos em minhas atitudes.
- À minha mãe, um agradecimento por tudo àquilo que sou, sem dúvida nenhuma, ela é a maior responsável por essa conquista.
- Em especial, agradeço ao Prof. Dr. Flávio Santos Damos, pela excelente orientação durante a realização deste trabalho, pela confiança depositada e por ser fonte de inspiração para mim. Obrigado por mostrar que orientar não é somente dar um suporte científico, mas também, é ensinar a sermos pessoas de caráter mais humano.
- Agradeço à Profa. Dra. Helen Rodrigues Martins, pela imprescindível colaboração e acima de tudo pela confiança.
- Aos professores Dra. Rita de Cássia Silva Luz e Dr. Wallans Torres Pio dos Santos, pelas contribuições significativas no decorrer deste trabalho.
- Ao professor Dr. Alexandre Barbosa Reis, pelas amostras biológicas gentilmente fornecidas.
- Aos amigos do Grupo de Estudos de Interfaces e Desenvolvimento de Sensores (GEIDS), pelo incentivo, carinho, companheirismo, pela cooperação, pelo ótimo ambiente de trabalho e pelas trocas de idéias. Em especial, agradeço aos amigos Antônio Carlos e Fernando Leite pela amizade sincera, a qual foi extremamente importante durante os momentos difíceis enfrentados nesta caminhada.
- Ao Departamento de Farmácia da UFVJM, pelo incentivo concedido.
- Aos órgãos de fomento: FAPEMIG, CNPq, e em especial ao INCT bioanalítica pela bolsa de mestrado a mim concedida via CAPES.
- E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Dênio, E. P. S. **Desenvolvimento de um Imunosensor pela técnica de Ressonância de Plásmons de Superfície para detecção em tempo real de anticorpos anti – *Leishmania Infantum.*** 2012, 78p. Dissertação (Mestrado em Química). Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológicas – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Diamantina, 2012.

Neste trabalho, foi realizado o desenvolvimento de um imunosensor para detecção de anticorpos anti-*Leishmania infantum*. O princípio de transdução foi a Ressonância de Plásmons de Superfície (SPR) e o sensor foi produzido através da imobilização covalente de antígenos solúveis de *Leishmania infantum* sobre Monocamada Auto-Organizada (SAM) do ácido 11-Mercaptoundecanóico (11-MUA) ativado pela mistura contendo 100,0 $mmol.L^{-1}$ de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e 150 $mmol.L^{-1}$ de N-hidroxisuccinimida (NHS). Através das técnicas de Voltametria Cíclica e Redução Dessortiva por Voltametria de Pulso Diferencial o processo de formação da SAM foi otimizado. Sob condições otimizadas, 1,0 $mmol.L^{-1}$ da solução etanólica de 11-MUA e 24 horas foram suficientes para a formação de uma SAM estável sobre a superfície de ouro. Para obtenção de informações complementares da SAM, foram realizados cálculos da Cobertura de Superfície, Constante Dielétrica e Espessura do tiol adsorvido no substrato de ouro. Após esta etapa, a adição de antígenos solúveis de *L. infantum* sobre a SAM foi acompanhada por SPR. As técnicas de Voltametria Cíclica e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica foram usadas para caracterizar a imobilização do antígeno. Após construção do imunosensor, foram adicionados em sua superfície soros caninos positivos para Leishmaniose Visceral, evidenciando variação significativa no ângulo de SPR, mostrando excelente sensibilidade da técnica para detecção da interação antígeno-anticorpo. Por outro lado, a adição dos soros negativos não foi acompanhada com resposta significativa, concluindo-se também que o imunosensor apresentou boa especificidade contra anticorpos anti-*L. infatum*. Portanto, neste trabalho foi desenvolvido com sucesso um sensor empregando SPR para detecção em tempo real de anticorpos anti-*L. infatum*, apresentando grande perspectiva como sistema de sensoriamento da Leishmaniose Visceral em áreas endêmicas.

Palavras-chave: Ressonância de Plásmons de Superfície, Monocamada Auto-Organizada, Imunosensor, Leishmaniose Visceral, anti – *L. infantum*.

Dênio, E. P. S. **Development of an Immunosensor by the Surface Plasmon Resonance technique for real-time detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies.** 2012, 78p. Dissertation *Stricto Sensu* Post-Graduate Program in Chemistry. Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológicas – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Diamantina, 2012.

In this work, the development of an immunosensor for detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies was performed. The principle of transduction used was the Surface Plasmon Resonance (SPR) and the sensor was constructed by covalent immobilization of soluble antigens of *Leishmania infantum* on self-assembled monolayers (SAMs) of 11-mercaptoundecanoic acid (11-MUA) which was activated by the mixture 100.0 $mmol.L^{-1}$ 1-ethyl-3 (3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and 150 $mmol.L^{-1}$ N-hidroxisuccinimide (NHS). Cyclic Voltammetry and Dessortive Reduction by Differential Pulse Voltammetry techniques were employed in monitoring of SAM formation. Under optimized conditions, 1.0 $mmol.L^{-1}$ of the 11-MUA in ethanolic solution and 24 hours were sufficient for the formation of a stable SAM on the gold surface. To obtain further information about the SAM, the Surface Coverage, Dielectric Constant and Thickness of the thiol film adsorbed on gold substrate were performed. After this step, the addition of soluble antigens of *L. infantum* on the SAM was monitored by SPR. Cyclic Voltammetry and Electrochemical Impedance Spectroscopy techniques were employed in characterization of antigen immobilization. After construction of immunosensor, positive canine serum for Visceral Leishmaniasis were added on its surface showing significant variation in the SPR angle, indicating excellent sensitivity of the technique for antigen-antibody interaction detection. On the other hand, the addition of negative serum was not accompanied with a significant response, demonstrating that the immunosensor shows excellent specificity against anti-*L infantum* antibodies. Therefore, this work shows a successfully development of a SPR sensor for anti-*L. infatum* antibodies detection in real time, showing a great perspective as a sensing system of Visceral Leishmaniasis in endemic regions.

Keywords: Surface Plasmon Resonance, Self-Assembled Monolayer, Immunosensor, Visceral Leishmaniasis, anti-*L. infantum*.

A	Área geométrica do eletrodo (cm^2)
Ab	Anticorpos
Ads	Tiol não adsorvido
AFM	Microscopia de Força Atômica
Ag	Antígenos
Au	Sítio de adsorção ou superfície de ouro
Au-Ads	SAM desorganizada
Au-Ads*	SAM no seu estado final organizado
BSA	Albumina de Soro Bovino
C	Concentração $mol.L^{-1}$
c	Coulombs
Con A	Concanavalina A
CYS	Cisteamina
d_3	Espessura da camada orgânica
DCC	Dicicloexilcarbodiimida
ΔE	Intervalo de potencial
Δk_{min}	Deslocamento do vetor onda
$\Delta\theta_{SPR}$	Variação do ângulo de SPR
E	Potencial em volts (V)
EA	Etanolamina
Ea	Eletrodo auxiliar
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EFC	Elemento de Fase Constante
EIS	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

ELISA	Ensaio Imunoenzimático
Er	Eletrodo de referência
Et	Eletrodo de trabalho
$\in_1$	Constante dielétrica do prisma
$\in_a$	Constante dielétrica do ambiente
$\in_3$	Constante dielétrica da camada orgânica
$\in_4$	Constante dielétrica do meio
$\in_r$	Parte real da constante dielétrica do filme de ouro
F	Constante de Faraday
Ø	Cobertura de superfície relativa
GLU	Glutaraldeído
Hepes	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfônico
I_a	Corrente de pico anódica
I_c	Corrente de pico catódica
I_d	Extensão de decaimento da onda de plásmons de superfície ou da onda evanescente
IgG	Imunoglobulinas G
IgM	Imunoglobulinas M
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
$K_3[Fe(CN)_6]$	Hexacianoferrato de potássio
K_a	Constante de associação
K_d	Constante de dissociação
$k_{obs,1}$	Constante cinética da etapa rápida
$k_{obs,2}$	Constante cinética da etapa lenta
k_{OPS}	Vetor onda da onda de plásmons de superfície ou constante de propagação da onda de plásmons de superfície

K_t	Constante de rearranjo molecular
k_x	Vetor onda da luz incidente
LC	Leishmaniose Cutânea
LIT	Meio de Cultura, do tipo Live Infusion Tryptose
LPS	Lipopolissacarídeo
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
λ	Comprimento de onda da luz incidente e da onda de plásmons de superfície.
Mda	Miligraus de ângulo
MPA	Ácido Mercaptopropiônico
11-MUA	Ácido 11-Mercaptoundecanóico
MUD	Mercatoundecanol
n	Número de elétrons
NHS	N-hidroxisuccinimida
3-NT	3-nitrotirosina
OCP	Potencial de Circuito Aberto
OD	Dessorção Oxidativa ou Oxidação Dessortiva
OPS	Ondas de Plásmons de Superfície
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PMB	Sulfato de Polimixina B
Q	Carga associada com a redução de espécies na superfície
RD	Redução Dessortiva ou Dessorção Redutiva
R_{et}	Resistência à transferência eletrônica
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta

rpm	Rotações por minuto
R_S	Resistência da solução
SAMs	Monocamadas Auto-Organizadas
SPR	Ressonância de Plásmons de Superfície
TWEEN 20	Polisorbato 20 ou Surfactante P_{20}
Γ	Cobertura de superfície total (número de moléculas por área)
θ	Ângulo de incidência da luz
θ_{SPR}	Ângulo de SPR crítico ou ângulo de SPR
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
v	Velocidade de varredura
VC	Voltametria cíclica
VCi	Voltamograma Cíclico
VCs	Voltamogramas cíclicos
VPD	Voltametria de Pulso Diferencial
W	Impedância de Waburg

FIGURA 1 - Esquema dos principais componentes de um sensor químico 4

FIGURA 2 - Configurações de Otto (à esquerda) e de Kretschmann (à direita) utilizando o método de reflexão total. Essas duas geometrias podem ser usadas para excitação dos plásmons de superfície, originando as ondas de plásmons de superfície. Na configuração de Otto, o meio dielétrico é colocado entre o prisma e o metal. Na configuração de Kretschman, o filme metálico é colocado diretamente sobre o prisma e os plásmons são excitados do outro lado desse filme. A maioria dos equipamentos de SPR, comerciais ou construídos em laboratório, utiliza a configuração de Kretschmann para excitação dos plásmons de superfície. 8

FIGURA 3 - (a) Representação esquemática da configuração de Kretschmann para SPR. O dielétrico em contato com o metal possibilita a transferência ressonante de energia da onda incidente para a OPS; (b) Curvas de refletância na ausência (θ_{SPR1}) e presença (θ_{SPR2}) de espécies na superfície do filme metálico; (c) Sensograma esquemático representativo da relação entre o θ_{SPR} (dado em mDA -miligraus de ângulo-) e tempo durante a interação de espécies com a superfície do filme metálico (adaptado de Damos *et al*., 2004). 10

FIGURA 4 - Decaimento exponencial da onda evanescente a partir da superfície metálica (I_d). 12

FIGURA 5 - Esquema representativo. Fotografia de um espectrômetro de SPR, modelo AUTOLAB SPRINGLE (a), e imagem ampliada de (a) mostrando a unidade ótica, o prisma e o detector de fotodiodo (b). 13

FIGURA 6 - Disposição de alcanotiol em ouro. O arranjo mostra uma estrutura onde os átomos de enxofre (círculos em cinza-escuro) estão posicionados nas cavidades tríplice da rede de ouro. Observe as rotações alternadas das cadeias de carbono formadas a partir da formação da SAM do mercaptotiol. As cadeias são rotacionadas com valores determinados de torções indicando as orientações relativas das cadeias vizinhas. 16

FIGURA 7 - Formação da SAM através da adsorção de um ácido mercaptocarboxílico em superfície de ouro, seguido por ativação através da adição de uma mistura aquosa contendo EDC/NHS com consequente adição da proteína que se liga covalentemente na SAM ativada. 22

FIGURA 8 - Potenciostato/galvanostato da Autolab PGSTAT 128 N utilizado para as medidas eletroquímicas. 32

FIGURA 9 - Célula eletroquímica utilizada nos experimentos. Ea = Eletrodo auxiliar; Et = Eletrodo de trabalho; Er = Eletrodo de referência. 32

FIGURA 10 - Ilustração do espectrômetro de SPR Autolab Springle utilizado para as medidas ópticas (a) e ilustração do substrato usado nas análises de SPR colocado sobre o prisma de vidro (b). 33

FIGURA 11 - Centrífuga refrigerada Jouan BR4i multifunction utilizada no processo de lavagem e separação durante a produção dos antígenos solúveis de *L. infatnum*. 33

FIGURA 12 - Ultrapurificador de água PURELAB Classic (ELGA) utilizado para ultrapurificação de água utilizada nos experimentos. 34

FIGURA 13 - Voltamograma cíclico (VCi) típico obtido para superfície de ouro limpa em solução 0,5 mol.L^{-1} de H_2SO_4, *v* de 50mV.s^{-1}, ΔE, de - 0.1 a 1.5 V *vs* Ag/AgCl. 36

FIGURA 14 - VCs obtidos para diferentes concentrações do 11-MUA em diferentes tempos de adsorção. Efeito da sonda em eletrodo limpo (FIGURAS 14(a), 14(b) e 14(c), curvas 1) e eletrodo modificado com 0,1 (curvas 2), 1,0 (curvas 3) e 10,0 (curvas 4) mmol.L^{-1} do 11-MUA, após 2,0 horas (FIGURA 14(a)), 16,0 horas (FIGURA 14(b)) e 24,0 horas (FIGURA 14(c)). Todos os VCs foram obtidos em 1,0 mmol.L^{-1} de ferricianeto em 0,1 mol.L^{-1} KCl, *v* de 20 mV.s^{-1} e ΔE de 0 a 0,5V *vs.* Ag/AgCl. 42

FIGURA 15 - RD obtida através da técnica de VPD. Voltamogramas obtidos do branco (curvas 1, FIGURAS 15(a), 15(b) e15 (C)), e para as diferentes concentrações de 11-MUA: 0,1 (curvas 2), 1,0 (curvas 3) e 10,0 (curvas 4) mmol.L^{-1}, após 2,0 horas (FIGURA 15(a)), 15,0 horas (FIGURA 15(b)) e 24 horas (FIGURA 15(c)) de modificação. Todos os voltamogramas foram obtidos em solução aquosa contendo 0,5 mol. L^{-1} de KOH, *v* de 20 mV.s^{-1} e ΔE de 0,1 a -1,3V vs. Ag/AgCl. Anteriormente a realização das medidas a solução aquosa de KOH foi desaerada com gás nitrogênio durante aproximadamente 10 minutos. 45

FIGURA 16 - Diferentes tempos de adsorção estudados para formação da SAM do 11-MUA. As curvas 1 das FIGURAS 16(a) e 16(b), referem-se, respectivamente, ao VC e VPD do eletrodo limpo em suas respectivas soluções. Já as curvas 2, 3, 4, 5, 6 e 7 das FIGURAS 16(a) e 16(b) referem-se, respectivamente, aos VCs e aos voltamogramas de pulsos diferenciais obtidos após 0,5, 2,0, 8,0, 16,0, 24,0 e 60,0 horas de interação com 1,0 mmol.L^{-1} do 11-MUA. Os VCs (FIGURA 16(a)) foram obtidos com 1,0 mol.L^{-1} de $Fe(CN)_6^{3-}$ em 0,1 mol.L^{-1} de KCl, *v* de 20 mV.s^{-1} e ΔE de 0 a 5 V *vs*. Ag/AgCl. A RD (FIGURA 16(b)) foi realizada através da VPD na presença de uma solução aquosa contendo 0,5 mol.L^{-1} de KOH anteriormente desaerada com gás nitrogênio, *v* de 20 mV.s^{-1} e ΔE de 0,1 a -1,3 V *vs*. Ag/AgCl. 48

FIGURA 17 - Diferentes valores obtidos para Γ para cada tempo de adsorção de 1,0 mmol.L^{-1} 11-MUA. 49

FIGURA 18 - (a) Sensograma referente à associação e dissociação do antígeno *L. infantum* sobre SAM do 11-MUA previamente ativada em EDC/NHS ([*L. infantum*] = 50 μgmL^{-1}); (b) Sensogramas referentes à associação do antígeno *L. infantum* a partir de soluções de diferentes concentrações: 10, 18, 30, 40 e 50 μg.mL^{-1}. 54

FIGURA 19 - VCs mostrando o comportamento de 1,0 mmol.L^{-1} de $Fe(CN)_6^{3-}$ em eletrodo de ouro limpo (curva 1), em SAM do 11-MUA (curva 2) e em imunosensor (curva 3). As medidas foram realizadas em 0,1 mol.L^{-1} de KCl, *v* de 20 mV.s^{-1} e ΔE de 0 a 0,5 V vs. Ag/AgCl. 55

FIGURA 20 - Diagrama de Nyquist (gráfico Z' vs. Z") para as medidas de EIS realizadas em eletrodo de ouro limpo (El Au limpo), eletrodo modificado com SAM (El Au-SAM) e após imobilização dos antígenos sobre a SAM (El Au-SAM-Ag). A sonda redox utilizada foi $Fe(CN)6^{3-/4-}$ 1,0 mmol.L^{-1} em KCl 0,1 mol.L^{-1}. A amplitude foi 10 mV, e a faixa de frequência de 0,1 a 10^5 Hz. Cada medida foi obtida em OCP e em potencial aplicado, obtendo resultados equivalentes para ambos. 57

FIGURA 21 - Circuito equivalente utilizado para as medidas de EIS. 58

FIGURA 22 - Curvas de Refletância. (a) Espectros referentes à solução binária (meio 1) antes e após adsorção do 11-MUA em superfície de ouro. (b) Espectros referentes ao etanol (meio 2) antes e após adsorção do 11-MUA em superfície de ouro. A $\Delta\theta_{SPR}(1)$ e $\Delta\theta_{SPR}(2)$ são usados para calcular o $\Delta k_{min}(1)$ e $\Delta k_{min}(2)$, respectivamente. 61

FIGURA 23 - Sensograma mostrando imobilização e imunorreação de antígenos solúveis de *L. infantum* sobre SAM do 11-MUA em superfície de ouro. Posição 1, injeção de 50 $\mu g.mL^{-1}$ de antígenos solúveis de *L. infantum* sobre SAM previamente ativada; Posições 2, 4 e 6 lavagem com tampão HBS-EP pH 7,4; Posição 3, injeção de 100 $mmol.L^{-1}$ de EA; Posição 5, injeção de soro canino positivo diluído 50 vezes em tampão HBS-EP pH 7,4. 63

FIGURA 24 - Sensogramas envolvendo etapa de associação entre antígenos solúveis de *L. infantum* e anti - *L. infantum* durante 10 minutos de interação. Foram injetados sobre o imunosensor 200 µL de soros caninos positivos em diferentes diluições: 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 e1:6400, curvas 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, respectivamente. 64

TABELA 1 - Exemplos recentes de biosensores construídos através de SAMs. 27

TABELA 2 - Diferentes I_a e I_c obtidas por VC utilizando como sonda ferricianeto em KCl em eletrodo limpo e após modificação com diferentes concentrações de 11-MUA após tempo de interação de 2,0 horas. 41

TABELA 3 - Diferentes I_c obtidas por VPD para eletrodo de ouro modificado com diferentes concentrações de 11-MUA em 0,5 mol.L^{-1} de KOH após tempo de interação de 2,0 horas. 46

TABELA 4 - Diferentes I_c obtidas por VPD para eletrodo de ouro modificado com diferentes concentrações de 11-MUA em 0,5 mol.L^{-1} de KOH após tempo de adsorção de 8,0 horas. 46

TABELA 5 - Diferentes I_c obtidas por VPD para eletrodo de ouro modificado com diferentes concentrações de 11-MUA em 0,5 mol.L^{-1} de KOH após tempo de adsorção de 16,0 horas. 46

TABELA 6 - Diferentes I_c obtidas por VPD para eletrodo de ouro modificado com diferentes concentrações de 11-MUA em 0,5 mol.L^{-1} de KOH após tempo de adsorção de 24,0 horas. 47

TABELA 7 - Valores de I_c, Q e Γ obtidos através da técnica de RD após diferentes tempos de adsorção de 1,0 mmol.L^{-1} 11-MUA. 49

TABELA 8 - Valores obtidos a partir do ajuste não linear da equação representante do modelo aos dados de Redução Dessortiva mostrados na FIGURA 17. 51

TABELA 9 - Valores de $\Delta\theta_{SPR}$ obtidos devido a adição de diferentes concentrações de antígenos brutos solúveis de *L. infantum* sobre SAM do 11-MUA após 30 minutos de imoblização. 53

TABELA 10 - Valores de $\Delta\theta_{SPR}$ obtidos após adição de de soros caninos positivos em diferentes diluições sobre sobre o imunosensor após 10 minutos de interação. 64

SUMÁRIO

RESUMO i

ABSTRACT ii

LISTA DE ABREVIATURAS iii

LISTA DE ILUSTRAÇÕES vii

LISTA DE TABELAS xi

1. INTRODUÇÃO 1

2. OBJETIVOS 3

3. REVISÃO DE LITERATURA 4

1.1 Sensores 4

1.2 Biosensores 5

1.2.1 Sensores Biocatalíticos 5

3.2.2 Biosensores de Afinidade 6

3.2.2.1 Imunosensores 6

1.3 Ressonância de Plásmons de Superfície (SPR) 7

3.3.1 Histórico 7

3.3.2 Princípio de transdução da técnica de SPR 8

3.3.3 Instrumentação da técnica de SPR 12

1.4 Modificação da Superfície de Ouro: formação de Monocamadas Auto-Organizadas 14

3.4.1 Estrutura das SAMs 15

3.4.2 Preparação das SAMs 16

3.4.2.1 Substratos 17

3.4.2.2 Pré-Tratamento da superfície de ouro 17

3.4.2.3 Tipo de solvente 18

3.4.2.4 Concentração e tempo de imersão do substrato 19

3.4.2.5 Efeito de oxigênio em solução 19

3.4.3 Transferência eletrônica através de SAMs 20

3.4.4 Imobilização de proteínas sobre SAMs: plataforma versátil para construção de biosensores 20

3.4.4.1 Ligações Covalentes 21

3.4.4.2 Acoplamento de nucleófilos com grupos carboxílicos 21

3.5 Aplicações recentes da técnica de SPR no desenvolvimento de biosensores empregando SAMs 23

3.6 Leishmaniose 28

3.6.1 Aspectos gerais e atuais sobre a Leishmaniose 28

3.6.2 Leishmaniose Visceral. Agente etiológico, transmissor e hospedeiro 28

3.6.3 Técnicas empregadas no diagnóstico da Leishmaniose Visceral 29

4. PARTE EXPERIMENTAL 31

4.1 Reagentes e Soluções 31

4.2 Equipamentos 31

4.3 Produção de Antígenos Solúveis de *Leishmania infantum* 34

4.4 Soros Caninos 35

4.5 Limpeza da superfície de ouro 35

4.6 Formação e Caracterização da SAM na superfície do eletrodo de ouro 36

4.7 Construção do Imunosensor através da técnica de SPR 37

4.7.1 Construção da SAM em substratos de SPR 37

4.7.2 Ativação dos grupos funcionais terminais da SAM 37

4.7.3 Adição de Antígenos solúveis de *Leishmania infantum* sobre o disco sensor 37

4.8 Caracterização Eletroquímica do Imunosensor 38

4.9 Detecção da imunorreação entre antígenos *L. Infantum* e anticorpos anti - *L. infantum* através da técnica de SPR 38

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 40

5.1 Construção e Caracterização da SAM através de Técnicas Eletroquímicas 40

5.1.1 Estudo do efeito da concentração do 11-MUA para formação da SAM através da Voltametria Cíclica 40

5.1.2 Estudo da concentração do 11-MUA para formação da SAM através da Redução Dessortiva 43

5.1.3 Estudo do tempo de adsorção de 1,0 $mmol.L^{-1}$ do 11-MUA através da Voltametria Cíclica e Redução Dessortiva 47

5.2 Construção do Imunosensor 52

5.2.1 Formação da SAM do 11-MUA em disco de ouro e sua ativação 52

5.2.2 Adição de antígenos solúveis de *Leishmania infantum* sobre o disco sensor 52

5.3 Caracterização do Imunosensor 55

5.3.1 Caracterização do Imunosensor através da Voltametria Cíclica 55

5.3.2 Caracterização do imunosensor através da Espectroscopia de Impedância Eletroquímica 56

5.4 Estudo complementar da modificação da superfície de ouro 58

5.4.1 Determinação da Espessura e Constante Dielétrica da SAM do 11-MUA 58

5.5 Detecção da imunorreação entre antígenos *L. Infantum* e anticorpos anti-*L .infantum* através da técnica de SPR 61

6. CONCLUSÕES 65

7. PERSPECTIVAS FUTURAS 67

8. ANEXO 68

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 69

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose visceral (LV) tem despertado grande preocupação das autoridades sanitárias devido a grande disseminação desta doença nas últimas décadas. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2010) são 500.000 novos casos de LV por ano, sendo uma parasitose fatal quando não tratada. Os métodos atualmente empregados em diagnósticos clínicos da LV são laboriosos, exigindo inúmeras etapas para sua realização, além de terem demonstrado baixa sensibilidade para detectarem os casos iniciais da doença, em que a carga parasitária na corrente sanguínea ainda é muito baixa, gerando falsos negativos para a doença. Dessa forma é nítida a necessidade de desenvolver metodologias que permitam um diagnóstico mais rápido e mais seguro em áreas endêmicas, garantindo maior controle da LV nessas áreas.

Neste sentido, o desenvolvimento de sensores químicos tem apresentado grande potencial na biomedicina (Thevenot *et al*., 2001). Atualmente os imunosensores (biosensores que exploram a capacidade de interação antígeno-anticorpo) tem possibilitado a criação de sistemas com elevada sensibilidade e seletividade, sendo grandes perspectivas para a criação de novas metodologias em diagnósticos clínicos, principalmente para doenças importantes que apresentam altos índices de mortalidade.

Dessa forma há de se destacar a potencialidade da técnica de Ressonância de Plásmons de Superfície (SPR, do inglês Surface Plasmons Resonance) para o desenvolvimento de sensores. As vantagens da espectroscopia de SPR como um dispositivo de biosensoriamento está em sua capacidade de detecção em tempo real e *in vivo*, possibilidade de regeneração da superfície do sensor (reduzindo tempo bem como o custo das análises), as medidas são diretas, ou seja, não necessitam de marcadores químicos e/ou biológicos, além de tornar possível a detecção de analitos em meios biológicos complexos com alta especificidade e sensibilidade.

No entanto, para a construção de um imunosensor eficiente a metodologia de imobilização de biomoléculas torna-se essencial uma vez que a espécie a ser imobilizada deve manter suas propriedades de reconhecimento. O emprego de Monocamadas Auto-Organizadas (SAMs, do inglês Self-Assembled Monolayers) como fase inicial para construção de biosensores tem proporcionado maior sensibilidade e estabilidade a esses sistemas preservando as propriedades das moléculas imobilizadas (Troughton *et al*., 1988).

Neste contexto, a aplicação da técnica de SPR para o desenvolvimento de imunosensores construídos através de SAMs é uma grande perspectiva, principalmente como método de detecção para doenças parasitárias importantes, como a LV.

De acordo com o apresentado na presente dissertação, foi construído o primeiro imunosensor baseado na técnica de Ressonância de Plásmons de Superfície para detecção da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) através da imobilização covalente de antígenos solúveis de *Leishmania infantum* sobre Monocamadas Auto-Organizadas em superfície de ouro, com detecção direta e altamente sensível a anticorpos anti – *Leishmania infantum*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolvimento de um Imunosensor empregando Ressonância de Plásmons de Superfície para detecção em tempo real da Leishmaniose Visceral através da imobilização covalente de antígenos solúveis de *Leishmania infantum* sobre Monocamadas Auto-Organizadas em superfície de ouro.

2.2 Objetivos específicos

Estudo da melhor concentração bem como do melhor tempo de adsorção do ácido 11-mercaptoundecanóico sobre eletrodo de ouro para formação de Monocamadas Auto-Organizadas e caracterização da SAM através das técnicas de Voltametria Cíclica e pelo método de Redução Dessortiva realizado por Voltametria de Pulso Diferencial;

Propor um modelo de formação da SAM do 11-MUA, e calcular os valores da constante de associação (K_a), constante de rearranjo molecular (K_t) e a cobertura de superfície total (Γ) para os tióis adsorvidos na superfície metálica através do método de Redução Dessortiva. Posteriormente, obter por Ressonância de Plásmons de Superfície valores da espessura (d_3) e constante dielétrica ($\in_3$) da SAM formada;

Construção do imunosensor através da imobilização covalente de antígenos solúveis de *Leishmania infantum* sobre a SAM previamente ativada e monitoramento do processo de ligação dos antígenos por SPR;

Caracterização do imunosensor através das técnicas de Voltametria Cíclica e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica, utilizando em ambas as técnicas o hexacianoferrato de potássio como sonda redox;

Avaliar por SPR a sensibilidade e seletividade do sensor desenvolvido para detecção em tempo real de anticorpos anti - *L. infantum* através da adição em diferentes diluições de soros caninos positivos e negativos para a Leishmaniose Visceral sobre o imunosensor.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Sensores

De acordo com a literatura, há inúmeras definições para sensores (Hulanicki *et al*., 1991; Camman, 1990; Vlasov *et al*., 1992). Dentre estas definições a de Vlasov e colaboradores (1992), a qual generaliza as características específicas descritas pelas outras definições é: "sensor é um dispositivo primário que reage (responde) para algumas propriedades específicas do ambiente e possibilita o registro de uma resposta através de um respectivo sinal elétrico (óptico, etc)".

Segundo esses autores, os sensores físicos podem registrar parâmetros como temperatura, pressão e aceleração dos sistemas (Vlasov *et al*., 2010). Já os sensores químicos são dispositivos que transformam uma informação química, como a variação da concentração de um componente específico de uma amostra em relação à composição total, em um sinal analítico útil ou mensurável (Thevenot *et al*., 2001). A FIGURA 1 apresenta um esquema geral dos principais componentes de um sensor químico.

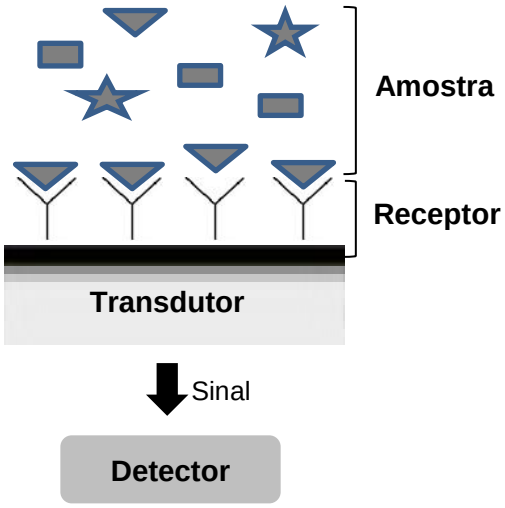

FIGURA 1. Esquema dos principais componentes de um sensor químico.

A obtenção da informação analítica de um sensor depende essencialmente da capacidade do receptor, usualmente posicionado na extremidade do transdutor, em reconhecer a espécie de interesse de maneira seletiva. Há inúmeras alternativas de imobilização deste elemento reconhecedor (receptor) na superfície do sensor e um aspecto relevante associado a

esta operação envolve a necessidade de acesso a algum processo químico que viabilize a transdução do sinal para o detector. Por sua vez, o sinal transmitido deve ser maximizado em relação às informações sobre o analito, garantindo boa sensibilidade do dispositivo sensor.

Os sensores possuem características peculiares que os distinguem de métodos instrumentais de grande porte (como a cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa, as espectrometrias de massa, infravermelho, ressonância magnética nuclear, entre outros), os quais não permitem a obtenção de informações *in situ* e em tempo real, condições que são facilmente obtidas em sensores. Outras características vantajosas no uso de sensores são sua portabilidade, facilidade de automação, possibilidade de miniaturização e baixo custo.

Neste sentido, a efetiva capacidade dos sensores em discriminar o analito constitui-se um aspecto de grande importância em sua fabricação para uso geral e em larga escala. Dispositivos de sensoriamento estão sendo amplamente empregados em diversos ramos da indústria, medicina, agricultura, monitoramento ecológico, e assim por diante (Vlasov *et al*., 2010) .

3.2 Biosensores

Os biosensores constituem um campo interdisciplinar que atualmente é uma das áreas mais ativas da pesquisa em química analítica. É uma subclasse de sensores químicos, que combina a elevada sensibilidade indicada pelos baixos limites de detecção, com a alta especificidade do processo de reconhecimento biológico (Niina *et al*., 2010). De acordo com Gronow (1984) biosensores são dispositivos analíticos que envolvem um componente de reconhecimento biológico (enzimas, células inteiras, tecidos, receptores, anticorpos, antígenos), em íntimo contato com uma superfície do transdutor que converte o sinal biológico em um sinal quantificável. São objetos de uma extensa pesquisa para o desenvolvimento em diversos campos de aplicação, dentre outros, incluem diagnósticos médicos, monitoramento ambiental e análises de alimentos (Baeumner *et al*., 2003).

Segundo Wang (2006) os biosensores podem ser divididos em duas principais categorias com base na natureza do processo de reconhecimento biológico: sensores biocatalíticos e sensores de afinidade, os quais serão descritos a seguir.

3.2.1 Sensores Biocatalíticos

Incorporam enzimas, células inteiras ou fragmentos de tecidos que reconhecem o

analito alvo e produzem algum resultado detectável (Wang, 2006). Como relatado por Grieshaber e colaboradores (2008) embora muitos tipos de elementos de reconhecimento tenham sido utilizados em dispositivos de biosensoriamento, biosensores eletroquímicos usam principalmente enzimas, devido à sua alta atividade biocatalítica e especificidade. Como descrito por Copeland (2000), o arranjo dos aminoácidos no sítio ativo da enzima, frequentemente encontrado no centro da proteína, se liga com o substrato específico tornando a enzima extremamente seletiva.

A utilização de enzimas como sistema de reconhecimento muitas vezes é relativamente simples e não exige instrumentação dispendiosa. Esses sensores são normalmente fáceis de usar, compactos e baratos. Sensores biocatalíticos também podem ser facilmente adaptados a laboratórios clínicos e/ou de análise industrial. Um dos sensores biocatalíticos mais empregados comercialmente é o glicosímetro, utilizado para monitoramento de glicose no sangue.

No entanto, muitos analitos de interesse não são passíveis de detecção por biosensores enzimáticos, devido à falta de enzimas seletivas disponíveis para o analito (substrato enzimático) (Barlett, 2008; Eggins, 2002).

3.2.2 Biosensores de Afinidade

Como descrito por Wang (2006) biosensores de afinidade usam a ligação forte e seletiva de biomoléculas como anticorpo (Ab, do inglês antibody), receptores de membrana, ou oligonucleotideos, com uma substância alvo para produzir um sinal mensurável. O reconhecimento molecular em biosensores de afinidade é determinado principalmente pelo tamanho e formato complementares do sítio de ligação para o analito de interesse (Wang, 2006). De acordo com Eggins (2002), a alta afinidade e especificidade da biomolécula ligada com o seu ligante fazem com que esses sensores sejam extremamente sensíveis e seletivos. O processo de vinculação, como a hibridização de DNA ou a complexação do Ab com seu antígeno (Ag, do inglês antigen) é regido por considerações cinéticas e termodinâmicas.

3.2.2.1 Imunosensores

O imunosensor é um biosensor de afinidade que explora a capacidade de um anticorpo em reconhecer seu antígeno em um meio muito complexo (Jain, 2005; Salata, 2004; Periasamy *et al*., 2009; Wang *et al*., 2008). O princípio de imunoensaios foi estabelecido

primeiro, por Yalow e Berson (1959) e, mais tarde, Clark e Lyons (1962) desenvolveram o conceito de imunosensor.

Os imunosensores tem sido explorados como métodos semi-quantitativos ou quantitativos de detecção analítica. São dispositivos que contém uma biomolécula de detecção, Ag ou Ab, que pode converter um sinal biológico em um sinal eletroquímico ou óptico (Mattoussi *et al*., 2004). Estes sinais de respostas dependem das características de ligação entre as biomoléculas imobilizadas (Ab sobre a superfície do transdutor tendo o Ag como analito de interesse ou o contrário). O Ab ou Ag imobilizado pode complexar de forma a alterar propriedades do transdutor, incluindo sua capacitância, resistência elétrica, índice de refração ou constante dielétrica, etc.

No passado, como relatado por Ronkainen-Matsuno e outros (2008) a disponibilidade limitada de variedades de Ab produzidos principalmente por universidades e pequenas empresas biotecnológicas dificultou o desenvolvimento dos imunosensores. No entanto, os Ab são agora vendidos por muitas fontes, incluindo grandes fabricantes de reagentes de laboratório como a Sigma Aldrich.

Atualmente, imunosensores são aplicados amplamente em muitos campos, tais como, medicina clínica (ramo em que estão sendo potencialmente utilizados para desenvolvimento de novas metodologias de diagnósticos clínicos), indústria alimentar, análise ambiental, entre outros (Dhawan *et al*., 2009).

De forma geral, a premissa básica no desenvolvimento de um imunosensor está na sua capacidade em avaliar processos interfaciais e superficiais, e dessa forma, a técnica de Ressonância de Plásmons de Superfície tem apresentado grande potencial para avaliação desses processos.

3.3 Ressonância de Plásmons de Superfície (SPR)

3.3.1 Histórico

A primeira documentação de trabalhos sobre Plásmons de Superfície, de acordo com Homola (2006), foi realizada em 1902, quando o físico Wood (1902) observou faixas estreitas e escuras de feixes luminosos sobre superfícies metálicas quando o mesmo iluminou uma rede de difração metálica com luz policromática. Estas faixas foram referidas por ele como irregularidades e estavam associadas à excitação de ondas eletromagnéticas na superfície da rede de difração.

Otto (1968), Kretschmann e Raether (1968), observaram que quando um feixe de luz monocromática incide sobre um fino filme metálico em uma configuração de reflexão total atenuada, observa-se diminuição da intensidade de luz refletida. Este fenômeno foi associado à excitação de plásmons na superfície metálica, mostrando um método conveniente para excitação de plásmons em filmes finos (FIGURA 2).

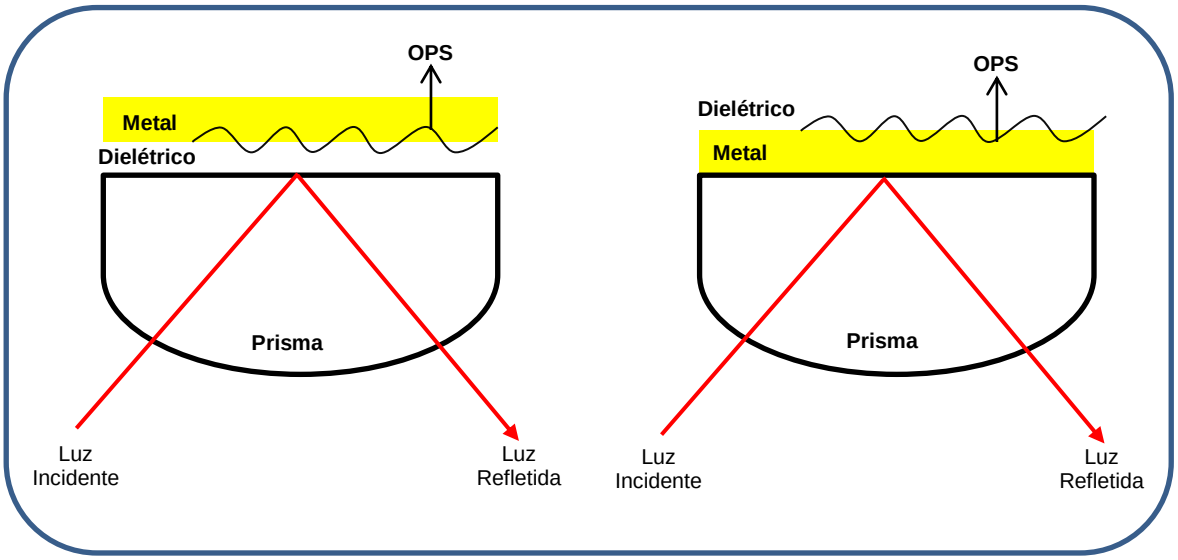

FIGURA 2. Configurações de Otto (à esquerda) e de Kretschmann (à direita) utilizando o método de reflexão total. Essas duas geometrias podem ser usadas para excitação dos plásmons de superfície, originando as ondas de plásmons de superfície. Na configuração de Otto, o meio dielétrico é colocado entre o prisma e o metal. Na configuração de Kretschman, o filme metálico é colocado diretamente sobre o prisma e os plásmons são excitados na interface externa. A maioria dos equipamentos de SPR, comerciais ou construídos em laboratório, utiliza a configuração de Kretschmann para excitação dos plásmons de superfície.

Os sistemas de SPR que operam mediante o emprego da configuração de Kretschmann são os de maiores usos dentre as configurações, pois geralmente apresentam maior sensibilidade e resolução em relação aos dispositivos desenvolvidos por grades de difração (Kretschmann *et al*., 1968; Homola *et al*., 1999). Sendo assim, o próximo item descreve o princípio de transdução da técnica empregando a configuração de Kretschmann.

3.3.2 Princípio de transdução da técnica de SPR

O princípio de construção dos chamados sensores de SPR baseados na configuração de Kretschmann envolve um feixe luminoso que atravessa um prisma e alcança uma superfície metálica, geralmente de ouro, de forma a excitar os plásmons de superfície. Para entendermos

o que é, e como ocorre a excitação dos plásmons de superfície, a definição de termos como reflexão interna total e ângulo de SPR crítico será descrita.

Quando uma luz monocromática (laser ou LED) e plano polarizada (seu componente vetor-elétrico é paralelo ao plano de incidência) atinge uma interface contendo dois meios com constantes dielétricas diferentes (exemplo ar-água), parte da luz é refletida e parte é refratada. O aumento do ângulo de incidência acarreta aumento no ângulo de refração, e quando este alcança 90° a refração é tangente à interface. Os ângulos acima deste ângulo de refração tangencial são denominados ângulos de reflexão total (Kretschmann *et al*., 1968). Neste momento, a radiação incidente é refletida a aproximadamente 100% por isso reflexão interna total.

Em certos ângulos de incidência, os elétrons livres do metal (ouro) oscilam e absorvem energia da radiação incidente dando origem a um campo eletromagnético evanescente devido à formação de ondas de plásmons de superfície (OPS), também denominadas ondas evanescentes, que se propagam paralelamente à interface do metal com o meio dielétrico (FIGURA 3(a)). Quando a radiação incidente transfere energia para a OPS ocorre o fenômeno da ressonância entre as mesmas, sendo detectado pela grande atenuação da intensidade de radiação refletida (FIGURA 3(b)). Sob condições de máximo acoplamento entre a radiação incidente e a OPS o ângulo de incidência é denominado ângulo de ressonância de plásmons de superfície (θ_{SPR}) ou ângulo de SPR crítico, condições máximas de ressonância da OPS são acompanhadas por um mínimo da reflexão interna total (FIGURA 3(b)) (Kretschmann *et al*., 1968). Dessa forma, alterações nas proximidades da interface metal/ambiente promovem uma alteração nas condições de ressonância do sistema, como resultado, ocorre um deslocamento no θ_{SPR} (FIGURAS 3(a)) e 3(b)).

Contudo, para que a OPS entre em ressonância com a radiação incidente é necessário que ambas tenham vetores de onda de igual magnitude. Uma vez que o vetor de propagação da OPS é superior ao da onda incidente, não ocorre excitação da OPS mediante o contato direto destas ondas eletromagnéticas. Portanto, foram desenvolvidos diversos sistemas para elevar o vetor onda da luz incidente, de forma que a OPS possa receber energia da onda incidente através de uma transferência ressonante de energia. Como relatado por Homola e Koudela (1999) a boa sensibilidade e resolução de sensores de SPR usando um prisma como sistema óptico para elevar o momento da onda incidente tem resultado em grande uso dessa configuração.

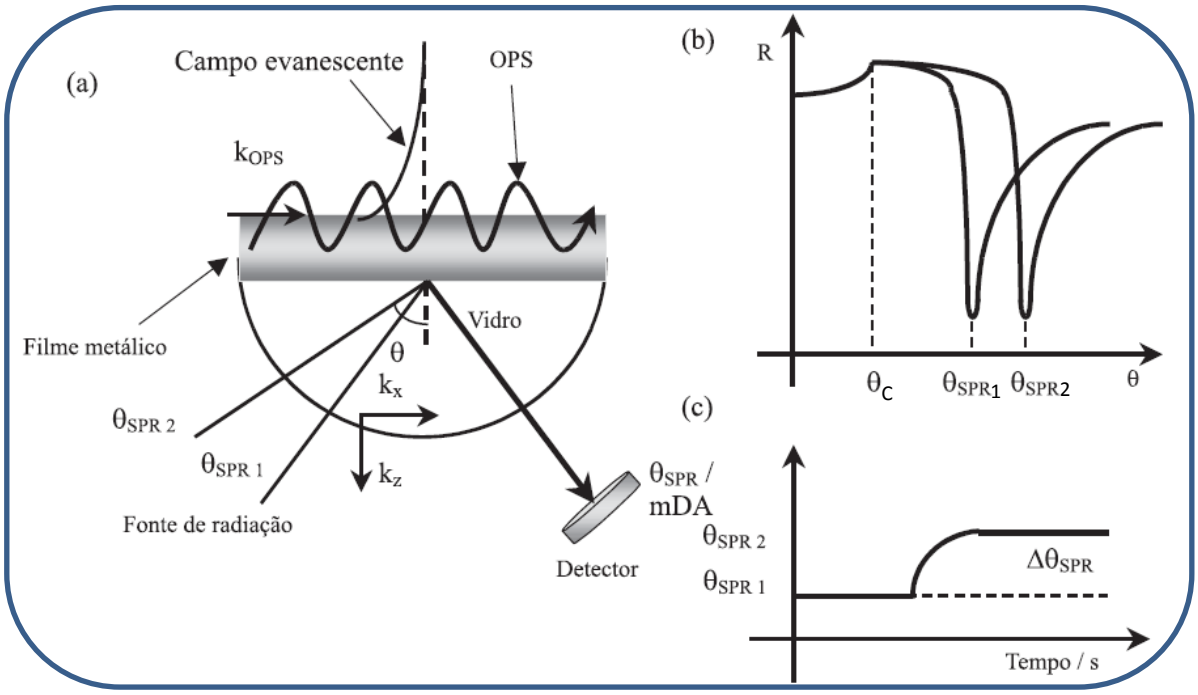

FIGURA 3. (a) Representação esquemática da configuração de Kretschmann para SPR. O dielétrico em contato com o metal possibilita a transferência ressonante de energia da onda incidente para a OPS; (b) Curvas de refletância na ausência (θ_{SPR1}) e presença (θ_{SPR2}) de espécies na superfície do filme metálico; (c) Sensograma esquemático representativo da relação entre o θ_{SPR} (dado em mDA -miligraus de ângulo-) e tempo durante a interação de espécies com a superfície do filme metálico (adaptado de Damos *et al*., 2004).

Conforme pode ser verificado na expressão a seguir, a componente paralela do fóton de luz incidente tem o vetor onda (k_x) relacionado com o ângulo de incidência da luz é dado por:

$$k_x = \sqrt{\epsilon_1}\,\frac{2\pi}{\lambda}\,\sin\theta_{SPR} \tag{1}$$

onde θ é o ângulo de incidência da luz com a superfície do metal, λ é o comprimento de onda da luz incidente, e ϵ_1 é a constante dielétrica do prisma. Adicionalmente, como descrito por Homola e Koudela (1999) a constante de propagação da OPS numa interface metal/dielétrico é expressa por:

$$k_{OPS} = \frac{2\pi}{\lambda}\sqrt{\frac{\epsilon_r\epsilon_a}{\epsilon_r + \epsilon_a}} \tag{2}$$

em que λ é o comprimento de onda da OPS, ϵ_r é a parte real da constante dielétrica do filme de ouro, e ϵ_a é a constante dielétrica do ambiente (espécies que interagem com a superfície). Assim, é possível monitorar o ângulo de ressonância de plásmons de superfície mediante um monitoramento da curva de refletância *vs.* ângulo de incidência (FIGURA 3(b)). No instante em que a componente paralela do fóton de luz incidente é equivalente à constante de propagação da OPS, ou seja, $k_x = k_{OPS}$ (Equações 1 e 2) ocorrerá a transferência ressonante de energia da onda incidente para a OPS ocorrendo a queda acentuada na refletância, como pode ser verificado através das expressões 3 e 4.

$$\sqrt{\epsilon_1}\,\frac{2\pi}{\lambda}\sin\theta_{SPR} = \frac{2\pi}{\lambda}\sqrt{\frac{\epsilon_r\epsilon_a}{\epsilon_r+\epsilon_a}} \tag{3}$$

$$\theta_{SPR} = arcsen\left(\sqrt{\left(\frac{\epsilon_r\epsilon_a}{\epsilon_r+\epsilon_a}\right)\times\frac{1}{\epsilon_1}}\right) \tag{4}$$

Nesta última expressão pode-se verificar que as propriedades ópticas do sistema, como as constantes dielétricas do metal, do prisma e da matriz, provocam mudanças no ângulo de ressonância, tornando possível aplicar o fenômeno de SPR ao monitoramento de alterações na superfície do sensor, mediante um acompanhamento do ângulo de ressonância com o tempo (FIGURA 3(c)). Assim, mediante o monitoramento do índice de refração nas proximidades da superfície do disco sensor é possível aplicar a técnica de SPR para obter informações em tempo real e sem a necessidade de marcadores biológicos e/ou químicos sobre velocidade e extensão da adsorção, determinação de propriedades dielétricas, cinética de associação e dissociação, bem como constantes de afinidades em interações específicas (Green *et al.*, 2000).

Nas medidas de SPR pode-se também monitorar a refletância em função da variação do comprimento de onda, fixando o ângulo de incidência (Henken *et al.*, 1998), embora a maioria dos trabalhos relatados na literatura monitoram a refletância em um único comprimento de onda em função do ângulo de incidência.

Também é importante ressaltar a magnitude do vetor campo elétrico das OPS formadas, pois, esta intensidade decai exponencialmente com a distância da superfície do

ouro (FIGURA 4). Como relatado por Liedberg, Lundstrom e Stenberg (1993) a extensão desse decaimento (I_d) varia de acordo com a espécie que está sendo analisada e é estimada como aproximadamente 25 a 50% do comprimento de onda da luz monocromática utilizada, que em equipamentos comerciais é cerca de 600 – 850 nm.

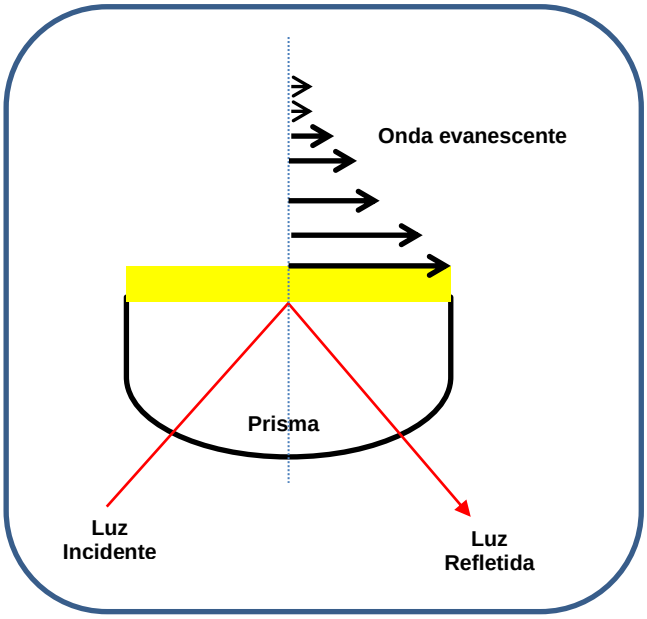

FIGURA 4. Decaimento exponencial da onda evanescente a partir da superfície metálica (I_d).

A extensão desse decaimento pode ser estimada através da equação (Jung *et al*., 1998):

$$I_d = \left[\left(\frac{\lambda}{2\pi} \right) \times \left(\frac{-\epsilon_a^2}{\epsilon_r + \epsilon_a} \right)^{-1/2} \right] \quad (5)$$

onde λ é o comprimento de onda da luz incidente utilizado no equipamento, ϵ_a é o valor da constante dielétrica do ambiente monitorada pelo equipamento de SPR, e ϵ_r é a parte real da constante dielétrica do ouro ou de outro metal utilizado (Kukanskis *et al*., 1999).

3.3.3 Instrumentação da técnica de SPR

Instrumentos baseados em SPR usam um método óptico para medir índice de refração próximo à superfície com elevada sensibilidade e a espessura de filmes formados sobre a superfície metálica. A instrumentação da espectroscopia de SPR pode ser configurada de diferentes maneiras para medir a variação do ângulo de SPR ($\Delta\theta_{SPR}$). Em geral, três diferentes

sistemas ópticos são usados para excitar os plásmons de superfície: sistemas com prismas, grades de difração e guias de ondas ópticos. Espectrômetros de SPR baseados na configuração de Kretschmann utilizam um prisma como sistema óptico para excitação dos plásmons de superfície. Nesta configuração os componentes básicos são: uma fonte luminosa plano polarizada (geralmente laser), um prisma onde é colocado sobre sua superfície um fino filme metálico (geralmente ouro), e um fotodetector (detector de fotodiodo ou uma câmera CCD). A FIGURA 5 mostra um esquema representativo ilustrando uma luz incidente (laser) sobre um prisma de vidro, onde sobre o mesmo é colocado um disco de vidro recoberto com um filme de ouro, e um detector de fotodiodo, o qual quantifica a intensidade da luz que foi refletida.

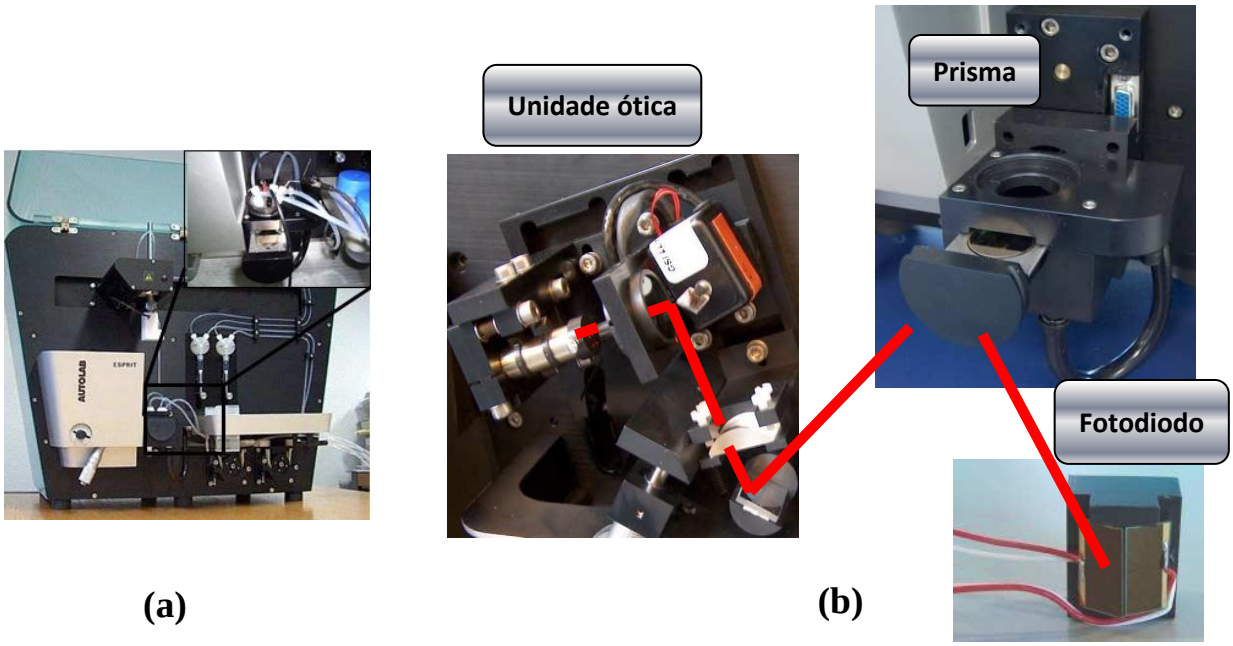

FIGURA 5. Esquema representativo. Fotografia de um espectrômetro de SPR, modelo AUTOLAB SPRINGLE (a), e em (b) mostra a imagem ampliada de (a) verificando a unidade ótica, o prisma e o detector de fotodiodo.

Para melhor resolução dos sistemas de transdução, sua superfície pode ser modificada através de diferentes formas, sendo descrita no próximo item a formação de Monocamadas Auto-Organizadas sobre substratos metálicos.

3.4 Modificação da Superfície de Ouro: formação de Monocamadas Auto-Organizadas

Por uma infinidade de razões, filmes orgânicos finos estão sendo explorados a muitos anos. No século 19, Pockels (1891, 1892, 1893 e 1894) estudou monocamadas na interface ar-água, seguido pelos trabalhos de Rayleigh (1899), Hardy (1912) e outros. Posteriormente,

Langmuir (1917 e 1920) publicou trabalhos envolvendo o estudo de monocamadas de moléculas anfifílicas na superfície da água.

Em substratos sólidos, Blodgett (1935 e 1937) realizou os primeiros estudos sobre a deposição de cadeia longa de ácidos carboxílicos. Mais tarde, pesquisa sistemática sobre sistemas envolvendo Monocamadas Auto-Organizadas foi realizada por Zisman e colaboradores (1946) e Blackman e Dewar (1957).

As SAMs fornecem um sistema conveniente, flexível e simples, o qual se adequa às propriedades interfaciais de metais, óxidos e semicondutores. Este tipo de modificação emprega camadas orgânicas monomoleculares que exibem uma alta organização e que são formadas pela adsorção de constituintes moleculares presentes em solução (ou em fase gasosa) em superfície de sólidos ou em matrizes regulares na superfície de líquidos (no caso do mercúrio e provavelmente de outros metais no estado líquido e ligas). O grau de organização depende da natureza da interação química entre átomos do substrato e do adsorbato, bem como do tipo e força da interação intermolecular entre as moléculas do adsorbato. A estabilidade da monocamada formada é diretamente proporcional à intensidade destas forças de ligação e interação (Love *et al*., 2005).

As SAMs são classificadas de acordo com o mecanismo utilizado na sua fixação sobre o substrato, existindo basicamente três técnicas de fixação: a silanização (Xia *et al*., 2005; Li *et al*., 2003), a técnica de Langmuir-Blodget (Ferreira *et al*., 2005; Petty, 1996) e a adsorção irreversível de moléculas anfóteras funcionalizadas sobre superfícies metálicas ordenadas. De acordo com a literatura mais antiga sobre SAMs (1983-1993), o foco de grande parte dos trabalhos refere-se à formação de SAMs através da adsorção dos compostos organosulfurados da solução ou da fase de vapor em substratos de ouro (Nuzzo *et al*., 1983; Porter *et al*., 1987; Bain *et al*., 1989[a]; Biebuyck *et al*., 1994), prata (Walczak *et al*., 1991; Fenter *et al*., 1991), cobre (Laibinis *et al*., 1991), paládio (Love *et al*., 2003; Carvalho *et al*., 2002), platina (Li *et al*., 2003) e Mercúrio (Muskal *et al*., 1996). Estes estudos utilizaram três tipos de compostos organosulfurados: alcanotióis $HS(CH_2)_nX$, dissulfetos de dialquila $X(CH_2)_mS\text{-}S(CH_2)_nX$, e sulfetos de dialquila $X(CH_2)_mS(CH_2)_nX$, onde n e m são o número de unidades de metileno e X representa o grupo final da cadeia alquila, podendo ser $-CH_3$,-OH,-COOH e $-NH_2$.

Como relatado por Bain (1988[b]), a alta afinidade de tióis para as superfícies de metais nobres faz com que seja possível gerar superfícies orgânicas quimicamente estáveis, bem definidas e com maior funcionalidade exibida pela maior exposição da interface. Apesar de uma grande variedade de alcanos funcionalizados e de superfícies metálicas terem sido examinadas, o grupo mais empregado e estudado é, indiscutivelmente, o de tióis sobre

superfícies de ouro, cujas estruturas das SAMs formadas por alcanotióis serão discutidas a seguir.

3.4.1 Estrutura das SAMs

Nas últimas duas décadas, a compreensão abrangente das SAMs evoluiu consideravelmente como consequência da disponibilidade de métodos aperfeiçoados ou novos para sua caracterização, promovendo uma compreensão maior da sua organização estrutural bem como de sua construção a nível molecular (Schreiber, 2000; Yang *et al*., 2003; Muller *et al*., 2008).

Apesar de muitas controvérsias ainda existirem sobre a dinâmica do processo de formação e as características estruturais da SAM de alcanotióis em superfícies de ouro, como por exemplo, a estrutura de ligação do grupo funcional, a configuração de construção e a natureza do sítio de adsorção (Torrelles *et al*., 2006; Li *et al*., 2003), já é claro que o processo de formação dessas SAMs envolve uma interação entre o enxofre e o metal com magnitude maior que 41,8 kJ mol^{-1} e também interações laterais entre moléculas adjacentes onde as energias envolvidas são consideradas menor que 41,8 kJ mol^{-1}. O conjunto destas interações confere à monocamada uma estabilidade muito maior que unidades individualmente adsorvidas (Smith *et al*., 2004). Na maioria dos casos, a ordenação específica dos átomos de enxofre na rede metálica define o espaço livre disponível para os componentes orgânicos (FIGURA 6).

Por outro lado, as interações atrativas da cadeia lateral (Van der Waals, ligações de hidrogênio) determinam a organização das moléculas na superfície. Estes grupos orgânicos também podem restringir a densidade de cobertura. O impedimento estérico formado por eles pode limitar o arranjo dos átomos de enxofre formando uma camada menos densa do que a exibida por enxofre elementar em um determinado substrato. Dessa forma, a formação de uma monocamada sobre o ouro exige um equilíbrio devido às interações dos átomos de enxofre com o metal (onde a superfície de ouro é coberta por uma camada de tióis) e às interações entre as cadeias laterais de alcanos, as quais promovem uma organização secundária dessas estruturas que está intimamente relacionada com a estabilidade da SAM formada, sendo alcanotióis de cadeias curtas menos estáveis que os de cadeias longas ($HS(CH_2)_nX$, $n > 5$) (Weeishaar *et al*., 1993).

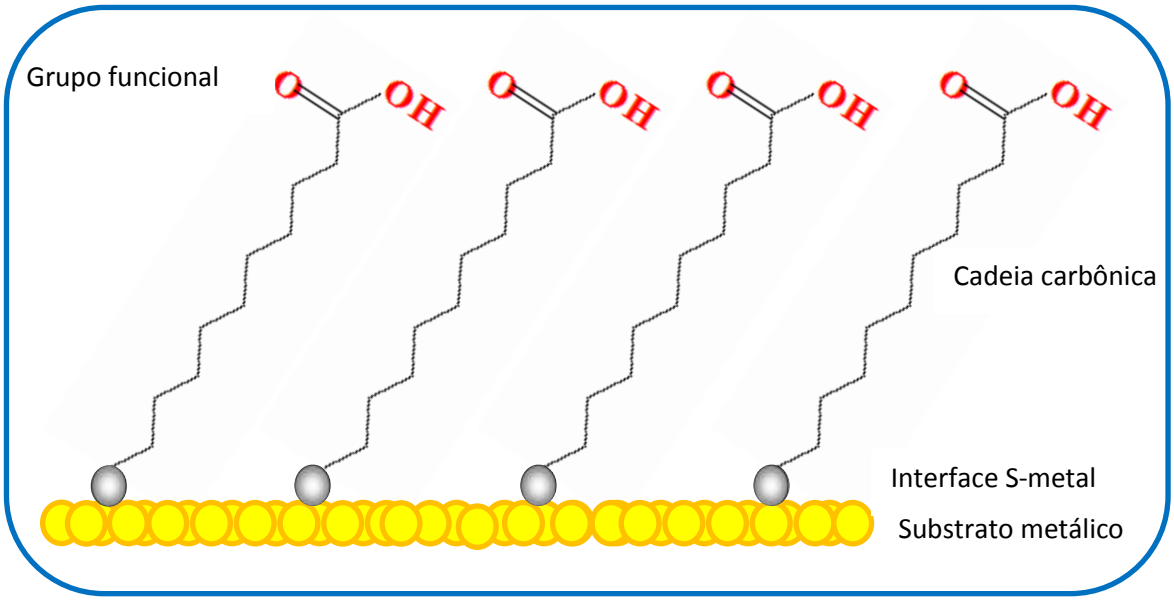

FIGURA 6. Disposição de alcanotiol em ouro. O arranjo mostra uma estrutura onde os átomos de enxofre (círculos em cinza-escuro) estão posicionados nas cavidades tríplice da rede de ouro. Observe as rotações alternadas das cadeias de carbono formadas a partir da formação da SAM do mercaptotiol. As cadeias são rotacionadas com valores determinados de torções indicando as orientações relativas das cadeias vizinhas.

3.4.2 Preparação das SAMs

O protocolo mais comum para a preparação de SAMs em ouro, prata, paládio, mercúrio e outros materiais é a imersão de um substrato previamente limpo em uma solução etanólica de tióis diluída (1-10 mmol.L^{-1}) por aproximadamente 12 a 18h à temperatura ambiente. Este procedimento é amplamente utilizado e se origina de estudos prévios de SAMs. Os detalhes experimentais resultaram de uma combinação de estudos destinados a otimizar a reprodutibilidade das SAMs produzidas (Bain *et al*., 1989). A densidade de cobertura dos adsorbatos é obtida rapidamente a partir de milisegundos a minutos, mas um processo de reorganização lento requer tempo da ordem de horas para maximizar a densidade de moléculas e minimizar os defeitos na SAM (Kavasaki *et al*., 2000).

Há, no entanto, uma série de fatores experimentais que podem afetar a estrutura da SAM e a taxa de sua formação, dentre os fatores mais estudados até hoje estão: escolha do substrato, pré-tratamento da superfície do substrato, solvente, concentração do adsorbato, tempo de imersão do substrato e concentração de oxigênio em solução.

3.4.2.1 Substratos

Um critério importante para selecionar o tipo de substrato e o método de preparação depende da aplicação para qual a SAM será utilizada. Fundamentalmente, o ouro é o substrato mais utilizado para preparação de SAMs. Como relatado por Love e colaboradores (2005) há características do ouro que o torna uma boa escolha como um substrato para o estudo de SAMs, tais como:

a) O ouro é fácil de obter tanto como um filme fino, tanto como um colóide, sendo simples sua preparação através de deposição física de vapor ou eletrodeposição;

b) Monocristais simples estão disponíveis comercialmente;

c) O ouro é um metal inerte, ele não oxida em temperaturas abaixo de seu ponto de fusão, não reagindo com O_2 atmosférico, e nem com a maioria dos produtos químicos, propriedades que tornam possível manipular amostras em condições atmosféricas;

d) Os tióis apresentam uma alta afinidade pelo ouro, não sofrendo reações não usuais com o mesmo. Devido a essa elevada afinidade, a adsorção do tiol em ouro remove espécies previamente adsorvidas na superfície;

e) Filmes finos de ouro são substratos comuns utilizados por um grande número de espectroscopias existentes e técnicas de análise, incluindo a Ressonância de Plásmons de Superfície, Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM, do inglês Quartz Crystal Microbalance), Elipsometria e a Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS, do inglês Espectroscopy Impedance Electrochemistry) características extremamente úteis para aplicações de SAMs como interfaces para estudos em inúmeras áreas;

f) O ouro é compatível com as células, ou seja, as células podem aderir e promover suas funções em superfícies de ouro sem evidência de toxicidade;

g) Além disso, SAMs formadas a partir de tióis em ouro são estáveis por períodos de dias ou semanas quando em contato com o meio líquido complexo necessário para estudos dos biomateriais.

3.4.2.2 Pré-Tratamento da superfície de ouro

As condições da superfície do substrato estão relacionadas com a estabilidade, reprodutibilidade e atividade da SAM, portanto, a limpeza do substrato é um parâmetro imprescindível para formação de uma SAM estável e reprodutiva. Superfícies contendo impurezas podem afetar a taxa de adsorção de alcanotióis, pois, para que ocorra adsorção do

tiol é necessário que ocorra a dessorção dos contaminantes, o que nem sempre ocorre com velocidade desejada. Dessa forma, a limpeza da superfície deve ocorrer rigorosamente para não afetar a cinética de formação da SAM. Neste sentido, várias metodologias de pré-tratamentos em superfícies de ouro são empregadas, incluindo os térmicos, mecânicos e eletroquímicos (Carvalhal *et al*., 2005). Dentre estes, os mais utilizados são o polimento mecânico com alumina (Creager *et al*., 1995), oxidação química por meio da radiação UV, plasma de O_2 ou por solução fortemente oxidante como a "solução piranha" (solução 1:3 de $H_2SO_{4\ conc.}/H_2O_2$ 30%) (Burgess *et al*., 1997) e a limpeza eletroquímica realizada em solução contendo 0,5 mol.L^{-1}de H_2SO_4 (Wang *et al*., 2000).

Após obtenção de uma superfície limpa, sua exposição pode permitir nova adsorção de impurezas, portanto, a formação da SAM deve ocorrer logo após o pré-tratamento. Assim, as técnicas citadas são poderosas ferramentas para promover o pré-tratamento da superfície do ouro, favorecendo a adsorção de moléculas de alcanotióis mais orientadas e organizadas devido à formação de uma superfície mais plana e orientada (Carvalhal *et al*., 2005).

3.4.2.3 Tipo de solvente

O etanol por dissolver uma variedade de tióis com diferentes polaridades e comprimentos de cadeia, devido a sua disponibilidade com alta pureza, baixa toxicidade e custo reduzido, é o solvente mais comumente utilizado para preparação de SAMs.

O efeito da escolha do solvente afeta mecanismos cinéticos envolvidos na formação da SAM. Interações solvente-substrato e solvente-adsorbato influenciam os processos termodinâmicos e cinéticos envolvidos na formação da monocamada. As interações solvente-substrato podem alterar a velocidade de adsorção de tióis presentes na solução, porque as moléculas solventes devem deslocar-se primeiramente à adsorção de tióis.

Estudos sugerem que a velocidade de formação da SAM de alcanotióis é mais rápida em certos solventes apolares (heptano, hexano) do que em etanol. O uso de solventes de hidrocarbonetos longos, como dodecano e hexadecano, reduz a velocidade de formação tal que eles são comparáveis àqueles para formação de SAMs de soluções etanólicas. Hidrocarbonetos como solventes podem melhorar a cinética de formação em muitos casos, mas a forte interação solvente-adsorbato nessas soluções impede a organização da SAM formada de alcanotiol (Peterlinz *et al*.,1996; Dannenberg *et al*.,1998). Medidas de ângulo de contato e eletroquímicas sugerem que SAMs formadas de soluções de tióis em solventes

apolares são menos organizadas que as formadas em soluções etanólicas (Yamada *et al*., 1999), tal fato se deve às interaçãoes adsorbato-solvente.

Assim, a presença de um novo solvente faz com que parâmetros na dinâmica de equilíbrio governado para a adsorção de tiol sofram alterações, sendo estas relacionadas com a velocidade de adsorção dos tióis, bem como no grau de organização das monocamadas formadas.

3.4.2.4 Concentração e tempo de imersão do substrato

A concentração e o tempo de imersão do substrato são inversamente proporcionais, pois, baixas concentrações de tióis em solução requerem imersão por períodos mais longos (Bain *et al*., 1989; Bensebaa *et al*., 1997). Para SAMs formadas a partir alcanotióis sobre o ouro, a densidade de superfície típica de moléculas (quando a cobertura máxima é obtida) é de $4,5 \times 10^{14}$ moléculas/cm^2 (Bubois *et al*., 1992), portanto, a concentração mínima para a formação de uma SAM densa é de 1,0 µmol.L^{-1}, ou seja, 6×10^{14} moléculas/cm^3. Na prática, SAMs formadas por um tempo de imersão de uma semana em soluções com concentrações iguais ou abaixo de 1,0 µmol.L^{-1} não apresentam as mesmas propriedades físicas das formadas a partir de soluções mais concentradas, pois, a não saturação da superfície devido a um pequeno número de tióis adsorvidos faz com que essa superfície seja mais acessível à ligação de impurezas ou outros compostos contendo enxofre (Bain *et al*., 1989[b]).

A maioria das evidências espectroscópicas e experimentais sugere que as propriedades das SAMs formadas a partir de alcanotióis (tais como a cobertura de superfície, e, em grande extensão, sua estrutura) não se alteram significativamente quando expostos a uma solução de aproximadamente 1,0 mmol.L^{-1} de tióis para mais de 12-18 h (Love *et al*., 2005). Técnicas eletroquímicas (Chidsey,1991), microscópicas, tais como a Microscopia de Varredura por Tunelamento (STM, do inglês Scanning Tunneling Microscopy) (Sun *et al*., 1991), e Espectroscopia de Refletância com Absorção no Infravermelho (RAIRS, do inglês Reflectance Absorption Infrared Spectroscopy) (Terrill *et al*., 1998) indicam no entanto, que a estrutura da SAM pode sofrer pequenas alterações por um período de tempo de imersão de aproximadamente 7 dias.

Portanto, o tempo típico sugerido para formação da SAM está entre 12 e 18h, mas para algumas aplicações, a formação ao longo de muitos dias pode melhorar a reprodutibilidade dos experimentos subsequentes que usam SAMs, por exemplo, estudos de transferência de elétrons através de SAMs (Chidsey,1991).

3.4.2.5 Efeito de oxigênio em solução

Evidências empíricas sugerem que o solvente desoxigenado com um gás inerte, tal como nitrogênio ou argônio, antes da preparação da solução de tióis e mantendo-se uma atmosfera inerte durante a formação melhora a reprodutibilidade das propriedades dos materiais das SAMs (Laibinis *et al*., 1991), já que reduzindo a concentração de oxigênio em solução ocorre limitação da oxidação de tióis. No entanto, esta precaução é mais importante para SAMs preparadas em substratos de paládio, platina, cobre e prata do que em ouro devido esses materiais serem mais suscetíveis a oxidação.

3.4.3 Transferência eletrônica através de SAMs

SAMs formadas por alcanotióis de cadeias longas (dez ou mais carbonos) favorecem a separação entre as cargas na dupla camada elétrica, como resultado a capacitância da interface eletrodo/SAM/eletrólito é reduzida em várias ordens de grandeza comparada à capacitância da interface eletrodo/eletrólito. Adicionalmente, as espécies eletroativas em solução apresentam menor aproximação à superfície eletródica e, consequentemente, a velocidade de transferência eletrônica pode diminuir em algumas ordens de magnitude comparada à superfície não modificada. (Fujihira *et al*., 2007).

A combinação do estudo de transferência eletrônica através da SAM e sua caracterização pelas técnicas eletroquímicas é um dos mais refinados sistemas de análise para filmes finos, principalmente pela possibilidade de controlar a reatividade da interface SAM/solução. Desta forma, uma metodologia eletroquímica frequentemente empregada no monitoramento da modificação de superfícies com SAMs constituídas de moléculas com cadeias hidrofóbicas é a avaliação dos processos redox de sondas eletroquímicas como $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ (Chidsey *et al*., 1990).

3.4.4 Imobilização de proteínas sobre SAMs: plataforma versátil para construção de biosensores

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de metodologias visando a construção de biosensores tem se intensificado com o surgimento de numerosas estratégias de imobilização de diferentes tipos de moléculas de reconhecimento. Não apenas as proteínas, mas também métodos para peptídeos, DNA, RNA, carboidratos e moléculas orgânicas de vários tipos incluindo lipídeos e os mais complexos produtos naturais.

Neste contexto, SAMs de alcanotióis em ouro são sistemas adequados para o estudo de processos biológicos e bioquímicos. A estabilidade, a estrutura de superfície uniforme e a relativa facilidade de variar os grupos funcionais terminais da SAM faz deste sistema uma escolha atraente para imobilizar moléculas de detecção em uma superfície do transdutor.

3.4.4.1 Ligações Covalentes

De acordo com Love e colaboradores (2005) uma fixação mais estável de proteínas sobre as SAMs envolve a formação de ligações covalentes. Em geral, as proteínas têm muitos grupos funcionais, principalmente nas cadeias laterais de aminoácidos que são adequadas para fins de imobilização. Portanto, estes métodos podem ser usados em proteínas não modificadas, uma vez que dependem apenas dos grupos funcionais naturalmente presentes.

Para proteínas em particular, a química utilizada precisa ser realizada em condições relativamente suaves e em soluções aquosas, para que não ocorra a desnaturação dessas proteínas, colocando certas limitações sobre o repertório proteico disponível. No entanto, a introdução, bem como a modificação de diferentes grupos funcionais na superfície do sensor é uma concepção extremamente atrativa, podendo uma mesma superfície ser utilizada com uma grande gama de agentes de acoplamento. Como relatado por Sullivan e Huck (2003), diferentes classes de reações orgânicas tem sido exploradas para modificar as superfícies de SAMs, incluindo substituição nucleofílica, esterificação, acilação e adição nucleofílica.

3.4.4.2 Acoplamento de nucleófilos com grupos carboxílicos

Como realatado por Löfas e Whirter (2006) o mais versátil e amplamente utilizado processo de imobilização envolve o acoplamento de grupamentos nucleofílicos presentes nas proteínas com grupos carboxílicos na superfície do sensor. O nucleófilo mais comum é o grupo amino presente em resíduos de lisina, mas grupos hidroxil também podem ser utilizados. Uma das estratégias consiste na introdução de grupos carboxílicos em dextranos ou outras camadas na superfície via reação do ácido haloacético. Em caso de construção de SAM, alcanotióis terminados com grupamentos carboxílicos são utilizados.

De acordo com Jonhsson e colaboradores (1991), para ativar a formação de uma ligação covalente amida ou éster entre o grupo carboxílico e grupos amino ou hidroxil, respectivamente, a ativação com reagentes carbodiimidas é a mais comumente utilizada. Carbodiimidas tais como DCC (dicicloexilcarbodiimida) são normalmente utilizadas em aplicações em química orgânica, mas para reações em soluções aquosas, alternativas como o

uso de EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) são preferidas. O propósito do reagente carbodiimida é criar um intermediário reativo aciluréia com o grupo carboxílico, o qual então reage com um nucleófilo fraco. O acoplamento é normalmente realizado em duas etapas, com ativação seguida de reação, nessa ordem, para evitar reação entre a carbodiimida e a molécula imobilizada. Contudo, em soluções aquosas a reatividade do intermediário é tão alta que rapidamente sofre hidrólise, retornando a ácido carboxílico novamente caso não haja nenhum outro nucleófilo presente. Este efeito é convenientemente contornado usando uma mistura de carbodiimida e um composto hidroxilado ativo, formando um derivado de éster reativo que é estável por vários minutos a horas (FIGURA 7).

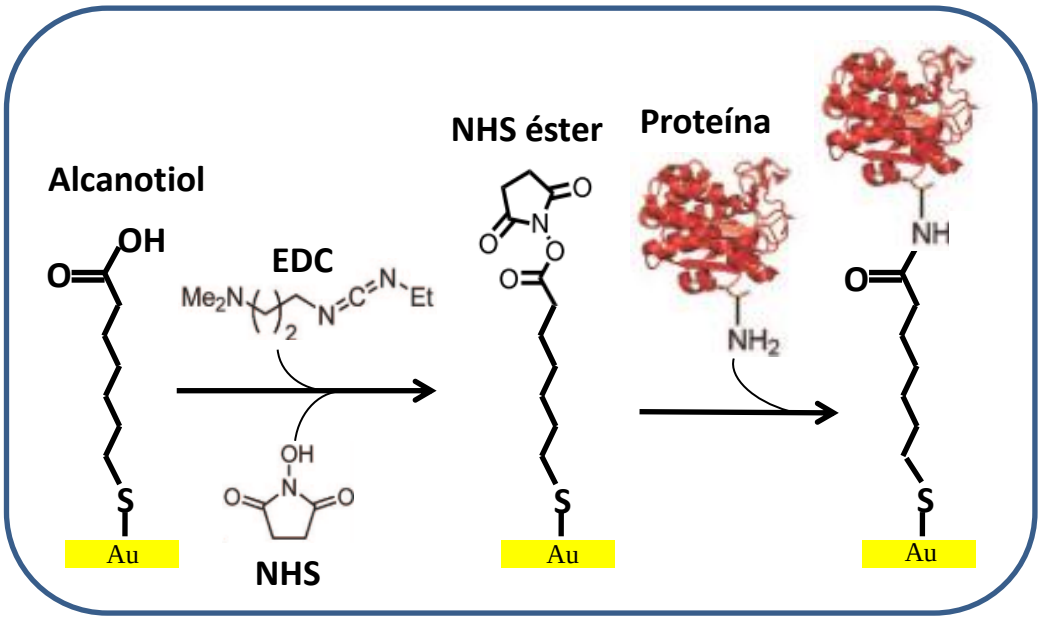

FIGURA 7. Formação da SAM através da adsorção de um ácido mercaptocarboxílico em superfície de ouro, seguido por ativação através da adição de uma mistura aquosa contendo EDC/NHS com consequente adição da proteína que se liga covalentemente na SAM ativada.

N-hidroxisuccinimida (NHS) tem sido comumente utilizada para este fim, e é normalmente misturada em altas concentrações com EDC em água. Ambos o EDC e NHS atuam como agentes tamponantes e um potencial hidrogeniônico (pH) em torno de 5-6 é obtido, possibilitando condições ótimas para velocidade da reação de formação do éster NHS. Embora outros ésteres possam ser formados com nitrofenol e seus derivados, NHS é preferencialmente escolhido devido sua alta solubilidade em água, baixa toxicidade e ótima reatividade para os dois estágios de acoplamento. Estudos extensivos de otimização da

ativação de condições de acoplamento para imobilização de proteínas em superfícies sensoras carboximetiladas foram desenvolvidos pela Biacore* (Jonhsson *et al*., 1991). (FIGURA 7).

3.5 Aplicações recentes da técnica de SPR no desenvolvimento de biosensores empregando SAMs

Conforme discutido previamente, as SAMs apresentam propriedades favoráveis à imobilização de espécies sem a necessidade de utilização de matrizes complexas. Neste sentido, as Monocamadas Auto-Organizadas tem sido amplamente exploradas na imobilização de moléculas para o desenvolvimento de biosensores.

Sendo assim, Jing e colaboradores (2011) desenvolveram um simples e versátil imunosensor baseado em SPR através de uma SAM para detecção de 3-nitrotirosina (3-NT) em amostras de urina humana. A formação da SAM foi realizada através de solução etanólica contendo uma mistura do ácido 11-mercaptoundecanóico (11-MUA, do inglês mercaptoundecanoic acid) e mercatoundecanol (MUD) (razão molar 1:3) injetada sobre a superfície de Au durante 120 min. A concentração de tiol total na solução de etanol foi de 10,0 $mmol.L^{-1}$. A superfície da SAM foi ativada formando um éster-NHS através da adição de uma solução aquosa contendo 4,0 $mmol.L^{-1}$ de EDC e 1,0 $mmol.L^{-1}$ de NHS. Posteriormente, anticorpos anti-3-NT foram imobilizados covalentemente na superfície da SAM ativada até saturação do sinal de SPR, um tempo de 120 min e uma concentração de 27,9 $\mu g.mL^{-1}$ foram necessários para obter o melhor desempenho da superfície do sensor. Sítios inespecíficos foram bloqueados pela adição de etanolamina (EA) 1,0 $mol.L^{-1}$ pH 8,5. Uma vez construído o imunosensor, foram injetados sobre o mesmo amostras de urinas humanas para detecção de 3-NT. O limite de detecção encontrado foi de 4,7 $ng.mL^{-1}$. A confiabilidade do sensor foi demonstrada por boa especificidade, e excelente estabilidade, em que mais de 200 ciclos de regeneração foram realizados. Portanto, esse foi o primeiro imunoensaio baseado em SPR para detecção de 3-NT na urina humana. A alta estabilidade da superfície do sensor produzido mostrou o potencial da técnica de SPR como uma ferramenta de baixo custo de diagnóstico para detecção clínica de 3-NT.

Já Ansorena e outros (2011) analisaram a influência das condições de formação e a capacidade de detecção de dois tipos de SAMs de ácidos mercaptocarboxílicos formadas sobre superfícies de ouro. A caracterização das SAMs obtidas foi realizada através das técnicas de Microbalança de Cristal de Quartzo e Ressonância de Plásmons de Superfície. O primeiro tipo de SAM foi produzida através da adsorção do ácido mercaptopropiônico (MPA,

* Biacore é uma empresa com sede na Suécia especializada em medir a afinidade de interações entre biomoléculas. Sua tecnologia é baseada na Ressonância de Plásmons de Superfície.

do inglês mercaptopropionic acid) em superfície de ouro. O Disco de ouro e o cristal de quartzo foram mergulhados em uma solução contendo 1,0 $mmol.L^{-1}$ de MPA em etanol (99,5%) por 2h. A fim de ativar os grupos carboxílicos do MPA, o disco e o cristal foram incubados em 46 $mmol.L^{-1}$ de EDC durante 1h e depois em 46 $mmol.L^{-1}$ de NHS também por 1h. Para formação do segundo tipo de SAM, um Spincoater (Motorcontroller, Autolab) a uma velocidade de 1500 rotações por minuto (rpm) por 45s foi usado para adsorver 1,0 $mmol.L^{-1}$ do 11-MUA dissolvido em etanol (99,5%) sobre a superfície de ouro. Posteriormente, o disco de ouro e o cristal de quartzo modificados foram incubados por 15 min em uma mistura contendo 400 $mmol.L^{-1}$ de EDC e 100 $mmol.L^{-1}$ de NHS. Para avaliar a formação das SAMs, foi utilizado como ligante o sulfato de polimixina B (PMB), e um lipopolissacarídeo (LPS), como analito. Como conclusão foi demostrado que, tanto na QCM quanto na SPR, o uso de SAM melhora significativamente a detecção e imobilização do composto alvo e um protocolo de formação ideal da SAM foi fornecido.

Interações entre proteínas e carboidratos constituem uma forma de sinalização para início de eventos intracelulares, agregação de células cancerígenas, invasão bacteriana, fúngica e adesão de vírus. Portanto, a compreensão dessas interações é essencial para a elucidação de vias biológicas e mecanismos celulares, mas muitas vezes é difícil devido à prevalência de interações multivalentes. Pensando nisso, Kristian e colaboradores (2010) desenvolveram um imunosensor através da técnica de SPR para avaliar a capacidade de inibição da interação proteína-carboidrato através da adição de glicodendrímeros multivalentes no meio. O biosensor foi construído através da funcionalização de resíduos de manoses (carboidratos) via SAM em superfície de ouro. A SAM foi preparada pela adsorção de um dialcanotiol aromático terminado em -COOH (25%) e um dialcanotiol aromático terminado em -OH (75%), a partir de suas soluções alcóolicas 1,0 $mmol.L^{-1}$. A ativação da SAM foi feita através da adição da mistura aquosa contendo EDC/ NHS. A proteína utilizada nas análises foi uma lectina, a Concanavalina A (Con A), a qual tem a propriedade de se ligar especificamente a resíduos de manose. Após construção do imunosensor dois ensaios foram realizados: (1) avaliação da interação Con A-manose através da técnica de SPR sem a presença de glicodendrinas no meio e (2) o mesmo ensaio na presença de glicodendrinas. No primeiro ensaio, foi observada resposta significativa através da $\Delta\theta_{SPR}$, já o segundo não obteve $\Delta\theta_{SPR}$ característica. Tais resultados sugeriram que a glicodendrina multivalente apresentou uma afinidade muito grande pela proteína, inibindo sua ligação aos resíduos de carboidratos funcionalizados. Portanto, o imunosensor desenvolvido mostrou ser uma técnica potente para avaliação de mecanismos naturais e invasivos que ocorrem em organismos vivos.

Baccar e outros (2010) desenvolveram dois biosensores para detecção de bactérias utilizando a técnica de SPR. O primeiro foi construído através da funcionalização do substrato de ouro, já o segundo por imobilização em nanopartículas de ouro. No primeiro biosensor, a funcionalização do substrato foi realizada através de sua imersão em solução de 1,0 $mmol.L^{-1}$ do 11-MUA por 12 horas obtendo uma SAM densa. Posteriormente, foram injetados anticorpos imunoglobulinas G (IgG) anti - *E. coli* (5,0 $\mu g.mL^{-1}$) durante 1 hora. Para o segundo biosensor, após síntese das nanopartículas, sua funcionalização foi feita através da adição de cisteamina (CYS) (1,0 $mmol.L^{-1}$) durante 12 horas à temperatura ambiente. As nanopartículas funcionalizadas foram então depositadas em substrato contendo SAM do 11-MUA previamente ativada com EDC/NHS por 1 hora. Então, o grupo amino do aminotiol foi ativado pela imersão do substrato em tampão fosfato salino (PBS, do inglês Phosphate Buffer Salino) pH 7,2 contendo 5% (V/V) de glutaraldeído (GLU). Posteriormente, foram injetados anticorpos IgG anti - *E. coli* (5,0 $\mu g.mL^{-1}$) durante 1 hora. Para avaliação da eficiência dos biosensores construídos, foram adicionados sobre os mesmos, bactérias específicas de *E. coli* e Lactobacilos não específicos e a resposta foi avaliada através da $\Delta\theta_{SPR}$. Como resultado, os dois biosensores mostraram seletivos e altamente sensíveis para detecção de bactérias *E. coli*, obtendo baixos limites de detecção.

Um imunosensor baseado em SPR para o diagnóstico sorológico em tempo real da infecção pelo vírus da dengue empregando o vírus como o elemento sensor foi desenvolvido por Sunita e colaboradores (2010). O vírus da dengue conjugado com albumina de soro bovino (BSA, do inglês bovine serum albumin) foi covalentemente imobilizado na superfície de ouro do sensor via SAM ativada do ácido 11-MUA por acoplamento amida. A SAM foi obtida através da imersão overnight do disco sensor em uma solução etanólica contendo 1,0 $mmol.L^{-1}$ do 11-MUA. A ativação da SAM foi realizada *in situ* pela introdução de solução aquosa contendo uma mistura de 100 $mmol.L^{-1}$ de EDC e 400$mmol.L^{-1}$ de NHS. Em seguida, o antígeno conjugado com BSA foi imobilizado. A interação ótima para ativação *in situ* da SAM e imobilização do vírus conjugado foi de 5 e 10 min, respectivamente. A injeção de 1,0 $mol.L^{-1}$ de EA (pH 8) foi realizada para bloquear os sítios inespecíficos. A morfologia da superfície do biosensor foi obtida usando Microscopia de Força Atômica (AFM, do inglês Atomic Force Microscopy). Após construção do imunosensor anticorpos imunoglobulinas M (IgM) específicos para o vírus da dengue foram injetados e a reação monitorada através do deslocamento do ângulo de SPR. Os resultados apresentaram sensibilidade mais elevada quando comparado ao ensaio imunoenzimático (ELISA, do inglês Enzyme Linked Immunosorbent Assay). A regeneração foi obtida pela solução de pepsina em glicina-HCl (pH

2,2) e a superfície do sensor mostrou um alto nível de estabilidade durante vários ciclos repetidos de imunorreação. Portanto, neste estudo foi apresentado um escopo encorajador para o desenvolvimento de um imunosensor para o diagnóstico da dengue, doença que continua sendo um grave problema de saúde nas regiões tropicais e subtropicais do mundo.

Alguns artigos recentes relataram informações sobre biosensores construídos através de SAMs (TABELA 1). Aspectos importantes destes trabalhos, tais como princípio de transdução, elemento reconhecedor, analito alvo e o tiol ou tióis utilizado (s) para confecção das SAMs também estão inseridas na TABELA 1.

É importante ressaltar que ainda não há na literatura, nenhum biosensor construído pela técnica de SPR para detecção da Leishmaniose Visceral, doença extremamente relevante em virtude de seu alto índice de mortalidade (den Boer *et al*., 2011).

TABELA 1

Exemplos recentes de biosensores construídos através de SAMs.

Princípio de Transdução	Elemento Reconhecedor	Analito alvo	Tiol ou Tióis utilizado (s) na confecção da SAM	Referência bibliográfica
SPR	Anticorpos anti-troponina T	Troponina T cardíaca	Ácido Mercaptohexadecanóico e Etilenoglicol Alcanotiolado	Liu *et al*., 2011
SPR	Anticorpos anti-CFP-10	Antígenos CFP (encontrados em pacientes tubercolosos)	Cisteamina	Hong *et al*., 2011
SPR	Bacteriófagos específicos de *E. coli* K12	*Escherichia coli* K12	Propionato de Sucsunimidila ditiolado	Arya *et al*., 2011
QCM	Anticorpos anti- Enterotoxina A	Enterotoxina A	Cisteamina	Salmain *et al*., 2011
QCM	Anticorpos anti- Receptor do fator de crescimento epidérmico	Receptor do fator de crescimento epidérmico	Ácido Tiosalicílico	Chen *et al*., 2011
QCM	Anticorpos anti- *Vibrio harveyi*	*Vibrio harveyi* (patógeno bacteriano)	Alcanotiol Carboximetilado	Sutawan *et al*., 2010
EIS	Anticorpos anti-Cortisol	Cortisol de fluidos intersticiais	Propionato de Sucsunimidila ditiolado	Venugopal *et al*., 2011
EIS	Receptor estrogênico	Estrógeno (hormônio esteroidal)	Alcanotiol Carboximetilado	Im *et al*., 2010
EIS	Lactato oxidase (enzima)	Lactato	Propionato de Sucsunimidila ditiolado	Gamero *et al*., 2010

3.6 Leishmaniose

3.6.1 Aspectos gerais e atuais sobre a Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença causada por um protozoário intracelular do gênero Leishmania. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2010), 350 milhões de pessoas vivem em áreas consideradas de risco, e há uma estimativa de ocorrência de 1,5-2.000.000 de novos casos por ano, sendo que até 500.000 dos casos apresentam LV e 1.500.000 Leishmaniose Cutânea (LC). Todos esses dados são provisoriamente aceitos, mas estão em constante revisão.

Como observado por den Boer e colaboradores (2011), o impacto da leishmaniose é essencialmente associado à pobreza. Considerando que a LC tem uma tendência espontânea de auto cura através da formação de cicatrizes, a LV é fatal quando não tratada, causando uma mortalidade global anual estimada em 59 000 (35 000 homens e 24 000 mulheres) e, em algumas áreas, devido à desigualdade de gênero, a taxa de letalidade é três vezes maior em mulheres que em homens (Desjeux, 2004).

3.6.2 Leishmaniose Visceral. Agente etiológico, transmissor e hospedeiro

A LV é causada pelas espécies *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum.* Nos continentes americanos a espécie mais comum é a *Leishmania infantum* (Murray *et al*., 2005; Lukes *et al*., 2007). É uma doença que tem como principal vetor um mosquito do gênero *Lutzomyia* (Ashford, 2000). O cão devido ao seu elevado parasitismo cutâneo é considerado o mais importante reservatório para o *L. infantum*, servindo de abundante fonte de infecção para os vetores (Reis *et al*, 2006).

Em decorrência da importância do cão como reservatório na LV e que a infecção canina, geralmente precede a humana, sendo a primeira responsável pelo avanço tanto espacial quanto temporal da segunda (Oliveira *et al*., 2001), o calazar canino tem sido considerado mais importante que a própria doença humana no âmbito epidemiológico, pois além de ser mais prevalente, as áreas endêmicas apresentam grande número de cães infectados que podem transmitir o parasito aos insetos vetores, constituindo um elo importante na manutenção da transmissão da infecção para o homem (Alves *et al*., 2004).

3.6.3 Técnicas empregadas no diagnóstico da Leishmaniose Visceral

O diagnóstico precoce para a Leishmaniose Visceral em humanos e cães é extremamente importante devido a LV ser uma doença que pode ser fatal para o ser humano e por ser necessária a adoção de medidas de controle específicas para o reservatório doméstico de *L. infantum*, incluindo o sacrifício para garantir o sucesso dos programas de controle dessa zoonose. Para o diagnóstico da LV, as suspeitas iniciais baseiam-se na presença de sinais e sintomas clínicos, muitas vezes inespecíficos, que podem ser comuns a outras infecções, tanto no homem quanto no cão (Ferrer, 1995). Como muitos não apresentam qualquer alteração no estado físico do paciente, o diagnóstico conclusivo da LV depende de provas laboratoriais para confirmação da infecção. Entre as técnicas disponíveis estão as de natureza parasitológica e sorológica.

As técnicas parasitológicas são empregadas para a demonstração do parasito em fragmentos de tecido fixados em lâminas ou após submissão a cultura para crescimento do agente etiológico, e a reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês polymerase chain reaction) para detecção de DNA do parasito. Contudo, em geral, o diagnóstico parasitológico apresenta várias desvantagens devido à punção ou a biópsia de órgãos serem métodos invasivos e traumáticos (Alves *et al*., 2004). Além disso, a observação do parasito pode ser difícil devido à baixa carga parasitária em muitos casos (Reis *et al*., 2006). Em decorrência da elevada produção de anticorpos anti - *L. infantum* no decurso da infecção pelo parasito, os testes sorológicos são adequados à investigação diagnóstica e tem sido ferramentas essenciais para o diagnóstico da LV. Várias técnicas são empregadas como testes sorológicos, sendo as mais comuns o ensaio de ELISA empregando antígeno bruto e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) baseada na pesquisa de anticorpos IgG (Kark, 1995).

A RIFI é o teste atualmente indicado pelo Ministério da Saúde para levantamento epidemiológico e diagnóstico da LVC. A reação cruzada com outros tripanosomatídeos e a baixa sensibilidade para detecção de casos assintomáticos são as principais limitações dessa técnica (Teixeira-Neto *et al*., 2010). Além disso, não é facilmente adaptável a grandes inquéritos sorológicos devido a sua dificuldade de execução e subjetividade (Mancianti *et al*., 1995).

A ELISA é uma técnica mais adequada para inquéritos epidemiológicos porque permite a leitura simultânea e automática de várias amostras, contudo, também é bastante laboriosa por exigir longo tempo para execução e a realização de várias etapas. Ela tem se mostrado uma técnica mais sensível, mas sua especificidade é variável, dependendo do

antígeno utilizado (Kark, 1995) e, também tem apresentando grande número de falsos negativos em cães com baixos níveis de anticorpos seja na fase inicial da infecção ou em assintomáticos. A utilização de antígenos recombinantes tem aumentando a sua especificidade (Saadia *et al*., 2003; Rosário *et al*., 2005,). Entretanto, os resultados entre diferentes estudos ainda é divergente considerando a capacidade desses antígenos detectarem os casos assintomáticos de LV. Outra limitação no emprego dos antígenos recombinantes é que muitas dessas proteínas são produzidas em quantidade muito limitada pelo parasito e sua purificação por técnicas bioquímicas é bastante laboriosa e a produção pela engenharia genética requer recursos especializados e elevado investimento.

Rosário e colaboradores (2005) avaliando a técnica de ELISA usando antígeno bruto de *Leishmania* e antígenos recombinantes como um marcador diagnóstico para a LVC demonstraram que esses antígenos produziram resultados similares em termos de sensibilidade e especificidade para identificar as diferentes formas clínicas da LV. O uso de antígenos recombinantes não melhorou significativamente os resultados comparados com antígenos brutos para identificar os cães positivos, mas apresentaram melhor especificidade minimizando reações cruzadas com outras doenças parasitárias.

Em decorrência das limitações das técnicas atualmente disponíveis há uma grande dificuldade na escolha de um teste apropriado, de simples execução, sensível e específico que possibilite tanto o diagnóstico dos casos avançados, mas também dos iniciais, oligossintomáticos e assintomáticos. Dessa forma, torna-se necessário o desenvolvimento de técnicas alternativas para serem aplicadas nos inquéritos epidemiológicos, tanto em populações humanas sob risco como em animais, a fim de se avaliar a verdadeira extensão do problema naquela região.

Pelo exposto, o presente trabalho propõe uma nova metodologia para detecção da LVC através do desenvolvimento de um imunosensor baseado na técnica de SPR. Diferentemente dos métodos convencionais para detecção de LVC já discutidos (RIFI e ELISA), o sensor proposto não necessita de marcadores e permite análise mais rápida e em tempo real, além de possibilitar a regeneração da superfície do sensor, o que pode contribuir significativamente para reduzir o custo das análises. Sendo, portanto, uma grande perspectiva como novo método de diagnóstico da LVC.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes e Soluções

11-MUA, NHS, EDC, EA e ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfônico (HEPES) foram adquiridos da Sigma-Aldrich®. Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, do inglês ethylenediamine tetraacetic acid), cloreto de sódio, cloreto de potássio e ácido clorídrico foram comprados da ISOFAR. TWEEN 20 (Polisorbato 20 ou surfactante P_{20}) e hidróxido de potássio foram obtidos da VETEC. Álcool etílico (99,5%) e fosfato de sódio monobásico foram adquiridos da Dinâmica® Química. Peróxido de hidrogênio (PA) foi comprado da IMPEX. Ácido sulfúrico (PA) foi adquirido da ACS reagente analítico. Hidróxido de sódio foi comprado da NEON.

A solução tampão HBS-EP pH 7.4 foi preparada através da mistura das seguintes soluções aquosas: HEPES pH 7.4 (10 $mmol.L^{-1}$), EDTA pH 8.0 (3 $mmol.L^{-1}$), NaCl (150 $mmol.L^{-1}$) e surfactante P_{20} (0,005%). A solução HBS-EP pH 7,4 foi utilizada tanto como tampão de corrida para as análises de SPR como para dissolução de antígenos solúveis de *L. infantum* e dos soros caninos positivos e negativos para LV.

A solução etanólica do 11-MUA, e as soluções aquosas de EA e da mistura EDC/NHS foram preparadas previamente ao uso.

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e todas as soluções foram preparadas usando água purificada em sistema Milli Q.

4.2 Equipamentos

As medidas voltamétricas e impedimétricas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato da Autolab modelo PGSTAT 128 N (*Eco Chemie*, www.metrohm.com.br) (FIGURA 8) acoplado a um microcomputador contendo o *software* GPES 4.9.

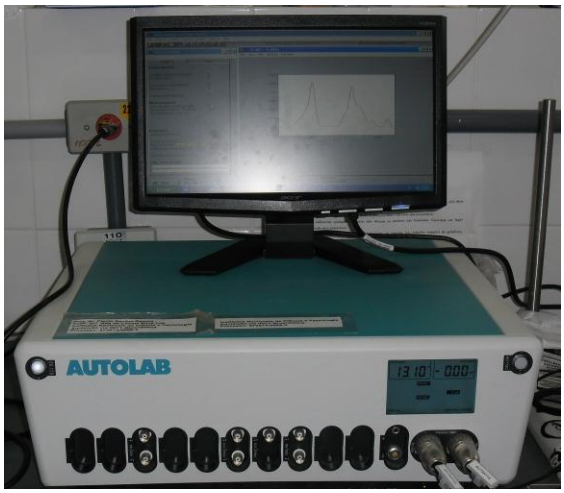

FIGURA 8 - Potenciostato/galvanostato da Autolab PGSTAT 128 N utilizado para as medidas eletroquímicas.

Para obtenção das medidas eletroquímicas utilizou-se uma célula com capacidade de 10,0 mL. Os eletrodos foram inseridos na célula por entradas presentes em uma cobertura de Teflon®. Um eletrodo de ouro (0,0314 cm^2) foi utilizado como eletrodo de trabalho. Os eletrodos auxiliar e de referência foram, respectivamente, um fio de platina e Ag/AgCl (sat.) na célula contendo 3 $mol.L^{-1}$ de KCl (FIGURA 9).

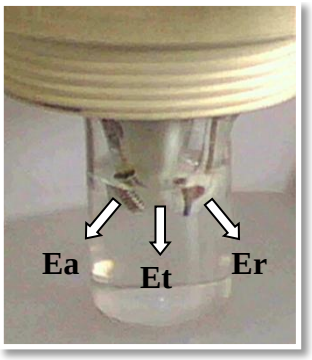

FIGURA 9 - Célula eletroquímica utilizada nos experimentos. Ea = Eletrodo auxiliar; Et = Eletrodo de trabalho; Er = Eletrodo de referência.

As medidas ópticas do ângulo de SPR foram obtidas para analisar as interações biomoleculares usando um Autolab Springle (*Eco Chemie*) (FIGURA 10(a)), no qual a parte óptica do sistema é composta de um prisma e de um disco de vidro recoberto com um fino filme de ouro adquiridos da Metrohm-Autolab. A FIGURA 10(b) mostra o prisma de vidro colocado sobre sua superfície o disco de vidro recoberto com o filme de ouro utilizados nas análises de SPR. O equipamento contém uma célula com capacidade de 300 µl. Como fonte

de radiação foi empregado um laser de He-Ne (com emissão em 670 nm) e a intensidade da luz refletida foi medida através de um detector de fotodiodo. A configuração utilizada é baseada na reflexão interna total atenuada (configuração de Kretschmann) que é a mais usada em espectroscopia de SPR. A vazão e a temperatura foram mantidas a 48 µl/min e 23±1◦C, respectivamente, durante todas as medidas.

(a) (b)

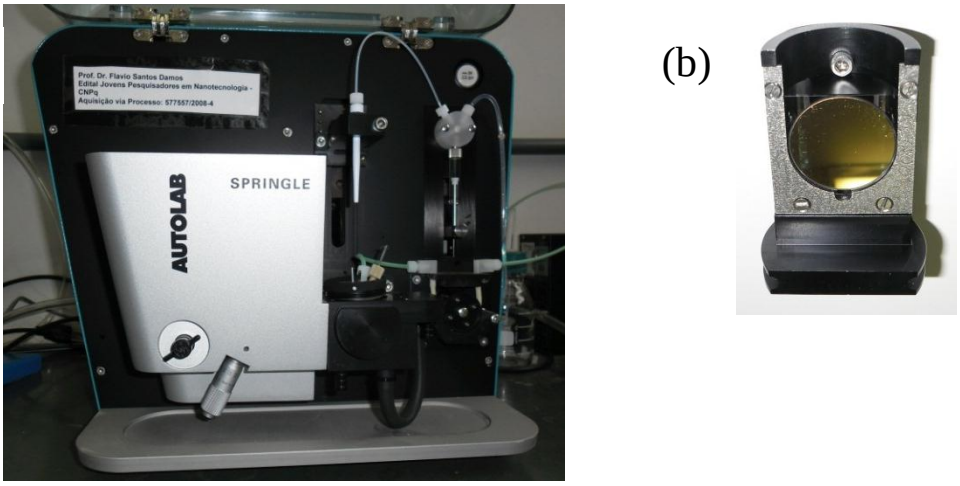

FIGURA 10. Ilustração do espectrômetro de SPR Autolab Springle utilizado para as medidas ópticas (a) e ilustração do substrato usado nas análises de SPR colocado sobre o prisma de vidro (b).

O pH final das soluções tampão foram determinados por um PHmetro Ion – Meter 781 (Metrohm Pensalab) e ajustado com 0,1 mol.L^{-1} de HCl ou 0,2 mol.L^{-1} de NaOH.

A FIGURA 11 mostra a Centrífuga refrigerada Jouan BR4i multifunction (Thermo Electron Corporation) utilizada no processo de lavagem e separação durante a produção dos antígenos solúveis de *L. infatnum*.

FIGURA 11. Centrífuga refrigerada Jouan BR4i multifunction utilizada durante o processo de produção dos antígenos solúveis de *L. infantum*.

A água destilada foi ultrapurificada através do Ultrapurificador de água PURELAB Classic DI (ELGA) (FIGURA 12).

FIGURA 12. Ultrapurificador de água PURELAB Classic DI (ELGA) utilizado para ultrapurificação da água utilizada nos experimentos.

4.3 Produção de Antígenos Solúveis de *Leishmania infantum*

Formas promastigotas de antígenos solúveis de *L. infantum* foram produzidas "in house", conforme protocolo e patente depositado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) por pesquisadores da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) (PI0605889-2). As formas promastigotas de *L. infantum* foram crescidas por meio de cultura em meio LIT (Live Infusion Tryptose) na fase estacionária. Os parasitos foram lavados 3 vezes em PBS pH 7,2 por centrifugação em 600 x g por 10 minutos. Em seguida, os parasitos foram rompidos com três ciclos durante 1 minuto a 40 Watts em ultra-som (Sonifier Cell Disruptor® - Brason Sonic Power Co., EUA) em banho de gelo. Posteriormente, o material sonicado foi centrifugado em centrífuga refrigerada Jouan BR4i multifunction (Thermo Electron Corporation) a 37.000 x g por 1 hora e 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi dializado contra PBS pH 7,2, durante 24 horas, a 4°C sob agitação. Por fim, o material remanescente no saco de diálise foi filtrado em filtros estéreis descartáveis, de 0,22 μm (Millipore Co, Massachusetts, EUA) e uma alíquota retirada para dosagem de proteína pelo método de Lowry e colaboradores (1951), sendo ajustada a concentração para 1.000 $\mu g.mL^{-1}$. Amostras do antígeno foram replicadas e congeladas em freezer à -80°C até o momento da sua utilização. A avaliação do potencial desses antígenos para sorodiagnóstico da LVC foi

previamente certificada utilizando soros testes de animais positivos e negativos armazenados no Banco de Soros da UFOP testados por ELISA nas condições do ensaio empregado rotineiramente nos trabalhos epidemiológicos.

4.4 Soros Caninos

Amostras de soros caninos foram obtidas em áreas endêmicas de cães naturalmente infectados pelo *L. infantum*. Estas amostras possuem diagnóstico estabelecido pela secretaria de saúde em Belo Horizonte e confirmado pelo laboratório de Imunopatologia da UFOP, MG-Brasil. Em adição, soros de cães saudáveis criados no biotério da UFOP foram usados como controles negativos. A coleta dessas amostras foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisa/UFOP, projeto nº 2007/83. Em ANEXO está a cópia do ofício de aprovação do projeto pelo comitê de ética.

4.5 Limpeza da superfície de ouro

A limpeza do eletrodo ou disco de ouro é fundamentalmente importante para modificação de sua superfície. Para esta finalidade, ambos foram imersos em solução piranha (mistura 1:3 v/v de H_2O_2 30% e $H_2SO_{4conc.}$) durante aproximadamente 3 minutos. A eficiência do processo de limpeza foi avaliada através de voltamogramas cíclicos (VCs) em solução de H_2SO_4 0,5 mol.L^{-1}, velocidade de varredura, v , de 50 mV.s^{-1} no intervalo de potencial, ΔE, de -0.1 a 1.5 V *vs* Ag/AgCl. O perfil voltamétrico típico obtido da superfície de ouro limpa é mostrado na FIGURA 13. As correntes de pico anódica (I_a) e catódica (I_c) observadas aproximadamente em 1,27 e 0,90 V são características da oxidação do ouro a óxidos de ouro e redução dos óxidos a ouro elementar, respectivamente. Este procedimento visa à renovação da superfície metálica. Assim sendo, previamente à modificação das superfícies do ouro foram realizados voltamogramas cíclicos cujo perfil típico é apresentado na FIGURA 13.

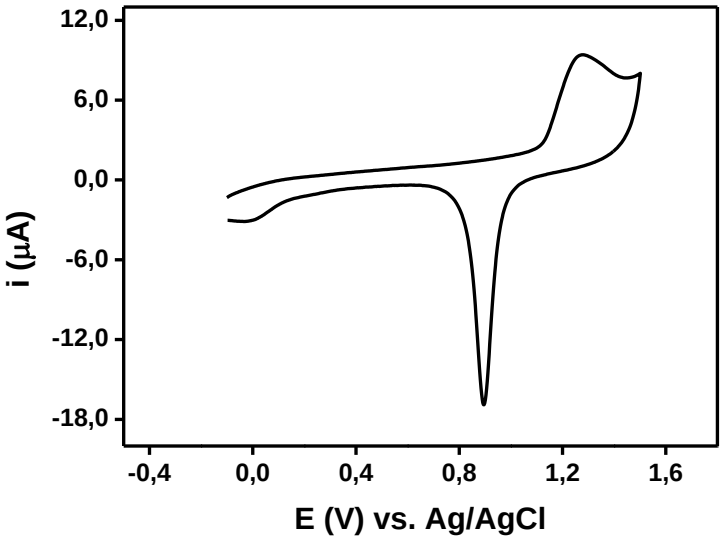

FIGURA 13. Voltamograma cíclico (VCi) típico obtido para superfície de ouro limpa em solução 0,5 mol.L^{-1} de H_2SO_4, *v* de 50mV.s^{-1}, ΔE, de - 0.1 a 1.5 V *vs* Ag/AgCl.

4.6 Formação e Caracterização da SAM na superfície do eletrodo de ouro

Para formação da SAM o eletrodo de ouro foi imerso em solução etanólica do ácido 11-mercaptoundecanóico. Nesta etapa, foram testadas diferentes concentrações do 11-MUA (0,1, 1,0 e 10,0 mmol.L^{-1}) bem como diferentes tempos de adsorção (0,5, 2, 8, 16, 24 e 60 horas) para cada concentração. Subsequentemente à preparação da SAM, o eletrodo foi removido da solução, lavado com etanol e água, e transferido para célula eletroquímica.

As técnicas eletroquímicas utilizadas para caracterização da formação da SAM do 11-MUA na superfície do eletrodo de ouro foram a Voltametria Cíclica (VC) e o Método de Redução Dessortiva (RD) realizado através da Voltametria de Pulso Diferencial (VPD). A RD foi empregada com o propósito de dessorver eletroquimicamente as moléculas de 11-MUA da superfície eletródica. Os VCs foram obtidos em solução aquosa contendo como sonda redox 1,0 mmol.L^{-1} de hexacianoferrato de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$), na presença de 0,1 mol.L^{-1} de KCl, a uma *v* de 20 mVs^{-1}. Os voltamogramas de pulsos diferenciais foram obtidos em solução aquosa contendo 0,5 mol.L^{-1} KOH, a 20mV.s^{-1}. Previamente à redução eletroquímica, a solução aquosa de hidróxido de potássio foi desoxigenada com gás nitrogênio (N_2) durante aproximadamente 10 minutos.

4.7 Construção do Imunosensor através da técnica de SPR

A construção do imunosensor foi realizada através da imobilização de antígenos solúveis de *L. infantum* sobre Monocamadas Auto-Organizadas do ácido 11-mercaptoundecanóico em superfície de ouro.

4.7.1 Construção da SAM em substratos de SPR

Uma vez otimizados a construção e caracterização da SAM na superfície do eletrodo de ouro, o próximo passo consistiu na formação da SAM do 11-MUA em discos de vidro recobertos com finos filmes de ouro usados como substratos para as análises de SPR. Então, o disco foi imerso em solução etanólica contendo a concentração do tiol e o tempo de modificação anteriormente estudados em eletrodo de ouro. Após formação da SAM, o disco foi lavado com água e etanol.

4.7.2 Ativação dos grupos funcionais terminais da SAM

Para ativação dos grupos carboxílicos terminais da SAM foram injetados 500 µL de uma mistura aquosa contendo EDC/NHS. As diferentes concentrações desses agentes de acoplamento e o tempo necessário para interação foi seguido de acordo com os procedimentos já bem descritos na literatura (Jonhsson *et al*., 1991).

4.7.3 Adição de Antígenos solúveis de *Leishmania infantum* sobre o disco sensor

O disco sensor contendo a SAM previamente ativada foi colocado sobre o prisma de vidro do espectrômetro de SPR. As medidas foram iniciadas através da adição de 300 µL de tampão HBS-EP pH 7,4 para obtenção de uma linha de base. O valor de pH escolhido é aproximadamente igual ao pH fisiológico, além de ser estável para dissolução das amostras biológicas. Uma vez obtida a linha de base, foram injetados sobre a superfície 100 µL dos antígenos de *L. infantum* diluídos em HBS-EP pH 7,4. A imobilização do antígeno foi acompanhada através da mudança do ângulo de SPR em função do tempo de interação. Durante a etapa de imobilização dos antígenos, foram estudadas diferentes concentrações dos Ag de *L. infantum* (10, 18, 30, 40 e 50 $\mu g.mL^{-1}$) bem como diferentes tempos de ligação desses antígenos sobre a superfície (1, 5, 10, 30 e 60 minutos). Posteriormente à adição dos

antígenos, a superfície foi lavada várias vezes com tampão HBS-EP pH 7,4 seguido pela injeção de 200 µl de solução aquosa de EA. Diferentes concentrações de EA (0,01, 0,05, 0,100 e 1,00 mol.L^{-1}) foram testadas. Após injeção de EA, novamente a superfície foi lavada com tampão HBS-EP pH 7,4.

4.8 Caracterização Eletroquímica do Imunosensor

Previamente à caracterização o imunosensor foi construído na superfície do eletrodo de ouro da seguinte maneira: após formação da SAM o eletrodo foi lavado com água e imerso em 0,5 mL de uma solução contendo 100 mmol.L^{-1} de EDC e 150 mmol.L^{-1} de NHS durante 15 minutos. Posteriormente, a superfície foi levemente lavada com água. Então o eletrodo contendo a SAM ativada foi imerso em 0,5 mL da solução contendo 50 µg.mL^{-1} de Ag de *L. infantum* dissolvido em tampão HBS-EP pH 7,4. Após tempo de imobilização de 30 minutos o substrato foi novamente lavado com água e então colocado na célula eletroquímica.

A caracterização do imunosensor foi realizada através das técnicas de Voltametria Cíclica e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica. Os VCs foram realizados em 1,0 mmol.L^{-1} de $Fe(CN)_6^{3-}$, na presença de 0,1 mol.L^{-1} de KCl. Os estudos de EIS foram realizados em tampão HBS-EP pH 7,4 e em solução aquosa contendo a sonda hexacianoferrato (1,0 mmol.L^{-1}) em KCl (0.1 mol.L^{-1}). Em ambos os meios utilizou-se o potencial de circuito aberto (OCP, do inglês Open Circuit Potential) e o potencial aplicado (valor obtido através da medida média das I_a e I_c obtidas pelos VCs referentes ao processo redox da sonda em eletrodo limpo), a amplitude foi de 10 mV, a faixa de frequência utilizada foi 0,1 a 10^5 Hz, e os dados foram obtidos através do software *Fit and Simulation* FRA2 (baseado no método de Boulkanp).

4.9 Detecção da imunorreação entre antígenos brutos solúveis de *L. Infantum* e anticorpos anti - *L. infantum* através da técnica de SPR

Foram avaliados 10 soros obtidos de cães negativos para LVC e 10 com diagnóstico confirmado para LVC. Estes soros foram utilizados para preparação de um pool de animais positivos e negativos empregado para avaliação da interação do antígeno imobilizado com o anticorpo em diferentes diluições seriadas dos soros (1:50, 1:100, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800, 1:25600, 1:51200 e 1:102400). Através dessa titulação foi definido a sensibilidade e especificidade do imunosensor para detecção de anticorpos anti - *L. infantum*.

Para cada fator de diluição mencionado, foram injetados 200 µL de soros caninos positivos e negativos sobre o imunosensor. Após adição realizou-se lavagem da superfície através da injeção de tampão HBS-EP pH 7,4. A intensidade de resposta para a adição dos soros foi avaliada através de sensogramas obtidos pela variação do ângulo de plásmons de superfície com o tempo de interação. Também foi estudado nesta etapa, o tempo necessário para uma interação estável entre Ag-Ab (60, 300, 600, 1800 e 3600 segundos).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Construção e Caracterização da SAM através de Técnicas Eletroquímicas

As técnicas eletroquímicas utilizadas para caracterização da adsorção do alcanotiol sobre superfície de ouro foram a VC e a RD por VPD. Através destas técnicas foram realizados estudos visando obter a melhor concentração bem com o melhor tempo de interação do 11-MUA com a superfície de ouro para formação da SAM.

5.1.1 Estudo do efeito da concentração do 11-MUA para formação da SAM através da Voltametria Cíclica

A FIGURA 14 mostra os VCs obtidos para eletrodo de ouro limpo e modificado com 11-MUA após diferentes tempos de adsorção na presença da sonda eletroquímica hexacianoferrato de potássio em KCl 0,1 mol.L^{-1}. As curvas rotuladas com o número 1 nas FIGURAS 14(a), 14(b) e 14(c), referem-se ao comportamento redox da sonda em eletrodo de ouro limpo. Para o referido processo foi observado um par redox com I_a de 1,69 µA e I_c de -1,66 µA em potenciais elétricos de 0,29 e 0,23 V *vs*. Ag/AgCl, respectivamente.

Com o propósito de obter filmes com elevado grau de organização foram estudadas diferentes concentrações do 11-MUA bem como diferentes tempos de adsorção. A FIGURA 14(a), curvas 2, 3 e 4 mostram, respectivamente, a modificação da superfície de ouro com 11-MUA a partir de soluções de diferentes concentrações: 0,1, 1,0 e 10,0 mmol.L^{-1} e um tempo de adsorção de 2h. Pode-se verificar claramente através da FIGURA 14(a) que a adsorção do tiol ocorre de forma muito rápida e que apresenta resistência para a transferência eletrônica na superfície do eletrodo para a sonda estudada, fato observado devido a diminuição dos picos anódico e catódico característicos. Avaliando o perfil de resposta para as diferentes concentrações, percebe-se que uma maior supressão do par redox foi observado em 1,0 mmol.L^{-1} do 11-MUA (FIGURA 14(a), curva 3). A explicação para este fato pode estar baseada no seguinte: uma menor concentração do tiol (0,1 mmol.L^{-1}) em tempo de interação de apenas 2,0 horas possibilitou uma formação ainda incompleta da SAM sobre a superfície de ouro, apresentando alguns espaços que permitiram maior acessibilidade da sonda para sofrer o processo redox através da superfície. Já a maior concentração do 11-MUA (10,0 mmol.L^{-1}) pode ter gerado ligações dissulfeto entre os próprios tióis, diminuindo a interação

dos átomos de enxofre com os átomos de ouro, possibilitando reação redox da sonda mais efetiva nesta concentração do 11-MUA quando comparado com sua reação em eletrodo modificado com 11-MUA 1,0 mmol.L^{-1}. As I_a e I_c obtidas para eletrodo de ouro limpo e modificado com cada concentração do tiol estudada após tempo modificação de 2,0 horas podem ser observadas na TABELA 2.

TABELA 2

Diferentes I_a e I_c obtidas por VC utilizando como sonda ferricianeto em KCl em eletrodo limpo e após modificação com diferentes concentrações de 11-MUA após tempo de interação de 2,0 horas

[11-MUA] (mmol.L^{-1})	***Ia* (µA)**	***Ic* (µA)**
0,0 (eletrodo limpo)	1,69	-1,66
0,1	1,00	-1,04
1,0	0,49	-0,43
10,0	0,81	-0,75

v = 20 mV s^{-1}; [$Fe(CN)_6^{3-}$] = 1,0 mmol.L^{-1}; [KCl] = 0,1 mol.L^{-1}; ΔE de 0 a 0,5V *vs*. Ag/AgCl.

Através do estudo realizado em tempos de interação de 8,0 horas (figura não mostrada) e 16 horas (FIGURA 14(b)), observou supressão total do comportamento redox da sonda para as concentrações do 11-MUA de 1,0 mmol.L^{-1} (FIGURA 14(b), curva 3) e 10,0 mmol.L^{-1} (FIGURA 14(b), curva 4). No entanto, para 0,1 mmol.L^{-1} de 11-MUA (Figura 14(b), curva 2) ainda foram observados processos faradaicos na superfície, devido as I_a (0,12 µA) e I_c (0,10 µA) observadas em 0,27 e 0,09 V, respectivamente, evidenciando que após 8,0 e 16,0 horas de modificação 0,1 mmol.L^{-1} de 11-MUA não suprime totalmente o comportamento eletroativo da sonda. Tal fato pode ser explicado devido à incompleta formação da SAM ainda permitir transferência eletrônica da sonda através da superfície.

A FIGURA 14(c), mostra os VCs obtidos em eletrodo modificado com diferentes concentrações do 11-MUA (0,1, 1,0 e 10 mmol.L^{-1}) após 24 horas. Pode ser observado através dos voltamogramas da FIGURA 14(c) que nenhum processo faradaico ocorreu, sendo caracterizados pela formação da dupla camada elétrica entre a superfície do eletrodo e a solução eletrolítica. Assim, todas as concentrações de tióis estudadas suprimiram totalmente o comportamento eletroativo da sonda para um tempo de adsorção de 24 horas.

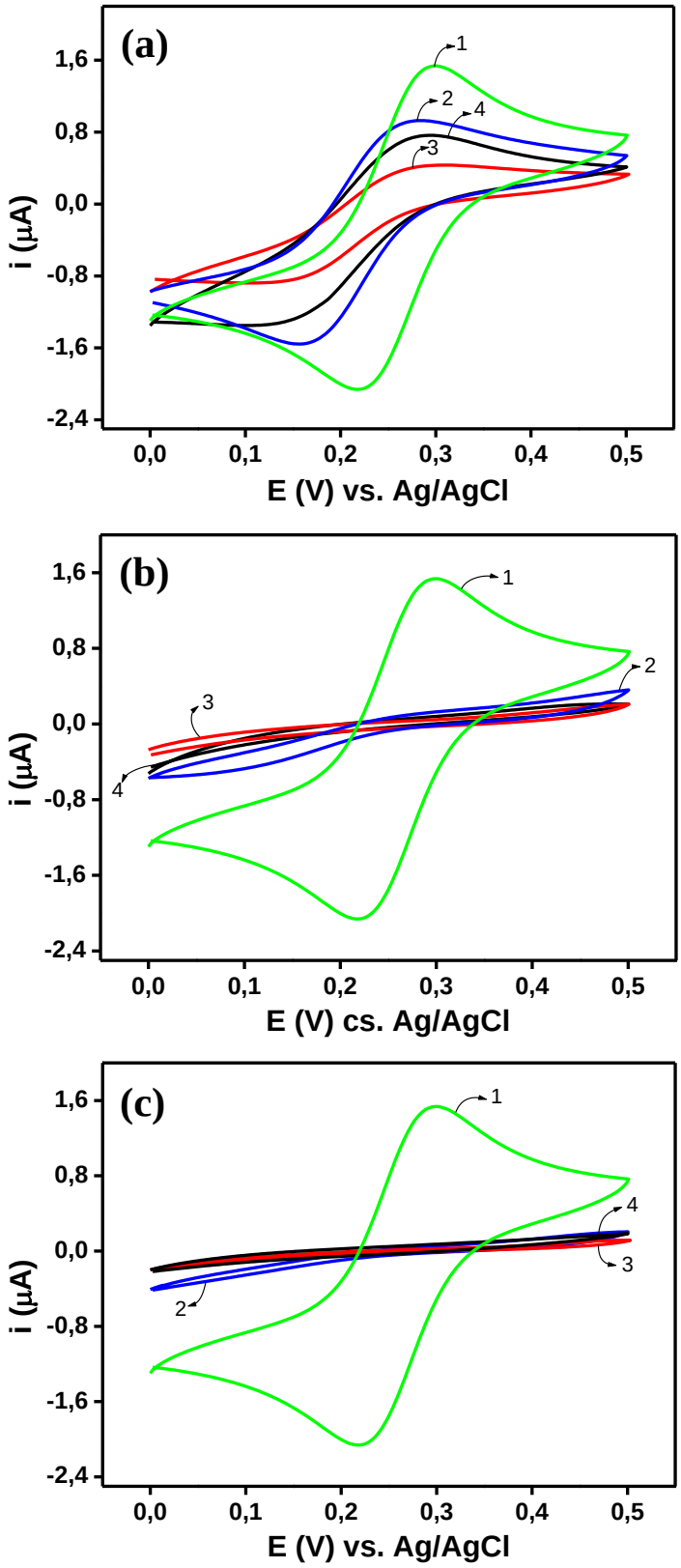

FIGURA 14. VCs obtidos para diferentes concentrações do 11-MUA em diferentes tempos de adsorção. Efeito da sonda em eletrodo limpo (FIGURAS 14(a), 14(b) e 14(c), curvas 1) e eletrodo modificado com 0,1 (curvas 2), 1,0 (curvas 3) e 10,0 mmol.L^{-1} (curvas 4) do 11-MUA após 2,0 horas (FIGURA 14(a)), 16,0 horas (FIGURA 14(b)) e 24,0 horas (FIGURA 14(c)). Todos os VCs foram obtidos em 1,0 mmol.L^{-1} de ferricianeto em 0,1 mol.L^{-1} KCl, *v* de 20 mV.s^{-1} e ΔE de 0 a 0,5V *vs.* Ag/AgCl.

Diante dos VCs apresentados, tem-se como resultado que concentrações do 11-MUA de 1,0 e 10,0 mmol.L^{-1} não apresentaram diferenças significativas de respostas para tempos de interação a partir a 8,0 horas. Já em tempo de interação de 24 horas todas as concentrações estudadas inibiram completamente o comportamento eletroativo do hexacianoferrato devido à resistência de transferência eletrônica ocasionada pela formação da SAM do 11-MUA.

5.1.2 Estudo da concentração do 11-MUA para formação da SAM através da Redução Dessortiva

De acordo com Porter e colaboradores (1991) que os alcanotióis podem ser eletroquimicamente dessorvidos da superfície do ouro ou de outros metais. Os estudos mostraram que a dessorção ocorre em solução alcalina (pH > 11) através da dessorção oxidativa (OD, do inglês oxidative desorption) ou da dessorção redutiva (RD, do inglês reductive desorption). O processo oxidativo envolve a perda de três elétrons (reação mostrada através da equação 6) e no redutivo tem-se o ganho de um elétron (reação evidenciada através da equação 7).

$$\mathrm{AuS(CH_2)}_n\mathrm{CH_3} + 2\mathrm{H_2O} \rightarrow \mathrm{Au}_{(0)} + \mathrm{CH_3(CH_2)}_n\mathrm{SO_2^-} + 4\mathrm{H^+} + 3\mathrm{e^-} \quad (6)$$

$$\mathrm{AuS(CH_2)}_n\mathrm{CH_3} + \mathrm{e^-} \rightarrow \mathrm{Au}_{(0)} + \mathrm{CH_3(CH_2)}_n\mathrm{S^-} \quad (7)$$

Ambas as reações eletródicas referentes à adsorção do mercaptotiol na superfície de ouro resultam na perda de um hidrogênio desse tiol e formação do ouro alcanotiolado. Já na dessorção, ambos, o tiol e a superfície metálica,tornam-se solvatados, e os tióis se difundem, distanciando da superfície.

Também foi verificado por Porter e colaboradores (1991) que a reação 7 serve de base para determinação da cobertura de superfície (г) de organotiolatos em ouro. O uso da reação 6 também é possível, embora complicada devido à necessidade de se considerar oxidações concomitantes na superfície do ouro. Assim, tomando-se por base a reação 7, eles realizaram VCs em eletrodo de ouro não modificado e modificado. Em todos os casos, a varredura foi iniciada em -0,2V *vs.* Ag/AgCl utilizando 0,5 mol.L^{-1} de KOH como eletrólito suporte. A I_c observada em aproximadamente -1,1V é resultado da redução via um elétron conforme a

reação 7. Experimentalmente os pesquisadores promoveram um método para mensurar a cobertura de superfície de grupos ferrocenos eletroativos, onde Γ é calculado como:

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA} \tag{8}$$

onde Q é a carga associada com a redução de espécies na superfície, n é o número de elétrons envolvidos, F é a constante de Faraday e A é a área geométrica do eletrodo. Os valores de Q são determinados através da integral da curva i *vs.* E.

Dessa forma, a I_c observada através da RD é um excelente indicativo da quantidade de tióis que foram adsorvidos na superfície metálica, sendo um método eficiente para caracterização de SAMs formadas pela adsorção de alcanotióis. Portanto, outro método eletroquímico utilizado no presente estudo para caracterização da SAM do 11-MUA foi a RD realizada através da técnica de VPD. Os voltamogramas foram obtidos em solução aquosa contendo 0,5 mol.L^{-1} KOH, a 20 mV.s^{-1}, ΔE de 0,1 a -1,3V *vs.* Ag/AgCl. Antes de iniciar os experimentos, a solução foi desoxigenada com $N_{2(g)}$ durante aproximadamente 10 minutos (FIGURA 15).

Através da FIGURA 15, observa-se intensidades de correntes catódicas características entre 1,05 e 1,08V *vs.* Ag/AgCl devido a dessorção dos tióis na superfície do eletrodo de ouro. Primeiramente, foram estudadas diferentes concentrações do 11-MUA (0,1, 1,0 e 10,0 mmol.L^{-1}) em diferentes tempos de interação. As curvas 1, mostradas nas figuras 15(a), 15(b) e 15(c), referem-se aos voltamogramas obtidos do eletrodo limpo em solução desaerada contendo 0,5 mol.L^{-1} KOH. Conforme pode ser analisado não há evidência de nenhum processo faradaico.

As curvas 2, 3 e 4 da FIGURA 15(a), mostram, respectivamente, a modificação da superfície de ouro através da adsorção de 0,1, 1,0 e 10,0 mmol.L^{-1} de 11-MUA após um tempo de interação de apenas 2,0 horas. Evidencia-se menor intensidade de corrente catódica quando a modificação do eletrodo foi realizada utilizando-se uma maior concentração do 11-MUA (10,0 mmol.L^{-1}), confirmando a hipótese relatada anteriormente pelos VCs, na qual um maior número de espécies na superfície pode possibilitar a formação de ligações dissulfetos entre as moléculas do 11-MUA, dificultando a interação do enxofre com as partículas de ouro, resultando na diminuição do número de moléculas adsorvidas na superfície metálica. A TABELA 3 mostra as I_c obtidas por RD para as diferentes concentrações do 11-MUA estudadas após um tempo de modificação de 2,0 horas.

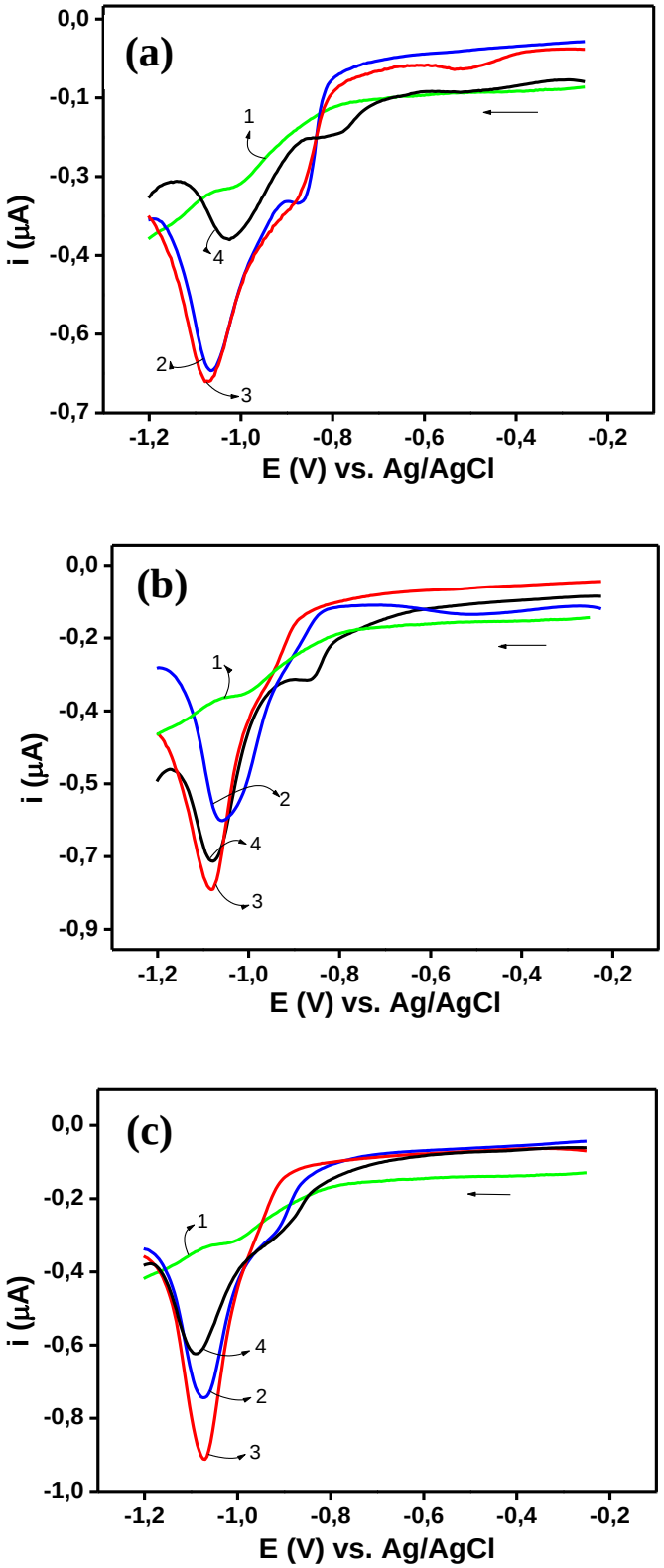

Figura 15. RD obtida através da técnica de VPD. Voltamogramas obtidos do branco (curvas 1, FIGURAS 15(a), 15(b) e 15 (C)), e para as diferentes concentrações de 11-MUA: 0,1 (curvas 2), 1,0 (curvas 3) e 10,0 (curvas 4) mmol.L^{-1}, após 2,0 horas (FIGURA 15(a)), 15,0 horas (FIGURA 15(b)) e 24 horas (FIGURA 15(c)) de modificação. Todos os voltamogramas foram obtidos em solução aquosa contendo 0,5 mol.L^{-1} de KOH, *v* de 20 mV.s^{-1} e ΔE de 0,1 a -1,3V vs. Ag/AgCl. Anteriormente a realização das medidas a solução aquosa de KOH foi desaerada com gás nitrogênio durante aproximadamente 10 minutos.

TABELA 3

Diferentes I_c obtidas por VPD para eletrodo de ouro modificado com diferentes concentrações de 11-MUA em 0,5 mol.L^{-1} de KOH após tempo de interação de 2,0 horas

[11-MUA] (mmol.L^{-1})	***Ic* (µA)**
0,1	-0,40
1,0	-0,42
10,0	-0,15

v = 20 mV s^{-1}; ΔE de 0,1 a -1,3V *vs*. Ag/AgCl.

Após tempos de modificação de 8,0 horas (figura não mostrada), 16,0 horas (FIGURA 15(b)) e 24 horas (FIGURA 15(c)) a intensidade da corrente catódica aumentou com o aumento do tempo de adsorção, certificando que o maior tempo de modificação possibilitou maior adsorção dos tióis na superfície. O perfil dos voltamogramas de pulsos diferenciais obtidos para todos os tempos de interação estudados foi semelhante ao voltamograma com o tempo de interação de 2,0 horas discutido anteriormente.

As TABELAS 4, 5 e 6 mostram a intensidade dos picos catódicos obtidos através da Redução Dessortiva para as diferentes concentrações do 11-MUA após tempos de adsorção de 8,0, 16,0 e 24 horas, respectivamente.

TABELA 4

Diferentes I_c obtidas por VPD para eletrodo de ouro modificado com diferentes concentrações de 11-MUA em 0,5 mol.L^{-1} de KOH após tempo de interação de 8,0 horas

[11-MUA] (mmol.L^{-1})	***Ic* (µA)**
0,1	-0,42
1,0	-0,46
10,0	-0,29

v = 20 mV s^{-1}; ΔE de 0,1 a -1,3V *vs*. Ag/AgCl.

TABELA 5

Diferentes I_c obtidas por VPD para eletrodo de ouro modificado com diferentes concentrações de 11-MUA em 0,5 mol.L^{-1} de KOH após tempo de interação de 16,0 horas

[11-MUA] (mmol.L^{-1})	***Ic* (µA)**
0,1	-0,44
1,0	-0,55
10,0	-0,31

v = 20 mV s^{-1}; ΔE de 0,1 a -1,3V *vs*. Ag/AgCl.

TABELA 6

Diferentes I_c obtidas por VPD para eletrodo de ouro modificado com diferentes concentrações de 11-MUA em 0,5 mol.L^{-1} de KOH após tempo de interação de 24,0 horas

[11-MUA] (mmol.L^{-1})	***Ic* (µA)**
0,1	-0,49
1,0	-0,65
10,0	-0,32

v = 20 mV s^{-1}; ΔE de 0,1 a -1,3V *vs*. Ag/AgCl.

Diante do estudo de RD realizado por VPD ficou evidente que para cada tempo estudado a aplicação do potencial negativo promoveu maior dessorção do 11-MUA na concentração de 1,0 mmol.L^{-1}. Tal fato evidencia que nesta concentração o tiol foi mais intensamente adsorvido na superfície do eletrodo de ouro, sendo, portanto, a concentração escolhida para formação da SAM.

5.1.3 Estudo do tempo de adsorção de 1,0 mmol.L^{-1} do 11-MUA através da Voltametria Cíclica e Redução Dessortiva

Após definição da melhor concentração a ser utilizada para formação da SAM (1,0 mmol.L^{-1} do 11-MUA), o próximo passo foi definir o melhor tempo de adsorção do tiol nas mesmas condições estudadas anteriormente. A FIGURA 16 mostra os diferentes tempos de adsorção estudados através das técnicas VC (FIGURA 16(a)) e RD (FIGURA 16(b)).

As curvas 1 das FIGURAS 16(a) e 16(b), referem-se, respectivamente, ao VC da sonda em eletrodo limpo e ao voltamograma de pulso diferencial do eletrodo limpo em solução aquosa desaerada contendo 0,5 mol.L^{-1} KOH. Já as curvas 2, 3, 4, 5, 6 e 7 das FIGURAS 16(a) e 16(b) referem-se, respectivamente, aos VCs e aos voltamogramas de pulsos diferenciais obtidos após 0,5, 2,0, 8,0, 16,0, 24,0 e 60,0 horas de interação com 1,0 mmol.L^{-1} do 11-MUA.

Através dos VCs (FIGURA 16(a)) verifica-se que a partir de tempos de interação de 8 horas (FIGURA 16(a), curva 4) a SAM formada por 1,0 mmol.L^{-1} do 11-MUA apresenta excelente supressão dos processos redox da sonda eletroquímica empregada. Tal fato é explicado devido a formação de uma SAM ainda desorganizada apresentar uma cobertura de superfície elevada, a qual já é suficiente para suprimir a eletroatividade da sonda devido a alta resistência à transferência eletrônica gerada na superfície.

Já através da RD (FIGURA 16(b)) observou-se que a partir de tempos de interação de 24 horas (FIGURA 16(b), curva 6) não foram verificadas variações significativas na corrente

catódica para 1,0 mmol.L^{-1} do 11-MUA, indicando que após adsorção a SAM inicia-se um processo de organização através do rearranjo molecular dos tióis. A TABELA 7 mostra os valores de I_c, Q e os valores obtidos de Γ através da equação (8) para cada tempo de adsorção (0,5, 2,0, 8,0, 16,0, 24,0 e 60,0 horas) do tiol mostrado na FIGURA 16(b).

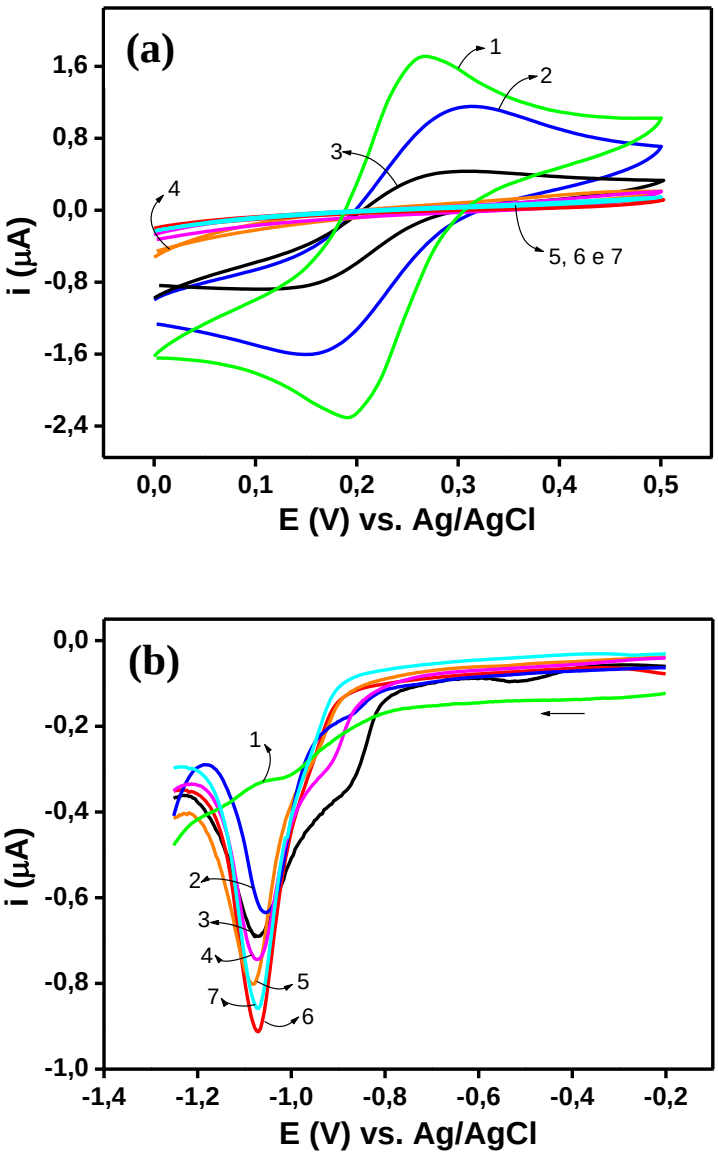

FIGURA 16. Diferentes tempos de adsorção estudados para formação da SAM do 11-MUA. As curvas 1 das FIGURAS 16(a) e 16(b), referem-se, respectivamente, ao VC e VPD do eletrodo limpo em suas respectivas soluções. Já as curvas 2, 3, 4, 5, 6 e 7 das FIGURAS 16(a) e 16(b) referem-se, respectivamente, aos VCs e aos voltamogramas de pulsos diferenciais obtidos após 0,5, 2,0, 8,0, 16,0, 24,0 e 60,0 horas de interação com 1,0 mmol.L^{-1} do 11-MUA. Os VCs (FIGURA 16(a)) foram obtidos com 1,0 mol.L^{-1} de $Fe(CN)_6^{3-}$ em 0,1 mol.L^{-1} de KCl, *v* de 20 mV.s^{-1} e ΔE de 0 a 5 V *vs.* Ag/AgCl. A RD (FIGURA 16(b)) foi realizada através da VPD na presença de uma solução aquosa contendo 0,5 mol.L^{-1} de KOH anteriormente desaerada com gás nitrogênio, *v* de 20 mV.s^{-1} e ΔE de 0,1 a -1,3 V *vs.* Ag/AgCl.

TABELA 7

Valores de I_c, Q e Γ obtidos através da técnica de RD após diferentes tempos de adsorção de 1,0 mmol.L^{-1} do 11-MUA

Tempo de adsorção (horas)	I_c (µA)	Q/c (x 10^{-8})	Γ / pmol.cm^{-2}
0,5	-0,39	4,44	14,7
2,0	-0,42	6,08	20,0
8,0	-0,46	6,66	22,0
16,0	-0,55	7,25	23,9
24,0	-0,65	8,00	26,6
60,0	-0,67	8,30	27,2

Através dos valores de cobertura de superfície encontrados através da RD construiu-se uma curva relacionando Γ versus tempo de adsorção do tiol (FIGURA 17). Conforme evidenciado mediante ajuste não linear do modelo proposto de formação da SAM, o mesmo não ocorre mediante uma isoterma simples de Langmuir.

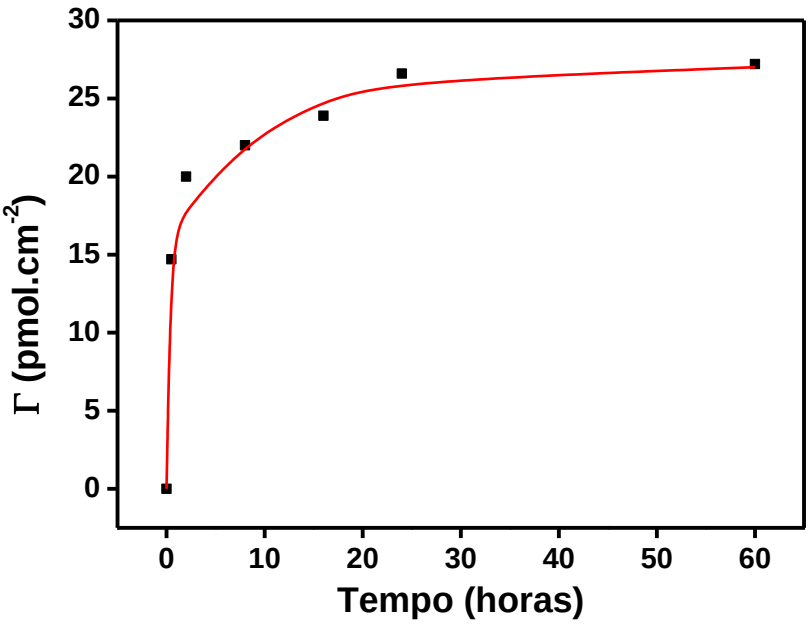

FIGURA 17. Diferentes valores obtidos para Γ para cada tempo de adsorção de 1,0 mmol.L^{-1} do 11-MUA.

O modelo proposto tem por base o fato do processo de adsorção da SAM investigada ocorrer de forma rápida alcançando uma cobertura de superfície elevada seguindo-se por uma etapa lenta de rearranjo molecular conforme proposto a seguir (Damos *et al.*, 2005):

$$Au + Ads \underset{k_d}{\overset{k_a}{\rightleftarrows}} Au - Ads \qquad 1^a \text{ etapa}$$

$$Au - Ads \overset{k_t}{\rightarrow} Au - Ads^* \quad 2^a \text{ etapa}$$

onde Au representa o sítio de adsorção, Ads é o tiol, Au-Ads representa a monocamada desorganizada, Au-Ads* representa a SAM no seu estado final organizado, e K_a, K_d e K_t referem-se, respectivamente, às constantes de associação, dissociação e de rearranjo molecular. A partir do modelo proposto a seguinte equação de ajuste foi desenvolvida:

$$\emptyset = A_1 \left(1 - exp.\left(-K_{obs,1}\, t\right)\right) + A_2 \left(1 - exp.\left(-K_{obs,2}\, t\right)\right) \tag{9}$$

Onde ∅ refere-se à cobertura de superfície relativa e A_1 e A_2 são respectivamente:

$$A_1 = \frac{-K_a.C\left(K_t - K_{obs,1}\right)}{\left(K_{obs,1} - K_{obs,2}\right)K_{obs,1}} \tag{10}$$

$$A_2 = \frac{-K_a.C\left(K_t - K_{obs,2}\right)}{\left(K_{obs,1} - K_{obs,2}\right)K_{obs,2}} \tag{11}$$

Bem como, $K_{obs,1}$ e $K_{obs,2}$ são dadas por:

$$K_{obs,1} = \frac{K_a.C + K_d + K_t}{2} + \sqrt{\left(\frac{K_a C + K_d + K_t}{2}\right)^2 - K_a.K_t.C} \tag{12}$$

$$K_{obs,2} = \frac{K_a C + K_d + K_t}{2} - \sqrt{\left(\frac{K_a C + K_d + K_t}{2}\right)^2 - K_a.K_t.C} \tag{13}$$

Sendo, $kobs,_1$ e $kobs,_2$, respectivamente, as constantes cinéticas referentes à etapa de adsorção rápida e a etapa lenta de rearranjo molecular do tiol sobre a superfície de ouro, e C a concentração do tiol em $mol.L^{-1}$ utilizada.

A TABELA 8 mostra os seguintes valores de A_1, A_2, $kobs,_1$ e $kobs,_2$ obtidos a partir do ajuste não linear da equação representante do modelo aos dados de Redução Dessortiva mostrados na FIGURA 17.

TABELA 8

Valores obtidos a partir do ajuste não linear da equação representante do modelo aos dados de Redução Dessortiva mostrados na FIGURA 17.

A_1	A_2	$Kobs,_1$ (s^{-1})	$Kobs,_2$ (s^{-1})
0,4164	0,5773	0,1058	223,71

Somando as equações 12 e 13 obtem-se:

$$K_{obs,1} + K_{obs,2} = K_a . C + K_d + K_t \quad (14)$$

Admitindo que K_a e K_t são >> que K_d tendo em vista que o processo de adsorção de tiois é admitido como irreversível (Freire *et al*., 2003) a equação 14 pode ser reescrita como:

$$K_{obs,1} + K_{obs,2} = K_a . C + K_t \quad (15)$$

Realizando o produto de $kobs,_1$ e $kobs,_2$ obtem-se:

$$K_{obs,1} . K_{obs,2} = K_a . K_t . C \quad (16)$$

Dessa forma, através das relações obtidas nas equações 15 e 16 foram calculados os valores de K_a: 2,2372x10^5 L mol^{-1} s^{-1} e K_t: 0,1058 s^{-1}, os quais estão em concordância com a literatura (Kyprianou *et al*., 2010). O alto valor encontrado para a constante de associação e o baixo valor obtido para a constante de rearranjo molecular, comprovam que o processo realmente envolve uma etapa rápida de adsorção do tiol na superfície metálica seguida por uma etapa lenta referente ao rearranjo molecular do 11-MUA.

De acordo com o discutido, 24 horas mostrou ser um tempo suficiente para adsorção e rearranjo de 1,0 mmol.L^{-1} do 11-MUA em superfície de ouro. A partir de então, o processo de formação da SAM foi padronizado: imersão do substrato em solução etanólica contendo 1,0 mmol.L^{-1} de 11-MUA por um período de 24 horas.

5.2 Construção do Imunosensor

O imunosensor foi construído através da imobilização de antígenos solúveis de *L. infantum* sobre Monocamadas Auto-Organizadas do ácido 11- MUA em superfície de ouro, conforme discutido a seguir.

5.2.1 Formação da SAM do 11-MUA em disco de ouro e sua ativação

Após otimização da concentração do 11-MUA e do tempo de adsorção, a formação da SAM foi realizada sobre o disco de ouro. Então, o disco previamente limpo foi imerso em 5,0 mL de uma solução etanólica contendo 1,0 $mmol.L^{-1}$ de 11-MUA durante 24 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, a superfície foi lavada diversas vezes com álcool etílico e água, objetivando a remoção de espécies fracamente adsorvidas ou mesmo o excesso de espécies na superfície do filme de ouro. Posteriormente, os grupos funcionais terminais da SAM foram ativados pela adição de 500 µL de uma solução aquosa contendo 100 $mmol.L^{-1}$ do agente de acoplamento EDC e 150 $mmol.L^{-1}$ do auxiliar NHS. Um tempo de ativação entre 10 a 15 minutos foi suficiente para promover formação de um éster reativo. Posteriormente, a superfície foi levemente lavada com água para retirar excesso de moléculas de EDC e NHS. O objetivo da ativação da SAM é a transformação dos grupos carboxílicos terminais pouco reativos em grupamentos NHS-ésteres altamente reativos, sendo os ésteres formados suscetíveis aos ataques nucleofílicos de grupamentos aminos livres presentes nas proteínas. As concentrações dos agentes de acoplamento bem como seus tempos de reação foram utilizados de acordo com procedimentos já bem descritos na literatura (Jonhsson *et al*., 1991).

5.2.2 Adição de antígenos solúveis de *Leishmania infantum* sobre o disco sensor

Com propósito de investigar a capacidade da SAM do 11-MUA referente à imobilização do antígeno *L. infantum* foi empregada a técnica de Ressonância de Plásmons de Superfície (FIGURA 18(a)), sendo a construção do imunosensor acompanhada através da mudança do ângulo de SPR em função do tempo de interação. Anteriormente à adição dos antígenos foram injetados sobre a SAM previamente ativada 300 µL de tampão HBS-EP pH 7,4 para promover uma linha base. Posteriormente, 100 µL de uma solução contendo 50 $\mu g.mL^{-1}$ de antígenos brutos solúveis de *L. infantum* dissolvidos em HBS-EP pH 7,4 foram

adicionados. Como observado através da FIGURA 18(a), a adição de antígenos solúveis de *L. infantum* envolveu duas etapas: uma etapa de associação devido à ligação dos antígenos na superfície e uma etapa de dissociação devido à retirada de espécies da superfície. Na primeira etapa, observa-se a eficiência do processo de imobilização de *L. infantum* através da SAM do 11-MUA ativada com EDC/NHS. A imobilização covalente do antígeno sobre a SAM aumentou o índice de refração do meio e como resultado dessa interação um deslocamento característico do ângulo de SPR é verificado. Um tempo de imobilização entre 20 a 30 minutos mostrou ser suficiente para imobilização estável do antígeno. Já a etapa de dissociação ocorreu devido a lavagem da superfície com tampão HBS-EP pH 7,4 retirando espécies fracamente ligadas na superfície, o que diminuiu o índice de refração do meio que foi acompanhado pela diminuição do ângulo de SPR. Conforme pode ser observado pela FIGURA 18(a), a técnica de SPR mostrou ser extremamente sensível ao processo de adsorção bem como ao processo de dessorção do antígeno *L. infantum*.

Na FIGURA 18(b), por sua vez, são apresentados sensogramas envolvendo apenas as etapas de associação para diferentes concentrações de antígeno *L. infantum* (10, 18, 30, 40 e 50 $\mu g.mL^{-1}$) e, pode ser observado que o aumento na concentração do antígeno é acompanhado pelo aumento do ângulo de ressonância de plásmons de superfície como resultado do aumento do índice de refração local na superfície do disco sensor devido à presença de maior número de moléculas na superfície. Tal resultado é indicativo da grande eficiência da SAM confeccionada em imobilizar o antígeno *L. infantum* uma vez que não foram observadas $\Delta\theta_{SPR}$ para adição do antígeno na ausência da SAM. A TABELA 9 mostra os valores do deslocamento do ângulo de SPR para cada uma das concentrações adicionadas após tempo de interação de aproximadamente 30 minutos.

TABELA 9

Valores de $\Delta\theta_{SPR}$ obtidos devido a adição de diferentes concentrações de antígenos brutos solúveis de *L. infantum* sobre SAM do 11-MUA após 30 minutos de imobilização

[*L. infantum*] ($\mu g.mL^{-1}$)	**$\Delta\theta_{SPR}$ (mgraus)**
10	20
18	41
30	72
40	96
50	180

Diante do apresentado, fica evidente a potencialidade da técnica de SPR para construção do imunosensor, observando que a etapa de imobilização dos antígenos solúveis de *L. infantum* sobre o disco sensor é estável e altamente sensível.

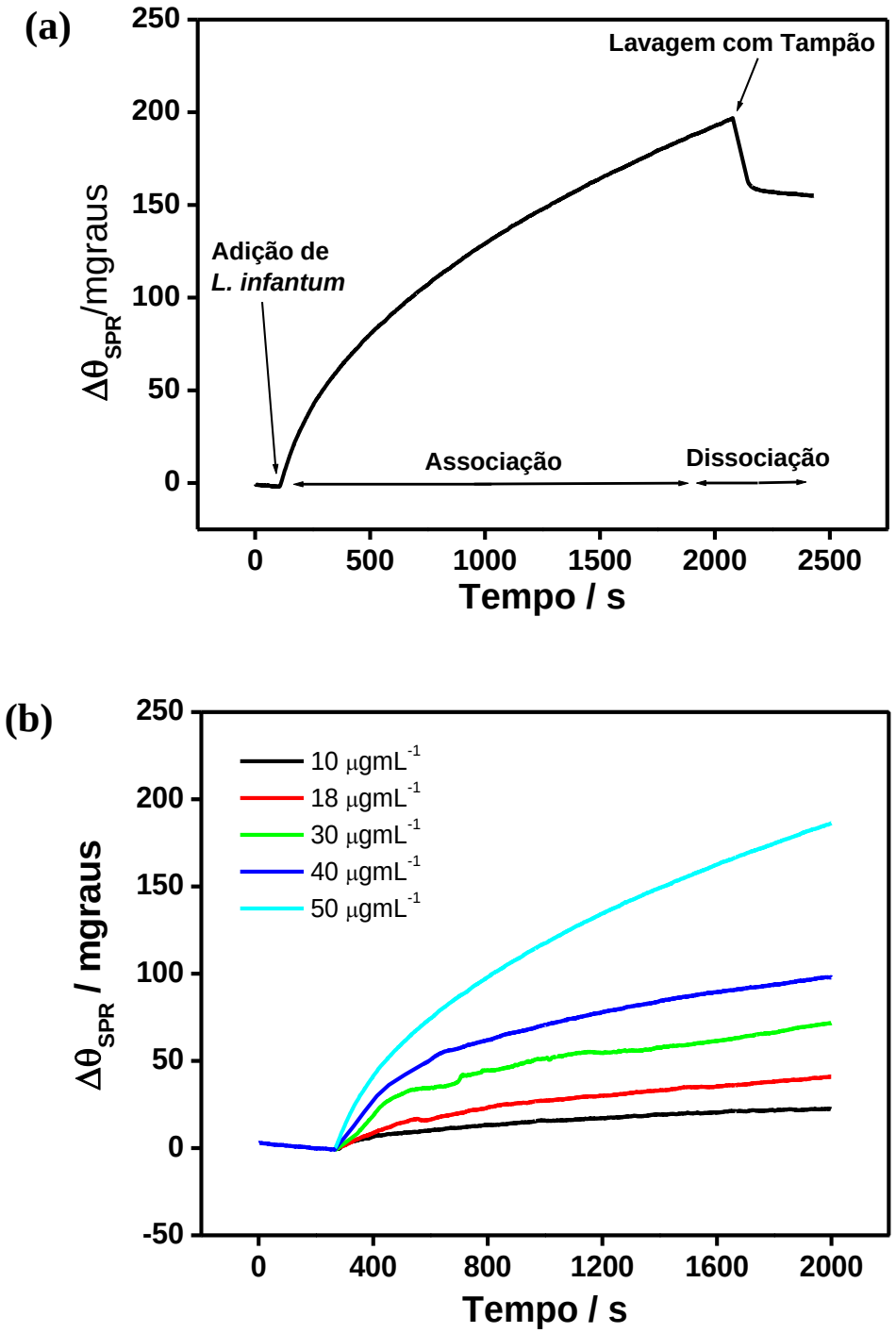

FIGURA 18. (a) Sensograma referente à associação e dissociação do antígeno *L. infantum* sobre SAM do 11-MUA previamente ativada em EDC/NHS ([*L. infantum*] = 50 μgmL^{-1}); (b) Sensogramas referentes à associação do antígeno *L. infantum* a partir de soluções de diferentes concentrações: 10, 18, 30, 40 e 50 $\mu g.mL^{-1}$.

5.3 Caracterização do Imunosensor

A caracterização do imunosensor foi realizada através das técnicas de Voltametria Cíclica e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.

5.3.1 Caracterização do Imunosensor através da Voltametria Cíclica

Os VCs mostrados na FIGURA 19, foram obtidos em 1,0 mmol.L^{-1} de $Fe(CN)_6^{3-}$ em 0,1 mol.L^{-1} de KCl, *v* de 20 mV.s^{-1}. As curvas 1 e 2 da FIGURA 19 referem, respectivamente, ao comportamento da sonda redox em eletrodo limpo, e em SAM formada pela adsorção de 1,0 mmol.L^{-1} de 11-MUA após 24 horas de adsorção. Os resultados mostrados pelas curvas 1 e 2 já foram discutidos na seção 5.1.1.

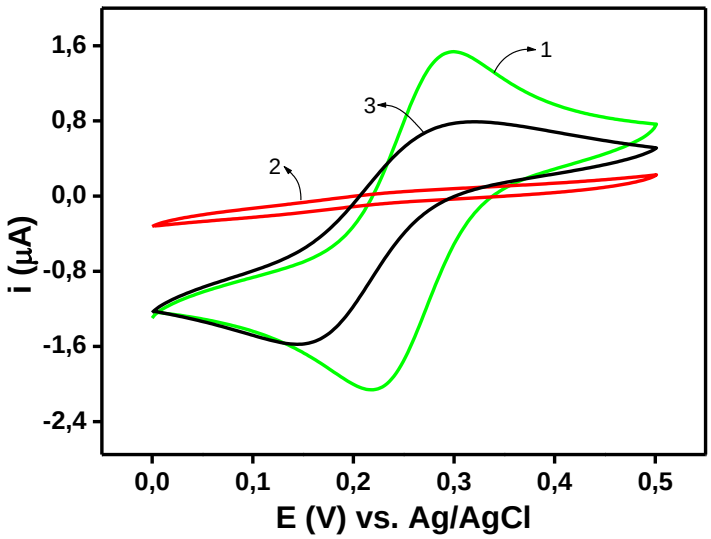

FIGURA 19. VCs mostrando o comportamento de 1,0 mmol.L^{-1} de $Fe(CN)_6^{3-}$ em eletrodo de ouro limpo (curva 1), em SAM do 11-MUA (curva 2) e em imunosensor (curva 3). As medidas foram realizadas em 0,1 mol.L^{-1} de KCl, *v* de 20 mV.s^{-1} e ΔE de 0 a 0,5 V vs. Ag/AgCl.

Já a curva 3 da FIGURA 19 referem-se ao comportamento da sonda sobre antígenos solúveis de *L. infantum* imobilizados sobre a SAM do 11-MUA previamente ativada na superfície do eletrodo de ouro. Observa-se que o comportamento redox do hexacianoferrato não é totalmente suprimido na superfície do imunosensor, apresentando I_a e I_c em 0,30 e 0,16 V, respectivamente. A explicação para tal fato é que a imobilização do antígeno sobre a SAM pode ter alterado o grau de rearranjo molecular dos tióis, gerando maior número de defeitos da SAM que possibilitou menor resistência à transferência eletrônica na superfície. Dessa

forma, a caracterização eletroquímica através da voltametria cíclica apresentou forte indício de que a imobilização de antígenos brutos solúveis de *L. infantum* sobre a SAM do 11-MUA ocorreu com sucesso.

5.3.2 Caracterização do imunosensor através da Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)

A EIS permite obtenção de informações dos diferentes processos eletroquímicos e suas constantes de tempo sendo possível associar estes processos a componentes elétricos como resistores, capacitores ou indutores tal que o entendimento do sistema como um todo seja possibilitado. A EIS consiste na aplicação de uma perturbação senoidal de tensão de pequena amplitude e uma frequência que seja possível investigar o sistema em estado estacionário já que tais condições de perturbação do sistema são mínimas. De forma geral, a impedância de um sistema é representado por um vetor composto por uma parte real [$Z_{re}(\omega)$] e por uma parte imaginária [$Z_{im}(\omega)$], onde $i=(-1)^{1/2}$. Desta forma a impedância complexa é representada por:

$$Z_{(\omega)} = Z_{re(\omega)} + iZ_{im(\omega)} \quad (17)$$

ou

$$Z_{(\omega)} = Z'_{(\omega)} + iZ''_{(\omega)} \quad (18)$$

A representação de dados de EIS pode ser feita de varias formas, sendo o Diagrama de Nyquist (gráficos de Z' *vs.* Z'') muito utilizado, sendo uma poderosa ferramenta para mensurar a resistência à transferência eletrônica (R_{et}) em reações eletroquímicas (Yang *et. al*., 2004).

Assim, a outra técnica eletroquímica utilizada em nossos estudos para caracterização do imunosensor foi a EIS. A FIGURA 20 representa o diagrama de Nyquist obtido dos espectros de impedância realizados em eletrodo de ouro limpo (El. Au limpo), em eletrodo de ouro contendo a SAM do 11-MUA (El. Au-SAM) e em eletrodo de ouro contendo antígenos solúveis de *L. infantum* (El. Au-SAM-Ag) imobilizados sobre a SAM. Todas as medidas foram feitas em solução aquosa contendo como sonda redox $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ 1,0 mmol. L^{-1} em KCl 0,1 mol.L^{-1}. De forma geral, nestes espectros estão incluídos um semicírculo e uma região linear. O semicírculo corresponde ao processo de transferência eletrônica do

$Fe(CN)6]^{3-/4-}$, já a região linear refere ao processo difusional. O diâmetro do semicírculo, de forma geral, representa a magnitude da resistência à transferência eletrônica na superfície do eletrodo. Portanto, fica evidente através da FIGURA 20 que a intensidade do processo de R_{et} aumenta na seguinte ordem: El. Au limpo (R_{te}: 2,90 Kohm), El. Au–SAM-Ag (R_{te}: 43,2 Kohm) e El. Au–SAM (R_{te}: 1600 Kohm). Tal fato confirma a hipótese já relatada através dos VCs realizados e discutidos na seção 5.3.1: a SAM do 11-MUA inibe o processo de transferência eletrônica do hexacianoferrato de potássio, apresentando um altíssimo valor de R_{te}. Já a imobilização dos antígenos solúveis de *L. infantum* sobre a SAM aumenta o número de defeitos da SAM, diminuindo a R_{te} comparada com a superfície modificada apenas com a SAM para a reação redox da sonda sobre a superfície.

Os dados obtidos pelas medidas de EIS neste trabalho podem ser simulados pelo circuito equivalente de Randles, como mostrado na FIGURA 21, em que R_s é a resistência ôhmica referente à solução eletrolítica, R_{te} é a resistência à transferência de eletrônica, W é a impedância de Waburg relacionada com a difusão da sonda do seio da solução para a superfície do eletrodo, e EFC é o elemento de fase constante que está relacionado com a capacitância da dupla camada elétrica.

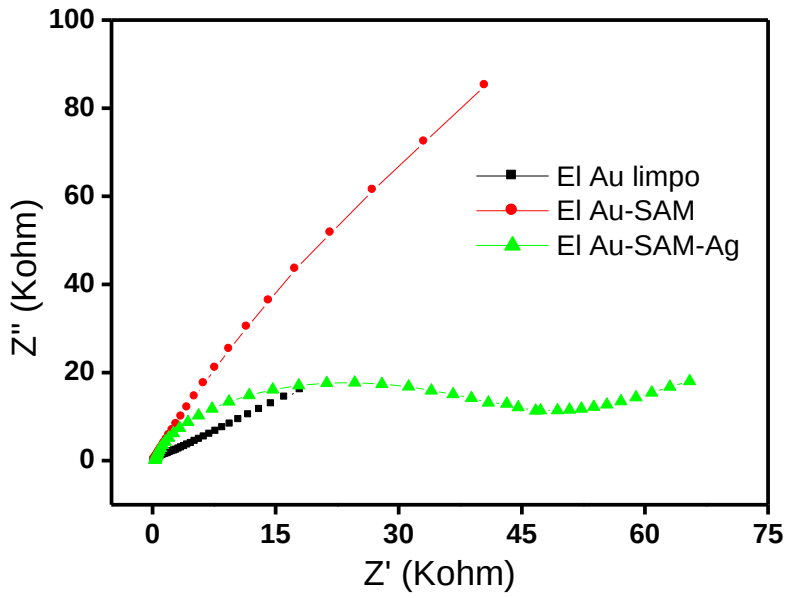

FIGURA 20. Diagrama de Nyquist (gráfico Z' *vs.* Z") para as medidas de EIS realizadas em eletrodo de ouro limpo (El Au limpo), eletrodo modificado com SAM (El Au-SAM) e após imobilização dos antígenos sobre a SAM (El Au-SAM-Ag). A sonda redox utilizada foi $Fe(CN)6^{3-/4-}$ 1,0 $mmol.L^{-1}$ em KCl 0,1 $mol.L^{-1}$. A amplitude foi 10 mV, e a faixa de frequência de 0,1 a 10^5 Hz. Cada medida foi obtida em OCP e em potencial aplicado, obtendo resultados equivalentes para ambos.

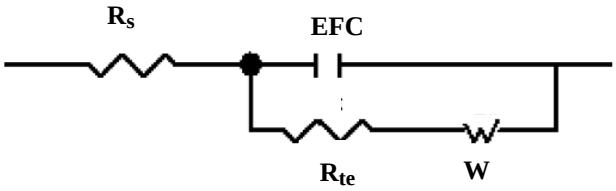

FIGURA 21. Circuito equivalente utilizado para as medidas de EIS.

Assim, os resultados encontrados nos estudos de EIS mostraram a eficiência desta técnica para caracterização de superfície modificada através da avaliação simples de um processo que envolve a transferência eletrônica de uma espécie eletroativa sobre a superfície. Sendo, portanto, uma ferramenta utilizada com sucesso para caracterização da imobilização covalente dos antígenos solúveis de *L. infantum* sobre a SAM do 11-MUA previamente ativa em superfície de ouro.

5.4 Estudo complementar da modificação da superfície de ouro

5.4.1 Determinação da Espessura e Constante Dielétrica da SAM do 11-MUA

A metodologia utilizada para encontrar de modo inequívoco a espessura do filme e sua constante dielétrica desenvolvida por Bruijn e outros (1990) foi considerada neste trabalho. Nesse sentido, as seguintes considerações podem ser feitas sobre a equação de Fresnel (Damos *et al*., 2007) para simplificar a relação entre a refletância e o ângulo de incidência: (a) somente filmes finos devem ser considerados bem como (b) devem ser transparentes, tais como sua parte imaginária da constante dielétrica se tornar insignificante (não ocorre absorção de luz na região do visível). Filmes finos não absorvem luz em comprimentos de ondas de 670 nm, portanto, as considerações são válidas para análise da espessura e constante dielétrica da SAM do 11-MUA adsorvido na superfície do substrato e serão adotadas neste trabalho. Como resultado destas considerações, as equações de Fresnel (Damos *et al*., 2007) foram reescritas, considerando a mudança do vetor onda da seguinte forma (Bruijn *et al*., 1991):

$$\Delta k_{min} = d_3 \left(\frac{6.28}{\lambda}\right)^2 \frac{(\epsilon_r \epsilon_4)^{3/2} (\epsilon_3 - \epsilon_4)}{\epsilon_3 (\epsilon_r - \epsilon_4)^2} \quad (19)$$

onde Δk_{min} representa o deslocamento do vetor onda, $\in_4$ a constante dielétrica do meio, $\in_3$ a constante dielétrica da camada orgânica, $\in_r$ a parte real da constante dielétrica da camada de ouro, λ representa o comprimento de onda utilizado (670 nm) e d_3 a espessura da camada orgânica.

Da equação (19) a mudança do vetor onda (Δk_{min}) depende de cinco variáveis, $\in_3$, $\in_4$, λ, d_3, $\in_r$. O valor do índice de refração do meio pode ser determinado como indicado na parte experimental do trabalho (Damos *et al*., 2005) e o laser diodo emite λ de 670 nm. O valor da parte real da constante dielétrica da camada de ouro ($\in_r$ = -11) é determinado como previamente reportado (Damos *et al*., 2005) com um erro menor do que 5%. Nesse sentido, pelo menos, duas equações são necessárias para tomar as propriedades ópticas da camada orgânica uma vez que duas variáveis ainda permanecem desconhecidas ($\in_3$ e d_3) na equação (19). Três alternativas têm sido amplamente utilizadas para resolver esta questão: (1) uma abordagem utilizando luz branca (múltiplos comprimentos de onda), (2) duas superfícies metálicas diferentes e uma abordagem usando (3) tipos diferentes de solventes. A primeira exige o conhecimento do valor das constantes ópticas dos filmes de diferentes comprimentos de ondas utilizados. Por outro lado, a troca do metal implica numa mudança de estratégias utilizadas nos estudos, que deverão resultar em alterações das afinidades entre a camada investigada e o substrato, como relatado por Bruijn e colaboradores (1991) a interação entre um filme de tiol é diferente para o ouro, quando comparado com o mesmo estudo em prata. Com base nestes aspectos, as desvantagens do uso de diferentes valores de $\in_r$ ou λ tem criado um interesse crescente para a abordagem com diferentes solventes. Por este método de comprimento de onda fixo, dois solventes diferentes com diferentes constantes dielétricas, $\in_4$ (1) e $\in_4$ (2) são usados para conduzir duas medidas diferentes. Supondo-se que a estrutura do filme não muda, então sugere-se que os dois valores medidos Δk_{min} (1) e Δk_{min} (2) podem ser usados para determinar um conjunto único de constante dielétrica e espessura de filme, que pode ser verificado através da geração de duas expressões usando a equação (19). Ao tomar a relação entre essas equações geradas pode-se verificar que é possível determinar de forma inequívoca o valor da constante dielétrica da camada orgânica como segue:

$$\epsilon_3 = \frac{\Delta k_{min}(1)\,\epsilon_4(2) - \alpha \Delta k_{min}(2)\,\epsilon_4(1)}{\Delta k_{min}(1) - \Delta k_{min}(2)\alpha} \qquad (20a)$$

$$\alpha = \left(\frac{\epsilon_4(1)}{\epsilon_4(2)}\right)^{3/2} \times \left[\frac{(\epsilon_r - \epsilon_4(1))^2}{(\epsilon_r - \epsilon_4(2))^2}\right] \quad (20b)$$

Assim, a espessura e a constante dielétrica podem ser determinadas através da introdução do valor da constante dielétrica na Equação (19). Na prática, Damos e colaboradores (2005) determinaram a constante dielétrica e a espessura do filme plotando três curvas que descrevem todos os possíveis pares de espessura e constante dielétrica para variação da refletância mínima medida. Após a constante dielétrica e espessura da camada de ouro serem controladas, a resposta óptica deste sistema para a formação do filme de tiol sobre a superfície sólida foi determinada.

De acordo com o apresentado acima, neste trabalho a metodologia adotada para calcular a espessura e a constante dielétrica da SAM do 11-MUA foi utilizando dois meios com diferenças significativas em seus índices de refração. O etanol foi usado como solvente de escolha (meio 1, $\in_4(1)$: 1,85) por ser o meio de dissolução do 11-MUA. E uma solução binária etanol/água (3:1) foi escolhida como segundo meio (meio 2, $\in_4(2)$: 1,83). Os valores de $\in_4(1)$ e $\in_4(2)$ foram obtidos através de um refratômetro de Abbe (Modelo 2WAJ).

Quatro espectros de SPR foram suficientes para determinação de $\in_3$ e d_3. Inicialmente, a solução binária foi injetada sobre o disco sensor e iniciou-se a medida. Após obtenção de uma linha base estável retirou-se o primeiro espectro (espectro 1) de SPR (curva de Refletância *vs.* θ_{SPR}). Posteriormente a solução binária foi substituída por etanol e o espectro 2 foi obtido. Em seguida a solução etanólica contendo 11-MUA 1,0 mmol.L^{-1} foi adicionada por aproximadamente 2,0 horas até não observar variação significativa do $\theta_{SPR.}$ Após esta etapa de adsorção a superfície foi lavada com etanol e o espectro 3 foi obtido. Posteriormente, o etanol foi substituído pela solução binária e o quarto e último espectro (espectro 4) foi obtido. Através dos espectros 1 e 4 foi possível calcular a $\Delta\theta_{SPR}(1)$ de 79,3mº referente à solução binária antes e após formação da SAM. A FIGURA 22(a) mostra as curvas de Refletância *vs.* $\theta_{SPR}(1)$ obtidas dos espectros 1 e 4. E através dos espectros 2 e 3 foi calculado a $\Delta\theta_{SPR}(2)$ de 75,6mº para o etanol antes e após adsorção do 11-MUA. A FIGURA 2(b) mostra as curvas de Refletância *vs.* $\theta_{SPR}(2)$ obtidas dos espectros 2 e 3.

Através da equação 1, $\Delta k_{min}(1)$ e $\Delta k_{min}(2)$ foram calculados, encontrando $\Delta k_{min}(1)$: 1970 m^{-1} e $\Delta k_{min}(2)$: 1870 m^{-1}. Em seguida, através da equação 20(b) o valor de α foi obtido (α: 0,99) e inserido na equação 20(a) para calcular a constante dielétrica da SAM do 11-MUA sobre a superfície de ouro, encontrando um valor de $\in_3$ igual a 2,17. Inserindo o valor

encontrado de $\in_3$ na equação 19 foi possível calcular a espessura da SAM do 11-MUA, obtendo d_3 igual a 13,3 Å. Os valores de $\in_3$ e d_3 encontrados são coerentes e estão em concordância com a literatura (Damos *et al*., 2005).

Dessa forma, através da técnica de SPR estudos complementares sobre a formação da SAM do 11-MUA na superfície do substrato de ouro foram realizados com êxito. Tais estudos são extremamente valiosos por possibilitar maior número informação referentes à modificação da superfície, sendo esta uma etapa crucial para construção do imunosensor proposto no trabalho.

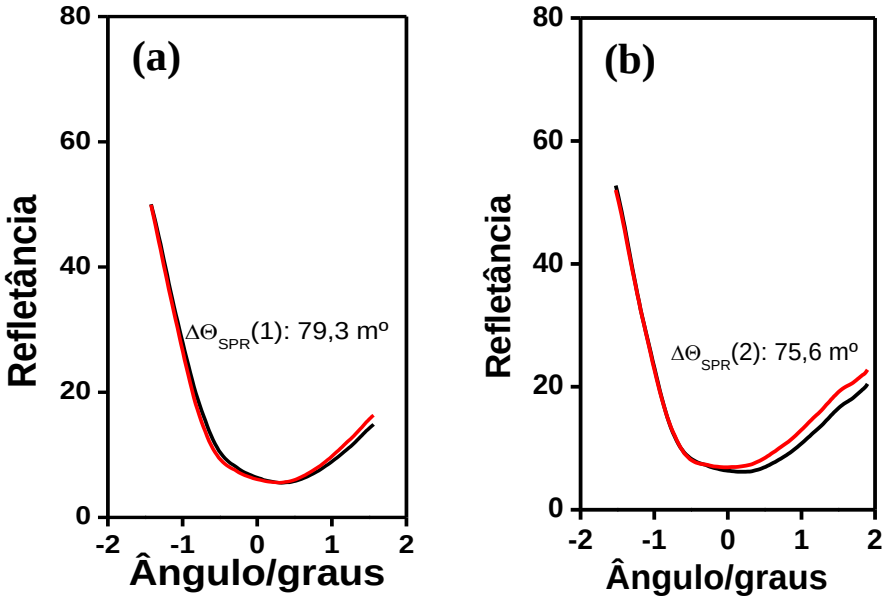

FIGURA 22. Curvas de Refletância. (a) Espectros referentes à solução binária (meio 1) antes e após adsorção do 11-MUA em superfície de ouro. (b) Espectros referentes ao etanol (meio 2) antes e após adsorção do 11-MUA em superfície de ouro. A $\Delta\theta_{SPR}(1)$ e $\Delta\theta_{SPR}(2)$ são usados para calcular o $\Delta k_{min}(1)$ e $\Delta k_{min}(2)$, respectivamente.

5.5 Detecção da imunorreação entre antígenos brutos solúveis de *L. Infantum* e anticorpos anti-*L .infantum* através da técnica de SPR

A FIGURA 23 mostra o sensograma obtido para todas as etapas envolvidas na detecção de anticorpos anti - *L. infantum* através da técnica de SPR. A análise foi iniciada através da adição do tampão HBS-EP pH 7,4 sobre a SAM do 11-MUA previamente ativada até obtenção da linha base.

O ponto 1 na FIGURA 23 refere-se a injeção de 100 µL de antígenos solúveis de *L. infantum* (50 $\mu g.mL^{-1}$) sobre a SAM ativada, observando aumento apreciável do índice de refração na superfície do sensor devido à imobilização do antígeno sobre a SAM. Uma

interação de aproximadamente 30 minutos, como estudado anteriormente, foi satisfatória para imobilização covalente do antígeno sobre o disco sensor.

A etapa de associação do antígeno foi seguida pela etapa de dissociação (ponto 2, FIGURA 23) devido à lavagem da superfície com tampão HBS-EP pH 7,4, ocorrendo diminuição do índice de refração do meio através da retirada de algumas moléculas da superfície, observando como resposta diminuição do ângulo de SPR.

Em seguida, sobre os antígenos imobilizados foi injetada uma solução aquosa de etanolamina para promover o bloqueio dos sítios inespecíficos (ponto 3, FIGURA 23). Nesta etapa, diferentes concentrações de EA foram testadas (0,01, 0,05, 0,100 e 1,00 $mol.L^{-1}$). Concentrações de EA menores que 0,1 $mol.L^{-1}$ não mostraram resposta significativa, sendo insuficientes para promover interação com a superfície. Já concentração de EA de 1,0 $mol.L^{-1}$ supersaturou a concentração limite de moléculas medida pelo equipamento de SPR utilizado, não sendo possível realizar a leitura para essa concentração. Então, uma concentração de EA de 0,1 $mol.L^{-1}$ mostrou ser suficiente para bloquear os sítios inespecíficos, deixando mais expostos os sítios específicos para interação com os anticorpos. Assim, foram injetados uma solução aquosa contendo 100 µL de EA 0,1 $mol.L^{-1}$ sobre a superfície (ponto 3, FIGURA 23). Observa-se a partir do ponto 3 que instantaneamente o índice de refração diminui, tal fato ocorreu porque o índice de refração da solução aquosa de EA é menor do que o da solução tampão HBS-EP pH 7,4. O tempo de interação necessário para injeção de EA 0,1 $mol.L^{-1}$ foi de no máximo 5 minutos (ponto 3, FIGURA 23), pois, tempos maiores não foram acompanhados com maiores variações do ângulo de SPR, mostrando que após 5 minutos não há mais interações de EA com a superfície do sensor.

Posteriormente, foi injetado sobre a superfície a solução tampão HBS-EP pH 7,4 para remover moléculas de EA em excesso (ponto 4, FIGURA 23). Observa-se neste ponto que instantaneamente a solução HBS-EP pH 7,4 eleva o índice de refração do meio retornando praticamente a posição após etapa de dissociação na imobilização dos antígenos. O tampão continuou a ser injetado até obtenção de uma linha base estável.

Em seguida, uma amostra de 200 µL de soro canino positivo diluído por um fator de 50 vezes, foi injetada sobre o sensor (posição 5, FIGURA 23) evidenciando a variação brusca do ângulo de SPR devido ao aumento do índice de refração do meio ocasionado principalmente através da interação dos antígenos *L. infantum* com os anticorpos anti - *L. infantum*, ficando evidente a excelente sensibilidade da técnica para detecção da interação Ag - Ab.

Subsequentemente à adição do soro positivo contendo anticorpos específicos da LVC, a superfície foi lavada com solução tampão HBS-EP pH 7,4 (ponto 6, FIGURA 23) para retirar espécies fracamente ligadas à superfície, observando-se como esperado, diminuição do ângulo de SPR devido a diminuição do índice de refração local.

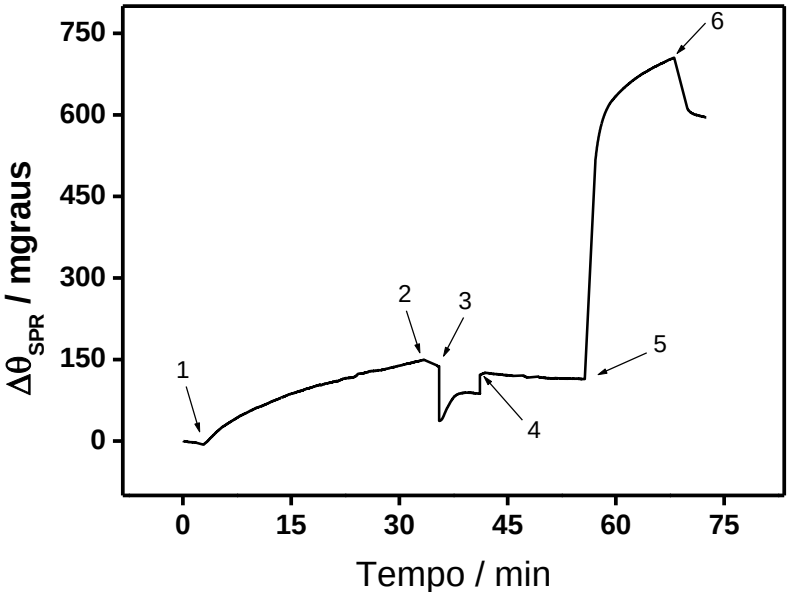

FIGURA 23. Sensograma mostrando imobilização e imunorreação de antígenos solúveis de *L. infantum* sobre SAM do 11-MUA em superfície de ouro. Posição 1, injeção de 50 µg.mL^{-1} de antígenos solúveis de *L. infantum* sobre SAM previamente ativada; Posições 2, 4 e 6 lavagem com tampão HBS-EP pH 7,4; Posição 3, injeção de 100 mmol.L^{-1} de EA; Posição 5, injeção de soro canino positivo diluído 50 vezes em tampão HBS-EP pH 7,4.

Posteriormente, foram injetados sobre o imunosensor soros caninos positivos e negativos em diferentes diluições. A FIGURA 24 mostra os sensogramas obtidos para a etapa de associação devido a adição de soros caninos positivos em diferentes diluições. As curvas 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 (FIGURA 24) referem-se, respectivamente, aos soros positivos nas seguintes diluições: 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 e 1:6400. Um tempo de interação de 10 minutos foi necessário para verificar resposta característica para a interação Ag - Ab. Analisando a FIGURA 24, observa-se uma ampla faixa de detecção de anticorpos anti - *L. infantum*, podendo ser detectados anticorpos em soros caninos positivos diluídos até 6400 vezes. Na TABELA 10 estão os valores observados da variação do ângulo de SPR após 10 minutos de adição de soros caninos positivos em diferentes diluições sobre o imunosensor.

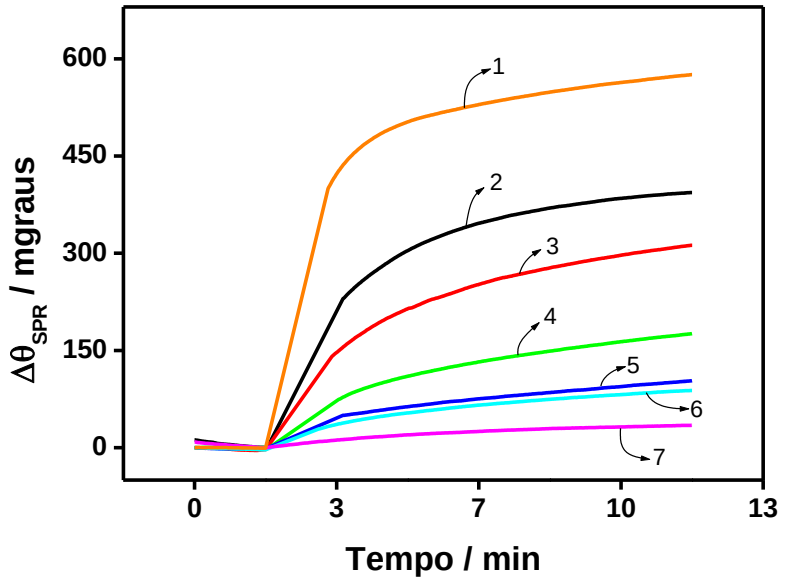

FIGURA 24. Sensogramas envolvendo etapa de associação entre antígenos solúveis de *L. infantum* e anti - *L. infantum* durante 10 minutos de interação. Foram injetados sobre o imunosensor 200 µL de soros caninos positivos em diferentes diluições: 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 e1:6400, curvas 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, respectivamente.

TABELA 10

Valores de $\Delta\theta_{SPR}$ obtidos após adição de soros caninos positivos em diferentes diluições sobre o imunosensor após 10 minutos de interação

Fator de diluição dos soros	$\Delta\theta_{SPR}$ (mgraus)
1/50	574,3
1/100	396,6
1/200	313,3
1/400	174,5
1/800	105,1
1/1600	88,4
1/6400	38,4

Uma vez que a adição de soros caninos negativos não foi acompanhada por respostas tão características como as dos soros positivos, pode-se dizer que o imunosensor proposto apresentou excelente sensibilidade e boa seletividade para detecção em tempo real de anticorpos anti- *L. infantum*.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi construído com sucesso o primeiro imunosensor baseado na Ressonância de Plásmons de Superfície para detecção de anticorpos anti-*L. infantum* através da imobilização covalente de antígenos solúveis de *Leishmania infantum* sobre Monocamadas Auto-Organizadas em superfície de ouro.

A formação da SAM do ácido 11-mercaptoundecanóico sobre a superfície de ouro foi caracterizada com êxito através das técnicas eletroquímicas de Voltametria Cíclica e Redução Dessortiva por Voltametria de Pulso Diferencial. A caracterização através da RD foi imprescindível, pois, através deste método foi possível calcular a cobertura de superfície dos tióis adsorvidos, evidenciando que a formação da SAM do 11-MUA envolveu duas etapas: uma etapa de adsorção rápida dos tióis e uma etapa lenta devido ao rearranjo molecular dos mesmos. O alto valor encontrado para a constante de associação, Ka, revelou que a formação da SAM em superfície de ouro mostrou ser um procedimento estável. Além disso, foram calculados através da espectroscopia de SPR a constante dielétrica e a espessura da SAM do 11-MUA sobre substrato de ouro, estudo que complementou ainda mais as informações sobre a superfície modificada.

A ativação dos grupos carboxílicos terminais da SAM através da adição de uma mistura contendo EDC/NHS foi indispensável para imobilização dos antígenos solúveis de *L. infantum*. Através da técnica de SPR, verificou-se que a imobilização covalente dos antígenos sobre a monocamada foi obtida com sucesso, observando variação significativa do ângulo de SPR durante a ligação dos antígenos.

A caracterização do imunosensor através da Voltametria Cíclica e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica mostrou que a ligação dos antígenos brutos solúveis de *L. infantum* sobre a SAM do 11-MUA diminui a resistência à transferência eletrônica quando comparado com o comportamento da sonda empregada sobre a SAM. Evidenciando que a imobilização dos antígenos alterou a conformação da monocamada.

Após sucesso na construção e caracterização do imunosensor, a etapa envolvendo adição de soros caninos positivos e negativos para Leishmaniose Visceral sobre o sensor foi obtida de modo satisfatório. O imunosensor apresentou alta sensibilidade para detecção de anticorpos anti-*L. infantum* devido uma variação brusca no ângulo de ressonância de plásmons de superfície observado após injeção de soros caninos positivos em diferentes diluições. Uma vez que a adição de soros caninos negativos não foi acompanhada por

variações significativas no ângulo de SPR em comparação a dos soros positivos pode-se concluir que o imunosensor também apresentou boa seletividade.

Como conclusão geral do trabalho, pode-se dizer que o primeiro imunosensor construído através da técnica de Ressonância de Plásmons de Superfície para detecção de anticorpos anti - *L. infantum* mostrou ser uma potente ferramenta. Diferentemente dos métodos convencionalmente empregados em diagnósticos da LVC o sensor proposto não utiliza marcadores químicos e/ou biológicos para detecção, além de permitir análise em tempo real, sendo, portanto, um dispositivo que apresenta grande perspectiva como um novo método de detecção da LV em áreas endêmicas, podendo garantir um diagnóstico mais rápido e mais seguro nessas áreas.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Avaliação de inúmeras amostras de soros caninos positivos para Leishmaniose Visceral em diferentes reatividades;

- Otimização da regeneração do imunosensor, verificando quantas análises podem ser realizadas em um mesmo sensor;

- Comparação de resposta (sensibilidade e seletividade) do sensor desenvolvido com a dos métodos convencionais de detecção da LVC (ELISA e RIFI) para diferentes tipos de soros caninos positivos para LV.

8. ANEXO

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Campus Universitário - Morro do Cruzeiro
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559 -1368 Fax: (31) 3559-1370

OFÍCIO CEP Nº 032/2007, de 28 de março de 2007.

Ilmº. Sr.
Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis
NUPEB/ICEB

Senhor Professor,

É com prazer que comunicamos a **aprovação**, por este Comitê, de seu **Projeto nº 2007/83** – "Estudo epidemiológico prospectivo em cães assintomáticos infectados por *Leishmania Leishmania chagasi* e identificação de biomarcadores de progressão clínica" e aproveitamos para sugerir que seja incluído um termo de consentimento para que o dono do cão pesquisado assine.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa/UFOP

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves W. A.; Bevilacqua P. D.; Qualidade de diagnóstico para Leishmaniose Visceral Canina em surtos epidemiológicos: uma epidemia em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, vol. 20, p. 259-65, 2004.

Ansorena P.; Zuzuarreguia A.; Pérez-Lorenzo E.; Mujikab M.; Arana S. Comparative analysis of QCM and SPR techniques for the optimization of immobilization sequences. **Sensors and Actuators B**, vol. 155, No 2, p. 667-672, 2011.

Arya S. K.; Singh A. T; Naidoo R.; et al. Chemically immobilized T4-bacteriophage for specific Escherichia coli detection using surface plasmon resonance. **Analyst**, vol. 136 No 3, p. 486-492, 2011.

Ashford R. W. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, vol. 30, p.1269–1281, 2000.

Azzam R. M. A.; Bashara N. M. Ellipsometry and Polarized Light. **Elsevier, Amsterdam**, p. 359, 1977.

Baccar H.; Mejri M. B.; Hafaiedh I.; Ktari T.; Aouni M.; Abdelghani A. Surface plasmon resonance immunosensor for bacteria detection. **Talanta**, vol. 82, p. 810–814, 2010.

Baeumner A. J. Biosensors for environmental pollutants and food contaminants. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, vol. 377, p. 434–445, 2003.

Bain C. D.; Troughton E. B.; Tao Y. T.; Evall J.; Whitesides G. M.; Nuzzo R. G. Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. **Journal of the American Chemical Society**, vol. 111, p. 321-335, 1989[a].

Bain C. D.; Evall J.; Whitesides G. M. Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: variation in the head group, tail group, and solvent. **Journal of the American Chemical Society**, vol. 111, p. 7155-7164, 1989[b].

Bain C. D.; Whitesides G. M. Molecular-Level Control over Surface Order in Self-Assembled Monolayer Films of Thiols on Gold. **Science**, vol. 240, p. 62-63, 1988.

Bartlett P. N. **Bioelectrochemistry Fundamentals, Experimental Techniques and Applications**, John Wiley & Sons, West Sussex, England, 2008.

Bensebaa F.; Voicu R.; Huron L.; Ellis T. H.; Kruus E. Kinetics of Formation of Long-Chain n-Alkanethiolate Monolayers on Polycrystalline Gold. **Langmuir**, vol. 13, p. 5335-5340, 1997.

Biebuyck H. A.; Bain C. D.; Whitesides G. M. Comparison of Organic Monolayers on Polycrystalline Gold Spontaneously Assembled from Solutions Containing Dialkyl Disulfides or Alkanethiols. **Langmuir**, vol. 10, p. 1825-1831, 1994.

Blackman L. C. F., Dewar M. J. S. Preparation of compounds containing monofunctional sulphur groups. **Journal of the Chemical Society**, vol. 162, part I-IV, 1957.

Blodgett K. B. Built-Up Films of Barium Stearate and Their Optical Properties. **Physical Review**, vol. 51, p. 964-982, 1937.

Blodgett K. B. Films Built by Depositing Successive Monomolecular Layers on a Solid Surface. **Journal of the American Chemical Society**, vol. 57, p. 1007-1022, 1935.

Bruijn H. E.; Altenburg B. S.; Kooyman R. P. H. ; Greve J.; Determination of thickness and dielectric constant of thin transparent dielectric layers using surface plasmon resonance. **Optics Communications**, vol. 82, p. 425–432, 1991.

Bruijn H. E.; Kooyman R. P. H.; Greve J. Determination of dielectric permittivity and thickness of a metal layer from a surface plasmon resonance experiment. **Applied Optics**, vol. 29, p. 1974–1978, 1990.

Burgess J. D.; Hawkride F. M. Octadecyl mercaptan sub-monolayers on silver electrodeposited on gold quartz crystal microbalance electrodes**. Langmuir**, vol.13, No 14, p. 3781-3786, 1997.

Camman K. Editorial. **Sensors and Actuators B**, vol. 2, p.7, 1990.

Carvalhal R. F.; Freire R. S.; Kubota L. T. Polycrystaline gold electrodes: A comparative study of pretreatment procedures used for cleaning and thiol self-assembled monolayer formation. **Electroanalysis**, vol. 17, No.14 p. 1254-1259, 2005.

Carvalho A.; Geissler M.; Schmid H.; Micel B.; Delamarche E. Self-Assembled Monolayers of Eicosanethiol on Palladium and Their Use in Microcontact Printing. **Langmuir**, vol. 18, p. 2406-2412, 2002.

Chen J-C; Sadhasivam S.; Lin F-H. Label free gravimetric detection of epidermal growth factor receptor by antibody immobilization on quartz crystal microbalance. **Process Biochemistry**, vol. 46, No 2, p. 543-550, 2011.

Chidsey C. E. D. Free Energy and Temperature Dependence of Electron Transfer at the Metal-Electrolyte Interface**. Science**, vol. 251, p. 919 – 922, 1991.

Chidsey C. E. D.; Bertozzi C. R.; Putvinski T. M.; Mujsce A. M. Coadsortion of ferrocene-terminated and unsubstituted alkanethiols on gold: electroactive self-assembled monolayers. **Journal of the American Chemical society**, v. 112, No 11, p. 4307-4306, 1990.

Clark J. L. C.; Lyons C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academy of Sciences**, vol. 102, p. 29–45, 1962.

Copeland R. A. **Enzymes**, John Wiley & Sons, VCH, New York, USA, 2000.

Creager S. E.; Olsen K. G. Self-assembled monolayers and enzyme electrodes: progress, problems and prospects. **Analytica Chimica Acta**, vol. 307, No 2-3, p. 277-289, 1995.

Damos F. S.; Luz, R. C. S.; Sabino A. A.; Eberli M. N.; Pilli R. A.; Kubota L. T. Adsorption kinetic and properties of self-assembled monolayer based on mono (6-deoxy-6-mercapto)-beta-cyclodextrin molecules. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, vol. 601, p.181-193, 2007.

Damos F. S., Luz R. C. S.; Kubota L. T. Determination of Thickness, Dieletric Constant of Thiol Films, and Kinetics of Adsortion Using Surface Plasmon Resonance. **Langmuir**, vol. 21, p. 602-609, 2005.

Damos F. S.; Mendes R. K.; Kubota L. T. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Quimica Nova**, vol. 27, No. 6, p. 970-979, 2004.

Dannenberger O.; Wolff J. J.; Buck M. Solvent Dependence of the Self-Assembly Process of an Endgroup-Modified Alkanethiol. **Langmuir**, vol. 14, p. 4679-4682, 1998.

den Boer M.; Argaw D.; Jannin J.; Alvar J. Leishmaniasis impact and treatment access. **Clinical Microbiology Infection**, vol. 17, p. 1471–1477, 2011.

Desjeux P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. Comparative Immunology, **Microbiology & Infectious Diseases** , vol. 27, p. 305–318, 2004.

Dimitris K.; Guerreiro A. R.; Martin N.; Chianellaa I., Sreenath S.; Anthony P. F. Turnera S. P. The application of polythiol molecules for protein immobilisation on sensor surfaces. **Biosensors & Bioelectronics**, vol. 25, p. 1049–1055, 2010.

Eggins B. R. **Chemical Sensors and Biosensors**, John Wiley & Sons, West Sussex, England, 2002.

Fenter P.; Eisenberger P.; Li J.; Camillone N.; Bernasek S.; Scoles G.; Ramanarayanan T. A.; Liang, K. S. Structure of octadecyl thiol self-assembled on the silver(111) surface: an incommensurate monolayer. **Langmuir**, vol. 7, p. 2013-2016, 1991.

Freire S. R.; Pessoa A. C.; Kubota L. T.. Emprego de Monocamadas Auto-Organizadas no desenvolvimento de Sensores Eletroquímicos. **Química Nova**, vol. 26, p. 381-389, 2003.

Ferrer L.; Aisa M. J.; Roura X.; Portús M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Record**, vol. 20, p. 136, 1995.

Fujihira M.; Rubinstein I.; Rusling, J. F. Electron transfer. In: Bard, A. J.; Stratmann, M. (Eds.). **Encyclopedia of Electrochemistry**. New York: Wiley-VCH, vol. 10, 2007.

Gamero M.; Pariente F.; Lorenzo E.; et al. Nanostructured rough gold electrodes for the development of lactate oxidase-based biosensors. **Biosensors & Bioelectronics**, vol. 25, No 9, p. 2038-2044, 2010.

Gorman C. B.; Biebuyck H. A.; Whitesides G. M. Control of the Shape of Liquid Lenses on a Modified Gold Surface Using an Applied Electrical Potential across a Self-Assembled Monolayer. **Langmuir**, vol. 11, p. 2242-2246, 1995.

Green R. J.; Frazier R. A.; Shakesheff K. M.; Davies M. C.; Roberts C. J.; Tendler S. J. B. Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. **Biomaterials**, vol. 21, p. 1823-1835, 2000.
Grieshaber D.; Mackenzie R.; J. VO¨ RO¨ S.; Reimhult E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors**, vol. 8, p. 1400-1458, 2008.

Gronow M. Biosensors, Trends Biochemistry. **Science**, vol. 9, No 8, p. 336–340, 1984.

Gunjan D.; Gajjala S.; Malhotra B. D. Recent developments in urea biosensors. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 44, p. 42–52, 2009.

Hardy W. B. The Tension of Composite Fluid Surfaces and the Mechanical Stability of Films of Fluid. **Proc. R. Soc. London A**, vol. 86, p. 610, 1912.

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

Homola J. Eletromagnetic **Theory of Surface Plasmon. In:___. Surface Plasmon Resonance Based Sensors.** 1st ed. Springer-Verlag, New York:, p.3-44, 2006.

Homola J.; Koudela I.; Yee S. S. Surface plasmon resonance sensors based on diffraction gratings and prism couplers: sensitivity comparison **Sensors and Actuators B**, vol. 54, p. 16-24, 1999.

Hong S. C.; Chen H.; Lee J.; Hye-Kyung P.;Young S. K.; Hyun-Chul S.; Cheol-Min K.; Tae J. P; Seok J. L.; Kwangnak K; Hwa-Jung K; Chulhun L. C.; Jaebeom L.Ultrasensitive immunosensing of tuberculosis CFP-10 based on SPR spectroscopy. **Sensors and Actuators B**, vol.156, p. 271–275, 2011.

Hulanicki A.; Geab S.; Ingman P. Chemical Sensors Definitions and Classification. **Pure and Applied Chemistry**, vol. 63, No. 9, p. 1247-1250, 1991.

Imabayashi S.; Hobara D.; Kakiuchi T.; Knoll W. Selective Replacement of Adsorbed Alkanethiols in Phase-Separated Binary Self-Assembled Monolayers by Electrochemical Partial Desorption. **Langmuir**, vol. 13, p. 4502-4504, 1997.

Im J-E.; Han J-A; Kim B. K.; et al. Electrochemical detection of estrogen hormone by immobilized estrogen receptor on Au electrode. **Surface & Coatings Technology**, vol. 205, p. S275-S278, 2010.

Jain K. K. Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics. **Clinica Chimica Acta**, vol. 358, p. 37–54, 2005.

Jing J.; Wang C.; Yi T.; Tan Y.; Yang D., Yin G.; Huihua D.; Bai Y.; Lu H.; Wan Y.; Zuhong L.; Yinghui L. Determination of 3-nitrotyrosine in human urine samples by surface plasmon resonance immunoassay. **Sensors and Actuators B**, vol. 153, p. 164–169, 2011.

Jonhsson B.; Lofas S.; Linquist G. Immobilization of proteins to a carboxymethyldextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. **Analytical Biochemistry**, vol. 198, p. 268 – 277, 1991.

Jung L. W. S., Sung M. C., et al. Characterization of a self-assembled monolayer of thiol on a gold surface and the fabrication of a biosensor chip based on surface plasmon resonance for detecting anti-GAD antibody. **Biosensors & Bioelectronics**, vol. 20, p. 1422–1427, 2005.

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

Kar K. Serodiagnosis of Leishmaniasis . **Critical Reviews in Microbiology** vol. 21 p. 123-152, 1995.

Kavasaki M.; Sato T.; Tanaka T.; Takao K. Rapid self-assembled of alkanethiol monolayers on sputter-grow Au (111). **Langmuir**, vol. 16, No 4, p. 1719-1728, 2000.

Kretschmann E. The determination of the optical constants of metals by excitation of surface plasmons**. Zeitschrift für Physik**, vol. 241, p. 313, 1971.

Kretschmann E., Reather H. Radiative decai of nonradiative surfasse plasmon excited by light. **Z. Naturf**, vol. 23A, p. 2135-2136, 1968.

Kristian H. S.; Cloninger M. J. Inhibition binding studies of glycodendrimer/lectin interactions using surface plasmon resonance. **Tetrahedron**, vol. 66, p. 5305-5310, 2010.

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

Kyprianou D.; Guerreiro A. R.; Nirschl M.; Chianella I.; Subrahmanyam S.; Turner A. P. F.; Piletsky S. The application of polythiol molecules for protein immobilisation on sensor surfaces. **Biosensors & Bioelectronics**, vol. 25, p. 1049–1055, 2010.

Laibinis P. E.; Whitesides G. M.; Allara D. L.; Tao Y. T.; Parikh, A. N.; Nuzzo, R. G. Comparison of the structures and wetting properties of self-assembled monolayers of n-alkanethiols on the coinage metal surfaces, copper, silver, and gold. **Journal of the American Chemical society**, vol. 113, p. 7152, 1991.

Langmuir I. The mechanism of the surface phenomena of flotation. **Transactions of the Faraday Society**, vol. 15, p. 62-74, 1920.

Langmuir I. The Constitution and Fundamental Properties of Solids and Liquids. **Journal American Chemical Society**. vol. 39, p. 1848, 1917.

Liedberg B.; Lundstrom I.; Stenberg E. Principles of biosensing with an extended coupling matrix and surface plasmon resonance. **Sensors and Actuators B**, vol. 11, p. 36-72, 1993.

Li B., Zeng C. G.; Li Q. X.; Wang B.; Yuan L. F.; Wang H. Q.; Yang J. L.; Hou J. G.; Zhu Q. S.; First-Principles Simulation of Scanning Tunneling Microscopy Images of Individual Molecules in Alkanethiol Self-Assembled Monolayers on Au(111). **The Journal of Physical Chemistry B**, vol. 107, p. 972 - 984, 2003.

Li H. L.; Perkas N.; Li Q. L.; Gofer Y.; Koltypin Y.; Gedanken A. Improved Silanization Modification of a Silica Surface and Its Application to the Preparation of a Silica-Supported Polyoxometalate Catalyst. **Langmuir**, vol 19, p. 10409, 2003.

Li Z.; Chang S-C.; Williams R. S. Self-Assembly of Alkanethiol Molecules onto Platinum and Platinum Oxide Surfaces. **Langmuir**, vol. 19, p.6744-6749, 2003.

Liu J. T.; Chen C. J.; Ikoma T.; Yoshioka T.; Cross J. S.; Chang S-J; Tsai J-Z; Tanaka J. Surface plasmon resonance biosensor with high anti-fouling ability for the detection of cardiac marker troponin T. **Analytica Chimica Acta**, vol. 703, p. 80-86, 2011.

Löfas S.; Whirter M. Immobilization techniques. In:___. Surface Plasmon Resonance Based **Sensors**. 1st ed. New York: Springer-Verlag, p. 3-44, 2006.

Love J. C.; Estroff L. A.; Kriebel J. K.; Nuzzo R. G.; Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. **Chemical Reviews**, No 105, p. 1103 – 1169. 2005.

Love J. C.; Wolfe D. B.; Haasch R.; Chabinyc M. L.; Paul K. E.; Whitesides G. M.; Nuzzo, R. G. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers of Alkanethiolates on Palladium. **Journal of the American Chemical society**, vol. 125, p. 2597-2609, 2003.

Lowry O. H.; Rosebrough N. J.; Farr A. L.; Randal A. J.; Protein measurement with folinphenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 193, p. 265-75, 1951.

Lukes J.; Mauricio I. L.; Schonian G.; et al. Evolutionary and geographical history of the Leishmania donovani complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, vol. 104, p. 9375–9380, 2007.

Mancianti F.; Falcone M. L.; Giannelli C.; Poli A. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble Leishmania infantum antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology,** vol.59, p.13-21, 1995.

Mattoussi H.; Medintz I. L.; Clapp A. R.; Goldman E. R.; Jaiswal J. K.; Simon S. M.; Mauro J. M. Luminescent quantum dot-bioconjugates in immunoassays, FRET, biosensing, and imaging applications. **J.A.L.A**. vol. 9, p. 28–32, 2004.

Mullen K.; Rabe J. P.; Nanographenes as Active Components of Single-Molecule Electronics and How a Scanning Tunneling Microscope Puts Them To Work. **Accounts of Chemical Research**, vol. 41, p. 511 – 520, 2008.

Munakata H.; Oyamatsu D.; Kuwabata S. Effects of ω-Functional Groups on pH-Dependent Reductive Desorption of Alkanethiol Self-Assembled Monolayers. **Langmuir**, vol. 20, p. 10123-10128, 2004.

Murray H. W.; Berman J. D.; Davies C. R.; et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, vol. 366, p. 1561–1577, 2005.

Muskal N.; Turyan I.; Mandler D.; Muskal N.; Turyan I.; Mandler D. Self-assembled monolayers on mercury surfaces. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, vol. 409, p. 131-136, 1996.

Niina J. R.; Brian H. H.; Heineman R. W. Electrochemical biosensors. **Chemical Society**, vol. 39, p. 1747-1763, 2010.

Nuzzo, R. G.; Allara, D. L. Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces. **Journal of the American Chemical Society**, vol. 105, p. 4481-4483, 1983.

Oliveira C. D.; Assunção R. M.; Reis I. A.; Proietti F. A. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, vol. 17, p. 1231-1239, 2001.

Otto A. Excitation of nonradiative surfasse plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection**. Zeitschrift für Physik**, vol. 216, p. 398-410, 1968.

Periasamy A. P.; Umasankar Y.; Chen S. M. Nanomaterials—acetylcholinesterase enzyme matrices for organophosphorus pesticides electrochemical sensors: A Review. **Sensors**, vol. 9, p. 4034–4055, 2009.

Peterlinz K. A.; Georgiadis R. In Situ Kinetics of Self-Assembly by Surface Plasmon Resonance Spectroscopy. **Langmuir**, vol. 12, p. 4731-4740, 1996.

Petty M. C. **Langmuir-Blodgett Films – An Introduction**, Cambridge University, Press: Cambridge, 1996.

Pockels A. On the Spreading of Oil upon Water. **Nature**, vol. 50, p. 223, 1894.

Pockels A. Relations Between the Surface-Tension and Relative Contamination of Water Surfaces. **Nature**, vol. 48, p. 152, 1893.

Pockels A. On the Relative Contamination of the Water-Surface by Equal Quantities of Different Substances. Editorial. **Nature**, vol. 46, p. 418, 1892.

Pockels A.“Surface tension”. **Nature**, vol. 43, p. 437, 1891.

Porter M. D.; Walczak M. M.; Chung C.; Stole S. M.; Widrig, C. A.;. Structure and interfacial properties of spontaneously adsorbed n-alkanethiolate monolayers on evaporated silver surfaces**. Journal of the American Chemical society**, vol. 113, p. 2370-2378, 1991.

Porter, M. D.; Bright, T. B.; Allara, D. L.; Chidsey C. E. D. Spontaneously organized molecular assemblies. 4. Structural characterization of n-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared spectroscopy, and electrochemistry. **Journal of the American Chemical Society**, vol. 109, p. 3559-3568, 1987.

Rayleigh L. “Investigations in capillarity.” **Philosophical Magazine**, vol. 48, p. 321, 1899.

Reis A. B.; Martins-Filho O. A.; Teixeira-Carvalho A.; Carvalho M. G.; Mayrink W.; França-Silva J. C.; Giunchetti R. C.; Genaro O.; Corrêa-Oliveira R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, vol. 81, p. 68-75, 2006.

Ronkainen-Matsuno N. J.; Thomas J. H.; Halsall H. B.; Heineman W. R.; TrAC, Trends. **Analytical Chemistry**, vol. 21, No 4, p. 213, 2002.

Rosário E. Y.; Genaro O.; Franca-Silva J. C.; da Costa R. T.; Mayrink W.; Reis A B.; Carneiro M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude Leishmania and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 100, p.197-203, 1995.

Saadia L.; Hamid S.; Amale N.; Abdelkebir R. Western blot analisys of Leishamin infantum using sera from pentamidine-treated dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology** vol. 91, p. 13-18, 2003.

Salata O. V. Applications of nanoparticles in biology and medicine. **Nanobiotechnology**, vol. 2, p. 3–7, 2004.

Salmain M.; Ghasemi M.; Boujday S.; et al. Piezoelectric immunosensor for direct and rapid detection of staphylococcal enterotoxin A (SEA) at the ng level. **Biosensors & Bioelectronics**, vol. 29, p. 140-144, 2011.

Schreiber F. Structure and growth of self-assembling monolayers. **Progress in Surface Science**, vol. 65, p. 151-256, 2000.

Schneider T. W.; Buttry D. A. **Journal of the American Chemical Society**, vol. 115, p. 12391, 1993.

Smith R. K.; Lewis P. A.; Weiss P. S. Patterning self-assembled monolayers. **Progress Surface Science**, vol. 75, p.1, 2004.

Sullivan T. P.; Huck W. T. S. You have full text access to this content Reactions on Monolayers: Organic Synthesis in Two Dimensions. **European Journal of Organic Chemistry,** vol. 2003, p. 17-29, 2003.

Sun L.; Crooks R. M. Imaging of Defects Contained within n-Alkylthiol Monolayers by Combination of Underpotential Deposition and Scanning Tunneling Microscopy: Kinetics of Self-Assembly. **Jouranl of the Electrochemical Society**, vol. 138, p. L23 – L25, 1991.

Sunita K.; Kavita S.; Rakhee G.; Aruna S.; Vinod J. Surface plasmon resonance based immunosensor for serological diagnosis of dengue virus infection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol. 52, p 255–259, 2010.

Sutawan B.; Cheeraporn A.; Paisarn S.; et al. Detection of the shrimp pathogenic bacteria, Vibrio harveyi, by a quartz crystal microbalance-specific antibody based sensor . **Sensors and Actuators B-Chemical**, vol. 145, No 1, p. 259-264, 2010.

Teixeira Neto R. G.; Giunchetti R. C.; Carneiro C. M.; Vitor R. W.; Coura-Vital W.; Quaresma P. F.; Ker H. G.; de Melo L. A.; Gontijo C. M.; Reis A. B. Relationship of Leishmania-specific IgG levels and IgG avidity with parasite density and clinical signs in canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, vol. 11 p. 248-57, 2010.

Terrill R. H.; Tanzer T. A.; Bohn P. W. Structural Evolution of Hexadecanethiol Monolayers on Gold during Assembly: Substrate and Concentration Dependence of Monolayer Structure and Crystallinity. **Langmuir**, vol. 14, p. 845-854, 1998.

Thévenot D. R.; Toth K.; Durst R. A.; Wilson G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors & Bioelectronics**, vol. 16, p. 121-131, 2001.

Torrelles X.; Vericat C.; Vela M. E.; Fonticelli M. H.; Millone M. A. D.; Felici R.; Lee T-L., Zegenhagen J.; Munoz G.; Martin-Gago J. A.; Salvarezza R. C. Two-Site Adsorption Model for the ($\sqrt{3} \times \sqrt{3}$)-R30° Dodecanethiolate Lattice on Au(111) Surfaces. **The Journal of Physical Chemistry B**, vol. 110, p. 5586 – 5594, 2006.

Troughton E. B.; Bain C. D.; Whitesides G. M.; Nuzzo R. G.; Allara D. L.; Porter M. D. Monolayer films prepared by the spontaneous self-assembly of symmetrical and unsymmetrical dialkyl sulfides from solution onto gold substrates: structure, properties, and reactivity of constituent functional groups. **Langmuir**, vol. 4, p. 365, 1988.

Venugopal M.; Arya S. K.; Chornokur G.; et al. A realtime and continuous assessment of cortisol in ISF using electrochemical impedance spectroscopy. **Sensors and Actuators A-Physical**, vol. 172, No 1, p. 154-160, 2011.

Vlasov Y. U.; Ermolenko Y. U. E.; Legin A. V.; Rudnitskaya A. M.; Kolodnikov V. V. Chemical sensors and their systems. **Journal of Analytical Chemistry**, vol. 65, No. 9, p. 880–898, 2010.

Vlasov Y. U;. Zhurn G. **Journal of Analytical Chemistry**, vol. 47, No. 1, p. 114, 1992.

Wang J.; Xu H.; Zhang J.; Li G. Electrochemical sensors for clinic analysis. **Sensors**, vol. 8, p. 2043–2081, 2008.

Wang J. **Analytical Electrochemistry**, John Wiley & Sons VCH, 3 st ed. Hoboken, New Jersey, USA, 2006.

Wang J.; Zeng B.; Fang C., Zhou X. Electrochemical characteristic of 2-mercaptobenzothioazole self-assembled monolayer on gold. **Analytical Science**, vol. 16, No 5, p. 457-461, 2000.

Weeishaar D. E., Walczak M. M., Porter M. D. Electrochemically induced transformations of monolayers formed by self-assembly of mercaptoethanol at gold. **Langmuir**, vol. 9, p. 323-329, 1993.

Wood R. W. On a Remarkable case of uneven distribuition of light in a diffraction grating spectrum. **Philosophical Magazine**, vol. 4, p. 396-402, 1902.

World Health Organization. Control of the leishmaniases. Report of a WHO expert committee. **World Health Organization Tech Rep Ser**, vol. 949, p. 1–186, 2010.

Xia B.; Li S. J.; Xiao J.; Guo D. J., Wang J.; Pan Y.; You X. Z. A Simple Method for Covalent Immobilization of Proteins on Porous Silicon Surfaces. **Chemistry Letters**, vol. 34, p. 226-227, 2005.

Yalow R. S.; Berson S. A. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. **Nature**, vol. 184, p. 1648–1649, 1959.

Yamada R.; Sakai H.; Uosaki K. Solvent Effect on the Structure of the Self-Assembled Monolayer of Alkanethiol. **Chemistry Letters**, vol. 28, p. 667-668, 1999.

Yang L. J.; Li Y. B.; Gisela F. Interdigitated Array Microelectrode-Based Electrochemical Impedance Immunosensor for Detection of Escherichia coli O157:H7. **Analytical Chemistry**, vol.76, p. 1107-1113, 2004.

Yang G.; Liu G-Y. New Insights for Self-Assembled Monolayers of Organothiols on Au(111) Revealed by Scanning Tunneling Microscopy. **The Journal of Physical Chemistry B**, vol. 107, p. 8746 – 8759, 2003.