



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA

**Determinação da troponina T cardíaca humana empregando
sistema de microbalança de quartzo por injeção de fluxo**

Alessandra Batista de Mattos

Orientadora: **Prof^ª. Dra. Valdinete Lins da Silva**

Co-Orientadora: **Prof^ª. Dra. Rosa Fireman Dutra**

Recife/2007

Alessandra Batista de Mattos

**Determinação da troponina T cardíaca humana empregando sistema de
microbalança de quartzo por injeção de fluxo**

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

Aprovado por distinção

Data:26/02/2007

Mattos, Alessandra Batista de.

Determinação da troponina T cardíaca humana empregando sistema de microbalança de quartzo por injeção de fluxo / Alessandra Batista de Mattos. – Recife: O Autor, 2007.

72 folhas : il., fig.

Dissertação (mestrado) – Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco. CCB, 2007.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Troponina T. 2. Monocamada auto organizada. 3. QCM Imunossensor. 4. SAM. I. Título.

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

**UFPE
CCB – 2007-073**

Ata da defesa de dissertação da Mestranda **Alessandra Batista de Mattos**, realizada em 26 de fevereiro de 2007, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Às 09:15 minutos do dia 26 de fevereiro de 2007, foi aberto, no Depto. de Engenharia Química/UFPE, o ato de defesa de dissertação da mestranda **Alessandra Batista de Mattos**, aluna do Curso de Mestrado em Bioquímica/CCB/UFPE. Iniciando os trabalhos a Profa. Dra. Valdinete Lins da Silva, na impossibilidade da presença da Coordenadora do Curso supra citado, Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima, fez a apresentação da aluna, de sua orientadora, ela própria, da sua Co-Orientadora Profa. Dra. Rosa Amália Fireman Dutra, do Depto. de Engenharia Química/UFPE, e da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: Valdinete Lins da Silva, do Depto. de Engenharia Química/UFPE, na qualidade de Presidente, Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, Maria das Graças Carneiro da Cunha, ambos do Depto. de Bioquímica e Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura, do Depto. de Patologia/UPE. Após as apresentações, a Sra. Presidente convidou a aluna para a apresentação de sua dissertação intitulada: **"Determinação da troponina T cardíaca humana empregando sistema de microbalança de quartzo por injeção de fluxo"** e informou que de acordo com o Regimento Interno do Curso, o candidato disporia 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 seria de 30 (trinta) minutos. A aluna procedeu a explanação e comentários acerca do tema em 35 (trinta e cinco) minutos. Após a apresentação da mestranda, a Sra. Presidente convidou a Banca Examinadora para ocupar seus lugares e passou a palavra ao primeiro examinador, a Profa. Dra. Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura, em seguida para a Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha e finalmente para o Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, os quais agradecerem o convite, fizeram alguns comentários e sugestões. Ao final de suas respectivas arguições, os referidos professores deram-se por satisfeitos. Em seguida, a Sra. Presidente usou da palavra para tecer alguns comentários, 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 Depto. de Engenharia Química. 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, 26 de fevereiro de 2007.

Luiz Bezerra de Carvalho Júnior
Maria das Graças Carneiro da Cunha
Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura
Valdinete Lins da Silva
Wlins

José Manoel de Jesus

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais, **Pedro Caetano e Ozélia**, e a minha tia **Maria José**, pelo amor, dedicação e principalmente por todas as oportunidades a mim oferecidas para minha formação acadêmica e pessoal.

Ao meu marido **Jonathas** e ao meu filho **Gabriel** pelo amor compartilhado.

À Profª. Dra. e orientadora **Valdinete Lins da Silva** pela confiança e estímulo, que com profissionalismo e amizade ensinou-me a enfrentar os desafios ao longo desses dois anos, muito obrigada.

À Profª. Dra. e orientadora **Rosa Amália Fireman Dutra**, pela amizade, orientação, dedicação e paciência nesta minha fase de aprendizado e pelos muitos momentos de descontração tornando o laboratório um ambiente mais prazeroso, muito obrigada.

Às amigas do laboratório de Biossensores, **Renata Fabiana, Tatianny Freitas e Neide Shinohara**, pelo apoio, ajuda e pelos muitos momentos de amizade compartilhados.

À **Tatianny de Freitas**, estudante de Iniciação Científica, pela grande contribuição para conclusão deste trabalho.

À Dra. **Dilênia Cipriano** do Laboratório Central do Hospital Oswaldo Cruz pela atenção e generosidade em disponibilizar material para conclusão desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. **José Luiz de Lima Filho**, Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Azami - LIKA, por disponibilizar os recursos e infra-estrutura para a realização deste trabalho.

À minha turma de mestrado e todos que fazem parte do LIKA, funcionários e alunos, pelos inesquecíveis momentos de descontração e amizade.

ÍNDICE ANALÍTICO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E NOMENCLATURA	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1.0 INTRODUÇÃO	10
2.0 REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 Marcadores Cardíacos	12
2.1.1 Características dos Novos Marcadores Cardíacos - as Troponinas	15
2.2 Biossensores, definição	16
2.2.1 Transdutor Piezoelétrico – QCM	17
2.3 Imunossensores Piezoelétricos	21
2.4 Imobilização de Compostos Biológicos	23
2.4.1 Monocamadas Auto-Organizadas	24
3.0 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivos Específicos	27
4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
5.0 CAPÍTULO I	39
6.0 CONCLUSÕES	65
7.0 ANEXOS	66
7.1 Normas da Revista	
7.2 Resumos publicados em Anais de Congressos	

LISTA DE FIGURAS

1.0 INTRODUÇÃO

Figura 1. Desenho Esquemático de um Biossensor.	16
Figura 2. Desenho esquemático de um biossensor QCM – FIA.	20
Figura 3. Representação esquemática dos processos de imobilização de biomoléculas por adsorção física (a), encapsulamento por ligação cruzada (b) e acoplamento orientado por monocamadas auto-organizadas (c).	26

CAPÍTULO 1

Captions for Figures

Figure 1. Schematic representation of the principle of QCM immunosensor for cTnT determinations	57
Figure 2. Illustration of the immobilization scheme of mAb-cTnT.	57
Figure 3 Analysis of mass loading by mab-cTnT at concentrations of 0.1 µg/mL, 0.6 µg/mL, 1.2 µg/mL and 10 µg/mL.	58
Figure 4. Effect of the concentration of CYS for thiol monolayer as a function of the amount of the immobilized cTnT monoclonal antibodies. Means in five replicates assays.	58
Figure 5. Sensorgram of response of immunosensor for cTnT in successive injections of 0.05 ng/mL cTnT in PBS. The change in resonance frequency was considered after the injection of PBS. The experiment was conducted at room temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) at pH 7.4.	59
Figure 6. (a) Calibration curve of QCM immunosensor for 0.05NG1.0 ng/mL cTnT injections with immobilized mab anti-cTnT (1.2 µg/mL).; (b) Linear fit as function of cTnT concentration in four replicates run.	59
Figure 7. Effect of temperature as function of interaction of anti-cTnT and	

cTnT at concentrations of 0.1ng/mL, 1.0 ng/mL, 2.0 ng/mL and 4.0 ng/mL.
The error bars represent the standard deviation in four replicates. 60

Figure 8. Efficacy of block with 0,1M glycine and 1% BSA (w/v) after
the 1.2 µg/mL mAb-cTnT immobilization. 60

Figure 9. Sensorgram illustrative of the regeneration with 0.1 M NaOH and
SDS at concentrations of 0.1%, 1% and 2% (w/v) when a fixed concentration
of 0.2 ng/ml of cTnT was injected in the QCM system over 1.2 µg/ml of
mAb-cTnT immobilized sensor chip. The experiment was conducted at room
temperature. 61

Figure 10. Response of QCM immunosensor for the samples of
serum at different concentration of cTnT measured by ECLIA methods.
Means of three replicates analysis after regeneration with 1%SDS. 61

Captions for Tables

Table 1: Change of resonance frequency of the SAM preparation on
gold sensor in the flow stream of QCM system. 62

Table2: Results of concentrations of cTnT from human serum measured by
ECLIA methods and average on three replicates in the QCM immunosensor from different
serum samples. 62

LISTA DE ABREVIATURAS E NOMENCLATURA

TnT - Troponina T

SCA - Síndrome Coronariana Aguda

IAM - Infarto Agudo do Miocárdio

QCM - Microbalança de Cristal Quartzo do inglês “Quartz Crystal Microbalance”

FIA – Análise em fluxo Contínuo do inglês “Flow Injection Assay”

CK – Creatinoquinase total

CK-MB – Isoforma miocárdica da CK

ECG - Eletrocardiograma

AW - Ondas Acústicas do inglês “Acoustic Wave”

SAW - Surface Acoustic Wave

SPR – Ressonância de Plasmóns de Superfície do inglês “Surface Plasmon Resonance”

CK - Creatinoquinase

CK-MB - creatinoquinase específica do miocárdio

CYS- Cysteamine

GLUT- Glutaraldeído

BSA – Albumina de soro bovino do inglês “Bovine Serum Albumin”

PBS – Phosphate Buffer Saline

RESUMO

As determinações da troponina cardíaca T (TnT) podem contribuir para o diagnóstico e tratamento de infarto agudo do miocárdio e para a estratificação dos riscos dos pacientes com síndromes coronárias agudas no que respeita ao risco relativo de mortalidade. Neste trabalho, um sistema de microbalança de quartzo por injeção de fluxo baseado na alteração de frequência elétrica em resposta à ligação antígeno-anticorpo foi empregado para determinação da TnT cardíaca. As variações de frequências foram registradas por um contador de frequência acoplado a um microcomputador. O anticorpo monoclonal específico foi imobilizado sobre a superfície de um eletrodo de cristal de quartzo por ligação irreversível *via* monocamadas auto-organizadas. O adsorbato composto por filme de alcanotiól foi formado incubando uma solução de 2-aminoetanotiol (cisteamina) por 2 h, seguido por glutaraldeído a 2,5% (v/v). Em seguida, anticorpos monoclonais anti- troponina T (anti-TnT) foram covalentemente imobilizados sobre o eletrodo de ouro do cristal de quartzo e foi usada uma solução de glicina (10mM) como agente bloqueante. Com o imunossensor desenvolvido foi possível medir concentrações de troponina T com limite de detecção de 0,025 ng/mL. A superfície do sensor pode ser regenerada por injeção de uma solução do dodecil-sulfato de sódio 1% (p/v). A determinação da TnT foi realizada em amostras de soros humanos permitindo seu uso nas aplicações clínicas para diagnóstico do IAM.

Palavras Chaves: TnT; SAM; QCM imunossensor

ABSTRACT

The cardiac troponin T (cTnT) is important specific biomarker 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 (mAb-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 0.025ng/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.

Keywords: cTnT; SAM; immunosensor QCM

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares representam, atualmente, um grave problema de saúde pública no Mundo. O Brasil é o 9º na lista dos países cuja população morre mais, em números absolutos, de doenças cardíacas, de acordo com os dados do Atlas de Doenças Cardíacas e Derrames, divulgado em 2004 pela Organização Mundial da Saúde (OMS). A OMS alertou que esses problemas irão vitimar mais de 24 milhões de pessoas por ano até 2030 (OPAS, 2003), tornando assim evidentes as necessidades de ações para detecção e prevenção relacionadas às afecções dessas doenças.

Os marcadores cardíacos, em especial as troponinas cardíacas, são extremamente importantes na prática clínica, facilitando o diagnóstico e melhor avaliação do miocárdio após procedimentos cirúrgicos (HERKNER, WALDENHOFER & LAGGNER, 2001; SARKO e POLLACK, 2002). A Troponina T (TnT) é um marcador que pode ser usado no diagnóstico diferencial da Síndrome Coronariana Aguda (SCA), identificando o infarto agudo do miocárdio (IAM) (GODOY, BRAILE & NETO, 1998).

Atualmente, para determinação da TnT são empregados imunoensaios enzimáticos por serem métodos de análise precisos, sendo quantitativos por basearem-se na determinação de um produto colorido enzimático obtido de uma reação entre antígenos e anticorpos específicos (STIEGLER et al., 2000). Apesar de convencionalmente empregadas, são técnicas caras que envolvem presença de pessoal qualificado e demandam tempo. Uma das alternativas para resolver este problema, pode ser o desenvolvimento de imunossensores. Estes dispositivos combinam um material biológico a uma parte eletrônica podendo rapidamente detectar espécies químicas e biológicas.

Os imunossensores vêm se tornando uma alternativa para os imunoensaios convencionais. O princípio básico de um imunossensor é o mesmo de um imunoensaio: são baseados na detecção da interação antígeno-anticorpo. Entre os diferentes tipos de transdutores, que têm sido experimentados na construção de imunossensores, os piezoelétricos têm se mostrado mais atrativo por serem mais sensíveis e não necessitarem de espécies

eletroativas (anticorpos ou antígenos conjugados a enzimas) no processamento, o que implica em resultados com menor tempo e possibilidade de monitoração “*on-line*” da interação antígeno-anticorpo.

No sistema piezoelétrico, a variação de massa é medida quando um material biológico adsorvente, interage com sua espécie complementar na superfície do eletrodo (LU, LEE & LIMA, 2004). A variação de frequência medida é proporcional à concentração do antígeno ou anticorpo presente na amostra. Muitas aplicações foram publicadas a partir do ano de 1995. Na literatura têm sido registradas aplicações de piezoelétrico ou Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM do inglês “*quartz crystal microbalance*”) em imunossensores para detecção de contaminantes em alimentos (ADÁNYI et al., 2006), para Leucemia (ZENG et al., 2006), para detecção de organismos microbianos (SU & LI, 2004), de anti-ferritina humana (CHOU, et al., 2002), entre outras. Recentemente, graças a um melhor entendimento do comportamento das ondas acústicas alguns avanços têm sido registrados: a produção de novos biossensores mais confiáveis, rápidos, seguros e viáveis para uso tanto em campo com resultados *in loco*, e de imediato com incubação do material biológico num sistema em batelada (“*batch*”); bem como em análises laboratoriais utilizando processo de detecção em análise em sistema de fluxo contínuo (FIA – “*Flow Injection Analysis*”).

Neste trabalho foi desenvolvido um imunossensor em fluxo contínuo com o princípio piezoelétrico através de uma microbalança capaz de quantificar os níveis de Troponina T (TnT) pela medição de frequência pela parte eletrônica do imunossensor. A alteração de frequência é obtida pela variação de massa na superfície do cristal piezoelétrico quando a TnT presente no soro liga-se ao anti-TnT imobilizado na superfície do eletrodo.

2.0 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Marcadores Cardíacos

Atualmente, não somente os marcadores de dano isquêmico, como a TnT e troponina I (TnI), mas também os de processos inflamatórios (proteína C reativa) (MOSCA, 2002) e de disfunção cardíaca (peptídeos natriuréticos tipo B - BNP) são prontamente utilizados na prática clínica, impondo a todo médico que acompanha pacientes com doenças cardíacas, o conhecimento não só das vantagens, mas principalmente, das limitações desses marcadores a fim de que possam ser integrados de maneira adequada à conduta clínica. As enfermidades cardiovasculares de origem isquêmica continuam representando um enorme problema de saúde pública. A síndrome coronariana aguda (SCA), que apresenta elevada taxa de morbimortalidade, compreende a angina instável e o infarto agudo do miocárdio (IAM) (BERTON & PALATINI, 2003).

Daí, o crescente interesse observado na última década pelos novos marcadores biológicos, cuja maior especificidade e sensibilidade permitiram evidenciar a presença da necrose miocárdica, e quando associados às características clínicas do paciente e aos achados eletrocardiográficos, viabilizaram a estratificação de risco de eventos coronarianos, o que até então, não era possível com os marcadores tradicionais, permitindo com isso uma melhor abordagem terapêutica (LINDAHL et al., 2000).

A concentração plasmática de um marcador biológico de necrose miocárdica depende do tempo transcorrido desde o início do processo isquêmico, da cinética de sua liberação e, sobre tudo, do método analítico utilizado para sua medida, e especialmente de sua sensibilidade. O que explica o porquê de uma primeira determinação do marcador de necrose miocárdica poder ser negativa, e posteriormente, resultar em positiva, justificando com isso a medição seriada de alguns desses marcadores bioquímicos (SANTALO et al., 2003).

O IAM ocasiona o rompimento da membrana das células cardíacas, ocorrendo à liberação de proteínas cardíacas intracelulares para o sistema vascular. Entre os constituintes que são liberados da célula em estado de isquemia e necrose, os que se encontram dissolvidos no citoplasma e os de menor tamanho, são os que mais facilmente ganham a circulação, sendo por isso os marcadores mais precoces da lesão celular. São esses marcadores, os íons e alguns metabólitos, como o lactato, que devido a sua ampla distribuição tissular não pode ser interpretado como específico de lesão miocárdica.

Com a persistência da isquemia, macromoléculas citoplasmáticas das células lesionadas são difundidas, sendo estas na sua grande maioria de natureza enzimática, como a lactato desidrogenase (LDH), a aminotransferase aspartato (AST), a creatinoquinase total (CK) e suas isoenzimas, a CK-MB e a CK-MM, com cardioespecificidade variável entre elas. A avaliação da atividade dessas enzimas pode ser feita rapidamente e em situações de rotina são parâmetros satisfatórios para confirmar o diagnóstico, monitorar a evolução e estimar o tamanho do infarto agudo do miocárdio (IAM). Porém, existem limitações uma vez que a sensibilidade é baixa nas primeiras horas de evolução devido ao aparecimento retardado desses marcadores no sangue. Acrescente-se que a sensibilidade da CK-MB não é suficientemente alta para detectar pequeno dano no miocárdio, face à imprecisão analítica das medidas de atividade e à ampla faixa de normalidade. Isto levou à procura de outros métodos ou novos marcadores diagnósticos de lesão celular miocárdica, tentando superar essas limitações (HAMM & KATUS, 1995).

Até muito recentemente, o diagnóstico de IAM baseava-se na existência de pelo menos três critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS): dor torácica de características isquêmicas, alterações eletrocardiográficas sugestivas e aumento sérico da atividade catalítica da CK e da CK-MB. Todavia, um percentual significativo de pacientes com IAM apresentam sintomatologia clínica atípica, não sugestiva de isquemia miocárdica, e embora seja indiscutível a utilidade do eletrocardiograma (ECG) no diagnóstico da SCA, cerca de 30% de pacientes com IAM apresentam traçados não característicos no ECG, de difícil interpretação, dificultando o diagnóstico (ANTMAN, 2002).

Os novos marcadores, e em especial as troponinas cardíacas, permitem cobrir uma parte importante das necessidades clínicas tanto na avaliação diagnóstica (HERKNER, WALDENHOFER & LAGGNER, 2001) e estratificação do risco, como na orientação quanto à terapêutica frente a SCA, uma vez que na ausência de necrose miocárdica aguda ou subaguda, as concentrações das troponinas cardíacas no plasma são indetectáveis. Conseqüentemente, sua medida é absolutamente cardioespecífica, permitindo reconhecer necrose miocárdica de tamanho reduzido e a existência de infartos do miocárdio até mesmo nos pacientes com angina instável clássica, que não seriam reconhecidos utilizando-se outros marcadores (PLEBANI & ZANINOTTO, 1999).

2.1.2 Características dos Novos Marcadores Cardíacos - as Troponinas

O complexo troponina regula a contração do músculo estriado e consiste de três subunidades: a T, I e C que estão estreitamente ligadas ao filamento da tropomiosina. A troponina C se liga ao cálcio, a TnI se liga a actina e inibe a interação actina-miosina (molécula inibitória) e a TnT, se liga diretamente a tropomiosina. Na prática clínica apresentam interesse somente a TnT e a TnI. A troponina C é idêntica tanto no músculo esquelético como cardíaco mas, os genes codificadores da TnI e TnT, cardíaca e esquelética, são diferentes, o que permitiu que anticorpos monoclonais de reatividade cruzada extremamente baixa pudessem ser desenvolvidos facilitando o diagnóstico do IAM (ANTMAN et al., 1996).

Frente a um processo de necrose miocárdica, a troponina cardíaca é detectada no plasma a partir de 4 a 6 h do início dos sintomas, refletindo provavelmente a liberação precoce de seu componente citoplasmático. A TnT apresenta pico de elevação de 12 a 48 h após o início dos sintomas, sofrendo uma queda gradual nos 10 dias subseqüentes, permitindo o diagnóstico subagudo do IAM, embora, a detecção de concentrações aumentadas no plasma irá depender da extensão do IAM (7 a 21 dias) (PIRAS & REHO, 2005). A TnI apresenta dinâmica similar, com seu pico de menor magnitude e o tempo de retorno à normalidade mais

curto, dependente também da extensão do IAM. Estudos dos níveis pico de TnT medidos dentro das primeiras 24h após a admissão em pequenos grupos selecionados de pacientes com dor precordial têm demonstrado um excesso de eventos cardíacos nos pacientes com elevação de TnT, mesmo naqueles sem elevação da CK-MB (CAMERON et al., 2007; KALLNER et al., 1994).

A concentração normal de TnT no plasma é inferior a 0,5 µg/L. Mair e colaboradores (1995) estudaram o comportamento desse marcador em pacientes submetidos à revascularização do miocárdio e encontraram que, concentrações de TnT inferiores a 3,5 µg/L poderiam excluir a presença de infarto do miocárdio, com bastante acurácia. Kallner e colaboradores (1994) demonstraram que os pacientes que sofreram infarto trans-operatório apresentaram níveis plasmáticos de TnT muito superiores aos níveis alcançados nos pacientes sem complicações; os níveis de TnT permaneceram elevados por até cinco dias.

Alguns autores atribuem à TnI e à TnT a mesma especificidade e importância na avaliação dos danos cardíacos (PLEBANI & ZANINOTTO, 1999; PENTTILÄ et al., 1999). Segundo Bertinchant e colaboradores (2003) a TnT demonstrou grande capacidade para detectar os menores danos no miocárdio induzidos por doxorubicina em comparação com outros marcadores, incluindo TnI e CK-MB.

Com base na literatura, a introdução da dosagem de troponina na prática clínica, tem facilitado enormemente o diagnóstico e avaliação do grau de sofrimento miocárdico após procedimentos clínicos ou cirúrgicos. Neste caso, o emprego de um sensor que pudesse monitorar em minutos esse marcador, iria garantir um diagnóstico em tempo real e com menor limite de detecção, visto que, o paciente com IAM deve ser diagnosticado precocemente para melhoria do prognóstico e qualidade de vida (DUTRA & KUBOTA, 2007).

2.2 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). Ele é composto 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 1 mostra um esquema de um biossensor.

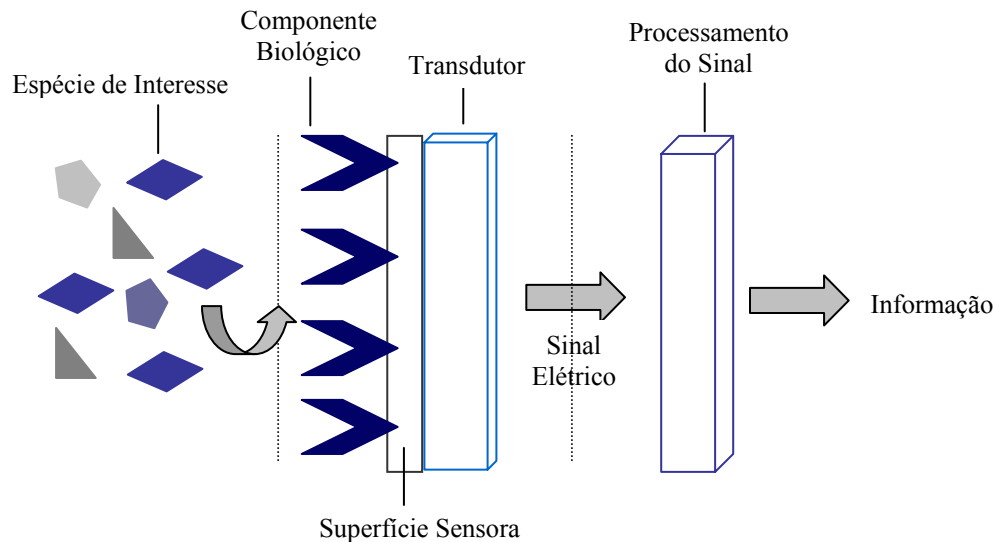


Figura 1: *Desenho Esquemático de um Biossensor*

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 (PERCIVAL et al., 2001), clínica analítica (HE et al., 2007), alimentos (CHANG et al., 2000; SUSMEL et al., 2000; REZA et al., 2002), entre outros. O mercado de Biossensores é bastante

promissor, foram contabilizados investimentos em 2003 de aproximadamente 7,3 bilhões de dólares, mas o mercado está projetado para melhorar e os investimentos serem em torno de 10,8 bilhões de dólares em 2007 com uma taxa de crescimento de aproximadamente 10,4% (LIN & WANG, 2005).

Como elementos biológicos, nos biossensores, podem ser usados: enzimas, sistemas multienzimáticos, anticorpos, antígenos, organelas, peptídeos, 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. 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 (PAVEY, HUNTER & PAUL, 2003); 3- os ópticos (SHIMOMURA et al., 2001; TANG et al., 2006) e 4- os térmicos (CHAUBEY & MALHOTRA, 2002).

2.2.1 Transdutor Piezoelétrico - QCM

O fenômeno da piezoelectricidade é próprio de cristais com estrutura anisotrópica (número igual de cargas positivas e negativas), que não tem centro de simetria. Neles, a

direção do dipolo é orientada por um eixo polar. Quando um cristal deste tipo é colocado em condições de “*stress*” (comprimido ou deformado elasticamente), o dipolo é realinhado determinando o aparecimento de um campo elétrico; da mesma forma, quando um campo elétrico é imposto ao cristal, seu estado vibracional é alterado e o realinhamento do dipolo é observado por uma deformação mecânica no cristal. Genericamente, quando o cristal piezoelétrico é submetido a um campo elétrico alternado, ele entrará num estado vibracional de oscilação harmônica gerando uma onda acústica (AW - do inglês “Acoustic Wave”) podendo operar em frequências na ordem de 10^5 a 10^6 Hz. A natureza cristalina do material, o arranjo geométrico dos eletrodos e a espessura do dispositivo, além de efeitos térmicos e quânticos, resultam em diferentes modos de propagação das AW (GUILBAUT, HOCK & SCHMID, 1992).

Os dispositivos AW vêm sendo largamente empregados nas áreas de comunicação e de transmissão de dados em filtros e circuitos osciladores bastante estáveis. Na área de biossensores, eles vêm sendo explorados como sensores de massa, permitindo detectar frações da ordem de poucos picogramas (TESSIER et al., 1997). A propriedade de sensibilidade à massa está relacionada à propagação das AW. Quando uma pequena quantidade de massa é adsorvida na superfície do cristal, a frequência de propagação das AW é alterada. Portanto, a quantidade de massa pode ser medida pela alteração no valor da frequência de vibração do cristal. Embora, sejam atualmente encontrados dispositivos com diferentes modos de propagação de AW, os que vêm sendo aplicados no desenvolvimento de biossensores são os dispositivos QCM e os SAW (“*Surface Acoustic Wave*”). Entretanto, os dispositivos SAW não vêm sendo explorados por não operarem em meio-líquido (LIN & SHIH, 2003).

Segundo Su e Li (2001), o QCM é um aparelho de medida de massa que opera de acordo com o princípio de Sauerbrey: qualquer mudança na massa do cristal muda a frequência natural de oscilação do QCM proporcionalmente, como descrito pela equação (1) a seguir:

$$\Delta F = -2.3 \times 10^6 F_0^2 \frac{\Delta M}{A} \quad , \text{Equação 1}$$

Onde, ΔF é a mudança de frequência medida em Hz, F_0 é a frequência de ressonância fundamental do cristal de quartzo em Hz, A é a área do eletrodo em cm^2 e Δm , a variação de massa devido à deposição na superfície em gramas.

As primeiras aplicações de dispositivos QCM foram para monitorar a deposição ou evaporação a vácuo da espessura de filmes metálicos, e para a detecção de gases (KING, 1964). Guilbault e Luong (1988) publicou um artigo de revisão identificando detectores para determinação de CO , SO_2 , NH_3 , HCl , compostos organofosfóricos, hidrocarbonetos e outros analitos. Mas estes dispositivos com sistema em batelada têm como limitação as várias etapas de imersão e secagem entre as amostras analisadas. Adicionalmente, este método não oferece dados em tempo real (SETHY, 1994; LIU, WANG & HSIUNG, 2001).

Por outro lado, no sistema de análise em fluxo contínuo (FIA do inglês – “*Flow Injection Analysis*”), as amostras podem ser injetadas sucessivamente devido à solução transportadora ser continuamente renovada (LIU et al., 2003). No FIA, uma célula de fluxo é utilizada para fornecer dados em tempo real sobre o tempo dos eventos de ligação na superfície do cristal. A análise é conduzida inteiramente em solução (BUNDE et al., 1998). Estes sistemas têm a vantagem de permitir respostas “*on-line*”, requerer menor tempo de resposta, além de serem mais reprodutivos, uma vez que são dispensadas as etapas de secagem do material biológico (LIU et al., 2004). A relação entre a variação de frequência e a alteração na quantidade de massa acumulada por um cristal ressonador piezoelétrico em meio líquido foi primeiramente descrita por Kanazawa e Gordon (1985) através da seguinte equação (2):

$$\Delta F = - F_0^{3/2} \left(\frac{\rho_l \eta_l}{\pi \rho_q \mu_q} \right)^{1/2} \quad , \text{Equação 2}$$

Onde, F_0 é a frequência de ressonância do cristal, ρ_l e η_l , são a densidade e a viscosidade absoluta da solução (meio líquido), ρ_q e μ_q , são a densidade e a tensão de cisalhamento do cristal de quartzo, respectivamente. Os detalhes das características do sensor de quartzo em fase líquida podem ser revistos por Thompson et al. (1991). A frequência de ressonância é influenciada pela viscosidade, densidade, condutividade, gravidade específica, superfície rugosa, etc. (BRUCKENSTEIN & SHAY, 1985; NOMURA & TSUGE, 1985)

O QCM-FIA como apresentado na figura 2 consiste, basicamente, em um disco confeccionado em cristal piezelétrico de quartzo revestido nas faces superior e/ou posterior por um depósito metálico (Ex: Ouro). O cristal é colocado em uma célula de fluxo e acoplado a um circuito oscilador responsável pela aplicação do campo elétrico alternado ao cristal, cujo propósito é provocar uma oscilação no centro do cristal piezelétrico. Diretamente ligado ao circuito oscilador aparece um contador de frequência (freqüencímetro) responsável pelo monitoramento das variações na frequência de oscilação do cristal e um computador para obtenção e tratamento dos dados. As amostras são injetadas no fluxo através de uma válvula injetora com a ajuda de uma bomba peristáltica.

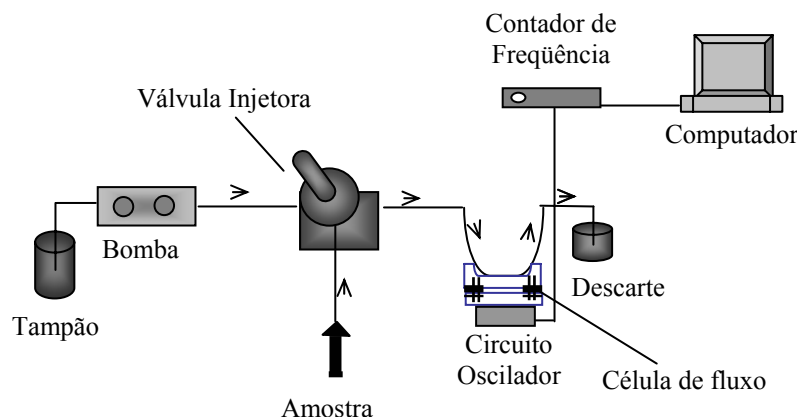


Figura 2: Desenho esquemático de um biossensor QCM - FIA

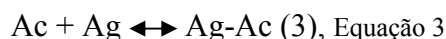
A primeira aplicação, com sucesso, de um dispositivo QCM em FIA foi conduzida por Konash e Bastiaans (1980), através do emprego dos cristais piezoelétricos de quartzo como detectores de massa para cromatografia líquida.

A combinação de QCM-FIA com as interações altamente específicas de antígeno/anticorpo faz surgir uma nova geração de imunossensores que são simples, de fácil uso e permitem a monitoração on-line de imunoreações.

2.3 Imunossensor Piezoelétrico

Com base no reconhecimento do sinal de interesse pelo detector encontram-se, por ex., os imunossensores e sensores enzimáticos. Enquanto que nos sensores com enzima são monitoradas as concentrações de substratos, produtos ou mediadores, nos imunossensores (RICCARDI, COSTA & YAMANAKA, 2002; TANG, YUAN & CHAI, 2007), que são dispositivos analíticos, são monitoradas a reação de afinidade antígeno-anticorpo (Ag-Ac).

No imunoensaio, o sítio combinatório do anticorpo (Ac) ou paratopo interage especificamente com porções mais superficiais (determinantes antigênicos ou epitopos) do antígeno (Ag) ou hapteno (substância não protéica de baixo peso molecular que pode se ligar a sítios específicos de combinação de anticorpos, mas não pode, por si só, iniciar uma resposta imune), formando um complexo Ag-Ac, conforme a Equação 3. Esta interação é caracterizada por uma constante de afinidade que é função das concentrações do complexo formado, do antígeno e do anticorpo livres no meio de reação. Essa interação é mantida por forças fracas, como forças iônicas, ligações de hidrogênio, forças eletrodinâmicas (Van der Waals) e hidrofóbicas, garantindo o fenômeno da especificidade antígeno-anticorpo (FERREIRA & YAMANAKA, 2006). Também podem ocorrer reações não-específicas (reações cruzadas) de outros anticorpos que competem pela ligação com o antígeno (WILSON & ALVES, 1987; RICCARDI, COSTA & YAMANAKA, 2002).



A formação do complexo (Ag-Ac) pode ser monitorada diretamente (sem a presença de marcador) ou pelo método indireto (com a presença de marcadores). Tanto o antígeno quanto o anticorpo podem ser marcados (conjugados) e as enzimas, atualmente, são os marcadores mais empregados em imunoensaios. Quando um anticorpo ou antígeno é ligado, ou imobilizado à superfície sensora, ocorre a formação do imunocomplexo e a energia é transduzida de diferentes formas: eletroquímica, por variação de temperatura, luz ou massa adsorvida produzindo um sinal elétrico.

São três os principais tipos de transdutores envolvidos no desenvolvimento de imunossensores: 1- eletroquímicos (DUTRA et al., 2000; LIN & JU, 2005; CONNEELY et al., 2007), 2-piezelétricos (QCM) (KUROSAWA et al., 2006) e 3- ópticos que utilizam a tecnologia de ressonância de plásmons de superfície - SPR (LARICCHIA-ROBBIO & REVOLTELLA, 2004; DUTRA & KUBOTA, 2007).

A técnica de SPR vem sendo bastante usada na produção de imunossensores, mas uma das limitações desta técnica deve-se à sensibilidade, a espessura óptica medida é relacionada com a massa molecular da camada adsorvida, e pequenas moléculas (massa molecular < 250) como háptenos, ou baixas concentrações, não podem ser mensuradas (SETHY, 1994). Em contrapartida, os imunossensores piezelétricos têm se mostrado mais atrativos, por apresentarem alta sensibilidade e simplicidade (DENG et al., 2006), podendo medir interações monoatômicas, com sensibilidade na ordem de 10^{-12} g e por não necessitarem de espécies eletroativas (Ac ou Ag conjugados à enzimas) no processamento, como ocorre na técnica amperométrica (DU et al., 2007). Isto implica em resultados com menor tempo e possibilidade de monitoração “*on-line*” da interação Ag-Ac.

Na literatura têm sido registradas aplicações de QCM imunossensor em FIA para detecção de albumina do soro humano (LIU, WANG & HSIUNG, 2001), de *Escherichia coli* em alimentos (ADÁNYI et al., 2006), de leucemia (ZHENG et al., 2006) etc.

Apesar de inúmeros registros na literatura, o imunossensor não se encontra totalmente disponível comercialmente para as diversas abordagens, acredita-se que alguns dos fatores sejam, o impacto tecnológico, as diferentes realidades para cada sistema de antígeno ou anticorpo empregado e a etapa de imobilização dessas biomoléculas.

2.4 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 (FREIRE, DURAN & KUBOTA, 2001; WANG et al., 2002). 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 (FATIBELLO-FILHO & VIEIRA, 2002; KRAJEWSKA, 2004).

Existem alguns métodos de imobilização empregados mais regularmente, são eles:

a) Adsorção: Este é o mais simples de todos, implicando em mínima preparação. 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. O biomaterial é mantido aprisionado sobre uma membrana, que é posicionada muito próxima ou acoplada ao transdutor;

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

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 randômica, 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. Neste caso, é muito mais fácil discutir a relação entre a estrutura e a função da superfície modificada (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”) (JIA et al., 2002).

2.4.1 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 (DONG, 2005; FREIRE, PESSOA & KUBOTA, 2003; CHAKI & VIJAYAMOHANAN, 2002). Também são empregadas no estudo da transferência eletrônica direta entre materiais biocatalíticos e eletrodos; na viabilização do uso de sistemas miméticos que empregam sistemas sintéticos com propriedades biocatalíticas, além de proporcionar 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 de materiais (superfície de Pt, Au, Ag, e Cu etc.) e de moléculas anfóteras (como derivados alquil, álcoois, aminas, tióis e etc.) têm sido empregados 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), sendo que os sistemas mais comumente usados têm sido os tióis sobre superfícies de ouro (Au) (CAMPUZANO et al., 2003; ULMAN, 1996; O'DWYER *et al.*, 2004). O grupo terminal de enxofre destas moléculas é ligado ao Au via uma ligação RS-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. Este tipo de formação de SAM envolve uma adsorção irreversível de alcanos funcionalizados sobre superfícies metálicas, devido à ligação RS-Au ser extremamente forte e estável, resultando na obtenção de uma estrutura molecular ordenada, especificamente orientada. Além disso, 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 (FREIRE, PESSOA e KUBOTA, 2003).

Neubert e cols. (2002) demonstraram que a presença das monocamadas auto-organizadas pôde melhorar a sensibilidade do imunossensor, confirmando que o IgG sobre a SAM está imobilizado de modo orientado. Esta característica está evidenciada na figura 3, que mostra esquematicamente a comparação entre métodos de imobilização por adsorção, por encapsulamento ou ligação cruzada e a orientação por SAM de uma biomolécula (GILARDI E FANTUZZI, 2001).

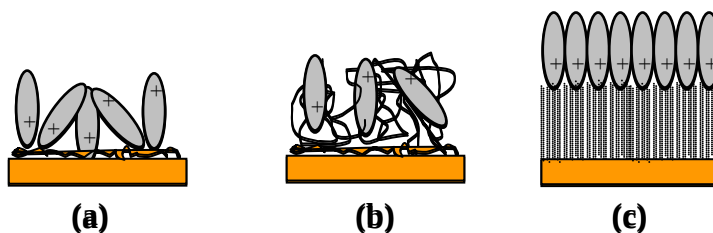


Figura 3: Representação esquemática dos processos de imobilização de biomoléculas por adsorção física (a), encapsulamento por ligação cruzada (b) e acoplamento orientado por SAM (c).

Devido à diversidade nas potencialidades de modificações (químicas e biológicas) dos eletrodos, várias novas aplicações das SAMs são esperadas num futuro próximo. Um exemplo bastante promissor é sua aplicação no desenvolvimento de nanotecnologias para a construção e modificação de arranjos de ultramicroeletrodos (OLIVEIRA E VIEIRA, 2006). Esta possibilidade é de grande interesse para diversas aplicações, tais como clínica, farmacológica, alimentícia, industrial e ambiental (MELO & KUBOTA, 2007).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Determinar a TnT cardíaca humana empregando sistema de microbalança de quartzo por injeção de fluxo;

3.2 Objetivos Específicos

- Propor métodos para imobilização de anti-TnT empregando SAM em suportes de ouro;
- Estabelecer curva de calibração do imunossensor para determinação da troponina T cardíaca humana;
- Estudar comportamento do imunossensor piezoelétrico frente à variação térmica, quantidade de anti-TnT imobilizada e agente bloqueador;
- Testar possível reutilização do imunossensor e
- Realizar ensaios preliminares com soros humanos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADÁNYI, N.; VÁRADI, M.; KIM, N.; SZENDRŐ, I. Development of new immunosensors for determination of contaminants in food. **Current Applied Physics**, 6: 279–286, 2006.

ANTMAN, E. M.; TANASIJEVIC, M. J.; THOMPSON, B.; SCHACTMAN, M.; MCCABE, C. H.; CANNON, C. P.; FISCHER, G. A.; FUNG, A. Y.; THOMPSON, C.; WYBENGA, D.; BRAUNWALD, E. Cardiac-specific troponin I levels to predict the risk for mortality in patients with acute coronary syndromes. **New England Journal of Medicine**, 31: 1342-349, 1996.

ANTMAN, E. M. Decision Making with Cardiac Troponin Tests. **New England Journal of Medicine**, 346: 2079-2082, 2002.

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

BERTINCHANT, J.P.; POLGE, A.; JUAN, J.M.; OLIVA-LAURAIRE, M. C.; GIULIANI, I.; MARTY-DOUBLE, C.; BURDY, J. Y.; FABBRO-PERAY, P.; LAPRADE, M.; BALI, J. P.; GRANIER, C.; DE LA COUSSAYE, J. E.; DAUZAT, M. Evaluation of cardiac troponin I and T levels as markers of myocardial damage in doxorubicin-induced cardiomyopathy rats, and their relationship with echocardiographic and histological findings. **Clinica Chimica Acta**. 329:39-51, 2003.

BERTON, G.; PALATINI, P. Risk stratification after acute myocardial infarction: role of neurohormones, inflammatory markers and albumin excretion rate. **Italian Heart Journal**, 4: 295-304, 2003.

BRUCKENSTEIN, S.; SHAY, M. Experimental aspects of use of the quartz crystal microbalance in solution. **Electrochimica Acta**, 30: 1295-1300, 1985.

BUNDE, R. L.; JARVI, E. J.; JEFFREY, J.; ROSENTERTER, J. J. Piezoelectric quartz crystal biosensors. **Talanta**, 46: 1223– 1236, 1998.

CAMERON, S. J.; SOKOLL, L. J.; LATERZA, O. F.; SHAH, S.; GREEN, G. B. A multi-marker approach for the prediction of adverse events in patients with acute coronary syndromes. **Clinica Chimica Acta**, 376: 168-173, 2007.

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.

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

CHANG, B. W.; HSU, Y. M.; CHANG, H. C. An improving method for determination of *Escherichia coli* population based on multi-channel series piezoelectric quartz crystal system. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 65: 105–107, 2000.

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

CHOU, S. F.; HSU, W. L.; HWANG, J. M.; CHEN, C. Y. Development of an immunosensor for human ferritin, a nonspecific tumor marker, based on a quartz crystal microbalance. **Analytica Chimica Acta**, 453: 181–189, 2002.

CONNELLY, G.; AHERNE, M.; LU, H.; GUILBAULT, G. G. Development of an immunosensor for the detection of testosterone in bovine urine. **Analytica Chimica Acta**, 583: 153-160, 2007.

DENG, C.; LI, M.; XIE, Q.; LIU, M.; TAN, Y.; XU, X.; YAO, S. New glucose biosensor based on a poly (o phenyldiamine)/glucose oxidase-glutaraldehyde/Prussian blue/Au electrode with QCM monitoring of various electrode-surface modifications. **Analytica Chimica Acta**, 557:85-94, 2007.

DONG, Y. The frequency response of QCM in electrochemically characterizing the immobilization on gold electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 108: 622-626, 2005.

DU, D.; XU, X.; WANG, S.; ZHANG, A. Reagentless amperometric carbohydrate antigen 19-9 immunosensor based on direct electrochemistry of immobilized horseradish peroxidase. **Talanta**, 71: 1257-1262, 2007.

DUTRA, R. F.; KUBOTA, L. T. An SPR immunosensor for human cardiac troponin T using specific binding avidin to biotin at carboxymethyldextran-modified gold chip. **Clinica Chimica Acta**, 376: 114–120, 2007.

DUTRA, R. F.; MACIEL NETO, J. O.; FONTANA, E.. Surface Plasmon Resonance Imaging of Immunological Reactions. In: International Symposium on Biomedical Optics, 2000, San Jose - CA - EUA. **International Symposium on Biomedical Optics: Technical Abstract Digest**. Bellingham - WA - EUA: SPIE-The International Society of Optical Engineering, 2000. v. 1. p. 82-87

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 imunoensaios. **Química Nova**, 29: 137-142, 2006.

FREIRE, S. R.; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L. T. Emprego de Monocamadas Auto-Organizadas no Desenvolvimento de Sensores Eletroquímicos. **Química Nova**, 26: 381-389, 2003.

FREIRE R.S.; DURAN N.; KUBOTA L.T Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds. **Talanta**, 54: 681-686, 2001.

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.

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

GODOY, M. F.; BRAILE, D. M.; NETO, J. P. A Troponina como marcador de injúria celular miocárdica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 71: 629-633, 1998.

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.

GUILBAULT, G. G.; HOCK, B.; SCHMID, R. A piezoelectric immunobiosensor for atrazine in drinking water. **Biosensors and Bioelectronics**, 7: 411– 419, 1992.

GUILBAULT, G. G.; LUONG, J. H. Gas phase biosensors. **Journal of Biotechnology**, 9: 565–570, 1988.

HAMM, C. W.; KATUS, H. A. New biochemical markers for myocardial cell injury. **Current Opinion in Cardiology**, 10: 355-360, 1995.

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, 2007.

HERKNER, H.; WALDENHOFER, U.; LAGGNER, A. N.; MULLNER, M.; OSCHATZ, E.; SPITZAUER, S.; GAMPER, G.; BUR, A.; HIRSCHL, M. M. Clinical application of rapid quantitative determination of cardiac troponin-T in an emergency department setting. **Resuscit**, 49: 259-264, 2001.

KALLNER, G.; LINDBLOM, D.; FORSELL, G.; KALLNER, A. Myocardial release of troponinT after coronary bypass surgery. **Scandinavian Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, 28: 67-72, 1994.

KANAZAWA, K. K.; GORDON, J. G. Frequency of quartz microbalance in contact with liquid. **Analytical Chemistry**, 57: 1770-1771, 1985.

KING, W. H. Analytical Uses of the Piezoelectric Crystal. **Analytical Chemistry**, 36: 1735–1739, 1964.

KONASH, P. L.; BASTIAANS, G. J. Piezoelectric crystals as detectors for liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, 52: 1929-1937, 1980

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

KUROSAWA, S.; PARK, J. W.; AIZAWA, H.; WAKIDA, S. I.; TAO, H.; ISHIHARA, K. Quartz crystal microbalance immunosensors for environmental monitoring. **Biosensors and Bioelectronics**, 22: 473–481, 2006.

LARICCHIA-ROBBIO, L.; REVOLTELLA, R. P. Comparison between the surface plasmon resonance (SPR) and the quartz crystal microbalance (QCM) method in a structural analysis of human endothelin-1. **Biosensors and Bioelectronics**, 19: 1753– 1758, 2004.

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

LIN, H. B.; SHIH, J. S. Fullerene C60-cryptand coated surface acoustic wave quartz crystal sensor for organic vapors **Sensors and Actuators B: Chemical**, 92: 243-254, 2003.

LIN, J.; JU, H. Electrochemical and chemiluminescent immunosensors for tumor markers. **Biosensors and Bioelectronics**, 20: 1461–1470, 2005.

LINDAHL, B.; TOOS, H.; SIEGBAHN, A.; VENGE, P.; WALLENTIN, L. Markers of Myocardial Damage and Inflammation in Relation to Long-Term Mortality in Unstable Coronary Artery Disease. **New England Journal of Medicine**, 343: 1139-47, 2000.

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**, 299: 130–135, 2001.

LIU, Y.; YU, X.; ZHAO, R.; SHANGGUAN, D. H.; BO, Z.; LIU, G. Quartz crystal biosensor for real-time monitoring of molecular recognition between protein and small molecular medicinal agents. **Biosensors and Bioelectronics**, 19: 9-19, 2003.

LIU, Y.; ZHANG, W.; YU, X.; ZHANG, H.; ZHAO, R.; SHANGGUAN, D.; LI, Y.; SHEN, B.; LIU, G. Quartz crystal biosensor for real-time kinetic analysis of interaction between human TNF- α and monoclonal antibodies. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 99: 416–424, 2004.

LOUZADA, E. S.; LUCCAS, P. O.; MAGALHÃES, C. S. Construção e Caracterização de um Biossensor Potenciométrico para Determinação de Pirogalol. **Revista Analytica**, 11: 52-56, 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.

MAIR, P.; MAIR, J.; SEIBT, I. Cardiac troponin T: a new marker of myocardial tissue damage in bypass surgery. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**, 7: 674-8, 1995.

MOSCA, L. C-Reactive Protein – To Screen or Not to Screen?. **New England Journal of Medicine**, 347:1615-1617, 2002.

NOMURA, T.; TSUGE, K. Determination of silver in solution with a Piezoelectric detector after electrodeposition. **Analytica Chimica Acta**, 169: 257-262, 1985.

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.

OPAS - ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Doenças Crônicas degenerativas e obesidade: Estratégia Mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde. Brasília, 2003, 60p.

PAVEY, K. D.; HUNTER, A. C.; PAUL, F. Real-time evaluation of macromolecular surface modified quartz crystal resonant sensors under cryogenic stress for biological applications. **Biosensors and Bioelectronics**, 18: 1349-1356, 2003.

PENTTILÄ, K.; KOUKKUNEN, H.; KEMPPAINEN, A.; HALINEN, M.; RANTANEN, T.; PYORALA, K.; PENTTILÄ, I. Myoglobin, creatine kinase MB, troponin T, troponin I - rapid bedside assays in patients with acute chest pain. **International Journal of Clinical and Laboratory Research**, 29: 93-101, 1999

PERCIVAL, C. J.; STANLEY, S.; GALLE, T. M. Molecular-imprinted, polymer-coated quartz crystal microbalances for the detection of terpenes. **Analytical Chemistry**, 73: 4225–4228, 2001.

PIRAS, L.; REHO, S. Colloidal gold based electrochemical immunoassays for the diagnosis of acute myocardial infarction **Sensors and Actuators B: Chemical**, 112: 450-454, 2005.

PLEBANI, M.; ZANINOTTO, M. Cardiac markers: present and future. **International Journal of Clinical and Laboratory Research**, 29: 56-63, 1999.

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

REZA, S.; SELMA, M.; ERHAN, P. Glow-discharge treated piezoelectric quartz crystals as immunosensors for HSA detection. **Biosensors and Bioelectronics**, 00: 1–8, 2002.

RICCARDI, C. S.; COSTA, P. I.; YAMANAKA, H. Imunossensor Amperométrico. **Química Nova**, 25: 316-325, 2002.

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.

SANTALO, B. M.; GUINDO, S. J.; ORDONEZ, L. J. Biological Markers of Myocardial Necrosis. **Revista Española de Cardiología**, 56: 703-720, 2003.

SARKO, J. S.; POLLACK, J. R. Cardiac troponins. Clinical laboratory in emergence medicine. **New England Journal of Medicine**, 23: 57-65, 2002.

SETHY, R. Transducer aspects of biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, 9: 243-264, 1994.

SHIMOMURA, M.; NOMURA, Y.; ZHANG, W.; SAKINO, M.; LEE, K. H.; IKEBUKURO, K.; KARUBE, I. Simple and rapid detection method using surface plasmon resonance for dioxins, polychlorinated biphenyls and atrazine. **Analytica Chimica Acta**, 434: 223-230, 2001.

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

STIEGLER, H.; FISCHER, Y.; VAZQUEZ-JIMENEZ, J. F.; GRAF, J.; FILZMAIER, K.; FAUSTEN, B.; JANSSENS, U.; GRESSNER, A. M.; KUNZ, D. Cardiac Troponin T and I Results in Heparin-Plasma Than in Serum. **Clinical Chemistry**, 46: 1338-1344, 2000;

SU, X. L. ; LI, Y. A self-assembled monolayer-based piezoelectric immunosensor for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7. **Biosensors and Bioelectronics**, 19: 563- 574, 2004.

SUSMEL, S.; O'SULLIVAN, C. K.; GUILBAULT, G. G. Human cytomegalovirus detection by a quartz crystal microbalance immunosensor. **Enzyme Microbial Technoogy**, 27: 639–645, 2000.

TANG, D.; YUAN, R.; CHAI, Y. Biochemical and immunochemical characterization of the antigen–antibody reaction on a non-toxic biomimetic interface immobilized red blood cells of crucian carp and gold nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, 22: 1116-1120, 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.

TESSIER, L; SCHMITT, N.; WATIER, H.; BRUMAS, V.; PATAT, F. **Analytica Chimica Acta**, 347: 207-217, 1997.

THOMPSON, M.; KIPLING, A. L.; DUNCAN-HEWITT, W. C.; RAJAKOVIC, L. V.; CAVIC-VLASAK, B. A. Thicknes-shear-mode acoustic wave sensors in the liquid phase. **Analytic**, 116: 881-890, 1991.

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, I.; WILSON, G. S. In: Biosensores. Fundamentals and applications. **Oxford University Press**. Oxford. 1987, p 770.

ULMAN, A. Formation and structure of self-assembled monolayers. **Chemistry Review**, 96: 1533-1545, 1996.

ZENG, H.; WANG, H.; CHEN, F.; XIN, H.; WANG, G.; XIAO, L.; SONG, K.; WU, D.; HE, Q.; GUOLI, S. Development of quartz-crystal-microbalance-based immunosensor array for clinical immunophenotyping of acute leukemias. **Analytical Biochemistry**, 351: 69-76, 2006.

WANG, C. C.; WANG, H.; WU, Z. Y.; CHEN, G. L.; YIU, R. Q. A piezoelectric immunoassay based on sel-assembly monolayer of cystamine polystyrene sulfonate for determination of *Schistosoma japonicum* antibodies. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 373: 803-809, 2002.

WANG, H. D.; XU, B. S.; LIU, J. J.; ZHUANG, D. M. The friction–reduction model of the iron sulfide film prepared by plasma source ion sulfuration. **Surface and Coatings Technology**, 201:5236-5239, 2007.

WILSON, G. S.; ALVES, U. Rapid Heterogeneous Competitive Electrochem Immunoassay for IgG in the *Picomole Range*. **Analytical Chemistry**, 59: 2786-93, 1987.

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

5. CAPÍTULO 1

Immunoassay of the cardiac troponin T using a flow injection system quartz microbalance

Alessandra B. Mattos ^{a,b}, Tatianny A. Freitas ^{b,c}, José L. Lima-Filho ^{a,b}, Rosa F. Dutra ^{b,c} and Valdinete L. Silva ^{a,d *}.

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

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

^c Departamento de Patologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Brasil, Rua Arnóbio Marques, 310 , Santo Amaro, 50100-130. Recife, PE, Brasil.

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

* Corresponding author
Valdinete Lins da Silva
Tel./Fax: +55-81 21268711
E-mail address: val_leaq@yahoo.com.br

Abstract

Background: The cardiac troponin T (cTnT) is specific biomarker important for trials of acute myocardial infarctions. Quartz crystal microbalance (QCM) biosensor integrated in a flow injection analysis system based on the alteration of electric frequency in response to the antigen-antibody interaction was used for the real-time investigation of the interaction between human cTnT and its specific monoclonal antibody (mAb).

Methods: The gold surface of an electrode quartz crystal was modified by use of cysteamine (CYS) self-assembled monolayer (SAM). The mAb-cTnT was immobilized onto the amine-coated surface via glutaraldehyde.

Results: A positive correlation was found between the cTnT concentration and frequency changes ($R^2 = 0.99678$) and the detection limit was 0.025 ng/ml in this QCM system. The effect of the CYS concentrations on the SAM coated gold sensor was studied as a function of the amount of the immobilized cTnT monoclonal antibodies. The sensor surface could be regenerated by using a solution of 1% (w/v) sodium dodecyl sulphate without losing the sensor immunoreactivity.

Conclusion: It was possible to measure the cTnT without dilution of the human serum with good specificity and reproducibility. Application of the QCM immunosensor to clinical samples demonstrated that results were in good agreement with ELISA.

Keywords: QCM, SAM, troponin T.

1. Introduction

The determination of the cardiac troponin T (cTnT) can contribute to the diagnosis and treatment of infarct acute of the myocardium (IAM) and for the bedding of the patients' risks with acute coronary syndromes because respect the relative risk of mortality. In these patients, troponin has higher sensitivity and specificity compared to creatine kinase or its MB isoform (CK-MB) [1-4]. The cTnT originates exclusively from the myocardium and has a molecular weight of 39kDa [5]. Several methods have been shown to be able to detect the troponin T such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [6], radioimmunoassay (RIA) [7], electrochemiluminescence immunoassay [8] and immunochromatographic [9] tests. However, these tests require labels, involve several steps and time consuming. During the myocardial infarctions (MI) the troponin T is immediately released to bloodstream. Then a sensor able to monitor this cardiac marker in less than 10 min would improve the patient care by allowing a definitive diagnosis of MI in real-time, and having a lower detection limit is more advantageous in providing more sensitive results.

The quartz crystal microbalance (QCM) immunosensor has been attempted as a transducer among immunossensing methods, because it is capable of measure the interaction between proteins and to detect the analytes in complex medium [10-13]. The QCM can be operated as a mass-loading sensor in which the acoustic mode propagates in the direction normal to the plane surfaces of a crystalline plate. When an appropriate alternating electrical potential is applied to gold electrodes on opposite sides of the piezoelectric crystal, the crystal will oscillate at a characteristic frequency, measured as baseline. As the analyte binds the coated surface, there is an increase in mass at the interface, which will decrease the oscillation frequency. The observed frequency change is directly proportional to the increase in mass and can, therefore, be correlated with analyte binding. The QCMs can operate in air or liquid, in air operation the QCM method is not particularly reliable, due to the 'dip-and dry' procedure, handling, and lack of reproducibility [14]. On the other hands, in liquid operation is possible to the real time output and automated or continuous operation suggesting that they are close

to commercialization [15]. Further, QCM biosensor integrated in a flow injection analysis (FIA) system has the advantage to work continuously and to monitor on-line the binding of the analyte [16]. No complicated and irreproducible drying procedures are needed and a highly automated test performance can be achieved. In addition, the binding results in a change of resonance frequency of the crystal and thus immunological marker, such as enzyme or fluorescence labeled tracers, are not necessary. Depending of the resonant crystal frequency, the resonator QCM can be developed to the mass sensitivity extended from the nanogram level to the picogram level.

The relationship between the oscillation frequency change of a quartz resonator in contact with liquid and accumulated mass had first realized by Kanazawa and Gordon (1985) who derived the following equation [17]:

$$\Delta F = - F_0^{3/2} \left(\frac{\rho_1 \eta_1}{\pi \rho_q \mu_q} \right)^{1/2}$$

where F_0 is the resonance frequency of the crystal, ρ_1 and η the absolute viscosity and density of the solution, ρ_q and μ_q the density and shear modulus of the quartz crystal, respectively.

In the manufacture of QCM sensor, the techniques for immobilization of the biomaterials play a significant role. The immobilization process not only ensures the intimate contact of the biological entities with the transducer but also aids in the stabilization of the biological system, enhancing its operational and storage stability [18-20].

Preparation of an immunosensor involves coating the QCM with a functional film to which either antibody or antigen is immobilized by chemical or physical treatment. As a consequence, optimization of immobilization strategies for biomolecules is the key problem to be addressed before such devices can be used on a larger scale [21]. The immobilization procedures should guarantee preservation of the activity of the immobilized biomolecules. Some immobilization methodologies, e.g. cross-linking and covalent attachment [22-26], however can suffer from problems such as reduced

sensitivity and unfavorable detection limits, because of loss of some bioactivity by entities of relatively large size and mass added to the QCM before analyte detection [27]. Regeneration can also cause problems in these immobilization procedures. Direct attachment, which would greatly simplify the immobilization and regeneration processes, can, however, suffer from problems associated with stability and reproducibility. In the work, an attempt to improve sensitivity of immunosensor was achieved by use of self-assembled monolayer (SAM) approaches, in order to enable immobilization of anti-cTnT on QCM immunosensor for trial of the myocardial infarctions. A flow type quartz crystal microbalance immunosensor for real time determination of cTnT is described in this manuscript. SAM of cysteamine (CYS) and glutaraldehyde (GLUT) were used for the immobilization of antibodies to the gold surface of quartz crystals. A frequency was detected as the immunoreaction between the cTnT and its antibodies. Furthermore, cTnT concentrations in buffer and human serum were determined by this QCM sensor. In this report, we show that the QCM measurement is useful for the determination of the cTnT.

2. Materials and Methods

2.1 Reagents

The monoclonal anti-TpT (mAb cTnT) and the human cardiac troponin T were acquired from Roche Diagnostics (Germany). Samples of Human Cardiac Troponin T were collected from venous blood and immediately centrifuged for 120s at 1150 rad/s. An aliquot of serum was analyzed and the remaining serum was frozen at -20°C and stored for three to five weeks. Donors' sera were provided by Oswaldo Cruz Hospital Central Laboratory (Recife, Brazil).

All the reagents were prepared with chemicals of analytical grade. 2- Aminoethanethiol (CYS), 25% GLUT, glycine and Bovine Serum Albumin (BSA) were acquired from SIGMA-ALDRICH (USA). Ethanol and NaOH were purchased from Biotec (USA). A phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, 10mM, used in all experiment, except special remark, was prepared by dissolving 0.2g KCl, 8.0g NaCl,

0.24g KH_2PO_4 and 1.44g Na_2HPO_4 , in 1000mL ultra pure water. All the reagents were prepared with chemicals of analytical grade. The water used in all solution preparations was obtained from a Millipore unit (USA). The quantitative determinations of Troponin T in human serum were processed in the Roche Elecsys 2010 immunoassay analyzer.

2.2 Apparatus

A schematic illustration of the QCM system is depicted in Fig. 1. A 10 MHz AT-cut piezoelectric quartz wafer attached with two gold electrodes of 8 mm diameter acquired from Universal Sensors (New Orleans, U.S.A) was used as the transducer of the QCM biosensor of this study. The QCM electrode was connected to the homemade TTL oscillator coupled to a frequency counter (Agilent, model 011) which was used to register the frequency changing at a microcomputer by RS-232 serial . With the antibody-coated gold surface upside, the crystal was placed with O-rings between two acrylic holders of a self-made flow cell with a nominal internal volume of 150 μL and was fixed by long joints. The samples and the washing solution were injected in the flow cell using an injection valve equipped with a peristaltic pump (Chromatograph ATTO). The pumping rate was set to 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. The flow of solution was stopped during the incubation steps. All experiments were carried out at 25°C and the frequency was monitored in real time with a sample rate of 0.11 Hz.

Insert Figure 1

2.3 Preparation of gold surface of an electrode quartz crystal

Prior to use, the gold surface of the QCM electrode was cleaned with the 'piranha' solution (a 1:3 mixture of 30%, v/v, $\text{H}_2\text{O}_2/\text{conc. H}_2\text{SO}_4$) for 2 min and rinsed with ultrapure water. After that the

QCM electrode was setup in the QCM system, and an ethanol solution was maintained at flow 100 μ L/min during 300 s to remove all organic contaminants.

2.4 Modification of the gold surface with CYS/GLUT methods

The SAM layer of thiols in the QCM electrode was prepared by injection of a solution freshly prepared 25mM CYS in ethanol (150 μ L) into the flow cell for 2h of deposition at stopped flow. After that, the electrode was thoroughly rinsed with PBS at flow during 4 min followed by a injection of 150 μ L of a solution also freshly prepared 2.5% (v/v) GLUT in 50 mM PBS (pH 7.4) to interact with the cysteamine modified-coated QCM surface during 45 min at stopped flow. The sensor disc was rinsed in PBS by 4 min at flow. Finally, the SAM on sensor disc was ready. Immobilization of the mAb cTnT on the SAM was carried out in QCM system.

2.5 Immobilization of mAb cTnT on the gold electrode

The mAb-cTnT (1.2 μ g/mL) in PBS was injected in the flow cell for 1 h and covalent by amino reactive group of mAb-cTnT with the aldehyde terminals was achieved. After coated mAb-cTnT, the flow cell was washed with PBS during 4 min. For blocking non-occupied spots on the sensor surface a solution of 10mM glycine in PBS during 1h was given on the sensor.

2.6. Sample injection of cTnT in the QCM system

Samples containing cTnT (100 μ L) were injected in the flow cell and incubated during 20 min at stopped flow, while the QCM frequency was monitored during an analytical run. After that, the flow cell was PBS washed during 4 min. The non-specific adsorptions were removed by PBS washing at flow of 100 μ L/min. The interaction between immobilized mAb-cTnT and cTnT was removed by injection of a solution of 1% (w/v) SDS dissolved in PBS in the flow cell (150 μ L) during 3 min. Afterwards the flow

cell was washed with PBS and the baseline was restored. Then, the coated sensor disc was ready to new runs. This experiment was performed at room temperature ($25\pm 1^\circ\text{C}$). The flow cell was washed with PBS for 5min until the resonant frequency returned to the baseline.

3. Results and discussion

3.1. Immobilization procedures of the immunoelectrode

Self-assembled monolayer on gold surfaces have become an increasingly important method for molecular immobilization [28,29]. The cysteamine was chose to pursue an SAM having a thiol-terminated linker which attaches it to the gold surface [30]. Amine coupling is known for the random immobilization which causes the ligand to be bound in different orientations. To overcome ligand heterogeneity other immobilization chemistries or ligand capturing can be used, in this work, the coupling cysteamine–glutaraldehyde method was used. The reaction of glutaraldehyde with a primary amino group to form a Schiff base bond has been investigated and applied to covalently binding compounds and antibody-containing amino groups [31]. As reported elsewhere, the gold electrode surface was functionalized with primary amino groups by chemisorptions of cysteamine. The amino tails of SAMs and the mab-cTnT reacted with the aldehyde groups of bifunctional reagent glutaraldehyde. The electrode modification and the immobilization process are illustrated in Fig. 2.

For AT-cut piezoelectric crystals, when materials are deposited or adsorbed on the surface of crystal, an increase in the oscillating mass results with the changes of resonant frequency (ΔF). Therefore, the growth of multilayer films on the sensor surface can be monitored by the decrease of frequency. When the solution of 25mM CYS was injected in a flow cell during approximately 2 h, the frequency shifted was 1.14 GHz with a low low coefficient of variation (CV = 10.10%) as a result of the SAM tightly attached to the gold electrode surface by use of thiol group. The use of ethanol instead of water or buffers to dilute the CYS promoted a more homogeneous layer. After 2.5% GLUT

incubation followed by PBS washing, a shift of 1.81 GHz was observed. The incubation time of glutaraldehyde can affect the multilayer of the immobilized component on the surface. In this assay, the incubation time was controlled at 45 min and the reproducibility achieved in six assays showed a good CV = 13.6%. Although more amount of mAb-cTnT was immobilized when the incubation time was up to 45 min, the relative standard deviation was higher as result of uncontrolled multilayer. Table 1 shows the change of resonance frequency of the SAM preparation on gold sensor in the flow stream of QCM system

Insert Figure 2

Insert Table 1

3.2. Analysis of mass loading by mAb-cTnT

Using the QCM biosensor, the optimal amounts of mass loading by mAb-cTnT could be estimated as function of cTnT interaction [22]. During the layer preparation, the QCM signal was measured online and the optimal mass loading was established from the baseline changes before and after sample injection of cTnT. When different concentration of mAb-cTnT was immobilized (0.1, 0.6, 1.2 and 10.0 $\mu\text{g/mL}$), the optimal response to cTnT interaction was reached at 1.2 $\mu\text{g/mL}$ according to Fig. 3. The amount of antibodies immobilized increased obviously with the increase of antibody concentration from 0.1 to 1.2 $\mu\text{g/mL}$ and stabilized thereafter. In this concentration, the maximal frequency shift was measured as resulting of equilibrium of demanded immobilized antibodies on the QCM electrode.

Insert figure 3

3.3. Optimisation by SAM coupling

The effect in the amount of antibodies immobilized as a fution of the CYS concentration was investigated. Then, a higher concentration of CYS than 25mM was tested so that more amounts of

antibodies could be immobilized achieving the plateau at 25mM, as be noted in Fig. 4. It was a discrete decrease in the amount of immobilized antibodies for the all concentration up to 50mM suggesting that a steric hindrance has occurred due to uncontrolled assembled monolayers on the QCM electrode surface [32]. Then, the concentration of 25mM was chosen for the SAM preparations.

Insert Figure 4

3.4. Response to the cTnT by QCM immunosensor

The calibration curves of the immunosensor were obtained from successive injections of cTnT at the concentration of 0.05 ng/mL followed by PBS washing during 4 min at 100 μ L/min after each injection. The cTnT samples prepared in PBS (pH 7.4; 10mM) were incubated during 20 min at stopped flow, while the QCM signal is being monitored. The interval of incubation was established in our previous studies with serum samples; at 20 min the monitored QCM signal reaches the plateau when the highest concentration of the cTnT measured by this system was bound to the sensor surface. The washing with PBS had the function of dissociating the excess of non-bounded antigens, which imply on false response of the sensor. Moreover the effect due to the different refractive indexes of the samples and PBS stated as baseline are compensated when the flow filled with PBS is monitored, then the changes in the resonant frequency were calculated from difference between PBS and previous baseline (Fig. 5). According to the calibration curve, the immunosensor reached a plateau at 0.55 ng/mL of cTnT and the linear range was up to 0.05 ng/mL (Fig. 6a). The data from the plotted curve presented a high linearity: $r = 0.994$ ($p < 0.0001$, $n=9$), combined with a low relative error of 4.1 % (Fig. 6b). The detection limit (DL), defined as the minimum concentration of cTnT that can be measured and reported with 99% confidence that the analyte concentration is greater than zero, was determined from analysis of a cTnT samples in PBS.

Insert Figure 5

Insert Figure 6a and 6b

3.4. Effect of temperature and blocking agent

Association and dissociation rate constant increase with increasing temperature because of increasing diffusion rate between biomolecules. In this work, the effect of temperature was studied as function of the mAb-cTnT and cTnT interaction. Figure 7 shows the thermodynamic curves established at different temperature of incubation between mAb-cTnT at 1.2 $\mu\text{g/mL}$ mAb-cTnT with different concentrations of the cTnT (0.1ng/mL, 1.0ng/mL, 2.0 ng/mL and 4ng/mL). Time the incubation time of 20 min was chosen to remain studies.

As noticed, the curves reached the plateau approximately at temperature up to 37° C, probably due to the increase in the equilibrium constant that can be explained by the change in dissociation rate constant, which increases with rising of temperature [33].

It is important to block the unreacted sites on the sensor surface to reduce the amount of nonspecific binding of proteins during subsequent steps in the assay. The ideal blocking buffer will bind to all potential sites of nonspecific interaction, eliminating background altogether without altering or obscuring the epitope for antibody binding. For true optimization of the blocking step for a particular immunosensor, empirical testing is essential. Many factors, including various protein: protein interactions unique to a given set of immunoassay reagents, can influence nonspecific binding. No single blocking agent is ideal for every occasion since each antibody-antigen pair has unique characteristics [34]. The BSA is an important blocking agent used in ELISA immunoassays, however when applied in QCM immunosensor showed a irregular response. In this work, a comparison of two different blocking agents showed that the glycine was 17% better than the BSA (Fig. 8). Then, the glycine resulted at a low of non-specific binding.

Insert Figure 7

Insert Figure 8

3.6. Regeneration of the immunosensor

Regeneration strategy is a key factor for developing a practical and advantageous QCM immunosensor. In many QCM immunosensors employing direct-binding strategy for antibody immobilization, although regeneration is done by only removing the analyte, those dissociating agents cannot desorb the antigen completely. At the same time, these methods involve relatively aggressive chemicals that could partially desorb the bound antibody and reduce the lifetime and reusability of the coated crystal [35]. Some studies have pointed out 0.1 M NaOH solutions to disrupt the immunocomplex [36,37]; however, this solution did not restore the baseline after PBS washes, indicating that not all antigens were leached out from the surface (Fig. 9). In the present study, 1% (w/v) SDS prepared in PBS was efficiently employed for the total elution of the antigen. The concentration of SDS and time of exposure of the SDS solution were optimized not only to remove the antigen from the sensor surface, but also to preserve the antibody activity. As can be seen in Fig. 9, only a partial elution of the cTnT at concentration 0.1% and 0.2% SDS (during 5 min exposure) was reached. When 1% SDS (during 3 min exposure) was employed, the baseline was totally restored so that new cycles in the SPR sensor were possible. Serum samples were successively injected in the SPR system, followed by PBS washes. As can be observed, not only the cTnT was removed, but other non-specific proteins present in the serum adsorbed at the sensor surface were also leached out. The results showed that 1% SDS surfactant was needed to restore the baseline and preserved a good sensitivity of immunosensor.

Insert Figure 9

3.7. Measuring in the human serum samples

To accomplish the human cTnT QCM response in complex medium, serum samples (100 μ L) was injected in the flow cell and incubated during 15 min, after that the non specific adsorption was

removed washing out with PBS at 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ and the shift of frequency was monitored for 5 minutes. The experiment was conducted at room temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). The main advantage of the stopped flow rate during the incubation steps is the practice, faster and is possible to measure the cTnT without dilution of serum sample. A low volume of human serum used is often desirable in the conventional methods of clinical routine. The amount cTnT of serum samples was previously measured by Roche Elecsys 2010 immunoassay analysers based on ECLIA -Electrochemiluminescence immunoassay. The QCM curve plotted as response to the concentration of cTnT in the serum samples presented a linear correlation, $r = 0.97312$ ($p < 0.005$), see Figure 11. The error bars corresponding to standard deviation from three replicates analysis from a single sample after regeneration with 1% (w/v) SDS. The results in Table 2 show the comparison between biosensor and ECLIA methods for different serum concentration. A paired ttest was processed and the measurements of this QCM immunosensor to cTnT determinations showed a good agreement with the ECLIA methods at 95% confidence interval. These results show that the new QCM immunosensor to cTnT determinations presented good reproducibility and agreement with the ECLIA methods.

Insert Figure 10

Insert Table 2

Conclusion

The developed QCM associated with FIA system is believed to share even more economical and simple than the immunoassay methods. From the practical viewpoint, protein immobilization on chip surface via SAM approach can easily be scaled up. The sensitivity, ease of operation, minimal sample processing, and economical cost are unique advantages for bringing QCM in routine clinical for determination of the cardiac troponin T. This technique has the advantage of being faster and permitting a label-free analysis of serum.

ACKNOWLEDGMENT

The authors acknowledge FACEPE and CAPES agencies from Brazil for financial support. The assistance of Doctor Dilenia Cipriano from the Oswaldo Cruz hospital central laboratory (Recife, Brazil) is also acknowledged.

REFERENCES

- [1] Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P, Wallentin L. Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. *N Engl J Med* 2000;343:1139–47.
- [2] DeFilippi CR, Tocchi M, Parmar RJ, Rosanio S, Abreo G, Potter MA, Runge MS, Uretsky BF. Cardiac troponin T in chest pain unit patients without ischemic electrocardiographic changes: angiographic correlates and long-term clinical outcomes. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:1827–34.
- [3] The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee. Myocardial infarction redefined—a consensus document of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 959–69.
- [4] Cameron SJ, Sokoll LJ, Laterza OF, Shah S, Green GB. A multi-marker approach for the prediction of adverse events in patients with acute coronary syndromes. *Clinica Chimica Acta* 2007; 376: 168-173.
- [5] Dutra RF, Kubota LT. An SPR immunosensor for human cardiac troponin T using specific binding avidin to biotin at carboxymethyldextran-modified gold chip. *Clinica Acta* 2007; 376: 114-120.

- [6] Katus HA, Remppis A, Looser S, Hallermeier K, Scheffold T, Kubler W. Enzyme linked immunoassay of cardiac troponin T for the detection of myocardial infarction in patients. *Mol. Cell. Cardiol.* 1989; 19:1349-1353.
- [7] Cummins B, Auckland ML, Cummins P. Cardiac-specific troponin-I radioimmunoassay in the diagnosis of acute myocardial infarction. *Am. Heart J.* 1987; 113:1333-44.
- [8] Stiegler H, Fischer Y, Vazquez-Jimenez JF, Graf J, Filzmaier K, Fausten B, Janssens U, Gressner AM, Kunz D. Lower Cardiac Troponin T and I Results in Heparin-Plasma Than in Serum. *Clinical Chemistry* 2000; 46:1338-1344.
- [9] Penttilä K, Koukkunen H, Kemppainen A, Halinen M, Rantanen T, Pyörälä K, Penttilä I. Myoglobin, creatine kinase MB, troponin T, and troponin I - rapid bedside assays in patients with acute chest pain. *Intern. J. Clin. & Lab. Res.* 1999; 29:93 – 101.
- [10] Lin HC, Tsai HC. Piezoelectric crystal immunosensor for the detection of staphylococcal enterotoxin B. *Biosens. Bioelectron.* 2003; 18:1479 -83.
- [11] Sota H, Yoshimine H, Whittier RF, Gotoh M, Shinohara Y, Hasegawa Y, Okahata Y. A Versatile Planar QCM-Based Sensor Design for Nonlabeling Biomolecule Detection. *Anal. Chem.* 2002; 74:3592–3598.
- [12] Zeng H, Wang H, Chen F, Xin H, Wang G, Xiao L, Song K, Shen G. Development of quartz-crystal-microbalancebased immunosensor array for clinical immunophenotyping of acute leukemias. *Anal. Biochem.* 2006; 351:69-76.

- [13] Lu F, Lee HP, Lima SP. Quartz crystal microbalance with rigid mass partially attached on electrode surfaces, *Sens. Actuat. A* 2004; 112:203–210.
- [14] Wu A, Syu M. Synthesis of bilirubin imprinted polymer thin film for the continuous detection of bilirubin in an MIP/QCM/FIA system *Biosensors and Bioelectronics* 2006; 21:2345-2353.
- [15] Pribyl J, Hepel M, Halamek J, Skladal P. Development of piezoelectric immunosensors for competitive and direct determination of atrazine. *Sensors and Actuators B-Chemical* 2003; 91:333-341.
- [16] Liu Y, Zhang W, Yu X, Zhang H, Zhao R, Shangguan D, Li Y, Shen B, Liu G. Quartz crystal biosensor for real-time kinetic analysis of interaction between human TNF- α and monoclonal antibodies. *Sensors and Actuators B* 2004; 99:416–424.
- [17] Kanazawa KK, Gordon JG. Frequency of a quartz microbalance in contact with liquid. *Anal. Chem.* 1985; 57:1770-1771.
- [18] Gerdon A, Wright D, Cliffl D. Quartz crystal microbalance detection of glutathione-protected nanoclusters using antibody recognition. *Anal. Chem.* 2005; 77:304-309.
- [19] Frederix F, Bonroy K, Laureyn W, Reekmans G, Campitelli A, Dehaen W, Maes G. Enhanced performance of an affinity biosensor interface based on mixed self-assembled monolayers of thiols on gold. *Langmuir* 2003; 19:4351–4357.
- [20] Ge B, Lisdat F. Superoxide sensor based on cytochrome c immobilized on mixed-thiol SAM with a new calibration method. *Anal. Chim. Acta* 2000; 454:53-64.

[21] Wang C, Wang H, Wu Z, Shen G, Yu R. A piezoelectric immunoassay based on self-assembled monolayers of cystamine and polystyrene sulfonate for determination of *Schistosoma japonicum* antibodies Anal Bioanal Chem 2002; 373 :803–809.

[22] Bassam SA, Suleiman AA. A piezoelectric immunosensor for the detection of cocaine. Microchem. J. 1996; 54:174–179.

[23] Deng C, Li M, Xie Q, Liu M, Tan Y, Xu X, Yao S. New glucose biosensor based on a poly(*o*-phenylenediamine)/glucose oxidase-glutaraldehyde/Prussian blue/Au electrode with QCM monitoring of various electrode-surface modifications. Analytica Chimica Acta 2006; 557:85-94.

[24] Grubor NM, Shinar R, Jankowiak R, Porter MD, Small GJ. Novel biosensor chip for simultaneous detection of DNA-carcinogen adducts with low-temperature fluorescence. Biosens. Bioelectron. 2004; 19:547–556.

[25] TSAI, W. C.; LIN, I. C. Development of a piezoelectric immunosensor for the detection of alpha-fetoprotein. Sensors and Actuators B 106 (2005) 455–460

[26] Ye J, Letcher SV, A.G. Rand, Piezoelectric biosensor for detection of *Salmonella typhimurium*, J. Food Sci. 62 (1997) 1067– 1071.

[27] Bunde RL, Jarvi EJ, Rosentreter JJ. Piezoelectric Quartz Crystal Biosensors. Talanta 1998; 46:1223–1236.

[28] Fenter P, Eberhardt A, Eisenberger P. n-Alkyl Thiols Self-Assemble as Disulfides on Au(111) Science 1994; 266:1216-1218.

[29] Prime KL, Whitesides GM. Self-assembled organic monolayers: model systems for studying adsorption of proteins at surfaces. *Science* 1991; 252:1164-1167.

[30] 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.

[31] Harteveld JLN, Nieuwenhuizen MS, Wils ERJ. Detection of staphylococcal enterotoxin B employing a PZ immunosensor. *Biosens. Bioelectron.* 1997; 12:661-667.

[32] Liu Y, Lu H, Zhong W, Song P, Kong J, Yang P, Girault HH, Liu B. Multilayer-assembled microchip for enzyme immobilization as reactor toward low-level protein identification *Anal Chem.* 2006; 78:801-808.

[33] Zeder-Lutz G, Zuber E, Witz J, Van Regenmortel MHV. Thermodynamic analysis of antigen-antibody binding using biosensor measurements at different temperatures. *Analytical Biochemistry* 1997; 246:123-132.

[34] Zhihong Shen Z, Stryker GA, Mernaugh RL, Yu L, Yan H, Zeng X. Single-Chain Fragment Variable Antibody Piezoimmunosensors. *Anal. Chem.* 2005; 77:797-805

[35] Hu J, Liu L, Danielsson, B, Zhou X, Wang L. Piezoelectric immunosensor for detection of complement C₆. *Anal. Chim. Acta* 2000; 423:215–219.

[36] Chen K, Chen S, Lin H, Yan T, Tseng C. A novel technique to immobilize DNA on surface of a quartz crystal microbalance by plasma treatment and graft polymerization. *Materials Science and Engineering: C*, In Press, Corrected Proof, Available online 14 September 2006,

[37]Park I-S, Kim D-K, Adanyi N, Varadi M, Kim N. Development of a direct-binding chloramphenicol sensor based on thiol or sulfide mediated self-assembled antibody monolayers. Biosensors and Bioelectronics 2004; 19:667-674.

Figure 1.

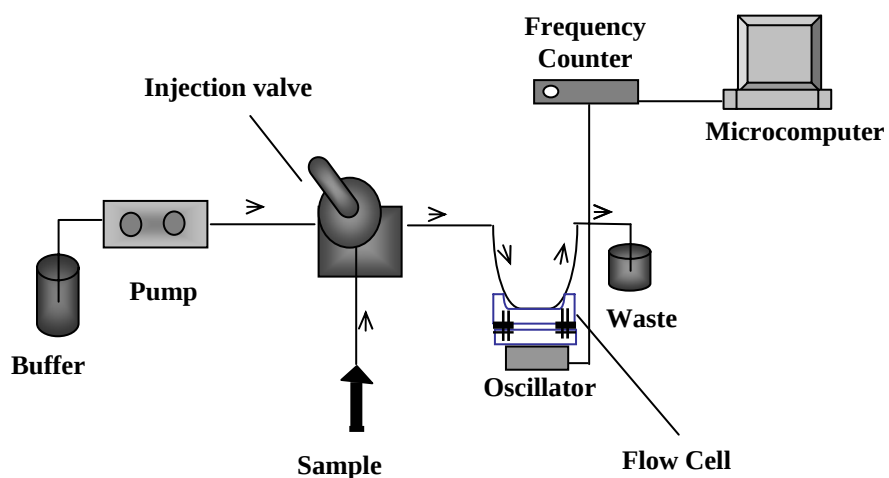


Figure 2.

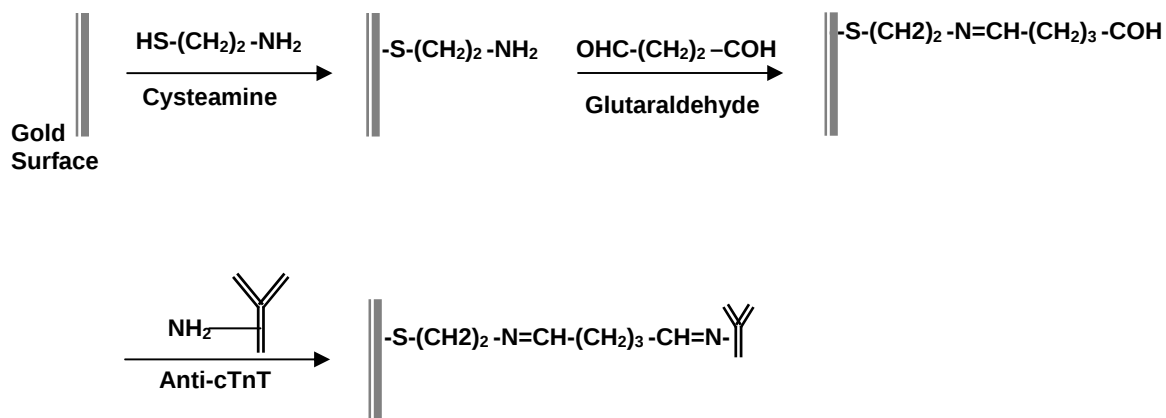


Figure 3.

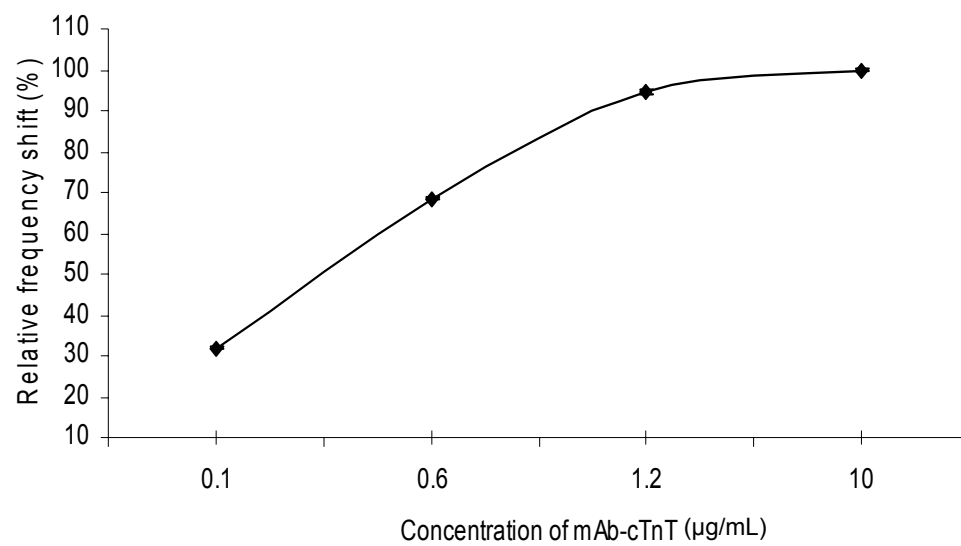


Figure 4.

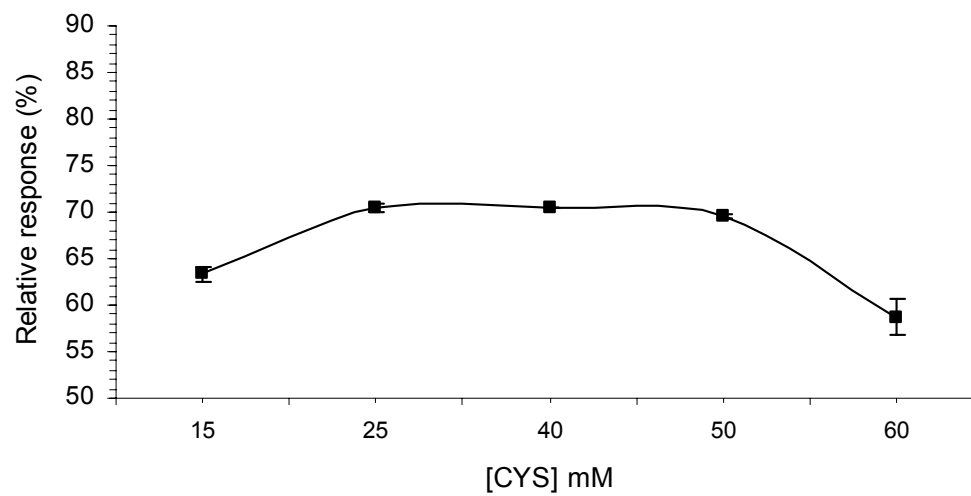


Figure 5.

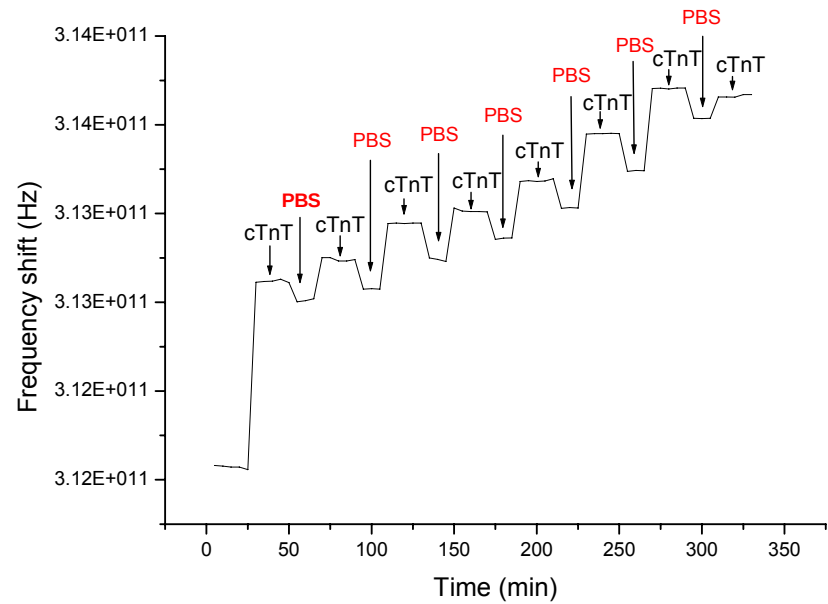


Figure 6.

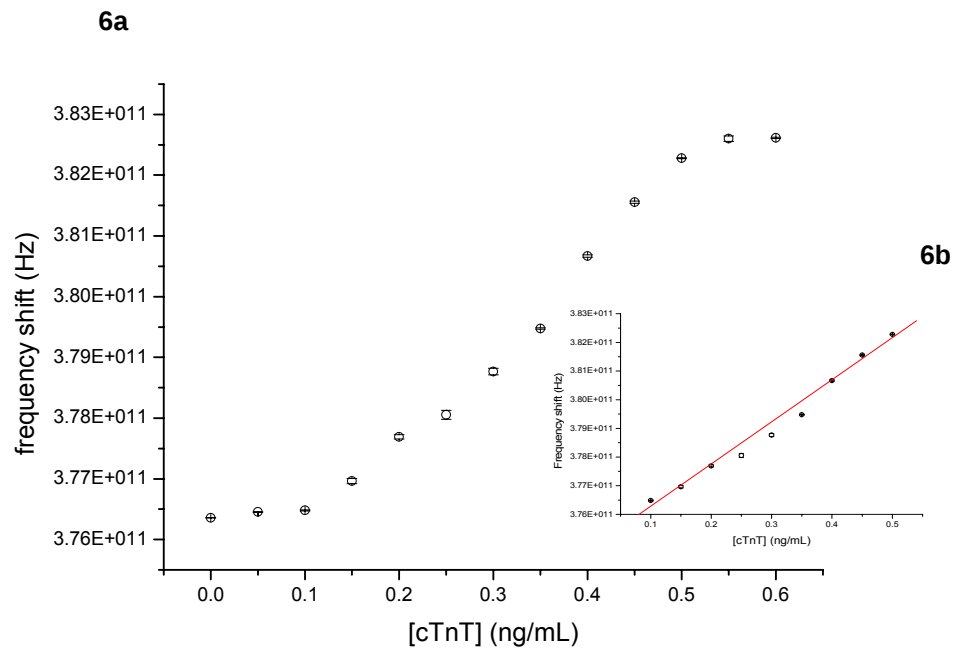


Figure 7

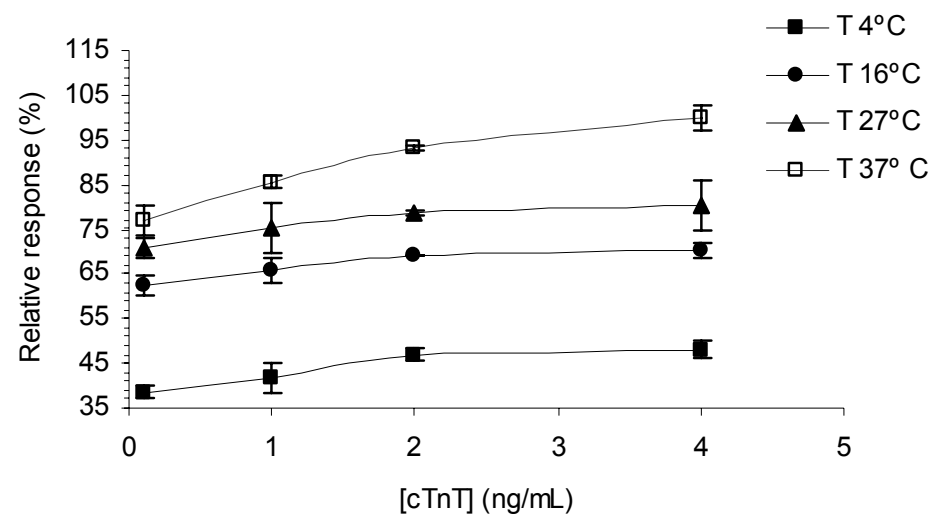


Figure 8

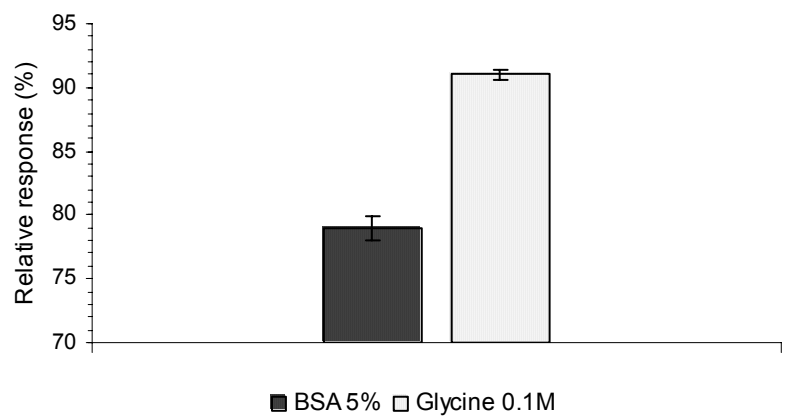


Figure 9

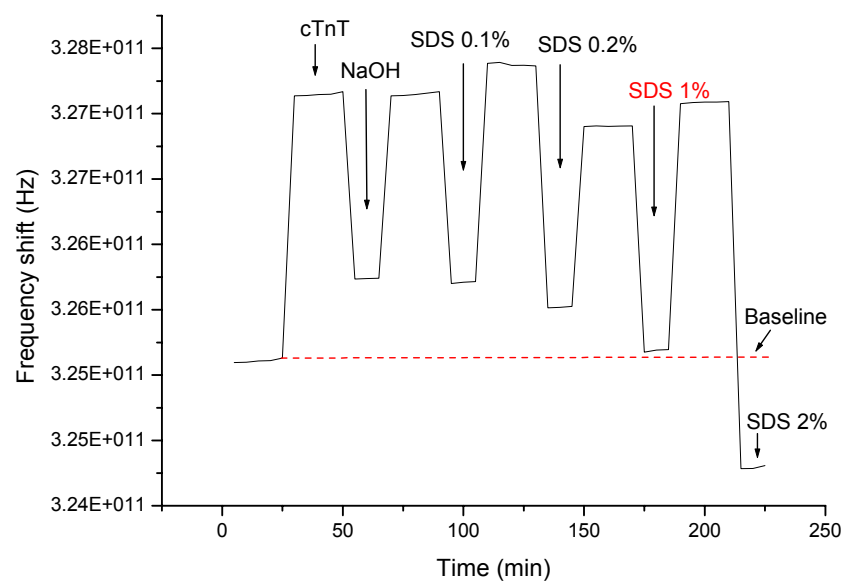


Figure 10.

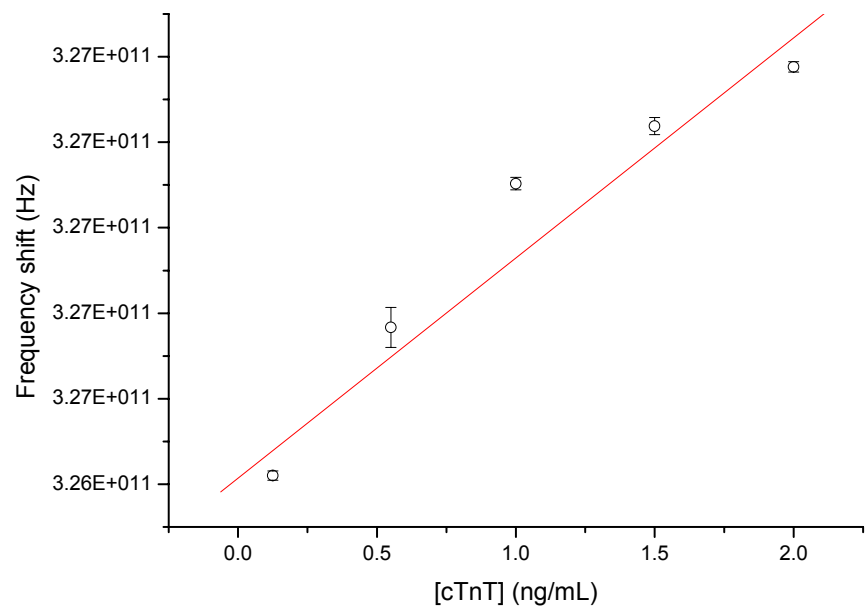


Table 1.

<i>Frequency shift of quartz crystal for immobilizing antibody procedure</i>			
Frequency Shift	CYS	GLUT	mAb-cTnT
$\Delta F(\text{Hz})$ (mean $\pm$ S.D.) ^a	$1.13 \times 10^{10} \pm 1.14 \times 10^9$	$1.98 \times 10^8 \pm 2.7 \times 10^7$	$1.48 \times 10^8 \pm 5.1 \times 10^5$
CV (%)	10.1	13.6	0.34
<i>a Standard deviations (S.D.) of five results.</i>			

Table 2.

<i>Concentration of cTnT in serum (ng/mL)</i>	
<i>ECLIA</i>	<i>QCM Immunosensor</i>
0.125	0.138
0.51	0.5
1.02	0.93
1.57	1.55
2.01	2.04

Captions for Figures

Figure 1. Schematic representation of the principle of QCM immunosensor for cTnT determinations.

Figure 2. Illustration of the immobilization scheme of mAb-cTnT.

Figure 3 Analysis of mass loading by mab-cTnT at concentrations of 0.1 µg/mL, 0.6 µg/mL, 1.2 µg/mL and 10 µg/mL.

Figure 4. Effect of the concentration of CYS for thiol monolayer as a function of the amount of the immobilized cTnT monoclonal antibodies. Means in five replicates assays.

Figure 5. Sensorgram of response of immunosensor for cTnT in successive injections of 0.05 ng/mL cTnT in PBS. The change in resonance frequency was considered after the injection of PBS. The experiment was conducted at room temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) at pH 7.4.

Figure 6. (a) Calibration curve of QCM immunosensor for 0.05NG1.0 ng/mL cTnT injections with immobilized mab anti-cTnT (1.2 µg/mL).; (b) Linear fit as function of cTnT concentration in four replicates run ($r = 0.994$; $p < 0.0001$, $n=9$),.

Figure 7. Effect of temperature as function of interaction of mAb-cTnT and cTnT at concentrations of 0.1ng/mL, 1.0 ng/mL, 2.0 ng/mL and 4.0 ng/mL. The error bars represent the standard deviation in four replicates.

Figure 8. Efficacy of block with 0,1M glycine and 1% BSA (w/v) after the 1.2 µg/mL mAb-cTnT immobilization.

Figure 9. Sensorgram illustrative of the regeneration with 0.1 M NaOH and SDS at concentrations of 0.1%, 1% and 2% (w/v) when a fixed concentration of 0.2 ng/ml of cTnT was injected in the QCM system over 1.2 µg/ml of mAb-cTnT immobilized sensor chip. The experiment was conducted at room temperature.

Figure 10. Response of QCM immunosensor for the samples of serum at different concentration of cTnT measured by ECLIA methods. Means of three replicates analysis after regeneration with 1%SDS.

Captions for Tables

Table 1: Change of resonance frequency of the SAM preparation on gold sensor in the flow stream of QCM system.

Table2: Results of concentrations of cTnT from human serum measured by ECLIA methods and average on three replicates in the QCM immunosensor from different serum samples.

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados, pode-se concluir que:

- A imobilização de anti-TnT 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-TnT na concentração de 25mM de cisteamina;
- Foi possível a reutilização do imunossensor com restauração do material imobilizado quando usada uma solução de 1% SDS;
- A curva de calibração atingiu atividade máxima de ligação do cTnT em aproximadamente 1.2µg/mL de anti-TnT;
- O sistema mostrou-se viável para detecção de anticorpos no soro humano, com limite de detecção de 0,05ng/mL de TnT comparados ao método ECLIA.
- Os ensaios preliminares com o biossensor em soro humano mostraram-se viáveis;
- Um método diagnóstico rápido para dosagem de TnT foi proposto abrindo perspectivas para o desenvolvimento de um método portátil e de menor custo que possa ser aplicado na clinica médica.

7. ANEXO

7.1 Normas da Revista



Clinica Chimica Acta



International Journal of Clinical Chemistry and Diagnostic Laboratory Medicine

Impact Factor: 2.149

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 on the Antibody Orientation at L-Lysine Self-Assembled Monolayers Modified Aluminum Support for Immunosensing Electrodes Development

Santos, R. F. R.^{1,2}; Mattos, A. B.^{1,2}; Freitas, T. A.^{2,5}; Lima-Filho, J. L.^{1,2};
Dutra, R. F.^{2,3}; *Silva, V. L.^{1,4}

1. Departamento de Bioquímica / UFPE; 2. LIKA – Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami / UFPE; 3. Departamento de Patologia / Universidade de Pernambuco - UPE; 4. Departamento de Engenharia Química / UFPE; 5. Instituto de Ciências Biológicas / UPE.

The coupling of a biological sensing element (such as antibodies, enzyme or cells) with a transducer, either electrochemical, optical or piezoelectric, is the basis of biosensor. The two crucial components of the biosensor are usually integrated by the immobilization of the biorecognition molecule onto the surface of the transducer. Immobilization of the biomolecule is a particularly demanding aspect of the fabrication of the biosensors as the immobilization procedure must maintain the biorecognition molecule close to the transducer surface, while retaining its biological activity, a reproducible manner. The use of self-assembled monolayers (SAMs) can potentially provide a reproducible and robust method of fabrication immobilized antibodies layers where some control over the orientation and distribution of the antibodies is afforded. The aim of this work is to specifically study on the antibody orientation at L-lysine SAM modified aluminum supports. The SAM modified aluminum support was prepared by incubating 10mM 3-Mercaptopropionic acid (3-MPA) in ethanol for 2h at room temperature. For the coupling of antibodies, the surface was treated with 50mM 3-(dimethylamino-propylethyl)-N-ethylcarbodiimide/ 50mM N-hydroxysuccinimide in PBS (pH 5.0) for 30 min followed by incubation 0.1% (w/v) lysine in PBS, then a solution 1 μ g/mL of immunoglobulin G (IgG) was incubated for 30 min. In order to block the other reactive sites, 1% (w/v) bovine serum albumin solution was used for 30 min. In comparison to the control, the use of lysine was better the antibodies orientation, and the average of absorbance measure was twice more than the control (without lysine). In addition, the pH effects were also evaluated showing best results at pH 9.6. Finally, these results showed the lysine at SAM modified metallic surface can improve the immunosensing electrode performance.

7.2.2 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

Immunoenzimatic 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

7.2.3 VIII Reunião Regional Nordeste da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq

A novel capacitive sensor based on aluminum-deposited silicon wafer for immunodiagnosis

Renata F.R.Santos^{1,2}; Alessandra B.Mattos^{1,2}; Tatianny A.Freitas^{1,3}
Elder A.Vasconcelos⁴; Valdinete L.Silva⁵; Rosa F.Dutra^{1,3}

¹Laboratório Imunopatologia Keizo Asami/UFPE; ²Depto.Bioquímica/UFPE; ³Instituto Ciências Biológicas/UPE; ⁴Depto.Física/UFPE; ⁵Depto.Engenharia Química/UFPE

The interest concerning fast and sensitive techniques for diagnosis has increased as a consequence of the rapid developments within the biotechnology. The capacitive biosensor has a metal surface transducer with immobilized specific antibodies. The interactions between the antibodies and the target analyte result in a capacitance change at the solid-liquid interface due to alterations of the electric double layer created in close proximity to the transducer during the applied potential pulses. The main advantages is that no labels is necessary, since the binding of the antigen was detected directly. In this work, microelectrodes was performed by thermal evaporation on the backside of silicon wafer, the aluminum-deposited silicon wafer was annealed for the purpose of performing ohmic contact between two strips. The purposed microelectrode was coupled to a Parameter Analyser(Hewlett-Packard,USA) for potentiostatic capacitance measurements. The capacitive sensor consisted of self-assembled of thiols compounds on aluminum strips to which antibodies towards. As model of antibodies was used immunoglobulin G(anti-IgG). The self-assembled monolayer onto electrodes was obtained by immersing of the silicon wafers in a cysteamine solution(25mM) followed by glutaraldehyde for cross linking immobilization of anti-IgG. The capacitive response to the immobilization was proportional to the amount of the IgG attached to the anti-IgG immobilized. This developed platform can be applied for several immunoassay systems due to rapid and low cost advantaging.

Keywords: biosensor, silicon wafer, immunodiagnosis

Supported-by: CNPq, FACEPE, UPE

Study of self-assembled monolayers of thiols on gold electrodes for immunosensors

Alessandra B. Mattos^{1,2}; Tatianny A. Freitas^{2,3}; Renata F. R. Santos^{1,2};
M^a Mascena D. Maia²; Rosa F. Dutra^{2,3}; Valdinete L. Silva⁴

¹Depto. Bioquímica/UFPE; ²Laboratório Imunopatologia Keizo Asami/UFPE; ³Instituto Ciências Biológicas/UPE; ⁴Depto. Eng. Química/UFPE

The immobilization step of the molecule is a particularly demanding aspect in the fabrication of the immunosensors. As the immobilization procedure must maintain the biorecognition molecule close to the transducer surface, while retaining its biological activity, a reproducible manner. The use of Self-Assembled Monolayers(SAMs) can potentially provide a reproducible and robust method of fabrication immobilized antibodies layers. In this work, two methods of SAM of thiols were tested for the immobilization of immunoglobulin G(IgG) aiming their use in a piezoelectric immunosensor. The electrodes consisted of a quartz crystal wafer sandwiched by two gold contacts (0.78cmΦ). Two methods of immobilization were tested: via 3-mercaptopropionic acid(MPA) mixed to 11-Mercaptoundecanoic acid(11-MUA) and via Aminoethanethiol(AET). In the first method, the electrodes were immersed in a mixture equimolar of 3-MPA and 11-MUA (10mM), followed by incubation with *N*-hydroxysuccinimide 0,2M/ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide 0,1M(1:1). In second method, the electrodes were immersed in a solution of 25mM of AET, followed by glutaraldehyde 2.5%(v/v). After the SAM obtained, an IgG solution were incubated for 1h. Studies of concentration of immobilized antibodies, pH stability and blocking agent were carried out. As comparing the two methods, the via AET immobilization showed more sensitivity and reproducibility than the mixed via 3-MPA and 11-MUA.

Keywords: immunosensor, SAM, gold electrode
Supported-by FINEP and FAPESP.