

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

**Desenvolvimento de Imunossensor Eletroquímico para
Detecção do Antígeno Prostático Específico (PSA)
Empregando Eletrodo de Ouro**

Ariele Milet do Amaral Mercês

Orientador: Profº. Dr. José Luiz de Lima Filho

Co-Orientadora: Profª. Dra. Rosa Fireman Dutra

Recife/2008

Ariele Milet do Amaral Mercês

**Desenvolvimento de Imunossensor Eletroquímico para
Detecção do Antígeno Prostático Específico (PSA)
Empregando Eletrodo de Ouro**

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela Universidade
Federal de Pernambuco.

Aprovado por distinção

Data: 27/02/2008

Mercês, Ariele Milet do Amaral.

Desenvolvimento de Imunossensor Eletroquímico para detecção do Antígeno Prostático Específico (PSA) empregando eletrodo de ouro / Ariele Milet do Amaral Mercês . – Recife: O Autor, 2008.

79 folhas. il.,fig., tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Bioquímica e Fisiologia.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Imunossensor. 2. Antígeno Prostático Específico (PSA). 3. Monocamadas auto organizadas. 4. Proteína A. I. Título.

**577.1
572**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
CCB – 2008-70**

Ata da defesa de dissertação da Mestranda **Ariele Milet do Amaral Mercês**, realizada em 27 de fevereiro de 2008, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia da UFPE.

Às 14:20 horas, do dia vinte e sete de fevereiro de 2008, foi aberto, no Auditório Marciolino Lins – Depto. de Bioquímica, do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, o ato de defesa de dissertação da mestranda **Ariele Milet do Amaral Mercês**, aluna do Curso de Mestrado em Bioquímica e Fisiologia/CCB/UFPE. Iniciando os trabalhos o Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, fez a apresentação da aluna, de seu orientador, ele próprio, da co-orientadora profa. Dra. Rosa Fireman Dutra, bem como da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: José Luis de Lima Filho, na qualidade de Presidente, Luis Bezerra de Carvalho Junior e Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão, ambos do Depto. de Bioquímica/CCB/UFPE e Maria de Mascena Dinis Maia, do Depto. de Biologia/UFRPE. Após as apresentações, o Prof. Dr. José de Lima Filho convidou a aluna para a apresentação de sua dissertação intitulada: **“Desenvolvimento de Imunossensor Eletroquímico para Detecção do Antígeno Prostático Específico (PSA) Empregando Eletrodo de Ouro”**, e informou que de acordo com o Regimento Interno do Curso, o candidato dispõe de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pelo aluno para responder às perguntas será de 30 (trinta) minutos. A aluna procedeu à explanação e comentários acerca do tema em **30 (trinta) minutos**. Após a apresentação da mestranda, o Sr. Presidente convidou a Banca Examinadora para ocupar seus lugares e passou a palavra ao primeiro examinador, Profa. Dra. Maria de Mascena Dinis Maia que agradeceu o convite, fez alguns comentários e sugestões, e iniciou sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Em seguida, o Sr. Presidente passou a palavra para o Prof. Dr. Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão, que agradeceu o convite, fez alguns comentários e sugestões, e iniciou sua arguição. Ao final, o referido professor deu-se por satisfeito. Logo após, o Sr. Presidente passou a palavra para o Prof. Dr. Luis Bezerra de Carvalho Junior, que agradeceu ao convite, fez alguns comentários e sugestões, iniciando sua arguição. Ao final, o referido professor deu-se por satisfeito. Em seguida, o Sr. Presidente, na qualidade de orientador, usou da palavra para tecer alguns comentários a respeito do trabalho da aluna, agradecer à Banca Examinadora e parabenizar a candidata. Finalmente, a sessão foi suspensa para proceder ao julgamento pela Banca Examinadora, a qual se reuniu na Secretaria do Curso. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção **“Aprovada com Distinção”**. Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros da Banca Examinadora. Recife, 27 de fevereiro de 2008.

[Assinaturas manuscritas]
Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão
José Luiz de Lima Filho

***“Paciência e perseverança têm o efeito mágico
de fazer as dificuldades desaparecerem e
os obstáculos sumirem”.***

John Quincy Adams

DEDICATÓRIA

*Dedico esta minha conquista aos meus pais,
Antonio Mercês e Lucinda Mercês pelo amor
e carinho prestados. E a meu eterno amor
Daniel pelo carinho, apoio e companheirismo.*

AGRADECIMENTOS

Em especial a **Deus** que até este exato momento tem me dado força e saúde para continuar a caminhada.

Aos meus pais, **Antonio e Lucinda Mercês**, pelo verdadeiro amor, dedicação, e, principalmente por todas as oportunidades a mim oferecidas.

Ao meu eterno amor **Daniel**, pela confiança, apoio e pelo carinho compartilhado ao longo desses anos.

Aos meus queridos irmãos **Alice, Anizabele, Lucas**, pelos momentos de descontração e carinho compartilhado e ao meu cunhado **Marcelo** pela paciência e atenção.

Ao Diretor do LIKA, Prof. Dr. **José Luiz de Lima Filho** pelo apoio e orientação concedida.

À Profa. Dra. e co-orientadora **Rosa Amália Fireman Dutra** pela amizade, contribuição científica, dedicação, paciência e pelos muitos momentos de descontração tornando o laboratório um ambiente mais prazeroso.

Às amigas, **Alessandra Mattos, Tatianny Freitas, Ana Carolina e Amanda Fidelis**, pela grande contribuição para conclusão deste trabalho e pelos momentos de amizade compartilhados.

Aos amigos do Laped, **Mízia, Igor, Bárbara, Manuelle, Rosana e Sérgio**, pelos momentos de amizade e descontração no laboratório.

Aos meus queridos amigos do mestrado, em especial **Roberto Afonso e Diego Buarque**, pelo companheirismo e pela amizade cultivada ao longo deste tempo.

Aos **professores e funcionários** do Mestrado em Bioquímica e Fisiologia que contribuíram para a minha formação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - **CAPES**, pelo apoio financeiro.

INDICE ANALÍTICO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	II
LISTA DE ABREVIATURAS	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Antígeno prostático específico (PSA)	13
2.2 Imunoensaios	16
2.3 Biossensores, definição	18
2.4 Transdutores	19
2.5 Transdutores eletroquímicos	20
2.6 Imunossensores Amperométricos	22
2.7 Imobilização de Compostos Biológicos	24
2.8 Monocamadas Auto-Organizadas	27
3 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo Geral	30
3.2 Objetivos Específicos	30
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
5 CAPÍTULO I	42
6 CONCLUSÕES	69
7 ANEXOS	70

LISTA DE FIGURAS

1. INTRODUÇÃO	11
Figura 1. Desenho esquemático de um imunoensaio competitivo.	16
Figura 2. Desenho esquemático de um imunoensaio não competitivo tipo sanduíche.	17
Figura 3. Desenho Esquemático de um biossensor.	18
Figura 4. Produção científica relacionada aos diferentes transdutores usados em biossensores de 1980 a 2006.	20
Figura 5. Representação esquemática dos processos de imobilização de biomoléculas.	25
5. CAPÍTULO 1	

Captions for Figures

Figure 1. Schematic representation of the oriented anti-PSA immobilization and blocking of non-specific binding.	58
Figure 2. CV of anti-PSA immobilization on gold electrode surface by protein A (black line) and without protein A (red line).	59
Figure 3. Relative response of absorbance of the effect of CYS concentration in relation to amount of immobilized anti-PSA.	60
Figure 4. Results of different GA concentration (% , v/v) in relation to immunoreaction with PSA antigen.	61
Figure 5. Influence of the pH on the response of the immunosensor incubated with 10 ng/mL PSA in 50µL of H ₂ O ₂ (40 mM) and 50 µL ABTS solution.	62
Figure 6. The influence of temperature on the current peak response on the immunosensor.	63
Figure 7. Studies with anti-PSA electrode immersed in 20µL PSA solution with different incubation time (2, 4, 6, 10, 20 and 30 min). Voltammograms showing anodic peaks on response to different incubation time (a). Exponential curve of the anodic peaks with saturation at 20 min (b).	64
Figure 8. Relative response of PSA immunosensor in relation to different concentration of immobilized anti-PSA on the protein A oriented on gold electrode functionalized by SAM.	65
Figure 9. Cyclic voltammograms of the immunosensor at different scan rates (from a to i): 5, 10, 12.5, 25, 50, 75, 100, 125 and 150 mV/s measured in 0.1M PBS solution (pH 7,2).	66
Figure10. The effect of the concentration of H ₂ O ₂ on the amperometrical response.	67
Figure 11. Linear fit of calibration curve obtained from CV of immunosensor for PSA varying the potential from -1.2 to 1.2 at scan rate of 100mV/s.	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Possíveis causas de alteração dos níveis séricos de PSA.

14

LISTA DE ABREVIATURAS

PSA => Antígeno Prostático Específico

HRP => Horseradish Peroxidase

RIA => Radioimunoensaio

ELISA => Imunoensaio Enzimático

CLIA => Imunoensaio Quimioluminescente

SAM => Self Assembled Monolayers

LPSA => Antígeno Prostático Específico Livre

PSA-ACT => Antígeno Prostático Específico complexado α -1 Antiquimotripsina

TPSA => Antígeno Prostático Específico Total

Ag => Antígeno

Ac => Anticorpo

ABTS => 2,2 azino-bis-C3-ethylbenzthiazoline sulfonato

RESUMO

O Antígeno Prostático Específico (PSA) é um valioso biomarcador de rastreamento do câncer de próstata. Para determinação do PSA, os imunossensores emergem como uma técnica muito atraente devido à sua simplicidade, especificidade e menor tempo de análise, quando comparada com técnicas convencionais de imunoensaios. Um imunossensor empregando eletrodo de ouro foi usado, em um sistema eletroquímico, para determinação do PSA. O anticorpo monoclonal (anti-PSA) foi orientado na superfície do eletrodo de ouro via proteína A, usada para uma melhor orientação dos anticorpos em Monocamadas Auto-Organizadas, que foram formadas através da incubação do eletrodo numa solução de 2-aminoetanotiol (25mM) seguida por glutaraldeído 2.5% (v/v) durante 45min. A quantidade de anti-PSA imobilizada no eletrodo de ouro, modificado por SAM de tióis, utilizando a proteína A foi 27% maior que o controle (sem proteína A). Parâmetros ótimos foram estabelecidos para um bom desempenho do imunossensor: tempo de incubação (20min) e pH (7.0 - 7.5). A curva de calibração alcançou uma linearidade ($r = 0,997$, $p < 0,0001$) e boa reprodutibilidade com erro relativo inferior a 5%, quando o antígeno PSA foi incubado variando as concentrações de 1,0 a 15 ng / mL a 25°C. Os resultados obtidos foram satisfatórios provando a viabilidade do desenvolvimento de imunossensores para a determinação do PSA.

Palavras chaves: imunossensor, PSA, Monocamadas Auto-Organizadas, proteína A.

ABSTRACT

Prostatic Specific Antigen (PSA) is a valuable biomarker for prostate cancer screening. For PSA determination, the immunosensors emerge as a very attractive technique due to its simplicity, specificity and less time for analysis when compared to conventional techniques of immunoassays. An immunosensor based on a gold electrode was used in an electrochemical system for the determination of PSA. The monoclonal antibody against PSA (Anti-PSA) was oriented on the gold electrode surface via protein A, used for a better orientation of the antibodies in the SAM (Self-Assembled Monolayers), that were formed incubating the electrode in a solution of 2-aminoethanethiol (25mM) followed by glutaraldehyde 2.5% (v/v) for 45min. The amount of anti-PSA immobilized on the gold electrode, modified by SAM of thiol, using protein A was 27% higher than control (without protein A). Optimal parameters were established to a good performance of immunosensors: incubation time (20min) and pH (7.0 – 7.5). The calibration curve achieved linearity ($r=0.997$, $p<0,0001$) and good reproducibility with relative error less than 5% when the PSA antigen was incubated at concentrations varying from 1.0 to 15 ng/mL at 25°C. The results obtained were satisfactory proving the viability on the immunosensors development to determination of PSA.

Keywords: immunosensor; PSA, SAM, protein A.

1. INTRODUÇÃO

O câncer de próstata representa um sério problema de saúde pública no Brasil, em função de suas altas taxas de incidência e mortalidade. O número de casos novos de câncer de próstata estimados para o Brasil no ano de 2008 é de 49.530. Estes valores correspondem a um risco estimado de 52 casos novos a cada 100 mil homens e cerca de 6.850 mortes. Em termos de valores absolutos, o câncer de próstata é o sexto tipo de câncer mais comum no mundo, representando cerca de 10% do total de câncer (INCA, 2008).

O aumento nas taxas de incidência do câncer de próstata pode ser parcialmente justificado pela melhoria na qualidade dos sistemas de informação do país, pelo aumento na expectativa de vida do brasileiro e especialmente pelo rastreamento comum através do teste Antígeno Prostático Específico (PSA - do inglês “*Prostatic Specific Antigen*”) em determinadas regiões (INCA, 2008). A Sociedade Americana de Urologia e o Ministério da Saúde brasileiro recomendam atualmente que todos os homens de 50 anos de idade ou mais devam fazer o teste do PSA e toque retal anualmente. A mesma recomendação existe para os homens entre 40 e 49 anos que sejam negros ou tenham história familiar de câncer de próstata e, portanto, considerados de maior risco para doença maligna da próstata (ZHANG, DU & LI, 2007).

Atualmente, para determinação do PSA são empregados imunoensaios quantitativos como radioimunoensaios (RIA), imunoensaio enzimático (ELISA) e imunoensaio quimioluminescente (CLIA) baseados na reação entre antígenos e anticorpos específicos (PANINI et al., 2008). Apesar de serem técnicas sensíveis e convencionalmente empregadas, envolvem presença de pessoal qualificado, demandam tempo e alto custo (ZHANG et al., 2007). Uma das alternativas é o emprego de imunossensores que são baseados na reação imunológica, sendo que o antígeno ou

anticorpo é imobilizado na superfície sensora, com o objetivo de detectar seletivamente a concentração ou atividade do produto de interesse (YUAN, CHAI & TANG, 2007).

Dentre os diversos tipos de transdutores, o mais promissor para o desenvolvimento de um imunossensor é o eletroquímico (PAM et. al., 2007). Imunossensores eletroquímicos combinam a especificidade da reação antígeno-anticorpo e a sensibilidade do transdutor com uma instrumentação barata e possível reuso (ZHOU et. al., 2002).

Um dos desafios para a construção desses sensores é a etapa da imobilização das biomoléculas sobre superfícies condutoras (WU et al., 2007; CHEN et al., 2003). O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar resultados confiáveis, possível reutilização da superfície sensora de modo a reduzir os custos e aumentar a estabilidade (FATIBELLO-FILHO & VIEIRA, 2002; KRAJEWSKA, 2004). Uma alternativa que tem sido muito usada nas últimas décadas envolve a imobilização por formação de monocamadas auto-organizadas (SAM do inglês “Self-Assembled Monolayers”) (THAVARUNGKUL et al., 2007).

O uso das SAMs oferece uma alta organização e orientação das biomoléculas, assegurando um comportamento homogêneo em toda a superfície do suporte, contribuindo para a obtenção de imunossensores com maior sensibilidade e reprodutibilidade (THEBAULT et al., 2008; YANG & WANG, 2008.).

Neste trabalho foi desenvolvido um imunossensor eletroquímico baseado na imobilização via SAM para determinação de PSA, destacando o emprego do ouro como material eletródico. O imunossensor irá fornecer condições para um rastreamento mais efetivo, permitindo uma melhor qualidade de vida e sobrevida global dos pacientes com câncer de próstata.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Antígeno prostático específico (PSA)

O PSA é uma serino-protease glicoproteica (CAO et al., 2006) produzida por células da glândula prostática, que está presente em altas concentrações no sêmen normal (KNOLL, VOGEL & NIESSEN, 2002). Sua função biológica é dissolver os coágulos seminais para aumentar a motilidade do espermatozóide e permitir a fertilização (STURGEON & ELLIS, 2007). O PSA foi descoberto como um componente do tecido prostático saudável em 1970 e como parte do líquido seminal em 1971. Em 1986, o teste de PSA se tornou clinicamente disponível para diagnóstico e seguimento do câncer prostático (BARATA, SOUTO & BERGER, 2006; SCHRÖDER, et al., 2008).

Devido a sua alta especificidade pelo tecido prostático, o PSA tem sido identificado com o marcador tumoral mais importante e acurado para o rastreamento e diagnóstico precoce do câncer de próstata e monitoramento da recorrência da doença depois do tratamento (BARATA, SOUTO & BERGER, 2006). Uma pequena quantidade dessa substância está presente no soro, aparecendo em diferentes formas, principalmente PSA livre (LPSA) e o PSA complexado a α -1-antitripsina (PSA-ACT) (LILJA et al., 1991). O PSA total (TPSA) refere-se a soma do LPSA e do complexo PSA-ACT no soro. A meia vida do TPSA imunoreativo é semelhante à meia vida da fração complexada à ACT (PSA-ACT), em torno de 2 a 3 dias na circulação (SOUTO et al., 2004). Esta lenta eliminação deve-se ao tamanho da molécula. Já a fração livre do PSA no soro tem meia vida de menos de 2 horas, compatível com filtração glomerular ou possível eliminação via formação de complexo com a alfa-2-macroglobulina, em vista do encapsulamento do PSA por esta globulina, com perda de

seus epítomos (BELLDEGRUN,1998). Em estudos recentes BALKY, KO & BUBLEY (2003) demonstraram que a determinação dos valores da relação de PSA livre/PSA total melhora o poder discriminativo entre as formas benignas e malignas de tumores prostáticos.

O nível de TPSA aumenta significativamente no soro durante o câncer de próstata (CONSTANTINO & FENELEY, 2006), sendo a concentração do TPSA no homem saudável entre 0.5- 4.0 ng/mL, valores compreendidos entre 4.0- 10.0 ng/mL encontra-se em uma faixa conhecida como zona cinzenta do diagnóstico. Mais de 80% dos homens que apresentam PSA alto encontram-se nessa zona, destes aproximadamente 2/3 quando investigados pela biópsia da próstata apresentam condições benignas (DE VITA JR, 2001). Níveis maiores que 10ng/mL estão relacionados a manifestações tumorais na próstata. Níveis elevados de PSA também podem ser observados em diversas patologias prostáticas e em situações distintas (Tabela 1) (CHODAK & WARREN, 2006).

Tabela 1. Possíveis causas de alteração dos níveis séricos de PSA.

<i>Comprovadas</i>	<i>Discutidas</i>
Câncer de Próstata	Toques retais
Hiperplasia Benigna	Ejaculação
Prostatites	Exercícios (ciclismo)
Isquemias, infartos prostáticos	Neoplasia prostática intraparietal (PIN)
Manipulação (biópsias prostáticas, ressecções transuretrais, citoscopias)	
Uso de medicações	

Fonte: Souto et al., 2004.

Baixas concentrações de PSA no soro (tipicamente $< 1.0 \mu\text{g/L}$) são encontradas em jovens (< 40 anos), mas aumentam gradualmente com a idade, refletindo em um aumento gradual do tamanho da próstata normal (STURGEON & ELLIS, 2007). O maior fator de risco para o desenvolvimento de neoplasia maligna de próstata é a idade, explicado através do processo geral de carcinogênese, devido a uma maior exposição a chance de alterações somáticas das células prostáticas. Outro fator de risco seria a história familiar de pai ou irmão com câncer da próstata antes dos 60 anos de idade, que pode aumentar o risco de câncer em 3 a 10 vezes em relação à população em geral (DE VITTA JR. et al., 2001). A influência que a dieta pode exercer sobre a gênese do câncer ainda é incerta, não sendo conhecidos os exatos componentes ou através de quais mecanismos estes poderiam estar influenciando o desenvolvimento do câncer da próstata. Contudo, já está comprovado que uma dieta rica em frutas, verduras, legumes, grãos e cereais integrais, menos gordura, principalmente as de origem animal, não só pode ajudar a diminuir o risco de câncer, como também o de outras doenças crônicas não transmissíveis (ZELMANOWICZ, 2008).

Não há valor de PSA que permita ao médico diagnosticar o câncer de próstata, mas um nível sérico maior que 10 ng/mL é sugestivo da doença na ordem de 55% (DANTAS, 2008). As elevações que são causadas por aumento benigno da próstata, prostatite, manipulação urológica ou trauma prostático são quase sempre abaixo de 20 ng/mL . As leituras de PSA não têm limite superior e podem chegar a 10.000 ng/mL ou mais. Em geral, um valor de PSA de 100 ng/mL é, com grande probabilidade, um sinal de câncer de próstata metastático (BALKY, KO & BUBLEY, 2003). Um nível normal de PSA não exclui o diagnóstico de câncer de próstata. Nesses casos a carga tumoral pode ser muito pequena para produzir evidências bioquímicas da existência de câncer. Em raras ocasiões, um grande tumor maligno pode também estar acompanhado por um

PSA baixo, relato de menos de 10% casos. Nesses casos, a população celular do tumor pode ser tão indiferenciada que não é capaz de sintetizar a molécula complexa de PSA (CATALONA et al., 1996).

2.2 Imunoensaios

Nos últimos 30 anos diversos imunoensaios quantitativos têm sido explorados para fins analíticos no diagnóstico clínico (ZHANG, DU & LI, 2007). Imunoensaios são baseados na habilidade dos anticorpos formarem complexos seletivos com seus correspondentes antígenos (PANINI et al., 2008).

Dentre os diversos formatos de imunoensaios, os denominados competitivos e não competitivos (sanduíche) têm sido os mais aplicados. O ensaio competitivo pode ocorrer de duas maneiras: o antígeno imobilizado e o antígeno livre (Ag) competem pela ligação de uma quantidade limitada de anticorpos marcados (Figura 1a) ou a competição pode ocorrer entre Ag marcado (Ag*) e Ag não marcado pelo sítio de ligação do anticorpo imobilizado (Figura 1b). Após a competição pela quantidade restrita de Ac, o excesso de reagente é eliminado por lavagens sucessivas e o complexo formado é medido através do agente empregado como marcador. Neste ensaio imunoquímico, a grandeza de medida é inversamente proporcional à concentração de antígeno livre (PEREIRA, SANTOS & KUBOTA, 2002).

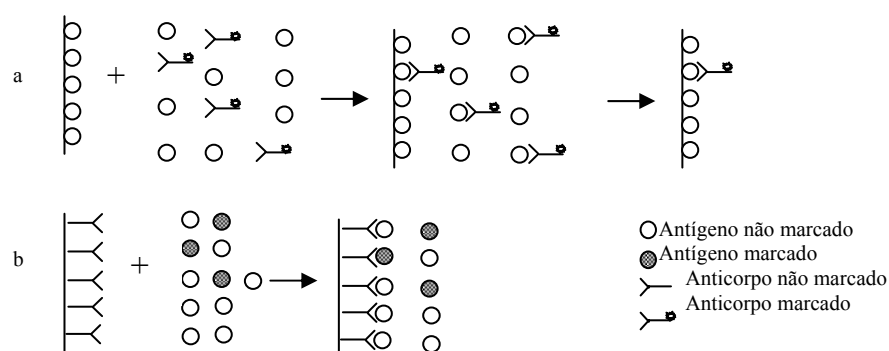


Figura 1. Desenho esquemático de um imunoensaio competitivo.

Um exemplo de imunoensaio não competitivo é o ensaio tipo sanduíche (Figura. 2), onde os anticorpos são imobilizados e após adição da amostra que contém antígenos, um anticorpo secundário marcado é adicionado. Este ensaio proporciona, teoricamente, uma alta sensibilidade e especificidade, uma resposta linear para um intervalo de concentração considerável e um curto tempo de reação comparando-se com o ensaio competitivo (PORSTMANN & KIESSING, 1996).

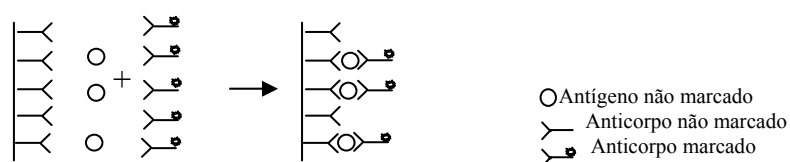


Figura 2. Desenho esquemático de um imunoensaio não competitivo tipo sanduíche.

Alguns imunoensaios para PSA têm sido utilizados, tais como microscopia fluorescente, imunocromatografia, “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay” (ELISA), radioimunoensaio (RIA). No entanto, esses testes requerem pessoal qualificado, envolvem procedimentos complicados, implicam em diversas etapas bioquímicas, demandam tempo, consomem reagentes e usam equipamentos relativamente caros (GILL et al., 2006).

Idealmente, um método para detecção da imuno-interação deve ter uma resposta rápida, uma alta especificidade e sensibilidade. Como alternativa de baixo custo, maior reprodutibilidade e capacidade de miniaturização surgem os biossensores (PORSTMANN & KIESSING, 1996).

2.3 Biossensores, definição

Biossensores, por definição, são dispositivos que têm a propriedade de detectar uma espécie química ou biológica (analito), quali ou quantitativamente (ROSATTO et al., 2001). São compostos por um elemento biológico (sensor) e um transdutor. O elemento biológico ou elemento sensor tem a propriedade de reconhecer seletivamente e interagir com o analito. A resposta bioquímica desta interação, então, é convertida pelo transdutor num sinal elétrico passível de ser quantificado (LOUZADA, LUCCAS & MAGALHÃES, 2004; FERREIRA & YAMANAKA, 2006). A Figura 3 mostra um esquema de um biossensor.

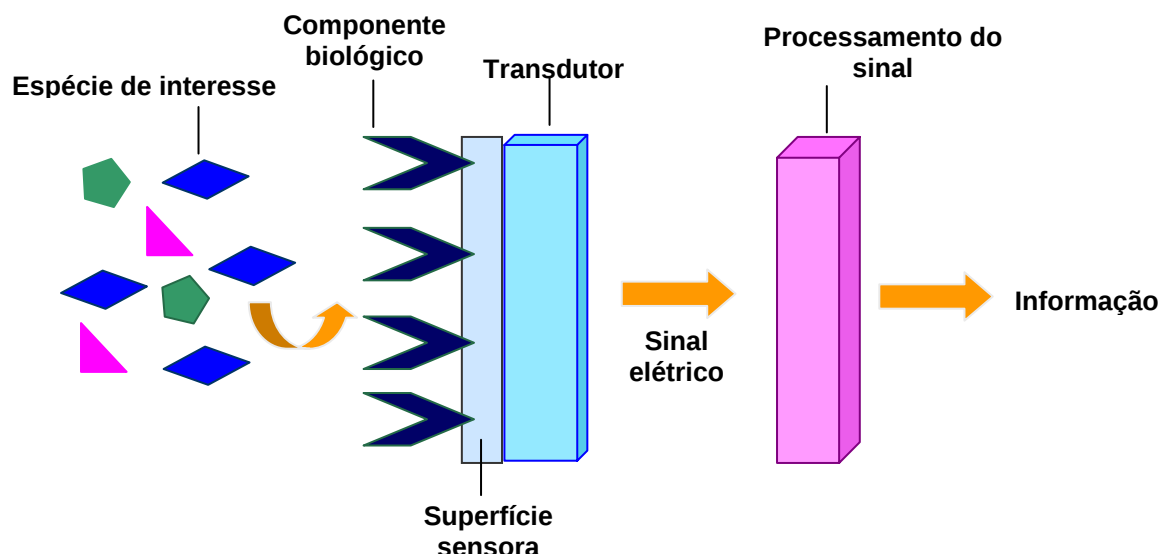


Figura 3: Desenho Esquemático de um biossensor.

Algumas das vantagens dos biossensores incluem a detecção direta do analito sem o envolvimento de diversas etapas bioquímicas, respostas mais rápidas ou “*on-line*”, possíveis reutilizações e menores custos. O campo de aplicação dos biossensores é vasto, não sendo somente restrito ao imunodiagnóstico, sendo também para área bioquímica, ambiental (SHANKARAN, GOBI & MIURA, 2007), clínica analítica (HE et al., 2007a), alimentos (PRIETO-SIMÓN et al., 2008), entre outros.

Como elementos biológicos, nos biossensores, podem ser usados: enzimas, sistemas multienzimáticos, anticorpos, antígenos, organelas, peptídios, lectinas, oligonucleotídeos, organismos, células, seções inteiras de tecidos de vegetais ou de mamíferos, etc. Em geral o elemento biológico é fixado (*imobilizado*) na superfície sensora permitindo repetidas análises (AHUJA et al., 2007).

A resposta bioquímica da interação elemento biológico–analito, que será convertida em sinal elétrico pelo transdutor, pode ser resultante de alterações na concentração de prótons, na liberação ou captação de gases (O_2 , CO_2 , NH_3), de íons específicos (NH_4^+ , de cátions monovalentes, CN^- , I^-), de calor, de massa, de absorvância, de condutância ou de transferência de elétrons (TURNER, KARUBE & WILSON, 1987).

O mercado de biossensores é bastante promissor. Foram contabilizados investimentos de aproximadamente US\$ 7.1 bilhões em 2004, mas o mercado está crescendo e a estimativa dos investimentos é de um aumento de 9.7% no ano de 2008 (LIN & WANG, 2005).

2.4 Transdutores

A escolha de um determinado transdutor depende basicamente do tipo de interação receptor-analito e de outros fatores como, tempo de resposta, seletividade e sensibilidade (TURNER, KARUBE & WILSON, 1987). Por exemplo, o transdutor para detectar o produto de uma reação redox enzima-substrato terá princípios diferentes daquele para determinar a interação antígeno-anticorpo. Desta forma, de acordo com o princípio de energia envolvida na transdução, são classificados basicamente quatro tipos de transdutores: 1- os eletroquímicos (WU et al., 2007), dentre eles, amperométricos, potenciométricos e condutimétricos; 2- os acústicos ou piezoelétricos (ZHANG et al.,

2008); 3- os ópticos (TANG et al., 2006) e 4- os térmicos (CHAUBEY & MALHOTRA, 2002). Comparados com os diversos tipos de transdutores, os eletroquímicos têm apresentado maior desenvolvimento nos últimos anos (Figura 4).

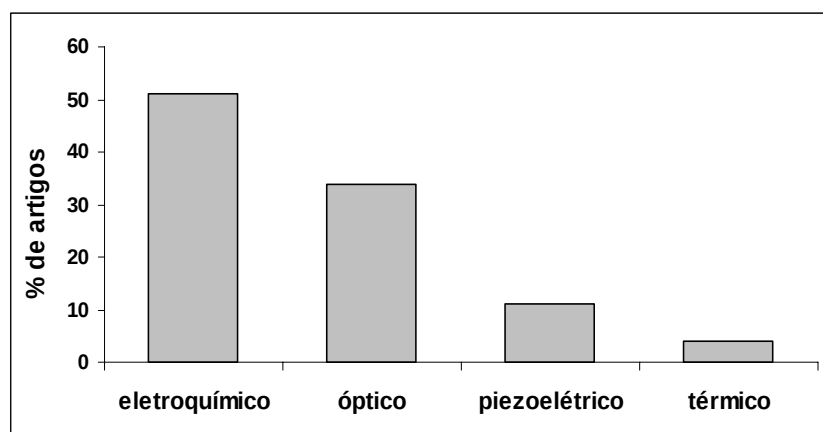


Figura 4: Produção científica relacionada aos diferentes transdutores usados em biossensores de 1980 a 2006, pesquisada na base de dados do ISI[®] (Institute for Scientific Information), acessado em 10/02/08.

2.5 Transdutores Eletroquímicos

O desenvolvimento de sensores eletroquímicos é uma das áreas de maior e mais rápido crescimento nos últimos anos (LIU, 2008). Os novos desafios impostos por amostras de interesse industrial, clínico e ambiental têm levado a este crescimento buscando sensores mais sensíveis, estáveis, de menor custo e com possível portabilidade (JIN et al., 2006). Dentre os transdutores eletroquímicos, os amperométricos têm sido bem sucedidos em inúmeras aplicações biotecnológicas, pois respondem a uma ampla faixa de concentração, além de poderem ser construídos de forma seletiva (WANG et al., 2008).

O transdutor amperométrico emprega a medida de intensidade de corrente de uma célula eletroquímica a um potencial fixo, sendo a corrente gerada por reação redox

na superfície sensível, proporcional à concentração do analito (ROSATTO et al., 2001). Em um biossensor amperométrico a molécula enzimática adequada, imobilizada ou conjugada a imunomolécula na superfície do eletrodo, catalisa a reação dos substratos. Devido à formação dos produtos ou consumo de reagente, o monitoramento da corrente elétrica poderá ser efetuado (FREIRE et al., 2003).

No sistema amperométrico, a voltametria é uma técnica que registra vários pontos numa região escolhida do perfil de corrente-potencial. Este método consiste em aplicar ao eletrodo de trabalho um potencial variando continuamente com o tempo, conduzindo reações de oxidação ou de redução de espécies eletroativas na solução (LINDINO, PELAQUIM & PREVIATTO, 2006). A sua principal utilização tem sido para diagnosticar mecanismos de reações eletroquímicas para a identificação de espécies presentes em solução e para a análise semiquantitativa das velocidades de reações.

A voltametria cíclica é a técnica mais comumente usada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos (GANDRA et al., 2004). A eficiência desta técnica fornece com habilidade informações sobre a termodinâmica de processos redox, a cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e reações químicas acopladas a processos adsorptivos (SKOOG et al., 2006).

A aplicação do potencial inicia-se de um valor no qual nenhuma redução ocorre. Com o aumento do potencial para regiões mais negativas (catódica) ocorre a redução do composto em solução, gerando um pico de corrente proporcional à concentração deste composto (TURNER, KARUBE & WILSON, 1987). Quando o potencial já tiver atingido um valor máximo, o potencial é varrido no sentido inverso até o valor inicial, e em casos de reações reversíveis, os produtos que tiverem sido gerados no sentido direto (e se localizam ainda próximos à superfície do eletrodo) serão oxidados, gerando um

pico simétrico ao pico da redução. A curva corrente vs. potencial obtida é chamada de voltamograma (LINDINO, PELAQUIM & PREVIATTO, 2006). O tipo de voltamograma gerado depende do tipo de mecanismo redox que o composto em questão sofre no eletrodo, o que faz da voltametria cíclica uma ferramenta valiosa para estudos mecanísticos.

A combinação de transdutores amperométricos com as interações altamente específicas de antígeno/anticorpo faz surgir uma nova geração de biossensores que são simples, de fácil uso e permitem a monitoração *on-line* de imunoreações (DARAIN et al., 2005).

2.6 Imunossensores Amperométricos

O imunossensor é um tipo de biossensor baseado na reação imunológica, sendo um antígeno ou anticorpo imobilizado na superfície do transdutor, com o objetivo de detectar seletivamente a concentração ou atividade do produto de interesse (WU, YAN & JU, 2007). Os imunossensores amperométricos surgem como uma técnica muito atrativa devido a sua simplicidade, especificidade, menor tempo de análise e baixo custo quando comparados às técnicas de imunoensaios convencionais (CHAI et al., 2008).

Em geral, imunomoléculas são espécies eletroquimicamente inertes, portanto, imunossensores requerem marcadores que serão úteis para monitorar a reação de afinidade. Nesse sentido, o anticorpo ou o antígeno deve ser marcado com uma enzima, constituindo então o conjugado. O melhor funcionamento dos imunossensores amperométricos dependerá da facilidade da transferência de elétrons do sítio ativo da enzima para a superfície do eletrodo (HABERMÜLLER, MOSBACH & SCHUHMANN, 2000). A medida da corrente elétrica, que será correlacionada com a

substância a ser determinada, será função do produto da reação enzimática na superfície do eletrodo, da reação do mediador ou da transferência eletrônica direta da enzima na superfície do eletrodo (SOUTOMAYOR & KUBOTA, 2002).

Diversas têm sido as enzimas experimentadas como elementos para respostas em imunossensores, sendo a mais freqüente a peroxidase (SÁNCHEZ, PUMERA & FÀBREGAS, 2007). A peroxidase (HRP, do inglês horseradish peroxidase) apresenta o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como seu principal substrato, no entanto, HRP catalisa paralelamente a desidrogenação de diversos compostos aromáticos como fenóis, hidroquinonas e derivados da benzidina. A atividade da enzima também tem sido determinada por amperometria usando hidroquinona, 1,2-fenilendiamina ou pirocatecol, tetrametilbenzidina ou através da transferência de elétrons por mediadores (WENDZINSKI et. al., 1997; LU, LEE & LIMA, 2004). A peroxidase é a enzima que tem relatado as melhores respostas quando presente nos imunoelrodos através da injeção do peróxido de hidrogênio (ROSATTO et. al., 2001; WU, YAN & J U, 2007). Além de ser a mais utilizada, devido a sua alta estabilidade por longos períodos de tempo à temperatura ambiente e em um amplo intervalo de pH; além de ser barata e disponível comercialmente em diferentes graus de pureza.

Muitas enzimas envolvidas nas reações de oxidação e redução contêm centros eletroativos (hemina, flavina) envolvidos por uma camada de proteína, que impede uma transferência de elétrons aos eletrodos. Devido à dificuldade encontrada por diversas enzimas na transferência de elétrons entre seu sítio ativo e a superfície do eletrodo, muitos sensores para biomoléculas têm empregado compostos que acelerem este processo (TRAN-MINH, 1998). Para melhorar a velocidade de transferência eletrônica, quando a enzima sofre a reação redox com o peróxido de hidrogênio, emprega-se um mediador de elétrons, que irá reagir rapidamente com a peroxidase oxidada diminuindo

o valor do potencial a ser aplicado e os eventuais interferentes da reação. (CHAUBEY & MALHOTRA, 2002; SOLNÁ et. al., 2005).

Dentre os mediadores surge na literatura o ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline sulfonato) que tem sido usado como substrato não-carcinogênico para a enzima HRP em imunoenaios enzimáticos com detecção potenciométrica e amperométrica (MOUSTY, VIEILLE & COSNIER, 2007; SHLYAHOVSKY et al., 2007).

Para permitir o uso contínuo dos imunossensores, é essencial uma incorporação estável dos elementos de reconhecimento e esta tem sido uma etapa crítica no desenvolvimento destes dispositivos analíticos. Isso porque os anticorpos ou antígenos, quando imobilizados, precisam reter a maior parte de sua atividade biológica, para que o imunossensor possa apresentar sensibilidade significativa para o composto alvo (CHEN & DONG, 2003).

2.7 Imobilização de Compostos Biológicos

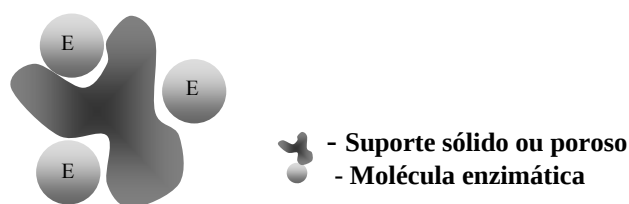
Um dos grandes desafios para a construção de imunossensores mais sensíveis, robustos e de maior confiabilidade é a imobilização das biomoléculas sobre superfícies condutoras (ORDÓÑEZ & FÀBREGAS, 2007; WU, YAN & JU, 2007). O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das superfícies, reduzir custos e aumentar a estabilidade. Esses fatores dependem principalmente da escolha apropriada do suporte e dos reagentes utilizados no processo de imobilização (KRAJEWSKA, 2004).

Na construção de imunossensores amperométricos, alguns materiais são frequentemente citados como suportes para imobilização: grafite, pasta de carbono,

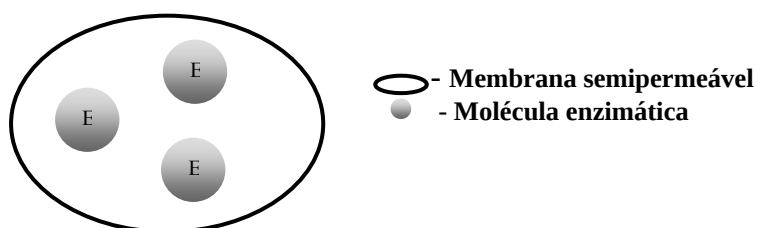
vidro, cerâmica, silicone, nylon, membranas poliméricas, fibra de carbono e de ouro (PIVIDORE MERKOÇI & ALEGRET, 2001). O eletrodo de ouro tem maior destaque para a viabilização e construção de imunossensores devido às suas propriedades de estabilidade eletroquímica, além de apresentar boa condutividade (LEI et al. 2003).

Ainda não existe um método ideal ou um procedimento geral para imobilização do componente biológico, porém, as diversidades dos métodos existentes permitem a escolha de um método que irá promover uma melhor imobilização e menor perda da atividade da biomolécula (OLIVEIRA & VIEIRA, 2006). Existem alguns métodos de imobilização empregados mais regularmente. São eles:

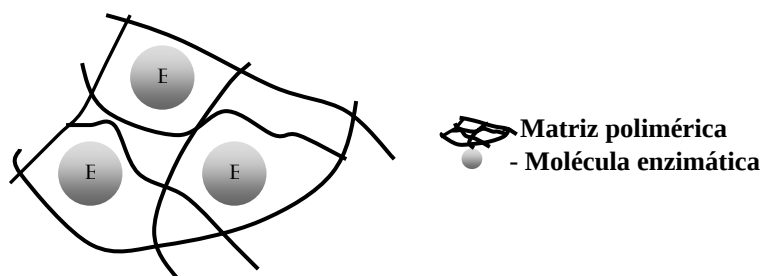
a) *Adsorção*: Este é o mais simples de todos, implicando em mínima preparação (DÍAZ-GONZÁLEZ, GONZÁLEZ-GARCÍA & COSTA-GARCÍA, 2005). A ligação é de natureza fraca envolvendo interação do tipo força de Van de Waals, ligações por pontes de hidrogênio, ou ligações hidrofóbicas. Em geral, o processo envolve apenas limpeza da superfície e incubação com o material;



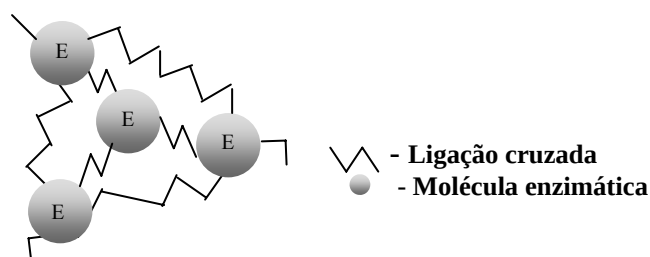
b) *Microencapsulamento*: Este método foi um dos primeiros usados na construção de biossensores (JAWAHEER et al., 2002). O biomaterial é mantido aprisionado sobre uma membrana, que é posicionada muito próxima ou acoplada ao transdutor;



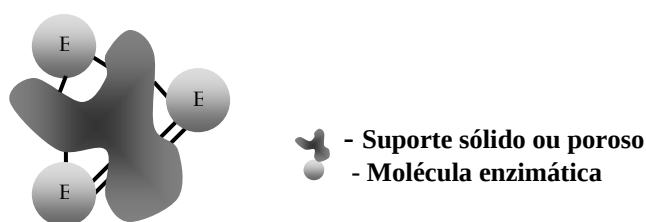
c) *Enclausuramento* ou “*Entrapment*”: O material biológico é misturado em uma solução monomérica que é então polimerizada, aprisionando o material biológico em um gel (AYDIN et al., 2002). Entre mais usados, estão os géis de poliacrilamida e de amido;



d) *Ligação Cruzada* ou “*Cross-Linking*”: Neste método o material biológico é quimicamente ligado entre si e, ao mesmo tempo, ao suporte. Reagentes bi-funcionais como o glutaraldeído são frequentemente usados (TSAI & LIN, 2005).



e) *Ligação covalente*: São métodos que envolvem mais etapas no processo de imobilização, compreendendo ligação do biomaterial ao suporte por um determinado grupo funcional. A ligação com o suporte deve somente envolver grupos ativos que não sejam essenciais à atividade do material biológico (GRUBOR et al., 2004);



Apesar de serem bastante empregados, estes processos produzem uma superfície altamente desorganizada e aleatórias, provocando mudanças conformacionais que afetam a atividade funcional do componente bioativo (RAMSDEN, 1998). Assim, somente uma pequena porcentagem das biomoléculas na superfície do eletrodo permanece ativa e mantém sua capacidade de interagir seletivamente com as moléculas do analito (CHAKI & VIJAYAMOHANAN, 2002). Estruturas mais ordenadas podem ser melhor controladas se a superfície for modificada por deposição sequencial de monocamadas de moléculas funcionais (FREIRE, PESSOA & KUBOTA, 2003). Uma alternativa que tem sido muito usada nas últimas décadas envolve a imobilização por formação de monocamadas auto-organizadas (SAM do inglês “Self-Assembled Monolayers”) (MENDES, CARVALHAL & KUBOTA, 2008).

2.8 Monocamadas Auto-organizadas

A orientação aleatória das macromoléculas de anticorpos na superfície do suporte é uma das principais razões para uma baixa atividade biológica. O uso das SAMs oferece uma alta organização e orientação das biomoléculas, assegurando um comportamento homogêneo em toda a superfície do suporte, contribuindo para a obtenção de imunossensores com maior sensibilidade e reprodutibilidade (SHERVEDANI AND HATEFI-MEHRJARDI, 2007; KLEIN, KERTH & LEBEAU, 2008). Além disso, são empregadas no estudo da transferência eletrônica direta entre materiais biocatalíticos e eletrodos e proporcionam uma melhor compreensão dos mecanismos de inúmeros processos químicos e biológicos (FREIRE, PESSOA & KUBOTA, 2003).

As SAMs são formadas espontaneamente como consequência da imersão de uma superfície sólida em solução constituída de moléculas anfóteras. Uma variedade dessas moléculas (derivados alquil, álcoois, aminas, tióis e etc.) e de materiais (ouro, prata, alumínio e cobre) tem sido empregada na confecção desses sistemas organizados (SMITH, LEWIS & WEISS, 2004).

Essas monocamadas têm sido construídas principalmente por silanização, filmes de Langmuir-Blodgett ou pela funcionalização por alcanotióis sobre superfícies metálicas (FU et al, 2005), dentre estas, as mais comumente usadas têm sido as SAMs de tióis sobre superfícies de ouro (CAMPUZANO et al., 2003; O'DWYER et al., 2004). O grupo terminal de enxofre destas moléculas é ligado ao Au via uma ligação Tiol-Au e os grupos funcionais na outra extremidade da molécula controlam as propriedades da superfície do eletrodo podendo ser manipulados de acordo com as mais variadas aplicações (HE et al., 2007b). A capacidade do uso de tióis com diferentes grupos funcionais torna possível o desenvolvimento de superfícies com propriedades e funções distintas, viabilizando interações quase específicas entre a superfície eletródica e o material biológico, com alto grau de controle sobre sua arquitetura molecular (BRIAND et al., 2006). O acoplamento orientado das biomoléculas está evidenciado na figura 3, que mostra a comparação com os outros métodos de imobilização, por adsorção, por encapsulamento ou ligação cruzada (GILARDI E FANTUZZI, 2001).

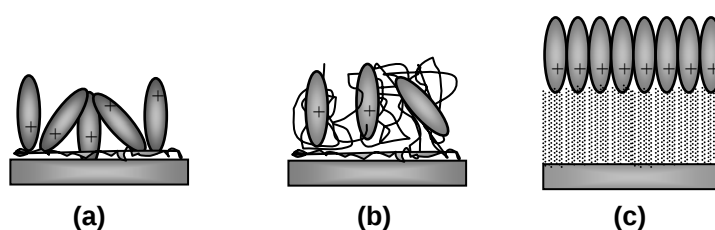


Figura 3: *Representação esquemática dos processos de imobilização de biomoléculas por adsorção física (a), encapsulamento por ligação cruzada (b) e acoplamento orientado por SAM (c).*

Imunossensores amperométricos baseados na modificação de suas superfícies por SAM são muito atrativos, pois combinam a alta sensibilidade dos métodos amperométricos tradicionais com as novas possibilidades de aumento de seletividade e estabilidade promovidas pelas SAMs. Apesar de suas inúmeras vantagens, imunossensores confiáveis ainda não estão disponíveis no mercado. Novas propostas de modificação de SAM têm sido investigadas, como o uso da proteína G, adsorvida na superfície de ouro (RIBAUT et al., 2008), e o emprego de nanopartículas de ouro (WU et al., 2007; WEN et al., 2008;) para aumentar a área de superfície, resultado ambas, em um melhor desempenho da imobilização dos imunossensores.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver imunossensor para detecção do Antígeno Prostático Específico empregando sistema eletroquímico.

3.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver métodos de imobilização irreversível de anticorpos anti-PSA empregando SAM em suporte de ouro;
- Empregar técnicas voltamétricas para caracterização eletroquímica de imunoeletrodo de ouro para PSA;
- Estabelecer o comportamento cinético do imunossensor para PSA ;
- Estabelecer curva de calibração do imunossensor para determinação da PSA;

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHUJA, T.; MIR, I. A.; KUMAR, D.; RAJESH, A. Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. *Biomaterials*, 28: 791-805, 2007.

AYDIN, G.; CELEBI, S. S.; OZYORUK, H.; YILDIZ, A. Amperometric enzyme electrode for L(+)-lactate determination using immobilized L(+)-lactate oxidase in poly(vinylferrocenium) film. *Sensors and Actuators B- Chemical*, 87: 8-12, 2002.

BALK, S. P.; KO, Y. -J.; BUBLEY, G. J. Biology of Prostate-Specific Antigen. *Journal of Clinical Oncology*, 21:383-391, 2003.

BARATA, H. S.; SOUTO, J. C. S.; BERGER, M. Câncer de próstata: marcadores Tumoriais. Sociedade Brasileira de Urologia, Projeto Diretrizes, Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, 2006.

BELLDEGRUN, A. KIRBY, R. S.; OLIVER, R. T. D. New perspectives in prostate cancer. Oxford: Isis medical media, 117-133, 1998.

BRIAND, E.; SALMAIN, M.; HERRY, J-M.; PERROT, H.; COMPÈRE, H.; PRADIER, C-M. Building of an immunosensor: How can the composition and structure of the thiol attachment layer affect the immunosensor efficiency? *Biosensors and Bioelectronics*, 22:440-448, 2006.

CAMPUZANO, S.; SERRA, B.; PEDRERO, F. J. M.; PINGARRÓN, J. M. Laccase biosensor based on N-Succinimidyl-3-Thiopropionate-functionalized gold electrodes. *Analytica Chimistry Acta*, 494: 187-194, 2003.

CAO, C.; KIM, J. P.; KIM, B. W.; CHAE, H.; YOON, H. C.; YANG, S. S.; SIM, S. J. A strategy for sensitivity and specificity enhancements in prostate specific antigen- α_1 -antichymotrypsin detection based on surface plasmon resonance. *Biosensor and Bioelectronics*, 21:2106-2113, 2006.

CATALONA, W. J.; HENSEL, W. A.; STEVENS, R.; BUDENHOLZER, B.; WOOLF, S. H. Screening for Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, 334:666-668, 1996.

CHAI, R.; YUAN, R.; CHAI, Y.; OU, C.; CAO, S.; LI, X. Amperometric immunosensors based on layer-by-layer assembly of gold nanoparticles and methylene blue on thiourea modified glassy carbon electrode for determination of human chorionic gonadotrophin. *Talanta*, 74:1330-1336, 2008.

CHAKI, N. K.; VIJAYAMOHANAN, K.; Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 17: 1-12, 2002.

CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Mediated biosensors, Review. *Biosensors and Bioelectronics*, 17: 441-56, 2002.

CHEN, S.; LIU, L.; ZHOU, J.; JIANG, S. Controlling antibody orientation on charged self-assembled monolayers. *LAGMUIR*, 19:2859-2864, 2003.

CHEN, X.; DONG, S. J. Sol-gel-derived titanium oxide/copolymer composite based glucose biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 18:999-1004, 2003

CHODAK, G. W.; WARREN, K. S. Watchful waiting for prostate cancer: a review article. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 9:25-29, 2006.

CONSTANTINOU, J.; FENELEY, M. R. PSA testing: an evolving relationship with prostate cancer screening. *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, 9:6-13, 2006.

DANTAS, J. J. Prevenindo o câncer de próstata. Disponível em: <<http://www.reservaer.com.br/saude/cancerprostata.html>>. Acesso em 15 de Fevereiro de 2008.

DARAIN, F.; PARK, S. -U.; PARK, J. -S.; CHANG, S. C.; SHIM, Y. -B. A separation-free amperometric immunosensor for vitellogenin based on screen-printed carbon arrays

modified with a conductive polymer. *Biosensor and Bioelectronics*, 20:1780–1787, 2005.

DE VITA JR, V. T. *Cancer principles and practice of oncology*, 6TH edition TAUTON:LIPPINCOTT-RAVEN, MA. Detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial, 1419-1479, 2001.

DÍAZ-GONZÁLEZ, M., GONZÁLEZ-GARCÍA, M.B., COSTA-GARCÍA, A. Recent Advances in Electrochemical Enzyme Immunoassays. *Electroanalysis*, 17:1901-1918, 2005.

FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. *Química Nova*, 25:455-464, 2002.

FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoenaios. *Química Nova*, 29:137-142, 2006.

FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. Direct Electron Transfer: An Approach for Electrochemical Biosensors with Higher Selectivity and Sensitivity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14:230-243, 2003.

FU, Y. ; YUAN, R.; TANG, D.; CHAI, Y.; XU, L. Study on the immobilization of anti-IgG on Au-colloid modified gold electrode via potentiometric immunosensor, cyclic voltammetry, and electrochemical impedance techniques. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 40: 61-66, 2005.

GANDRA, P. G.; ALVES, A. A.; MACEDO, D. V.; KUBOTA, L. T. Electrochemical determination of antioxidant capacity for physical exercise evaluation. *Química Nova*, 27:980-985, 2004.

GILARDI, G.; FANTUZZI, A.; Manipulating redox systems: application to nanotechnology *Trends Biotechnology*, 19: 468-476, 2001.

GILL, P.; FOROUZANDEH, M.; RAHBARIZADEH, F.; RAMEZANI, R.; RASAEI, M. Production of anti-digoxigenin antibody HRP conjugate for PCR-ELISA DIG detection system. *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*, 27:303-318, 2006.

GRUBOR, N. M.; SHINAR, R.; JANKOWIAK, R.; PORTER, M. D.; SMALL, G. J. Novel biosensor chip for simultaneous detection of DNA-carcinogen adducts with low-temperature fluorescence. *Biosensors and Bioelectronics*, 19: 547–556, 2004.

HABERMÜLLER, K.; MOSBACH, M.; SCHUHMANN, W. Electron-transfer mechanisms in amperometric biosensors. *Analytical Chemistry*, 72:560–568, 2000.

HE, J. B.; JIN, G. P.; CHEN, Q. Z.; WANG, Y. A quercetin-modified biosensor for amperometric determination of uric acid in the presence of ascorbic acid. *Analytica Chimica Acta*, 585:337-343, 2007a.

HE, X.; YUAN, R.; CHAI, Y.; SHI, Y. A sensitive amperometric immunosensor for carcinoembryonic antigen detection with porous nanogold film and nano-Au/chitosan composite as immobilization matrix. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, In Press, Corrected Proof, Available online 5 July 2007b.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Síntese de resultados e comentários. Disponível em: Estimativa 2008 - Incidência de câncer no Brasil. <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/>>. Acesso 17 de Fevereiro de 2008.

ISI[®], Institute for Scientific Information. Disponível em: <<http://scientific.thomson.com/isi/>>. Acesso em 10 de Fevereiro de 2008.

JAWAHEER, S.; WHITE, S. F.; RUGHOPUTH, S. D. D. V.; CULLEN, D. C. Enzyme stabilization using pectin as a novel entrapment matrix in biosensors. *Analytical Chemistry*, 74: 2077-2091, 2002.

JIN, Y.; YAO X.; LIU Q.; LI, J. Hairpin DNA probe based electrochemical biosensor using methylene blue as hybridization indicator. *Biosensors and Bioelectronics*, 22:1126-1130, 2006.

KLEIN, E.; KERTH, P.; LEBEAU, L.. Enhanced selective immobilization of biomolecules onto solid supports coated with semifluorinated self-assembled monolayers. *Biomaterials*, 29:204-214, 2008.

KNOLL, S.; VOGEL, R. F.; NIESSEN, F. Identification of *Fusarium graminearum* in cereal samples by DNA Detection Test StripsTM. *Letters in Applied Microbiology*, 34:144–148, 2002.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin and chitosan based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35:126-139, 2004.

LEI, C. -X.; GONG, F. -C.; SHEN, G. -L.; YU, R. -Q. Amperometric immunosensor for *Schistosoma japonicum* antigen using antibodies loaded on a nano-Au monolayer modified chitosan-entrapped carbon paste electrode. *Sensors and Actuators B*, 96:582–588, 2003.

LILJA, H.; CHRISTENSSON, A.; DAHLEN, U.; MATIKAINEN, M. T.; NILSSON, O.; PETTERSSON, K.; LOVGREN, T. Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with alpha 1-antichymotrypsin. *Clinical Chemistry*, 37:1618–1625, 1991.

LIN, C. T; WANG, T. M. Biosensor Commercialization Strategy - A Theoretical Approach. *Frontiers in Bioscience*, 10: 99-106, 2005.

LINDINO, C. A.; PELAQUIM, L. L.; PREVIATTO, M. D. Determinação de iodato em sal culinário com técnica amperométrica. *Revista Varia Scientia*, 6:51-59, 2006.

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

LOUZADA, E. S.; LUCCAS, P. O.; MAGALHÃES, C. S. Construção e caracterização de um biossensor potenciométrico para determinação de pirogalol. *Analytica*, 2:52-57, 2004.

LU, F.; LEE, H. P.; LIMA, S. P. Quartz crystal microbalance with rigid mass partially attached on electrode surfaces. *Sensors and Actuators A*, 112:203–210, 2004.

MENDES, R. K.; CARVALHAL, R. F.; KUBOTA, L. T. Effects of different self-assembled monolayers on enzyme immobilization procedures in peroxidase-based biosensor development. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 612:164-172, 2008.

MOUSTY, C.; VIEILLE, L.; COSNIER, S. Laccase immobilization in redox active layered double hydroxides: A reagentless amperometric biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 22:1733-1738, 2007.

O'DWYER, C.; GAY, G.; LESEGNO, B. V.; WEINER, J. The nature of alkanethiol self-assembled monolayer adsorption on sputtered gold substrates. *Langmuir*, 20: 8172-8182, 2004.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. *Química Nova*, 29:932-939, 2006.

ORDÓÑEZ, S. S.; FÀBREGAS, E. New antibodies immobilization system into a graphite-polysulfone membrane for amperometric immunosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 22:965–972, 2007.

PAM, J.; YAO, X.; LIU, Q.; LI, J. Voltammetric detection of DNA hybridization using a non-competitive enzyme linked assay. *Biochemical engineering Journal*, 35:183-190, 2007.

PANINI, N. V.; MESSINA, G. A.; SALINAS, E.; FERNÁNDEZ, H.; RABA, J. Integrated microfluidic systems with an immunosensor modified with carbon nanotubes for detection of prostate specific antigen (PSA) in human serum samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 23:1145–1151, 2008.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Química Nova*, 25:1012-1021, 2002.

PIVIDORE, M. I.; MERKOÇI, A.; ALEGRET, S. Classical dot-blot Format Implementing as an Amperometric Hybridization Genosensor. *Biosensores and Bioelectronic*, 16:1133-1142, 2001.

PORSTMANN, T.; KIESSIG, S. T. Enzyme immunoassay techniques. *Journal of Immunological Methods*, 150:5-21, 1996.

PRIETO-SIMÓN, B.; CAMPÀS, M.; MARTY, J-L.; NOGUER, T. Novel highly-performing immunosensor-based strategy for ochratoxin A detection in wine samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 23:995-1002, 2008.

RAMSDEN, J. J. Biomimetic protein immobilization using lipid bilayers. *Biosensors and Bioelectronics*, 13: 593-598, 1998.

RIBAUT, C.; REYBIER, K.; TORBIERO, B.; LAUNAY, J.; VALENTIN, A.; REYNES, O.; FABRE P-L.; NEPVEU, F. Strategy of red blood cells immobilisation onto a gold electrode: Characterization by electrochemical impedance spectroscopy and quartz crystal microbalance ITBM-RBM, In Press, Corrected Proof, Available online 11 February 2008.

ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L. T. Biossensores Amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. *Química Nova*, 24:77-86, 2001.

SÁNCHEZ, S.; PUMERA, M.; FÀBREGAS, E. Carbon nanotube/polysulfone screen-printed electrochemical immunosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 23:332-340, 2007.

SCHRÖDER, F. H.; CARTER, H. B.; WOLTERS, T.; VAN DEN BERGH, R. C. N.; GOSSELAAR, C.; BANGMA, C. H.; ROOBOL, M. J. Early Detection of Prostate Cancer in 2007: Part 1: PSA and PSA Kinetics. *European Urology*, 53:468-477, 2008.

SHANKARAN, D. R.; GOBI, K. D.; MIURA, N. Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 121:158-177, 2007.

SHERVEDANI, R. K.; HATEFI-MEHRJARDI, A. Electrochemical characterization of directly immobilized glucose oxidase on gold mercaptosuccinic anhydride self-assembled monolayer. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 126:415-423, 2007.

SHLYAHOVSKY, B.; LI, D.; KATZ, E.; WILLNER, I. Proteins modified with DNazymes or aptamers act as biosensors or biosensor labels. *Biosensors and Bioelectronics*, 22:2570-2576, 2007.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Fundamentos de química analítica. Trad. Marco Tadeu Grassi. São Paulo: Pioneira Thomsom Learning, 999 p, 2006.

SMITH, R. K.; LEWIS, P. A.; WEISS, P. S. Patterning self-assembled monolayers. *Progress in Surface Science*, 75: 1- 4, 2004.

SOLNÁ, S.; SAPELNIKOVA, P.; SKLÁDAL, M.; WINTHER-NIELSEN, C.; CARLSSON, J.; RUZGAS, T. Multienzyme electrochemical array sensor for determination of phenols and pesticides. *Talanta*, 65:349-357, 2005.

SOUTO, C. A. V.; FONSECA, G. N.; CARVALAHAL, G. F.; BARATA, H. S.; SOUTO, J. C. S.; BERGER, M. Marcadores tumorais em câncer de próstata. *International Brazilian Journal of Urology*. 30:9-17, 2004.

SOUTOMAYOR, M. D. P.; KUBOTA, L. T. Enzymeless biosensors: uma nova área para o desenvolvimento de sensores amperométricos. *Química Nova*, 25:123-128, 2002.

STURGEON, C. M.; ELLIS, A. R. Improving the comparability of immunoassays for prostate-specific antigen (PSA): Progress and problems. *Clinica Chimica Acta*, 381:85-92, 2007.

TANG, J. L.; CHENG, S. F.; HSU, W. T.; CHIANG, T. Y.; CHAU, L. K. Fiber-optic biochemical sensing with a colloidal gold-modified long period fiber grating. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 119:105-109, 2006.

THAVARUNGKUL, P.; DAWAN, S.; KANATHARANA, P.; ASAWATRERATANAKUL, P. Detecting penicillin G in milk with impedimetric label-free immunosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 23:688-694, 2007.

THEBAULT, P.; TAFFIN DE GIVENCHY, E.; GUITTARD, F.; GUIMON, C.; GÉRIBALDI, S. Self-assembled monolayers of semi-fluorinated thiols and disulfides with a potentially antibacterial terminal fragment on gold surfaces. *Thin Solid Films*, 516:1765-1772, 2008.

TRAN-MINH, C. Enzyme and microbial biosensors. *Humana press*, 15-22, 1998.

TSAI, W. C.; LIN, I. C. Development of a piezoelectric immunosensor for the detection of alpha-fetoprotein. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 106: 455–460, 2005.

TURNER, A. P. F.; KARUBE, Y.; WILSON, G. S.; Biosensors: fundamentals and applications. Oxford University Press, Oxford, 1987.

WANG, H.; WANG, X. J.; ZHAO, J. F.; CHEN, L. Toxicity assessment of heavy metals and organic compounds using CellSense biosensor with *E.coli*. *Chinese Chemical Letters*, 19:211-214, 2008.

WEN, L.; FU, J. -K.; GU, P. -Y.; YAO, B. -X.; LIN, Z. -H.; ZHOU, J. -Z. Monodispersed gold nanoparticles supported on γ -Al₂O₃ for enhancement of low-temperature catalytic oxidation of CO. *Applied Catalysis B: Environmental*, 79:402-409, 2008.

WENDZINSKI, F.; GRÜNDIG, B.; RENNEBERG, R.; SPENER, F. Highly sensitive determination of hydrogen peroxide and peroxidase with tetrathiafulvalene based electrodes and the application in immunosensing. *Biosensors and Bioelectronics*, 12:43-52, 1997.

WU, B. -Y.; HOU, S. -H.; YIN, F.; LI, J.; ZHAO, Z. -X.; HUANG, J. D.; CHEN, Q. Amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer assembly of multilayer films composed of chitosan, gold nanoparticles and glucose oxidase modified Pt electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 22: 834-844, 2007.

WU, L.; YAN, F.; JU, H. An amperometric immunosensor for separation-free immunoassay of CA125 based on its covalent immobilization coupled with thionine on carbon nanofiber. *Journal of immunological methods*, 322:12-19, 2007.

YANG, N.; WANG, X. Thin self-assembled monolayer for voltammetrically monitoring nicotinic acid in food. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 61:277-281, 2008.

YUAN, O. C.; CHAI, R.; TANG, Y. A novel amperometric immunosensor based on layer-by-layer assembly of gold nanoparticles-multi-walled carbon nanotubes-thionine multilayer films on polyelectrolyte surface. *Analytica Chimica Acta*, 603:205-213, 2007.

ZHANG, B.; ZHANG, X.; YAN, H-H.; XU, S-J.; TANG, D-H.; FU, W-L. A novel multi-array immunoassay device for tumor markers based on insert-plug model of piezoelectric immunosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 23:19-25, 2007.

ZHANG, Q.; HUANG, Y.; ZHAO, R.; LIU, G.; CHEN, Y. In situ growth of nanogold on quartz crystal microbalance and its application in the interaction between heparin and antithrombin III. *Journal of Colloid and Interface Science*, 319:94-99, 2008.

ZHANG, S.; DU, P.; LI, F. Detection of prostate specific antigen with 3,4-diaminobenzoic acid (DBA)-H₂O₂-HRP voltammetric enzyme-linked immunoassay system. *Talanta*, 72:1487-1493, 2007.

ZHOU, Z. Y.; LIU, G. D.; WU, Z.Y.; SHEN, G. L.; YU, R. Q. An amperometric immunosensor based on conducting immunocomposite electrode for the determination of Schistosoma Japonicum antigen. *Analytical Sciences*, 18:155-159, 2002.

ZELMANOWICZ, A. M. Detecção precoce para o câncer de próstata. Disponível em: <<http://www.abcdasaude.com.br/artigo.php>>. Acesso em 15 de Fevereiro 2008.

5. CAPÍTULO I

Self- Assembled Monolayers gold electrode oriented by Protein A for Prostatic Specific Antigen detection

Ariele, M.A. Mercês^a, *Rosa F. Dutra^b, José L. Lima-Filho^{a,c}

^a Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50740-521, Recife, PE, Brasil.

^b Departamento de Patologia, Instituto de Ciências Biológicas/ Pronto Socorro Cardiológico-PROCAPE, Universidade de Pernambuco, Recife, Brasil, Rua Arnóbio Marques, 310, Santo Amaro, 50100-130. Recife, PE, Brasil.

^c Laboratório Imunopatologia Keizo Asami- LIKA, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50740-521, Recife, PE, Brasil.

A ser submetido na Clinica Chimica Acta.

*Corresponding author

Rosa Fireman Dutra

Tel./Fax: +55-81 31174697

E-mail address: rosa.dutra@pq.cnpq.br

Abstract

Background: Prostatic specific antigen (PSA) is a valuable biomarker for prostate cancer screening. The immunosensor emerge as a very attractive technique for determination of the PSA due to its simplicity, specificity, less time for analysis and low cost when compared to conventional techniques of immunoassays.

Methods: An immunosensor based on a gold electrode was used in an electrochemical system for determination of the PSA. The monoclonal antibody against PSA (Anti-PSA) was oriented on the gold electrode surface via protein A, used for a better orientation of the antibodies in the SAM (Self-Assembled Monolayers), that were formed incubating the electrode in a solution of 2-aminoethanethiol (25mM) followed by glutaraldehyde 2.5% (v/v) for 45min.

Results: The immunosensor response of anti-PSA immobilized on a thiol gold electrode by self-assembled monolayers with protein A was 27% higher than control (without protein A). Optimal parameters were established to a good performance of immunosensor: incubation time (20min) and pH (7.2). The calibration curve achieved a high linearity ($r=0.997$, $p<0001$) and good reproducibility with relative error less than 5% when the PSA antigen was incubated at concentrations varying from 1.0 to 15ng/mL at 25°C.

Conclusion: The obtained results were satisfactory opening new perspectives on the immunosensors development to determination of PSA.

Keywords: immunosensor; PSA, SAM, Protein A.

1. Introduction

Prostate-specific antigen (PSA) is a protein made by cells of the prostate gland, that is present in high concentrations in normal semen [1], where its biological function is to dissolve the seminal coagulum to increase sperm motility and permit fertilization. PSA is also present in prostate tissue, from which it may be released into the serum. Low serum PSA concentrations (typically $<1.0 \mu\text{g/L}$) are found in young men (<40 years) but increase gradually with age, reflecting gradual increases in the size of the normal prostate [2]. PSA has been identified as the most reliable tumor marker for the early diagnosis of prostate cancer and monitoring of disease recurrence after treatment. A very low amount of this substance reaches the bloodstream, being the total PSA concentration in healthy males usually less than 4 ng/mL [3]. A total PSA level of 10 ng/mL or higher is a highly probable indication for prostate cancer [4]. PSA screening has dramatically improved the diagnosis and management of prostate cancer and the prostatic diseases [5]

Immunoassays, with high selectivity and affinity of the antibody molecules to their corresponding antigens have been deeply explored in the field of clinical diagnosis. Some immunoassays for PSA have been reported, such as fluorescence microscopy, surface plasmon resonance technology, immunochromatography, lateral flow immunoassay, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and radioimmunoassay (RIA). However, these tests consume time, expensive instrumentation, complicated separation and labeling step with other potentially dangerous or expensive materials [6 7]. Immunosensors emerge as a very attractive

technique due to its simplicity, specificity, less time for analysis and low cost when compared to conventional techniques of immunoassays[8,9].

Different types of transducers have been applied to immunosensors, however the electrochemical transducers are more sensible and sensitive than optical and piezoelectrical immunosensors due to use of the specific conjugate to generate the output signal. The current response is commonly registered in electrochemical immunosensors by use of an electroactive species (enzyme) linked to the working electrode surface that reacts with substrate in a controlled voltage against the reference electrode[10].

The first and probably most important step in electrochemical immunosensors development is the immobilization of the biomolecule to the paratope or epitope recognition. Some strategies for the antibodies immobilization on solid surfaces include physical adsorption [11], entrapment in polymer matrix [12, 13]) and covalent attachment [14]. The sensitivity and selectivity of these sensors depend much of the distance and orientation of the electroactive species immobilized on the electrodes surface . The use of self-organized monolayers (SAM - "Self-Assembled Monolayers") has allowed the most control over these variables, in order to obtain a greater orientation of eletroactive species and an increase in the direct transference of electrons [15]. The well-ordered layer, SAM, is provided by adsorption of sulfur-containing molecules on the Au electrode surface. The use of the chemical linkers to functionalize the thiol surface can cause random orientations of the immobilized antibodies, due to binding sites of these asymmetrical macromolecules being generally multiple, which might somewhat also decrease their antigen-binding efficiency [16]. Special interest has gone into the development of the orientation-controlled immobilization techniques for

antibodies through molecules that specifically bind the Fc fragment of the immunoglobulin (IgG) or, by use of the chemical groups in the antibody Fc region. Some authors had achieved good results using a protein G on oriented immobilization [17].

In this work, the protein A was used to promote an oriented immobilization of monoclonal antibody against PSA (anti-PSA) on thiol film assembly monolayer. The protein A is a cell wall component of *Staphylococcus aureus* that binds specifically to the Fc portion of IgG from many mammals [18]. Since the binding sites between protein A and antibody are oriented away from the template which lends to better binding capacity with antigen, their binding does not interfere with antigen–antibody reaction, and the antibody on a protein A-assembled surface is expected to retain full antigen-binding activity [19,20]. The use of mediators in electrochemical sensors enhances, among others, the sensitivity and the selectivity of the electrodes. To receive the analytical signal in the electrochemical immunosensor system, mostly mediators in sensors have been used to shuttle electrons between the enzyme and the electrode [21]. ABTS peroxidase substrate (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline sulfonato) is used in this work as a mediator in order to accomplish a gold electrode to detect the prostatic specific antigen.

2. Experimental

2.1. Reagents

The monoclonal anti-PSA (anti-PSA), the polyclonal anti-PSA conjugated with peroxidase (anti-PSA-HRP) and the human PSA were acquired from Cortex

BiochemTM. 2- Aminoethanethiol (Cysteamine, ~95%, M9768), 25%glutaraldehyde (w/v), glycine and Protein A were purchased from Sigma Co. (MO, USA). 30% Hydrogen Peroxide (w/v) and ethanol were obtained from Labsynth (São Paulo, Brazil) and F. Maia Ltda. (São Paulo, Brazil), respectively. ABTS peroxidase substrate (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline sulfonato) was acquired from KPL (Kirkegaard & Perry Laboratories, EUA). Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7.2, 10mM (0.2g KCl, 8.0g NaCl, 0.24g KH₂PO₄ and 1.44g Na₂HPO₄ in 1000mL ultra pure water) was involved in the study and used as electrolyte support. Water, used in all solution preparations, was obtained from ultra pure water.

2.2. Apparatus

Electrochemical measurements were carried out by a Potentiostat (Microquímica Brazil, MPQG-01 with a software MPQG-P). A conventional three-electrode system, comprising the gold electrode (0,5mm diameter, Microquímica, Brazil) as a working electrode, a Pt wire as an auxiliary electrode and an Ag/AgCl electrode as a reference electrode, was employed for all electrochemical experiments in an electrochemical cell filled with 10 mL PBS (pH 7,2). Besides PBS, solutions of peroxide different concentrations and 50 µL ABTS were placed in the cell. All the electrochemical measurements experiments were carried out at a room temperature of 25°C.

2.3. Preparation and Modification of the gold surface

The gold electrode surface (0,5mm diameter) was gently polished with alumina slurry (Al₂O₃, 0,3 µm), followed by rinsing with ultra pure water and then sonicated in

ethanol and water in ultrasonic shower (UltraSonic Clean USC 700, Unique, Brazil), for 5 min to remove all organic contaminants. Following it was chemically treated by immersion in 'piranha' solution (concentrated H_2SO_4 / H_2O_2 , 1:3 v/v. *Cautions!*) for 5 min and rinsed with ultra pure water. The SAM of thiols in the gold electrode surface was prepared by immersion in a solution freshly prepared 25mmol^{-1} Cysteamine (CYS) in ethanol for 2h, allowing adsorption of the thiol groups on the electrode. After that, the electrode was thoroughly washed with ultra pure water. The covalent coupling of glutaraldehyde (GA) was accomplished by incubation the electrode in a solution also freshly prepared 2.5% (v/v) GA in 0.1 mol L^{-1} PBS, pH 7.2 during 45 min. It was washed with ultra pure water. Finally, the SAM on sensor surface was ready. This protocol produces stable and fully covered SAMs on gold.

2.4. Orientation of anti-PSA

After the covalent activation process and rinsing, an $20\mu\text{L}$ aliquot of Protein A ($50\mu\text{g/mL}$) in PBS was added to the electrode surface and kept for 1 h at room temperature in order to promote the antibody orientation. The gold electrode was immersed in an anti-PSA ($2\mu\text{g/mL}$) solution (pH 7.2) for 1h. An illustrative design of anti-PSA orientation is showed at Figure 1.

2.5. Amperometric response of PSA

Prior to amperometric measurements, the electrode surface was blocked of unspecific binding by immersion in 10mM glycine in PBS (pH 7.2) for 20 min. The PSA immunosensor performance was evaluated by electrode immersion in PSA

solution (pH 7.2) for 20 min at room temperature (25°C). After that, the electrochemical signal was output by anti-PSA-HRP incubation at concentration of 2 μ g/mL for 1 h. Before each incubation step, the electrodes were exhaustively washed with PBS (pH 7.2) to remove excess of non-reacted molecules. Finally the electrode was immersed in a substrate solution (10mL of 0.01M PBS, pH 7.2, adding 50 μ L of 40mM H₂O₂ and 50 μ L of 0.3mg/mL ABTS) and the enzymatic product was detected by electrochemical analyzer. When it not use, the gold electrode anti-PSA immobilized was stored at 4°C in order to maintain its immunoactivity for long-term.

3. Results and Discussion

3.1. The anti-PSA Orientation

The oriented immobilization of anti-PSA is a critical step to performance of the immunosensor. The sensitivity of the electrochemical immunosensor could be improved by protein A addition to SAM. According to voltammetric curves (Figure 2), the anodic peak was 27% higher than control experiments (without protein A) after the sandwich immunoassay. Thus, the use of protein A due to its great specific affinity by the Fc portion of the anti-PSA, resulted in a better binding capacity with the PSA antigen and consequently a major amount of anti-PSA-HRP was bound.

The effect of CYS concentration was observed in order to reach a major binding of immobilized anti-PSA to thiol surface. An optimal response of immunoreaction was obtained when a CYS concentration between 25mM to 50mM was used (Figure 3). Several different solvents are used in preparation of SAMs, but precaution must be

taken because the final composition of the monolayer depends on the relative solubility of the chain length. In this study, the thiol-terminated linker, which attaches it to the gold surface (CYS), was used as having a short chain length of the propanethiol molecules, which promote high solubility. The incorporation of water free solvents into the SAM structure increases repeatability and produces well-ordered monolayers, defected-free SAMs and not-formed multilayers [22]. The ethanol used in SAM preparation is the solvent more frequently used, less toxic and more easily found.

The incubation time of glutaraldehyde can affect the multilayer of the immobilized component on the surface. In order to obtain more reproducible results of amount of immobilized anti-PSA, the GA after thiol surface was kept at 45min incubation time. The obtaining of monolayers with a high binding antibody capacity also depends of amount active sites offered by functionalized groups. Different concentrations of GA were tested (0.63, 1.25, 2.50, 5.00, 10.00 % (v/v)). According to Figure 4, the best amount of PSA bound was achieved around 2.5% of GA (v/v) as response of the highest avidity antigen-antibody binding reaction that was established for remains studies (Figure 4). It was also observed that a high amount of immobilized anti-PSA leads a drawback of relative response, suggesting that had occurred an esteric hindrance by cross linking or excess of antigen has been offered.

3.2. Optimization of measurement variables

The experimental variables, which can affect the amperometric response of the immunosensor, include the pH of supporting electrolyte, the incubation temperature and the incubation time.

The effect of solution pH on the immunosensor behavior was investigated between 6,5 and 8,5. As shown in Figure 5, the current response had a maximum value between pH 7.0 and 7.4, coinciding with the human physiological pH. This optimal pH facilitates measurements with sample serum without previous preparation.

In the study of the temperature influence, it was observed that the increase of temperature had a favorable effect increasing the current amplitude. According to figure 7, the current response at 37 °C temperature was higher than 25°C (room temperature), with the same reproducibility and behavior; similar results were reported by [13]. It was also observed that the elevation of temperature in immunoassay can cause proportionally a lost of activity of antigen or immobilized antibody, implying on the deterioration of response signals and shortening lifetime of the immunosensor [11, 23]. Then, the 25°C temperature (room temperature) was recommended to be used, although it had been 10.22 % lower.

One of characteristic of a ideal immunosensor consists in a quick response. The effect of incubation time on current response of the imunossensor in relation to the analyte was studied incubating the anti-PSA electrode with 20µL PSA solution diluted in PBS (10ng/mL). After that, the electrode was submersed in solution of anti-PSA-HRP for 20 min at room temperature. The voltammogram showed an increase of anodic peak with rising the incubation time (Figure 7A). After plotting exponential curve that was adjusted by Origin version 7.03 (OriginLab Cooperation, USA, 2002), it was reached a plateau at 20min suggesting a equilibrium reaction (Figure 7B). This results are in concordance with other authors [23, 24].

3.3. Performance of the immunosensor

3.3.1. Optimization of anti-PSA concentration immobilized

The optimal concentration of anti-PSA was determined in order to obtain the maximal antibody-antigen interaction with a minimal amount of immobilized anti-PSA. Then, different concentrations of anti-PSA were immobilized (0.2, 1.0, 2.0, 5.0 $\mu\text{g/mL}$) in protein A, with incubation at room temperature for 1h. After that, the electrodes were incubated with PSA (10ng/mL) followed by anti-PSA-HRP incubation, the measurements were carried out in the potentiostat after H_2O_2 :ABTS adding. According to Figure 8, the concentration anti-PSA optimal immobilized was reached at approximately 2.0 $\mu\text{g/mL}$ that was established for remain experiments.

3.3.2. Effect of H_2O_2 concentration on immunosensors response

The CVs of the resulting immunosensor at different scan rates were showed in Fig 9. Both the anodic peak currents increased linearly with scan rates in the range (5-150 mV/s), suggesting a surface-controlled electrochemical behavior. The maximal anodic peak saturated at 100mV/s that was established to remain studies.

The effect of the concentration of H_2O_2 on the amperometrical response was studied by cyclic voltammetry. The electrochemical cell was filled with 10 mL of PBS added to mixture with equivalent volum ABTS: H_2O_2 (100 μL) varying the H_2O_2 concentrations at 0,5mM, 1mM, 2,5mM, 5,0mM, 7,5mM, 10mM, 15mM, 20mM, 40mM, 60mM and 80mM and using a three-electrode system in the CV studies (Figure

10a). The ABTS was used to improve amperometric signal response of reaction. It was found that the current response increased with the increasing of H_2O_2 concentration, reaching a plateau at 40mM H_2O_2 (Figure 10b) that was established to all measurements (Figure 10).

3.3.3. Calibration curve of PSA immunosensor

The linear range and the detection limit of the PSA immunosensor were established by incubating variable concentration of PSA with the anti-PSA immobilized on gold electrode. The voltammetric studies were performed by H_2O_2 :ABTS reaction with incubated anti-PSA-HRP at scan rate of 100mV/s, varying the potential from -1.2 to 1.2. The calibration curve obtained by shifting of the current anodic peak covered the linear range from 1.0 to 15.0 ng/mL with a regression equation of the form $Y = 0,1934x + 0,35452$ and correlation coefficient of 0,997 ($p < 0,0001$; $n=6$). The detection limit considered to be the concentration that gives a signal three times the standard deviation of the blank was 0.5 ng/mL (Figure 11). This PSA immunosensor showed a lower detection limit than reported in the literature (Zang et al. 2007) associated with a good reproducibility (4.48% of variation coefficient).

4. Conclusion

This contribution describes an electrochemical immunosensor for PSA detection based on the immobilized anti-PSA orientation by protein A. This immunosensor permits a reliable determination of PSA from 1.0 to 15 ng/mL with a detection limit of 0.5ng/mL. The obtained results were satisfactory opening new perspectives on the immunosensors

development to determination of PSA. By generating functionalized surfaces through modification by thiol, it was possible to attach selectively the biomolecules of interest using a commercial gold microelectrode. The range of the purposed PSA immunosensor reached levels of clinical relevant.

Acknowledgment

The authors acknowledge FACEPE and CAPES agencies from Brazil for financial support.

5. References

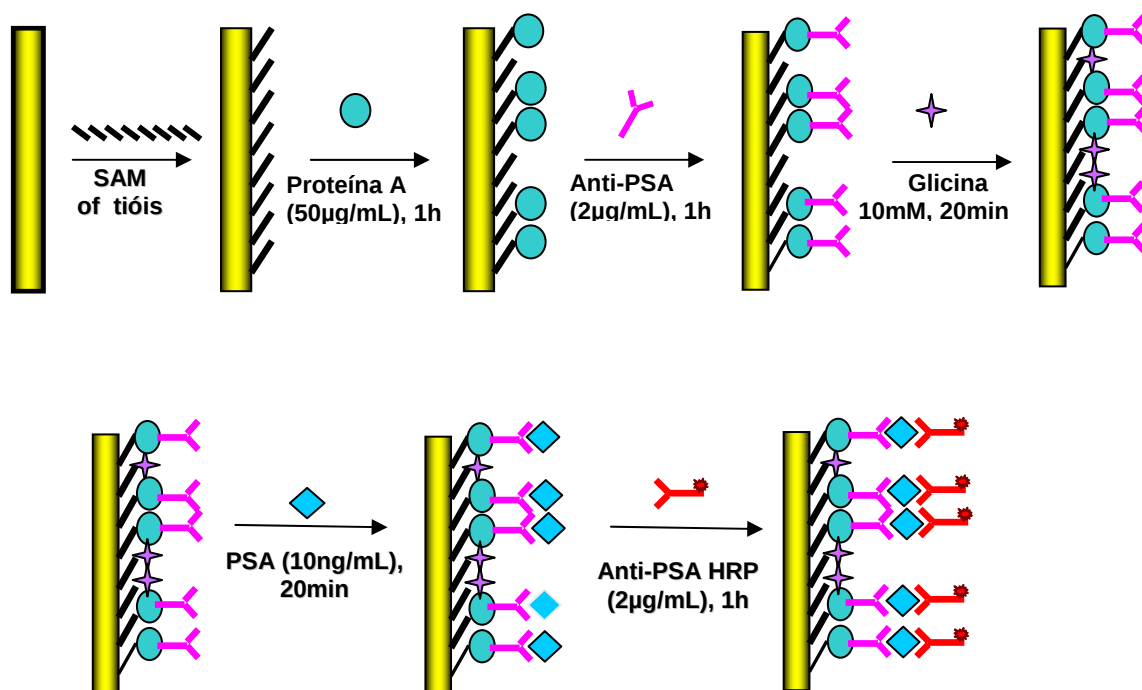
- [1] Knoll S, Vogel F, Niessen I. Identification of *Fusarium graminearum* in cereal samples by DNA Detection Test Strips. *Lett Appl Microbiol* 2002; 34:144–148
- [2] Sturgeon CM, Ellis A.R. Improving the comparability of immunoassays for prostatic-specific antigen (PSA): Progress and problems. *Clin Chim Acta* 2007; 381:85-92
- [3] Panini NV, Messina GA, Salinas E, Fernández H, Raba J. Integrated microfluidic systems with an immunosensor modified with carbon nanotubes for detection of prostatic specific antigen (PSA) in human serum samples. *Biosensors and Bioelectronics* 2008; 23:1145-1151
- [4] Huang L, Reekmans G, Saelens D, Friedt J-M, Frederix F, Francis L, Muyldermans S, Campitelli A, Hoof CV. Prostatic-specific antigen immunosensing based on mixed self-assembled monolayer, camel antibodies and colloidal gold enhanced sandwich assay. *Biosensor and Bioelectronics* 2005; 21:483-490
- [5] Chodak GW, Warren KS. Watchful waiting for prostate cancer: a review article. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 2006; 9:25–29

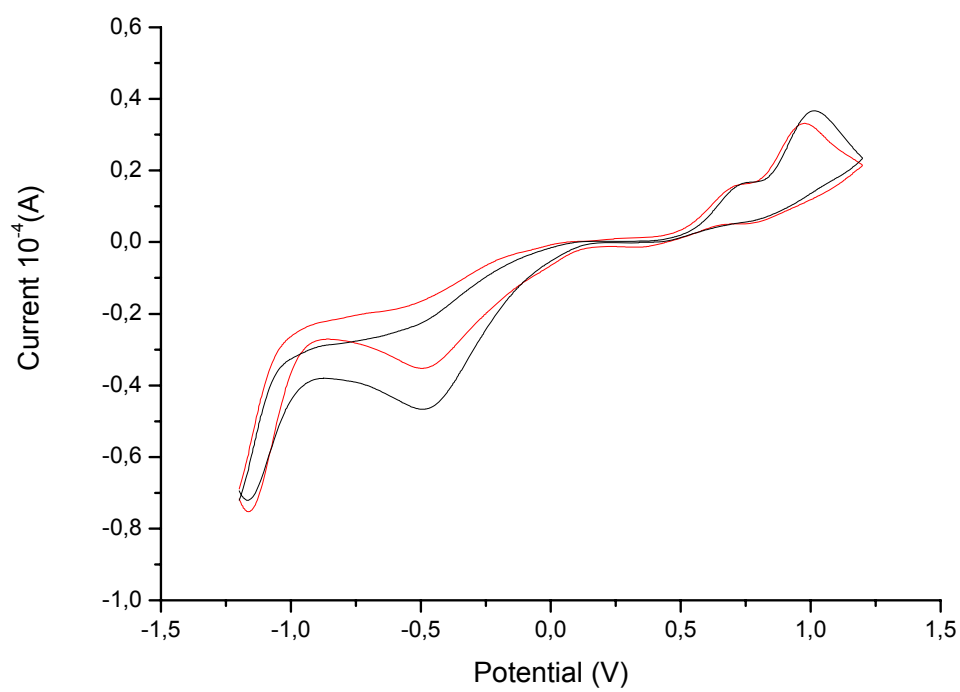
- [6] Zhang B, Zhang X, Yan H-H, Xu S-J, Tang D-H, Fu W-L. A novel multi-array immunoassay device for tumor markers based on insert-plug model of piezoelectric immunosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 2007; 23:19-25
- [7] Sturgeon CM. Tumor markers in the laboratory: closing the guideline-practice gap *Clinical Biochemistry* 2001; 34:353-359
- [8] Matsumoto K, Yuan JL, Wang GL, Kimura H. Simultaneous determination of α -fetoprotein and carcinoembryonic antigen in human serum by timeresolved fluoroimmunoassay. *Anal Biochem* 1999; 276:81-87.
- [9] Zhuo Y, Yuan R, Chai YQ, Sun AL, Zhang Y, Yang JZ. A tris(2,2'-bipyridyl)cobalt(III)-bovine serum albumin composite membrane for biosensors. *Biomaterials* 2006; 27:5420–5429.
- [10] Dutra FR, Coelho GD, Silva, VL, Ledingham WM, Lima Filho JL. A reusable amperometric biosensor base don a novel silver-epoxy electrode for immunoglobulin detection. *Biotechnology Letters* 2000; 579:583-22
- [11] Vallina-García R, García-Suárez MM, Fernández-Abedul MT, Méndez FJ, Costa-García A. Oriented immobilisation of anti-pneumolysin Fab through a histidine tag for electrochemical immunosensors. *Biosensor and Bioelectronics* 2007; 23:210-217
- [12] Odaci D, Kayahan SK, Timur A, Toppare S. Use of a thiophene-based conducting polymer in microbial biosensing. *Electrochimica Acta* 2008, In Press, Corrected Proof, Available online 6 January
- [13] Santadreu M, Cespedes F, Alegret S, Martinez-Fàbregas E. Amperometric immunosensor base don rigid conduting immunocomposites. *Anal. Chem.* 1997; 69: 2080-2085
- [14] Garcinuño RM, Fernández P, Pérez-Conde C, Gutiérrez AM, Cámara C. Development of a fluoroimmunosensor for theophylline using immobilised antibody. *Talanta* 2000; 52:825-832

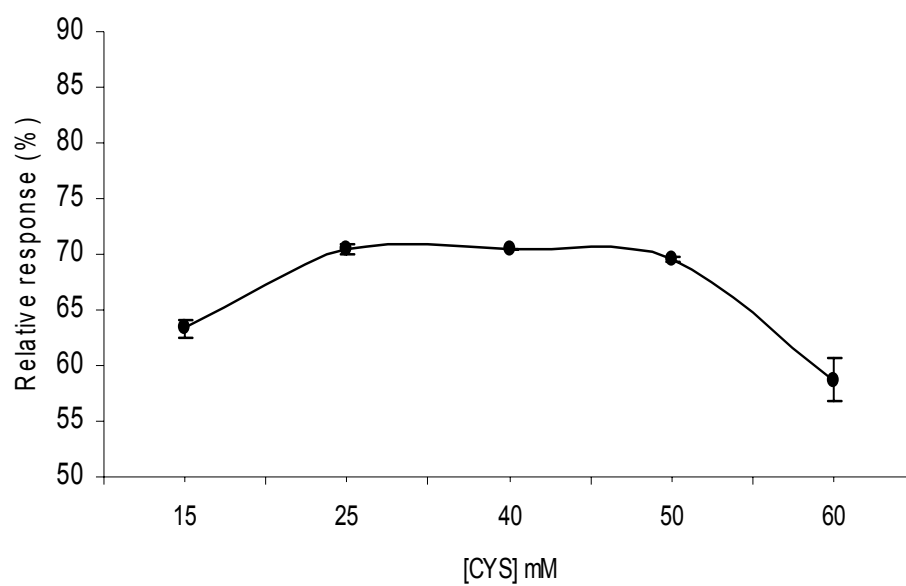
- [15] Liu Y. Electrochemical detection of prostate-specific antigen based on gold colloids/alumina derived sol-gel film. *Thin Solid Films* 2008; 516:1803-1808
- [16] Berggren C, Bjarnason B, Johansson G. Capacitive Biosensors. *Electroanalysis* 2001; 13:173 – 180
- [17] Choi J-W, Kanga D-W, Jang Y-H, Kima H-H, Mind J, Oh B-K. Ultra-sensitive surface plasmon resonance based immunosensor for prostate-specific antigen using gold nanoparticle-antibody complex. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 2008; 313–314:655-659
- [18] Marchalonis JJ, Atwell JL, Goding JW. Immunoglobulins of a monotreme, the Echidna *Tachyglossus aculeatus*: two distinct isotypes which bind A protein of *Staphylococcus aureus*. *Journal Immunology Methods* 1978; 34:97–103
- [19] Valat C, Limoges B, Huet D, Romette JL. A disposable protein A-based immunosensor for flow-injection assay with electrochemical detection. *Anal Chim Acta* 200; 404:187-194
- [20] Kanno S, Yanagida Y, Haruyama T, Kobatake E, Aizawa M. Assembling of engineered IgG-binding protein on gold surface for highly oriented antibody immobilization. *J Biotechnol* 2000; 76:207-214
- [21] Ordóñez SS, Fàbregas E. New antibodies immobilization system into a graphite polysulfone membrane for amperometric immunosensors. *Biosensors and Bioelectronics* 2007; 22:965–972
- [22] Liu Y-C, Wang C-M, Hsiung K-P. Comparison of Different Protein Immobilization Methods on Quartz Crystal Microbalance Surface in Flow Injection Immunoassay. *Analytical Biochemistry* 2001; 299:130-135.
- [23] He X, Yuan R, Chai Y, Shi Y. A sensitive amperometric immunosensor for carcinoembryonic antigen detection with porous nanogold film and nano-Au/chitosan composite as immobilization matrix. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 2007, In Press, Corrected Proof, Available online 5 July 2007.

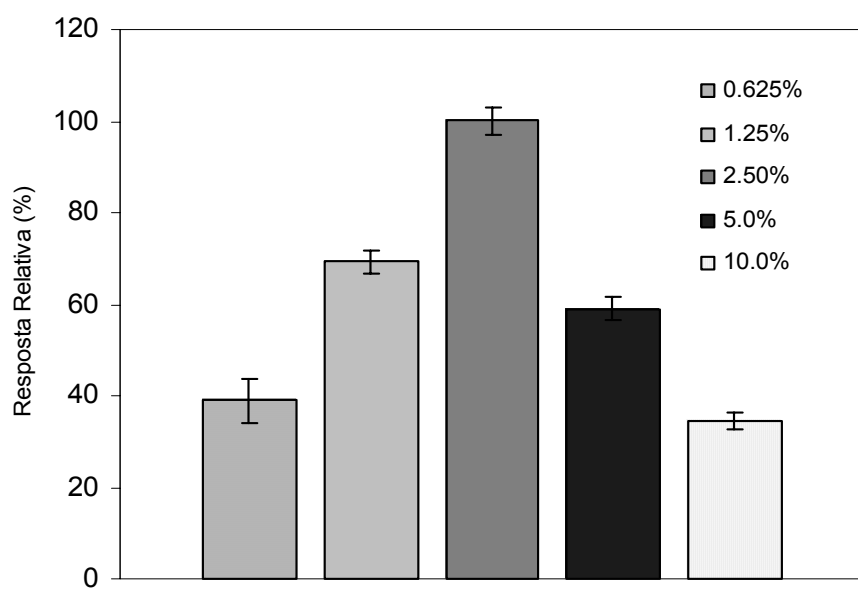
Captions for Figures

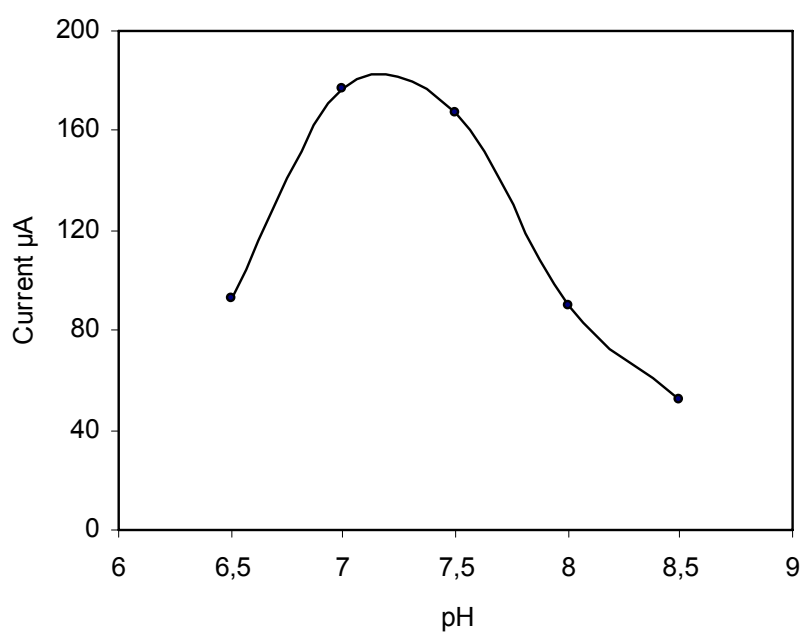
- Figure 1.** Schematic representation of the oriented anti-PSA immobilization and blocking of non-specific binding. 58
- Figure 2.** CV of anti-PSA immobilization on gold electrode surface by protein A (black line) and without protein A (red line). 59
- Figure 3.** Relative response of absorbance of the effect of CYS concentration in relation to amount of immobilized anti-PSA. 60
- Figure 4.** Results of different GA concentration (% , v/v) in relation to immunoreaction with PSA antigen. 61
- Figure 5.** Influence of the pH on the response of the immunosensor incubated with 10 ng/mL PSA in 50 μ L of H₂O₂ (40 mM) and 50 μ L ABTS solution. 62
- Figure 6.** The influence of temperature on the current peak response on the immunosensor. 63
- Figure 7.** Studies with anti-PSA electrode immersed in 20 μ L PSA solution with different incubation time (2, 4, 6, 10, 20 and 30 min). Voltammograms showing anodic peaks on response to different incubation time (a). Exponential curve of the anodic peaks with saturation at 20 min (b). 64
- Figure 8.** Relative response of PSA immunosensor in relation to different concentration of immobilized anti-PSA on the protein A oriented on gold electrode functionalized by SAM. 65
- Figure 9.** Cyclic voltammograms of the immunosensor at different scan rates (from a to i): 5, 10, 12.5, 25, 50, 75, 100, 125 and 150 mV/s measured in 0.1M PBS solution (pH 7,2). 66
- Figure10.** The effect of the concentration of H₂O₂ on the amperometrical response. 67
- Figure 11.** Linear fit of calibration curve obtained from CV of immunosensor for PSA varying the potential from -1.2 to 1.2 at scan rate of 100mV/s. 68

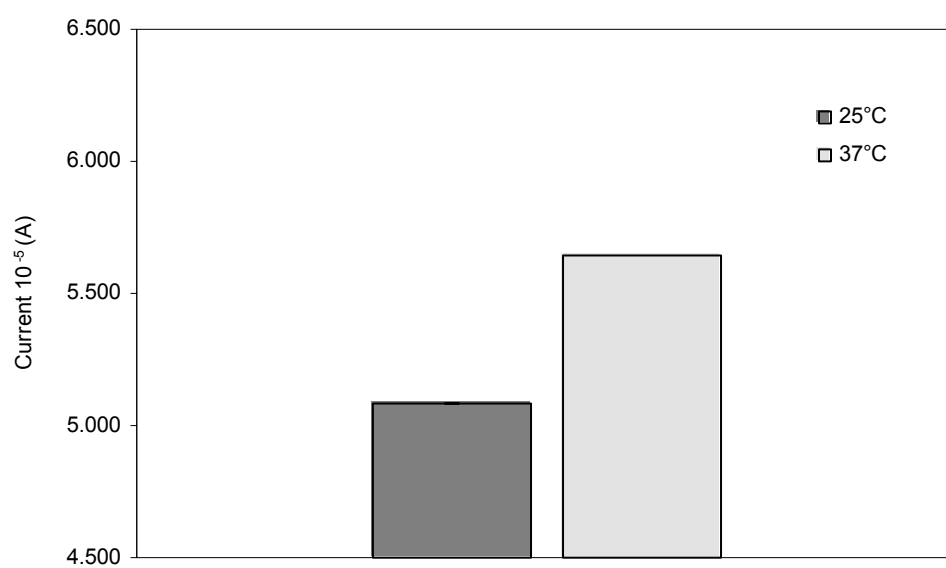
**Figure 1**

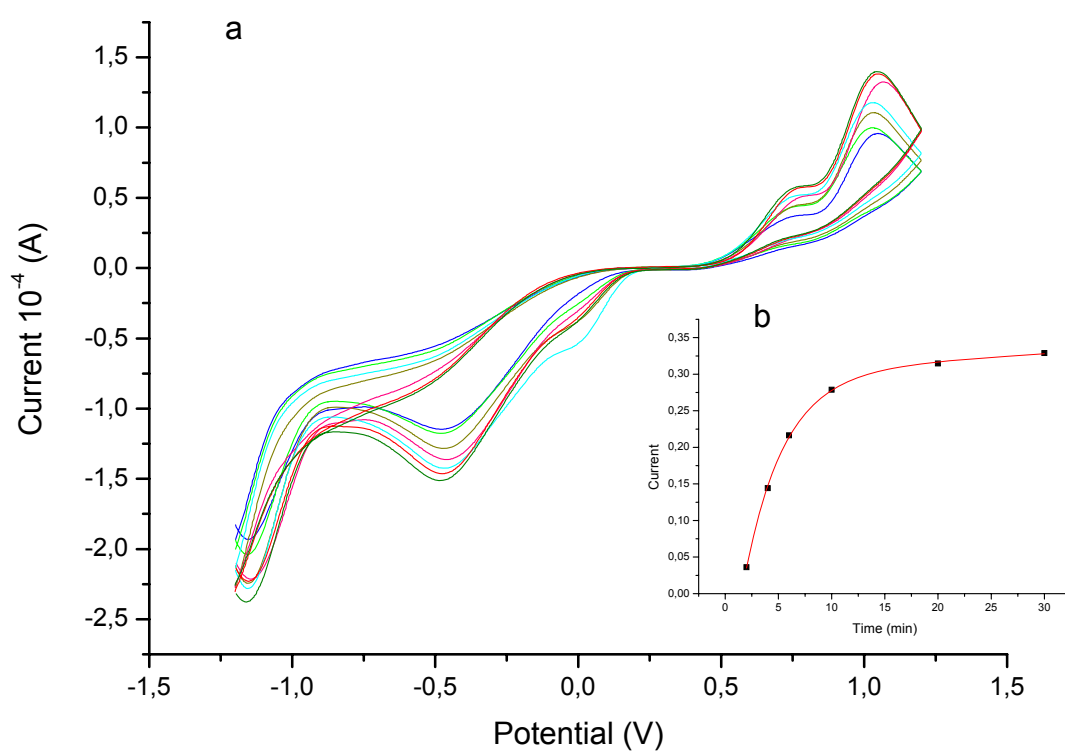
**Figure 2**

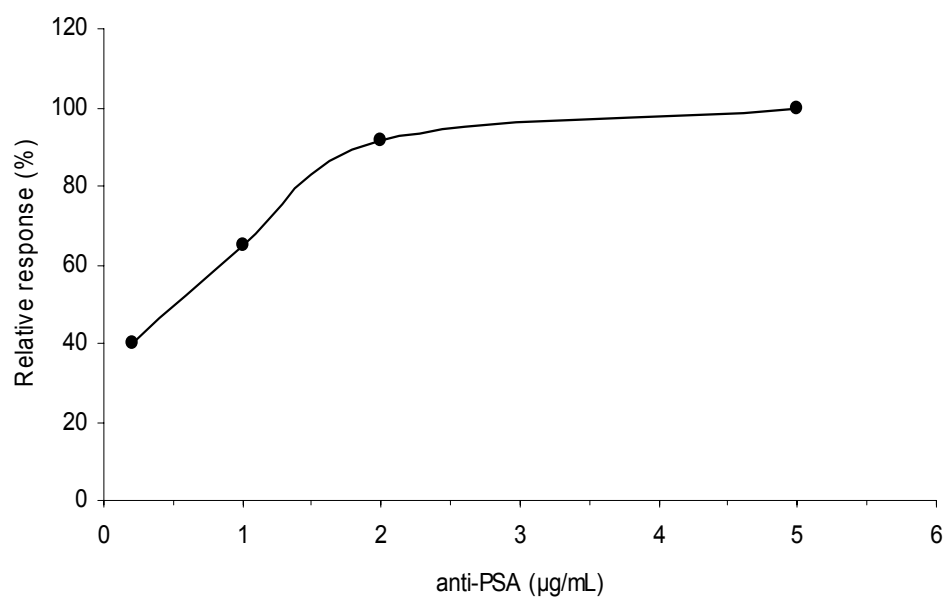
**Figure 3**

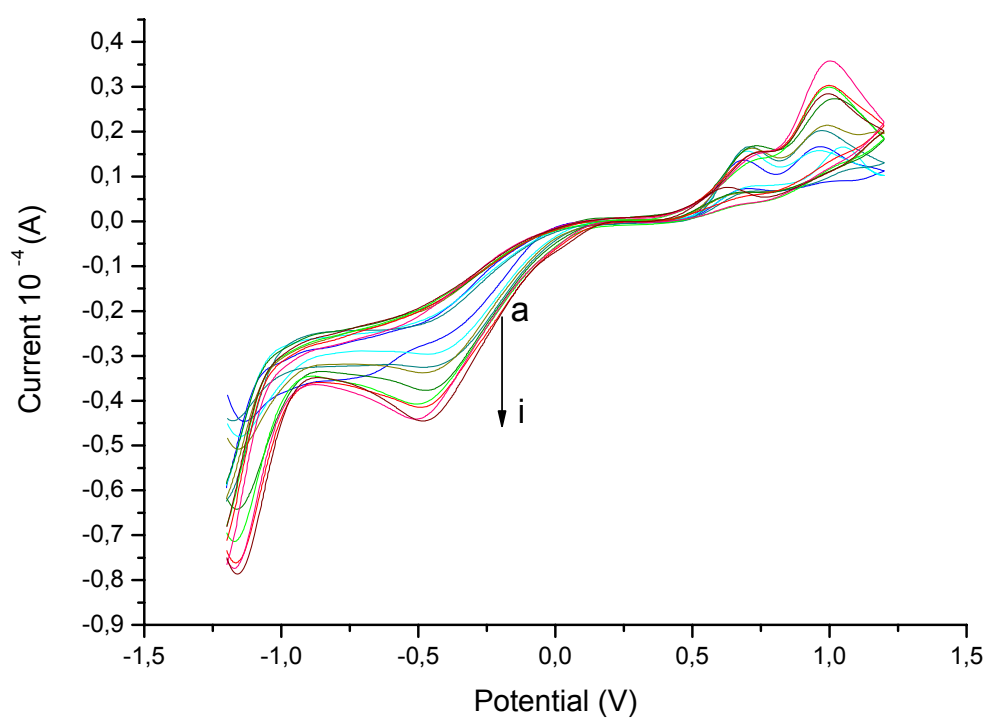
**Figure 4**

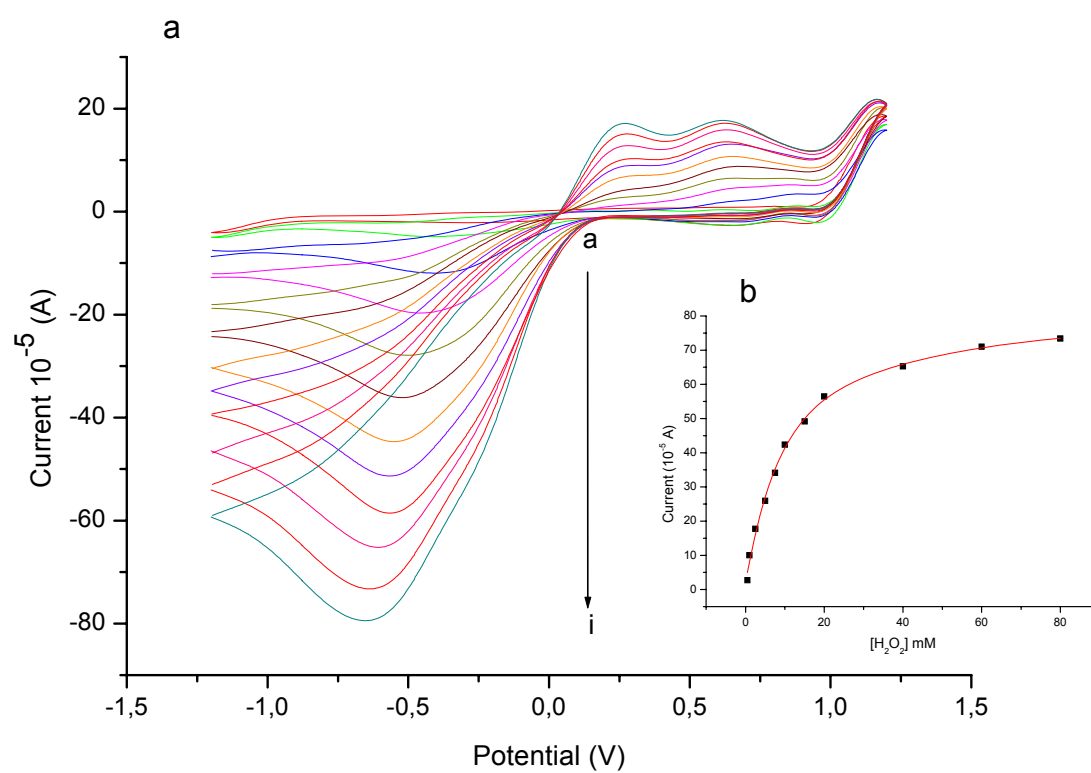
**Figure 5**

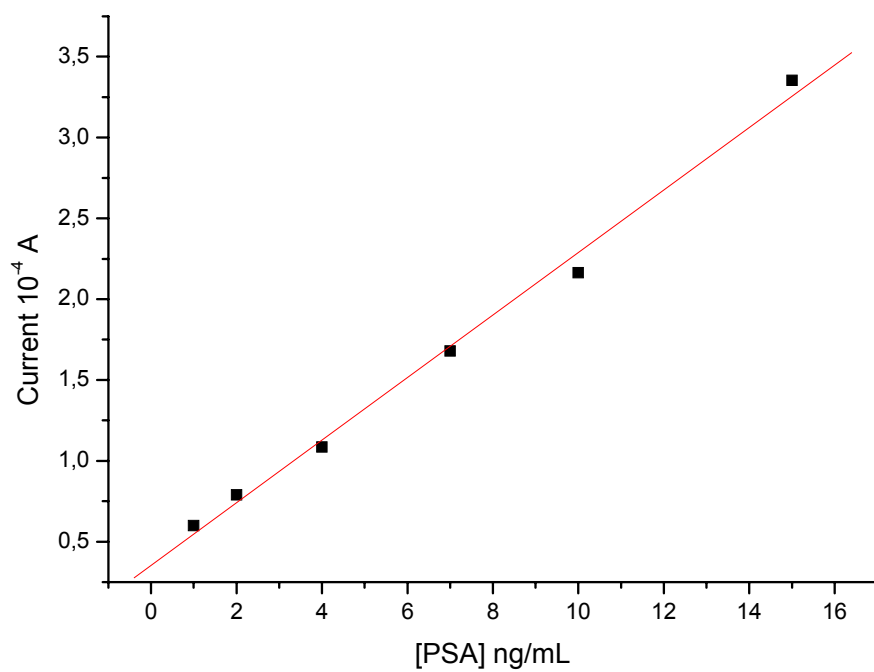
**Figure 6**

**Figure 7**

**Figure 8**

**Figure 9**

**Figure 10**

**Figure 11**

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados, pode-se concluir que:

- A imobilização de anti-PSA por SAM de tióis mostrou-se satisfatória para aplicação no desenvolvimento do imunossensor;
- A caracterização da SAM de tiol na superfície do ouro demonstrou atividade máxima da ligação do anti-PSA na concentração de 25mM de cisteamina;
- Um estudo detalhado de concentração do reagente funcional (Glut) foi realizado de modo a reduzir os efeitos deletérios ao biossensor. A concentração ótima obtida foi alcançada em 2,5% (v/v);
- Um platô foi alcançado na concentração de 2µg/mL de anti-PSA, indicando que neste ponto uma máxima concentração de antígenos PSA foi complexada à quantidade de anti-PSA ofertada, o que pode ser traduzido pelo equilíbrio cinético da reação antígeno-anticorpo;
- A curva de calibração $0,1934x + 0,35452$, ajustada pelo método dos mínimos quadrados, alcançou uma alta linearidade ($r=0,997$); ($p<0,0001$) e boa reprodutibilidade com erro relativo menor que 5%;
- Um método diagnóstico rápido para dosagem de PSA foi proposto abrindo perspectivas para o desenvolvimento de um método viável para a produção em massa de imunossensores reprodutíveis e de menor custo.

7. ANEXO

7.1 Normas da Revista



Clinica Chimica Acta



International Journal of Clinical Chemistry and Diagnostic Laboratory Medicine

PREPARATION OF PAPERS

Authors should consult a recent issue of the journal to make themselves familiar with the conventions and layout of articles.

The entire text, including figure and table legends and the reference list, should be double-spaced, leaving margins of approximately 3 cm (1 inch). All pages should be numbered consecutively and carry a running title, in the upper right corner, starting with the title page of the manuscript. Every new paragraph should be clearly indented. Do not use right-hand justification.

Title page. Page 1 should be concise, descriptive and informative. It should include:

- (1) The title of the article;
- (2) The authors' full names (first name, middle initial(s), and surname);
- (3) Affiliations (the name of department (if any), institution, city and state or country where the work was done), indicating which authors are associated with which affiliation;
- (4) Acknowledgement of grant support and of individuals who were of direct help in the preparation of the study;
- (5) Disclaimers, (if any);
- (6) The name, address, telephone and fax numbers and E-mail address of the corresponding author. Authors are requested to select a maximum of six key words and to present them on the title page of the typescript. They should cover precisely the contents of the submitted paper and should give readers sufficient information as to the relevance of the paper to his/her particular field.

Abstract. Page 2 of the typescript should be reserved for the Abstract which should have no more than 200 words. This should follow a structured format, sub-divided into subsections entitled "Background"; "Methods"; "Results"; and "Conclusions". Each subsection should be brief and informative, emphasizing those points that are unique to the paper. Since summaries are increasingly used by abstracting services which will cut off after a fixed number of words, it is important not to exceed the maximum number of words and to avoid bibliographic references and non-standard abbreviations.

Text. After the Abstract, Original Research Communications should be organized in the following format: Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgements, List of abbreviations, References.

Introduction This is a short section in which the authors should clearly state the reasons for and aims of the investigation. Summarise the rationale for the study and hypothesis tested by it, with brief reference to relevant previous work.

Materials and methods The section Materials and methods should be detailed enough for readers to reproduce the experiments. Authors should always refer to other work on the same subject, indicating whether or not their experimental results are in agreement with previous work. Conclusions drawn from experiments described in the tables or figures can often appear most conveniently in the Results section.

Result and Discussion The overall conclusions based on the work reported should be given in the Discussion. In some cases, Results and Discussion sections may more appropriately be combined than separated (at the author's discretion). Every effort should be made to avoid jargon, to spell out all non-standard abbreviations the first time they are mentioned and to present the contents of the study as clearly and concisely as possible.

Reports of new or improved methods should be as brief as is consistent with clarity (up to about 1000 words). They should unequivocally identify the element of novelty claimed and the advantages over existing technology. Performance characteristics, including effects of interfering substances, comparisons with results of accepted methods and reference values based on appropriate population samples should be documented by adequate data. Citing of earlier publications is preferred to repetition of details for reagents, procedures, etc., which are always in print. Nevertheless, the information provided must suffice to allow readers to duplicate the work or to compare the technique with current practice. Instrument and kit evaluations usually will not be accepted unless a new principle is involved.

Acknowledgements

Only persons who have made substantial contributions to the work should be acknowledged. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions.

The source(s) of support in the form of grants, equipment, drugs, or all of these should be acknowledged here.

References

Type references double-spaced and number them consecutively in the order in which they are first quoted in the text. Identify references in text, tables and legends by arabic numerals [square brackets]. References cited only in tables or in legends to figures should be numbered in accordance with a sequence established by the first identification in the text of the particular table or illustrations. Please note that all authors should be listed when six or less; when seven or more, list only the first three and add et al. The names of journals should be abbreviated according to the list of serial title word abbreviations (ISDS, Paris, 1985, ISBN 2-904938-02-8). Do not include references to personal communications, unpublished data or manuscripts either 'in preparation' or

'submitted for publication'. Reference to a paper as 'in press' implies that it has been accepted for publication. Recheck references in the text against the reference list after your manuscript has been revised and renumber accordingly. Incomplete references can result in publication delay.

Examples of correct forms of references are as follows:

[1] Lott JA, Curtis LW, Thompson A, Gechlik GA, Rund DA. Reported alcohol consumption and the serum carbohydrate-deficient transferrin test in third-year medical students. *Clin Chim Acta* 1998; 276:121-128

[2] Strunk W, White EB, *The elements of style*, third ed. New York: Macmillan, 1979.

[3] Kennedy L. Glycation of haemoglobin and serum proteins. In: Alberti KGMM, DeFronzo RA, Keen H, Zimmet P, editors. *International textbook of Diabetes Mellitus*. Chichester: John Wiley, 1992: 985-1007.

Tables

Tables should be used sparingly; they should be used only when the data cannot be presented clearly in the text. Each table, and every column should be provided with an explanatory heading, with units of measure clearly indicated. The heading of the table should make its general meaning understandable without reference to the text. Authors are requested to consult recent issues of CCA for the proper table layout. Cite each table in the text in consecutive order. The Editor-in-Chief, on accepting a manuscript, may recommend that additional tables containing important backup data, too extensive to be published in the article, may be published as supplementary material (see below) or deposited with the National Auxiliary Publications Service or made available by the author(s). In that event, an appropriate statement will be added to the text. Submit such tables for consideration with the manuscript.

Figures

Figures should be used to illustrate experimental results clearly. Illustrations for reproduction should normally be about twice the final size required as figures are often reduced to a one-column width. Symbols, lettering and lines should be sufficiently large and clear to be legible after reduction. Photographs of tissues, cells, or subcellular components should be included only when they are essential. Please visit our Web site at <http://authors.elsevier.com/artwork> for detailed instructions on preparing electronic artwork.

Figure Legends. Legends should be collated, typed double-spaced, numbered with Arabic numerals corresponding to the illustrations, and submitted on a separate page. When symbols, arrows, numbers, or letters are used to identify parts of the illustrations, each should be explained clearly in the legend. For photomicrographs, the internal scale markers should be defined and the method of staining should be given. The legends should permit the figures to be understood without reference to the text. If the figure has been previously published, a credit line should be included and a permission letter supplied by the author.

7.2 Resumos publicados em Anais de Congressos

7.2.1 XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq

Studies of antibodies inactivation by U-Violet for SPR biosensor development

Mercês, A. M. A.^{1,2}; Shinohara, N. K.²; Santos, R. F. R.^{1,2}; Mattos, A. B.^{1,2}; Lima-Filho, J. L.¹; Dutra, R. F.^{2,3}

1. Departamento de Bioquímica / UFPE
2. LIKA – Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami/UFPE;
3. Departamento de Patologia - Universidade de Pernambuco /UPE

Immunoenzymatic assays using biochemistry tests have been enough employed. In general way, these presents good diagnostic sensitivity, however complex technologies are involved and a long time of response is required, so new alternatives have been proposed. The SPR biosensor (Surface Plasmon Resonance) appear as promising alternative because it presents low cost, results in real time and simple operation. In SPR, while occur the formation of antigen-antibody complex, the thickness of the film on the altered sensory surface is detected by the displacement in the resonance angle providing in real time an electric signal susceptible of quantification. Like this to increase the diagnostic specificity in this sensors, was suggested a system of "SPR image", in order to reduce the quantity of positives false in the analysis when the measure are done in sensor surface with multiples zones of receptors active and inactive. This work, in contribution to SPR image development, had as major objective the study of methods of inactivation of receptors (antibodies) immobilized in solid surface that preserve actives the receptors of around micro regions. Plates of ELISA (NUNC – Immuno Plate Maxi Sorp) were used as model for immobilization of anti-*Salmonella spp.* and submitted to Ultraviolet (UV) light. Parameters like distance of UV source (5, 10 and 15 cm), time of exposition (15, 30 and 40 min) were evaluated. A medium inactivation of 99,98% was obtained when the plate was maintained to 5 cm of distance of the source for a great time of exposition of 45 min with antibody solution. These results suggest the use of the UV light on antibodies as capable to promote inactive zones permitting the production of SPR image sensors faster and selective.

Supported by: FINEP, CNPq, LIKA-UFPE

7.2.2 XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq

QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE BASED ON FLOW INJECTION FOR THE HUMAN CARDIAC TROPONIN T DETERMINATION

Mattos, A.M.^{1,2}, Freitas, T.A.^{2,3}, Santos,
R.F.R.^{1,2}, Mercês, A.M.A.^{1,2}, Lima-Filho,
J.L.², Dutra, R.F.³, Silva, V.L.⁴.

1

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Brazil. 2 Laboratório Imunopatologia Keizo Asami/UFPE; 3 Instituto Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Brazil; 4 Departamento de Engenharia Química/UFPE.

The cardiac troponin (cTnT) is specific biomarker important in establishing diagnosis and predicting prognosis in patients with suspected acute myocardial infarctions (AMI). In this work, a flow injection system quartz microbalance based on the alteration of electric frequency in response to the antigen-antibody interaction was used for determination of the cTnT. The variations of frequencies were registered by a frequency counter coupled to a microcomputer. The specific monoclonal antibody was immobilized on the surface of an electrode quartz crystal by a self-assembled monolayer (SAM). The adsorbate of thiol film was formed by incubating a 2-aminoethanethiol solution (cysteamine) for 2 h, followed by 2.5% glutaraldehyde (v/v). Afterwards, monoclonal antibodies against cTnT (anti-cTnT) were covalently immobilized on the gold electrode of the quartz crystal and 10 mM glycine solution was used as blocking agent. The development of the immunosensor made it possible to measure cTnT concentration with a detection limit of 0.025 ng/mL. The effect of the cysteamine concentrations on the SAM coated gold sensor was studied. The surface of the sensor can be regenerated by injection of a solution 1% sodium dodecil-sulphate (w/v). The cTnT determination was accomplished in samples of human serum, that which allows its use in AMI diagnosis.

Supported-by CAPES; FAPESP.

7.2.4 XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq

DEVELOPMENT OF ELECTROCHEMICAL IMMUNOSENSOR FOR DETECTION OF PROSTATE-SPECIFIC ANTIGEN

Mercês, A.M.A.^{1,2,4}; Mattos, A.B.M.^{1,2,4}; Silva, A.C.M.^{2,3}; Freitas, T.A.^{2,3}; Dutra, R.F.^{1,2,4}; Lima Filho, J.L.^{1,3}

¹Rede Nordeste de Biotecnologia-RENORBIO-Recife/PE; ²Laboratório de Pesquisa em diagnóstico-LAPED/PROCAPE; ³Universidade Federal de Pernambuco-Recife/PE; ⁴Universidade de Pernambuco, Instituto Ciências Biológicas, Recife/PE-Brasil; ⁵Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife/PE.

Prostatic-specific antigen (PSA) is a valuable biomarker for prostate cancer screening. The immunosensor emerge as a very attractive technique for determination of PSA due to its simplicity, specificity, less time for analysis and low cost when compared to conventional techniques of immunoassays. In this work, a three electrode system employing a gold commercial electrode (Microquímica, Brazil) as working electrode was used for determination of the PSA in human serum. The monoclonal antibody against PSA (Ab-PSA) was immobilized on the gold electrode surface via SAM (Self-Assembled Monolayer), that was formed incubating a solution of 2-aminoethanethiol (25mM) followed by glutaraldehyde 2.5%(v/v) for 45min. The cyclical voltammetry (CV) studies were carried out varying the potential from -1.2 to +1.2V with a scan rate of 100 mV⁻¹s. The calibration curve achieved a high linearity ($r=0.9951$, $p<0001$) and good reproducibility with relative error less than 3.5% when the PSA antigen was incubated at concentration from 2,0 to 15 ng/mL at 37°C. Several studies were performed as kinetic, incubation time of PSA and concentration of H₂O₂ injected. pH studies showed that a current response reached a maximum value between pH 7.0 and 7.2 when the pH varying from 5.5 to 8.5. The amperometric response increased with the increasing of incubation time and was registered a maximum steady at 20min. The optimal concentration of hydrogen peroxide was achieved at 40mM when successive addition was carried out to the electrochemical cell (10mL). The obtained results were satisfactory proving the viability on the immunosensors development to determination of PSA.

Keywords: immunosensor; SAM.

Supported by: CAPES; CNPq.

7.2.5 XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq

FUNCTIONALIZATION OF METALLIC SURFACES FOR ORIENTED COUPLING OF ANTI-PSA FOR ELECTROCHEMICAL SENSORS CONSTRUCTION

Mercês, A.M.A.¹; Mattos, A.B.¹; Silva, A.C.M.²; Freitas, T.A.³; Silva, M.M.S.³; Fidelis, A. C.⁴; Dutra, R.F.^{1,3}; Lima-Filho, J.L.^{1,2}

¹Rede nordeste de Biotecnologia – RENORBIO-Recife/PE-Brasil; ²Universidade Federal de Pernambuco-Recife/PE; ³Universidade de Pernambuco, Instituto Ciências Biológicas, Recife/PE; ⁴Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife/PE.

The clinical use of the Prostate Specific Antigen (PSA) as a tumor marker revolutionized the diagnosis, treatment, management and monitoring of prostate cancer. The development of sensitive, cheap and portable methods of diagnosis has been desirable, bringing the benefits of an early diagnosis. In this paper, studies of optimizing of functionalization of metallic surfaces were carried out to oriented coupling of anti-PSA via self-assembled monolayer(SAM). Anti-PSA was immobilized on the gold plates surface(3mm²) via SAM, that was formed incubating a solution of 2-aminoethanethiol (cysteamine-CYS) followed by glutaraldehyde(v/v). After that, Protein A was used for greater orientation of anti-PSA. The anti-PSA (2µg/mL) was incubated for 2h and then the PSA(5ng/mL) was left for 25 min at 37°C to assess the efficiency of immobilization through enzyme immunoassay. The anti-PSA-HRP (2µg/mL) was incubated for 1h. Effects in the amount of immobilized anti-PSA in function of the concentration of CYS were investigated and according to the results the concentration of 25mM CYS was ideal for the antibodies immobilization. Studies with different concentrations of GLUT (0.625, 1.25, 2.5, 5 and 10%) (v/v) and immobilized anti-PSA (0.2, 2 and 5 µg/mL) were performed, the optimum concentration was achieved in GLUT 2.5%(v/v) and a plateau was reached in the concentration of 2µg/mL anti-PSA, indicating a maximum concentration of complexed antigens to the amount of offered anti-PSA. The use of protein A showed higher results(27.84%) with greater efficiency in the immobilization of anti-PSA. Given the results achieved, the immobilization of anti-PSA via SAM is potentially suitable for the development of immunosensors.

Keywords: IMMOBILIZATION;SAM;PSA;

7.2.6 XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq

SCREEN-PRINTED ELECTRODE FOR DETECTION OF GLUCOSE

Silva, A.C.M.¹, Mercês, A.M.A.^{2,3}, Mattos, A.M.³, Fidelis, A.C.⁴, Freitas, T.A.⁵;
Silva, M.M.S.⁵; Dutra, R.F.⁵

¹Universidade Federal de Pernambuco-UFPE; ²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE; ³RENORBIO- Rede Nordeste de Biotecnologia; ⁴Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE; ⁵Instituto Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

Diabetes mellitus is one of the leading causes of death and disability in the world. Rapid and accurate analysis of glucose is of great interest in the diagnosis and treatment of diabetes. For this reason, numerous biosensors have been developed with this objective in mind. A manual screen-printing was carried out to prepare the working electrode using carbon ink. The enzyme immobilization was accomplished by modifying the electrode surface with a 1:1 mixture of 100µl glutaraldehyde (2.5%v/v) and 100µl Glucose Oxidase(GOD)/Peroxidase. After registration of baseline with the buffer, the cyclic voltammograms (CV) were obtained using PBS buffer (pH 7.2). The calibration curve was achieved by consecutive injections of 1mL glucose (350mg/dL) added to the volume of the electrochemical cell (10mL). The screen-printed electrode in presence of the glucose solution (35mg/dL) resulted in an anodic peak 0,2276V which represents the catalytic action of the GOD in the glucose oxidation. It was observed an increase of the anodic peak with the increasing of glucose concentration, and the registered calibration curve showed a good linear response with a correlation coefficient $r=0,9914$ ($p<0,0001$; $n=6$) and the linear range was achieved from 35mg/dL to 153,12mg/dL. The prototype biosensor showed suitable for the mass production due to low cost and good results.

Keywords: screen-printed, glucose oxidase, carbon ink.

7.2.7 XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq

STUDY OF PET AS SUPPORT FOR DEVELOPMENT OF QUICK TEST IN IMMUNODIAGNOSTIC

Gomes Filho, S.L.R.^{1,2}; Mattos, A.B.^{2,3}; Mercês, A.M.A.^{2,3}; Silva, A.C.M.^{2,4}; Fidelis, A.C.^{2,5}; Freitas, T.A.^{1,2}; Dias Filho, M.J.O.⁵; Dutra, R.F.^{1,2}

¹Universidade de Pernambuco, Instituto Ciências Biológicas, Recife/PE-Brasil; ²Laboratório de Pesquisa em Diagnóstico-LAPED/PROCAPE; ³Rede Nordeste de Biotecnologia–RENORBIO-Recife/PE; ⁴Universidade Federal de Pernambuco-Recife/PE; ⁵Universidade Federal Rural de Pernambuco-Recife/PE.

The interest in the study of new supports for purpose of application in diagnostic tests has been growing in recent years. The polyethylene tereftalato (PET), mainly for being a low-cost material, moldable, and of easy acquisition presents itself as an interesting candidate. In this work PET was used as alternative support for facilitating the biomolecules immobilization, with the advantage of being more easily modified chemically than the nitrocellulose membranes used in common tests of immunochromatography. For the use, PET was treated using solvents to reduce the amorphous artifacts and tension of shear. Two solvents were tested: isopropyl alcohol (70%) and acetone (PA). They were dripped for 2 min. For cross-linking of immunomolecule, the treated support was immersed in a solution of Glutaraldehyde (GLUT) 1%(v/v) for 45 min and followed in 100µL anti-IgG-HRP (1µg/mL) for 1h. To quantify the efficiency of immobilization it was carried out an enzyme immunoassay. Comparing two solvents used for the surface treatment, acetone showed superior results at 80.73% with greater efficiency in the anti-IgG-HRP immobilization. Studies with different concentrations of GLUT (25%, 2.5% and 1%) (v/v) were performed, the optimum concentration was achieved in 1%(v/v). The effect of the concentration of immobilized anti-IgG (0.1, 1, 10 and 100µg/mL) was also studied and the ideal concentration to react with aldehydes groups of GLUT was 1:1000, indicating greater quantity of immobilized anti-IgG-HRP and larger immunoreactivity showing low steric hindrance of biomolecule. The achieved satisfactory results confirm the viability of the use of PET for development of rapid tests.

Keywords: Quick Test of Diagnostic; IgG; PET.

Supported by: CNPq.

7.2.2 XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq

UREASE IMMOBILIZATION ON POROUS SILICON LAYERS FOR CLINICAL BIOSENSOR ASSAY

Fidelis, A.C.^{1,5}, Silva, A.C.M.^{3,5}, Mercês, A.M.A.⁵, Mattos, A.M.⁵,
Maia, M.M.D.^{1,2}; de Vasconcelos, E.A.⁴; Dutra, R.F.^{5,6}

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, ²Departamento de Biologia-Genética – UFRPE, ³Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, ⁴Departamento de Física - UFPE, Pernambuco, Brasil, ⁵Laboratório de Pesquisa em Diagnóstico – LAPED/PROCAPE, ⁶Instituto Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

The development of a biosensor for urea is of significant interest, since urea is a bioproduct which is monitored in blood as an indicator of renal function. Porous silicon (PS) is a nanostructured form of silicon which has been intensively investigated for drug delivery due to its large surface area and biocompatibility. In this work, we investigated urease immobilization by silanization using 3-APTES (3-aminopropyltriethoxy-silane) and glutaraldehyde (2.5%) on five different supports, including glass support and four PS layers with different characteristics (porosity, degree of oxidation and doping of the underlying silicon wafer). The PS layers were fabricated by vapor phase etching. The supports were immersed in urease solutions containing different concentrations for 1h at room temperature. We investigated the degree of protein adsorption on the different surfaces after 1h of incubation reaction. The amount of protein in the solution was determined by the Bradford method. The results showed that, in comparison with flat glass, the retention of urease was up to 50% higher in PS layers due to covalent bonding and trapping inside the porous structure. It will discuss the optimization parameters for urease immobilization on PS and explore its clinical uses.

Keywords: immobilization, urease, porous silicon.
Supported by CNPq, FACEPE