

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA

**Orientação de anticorpos em alumínio empregando
monocamadas auto-organizadas para produção
de microsensores capacitivos**

Renata Fabiana Rodrigues Santos

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

**Co-orientadores: Prof^a Dra. Rosa Fireman Dutra;
Prof^a Dra. Vera Lúcia Menezes;
Prof. Dr. Élder Alpes Vasconcelos.**

Recife, 2007.

Renata Fabiana Rodrigues Santos

**Orientação de anticorpos em alumínio empregando
monocamadas auto-organizadas para produção
de microsensores capacitivos.**

Excluído: ¶

Excluído: *microchips*

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

Recife, 27 / 02 / 2007

Santos, Renata Fabiana Rodrigues

Orientação de anticorpos em alumínio empregando monocamadas auto-organizadas para produção de microsensores capacitativos. – Recife: A Autores, 2007.

56 folhas: il.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – UFPE. CCB.

1. Imunossensor capacitivo 2 Alumínio 3. Monocamada auto-organizada I. Título.

**572
577.1**

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

**UFPE
CCB - 2007 - 072**

Ata da defesa de dissertação da Mestranda **Renata Fabiana Rodrigues Santos**, realizada em 27 de fevereiro de 2007, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Às 09:15 minutos do dia 27 de fevereiro de 2007, foi aberto, no Depto. de Engenharia Química/UFPE, o ato de defesa de dissertação da mestranda, **Renata Fabiana Rodrigues Santos**, 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. Vera Lúcia de Menezes Lima, do Depto. de Bioquímica/UFPE, e da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: Valdinete Lins da Silva, do Depto. de Engenharia Química/UFPE, na qualidade de Presidente, Ranilson de Souza Bezerra, Maria das Graças Carneiro da Cunha, Maria Elizabeth Cavalcante Chaves, os três do Depto. de Bioquímica. Após as apresentações, a Sra. Presidente convidou a aluna para a apresentação de sua dissertação intitulada: "**Orientação de anticorpos em alumínio empregando monocamadas auto-organizadas para produção de microsensores capacitivos**", 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 40 (quarenta) 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. Maria Elizabeth Cavalcante Chaves, em seguida para a Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha, e finalmente para o Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra, 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, 27 de fevereiro de 2007.

Valdine

José Apolônio de Oliveira

Maria Elizabeth Cavalcante Chaves
Maria das Graças Carneiro da Cunha
Ranilson de Souza Bezerra
Humberto Francisco de Paula

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por sempre iluminar meus caminhos e minha mente, pelo infinito amor e sua eterna bondade.

Aos meus irmãos da espiritualidade pela eterna ajuda e orientação.

Ao meu amigo espiritual a minha eterna gratidão.

Aos meus pais, minha maior riqueza, pelo verdadeiro amor, carinho, dedicação e por lutarem sempre por mim. A minha irmã que sempre esteve ao meu lado e que eu tanto amo e adoro. Ao meu cunhadinho Charles que tanto adoro.

Aos meus orientadores, Valdinete, Vera Menezes, Rosa Dutra e Élder, pela oportunidade no desenvolvimento deste trabalho que foi valioso no meu crescimento profissional; mas também pela amizade, compreensão, apoio e atenção.

A todos os meus colegas de turma, Alessandra, Chirley, Jayra, Flávia, Éricka, Danny, Elaine, Paula, Igor, Cynthia, Janielle, Alba, Nice, Humberto, Fernanda, Marcela, Juliene, Rosa, Rackel e Fabrício, pelos momentos compartilhados durante o período que passamos juntos. E principalmente a minha colega de turma e amiga cabeça Alê pela força nos períodos difíceis de minha vida e pela paciência nos meus momentos de chatice e mau-humor. Aos meus amigos do LIKA, Moutinho, Danny Maria, Danny Padilha, Ariele, Germana, Marília, Alessandro, Pabyton, Roberto, Flávio, Suany, e principalmente a minha amiga Taty pela ajuda, incentivo e paciência.

Aos meus eternos amigos Fernanda, Juliana, Alexandra, Ivana, Camila, Aninha Luiza, Adriana, Anninha Lenira e Paulinho.

À professora Neide pela sua amizade, confiança, otimismo, e incentivo.

A todos os funcionários do LIKA e Dept. de Bioquímica que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À FACEPE pelo apoio financeiro.

MUITO OBRIGADA.

ÍNDICE ANALÍTICO

LISTA DE FIGURAS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. 0 – INTRODUÇÃO	9
2. 0 - REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1. Imunoglobulinas	10
2.2. Imunoensaios	11
2.3. Imunossensores	12
2.4. Imunossensores capacitivos	13
2.4.1. Eletrodos interdigitados	14
2.4.2. Eletrodos baseados nas medidas potencioestáticas da interfase eletrodo/solução	14
2.5. Imobilização	15
2.5.1. Monocamadas Auto-Organizadas (SAMs)	16
2.5.2. Interação adsorvente-substratos metálicos	17
2.5.3. A adsorção de tióis sobre substratos metálicos	20
3. 0 – OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo Geral	21
3.2. Objetivos Específicos	21
4. 0 - REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
5. 0 - CAPITULO I	30
6.0 – CONCLUSÃO	48
7.0 – ANEXOS	49
7.1. Normas da revista	49
7.2. Trabalhos enviados a congressos	53

LISTA DE FIGURAS

1.0 – INTRODUÇÃO

Figura 1. Estrutura básica de uma molécula de IgG;	10
Figura 2. Formatos mais usados: (a) um imunoensaio competitivo homogêneo, (b) um imunoensaio não-competitivo heterogêneo, (c) um imunoensaio competitivo heterogêneo e (d) um análise imunométrica competitiva heterogênea	12
Figura 3. Princípio de operação de um Imunossensor;	12
Figura 4. Esquema dos principais métodos de imobilização do elemento biológico em imunossensores;	16
Figura 5. Alguns compostos anfifílicos: ácido esteárico (1), ácido palmítico (2), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-[fosfatidil-rac-(1-glicerol)] (sal de sódio) (DPPG) (3);	18
Figura 6. Monocamada de n-alcanatiol sobre uma superfície metálica	19

5. 0 - CAPITULO I

Figure 1. Schematic diagram of the device geometry of the capacitive immunosensor. (a) Side of view and (b) top of view. 50

Figure 2. Schematic design of the capacitive immunosensor system. 50

Figure 3. Schematic representation of the IgG immobilization by thiol film. 51

Figure 4. Effect of the cysteamine concentration as function of the maximal retention and activity of the bound IgG at 0.1 μ g/mL (-■-), 0.5 μ g/mL (- o -), and 1.0 μ g/mL (-▲-) anti-IgG concentration. 52

Figure 5. Effect of the amount of anti-IgG immobilized on the response of the immunoassay. 52

Figure 6. Characterization of the capacitance as function of frequency varying with bias 0 V, applying a 20 mV of potential. 53

Figure 7. Response on the IgG concentration as function of the capacitance. The linear fit is showed (—). 53

Table 1. Results of capacitance shift at each step of the immunoassay from capacitive immunosensor. 54

RESUMO

Há uma crescente demanda pelo monitoramento in situ da interação antígeno-anticorpo. Os imunossensores baseados nessa interação têm atraído grandes interesses nos anos recentes e em várias áreas. Para essa finalidade têm sido empregados numerosos sensores, como óptico, piezoelétrico e eletroquímico. Dentre eles, o capacitivo tem sido investigado com alta sensibilidade. Os imunossensores capacitivos são baseados nas mudanças das propriedades dielétricas, distribuição de cargas, dimensão e forma do complexo antígeno-anticorpo formados na superfície do eletrodo. Estes dispositivos apresentam como principais vantagens pouco influência de correntes farádicas e a falta da necessidade de marcação. Neste trabalho, uma nova plataforma de imunossensor capacitivo baseado em dispositivos interdigitados foi proposta, na tentativa de reduzir os custos na produção em massa de eletrodos. Em adição, suportes de alumínio foram empregados para imobilização de IgG usando monocamadas auto-organizadas (SAMs) e sua eficiência avaliada através de métodos enzimáticos. Os microeletrodos foram obtidos pela evaporação térmica de alumínio sobre o substrato de silicone (Si/SiO/Al), seguidos por posterior recozimento com a finalidade de executar um contato ôhmico entre os dois filamentos (área de aproximadamente 3mm^2). O microeletrodo proposto foi acoplado a um analisador de parâmetro (Hewlett-Packard, USA) para medidas potentiostáticas da capacidade. A superfície do sensor capacitivo foi composta pela formação de monocamadas de tióis e subsequente imobilização dos anticorpos. Como modelo de anticorpos foi usado imunoglobulina G (Anti-IgG). A SAM sobre os eletrodos foi obtido pela imersão em uma solução de cisteamina (25mM) seguidos pelo glutaraldeído para ligação com anti-IgG imobilizado. A resposta capacitiva da imobilização foi proporcional à quantidade do IgG ligados ao anti-IgG imobilizado. Esta plataforma desenvolvida poderá ser aplicada para diversos sistemas de imunoensaio devido à rapidez e ao custo baixo que oferece. Este trabalho abre perspectivas para o desenvolvimento de imunossensores aplicados à saúde humana e animal, no diagnóstico ambiental e outros ensaios baseados na interação antígeno-anticorpo.

Palavras-chave: imunossensor capacitivo, alumínio, monocamada auto-organizada.

ABSTRACT

There is a growing demand for in situ monitoring of antigen-antibody interaction. Immunosensors based on antigen-antibody interaction have attracted great interest in recent years in various areas. Numerous techniques such as optical, mass-sensitive and electrochemical have been employed for this purpose. Among the electrochemical techniques, a capacitive measurement has also been investigated as a highly sensitive approach. Capacitive immunosensor is based on changes in dielectric properties, charge distribution, dimension and shape, when an antibody / antigen complex formed on the surface of an electrode. These devices present advantages such as reduced influence Faradic currents, non-necessity labeled or tracer to output signal. In this work, a novel platform of capacitive sensor based on interdigitated devices principle was purposed. In addition, aluminum supports were employed to antibody immobilization using "self assembled-monolayer" (SAM) and its efficiency were evaluated by immunoenzymatic methods. The 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 (with area approximately 3mm^2). The purposed microelectrode was coupled to a Parameter Analyser (Hewllet-Packer,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 results suggest that the antigen-antibody interactions can be measured as proportional to the capacitance increase. This developed platform can be applied for several immunoassay systems due to rapid and low cost advantaging. Then, this work opens perspectives for the development of novel imunossensores applied to the human and animal health, in the ambient diagnosis and other assays based on the interaction antigen-antibody.

Keywords: capacitive, immunosensor, aluminum, self-assembled monolayer

1.0 - INTRODUÇÃO

O interesse por técnicas rápidas, sensíveis e práticas para diagnóstico tem aumentado devido ao crescente desenvolvimento alcançado pelos sistemas de imunoensaios. Neste contexto, os imunossensores, dispositivos portáteis, baseados na interação do antígeno-anticorpo, surgem como ferramenta alternativa e tem atraído grande interesse nos últimos anos. Os imunossensores, portanto, têm sido um exemplo bem conhecido e revolucionário na determinação de drogas e hormônios nas áreas clínicas, farmacêuticas e de contaminantes na área ambiental (WILDE, PETTY & SAFFELL, 1997; ZHOU et al., 2004; BAE et al., 2005).

Os biossensores de afinidade podem ser divididos em duas categorias principais: marcados (indireto) e não-marcados (direto). Os biossensores de afinidade marcados são derivados da tecnologia imunoensaio, no qual a geração do sinal é facilitada significativamente, mas este tipo é caro, consome tempo e as medidas em tempo-real são impossíveis (GEBBERT et al., 1992; TANG et al., 2004). Os biossensores não-marcados são atrativos por muitas razões e dentre eles estão ópticos, piezoelétricos e eletroquímicos (TANG et al., 2004; TANG et al., 2005; TAYLOR et al., 1991; YAGIUDA et al., 1996; LUPPA, SOKOLL & CHAN, 2001). Dentre estes, os biossensores ópticos estão como os mais estudados, mas o limite de detecção espera-se ser melhor para os sensores eletroquímicos. Além disso, o imunossensor óptico envolve uma instrumentação mais complexa do que os eletroquímicos (LUPPA, SOKOLL & CHAN, 2001). Um dos transdutores eletroquímicos com forte potencial é o capacitivo (BERGGREN & JOHANSSON, 1997).

A interação entre antígeno-anticorpo provoca mudanças nas propriedades dielétricas e desse modo a quantidade de anticorpo ou antígeno na amostra pode ser detectada pela mudança da capacidade (VARLAN et al., 1997; LI et al., 2007). Uma quantidade significativa de sensores não produz sinal mensurável e para outros a reprodutibilidade é baixa.

Desse modo, uma etapa crítica na preparação do imunossensor capacitivo é a imobilização das moléculas no suporte, onde orientação nos locais dos antígenos ligados ao analito na solução representa um papel chave (BATAILLARD et al., 1988; ZAYATS et al., 2002). As imunoglobulinas podem ser adsorvidas diretamente na superfície ou unidas covalentemente à superfície modificada com as monocamadas auto-organizadas (SAMs) de alcanotióis (WU et al., 2001; ARNTZ et al., 2003). Usando a técnica de SAM pode fornecer um método reprodutível e robusto de fabricação de camadas de anticorpos imobilizados. SAM

é um método de formulação de filmes orgânicos ultrafinos que requerem poucas etapas comparadas a outras abordagens (LIMBUT et al., 2006; YIN et al., 2002).

Neste estudo, um novo modelo de sensor capacitivo baseado sobre uma disposição interdigitada está sendo proposto na tentativa em reduzir os custos para produção maciça dos eletrodos. A plataforma nova do sensor seria a evaporação do alumínio (Al) em suportes de silicones de Si/SiO₂, com área aproximadamente 3mm² e a interação do antígeno-anticorpo seria medida pela capacitância do sinal de saída.

2.0 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1. IMUNOGLOBULINAS

Os anticorpos são estruturalmente muito similares. Das cinco classes de imunoglobulinas (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE), que diferem em, por exemplo, na glicosilação, no número e posições das pontes dissulfeto, principalmente IgG (150 kDa) que é usado nos imunoenaios. Uma IgG consiste em duas cadeias pesadas e duas leves, que são interconectadas pelas pontes dissulfeto (veja figura 1). Todas as cadeias têm uma região variável e constante. As regiões variáveis da cadeia pesada e leve combinam em um local de interação com o antígeno, que é chamado o sítio antigênico. Assim, uma molécula de IgG tem duas posições de ligação idênticas para o antígeno (STRYER, 2004)

As forças moleculares responsáveis pela ligação antígeno-anticorpo são baseadas em interações não-covalentes incluindo: interações hidrofóbicas não-polares, interação de Coulomb, forças Van der Waals e forças de repulsão estéricas (BUTLER, 1991).

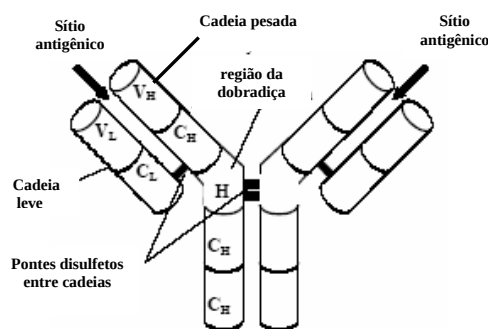


Fig 1. Estrutura básica de uma molécula de IgG. (Fonte: KILLARD et al., 1995)

2.2. IMUNOENSAIOS

Os imunoenaios estão sendo largamente usados como ferramentas analíticas em ciências clínicas e farmacêuticas. Para ser hábil em detectar a interação, um dos imunoagentes tem que ser marcado. Várias marcações têm sido aplicadas, dos quais os radioisótopos estavam entre os primeiros, por causa de sua sensibilidade inerente. Atualmente, as marcações freqüentemente usadas são os compostos quimioluminescentes (RONGEN & BENNEKOM, 1994; RONGEN et al., 1994) e as enzimas (por exemplo, fosfatase alcalina, peroxidase), que convertem um substrato da enzima em um produto mensurável (GOSLING, 1997; PORSTMANN & KIESSING, 1996).

Muitos formatos diferentes têm sido descritos e quatro, dentre eles, estão sendo mostrados na figura 2. No imunoensaio homogêneo (figura 2a), anticorpos, antígenos e antígenos marcados são misturados. Os antígenos marcados-livres e aqueles marcados-ligados aos anticorpos podem ser distinguidos por uma mudança de atividade dos marcados que estão ligados (PORSTMANN & KIESSING, 1996; TIJSEN, 1993).

Usualmente, imunoenaios são heterogêneos, significando que o anticorpo ou o antígeno imobilizado em um suporte contínuo e um imunocomplexo é formado pelo contato com uma solução contendo o outro imunoagente. As proteínas não ligadas são removidas por lavagens e a resposta obtida das marcadas é proporcional à quantidade de proteínas ligadas (PORSTMANN & KIESSING, 1996; TIJSEN, 1993).

Em imunoensaio sanduíche, anticorpos são imobilizados e após adição da amostra que contém o antígeno, um anticorpo secundário marcado é adicionado (Fig. 2b). Além deste formato não-competitivo, também os formatos competitivos podem ser aplicados. Em um ensaio competitivo, a competição ocorre entre o antígeno livre e ligado por uma quantidade limitada de anticorpo marcado (fig. 2c) ou entre o antígeno (a amostra) e antígeno marcado para quantidade limitada de anticorpo (fig. 2d) (PORSTMANN & KIESSING, 1996; TIJSEN, 1993).

Os lipossomos com moléculas marcadas ou enzimas encapsuladas têm sido usados para intensificar as respostas. Usando essa técnica, o anticorpo secundário é marcado com biotina e (estrep) avidina sendo usado como uma molécula de conexão entre este anticorpo e os lipossomos biotinilados (RONGEN, BULT & BENNEKOM, 1997).

Os imunoenaios são convenientes para prática clínica quando muitos, freqüentemente idênticas, as análises têm sido conduzidas em uma base rotineira. Imunoenaios são usualmente executados em (um múltiplo de) 96 poços de placas de microtitulação (RONGEN, BULT & BENNEKOM, 1997).

Idealmente, um método para detecção da imunointeração deve ter uma resposta rápida, e uma alta especificidade e sensibilidade. Na pesquisa para métodos aperfeiçoados, o desenvolvimento de metodologias mais rápidas e mais sensíveis para detecção direta é assunto principal. Estes pré-requisitos podem ser cumpridos através do imunossensor (PORSTMANN & KIESSING, 1996; TIJSEN, 1993).

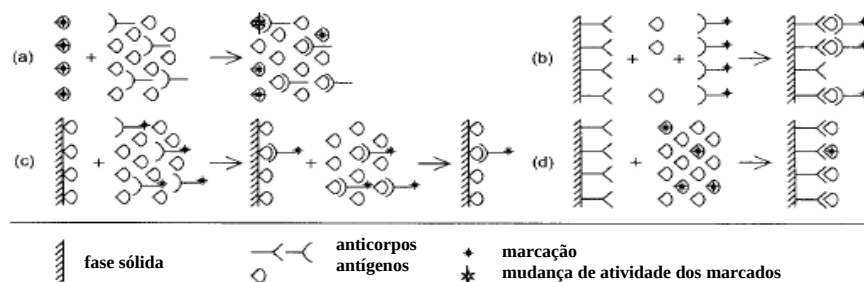


Fig 2. Formatos mais usados: (a) um imunoenensaio competitivo homogêneo, (b) um imunoenensaio não-competitivo heterogêneo, (c) um imunoenensaio competitivo heterogêneo e (d) um análise imunométrica competitiva heterogênea. (Fonte: RONGEN, BULT & BENNEKOM, 1997)

2.3. IMUNOSENSORES

Geralmente, um sensor consiste em um elemento de reconhecimento biológico e um transdutor (figura 3). No caso de um imunossensor, o elemento de reconhecimento biológico é formado pela imobilização de anticorpos e antígenos (BYFIELD, 1994).

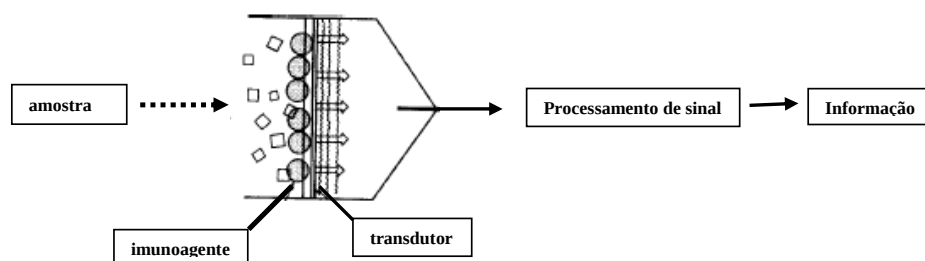


Figura 3. Princípio de operação de um imunossensor (Fonte: BYFIELD & ABUKNESHA, 1994).

Para imobilização dos imunoagentes muitos métodos têm sido desenvolvidos, em vários substratos (RAO, ANDERSON & BACHAS, 1998). O evento de ligação é transformado em um sinal mensurável pelo transdutor (BYFIELD, 1994). A transdução tem sido executada usando óptico (SPR) (HOMOLA, YEE & GAUGLITZ, 1999), piezoelétrico (QCM) (SULLIVAN, VAUGHAN & GUILBAULT, 2000), microscopia de varredura de superfície (microscopia de força atômica) (DONG & SHANNON, 2000), microscopia de varredura eletroquímica (WIJAYAWARDHANA et al., 2000) e outras técnicas eletroquímicas (GHINDILIS et al., 1998).

A descrição sistemática de um imunossensor inclui cinco características principais: (i) a espécie de interesse analítico ou o parâmetro medido, (ii) o princípio de leitura do transdutor, (iii) o modelo físico ou (bio)químico do sistema, (iv) a aplicação e (v) a tecnologia e materiais para a fabricação do sensor (SCOUTEN, LUONG & BROWN, 1995).

A detecção eletroquímica da imunointeração pode ser efetuada com e sem a marcação. Um formato frequentemente usado na imunodetecção eletroquímica é um imunossensor amperométrico, onde proteínas são marcadas com enzimas produzindo um produto eletroativo de um substrato adicionado (SKLADAL, 1997).

A detecção direta sem marcação pode ser efetuada pela voltametria cíclica, impedância e pela medida da corrente durante os pulsos potenciais (detecção amperométrica pulsátil). Esses métodos podem detectar uma mudança na capacidade e/ou resistência do eletrodo induzido pela ligação da proteína. Estes imunossensores têm sido desenvolvidos usando vários substratos. Aqueles construídos em silicone, metal silanizado, ou polipirrole são frequentemente regeneráveis, quando são baseados em monocamadas auto-organizadas (SAMs), isto é, monocamadas espontaneamente formadas entre compostos de enxofre e superfícies de prata ou ouro (KNICHEL et al., 1999; RICKERT et al., 1999).

2.4. IMUNOSSENSORES CAPACITIVOS

Existem duas abordagens que têm sido aplicadas nas medidas de capacitância. Qualquer uma pode ser realizada medindo a mudança na capacitância entre dois condutores de metais próximos ao elemento de reconhecimento imobilizado entre eles (eletrodos interdigitais), ou medindo a capacitância potencioestática da interfase eletrodo/solução com os elementos de reconhecimento da superfície do eletrodo de trabalho.

2.4.1. Eletrodos Interdigitados

Um capacitor elétrico normal consiste em duas placas de metal paralelas separadas por uma determinada distância e com um dielétrico entre elas. A capacitância pode ser descrita pela Equação.

$$C = \epsilon \epsilon_0 A / d$$

Onde, ϵ é a constante dielétrica do meio entre as placas, $\epsilon_0 = 8.85419 \text{ pF/m}$ (permissividade do espaço livre), A é a área das placas e d a distância entre elas. Assim, quando há uma mudança nas propriedades dielétricas no material entre as placas, ocorrerá uma mudança na capacitância (BERGGREN, BJARNASON & JOHANSSON, 2001).

Pode-se observar na equação que a capacitância, e assim a sensibilidade, aumentarão quando a distância entre os dois condutores reduzir. Além disso, é importante que a camada de passivação esteja tão fina e tenha como constante dielétrica elevada, assim, isto reduzirá sua importância na capacidade total de acordo com o modelo de camadas acopladas em séries independentes. Até aqui tem havido dificuldades em produzir camadas finas livres de pinholes. As desvantagens associadas com os eletrodos interdigitais são limitações na produção de uma distância curta e reproduzível entre os dois condutores, e sensível à mudanças na solução. A razão é que as linhas do campo se curvarão para fora na solução. Para superar o último problema, uma célula de referência sem elemento de reconhecimento pode ser usada (BILLARD et al., 1991; BERGGREN, BJARNASON & JOHANSSON, 2001).

2.4.2. Eletrodos baseados nas medidas potencioestáticas da interfase eletrodo/solução

O segundo tipo de sensores é baseado na teoria da camada-dupla elétrica. Um eletrodo imerso em uma solução do eletrólito pode ser descrito como semelhante a um capacitor em sua habilidade de armazenar a carga. Para um dado potencial, o eletrodo possuirá uma carga q_m e a solução outra carga q_s , onde o q_m será igual - q_s . Espécies carregadas e dipolos serão orientados na interface eletrodo/solução, portanto compondo a camada-dupla elétrica. Próximos à superfície do eletrodo, solvente e especialmente espécies adsorvidas constituem o plano compacto de Helmholtz ou a camada Stern e íons solvatados podem apenas se aproximar à superfície do eletrodo a uma distância de uma monocamada de moléculas

solventes orientadas. Ao construir um biossensor capacitivo a superfície do eletrodo é geralmente coberta com uma camada insulada e o elemento de bioreconhecimento é imobilizado no topo da camada. Neste caso, íons solvatados e moléculas de água são empurrados para fora da superfície do eletrodo dando origem a uma mudança na capacitância. A maioria dos biossensores capacitivos descritos na literatura é baseada nesta abordagem (BILLARD et al., 1991; BERGGREN, BJARNASON & JOHANSSON, 2001).

Um ponto crítico na preparação de sensores capacitivos é a escolha dos constituintes para a imobilização da camada de bioreconhecimento. Como eletrodo matricial um semicondutor ou um condutor (metal) pode ser usado. Anticorpos têm sido acoplados aos semicondutores, óxidos de metal e as monocamadas auto-organizadas (SAMs) de compostos de enxofre em ouro (BERGGREN, BJARNASON & JOHANSSON, 2001; NAKAMURA, AOKI & CHEN, 2002).

2.5. IMOBILIZAÇÃO

Para permitir o uso contínuo dos imunossensores, é essencial uma incorporação estável dos elementos de reconhecimento e esta tem sido uma etapa crítica no desenvolvimento destes dispositivos analíticos. Isso porque os biocomponentes, quando imobilizados, precisam reter a maior parte de sua atividade biológica, para que o imunossensor possa apresentar sensibilidade significativa para o composto alvo. Existem várias técnicas para a imobilização das biomoléculas, porém as mais comuns são a ligação covalente, a ligação covalente cruzada, a oclusão em gel e a adsorção física (Figura 3). Todos esses métodos possuem numerosas variantes e se faz necessário selecionar o método mais apropriado para cada caso em particular, considerando-se o tipo de aplicação que será realizada e o transdutor utilizado (CUNNINGHAM, 1998).

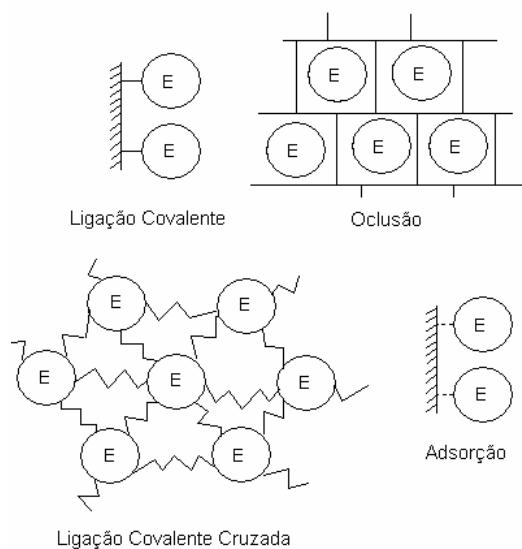


Figura 4. Esquema dos principais métodos de imobilização do elemento biológico em imunossensores (Fonte: CUNNINGHAM, 1998).

2.5.1. Monocamadas Auto-Organizadas (SAMs “self-assembled monolayers”)

As interações covalentes entre moléculas e superfícies são alguns dos aspectos mais empolgantes e mais bem estudados da ciência de superfícies. A magnitude destas interações depende da natureza química da ligação variando desde as mais fracas como, por exemplo, a existente entre alcanotióis adsorvidos sobre ouro até interações muito fortes, capazes de quebrar ligações moleculares, bem como a existente entre etileno e platina (SMITH, LEWIS & WEISS, 2004).

Uma das interações mais marcantes consiste na auto-organização espontânea de átomos ou moléculas em arranjos ordenados sobre superfícies. O conceito de moléculas organizadas com alto grau de ordenamento sobre determinados substratos não é novo, contudo, no contexto da química de superfícies, o tema tem chamado a atenção, principalmente, nos últimos vinte anos, no que tange ao estudo e à aplicação tecnológica de monocamadas moleculares auto-organizadas sobre superfícies metálicas. No entanto, ainda hoje são realizados desde estudos relacionados à investigação da organização fundamental e a química envolvida nestes sistemas, até trabalhos que examinam a robustez e aplicabilidade

destes na modificação das propriedades físicas e químicas de superfícies (ULMAN et al., 1996).

Monocamadas auto-organizadas (SAM) são ordenamentos orgânicos formados por meio da adsorção dos seus constituintes moleculares dispersos, inicialmente, em solução líquida ou fase gasosa sobre superfícies de sólidos, arranjos regulares de sólidos ou líquidos (no caso de mercúrio ou outro metal líquido ou liga). Os adsorbatos se organizam espontaneamente e, às vezes, em estruturas cristalinas ou semicristalinas (LOVE et al., 2005). No entanto, o grau de organização depende da natureza da interação da química entre átomos do substrato e do adsorbato, bem como do tipo e força da interação intermolecular entre as moléculas do adsorbato. A estabilidade da monocamada formada é diretamente proporcional à intensidade destas forças de ligação e interação (ULMAN et al., 1996; LOVE et al., 2005).

2.5.2. Interação adsorvente-substrato

Sistemas quimioadsorvidos incluem a auto-organização de trialkil, triclora, ou trialkoxisilanos em superfícies de dióxidos de silício (ALLARA, PARIKH & RONDELES, 1995; ULMAN, 1996), ácidos carboxílicos adsorvidos sobre superfícies de prata (LAIBINIS et al., 1989; LAIBINIS et al., 1992) e óxidos de alumínio e n-alkanotóis quimioadsorvidos em superfícies de ouro (CAMPUZANO et al., 2003; KARPOVICH & BLANCHARD, 1995; FREIRE, PESSOA & KUBOTA, 2003), para mencionar alguns poucos exemplos. As SAMs são classificadas de acordo com o mecanismo utilizado na sua fixação sobre o substrato e existem basicamente três técnicas de fixação. O primeiro tipo de SAM sobre eletrodos sólidos envolve a formação de monocamadas organizadas, via o processo de silanização, a partir de alquilclorosilanos, alquilalkoxisilanos e alquilaminosilanos que requerem superfícies hidroxiladas como substratos para sua formação. A força que dirige para a auto organização é a formação de polisilanos, o qual está conectado a grupos silanóis na superfície (-SiOH) via ligação Si-O-Si (WEETALL, 1993; ULMAN, 1996).

A segunda abordagem, a tecnologia de Langmuir-Blodgett é baseada nas propriedades particulares de moléculas orgânicas como lipídios, fosfolipídios ou glicolipídios, orientar-se em uma relação de ar/água entre a fase gasosa e líquida, minimizar sua energia livre e formar uma monocamada insolúvel chamado filmes de Langmuir (LI et al., 2003). Os materiais clássicos na formação das monocamadas são anfifílicos insolúveis, compostos de duas regiões

moleculares distintas: cabeça hidrofílica, facilmente solúvel em água, um cauda hidrofóbica, solúvel em solventes apolares (Fig 5). A parte hidrofílica é responsável pelo espalhamento do filme na superfície da água devido à sua maior interação com a subfase aquosa. A parte hidrofóbica, freqüentemente formada de cadeias alifáticas, diminui a solubilidade das moléculas na subfase aquosa. Para componentes biológicos, a parte hidrofóbica é composta mais freqüentemente de uma ou duas cadeias alquila longas (GIRARD-EGROT, GODOY & BLUM, 2005).

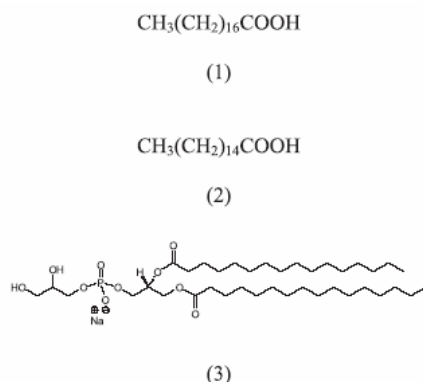


Fig 5. Alguns compostos anfifílicos: ácido esteárico (1), ácido palmítico (2), 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-[fosfatidil-rac-(1-glicerol)] (sal de sódio) (DPPG) (3) (GIRARD-EGROT, GODOY & BLUM, 2005).

A terceira categoria de monocamadas faz uso da adsorção irreversível de alcanos funcionalizados sobre superfícies metálicas ordenadas. Particularmente, as SAMs mais bem estudadas são essas monocamadas (Fig. 6). As mesmas são formadas sobre metais de transição, como ouro, prata, cobre, paládio e mercúrio, a partir de moléculas que tenham um grupo cabeça rico em elétron, como S, O e N, comumente, grupos de cadeias alquílicas. Nestes casos, a afinidade entre a superfície e o grupo cabeça, é forte o suficiente para formar tanto ligações covalentes quanto iônicas que, em geral, possuem magnitude maior que $41,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ e também interações laterais entre moléculas adjacentes onde as energias envolvidas são consideradas $< 41,8 \text{ kJ mol}^{-1}$, devido a forças de Van der Waals que são suficientes para manter o arranjo da SAM. O conjunto destas interações confere à monocamada uma estabilidade muito maior que unidades individualmente adsorvidas (SMITH, LEWIS & WEISS, 2004).

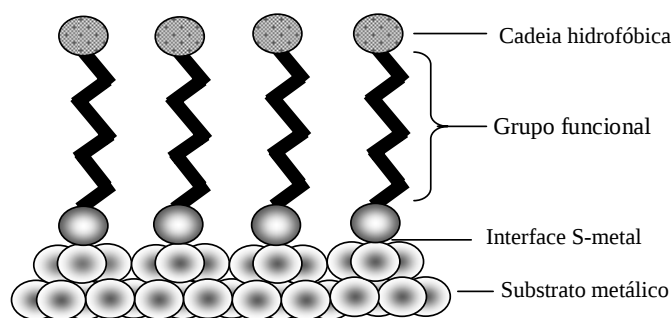


Fig 6. Monocamada de n-alkanatiol sobre uma superfície metálica
(Fonte: CARVALHAL, FREIRE & KUBORTA, 2005).

Considerando que a variação no contato eletrônico entre o adsorbato e o substrato metálico controla, principalmente, a força das interações no interior do filme fino, a manipulação estrutural dos monômeros formadores da SAM afetará a capacidade de realizar reações com grupos funcionais expostos (grupos carboxílicos, quinonas, aminas, anidridos). A mudança dos grupos expostos à interface filme/ar é crítica para a determinação e designação das forças de interações das moléculas proximais ou espécies químicas de interesse, no caso, de aplicações terminais podem ser modificadas após a monocamada ser dispostos sobre determinada superfície e a incorporação de outros grupos como cromóforos, grupos eletroativos ou outras moléculas possibilita estudos nas áreas de desenvolvimento de sensores, transferência eletrônica, adsorção de polímeros e outros. Alcanotióis com grupos terminais sensíveis à variação de pH – COOH e NH₂ permitem o controle da densidade de carga da superfície da SAM conforme o pH da solução onde são imersas. Estas superfícies carregadas têm sido usadas para imobilização eletrostática de enzimas em biossensores e como modelos de estudo de equilíbrio ácido-base em superfícies (CAMPUZANO et al.; 2003; LINDGREN et al., 2001; BAIN & WHITESIDES, 1989).

Inicialmente, os estudos se concentraram na investigação das propriedades de impedimento das monocamadas de tióis. Verificou-se que mesmo monocamadas de alcanotióis são eletroativas (WEEISHAAR, LAMP & PORTER, 1992; WIDRIG, CHUNG & PORTER, 1991), no entanto, atualmente credita-se a derivatização (grupos funcionais ou subunidades adicionadas à estrutura do monômero organosulfurado) a possibilidade de arquitetar e conceber o desenho molecular da superfície com controle posicional confere as SAMs grande interesse tecnológico, já que, a presença de moléculas quimicamente ligadas à

superfície em estudo, confere propriedades físicas e químicas diferenciadas daquelas exibidas pela interface do substrato bruto. A estabilidade de monocamadas auto-organizadas (SAM) formadas sobre eletrodos sólidos está intimamente relacionada com a intensidade das interações intermoleculares entre os monômeros da camada, portanto, SAM de cadeia curta, em geral, são menos estáveis que as de cadeia longa (WEEISHAAR, WALCZAR & PORTER, 1993).

2.5.3. A adsorção de tióis sobre substratos metálicos

Em geral, considera-se que as SAMs apresentam poucas imperfeições. Na verdade, estes sistemas são, substancialmente, mais complicados que arranjos altamente ordenados, os quais são usualmente utilizados na descrição de sistemas auto-organizados, como na fig. 6. As causas das imperfeições encontradas nas SAM são de origem intrínseca e extrínseca, fatores externos, como a limpeza e os métodos de preparação do substrato são responsáveis por alguns defeitos, mas certas imperfeições existem pelo simples fato de que sistemas auto-organizados são sistemas dinâmicos com complexos comportamentos de fase (FOLKERS, LAIBINIS & WHITESIDES, 1992; RON & RUBINSTEIN, 1994; CARVALHAL, FREIRE & KUBOTA, 2005).

Esforços na tentativa de se obter a monocamada mais impenetrável e com menos defeitos sobre superfícies de ouro estimularam o estudo de diversos fatores durante o processo de formação, morfologia do substrato, limpeza, pureza do adsorvente, solvente de deposição, concentração da solução do adsorvente, tempo de deposição e outras variáveis mais específicas, relativas ao procedimento específico de formação da SAM. Infelizmente, não há fórmulas definidas para a obtenção de monocamadas “perfeitas” (FOLKERS, LAIBINIS & WHITESIDES, 1992). Folkers et al., afirmaram que considerações a respeito de monocamadas preparadas segundo em determinado protocolo não são, necessariamente, válidas para SAM construídas a partir de protocolos diferentes, uma vez que a presença de impurezas e irregularidades superficiais como vales, picos e terraços entre planos regulares, influenciam mais nas propriedades eletroquímicas do eletrodo modificado, do que o grau de cristalinidade do substrato. Alguns trabalhos na literatura mostraram que monocamadas de tióis formadas sobre ouro policristalino apresentaram características superiores às aquelas formadas sobre superfícies de sílica ou mica, sob as quais, ouro depositado por evaporação

(FINKLES, 1996). Creager et al. e Guo et al. demonstraram que monocamadas formadas sobre ouro policristalino são mais impenetráveis à sondas redox em solução, que aquelas formadas sobre superfícies monocristalinas.

3.0 - OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Desenvolver uma nova plataforma de imunossensor capacitivo (Si/SiO₂/Al) baseado em dispositivos interdigitados.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a eficiência da imobilização de IgG usando SAM em suportes de alumínios;
- Produzir os microeletrodos (Si/SiO₂/Al), a partir da evaporação do alumínio sobre o substrato de silício (Si/SiO₂);
- Caracterizar o imunossensor Si/SiO₂/Al resultante da interação Anti-IgG x IgG

4.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLARA, D. L.; PARIKH, A. N.; RONDELES, F. Evidence for a unique chain organization in long-chain silane monolayers deposited on 2 widely different solid substrates. **Langmuir**, 11, 2357-2360, 1995.

- ARNTZ, Y.; SEELIG, J. D.; LANG, H. P.; ZHANG, J.; HUNZIKER, P.; RAMSEYER, J. P., MEYER, E.; HEGNER, M.; GERBER, C. Label-free protein assay based on a nanomechanical cantilever array. **Nanotechnology**, 14, 86-89, 2003.

- BAE, Y. M.; LEE, W.; LEE, W. H.; CHOI, J. W. Study on orientation of immunoglobulin G on protein G layer. **Biosensors Bioelectronics**, 21, 103–110, 2005.

- BAIN, C. D.; WHITESIDES, G. M. Structure of Hydrophilic self-assembled monolayers: a combined Scanning Tunneling Microscopy and computer simulation study. **Langmuir**, 5, 1370-1376, 1989.

- BATAILLARD, P.; GARDIES, F. G.; JAFFREZIC-RENAULT, N.; MARTELET, C.; COLIN, B.; MANDRAND, B. Macroporous Silicon Based Capacitive Affinity Sensor—Fabrication And Electrochemical Studies. **Analytica Chimistry Acta**, 60, 2374-2380, 1988.

- BENSEBAA, F.; VOICU, R.; HURON, L.; ELLIS, T.H.; KRUUS, E. Kinetics of formation of long-chain n-alkanethiolate monolayers on polycrystalline gold. **Langmuir**, 13, 20, 5335-5340, 1997.

- BERGGREN, C.; BJARNASON, B.; JOHANSSON, G. Review Capacitive Biosensors. **Electroanalysis**, 13, 173-180, 2001.

- BERGGREN, C.; JOHANSSON, G. Capacitance immunosensors based on an array biotape. **Analytica Chimistry Acta**, 69, 3651-3655, 1997.

- BILLARD, V.; MARTELET, C.; BINDER, P.; THERASSE, J. A capacitive immunosensor measurement system with a lock-in amplifier and potentiostatic control by software. **Analytica Chimica Acta**, 249, 367-371, 1991.

- BURKE, L. D.; COLLINS, J. A.; HORGAN, M. A.; HURLEY, L. M.; MULLANE, O. The importance of the active states of surface atoms with regard to the electrocatalytic behaviour of metal electrodes. **Electrochemistry Acta**, 45, 4127- 4132, 2000.

- BUTLER, J. E. E. Immunochemistry of solid phase immunoassay, CRC Press, Boca Raton, FL, USA: 1991.

- BYFIELD, M. P.; ABUKNESHA, A. Biochemical aspects of biosensors, **Biosensors Bioelectronics**, 9, 373-400, 1994.
- BYFIELD, M. P.; ABUKNESHA, A. Biochemical aspects of biosensors. **Biosensors Bioelectronics**, 9, 373-400, 1994.
- 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.
- CAMPUZANO, S.; SERRA, B.; PEDRERO, M.; MANUEL DE VILLENA, F. J.; PINGARRÓN, J. M. Sensing characteristics of tyrosinase immobilized and tyrosinase, laccase co-immobilized platinum electrodes. **Analytica Chimistry Acta**, 494, 187-192, 2003.
- CARVALHAL, R.F.; FREIRE, R.S., KUBOTA, L.T. Polycrystalline gold electrodes: a comparative study of pretreatment procedures used for cleaning and thiol self-assembly monolayer formation. **Electroanalysis**, 17, 14, 1251-1259, 2005.
- CREAGER, J. E.; HOCKETT, L. A.; ROWE, G. K. Alkanethiol self-assembled monolayers as the dielectric of capacitors with nanoscale thickness. **Langmuir**, 8, 854-858, 1992.
- CUNNINGHAM, A.J. Introduction to Bioanalytical Sensor. John Wiley & Sons, Inc. New York, 19-21, 1998.
- DANNENBERGER, O.; WOLFF, J.J.; BUCK, M. Solvent dependence of the self-assembly process of an endgroup-modified alkanethiol. **Langmuir**, 14, 17, 4679-4682, 1998.
- DONG, Y.; SHANNON, C. Heterogeneous Immunosensing using antigen and antibody monolayers on gold surfaces with electrochemical and scanning probe detection. **Analytica Chimistry Acta**, 72, 2371-2376, 2000.

- FINKLES, H. O. Structure of self-assembled layers on silicon: combined use of spectroscopic variable angle Ellipsometry, Neutron Reflection, and Atomic Force Microscopy. **Electroanalytical Chemistry**, 19, 189-195, 1996.

- FOLKERS, J. P.; LAIBINIS, P. E.; WHITESIDES, G. M. Self-Assembled Monolayers of N-alkanethiolates on copper are barrier films that protect the metal against oxidation by air. **Langmuir**, 8, 1330-1335, 1992.

- FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L. T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímico. **Química Nova**, 26, 381-386, 2003.
- GEBBERT, A.; ALVAREZ-ICAZA, M.; STOCKLEIN, W.; SCHMID, R. D. Monitoring of Immunochemical Interactions with a Tantalum Capacitance Flow-Through Cell. **Analytica Chimistry Acta**, 64, 997, 1992.

- GHINDILIS, A. L.; ATANASOV, P.; WILKINS, M.; WILKINS, E. Immunosensors: electrochemical sensing and other engineering approaches. **Biosensors Bioelectronics**, 13, 113-131, 1998.

- GIRARD-EGROT, A. P.; GODOY, S.; BLUM, L. C. J. Enzyme association with Lipidic Langmuir–Blodgett Films: Interests and Applications. **Colloid and Interface Science**, 116, 205 – 225, 2005

- GOSLING, J. P. Enzyme Immunoassay: With And Without Separation, In Principles and practice of immunoassay, 2nd [Rev.] Ed., C. P. Price And D. J. Newman, Eds. 1997, Stockton Press: London. P. 349, 351-388.

- GUO, L. H.; FACCI, J. S.; MCLEENDON, G.; MOSHER, R. Electrical measurement on a phthalocyanine Langmuir-Blodgett Film: Ii. The effect of the substrate surface treatment on the electrical characteristics. **Langmuir**, 10, 4588-4595, 1994.

- HOMOLA, J.; YEE, S. S.; GAUGLITZ, G. Surface Plasmon Resonance Sensors: Review, **Sensors Actuators**, B54, 3-15, 1999.
- KARPOVICH, D. S.; BLANCHARD, G. J. J. Self-assembled monolayers (SAMs) and synthesis of planar micro- and nanostructures. **Chemical Education**, 72, 466-470, 1995.
- KILLARD, A. J.; DEASY, B.; O'KENNEDY, R.; SMYTH, M. R. Antibodies: production, functions and applications in biosensors. **Trends Analytical Chemistry**, 14, 257-266, 1995.
- KNICHEL, M.; HEIDUSCHKA, P.; BECK, W.; JUNG, G.; GÖPEL, W. Utilization of a self-assembled peptide monolayer for an impedimetric immunosensor. **Sensors Actuators B**, 28, 85-94, 1999.
- LAIBINIS, P. E.; HICKMAN, J. J.; WRIGHTON, M. S.; WHITESIDES, G. M. Orthogonal self-assembled monolayers - alkanethiols on gold and alkane carboxylic-acids on alumina. **Science**, 245, 845-849, 1989.
- LAIBINIS, P. E.; WHITESIDES, G. M. Study by contact angle of the acid-base behavior of monolayers containing w-mercaptocarboxylic acids adsorbed on gold: an example of reactive spreading. **Journal of American Chemistry Society**, 114, 1990-1998, 1992.
- LI, H.L.; PERKAS, N.; LI, Q. L.; GOFER, Y.; KOLTYPIN, Y.; GEDANKEN, A. improved silanization modification of a silica surface and its application to the preparation of a silica-supported polyoxometalate catalyst. **Langmuir**, 19, 10, 409-412, 2003.
- LI, J.; LONGTIN, J. P.; TANKIEWICZ, S.; GOULDSTONE, A.; SAMPATH, S. **Sensors and Actuators A**, 133, 1-8, 2007.
- LIMBUT, W.; KANATHARANA, P.; MATTIASSON, B.; ASAWATRERATANAKUL, P.; THAVARUNGKUL, P. A comparative study of capacitive immunosensors based on self-assembled monolayers formed from thiourea, thioctic acid, and 3-mercaptopropionic acid. **Biosensors Bioelectronics**, 22, 233-240, 2006.

- LINDGREN, A.; GORDON, L.; RUZGAS, T.; BAMINGER, U.; HALTRICH, D.; SCHULEIN, M. J. Peroxidase-based amperometric sensor for the determination of total phenols. **Electroanalytical Chemistry**, 496, 76-81, 2001.

- LOVE, J. C.; ESTROFF, L. A.; KRIEBEL, J. K.; NUZZO, R. G.; WHITESIDES, G. M. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. **Chemistry Review**, 105, 4, 1103-1111, 2005.

- LUPPA, P. B.; SOKOLL, L. J.; CHAN, D. W. Immunosensors--principles and applications to clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**, 314, 1-26, 2001.

- NAKAMURA, T.; AOKI, K.; CHEN, J. Temperature-variation of Capacitance of alkanethiol monolayer films. **Electro-Chimica Acta**, 47, 2407-2411. 2002.

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

- RAO, S. V.; ANDERSON, K. W.; BACHAS, L. G. Oriented immobilization of proteins. **Mikrochimistry Acta**, 128, 127-143, 1998.

- RICKERT, J.; GÖPEL, W.; BECK, W.; JUNG, G.; HEIDUSCHKA, P. A Mixed self-assembled monolayer for an impedimetric immunosensor. **Biosensors Bioelectronics**, 11, 757-768, 1999.

- RON, H.; RUBINSTEIN, I. Corrosion inhibition by self-assembled monolayers for enhanced wire bonding on Cu surfaces. **Langmuir**, 10, 4566-4572, 1994.

- RONGEN, H. A. H.; BENNEKOM, W. P. Assays for interferons and interleukins in biological matrices. **Analytica Chimistry Acta**, 295, 1-26, 1994.

- RONGEN, H. A. H.; BULT, A.; BENNEKOM, W. P. Liposomes and immunoassays. **Journal of Immunological Methods**, 204, 105-133, 1997.

- RONGEN, H. A. H.; BULT, A.; BENNEKOM, W. P. Liposomes and immunoassays. **Journal of Immunological Methods**, 204, 105-133, 1997.

- RONGEN, H. A. H.; HOETELMANS, R. M. W.; BULT, A.; BENNEKOM, W. P. Chemiluminescence and Immunoassays. **Journal of Pharmacy Biomedical Applied**, 12, 433-462, 1994.

- SKLADAL, P. Electrochemical Immunosensors. **Electroanalysis**, 9, 737-745, 1997.

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

- STRYER, L. Biochemistry, 3rd Ed.; W.H. Freeman and Company: New York, 2004.

- SULLIVAN, C. K.; VAUGHAN, R.; GUILBAULT, G. G. Piezoelectric immunosensors - Theory and Applications. **Analytical Letters**, 32, 2353-2377, 2000.

- TANG, D.; YUAN, R.; CHAI, Y.; DAI, J.; ZHONG, X.; LIU, Y. A novel immunosensor based on immobilization of hepatitis B surface antibody on platinum electrode modified colloidal gold and polyvinyl. **Bioelectrochemistry**, 65, 15–22, 2004.

- TANG, D.; YUAN, R.; CHAI, Y.; ZHONG, X.; LIU, Y.; DAI, J. Potentiometric Immunosensor Based on Immobilization of Hepatitis B Surface Antibody on Platinum Electrode Modified. **Electroanalysis**, 22, 43–49, 2005.

- TAYLOR, R. F.; MARENCHIC, I. G.; SPENCER, R. H. Antibody- and receptor-based biosensors for detection and process control. **Analytica Chimistry Acta**, 249, 67–90, 1991.

- TIJSSEN, P. Principles of Immunoassays. Enzymes. **Journal of Immunological Methods**, 1, 283-297, 1993.

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

- VARLAN, A. R.; SULS, J.; SANSEN, W.; VEELAERT, D.; LOOF, A. D. Capacitive Sensor for the Allatostatin Direct Immunoassay. **Sensors Actuators B**, 44, 334-340, 1997.

- WANG, J.; ZENG, B.; FANG, C.; ZHOU, X. Electrochemical characteristic of 2-mercaptobenzothiazole self-assembled monolayer on gold. **Analytical Science**, 16, 457-461, 2000.

- WEEISHAAR, D. E.; LAMP, D. B.; PORTER, M. D. Electrochemical and X-Ray Photoelectron Spectroscopic Evidence for differences in the binding-sites of alkanethiolate monolayers chemisorbed at gold. **Journal of American Chemistry Society**, 114, 5860-5865, 1992.

- WEEISHAAR, D. E.; WALCZAK, M. M.; PORTER, M. D. Electrochemically induced transformations of monolayers formed by self-assembly of mercaptoethanol. **Langmuir**, 9, 323 – 329, 1993.

- WEETALL, H. H. Preparation of immobilized proteins covalently coupled through silane coupling agents to inorganic supports. **Applied Biochemistry Biotechnology**, 41, 157-163, 1993.

- WIDRIG, C. A.; CHUNG, C.; PORTER, M. D. The Electrochemical Desorption Of N-Alkanethiol Monolayers From Polycrystalline Au And Ag Electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial**, 310, 335-339, 1991.

- WIJAYAWARDHANA, C. A.; WITTSTOCK, G.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. Electrochemical immunoassay with microscopic immunomagnetic bead domains and scanning electrochemical microscopy. **Electroanalysis**, 12, 640-644, 2000.

- WILDE, J. N.; PETTY, M. C.; SAFFELL, J.; TEMPORE, A. Surface plasmon resonance imaging for gas sensing. **Measurement + Control**, 9, 269-72, 1997.

- WU, G., DATAR, R. H., HANSEN, K. M., THUNDAT, T., COTE, R. J. & MAJUMDAR, A. Bioassay of prostate-specific antigen (PSA) using microcantilevers. **Nature Biotechnology**, 19, 856-860, 2001.

- YAMADA, R.; WANO, H.; UOSAKI, K. Effect of temperature on structure of the self-assembled monolayer of decanethiol on Au(111) Surface. **Langmuir**, 16, 5523-5527, 2000.

- YIN, F.; ZHU, Y.; XIE, Q.; ZHANG, Y.; NIE, L.; YAO, S. Study of surfactant adsorption onto electropolymerized o-phenylenediamine film by using a capacitive sensing method. **Analyst**, 10, 106-108, 2002.

- ZAYATS, M.; RAITMAN O. A.; CHEGEL, V. I.; KHARITONOV, A. B.; WILLNER, I. Probing Antigen-Antibody Binding Processes by Impedance Measurements on Ion-Sensitive Field-Effect Transistor Devices and Complementary Surface Plasmon. **Analytical Chemistry**, 74, 4763, 2002;

- ZHOU, J.; TSAO, H. K.; SHENG, Y. J.; JIANG, S. Monte Carlo simulations of antibody adsorption and orientation on charged surfaces. **The Journal of Chemical Physics**, 2, 1050-1057, 2004.

5.0 – CAPÍTULO I

A novel aluminum capacitive immunosensor with orientated antibodies by self-assembled monolayers

Renata Fabiana R. Santos^{a,b}; Élder A. Vasconcelos^d;

Vera L. de Menezes Lima^a; Valdinete L. da Silva^{a,e}; Rosa F. Dutra^{b,c*}.

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

^e 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. Tel.: +81 3421 1769

E-mail address: rfiremandutra@yahoo.com.br

Abstract

A novel platform of capacitive sensor based on interdigitated devices principle was purposed. The new sensor platform was composed of two aluminum vapor etched electrodes separated by wide gaps onto silicon wafers (Si/SiO₂/Al), with area approximately 9mm². The antigen-antibody interaction was measured by capacitance output signal. Self-assembled monolayer (SAM) prepared by cysteamine-glutaraldehyde method was applied to immobilize anti-Imunoglobulin (anti-IgG) on the aluminum surface. The characterization of a thiol SAM on aluminum demonstrated maximal retention and the activity of the bound IgG receptor at 25mM cysteamine concentration. The capacitance response was maxima at 10²Hz frequency oscilation on the response to the antigen-antibody interaction and resulted in a sensitivity of 0.1 μg/pF. The results suggest that the antigen-antibody interactions can be measured as proportional to the capacitance increase.

Keywords: capacitive, immunosensor, aluminum, self-assembled monolayer, cysteamine.

1. INTRODUCTION

There is a growing demand for in situ monitoring of antigen-antibody interaction. Immunosensors based on antigen-antibody interaction (affinity biosensors) have attracted great interest in recent years in various areas [1-2]. The affinity biosensors can be divided into two main categories; label-free (direct) and labeled. Labeled affinity biosensors are derived from the immunoassay technology, where signal generation is significantly facilitated, but this type is expensive, time-consuming and makes real-time measurements impossible [3,4]. Biosensors for direct, label-free, measurements of various analytes are attractive for many reasons and have been described for optical, mass-sensitive and electrochemical [4-8]. Among these, the optical biosensors are the most studied, but the detection limit is expected to be better for the electrochemical sensors. In addition, the optical immunosensor involve more complex instrumentation than the electrochemical types [8].

One of the electrochemical transducers with the highest potential is the capacitive one [9]. They has been studied as a new immunoassay methodology for the measure the capacitance potentiostatically at an electrode/solution interface with the recognition element on the surface of the working electrode [10,11], or by measuring the change in the capacitance between two metal conductors in close proximity to each other with the recognition element immobilized between them. This last, denominated interdigitated electrodes have been applied to immunosensors with the advantage of reduced influence Faradic current, non-necessity labeled or tracer to output signal and it can be easily miniaturized, making its ideal for mass producing of a wide variety of nanotech devices [12,13].

The principle of the interdigitated transducer is based on the thickness and dielectric behavior of a dielectric layer on the surface a metal. A normal electrical plate capacitor consists of two parallel metal plates separated by a certain distance and with a dielectricum in between [14]. The capacitance can be described by Equation:

$$C = \epsilon \epsilon_0 A / d$$

where, ϵ is the dielectric constant of the medium between the plates, $\epsilon_0 = 8.85419 \text{ pF/m}$ (permittivity of free space), A the area of the plates and d the distance between them. Thus, when there is a change

in the dielectric properties in the material between the plates, a change in the capacitance will occur [14,15].

In an interdigitated immunosensor, the interactions between antigen-antibody cause changing on the dielectric properties and thereby the amount of antibody or antigen in the sample can be detected by capacitance changing [16,17]. A significant amount of sensors did not give any signal at all and for others the reproducibility is low. Thereby, a most critical step in preparation of capacitive immunosensor is the immobilization of capture molecules on the support, a process where the orientation of the antigen-binding sites toward the analyte in solution plays a key role [18,19].

Immunoglobulins can be either adsorbed on surface directly or attached covalently to the surface modified with hetero-bifunctional self-assembled monolayers of alkylthiols [20,21]. Using the self-assembled monolayer (SAM) technique can potentially provide a reproducible and robust method of fabrication immobilized antibodies layers [22-23]. Self-assembled monolayer (SAM) is a method of formulation of ultrathin organic films requiring fewer steps than other approaches. Due to its high stability, good orientation, and easy preparation, the SAMs have become well-established method to immobilize sensor elements for immunosensor development. They are ordered molecular assemblies formed by the adsorption of an intended compound on a solid surface [24-26]. The SAM of thiolate compounds has been widely used utilizing 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidehydrochloride(EDC)/ hydroxysuccinimide (NHS) for the coupling of biomolecules [27, 28]. In this article, the use of cysteamine to form a versatile SAM tightly attached to the electrode surface by thiols (-SH) groups were tested. The amino groups of cysteamine SAM make it possible to immobilize antibodies through cross-linking by glutaraldehyde [29]. In addition, a novel platform of capacitive sensor based on interdigitated devices principle was purposed. The new sensor platform was composed of two aluminum vapor etched electrodes separated by wide gaps onto silicon wafers (Si/SiO₂/Al), with area approximately 3mm². The antigen-antibody interaction was measured by capacitance output signal. Finally, an attempted to use the SAM tightly attached to the aluminum surface was also be achieved. The aluminum supports were employed to antibody immobilization and its efficiency was evaluated by immunoenzymatic methods (modified ELISA). A new configuration for electrodes in mass production of reducing cost was purposed.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Goat anti-human IgG, H & L Chain Specific Peroxidase Conjugate (anti-IgG-HRP), Goat Anti-human IgG, H & L Chain Specific (anti-IgG), and Human IgG, Plasma (IgG) were purchased from Calbiochem. 2- Aminoethanethiol (cysteamine), 25% Glutaraldehyde, glycine and o-phenylenediamine (OPD) were acquired from SIGMA-ALDRICH (USA). All the other reagents were prepared with chemicals of analytical grade and the solutions used in the experiments were freshly prepared using ultra pure water from the MILLIPORE units

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.

2.2. Aluminum supports preparation

Aluminum supports measuring $3.0 \times 3.0 \text{ mm}^2$ surface area were previously polished on with alumina slurries (particles diameters $3.0 \mu\text{m}$) and then were immersed in a solution of 2M NaOH for 2min at 60°C . After that, the supports were subsequently cleaned to remove any physical adsorbed multilayer through sonication for 15 min in distilled water and ethanol. Finally, the supports were dried with stream nitrogen.

2.3. Immobilization of the IgG on the aluminum supports

The aluminum supports, after cleaned, were immediately immersed in a thiol solution of 25mM cysteamine (CYS) prepared in ethanol for 2h at room temperature. The excess of material non-reacted was removed after cleaned with ethanol. Then, the supports were then dipped in a 2.5% (v/v) glutaraldehyde prepared in 10mM PBS (pH 7.4) for 1h. After the SAMs prepared, the IgG were immobilized by incubation of the supports in a $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ Anti-IgG solution for 2h at 37°C . The coated

supports were exhaustively washed with PBS buffer. The excess of free reactive sites were blocked with 10mM glycine solution, overnight at 4°C, washed with water, and dried.

2.4. Evaluation of the IgG immobilization efficiency

The modified ELISA method, used to measure the activity of the IgG immobilized on aluminum supports, was carried by follow; the IgG immobilized aluminum supports were immersed in 100 μ L of a solution of IgG (1 μ g mL⁻¹) about 1h at 37°C. Between each step, the supports were rinsed three times with PBS. After that, a solution of Anti-IgG-HRP (1 μ g/mL) diluted in PBS solution also was incubated for 90 min at 37°C. A revelation solution was prepared adding 0.0325g of O-phenylenediamine, 8.5 μ L of Hydrogen Peroxide 30% (v/v) and diluting at 10 mL with 0.1 mol/L citrate-Na₂HPO₄ buffer, pH 5.5. About 100 μ L/supports of revelation solution was incubated for 25 min under the cover of the light and the reaction was stopped with 25 μ L/support of 8 mol/L H₂SO₄ and the absorbance was determined by transferring the remaining solution to the microtitration plates by an ELISA reader (Bio-rad, USA) at 492 nm.

2.5. Production of capacitive immunosensor

The capacitive biosensors were fabricated using silicon wafers (100) oriented, n-type, two inch diameter, and of 1 Ω .cm resistivity. The wafers were ultrasonically cleaned in methanol and HF 10% before furnace loading.

Wet SiO₂ 350 nm thick was grown at 1100°C in a three-zone Lindbergh furnace. The thickness of the grown thermal SiO₂ was measured using an Auto EI-IV Rudolph Ellipsometer. Aluminum films approximately 80 nm thick were thermally evaporated from a W boat onto the oxide surface and photolithographically defined to form two rectangular electrodes 1.5 mm wide and 2 mm apart. The length of the electrodes varied from 7 to 10 mm. The wafers were annealed in forming gas at 400°C for 30 minutes.

Insert Figure 1.

2.6. Apparatus and measurements of capacitance

The capacitance between electrodes was measured in the dark inside a metal box using two micromanipulators and a computer controlled HP 4284A Precision LCR Meter. The bias was 0 V and the level of the AC signal was 20 mV RMS.

Insert Figure 2.

3. Results and Discussion

3.1. Immobilization of Anti-IgG on aluminum by thiol monolayers

The process of immobilization of the antibody onto aluminum is showed at figure 3. The aluminum support was treated to immobilize the antibody by cysteamine and glutaraldehyde. The antibody could be immobilized via covalent by the aldehyde groups of glutaraldehyde that bind to the amino groups of Fab portion in the IgG molecule.

The gold has been a metal widely studied for thiol film performing to immobilize biomolecules to product surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance immunosensors [26, 27]. The gold is considered as inert metal permitting a strong linkage to the sulfur. In order to develop a robust immunosensor, the characterization of a thiol SAM on aluminum was as a first step for the fabrication of this immunosensors type. Then, the first experiment consisted to determine the influence of the concentration of cysteamine on the retention and the stability and activity of the bound IgG receptor. According to figure 4, varying the concentration of the cysteamine, the maximal retention and the activity of the bound IgG receptor was reached at 25mM cysteamine for all concentration of anti-IgG used. A discrete decreasing arrived up to 25mM as resulting of hindrance esteric with damage to the activity of the bound anti-IgG was also observed [29], then the concentration of 25mM was chosen to remain studies.

Insert Figure 3.

Insert Figure 4.

3.2. Effect of amount of IgG bound to SAM

The response signal of the immunosensor depends on the amount of anti-IgG immobilized, which in turn corresponds to the concentrations of the IgG in the incubating buffer. When a thiol monolayer attached to a sensor surface was performed at concentration of 25mM CYS, the curve achieve a plateau at approximately 1.0µg/mL anti-IgG with maximal activity of the bound IgG receptor, it was showed at figure 5. Then, a concentration of 1.0µg/mL anti-IgG was selected for subsequent immobilization on the capacitive immunosensor.

Insert Figure 5.

3.3. Characterization of the capacitive immunosensor

According to Figure 6, the capacitance response was maxima at 10²Hz on the response to the antigen-antibody interaction. However, the 10³Hz frequency was established because require a simpler electronic configuration, as possible the use of the purposed capacitive device in commercial capacitance meter.

Insert Figure 6.

The total capacitance is built up from several components. The first is the capacitance of self-assembled monolayer, SAM. The second is the capacitance of the self-assembled monolayer and the immobilized antibody. The total value of the capacitance can be described by the following equation after the antigen-antibody interaction:

$$C_T = C_o + C_{SAM} + C_{Ab} + C_{Ag},$$

where, C_o is the capacitance as fabricates, C_{SAM} is capacitance after the SAM monolayer, C_{Ab} is capacitance after the antibody immobilization and C_A is the capacitance after antigen-antibody interaction. As showing at Table 1, a little capacitance shift (0.5 pF) was observed after SAM preparation as indicative that a thin film was tightly attached to the aluminum surface with well organized monolayer functionalisation of alkanothiols, which form a compact insulating barriers,

avoiding the Faradic currents [14]. The covalent attachment of anti-IgG (1.0 μ g/mL) also resulted a little capacitance shift suggesting the coupling of anti-IgG resulted in a thinner efficient bioaffinity platform [29]. The antigen-antibody interaction measured resulted in a capacitance output signal of 5.9 pF, after the incubation with a solution of 1.0 μ g/mL IgG. These results provide a solid basis for further applications aiming at elaborating sensitive and specific immunosensors.

Insert Table 1

3.4. Calibration curve on the capacitive immunosensor

The calibration curve constructed by plotting the capacitance measured at picofarad against the concentration of different antigen layers is shown in Fig. 7. The capacitive immunosensor presented a good linearity with $r = 0.982$ ($p < 0.01$) and reproducibility; the coefficient of variation was 13.4% calculated by data processing on the MicrocalTM OriginTM, version 5.0, Microcal Software Inc. Then, the developed capacitive immunosensor is capable to measure changing of antigen layer at 0.1 μ g/ pF as indicative that the purposed capacitive device can be applied to immunosensor configuration with a reduced cost.

Insert Figure 7

Conclusion

The results suggest that the antigen-antibody interactions can be measured as proportional to the capacitance increase. Further studies to determine the actual potentiality of this biodevices and to elucidate a number of important issues, such as the reproducibility and sensitivity are necessary before the clinical application. The present method using SAM based on cysteamine-glutaraldehyde could be applied to the reversible affinity-sensors for other antigen-antibody or ligand-receptor couples, and would find applications to the biomolecular switches.

Acknowledgement

This research was supported by grants from the FINEP and FACEPE from Brazil.

References

- [1] J. N. Wilde, M. C. Petty, J. Saffell, A. Tempore, *Control* 1997, 9, 269-72.
- [2] J. Zhou, H. K. Tsao, Y. J. Sheng, S. Jiang, *J. Chem. Phys.* 2004, 2, 1050-1057.
- [3] A. Gebbert, M. Alvarez-Icaza, W. Stocklein, R. D. Schmid, *Anal. Chem.* 1992, 64, 997-1001.
- [4] D. Tang, R. Yuan, Y. Chai, J. Dai, X. Zhong, Y. Liu, *Bioelectronchem.* 2004, 65, 15-22.
- [5] D. Tang, R. Yuan, Y. Chai, X. Zhong, Y. Liu, J. Dai, *Electroanal.* 2005, 22, 43-49.
- [6] R. F. Taylor, I. G. Marenchic, R. H. Spencer, *Chim. Acta* 1991, 249, 67-90.
- [7] K. Yagiuda, A. Hemmi, S. Ito, Y. Asano, *Biosens. Bioelectron.* 1996, 11, 703-707.
- [8] P. B. Lippa, L. J. Sokoll, Chan DW. Immunosensors--principles and applications to clinical chemistry. *Clin Chim Acta* 2001, 314, 1-26.
- [9] C. Berggren, G. Johansson, *Anal. Chem.* 1997, 69, 3651-3659.
- [10] S. Q. Hu, Z. Y. Wu, Y. M. Zhou, Z. X. Cao, G. L. Shen, R. Q. Yu, *Anal. Chim. Acta* 2002, 458, 297-304.
- [11] S. Q. Hu, Z. M. Xie, C. X. Lei, G. L. Shen, R. Q. Yu, *Sens. Actuators B* 2005, 106, 641-647.
- [12] A.L. Newman, K.W. Hunter, W.D. Stanbro, *Chemical Sensors: 2nd International Meeting, Proceedings* 1986.
- [13] C. Berggren, B. Bjarnason, G. Johansson, *Biosens. Bioelectron.* 2002, 13, 1061-1068.
- [14] C. Berggren, B. Bjarnason, G. Johansson, *Electroanal.* 2001, 13, 173-180.
- [15] V. Billard, C. Martelet, P. Binder, J. Therasse, *Chim. Acta* 1991, 249, 367-371.

- [16] A. R. Varlan, J. Suls, W. Sansen, D. Veelaert, A. D. Loof, *Sens. Actuators B* 1997, 44, 334-339.
- [17] J. Li, J. P. Longtin, S. Tankiewicz, A. Gouldstone, S. Sampath, *Sens. and Actuators A* 2007, 133, 1-8.
- [18] P. Bataillard, F. G. Gardies, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, B. Colin, B. Mandrand, *Anal. Chem.* 1988, 60, 2374-2379.
- [19] M. Zayats, O. A. Raitman, V. I. Chegel, A. B. Kharitonov, I. Willner, *Anal. Chem.* 2002, 74, 4763-4770.
- [20] G. Wu, R. H. Datar, K. M. Hansen, T. Thundat, R. J. Cote, A. Majumdar, *Nat. Biotechnol.* 2001, 19, 856-860.
- [21] Y. Arntz, J. D. Seelig, H. P. Lang, J. Zhang, P. Hunziker, J. P. Ramseyer, E. Meyer, M. Hegner, C. Gerber, *Nanotechnology* 2003, 14, 86-89.
- [22] W. Limbut, P. Kanatharana, B. Mattiasson, P. Asawatreratanakul, P. Thavarungkul, *Biosens. Bioelectron.* 2006, 22, 233-240.
- [23] F. Yin, Y. Zhu, Q. Xie, Y. Zhang, L. Nie, S. Yao, *Analyst.* 2002, 10, 106-108.
- [24] N. Patel, M. C. Davies, R. J. Heaton, C. J. Roberts, S. J. B. Tendler, P. M. Williams, *Appl. Phys. A* 1998, 66, S569-S574.
- [25] L. Niu, C. Kvarnstrom, A. Ivaska, *J. Electroanal. Chem.* 2007, 600, 95-102.
- [26] E. Briand, M. Salmain, C. Compere, C. M. Pradier, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2006, 53, 215-224.
- [27] L. Huang, G. Reekmansa, D. Saerens, J. M. Friedt, F. Frederix, L. Francis, S. Muyldermans, A. Campitelli, C. V. Hoof, *Biosens. Bioelectron.* 2005, 21, 483-490.

[28] S. Ferreti, S. Paynter, D. A. Russell, K. E. Sapsford, D. J. Richardson, *Trends Anal. Chem.* 2000, 19, 530–540.

[29] R. F. Dutra, Kubota, *Clinica Chimica Acta*, 2007, 376, 114–120.

[30] S. F. Chou, W. L. Hsueh, J. M. Hwang, C. Y. Chen, *Biosens. Bioelectron.*, 2004, 19, 999–1005.

[31] S. F. Chou, W. L. Hsueh, J. M. Hwang, C. Y. Chen, *Anal. Chim. Acta* 2002, 453, 181–189.

Figure 1.

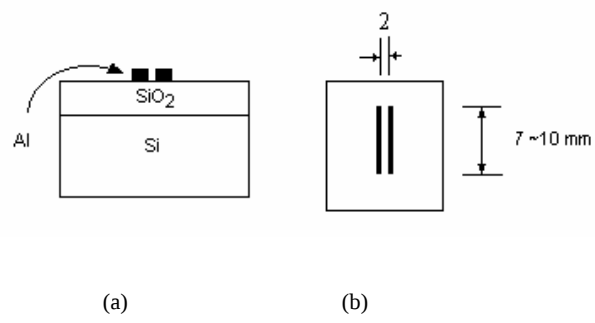


Figure 2.

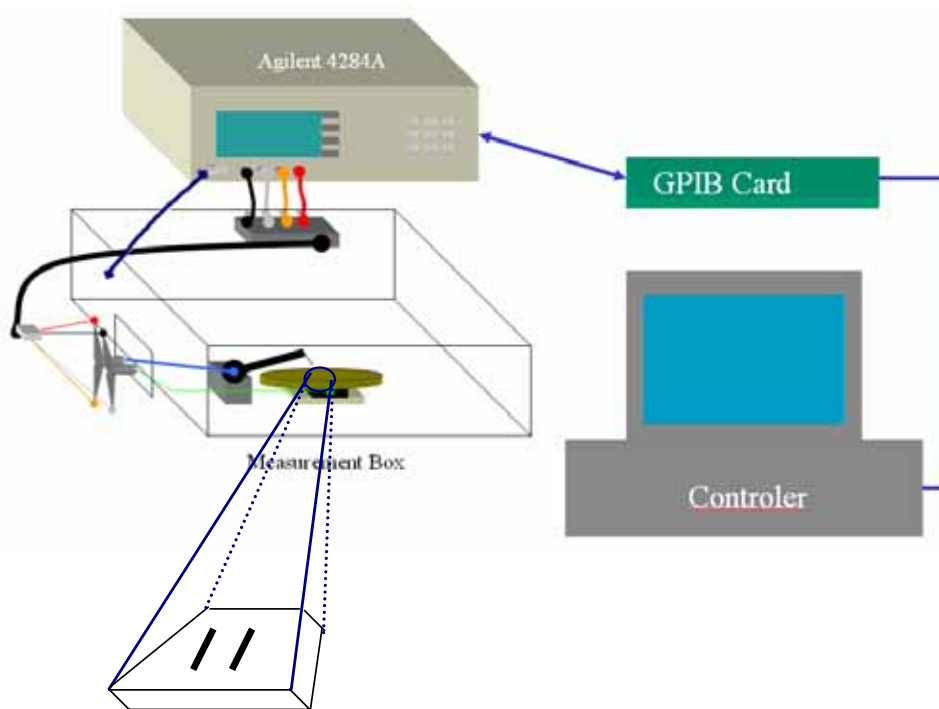


Figure 3.

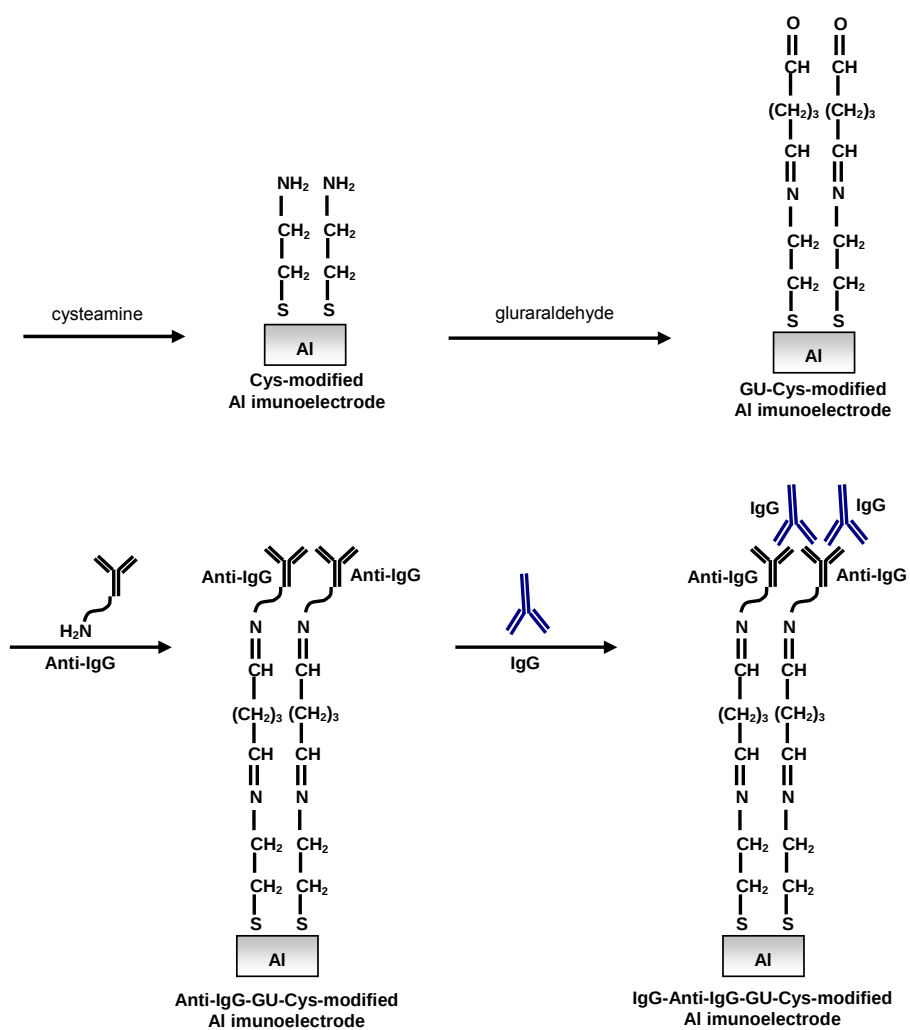


Figure 4.

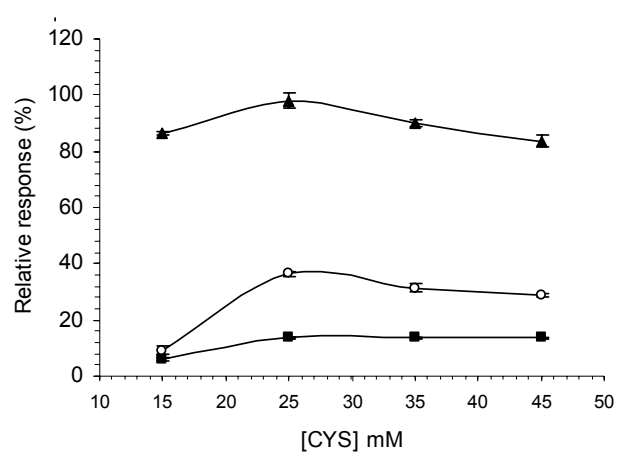


Figure 5.

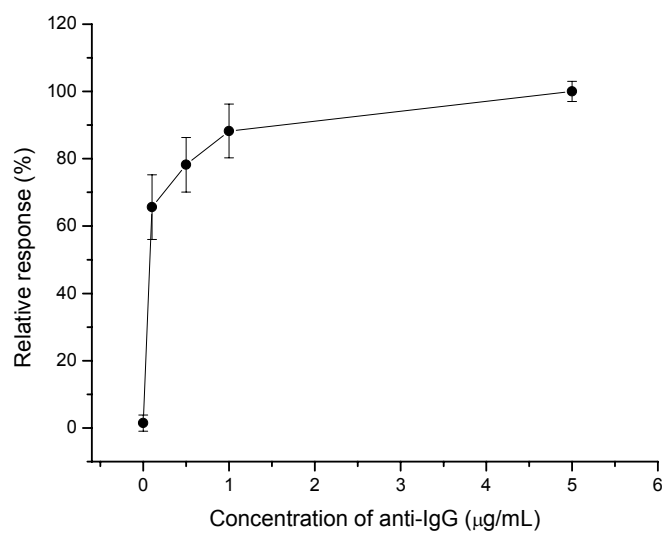


Figure 6.

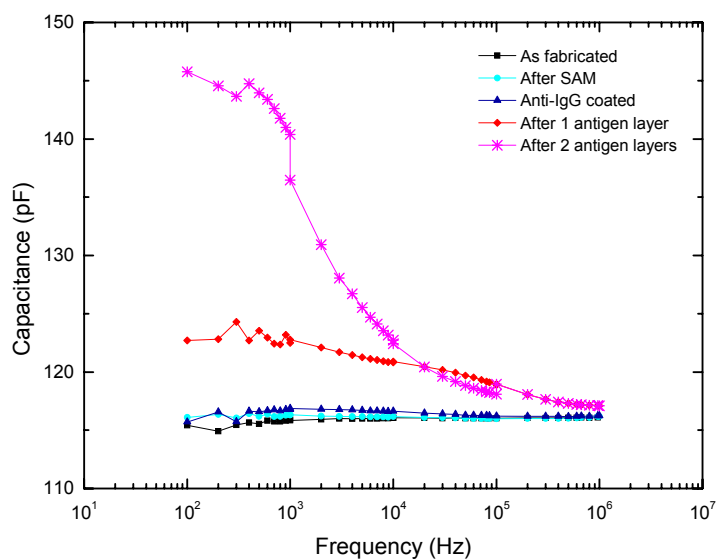


Figure 7.

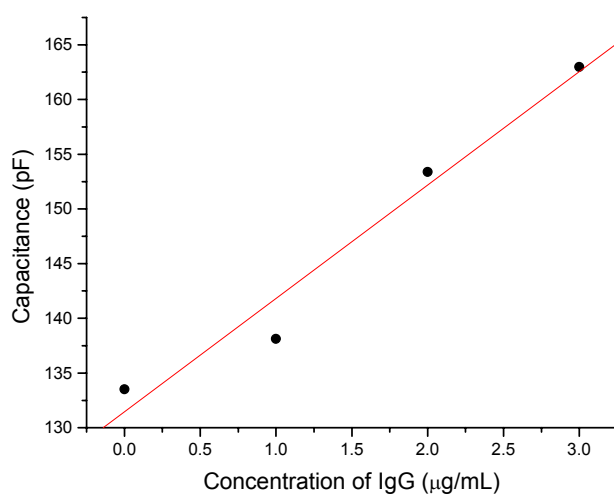


Table 1.

Step of immunosensor	Capacitance Shift (pF)
<i>As fabricated</i>	0.0
<i>After SAM</i>	0.5
<i>Anti-IgG coated</i>	0.5
<i>After Anti-IgG – IgG interaction</i>	5.9

Captions for Figures and Table

Figure 1. Schematic diagram of the device geometry of the capacitive immunosensor. (a) and side of view; (b) Top of view.

Figure 2. Schematic design of the capacitive immunosensor system.

Figure 3. Schematic representation of the IgG immobilization by thiol film.

Figure 4. Effect of the concentration of the cysteamine as function of the maximal retention and activity of the bound IgG at 0.1 μ g/mL (-■-), 0.5 μ g/mL (- o -), and 1.0 μ g/mL (-▲-) anti-IgG concentration.

Figure 5. Effect of the amount of anti-IgG immobilized on the response of the immunoassay.

Figure 6. Characterization of the capacitance as function of frequency varying with bias 0 V, applying a 20 mV of potential.

Figure 7. Response on the IgG concentration as function of the capacitance. The linear fit is showed (□).

Table 1. Results of capacitance shift at each step of the immunoassay from capacitive immunosensor.

6.0 – CONCLUSÕES GERAIS

Baseado nos resultados pode-se concluir que:

- Os microeletrodos (Si/ SiO₂/ Al) foram produzidos a partir da evaporação do alumínio sobre o substrato de silício (Si/SiO₂);
- A caracterização da SAM de tiol na superfície do alumínio demonstrou retenção e atividade máxima da ligação do receptor IgG na concentração de 25mM de cisteamina;
- A curva de calibração atingiu atividade máxima de ligação do IgG em aproximadamente 1.0µg/mL de anti-IgG;
- A interação antígeno-anticorpo demonstrou sua máxima resposta capacitiva em uma frequência de 10² Hz, mas a frequência escolhida foi de 10³ Hz;
- O imunossensor capacitivo apresentou uma boa linearidade com $r = 0.982$ ($p < 0.01$) e o coeficiente de variação foi de 13,4%. De acordo com esses dados, o dispositivo proposto apresentou uma sensibilidade de 0.1µg/ pF.

7.0 - ANEXO

7.1. Normas da revista



ELECTROANALYSIS

An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis

Instructions for Authors

1. General Information

Electroanalysis is an international, highly peer-reviewed journal containing original research papers (Full Papers), Short Communications, critical Reviews, and details of forthcoming meetings, book reviews, and equipment news concerned with the development and applications of electroanalysis. The scope of the Journal includes advances in analytical voltammetry and potentiometry, new electrochemical sensors and detection schemes, novel electrode materials, advanced instrumentation, and practical applications in the biomedical, environmental, industrial, pharmaceutical, and food fields. *Electroanalysis* is a vital medium for research scientists and serves as a bridge between the research laboratory and the routine analytical laboratory. *Electroanalysis* is published 24 times a year. Please submit your manuscripts using manuscriptXpress, our web-based submission system, on the *Electroanalysis* homepage and click on "[For Authors](#)". Accepted formats are Microsoft Word/RTF, Postscript, and PDF (with fonts included). Please prepare one single file that contains all the parts of the manuscript (formulae, figures, schemes, tables, etc.) and integrate all figures and tables where they are cited in the document. The data submitted by you will be sent to your E-mail address for confirmation. For more information about OSM please refer to the journal's homepage. The authors must inform the Editor-in-Chief of manuscripts submitted to, soon to be submitted to, or in press at other journals that have a bearing on the manuscript being submitted. All submissions and publication issues must be in keeping with the Ethical Guidelines for Publication in Journals and Reviews of the European Association of Chemical and Molecular Sciences.

IMPORTANT: Any manuscript already available on personal/group web pages will be considered by the Editors as already published and will not be accepted. Manuscripts containing animal experiments must include a statement in the Experimental Section to state that permission was obtained from the relevant national or local authorities. The institutional committees that have approved the experiments must be identified and the accreditation number of the laboratory or of the investigator given where applicable. If no such rules or permissions are in place in the country where the experiments were performed, then this must also be clearly stated. Manuscripts with experiments with human subjects or tissue samples from human subjects must contain a disclaimer in the Experimental Section to state that informed signed consent was obtained from either the patient or from next of kin. Each contribution

submitted to *Electroanalysis* will be sent to independent referees via E-mail. Authors are encouraged to suggest suitable referees (full names and affiliations). However, not exclusively those referees nominated by the authors will be contacted. All accepted manuscripts are edited before printing to ensure scientific consistency, clarity of presentation, and uniformity of style. The correspondence author will receive the page proofs via E-mail as a PDF file.

Reprints can be ordered when the proofs are returned to the publisher. Reprint rates are also available from the Editorial Office on request. On behalf of our authors who are also US National Institutes of Health (NIH) grantees, we will deposit in PubMed Central (PMC) and make public after 12 months the peer-reviewed version of the author's manuscript. By assuming this responsibility, we will ensure our authors are in compliance with the NIH request, as well as make certain the appropriate version of the manuscript is deposited. We await the release by PMC of the protocols regarding manuscript submission. We reserve the right to change or rescind this policy.

2 Type of Contributions

Reviews deal with topics of current interest in any area of electroanalysis. Rather than an assemblage of detailed information, they should give a critical overview of a particular field, providing the reader with an appreciation of the importance of the work, a summary of recent developments, a balanced discussion of problems and progress, and well selected literature coverage. Reviews ought to meet all the criteria for peer review (two independent referees) and most importantly, should be composed with the general perspective of the topic as the central thread. Although Reviews are generally written on invitation, unsolicited manuscripts are also welcome provided their contents are in keeping with the character of the journal. Authors should discuss the article with the Editor-in-Chief at an early stage. Reviews should not exceed 25 typewritten pages and can include up to 20 camera-ready display items (figures and tables). The first section of the article itself, the Introduction, should primarily introduce the non-specialist to the subject in as clear a way as possible. A biographical sketch (200-300 words) and a portrait-quality black & white photograph (or TIF file) of the correspondence author(s) (maximum of three) should also be submitted.

Full Papers must be either of current general interest or of great significance to a more specialized readership and should report peer-reviewed comprehensive details of completed studies, whether experimental or theoretical, and have well developed discussions, background information, and literature coverage. All contributions will be judged on the criteria of originality, quality and novelty. Papers that are suitable for consideration will then be sent to two independent referees. Based on the referees' recommendations, the Editor-in-Chief will make a decision on whether to accept a contribution. Manuscripts must not have been published previously, except in the form of a preliminary Communication (reprint requested). Details that could be of importance to the referees,

but that are unlikely to be of interest to the reader, can be submitted as an enclosure for the referees. Only articles that have already been published in a scientific journal should be cited. Copies of cited publications not yet available for the referees should be submitted along with the manuscript. Unpublished results and lectures should only be cited for exceptional reasons. The manuscript can be divided into sections in the following order: Abstract, Introduction, Experimental, Results, Discussion, Conclusions, References and should be limited to 15 type-written pages plus no more than 8 display items (figures and tables).

Short Communications are unsolicited, peer-reviewed, short reports. Preliminary results might be presented, which will usually be followed up by a Full Paper. The results must be of great significance and contribute to the development or further development of an important area of research. As for Full Papers, Communications will be sent to two independent referees. There should be no section headings except for an Experimental section (where appropriate) at the end of the article before the references. The first paragraph should summarize the reasons for undertaking the work, and the main conclusions which can be drawn. The final paragraph should summarize the major findings of the paper. Short Communications should be limited to 6 typewritten pages plus references and no more than 4 display items (figures and tables).

Electroanalysis Forum contains short news items from industry and academia, correspondence, and product and conference information. Single-page manuscripts, with or without a display item, are welcome and should be sent to the Editor-in-Chief directly via E-mail (electroa@nmsu.edu).

Journal/Software/Book Reviews are usually written on invitation, but suggestions for products/topics/reviewers are always welcome. Publishers should send announcements, brochures or preferably products directly to the Editor-in-Chief. Unsolicited books will not be returned.

3 Manuscript Styling

Authors are encouraged to consult recent issues of the journal for examples of format. Manuscripts must be typed with double spacing (including footnotes, references, tables, and legends). The full names of all authors should be given along with full postal addresses, and fax numbers and E-mail addresses. The correspondence author should be designated by an asterisk. Please supply 5 keywords and an abstract of up to 100 words describing the main results and conclusions of the paper. Either American or English spelling can be used as long as it is consistent throughout the text. SI units should be used. References: Only papers which are published or in press should be referenced. References should must be numbered consecutively in the text and typed in square brackets, e.g. ...as shown by Kissinger [1,6] and Wang [7-9]. At the end of the manuscript the references should be listed as follows.

Journals:

[1] P. T. Kissinger, *Anal. Chem.* 1986, 59, 1287.

[2] H. Fujimori, K. Osada, *Chem. Lett.* 1994, 456.

Books:

[3] E.J. Bentz, *Synthetic Fuels Technology Overview with Health and Environmental Impacts*, Ann Arbor Scientific Press, Ann Arbor, MI 1981.

[4] M. Hite, in *Laboratory Safety, Theory and Practice* (Eds: A. A. Fuscaldo, B. J. Erlick, B. Hindman), Academic Press, New York 1983, pp. 29-57.

[5] E.B. Sansone, *Ph.D. Thesis*, University of Michigan, Ann Arbor, MI 1967.

Artwork: Multi-part figures should be avoided. Color figures/schemes are welcome and will be reproduced for free when scientifically necessary (to be decided by the Editor-in-Chief). For all other colored artwork, authors are expected to make a contribution of EUR 395 per figure/scheme (with taxes) towards the extra costs for color reproduction. The quality of all figures should be such that they can be reproduced directly after reduction to 85 mm width. Larger sizes can be printed in exceptional cases only. Numbers, letters, and symbols used must be all roughly the same size and such that they are 1.8 mm high after the figure has been reduced to a width of 85 mm. If the figures are of poor quality, the authors will be asked to provide better original figures, which could lead to a delay in publication. Tables should be provided in a camera-ready form with a text and symbol size which will result in a height of 2 mm when the table is reduced to a width of 85 mm. Tables should have the absolute minimum of horizontal and no vertical lines (two horizontal as header, one at the base).

4 Electronic Data Processing - Final/Revised Version

Please note that the final/revised manuscript, which will be used for editing, must be formatted differently from that used for online submission via manuscriptXpress!

The final/revised document must be kept as simple as possible; please avoid any complex formatting, using the formula editor of your word-processing system and using automatic endnotes, enumerations or listings as far as possible. The final/revised version should be submitted via E-mail: (i) Title page, abstract, text pages, references, tables and captions to figures/schemes must be saved as one file in Word format as well as in an interchangeable format such as RTF. (ii) Formulae, figures, schemes and tables must be saved in separate files and must not be integrated in the script. (iii) Figures (especially half-tone or gray-scale images) must be stored as TIF or JPG files. If the files are too big for E-mail transmission, please provide the Editor-in-Chief with a DOS-formatted diskette or CD-ROM. Files for figures must have a resolution of at least 300 dpi.

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.

Supported by CNPq, FINEP, FDPE/UPE, FAPESP.

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 advantage is that no label 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(Hewllet-Packer,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 (0.78cm Φ). 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.