Leandro de B. Carneiro

Detecção do peptídeo p17-1 (HIV) baseada em SERS

(Surface-enhanced Raman Spectroscopy)

Tese apresentada ao Instituto de Química,

Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química

Orientador: Prof. Dr. Sidney J. L. Ribeiro

Araraquara

2015

LEANDRO DE BISPO CARNEIRO

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Araraquara, 29 de julho de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. SIDNEY JOSÉ LIMA RIBEIRO (Orientador)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara – SP

Prof. Dr. MARCELO NALIN
Instituto de Química / UNESP / Araraquara – SP

Dr. ANTONIO APARECIDO PUPIM FERREIRA
Instituto de Química / UNESP / Araraquara – SP

Prof. Dr. AIRTON ABRAHÃO MARTIN
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba / UNIVAP / São José dos Campos - SP

Prof. Dr. GUSTAVO FERNANDES SOUZA ANDRADE
Instituto de Ciências Exatas / UFJF / Juiz de Fora- MG

FICHA CATALOGRÁFICA

Carneiro, Leandro de Bispo
C289d Detecção do peptídeo p17 (HIV) baseado em SERS (Surface-enhanced Raman Spectroscopy) / Leandro de Bispo Carneiro – Araraquara : [s.n], 2015
134 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Sidney José Lima Ribeiro

1. Efeito raman. 2. Biossensores. 3. Nanopartículas. 4. Bioestatística. 5. HIV (Vírus). I. Título.

Elaboração: Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

CURRICULUM VITAE

DADOS CURRICULARES

Nome: *Leandro de Bispo Carneiro*

Naturalidade: *Clevelândia-PR*

Nacionalidade: *Brasileiro*

Estado Civil: *Solteiro*

FILIAÇÃO

Pai: *Ciderley Arruda Carneiro*

Mãe: *Neusa de Fátima B. Carneiro*

Profissão: *Bacharel em Química*

Documento de Identidade: *8.375.550-4*

Endereço para Correspondência

Rua Luiz Vaz de Camões, 1942-Vila Progresso, CEP 14800-160-Araraquara-SP.

Email: *research.photonics@gmail.com*

FORMAÇÃO

Básica

Ensino Fundamental-Colégio Estadual Presidente Castelo Branco-Clevelândia PR

Ensino Médio-Colégio Estadual João XVIII-Clevelândia PR

Acadêmica

GRADUAÇÃO

Bacharel em Química pela Universidade do Oeste do Paraná-UNIOESTE-Toledo PR.

Conclusão dezembro 2008.

Iniciação Científica realizado junto ao Centro de Ciências Exatas e Engenharias da UNIOESTE-Toledo, sob orientação da professora Dra. Silvia Denofre de Campos.

Projetos

MATERIAIS CERÂMICOS BIOATIVOS CONSTITUÍDOS POR Na_2O-CaO-SiO_2- P_2O_5- TiO_2. In: XVII ENCONTRO ANUAL DE INCIAÇAO CIENTIFICA, 2008

Estudos de Biocompatibilidade em Materiais Constituídos de Na_2O-CaO-P_2O_5-SiO_2 - TiO_2, 2006-2007.

PÓS GRADUAÇÃO

Mestrado em Química junto ao Departamento de Química Inorgânica da Universidade Estadual de Maringá-UEM, sob orientação do professor Dr. Emerson Girotto.

Conclusão Fevereiro 2011**.**

***Projeto* Desenvolvimento de um sistema de microfluídica para a montagem de biossensores para a detecção precoce de cancêr**

Doutorado em Química junto ao Departamento de Química Inorgânica do Instituto de Química Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho-Unesp, Araraquara-SP, sob orientação do professor Dr. Sidney J.L. Ribeiro.

Estágio sanduíche no Departamento de Química da Universidade de Victoria, Victoria-British Columbia-Canadá, sob supervisão do professor Dr. Alexandre G. Brolo (2013-2014).

Detecção do peptídeo p17-1 baseado em SERS (Surface-enhanced Raman Spectroscopy).

Periódicos publicados.

MONTEIRO, JOHNY P.; **CARNEIRO, LEANDRO B.**; RAHMAN, MOHAMMAD M.; BROLO, ALEXANDRE G. ; SANTOS, MARCOS J.L. ; FERREIRA, JACQUELINE ; GIROTTO, EMERSON M. . Effect of periodicity on the performance of surface plasmon resonance sensors based on subwavelength nanohole arrays. Sensors and Actuators. B, Chemical, v. 178, p. 366-370, 2013.

CARNEIRO, L. B.; MONTEIRO, J.P.; FERREIRA, J.; GIROTTO. A new approach to immobilize poly(vinyl alcohol) on poly(dimethylsiloxane) resulting in low protein adsorption. Applied Surface Science, v. xxxxxx, p. 1-6, 2011.

CAMPOS, S. D.; CAMPOS, E. A.; Favreto, W. J.A.; **CARNEIRO, L. B.**; Pazinato, J., Estudo da bioatividade de materiais constituídos por Na_2O-CaO-P_2O_5 -SiO_2 : Influência da adição dos óxidos de zircônio e de titânio. Orbital: the Electronic Journal of Chemistry, v. 3, p. 180-196, 2011.

Simões, M.R.; Costa, T. A.; Souza, M. L.; Holzbach, J. C.; **CARNEIRO, L. B.;** Gubiani, A.G., . Análise físico-química de linguiças coloniais comercializadas no município de Toledo, Estado do Paraná e comparação com valores fornecidos pelos fabricantes. Acta Scientiarum. Technology (Online), v. 31, p. 311-318, 2009.

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

CARNEIRO, L. B. ; CAMPOS, S. D. . MATERIAIS CERÂMICOS BIOATIVOS CONSTITUÍDOS POR Na_2O-CaO-SiO_2- P_2O_5- TiO_2. In: XVII ENCONTRO ANUAL DE INCIAÇAO CIENTIFICA, 2008, FOZ DO IGUAÇU. XVII EAIC. CASCAVEL, 2008.

CARNEIRO, L. B. ; CAMPOS, S. D. ; CAMPOS, E. A. . Estudos de Biocompatibilidade em Materiais Constituídos de Na_2O-CaO-P_2O_5-SiO_2 - TiO_2. In: XIV SBQSul - Química na Sociedade: Significados e implicações, 2007, ERECHIM. SBQSul, 2007.

CARNEIRO, L. B. ; CAMPOS, S. D. ; CAMPOS, E. A. . Estudo de Biocompatibilidade em materiais Constituídos de Na_2O-CaO-P_2O_5-SiO_2.In: XV ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E VI ENCONTRO DE PESQUISA DA UEPG,, 2006, Ponta Grossa. XV EAIC, 2006.

Resumos publicados em anais de congressos

CARNEIRO, L.B.; R. S.; BROLO, A., Surface-enhanced Raman Scattering detection Anti-p17 Antibody, 97th Canadian Chemistry Conference and Exhibition, Chemical Institute of Canada, 2014.

CARNEIRO, L.B.; FERREIRA, J.; GIROTTO. Surface Functionalization of PDMS for Microfluids Application. In: X Brazilian MRS Meeting - Sociedade Brasileira de Materiais, 2011, Gramado. X Brazilian MRS Meeting 2011, 2011. v. 0. p. 0-0.

CARNEIRO, L. B.; MONTEIRO, J.P.; FERREIRA, J.; GIROTTO, E., Microfluídica aplicada á fabricação de biosensores baseados em SPR. In: 33ª Reunião Anual da SBQ Águas de Lindoia, SP, 2010, Aguas de Lindòia. 33ª Reunião Anual da SBQ Águas de Lindoia, SP, 2010.

CARNEIRO, L. B.; MONTEIRO, J.P.; FERREIRA, F.; FERREIRA, J.; GIROTTO. E., "Biosensor baseado em ressonância de plasmon de superfície gerado em nanoestruturas. In: 33ª Reunião Anual da SBQ Águas de Lindoia, SP, 2010, Águas de Lindoia. 33ª Reunião Anual da SBQ Águas de Lindoia, SP, 2010.

CARNEIRO, L. B.; CAMPOS, S. D.; CAMPOS, E. A.; Pazinato, J. Morfologia e Bioatividade de Cerâmica Porosa Constituída por Na_2O-CaO-SiO_2-P_2O_5-TiO_2. In: 32a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza. 32A Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009.

CARNEIRO, L. B.; CAMPOS, S. D.; CAMPOS, E. A. Effect of the TiO2 on Bioactivity of Na2O-CaO-SiO2-P2O5. In: I Latin A merican Meeting on Biological Inorganic Chemistry, XIV Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry, 2008, FOZ DO IGUAÇU. Book of Abstracts of XIV BMIC / I LABIC, 2008. p. p.427.

CARNEIRO, L. B.; CAMPOS, S. D.; CAMPOS, E. A.Estudo de biocompatibilidade em materais vitro - cerâmico constituído de Na_2O-CaO-SiO_2- P_2O_5- TiO_2. In: XV Encontro de Química da Região Sul - Química e a Interdisciplinalidade, 2007, Ponta Grossa. XVSBQ Sul.

Apresentações de Trabalho

CARNEIRO, L.B.; RIBEIRO, S.; BROLO, A. Biosensing and Nanomedicine VIII" conference have accepted your paper, "**Detection of p17-1 peptide (HIV) based in surface enhanced Raman scattering (SERS)**," for Oral presentation,**Symposium**: SPIE NanoScience + Engineering, **PAPER NUMBER:** 9550-11, San Diego, California United States, 2015

CARNEIRO, L.B.; FERREIRA, J.; GIROTTO, E. Surface Funcionalization of PDMS for Microfluidics Application. 2011. (Apresentação de Trabalho oral)

CARNEIRO, L. B.; MONTEIRO, J.P.; GIROTTO, E; SANTOS, M. J. L.; FERREIRA, J. Microfluídica aplicada á fabricação de biosensores baseados em SPR. 2010. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

CARNEIRO, L. B.; MONTEIRO, J.P.; FERREIRA, J.; FERREIRA, F., Biosensor baseado em ressonância de plasmon de superfície gerado em nanoestruturas. 2010. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

CARNEIRO, L. B.; CAMPOS, S. D.; CAMPOS, E. A. Effect of the TiO_2 on Bioactivity of Na_2O-CaO-SiO_2-P_2O_5 Ceramic. 2008. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

CARNEIRO, L. B.; CAMPOS, S. D.; CAMPOS, E. A. Materiais cerâmicos bioativos constituídos por Na_2O-CaO-P_2O_5-SiO_2-TiO_2. 2008. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

CARNEIRO, L. B.; CAMPOS, S. D.; CAMPOS, E. A. Estudo de Biocompatibilidade em vitreo-cerâmicos constituídos de Na_2O-CaO-P_2O_5-SiO_2-TiO_2. 2007. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

CARNEIRO, L. B.; XV - Encontro anual de iniciação científica (EAIC). 2006. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

CARNEIRO, L. B.; CAMPOS, S. D.; CAMPOS, E. A. 14º SBQsul. 2006. (Apresentação de Trabalho/Congresso

Dedicatória

Dedico este trabalho à Deus pelo Dom da vida e aos meus pais, pelo incentivo.

Agradecimentos

Chega ao fim mais uma fase da vida e como tudo na vida ELE vem em primeiro lugar. Agora não vai ser diferente, agradeço a DEUS, razão do meu existir, por ter acreditado em mim duas vezes dando me dom da vida e por ser a "bússola" que orienta os meus caminhos, ilumina os meus pensamentos e que me conduziu durante esta jornada, até o fim de mais uma etapa. Obrigado por tudo!

Agradeço aos meus pais Ciderley e Neusa, por sempre estarem dando apoio e incentivo, mesmo que distante. Agradeço principalmente pelas palavras da minha mãe querida, "confie que você vai conseguir", sem seu apoio, mais uma vez, eu não teria chegado até aqui.

Ao meu orientador professor Dr. Sidney Ribeiro pela oportunidade e ensinamentos. Agradeço ao grupo de pesquisa em Materiais Fotônicos pelo acolhimento e amizade.

Durante os quatro anos foram geradas grandes amizades, as quais irei levar para toda a vida. Agradeço imensamente a Michele, Molíria e Robson, além da amizade, compartilhamento de ensinamento e incentivo. Não menos importantes, aos meus grandes amigos, Rafael Miguel, Marcos Vinícius, Denise, Fernando, Igor, Lippy e Hernane.

Não tenho palavras para descrever o acolhimento e aprendizado durante meu estágio sanduíche em Victoria- British Columbia. Agradeço aos grandes amigos Abhay Kutnala, Ivy, Joan, Klester e ao pessoal da escola de inglês VIRCS (*Victoria Immigrant and Refugee Centre Society*), principalmente Hazel Morris, Anna e Melina McConnel por toda a dedicação, paciência e pelo conforto. Thank you!

Ao professor Dr. Alex Brolo pela paciência, ensinamentos e sugestões muito importantes dadas ao meu trabalho e também ao seu grupo por estarem sempre dispostos a ajudar com opiniões decisivas e pela amizade. São eles: Meikun Fan, Regie, Nick, Hondjae, Milton, Mahdieh Atighi, Klester, Ariyan Suleman, Koh Yin e Muyang.

A minha namorada Malu pela paciência e carinho que, mesmo estando longe, sempre me incentivava.

Ao programa ciência sem fronteiras (CNPq) e a Rede Nanobiotec (CAPES) pelo apoio financeiro.

Aos funcionários do Instituto de Química por terem me ajudado na concretização deste sonho.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

Muito obrigado!

''Don’t ever let someone tell you that you can’t do something. You got a dream, you gotta protect it. When people can’t do something themselves, they’re gonna tell you that you can’t do it. You want something, go get it.''

Resumo

A espectroscopia de Raman intensificada por superfície (SERS, termo em inglês *Surface-enhanced Raman Spectroscopy*) é uma técnica promissora que mostra a sensibilidade para a detecção da interação de biomoléculas que são importantes para detecção precoce de doenças.

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) têm sido um grande problema por várias décadas. Existem vários métodos de deteção baseados na interação específica de anticorpos, tais como, o ELISA e os testes rápidos (TR´s). No entanto, novas estratégias têm sido desenvolvidas para rápido diagnóstico do vírus HIV, e uma prova de conceito de detecção do peptídeo p17-1 foi descrito neste trabalho.

A proteina matriz p17 é uma essencial proteína no ciclo de replicação do vírus HIV. As fases iniciais da replicação do vírus envolve a pré integração do complexo do DNA no núcleo do p17 desempenhando um papel na ligação de RNA viral e transporte para a membrana.

Neste trabalho foram descritos duas plataformas SERS para a detecção do vírus HIV baseado no peptide p17 -1 (sequência *LSGGELDRWEKIRLPGG).* O anticorpo foi imobilizado em um substrato de ouro usando duas diferentes camadas automontadas (SAM). A primeira SAM, os substratos de ouro foram imersos em uma solução aquosa de 11 mercaptoundecanóico (MUA). Na segunda SAM, os substratos foram imersos em uma mistura aquosa de politietileno glicol (SH-PEG-COOH e SH-PEG-CH_3). Aqui serão chamados de SAM-MUA e SAM-PEG, respectivamente. Ambas as SAM´s foram imersas emu ma solução de anticorpo (anti-p17) e foram descritas como plataforma d captura MUA e PEG. Ambas plataformas foram funcionalizadas com o peptídeo p17-1. Sondas SERS foram preparadas com nanopartículas de ouro e revestidas com uma molécula Raman reporter (azul de Nilo A) e funcionalizadas com um anticorpo anti-p17. Estas estruturas (sonda SERS e plataformas de captura) formam um ensaio sanduíche, uma estratégia regularmente utilizada para detecção com alta sensibilidade.

No mapeamento SERS a cor azul claro representa a forte interação do peptídeo com a sonda, que deve correlacionar-se com a detecção específica de p17-1 no ensaio. Por outro lado, regiões em azul escuro no mapeamento, indicam que menos sondas SERS estão presentes na superfície, como esperado para os negativos controles. O histograma reflete uma distribuição log-normal inclinado para maiores valores de intensidade de um número relativamente pequeno de eventos para resultado experimental.

Um teste de Cohen´s d foi obtido para o ensaio sanduíche MUA e mostra o deslocamento entre o controles e o experimental. Um grande deslocamento foi obtido, o que significa que grupo dos controles não interferiram no experimental. Além disso, foi utilizado o teste Cohen's d para comparar ambos ensaio (MUA e PEG). O ensaio sanduíche-MUA mostrou um log de distribuição normal distorcida para zero, o que significa menos sondas SERS na superfície para o grupo dos controles. A abordagem sugere para detectar o peptídeo p17-1 com ensaio sanduíche-MUA foi mais promissora e pode ainda ser testado utilizando soro contaminado futuramente.

Palavras-chave: HIV, peptídeo p17-1, SERS e biosensor.

Abstract

Surface-enhanced Raman Scattering (SERS) technique offers great promises for simplified and sensitive detection of biomolecular interactions that are relevant for early disease diagnostics.

Human immunodeficiency virus (HIV) has been a problem for decades. There are several methods of diagnostics based on antibodies specific reactions, such as enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) and rapid test (RT). However, new strategies have been developed for rapid HIV diagnostics and, as a proof-of-concept, peptide p17-1 was considered here.

The matrix protein p17 is a structural protein that is essential in the life cycle of the retrovirus The early stages of the virus replication involve the pre integration of the DNA complex into the nucleus P17 plays a role in RNA viral binding and transport to the membrane.

Here were describe two new SERS platform for HIV detection based on peptide p17-1 (sequence *LSGGELDRWEKIRLPGG).* The antibody anti-p17 was immobilized in a planar gold surface using two differents self-assembled (SAM) techniques. First SAM, were obtained by immersion of the surface into ethanolic solution of 11-Mercaptoundecanoic acid (MUA). Second SAM were obtained by immersion in aqueous solution aquous mixtures of (SH-PEG-COOH/SH-PEG-CH_3) and polyethylene glycol (PEG,). Here were describe the two platforms as SAM-MUA and SAM-PEG, respectively. Both SAM´s were immersed in a solution containing the anti-p17. Samples at this step were called capture platform-MUA and capture platform-PEG. Both capture platforms were funcionalizated with the peptide p17-1. SERS probes were prepared with gold nanoparticles coated with a Raman reporter molecule (Nile Blue A) and, functionalized with an anti-p17. These structures (SERS probe and capture platforms) allow for a sandwich assay, a strategy regularly used for high-sensitivity detection.

The light blue color in the SERS mapping represents peptide strong response from the SERS probe, which should correlate with the specific detection of p17-1 in the assay. On the other hand, shows dark blue regions, indicating that less SERS probes are present in the surface, as expected for this negative control. The histogram reflects a log-normal distribution skewed to larger values of intensities from a relative small number of events for experimental results.

Cohen´s d test for sandwich assay-MUA were obtained and showed the difference between controls and experimental groups. A large shift was obtain what means controls group did not interfere in the results. Moreover, Cohen´s d test was used to compare both assay (MUA and PEG). Sandwich assay-MUA showed log normal distribution skewed zero, what means less probes SERS on the

surface for controls group. The suggest approach to detect peptide p17-1 with sandwich assay-MUA is promising and could be further tested using serum contamined.

Keywords: HIV, p17-1, biosensor, SERS

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 Proteínas regulatórias e suas funções [15]..... 4

Tabela 2.1 Aproximação da ordem de magnitude para seção de choque (por molécula) para vários processos de espectroscopia [58]..... 21

Tabela 3.1.Propriedades e abundância de imunoglobulina [122]..... 40

Tabela 5.1. Modo de atribuição da superfície de ouro modificada com MUA (SAM) e plataforma de captura e plataforma funcionalizada o peptídeo. 64

Lista de Figuras

Figura 1.1 Pessoas vivendo com HIV entre 15-49 anos. Fonte adquirida WHO [9]..... 2

Figura 1.2 Vírus HIV adaptado [13]..... 3

Figura 1.3 Ciclo de replicação do vírus HIV.(i) Ligação - nesta etapa o vírus se liga aos receptores CD4 na superfície da célula.(ii) Fusão - o envelope HIV e os linfócitos se fundem, o que permite a entrada do HIV na célula. (iii) Transcricão reversa - dentro da célula ocorre a conversão do material genético HIV-RNA para HIV-DNA, usando a enzima transcriptase reversa. A conversão permite a entrada do HIV-DNA no núcleo da célula e combina com o material genético. (iv) Integração - no núcleo da célula, a enzima integrase utiliza o seu DNA viral para o DNA da célula, (v) Replicação - uma vez integrado com o DNA da célula, o HIV inicia a construção de cadeia de proteínas, a fim de formar mais HIV. (vi) Montagem - novas proteínas do HIV movem-se para a superfície da célula e montam HIV imaturos, (vii) Crescimento - com a formação de células imaturas, o HIV empurra para fora da célula hospedeira e ocorre a liberação de uma outra enzima, a protease. Essa enzima quebra proteínas de cadeia longas que formam o HIV imaturo. As proteínas menores combinam-se para formar o vírus maduro. Figura adaptada [13]. 5

Figura 1.4 Natural histórico do surgimento do vírus HIV. Três fases do vírus: (i) Infecção primária, decaimento exorbitante de linfócitos CD4. (ii) Infecção crônica, o decaimento de linfócitos CD4 diminui lentamente. (iii) Infecções oportunistas. Nesta fase surgem as doenças devido ao sistema imunológico debilitado, e quando o portador não recebe o tratamento adequado pode ocasionar na sua morte. Figura adaptada [33]..... 10

Figura 1.5 Esquema ilustrativo do ensaio-sanduíche. (i) Anticorpo imobilizado no suporte sólido (poços) (ii) Interação do anticorpo com o antígeno. (iii) Bloqueio da superfície para reduzir ligação não especifica. (iv) Imobilização do anticorpo conjugado. Figura adaptada [44]. 12

Figura 1.6Típica configuração do teste fluxo lateral. (i) Quando um teste é executado, a amostra é adicionada à extremidade próxima da fita. (ii) A amostra tratada migra através desta região para a região de conjugado, em que um conjugado de partículas foi imobilizado. Esta partícula é conjugada a um dos componentes biológicos específicos do ensaio (antigeno ou anticorpo. A amostra é remobilizada com conjugado seco e o analito na amostra interage com o conjugado ambos migram para a próxima tira, que é a matriz reacional. (iii) A matriz reacional é uma membrana porosa, em que o outro componente biológico específico do ensaio é imobilizado (proteinas, anticorpos ou antígenos), Componentes biológicos foram imobilizadas em áreas específicas da membrana onde servem para capturar o analito e fazendo migrar por linhas de captura. (iv)Os reagentes em excesso movem – se ao passar as linhas de captura e são aprisionados. Os resultados são interpretados na matriz de reação como a presença ou ausência de do conjugado capturado, sendo lido a ollho nu. Figura adaptada [49]..... 14

Figura 2.1(a) Luz solar espalhada por moléculas na atmosfera gerando a coloração azul do céu (b) Quando estamos no pôr-do-sol a luz acaba tendo um caminho maior para percorrer. Assim, neste trajeto da luz, muitas das cores foram espalhadas restando apenas luz amarela-vermelha para enxergarmos. Fotos adquiridas pelo autor. 17

Figura 2.2(a) Molécula diatômica interagindo com uma radiação eletromagnética e sofrendo espalhamento (b) Diagrama de energia do espalhamento. (i) Espalhamento Rayleigh ($w_0 = w_v$), (ii).Espalhamento anti-Stokes $(w_0 + w_v)$, neste processo o fóton incidente provém de uma energia da vibração molecular inicialmente existente e é, portanto, espalhada com uma energia mais elevada. (iii) Espalhamento Stokes

$(w_o - w_v)$, neste processo o fóton incidente cria uma vibração molecular, assim dispersa com uma energia reduzida. Figura adaptada [43,54,57]. 18

Figura 2.3(i) Representação esquemática do conceito de seção de choque, como uma área cortada do feixe incidente (ii) Similar representação esquemática ilustrando um espalhamento diferencial. Figura adaptada da referência [57]. 21

Figura 2.4 Cálice de Licurgo fabricado em matriz vítrea e com a coloração dependente do ângulo de incidência da luz visível sobre a sua superfície [74]. (i) Quando a luz ao ser transmitida observa-se uma coloração vermelha. [74-75] (ii) A cor verde resulta da reflexão da luz pela superfície do cálice. Figura retirada da referência [74]. 24

Figura 2.5 Catedral Notre Dame em Paris. Figura retirada da referência [76] 25

Figura 2.6 Representação esquemática dos plasmons se propagando em nanopartículas metálicas. Figura adaptada [78]. 26

Figura 2.7 Espectros de absorção de suspensões aquosas de nanopartículas de ouro com diferentes tamanhos (9, 22, 48 e 99 nm). Os espectros foram normalizados no máximo de absorção (517, 521, 533 e 575 nm). Figura adaptada [87]. 30

Figura 2.8 Esquema representativo para o entendimento do conceito de intensificação do SERS eletromagnético. Figura adaptada de [97]. 31

Figura 2.9 Fator de intensificação em um hot-spot com nanopartículas separadas até 2 nm. Figura adaptada [102] 33

Figura 2.10. Representação esquemática para o processo de transferência de cargas para uma molécula adsorvida em uma superfície. Figura adaptada [100] 35

Figura 3.1 Elementos básicos de um biossensor. Adaptado [106,116]. 37

Figura 3.2 Esquema ilustrativo da forma Y da estrutura do anticorpo. Na região entre a cadeia leve e a cadeia pesada ocorre a ligação antigênica. O braço aberto da forma Y é geralmente denotado como Fab enquanto a porção não antigênica é referida como Fc. Figura adaptada [123]. 39

Figura 3.3 Esquema de formação do organotiol imobilizado em uma superficie de ouro Figura adaptada [137]. 43

Figura 4.1 Ilustração da suspensão de AuNPs. 48

Figura 4.2 Representação esquemática da formação da plataforma de captura MUA (i) e PEG (ii). (A) Superfície de ouro, (B)Mobilização de MUA e PEG na superfície, (C) Ativação da superfície com EDC/sulfo-NHS, (D)Funcionalização com anti-p17. Figuras elaboradas pelo autor. 50

Figura 4.3 Construção de um eletrodo a partir da superficie de ouro, com área delimitada para calcular o grau de recobrimento da superfície. Foto adquirida pelo autor. 51

Figura 4.4 Representação esquemática para a formação da sonda SERS. Figura elaborada pelo autor. 53

Figura 4.5. Representação esquemática de preparação do ensaio imunológico, ensaio sanduiche. (A). Ensaio sanduíche completo, experimental (B) plataforma de captura MUA sem o anti-p17, controle (i) (C) SERS probes sem o anti-p17, controle (ii) e, (D) Ensaio sanduiche utilizando o analito (BSA), controle (iii). Todas as etapas (A, B, C e D) no processo (i), descrevem a plataforma de captura MUA. As setas indicam as diferenças entre os controles. Figuras elaboradas pelo autor. 56

Figura 5.1 Representação esquemática para a formação da SAM com MUA. (i) substrato de vidro recoberto com ouro (100 nm), (ii) Mobilização com solução de MUA, (iii) Representação de uma SAM. Figura adaptada [137,156] 59

Figura 5.2 Voltamogramas ciclícos obtidos do substrato de ouro (-) e do substrato de ouro modificado com MUA formando a SAM (-) em uma solução 1,2 mM de [Fe(CN)6]3/4- em tampão fosfato 0,1M pH 6,5 at 100 mV.s-1 60

Figura 5.3 Imagens topográfica de AFM para o substrato de ouro e substrato de ouro modificado com MUA (a) e (b), respectivamente. (c) Perfil da rugosidade obtida em ((a) e (b)), onde observou-se a rugosidade média ((-) 2,81 ± 0.16) e (-)13,28 ± 1.90) nm, respectivamente. 62

Figura 5.4 PM-IRRAS. (A) Modulador fotoelástico (PEM) em 3000 cm-1(B) PEM em 1700 cm^{-1}. 63

Figura 5.5. Espectro de absorção da suspensão aquosa de AuNPs 64

Figura 5.6. (a) Imagem de HR-TEM das AuNPs; (b) Distribuição do tamanho das AuNPs com diâmetro médio de 16 nm. 65

Figura 5.7 Espectro de absorção da solução aquosa do NBA. 66

Figura 5.8 Representação esquemática da área mapeada. Trajetória percorrida pelo estágio do espectrômetro MicroRaman Renishaw In Via nos mapeamentos obtidos. Foram obtidos espectros SERS ao passo de 1 µm x 1 µm, cobrindo uma área de aproximadamente 100 x 100 µm2. Obtendo aproximadamente treze mil espectros. A Figura também mostra o espectro SERS característico do NBA. Figura elaborada pelo autor. 67

Figura 5.9. (a)Mapeamento SERS do teste sanduíche completo. Cada região em azul claro corresponde o máximo de intensidade SERS. (b) Espectro SERS característico do NBA correspondente a área mapeada com máxima intensidade do sinal em 595 cm-1 Observou-se uma alta intensidade exibida também pela grande quantidade de região em azul claro (mapeamento SERS). 69

Figura 5.10 (i) Mapeamento SERS do controle, a área que representa a região em azul escuro apresenta ausência de sinal. Regiões em azul claro correspondem a uma ligação não especifica. (ii)Representação esquemática do controle mostrando a ausência de um anticorpo na plataforma de ensaio. (iii)Espectro SERS característico do NBA correspondente a área mapeada com máxima intensidade do sinal em 595 cm-1. O espectro exibe uma menor intensidade SERS mostrada também pela quantidade menor de região em azul claro (mapeamento). Observou-se também uma menor intensidade SERS quando comparado com o experimental. 70

Figura 5.11 (i) Mapeamento SERS do controle, a área em azul escuro representa ausência de sinal e a presença de regiões em azul claro, corresponde a uma ligação não especifica. (ii)Representação esquemática do controle mostrando a ausência de um anticorpo na sonda SERS (iii)Espectro SERS característico do

NBA correspondente a área mapeada com máxima intensidade do sinal em 595 cm-1. O espectro SERS exibiu uma menor intensidade, também mostrado pela maior área azul escuro no mapeamento. 71

Figura 5.12 (i) Mapeamento SERS do controle, a área em azul escuro representa ausência de sinal e a presença de regiões em azul claro, corresponde a uma ligação não especifica. (ii)Representação esquemática do controle mostrando a presença de um diferente analito (Albumina de soro bovino, BSA), (iii)Espectro SERS característico do NBA correspondente a área mapeada com máxima intensidade do sinal em 595 cm-1. O espectro SERS mostrou a um pequeno aumento de intensidade que compreende a região em azul claro. 72

Figura 5.13 Imagem MEV correspondente ao ensaio sanduiche completo, experimental. Os pontos claros significam a presença de AuNPs (sonda SERS) nesta superfície. Observou-se uma grande quantidade de nanopartículas adsorvidas nesta superfície e separadas por poucos nanômetros (hot-spot), o que pressupõe-se que há uma alta intensidade SERS quando o laser incidente interage com essas nanopartículas. 74

Figura 5.14 Imagens MEV das NPs adsorvidas nos controles (a), (b) e (c), correspondentes aos controles (i), (ii) e (iii), respectivamente. Observou-se, uma diminuição das nanopartículas adsorvidas que consequentemente provoca uma diminuição do sinal SERS. 75

Figura 5.15. Número de nanopartículas adsorvidas por unidade de área das quinze imagens obtidas do MEV (média e desvio padrão) para cada ensaio..... 76

Figura 5.16 (a) Distribuição da máxima intensidade SERS para ensaio sanduiche, experimental. (b) Inset da distribuição da máxima intensidade entre o experimental e o controle (i). O valor de Cohen´s d mostra o deslocamente entre eles. O tamanho do Bin corresponde à 3,49 σ x3N..... 79

Figura 5.17 (a) Distribuição da máxima intensidade SERS para o controle (ii) (b) Inset da distribuição da máxima intensidade entre o experimental e o controle (ii) O valor de Cohen´s d mostra o deslocamente entre eles. O tamanho do Bin corresponde à 3,49 σ x3N. 80

Figura 5.18 (a) Distribuição da máxima intensidade SERS para o controle (iii) (b) Inset da distribuição da máxima intensidade entre o experimental e o controle (iii.) O valor de Cohen´d mostra o deslocamente entre eles. O tamanho do Bin corresponde à 3,49 σ x3N. 81

Figura 5.19 (a) Esquema representativo do ensaio Sanduíche completo usando a plataforma de captura-PEG (b) Espectro da intensidade SERS em relação ao número de eventos. (ii) Imagem de MEV correspondente a superfície do gráfico b. 84

Figura 5.20 (a) Esquema representativo do Sanduiche da plataforma de captura usando PEG para os controles. As setas indicativas mostram as diferenças entre cada ensaio. (b) Espectro da intensidade SERS pelo o número de eventos relativo a banda com máximo intensidade do NBA em 595 cm^{-1}. (ii) Cada imagem MEV corresponde ao espectro de intensidade SERS ao lado. 86

Figura 5.21 (a e b) Média e desvio padrão correspondentes as imagens de MEV (quinze imagens para cada ensaio). (a) Ensaio sanduíche-PEG. (b)Ensaio sanduíche-MUA. 87

Figura 5.22 (a) Distribuição da máxima intensidade SERS para o ensaio sanduiche completo. (b) Distribuição da máxima intensidade entre o experimental e o controle (iii) mostrando o deslocamente entre eles, exibido pelo valor de Cohen´d. 89

Figura 5.23 Distribuição da máxima intensidade entre os controles do teste sanduiche correspondentes as plataformas de captura-MUA (-) e plataforma de captura-PEG (-). Os valores de Cohen´d > 0,5 significam que houve um grande deslocamento (a) e (c). Em, (b) observa-se um médio deslocamento, apesar que ambas as curvas de distribuição estão deslocadas para regiões próxima de zero. 90

Lista de siglas

Linfócito CD4 (linfócito ligada a proteína CD4. Juntos comandam o sistema imunológico)

WHO (Organização Mundial da Saúde)

UNAIDS (programa conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS)

MA (Matrix proteína p17)

CA (capsídeo)

Gp(Glicoproteínas)

CCR5/CXCR4(receptores alfa e beta quimiocina)

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent assAy)

IgG e IgM (imunoglobulina G e imunoglobulina M

TR (testes rápidos)

SERS (surface-enhanced Raman Scatering ou espalhamento Raman de superfície intensificada)

SERRS (surface-enhanced Raman Resonance Scattering ou espalhamento Raman ressontante de superfície intensificada)

NBA (Nile Blue A)

AuNPs (Nanopartículas de ouro)

Ag NPs (Nanopartículas de prata)

SPR (ressonância de plasmon de superfície)

LSPR (ressonância de plasmon de superfície localizada)

SAM (monocamada automontada)

MUA (ácido 11 mercaptoundecanóico)

PEG (polietileno Glicol)

SAM-MUA (monocamada modificada com MUA)

SAM-PEG (monocamada modificada com PEG)

BSA (albumina de soro bovino)

AFM (microscopia de força atômica)

MEV (microscopia eletrônica de varredura)

HR-TEM (microscopia de transmissão de alta resolução)

Sumário

1 HIV (*Human Immunodeficient Virus* ou vírus da imunodeficiência humana) 1
1.1 Aspectos gerais do HIV 2
1.2 Ciclo de replicação do retrovírus 5
1.3 Proteína matriz p17 7
1.4 Fases do vírus 8
1.5 Alternativas de testes para diagnóstico da infecção pelo HIV 10
1.5.1 ELISA (Enzime-linked Immunosorbent Assay) 10
1.5.2 Ensaio ELISA indireto 11
1.5.3 Ensaio ELISA-sanduíche 11
1.5.4 Testes Rápidos (TRs) 13
2 ESPALHAMENTO RAMAN 16
2.1 Seção de choque Raman 20
2.2 Espalhamento Raman Ressonante 22
2.3 SERS (SURFACE ENHANCED RAMAN SPECTROSCOPY) 23
2.3.1 Nanopartículas metálicas 23
2.3.2 Fator de intensificação SERS e Mecanismo Eletromagnético 30
2.3.3 Mecanismo Químico 34
3 Biossensores 36
3.1 Imunosensor e Imunoensaios 38
3.2 Princípios do Imunoensaio 38
3.3 Biossensores usando ensaios sanduíche SERS 41
3.3.1 Redução da ligação não especifica 45
4 Seção Experimental 48
4.1 Reagentes 48
4.2 Preparação das Nanopartículas de ouro (AuNPs) 48
4.3 Construção das plataformas de ensaio MUA e PEG. 49
4.4 Construção do eletrodo com a superficie de ouro e voltametria ciclíca 51
4.5 Preparação das sondas SERS 52
4.6 Protocolo de formação do Imunoensaio Sanduíche 53
4.7 Medidas SERS 56
4.8 Medidas de PM-IRRAS (do inglês Polarization modulation infrared reflection absorption spectroscopy) 57
4.9 Microscopia de força atômica (AFM) 57
4.10 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 57
5 Resultados e Discussão 58
5.1 Caracterização da plataforma SAM-MUA 58
5.2 Caracterização das Nanopartículas de ouro 64
5.3 Características do Azul do Nilo A (NBA) 66
5.4 Mapeamento SERS 66
5.5 Tratamento estatístico 77
5.6 Plataforma de ensaio usando PEG. 81
5.7 Comparação entre os ensaios 88
6 Conclusão 91

7 Perspectivas 92
Referências..... 93

Motivação

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um vírus que ataca severamente o sistema imunológico do invidívuo. Logo após os primeiros dias, o vírus se manifesta rapidamente devido ao sistema imunológico não estar apto para combater este vírus. Após alguns anos com o vírus circulando na corrente sanguínea, caso o indivíduo não buscar um tratamento adequado, este irá adquirir a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS).

Uma proteína extremamente importante é a proteína matriz p17, pois participa dos estágios iniciais da replicação do vírus funcionando também com um alvo no redirecionamento do RNA para a membrana plasmática e incorporação em vírions na montagem do vírus.

O teste conhecido como ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent assay*) é amplamente utilizado para diagnóstico de doenças, sendo uma excelente ferramenta para pesquisas biomédicas. Apesar de amplamente utilizado, requer dedicação do operador no preparo das amostras e é preciso um longo tempo para gerar os anticorpos para diagnóstico. A técnica SERS (*Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*), por outro lado, é uma excelente alternativa que nos últimos anos vem ganhando popularidade em ferramentas analíticas, devido a excelente informação dos grupos funcionais adsorvidos na nanoestrutra metálica. Além disso, é possível detetectar baixas concentrações de moléculas com alta especificidade e sensibilidade.

Neste trabalho de doutoramento é apresentada uma prova de conceito baseada em imunoensaios SERS para detecção do peptídeo p17-1.

No primeiro capítulo é apresentada uma breve revisão do vírus HIV, ciclo de replicação do vírus, bem com os ensaios de detecção disponíveis atualmente.

O segundo capítulo é apresentado apresenta uma breve revisão dos conceitos de espectroscopia Raman, dos componentes de uma plataforma SERS, ou seja, superfície (nanopartículas de ouro) e os mecanismos de intensificação.

No terceiro capítulo apresenta-se uma breve descrição de biossensores, bem como biossensores baseados em SERS.

No restante desta tese são descritos a parte experimental e resultados: superfícies de ouro foram modificadas com ácido mercaptoundenóico (MUA) ou polietilenoglicol (PEG), formando camadas auto-montadas (SAM, do inglês *self assembled monolayer*). Foram realizadas a caracterização do SAM-MUA usando voltametria ciclíca, PM-IRRAS (do inglês *Polarization modulation-infrared reflection-adsorption spectroscopy* e microscopia de força atômica (AFM).

Também foram realizados mapeamentos SERS em áreas de tamanho suficiente para haver confiabilidade estatística e reprodutibilidade na intensidade do sinal, respondendo por flutuações de intensidade *spot-to-spot* ocorrendo tanto em superfícies com alta distribuição de partículas ou com baixa abundância de partículas (controles).

Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) confirmaram os resultados do número de partículas distribuídas por unidade de área. Uma distribuição estatística através de histogramas mostra um deslocamento para maiores valores de intensidade para o ensaio experimental e um teste estatístico conhecido como *Cohen´s d*, permite com base na média e desvio padrão do controle e experimental verificar o quanto os controles estão contribuindo para o experimental. Este teste estatístico também foi realizado a fim de mostrar a diferença entre os dois imunoensaios utilizados.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1 HIV (*Human Immunodeficient Virus* ou vírus da imunodeficiência humana)

O vírus HIV é um *Lentivirus* membro da família *Retroviridae* [1-7]. Como o nome sugere as infecções com *Lentivirus*, são caracterizadas pelo longo período de latência clínica e persistência viral de replicação. Os vírus *Retroviridae* são caracterizados por apresentarem em seu núcleo RNA, sendo assim usa-se a enzima reverse transcriptase para conversão de RNA em DNA [1, 3].

O vírus HIV ataca os linfócitos CD4 comprometendo severamente o sistema imunológico. Nas primeiras semanas após a infecção o vírus manifesta-se rapidamente, pois o sistema imunológico não está pronto para combater esse novo vírus. Isso significa que a maioria das pessoas infectadas com HIV tornam-se menos capazes de combater as infecções oportunistas do sistema imunológico [1,5-8]. Geralmente, estas infecções são pouco desenvolvidas em pessoas saudáveis, mas podem ser fatais para uma portadora do vírus. A infecção do vírus HIV pode causar a AIDS quando os vírus destroem uma grande quantidade de linfócitos CD4, deixando o portador do vírus suscetível a novas doenças [1,2-5].

Segundo dados da organização mundial da saúde [9] (WHO, termo em inglês *World Health Organization)*, (Figura 1.1). Desde o início da epidemia quase 70 milhões de pessoas foram infectadas com o vírus e cerca de 39 milhões de pessoas já morreram. Mundialmente, 35 milhões de pessoas estão com o vírus, dentre as quais 19 milhões não sabem. A África Subsaariana continua sendo a região mais afetada. Estima-se que 1 a cada 20 adultos entre 15-49 estão vivendo com HIV, isso corresponde a quase 70% das pessoas que vivem com HIV em todo mundo.

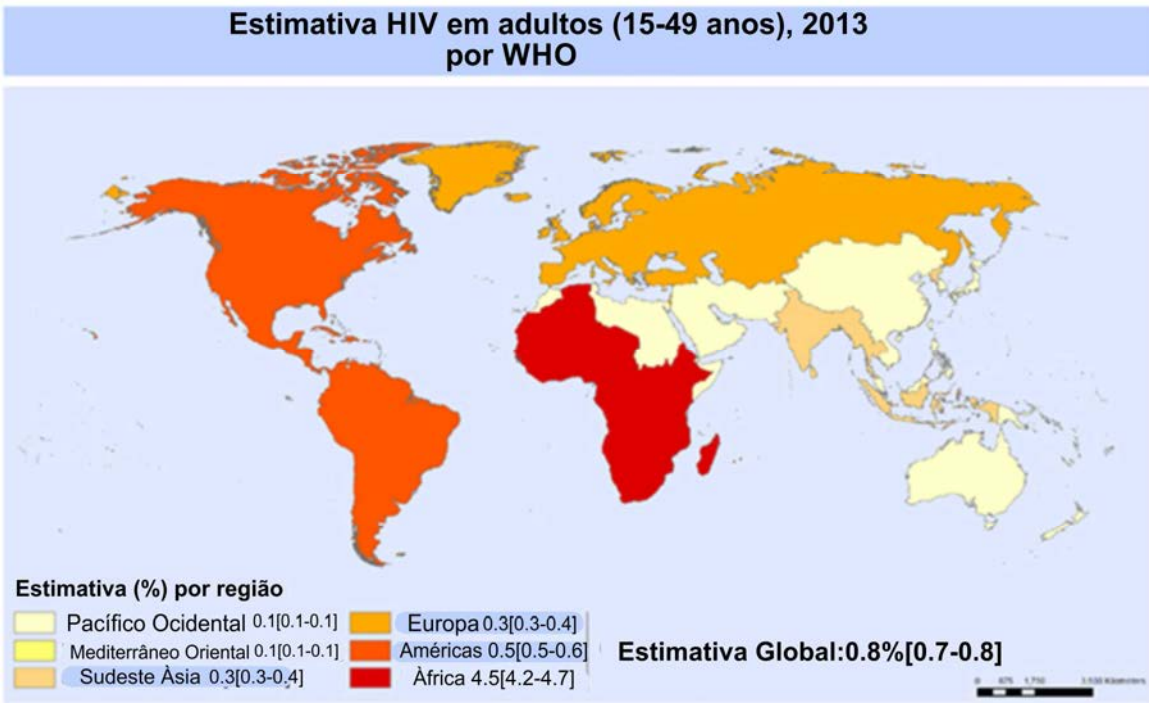


Figura 1.1 Pessoas vivendo com HIV entre 15-49 anos. Fonte adquirida WHO [9].

No Brasil houve um aumento dos casos de HIV em comparação com outros países. Segundo dados do programa conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (Unaids) [10] estima-se um crescimento de 11% entre 2005 e 2013, tendência contrária aos números globais. No mesmo período a quantidade de casos mundialmente caiu 38% [8-10].

1.1 Aspectos gerais do HIV

Partículas virais do HIV medem aproximadamente 80-100 nm de diâmetro, possuem envelope esférico, capsídeo e genoma formado por duas fitas de RNA. São caracterizados pela presença dos genes *gag, pol e env* (específico grupo antígeno, polimerase e envelope glicoproteína) comuns em todos os retrovírus [1,4,8, 11-12]. A Figura 1.2 mostra um esquema exibindo as principais partes do virus HIV [13].

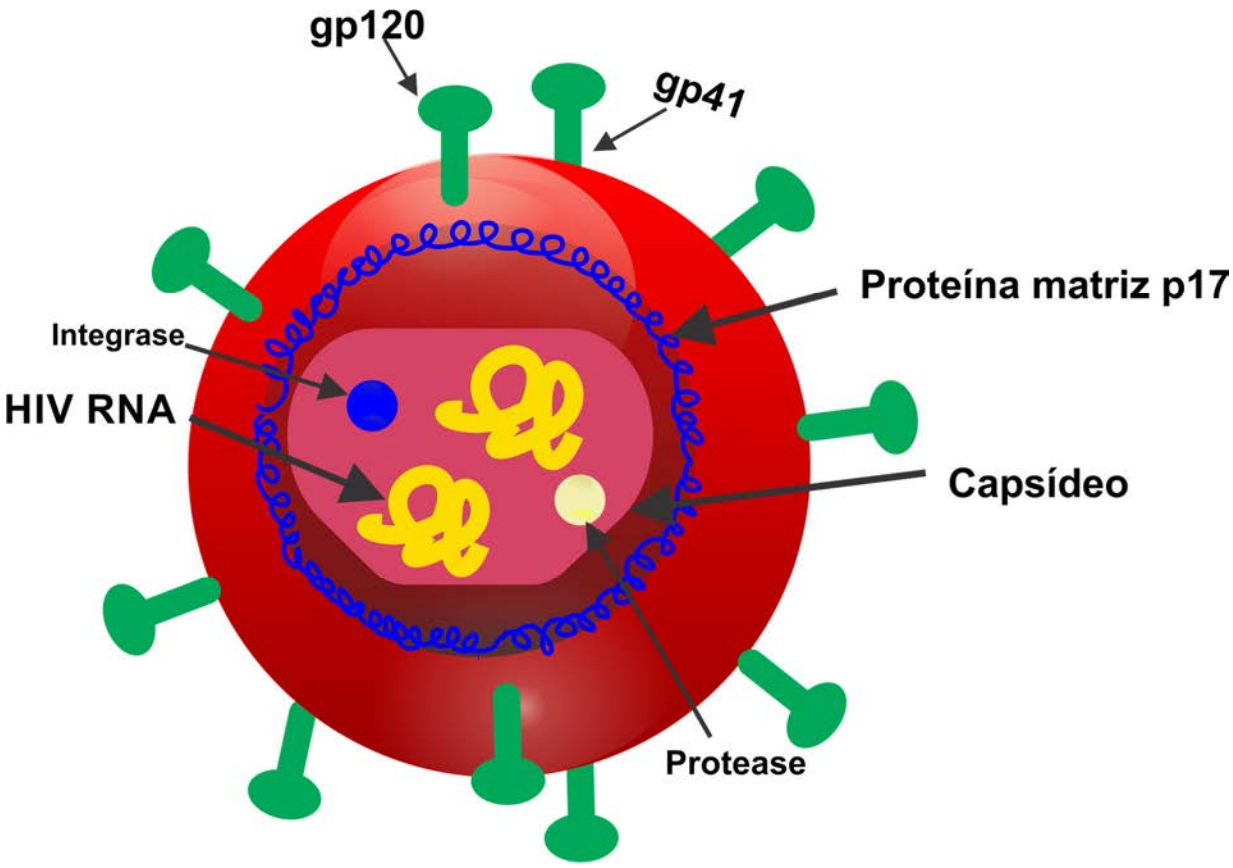


Figura 1.2 Vírus HIV adaptado [13].

Os genes *gag* codificam as proteínas do capsídeo viral. A proteína MA (matriz p17), que permanece ligada à face interna do envelope, CA (capsídeo, p24) e NC (nucleocapsídeo) associado ao RNA viral.

O gene *env* codifica o envelope viral, a glicoproteína gp160. A clivagem intracelular da gp160 produz subunidades, gp120 (120 KDa) e gp41 (41 KDa) [14]. A gp120 é uma proteína hidrofílica que se localiza na superfície externa do envelope viral, bem como na membrana plasmática das células infectadas. A glicoproteína gp41 é uma proteína que atravessa a membrana lipídica dos vírions (fora da célula o HIV é conhecido com vírion). Estas glicoproteínas (gp120 e gp41) estão ligadas por interações não covalentes [13-15].

O gene pol codifica as enzimas transcriptase reversa (converte o RNA viral em DNA), integrase (incorpora o DNA viral no cromossoma hospedeiro) e a protease (tem a função de clivar grandes proteínas Gag em precursores menores). Essas enzimas são cruciais para a replicação do vírus.

Além disso, as proteínas Tat e Rev modulam a expressão genética do vírus e são essenciais para a propagação viral. As proteínas Net, Vif, Vpr e Vpu são proteínas acessórias que apenas atuam nas células hospedeiras [11,15-18]. A Tabela 1 mostra as propriedades e suas principais funções durante a fase de replicação do vírus HIV.

Tabela 1-1 Proteínas regulatórias e suas funções [15]

Proteínas	**Função**
Tat	Amplifica a transcrição do RNA viral
Ver	Regula a expressão das proteínas virais transportando o RNA mensageiro viral para o citoplasma.
Nef	Reduz a expressão do CD4 nas células infectadas e aumenta a saída dos vírus nas células
Vif	Regula infectividade viral
Vpu	Promove a liberação das partículas virais no meio extracelular e reduz a expressão de CD4
Vpr	Promove o transporte do DNA viral para o núcleo

1.2 Ciclo de replicação do retrovírus

A replicação da infecção causada pelo vírus HIV é um processo de várias etapas. A Figura 1.3 representa este processo.

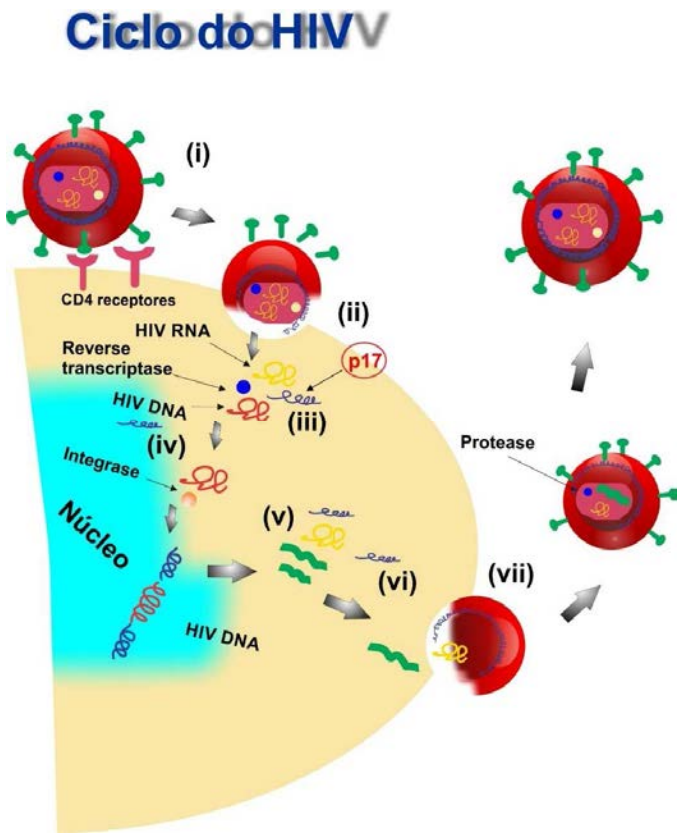


Figura 1.3 Ciclo de replicação do vírus HIV.(i) Ligação - nesta etapa o vírus se liga aos receptores CD4 na superfície da célula.(ii) Fusão - o envelope HIV e os linfócitos se fundem, o que permite a entrada do HIV na célula. (iii) Transcrição reversa - dentro da célula ocorre a conversão do material genético HIV-RNA para HIV-DNA, usando a enzima transcriptase reversa. A conversão permite a entrada do HIV-DNA no núcleo da célula e combina com o material genético. (iv) Integração - no núcleo da célula, a enzima integrase utiliza o seu DNA viral para o DNA da célula, (v) Replicação - uma vez integrado com o DNA da célula, o HIV inicia a construção de cadeia de proteínas, a fim de formar mais HIV. (vi) Montagem - novas proteínas do HIV movem-se para a superfície da célula e montam HIV imaturos, (vii) Crescimento - com a formação de células imaturas, o HIV empurra para fora da célula hospedeira e ocorre a liberação de uma outra enzima, a protease. Essa enzima quebra proteínas de cadeia longas que formam o HIV imaturo. As proteínas menores combinam-se para formar o vírus maduro. Figura adaptada [13].

Inicialmente, o envelope glicoproteíco gp120 presente na superfície viral reconhece a superfície receptora CD4 induzindo a mudança conformacional da glicoproteína gp120. Esta interação não é suficiente, mas expõe o local de ligação para uma segunda molécula da superfície

celular, tipicamente por receptores quimicionas CCR5 e/ou CXCR4 (beta e alfa quimiocina, respectivamente). Assim, uma segunda interação ocorre entre a gp120 e os receptores (CCR5 e CXCR4), o que desencadeia novos deslocamentos conformacionais das glicoproteínas no envelope. Estas alterações conformacionais sequenciais levam à dissociação da gp120 do gp41, e permitem que o grupo N-terminal do gp41 se funda para penetrar a membrana celular. A entrada do vírion na célula é alcançada pela inserção do peptídeo da fusão gp41 na membrana, expondo uma região hidrofóbica que resulta na fusão das membranas virais e celulares e permite a libertação do núcleo viral no citoplasma [2,8, 17-24].

Depois que o capsídeo viral nuclear entra na célula, inicia-se. a etapa de desencapsulamento (termo em inglês, *uncoating*), que consiste na liberação do conteúdo do capsídeo, MA (proteína matriz p17), Nef, Vpr, dois filamentos de RNA viral e três enzimas essenciais na replicação, (integrase, protease e a transcriptase reversa). A transcriptase reversa inicia a transcrição do RNA viral, consistindo em um heterodímero de subunidades assímetricas. A subunidade p66 possui dois domínios catalíticos, i) ribonuclease-H e ii) polimerase [18-24].

O RNA viral é transcrito em uma fita híbrida dupla hélice de RNA-DNA. A ribonuclease-H quebra a fita híbrida de RNA-DNA e permite assim o sítio polimerase, completando a fita de DNA, formando uma dupla hélice de DNA. Após a transcrição, o DNA viral serve como molde para a síntese de novas fitas de RNA viral, o qual, é associado com proteínas virais em um grande complexo nucleoproteíco pré-integrado (PIC). Então, a enzima integrase corta cada extremidade 3’ do DNA criando duas extremidade ligantes e associadas com proteínas virais (MA p17, Vpr) do PIC, transportando o DNA até o citoplasma [2,18-24].

Depois da integração, ocorrem as primeiras transcrições produzindo RNA virais que são transportados até o núcleo da célula. Uma vez dentro do núcleo, o complexo de integração se liga ao DNA celular, permitindo que a integrase transfira o DNA viral para o genoma celular.

A ativação da célula induz a transcrição do DNA viral em RNA mensageiro (mRNA), migrando para o citoplasma onde proteínas precursoras do vírus são sintetizadas. Algumas são processadas pela protease, que tem a função de quebrar proteínas longas (Gag) em menores (MA, CA, NC). Esta etapa é crucial para a replicação do vírus. Dois filamentos de RNA viral e as enzimas se replicam e se juntam com as proteínas cortadas se organizando ao seu redor formando uma nova

cápsula. Estas proteínas virais imaturas proveniente das células adquire um novo envelope com proteínas virais do hospedeiro. O vírus maduro já esta pronto para infectar novas células. O vírus HIV se replica bilhões de vezes por dia destruindo células imunes do hospedeiro e eventualmente favorecendo novas doenças [2,18-25].

1.3 Proteína matriz p17

A proteína matriz p17 é uma proteína estrutural importante no ciclo de vida do retrovírus. Foi uma das primeiras proteínas virais do HIV-1 descrita como envolvida na importação.[25-29]. Aliás, esta proteína participa na montagem da membrana plásmatica de células infectadas.

Em vírions maduros, a proteína matriz p17 é composta por um ácido polipeptídeo de 132 aminoácidos que forma uma capa de proteção ligada à superfície interna da membrana plasmática do vírus. Moléculas individuais de p17 são compostas de cinco α hélices e uma plataforma básica consistindo de três cadeias β. Estudos revelaram que a p17 forma trímeros e em três cristais tridimensionais e recentemente sugere-se que a p17 se organiza como hexâmeros de trímeros nas membranas [26-28].

A proteína p17 é importante nas fases iniciais de replicação do vírus e participa na pré-integração do complexo do DNA no núcleo de células hospedeiras. Além disso, a proteína p17 está envolvida na ligação do RNA viral e transporte para a membrana plasmática, e na incorporação do envelope do HIV-1 em vírion. Isto é, ela desempenha papel importante em vários estágios durante a replicação, assim como na fase precoce e tardia do ciclo de vida do vírus [26-29].

Além do seu papel bem estabelecido no ciclo de vida do vírus, há evidências que as células infectadas do HIV-1 libertam quantidades significativas de p17 livre. P17 exógena é detectada no plasma de indivíduos infectados pelo HIV-1 soropositivo em concentrações nanomolares, mesmo na presença de p17 Abs (anticorpos), tornando-se possível que a quantidade de p17 detectado passa a ser reduzida pela presença de complexos imunes com anti-p17 [26,28]. A proteína p17 pode acessar o espaço extracelular através de vias alternativas de secreção. Aliás, a p17 pode atingir concentrações consistentes em hospedeiros de HIV-1-infectados através de mecanismos de desintegração do vírus ou a lise das células. Ao mesmo tempo, devido à existência de dois subconjuntos de proteínas da matriz, um clivado nos vírions e outro clivado na célula hospedeira é

concebível que a p17 passa a ser gerada e liberada ao longo de todo o ciclo de vida do vírus pelas células infectadas [28].

Extracelularmente a p17 foi encontrada para regular as atividades biológicas de muitas células imunes diferentes que estão direta ou indiretamente envolvidos na patogênese da AIDS. Todas as atividades p17 ocorrem após a sua interação com um receptor celular ainda não identificado (p17R) expressa por um subgrupo definido de células imunes [26-29].

Tem sido relatado que a p17 pode ser o alvo de anticorpos neutralizantes contra o HIV-1 e que os níveis elevados de anticorpos p17 estão correlacionados com a progressão mais lenta para AIDS [28].

Neste trabalho de doutorado usamos um peptídeo situado na primeira sequência da matriz proteína p17, denominado peptídeo p17-1. Essa sequência (*LSGGEDRWEKIRLPGG*) foi usada, pois estudos demostram a alta imunoreatividade desta sequência [30-32].

O uso de sequências de peptídeos correspondentes à regiões bem definidas de uma proteína tem sido demonstrado que possuem funções específicas tais como promotor da fusão da membrana. A sequência e estrutura de aminoácidos num peptídeo são cruciais para identificar locais de reconhecimento específicos de proteínas antigênicas [30-32].

1.4 Fases do vírus

Após a infecção pelo HIV, a sequência de marcadores de sangue que podem ser usados para identificar a infecção surge: o RNA viral, os antígenos p17 e p24. Aproximadamente três a quatro semanas depois surgem os anticorpos associados a estes antígenos. Os níveis de RNA viral são uma indicação da replicação, geralmente chega a 1 milhão de cópias de RNA/mL dentro de alguns meses, antes de diminuir gradualmente para um nível constante de decaimento é conhecido como *set-point*. Este período de *set-point* é importante, pois indica a taxa de evolução do vírus. Um alto *set-point* é sinal de um rápido desenvolvimento do vírus levando à doenças e, posteriormente, a morte. Por outro lado, um baixo *set-point* é associado à longa prolongação da doença [33-35]. Consequentemente, ao longo do tempo o número de cópias de RNA/mL começa a decair novamente a uma taxa elevada, levando o paciente a adquirir a AIDS. Na maioria dos casos, uma

pessoa sem o tratamento adequado e dependendo das condições de saúde do indíviduo pode levar até aproximadamente 10 anos para adquirir a doença [33-35].

As proteínas virais, os antígenos p17 e p24 também podem ser medidos no sangue, mas a sua detecção ocorre mais tarde do que o RNA viral. Estudos indicam que os antígenos p17 e p24 aumentam em paralelo com a RNA viral quando o vírus se replica, mas são detectados mais tarde principalmente devido aos métodos utilizados para a sua detecção; isto é, os métodos de detecção são menos sensíveis que os métodos de amplificação utilizados para detectar RNA [33-35]. Devido a isso surge à necessidade de buscar uma nova alternativa para detecção, diferente aos métodos convencionais, que é descrito neste trabalho.

A Figura 1.4 mostra o natural histórico do surgimento do vírus HIV. O intervalo de tempo anterior ao aparecimento de anticorpos, conhecido como período de janela imunológica, caracteriza-se por apresentar soros negativos e nível de linfócitos CD4 variável, porém, viremia detectável (RNA viral). A detecção de anticorpos específicos para HIV indica o fim do período de janela e o surgimento de indivíduos com soros positivos. A detecção por anticorpos na maioria das pessoas ocorre num periodo de 1-2 meses, independentemente do método utilizado.

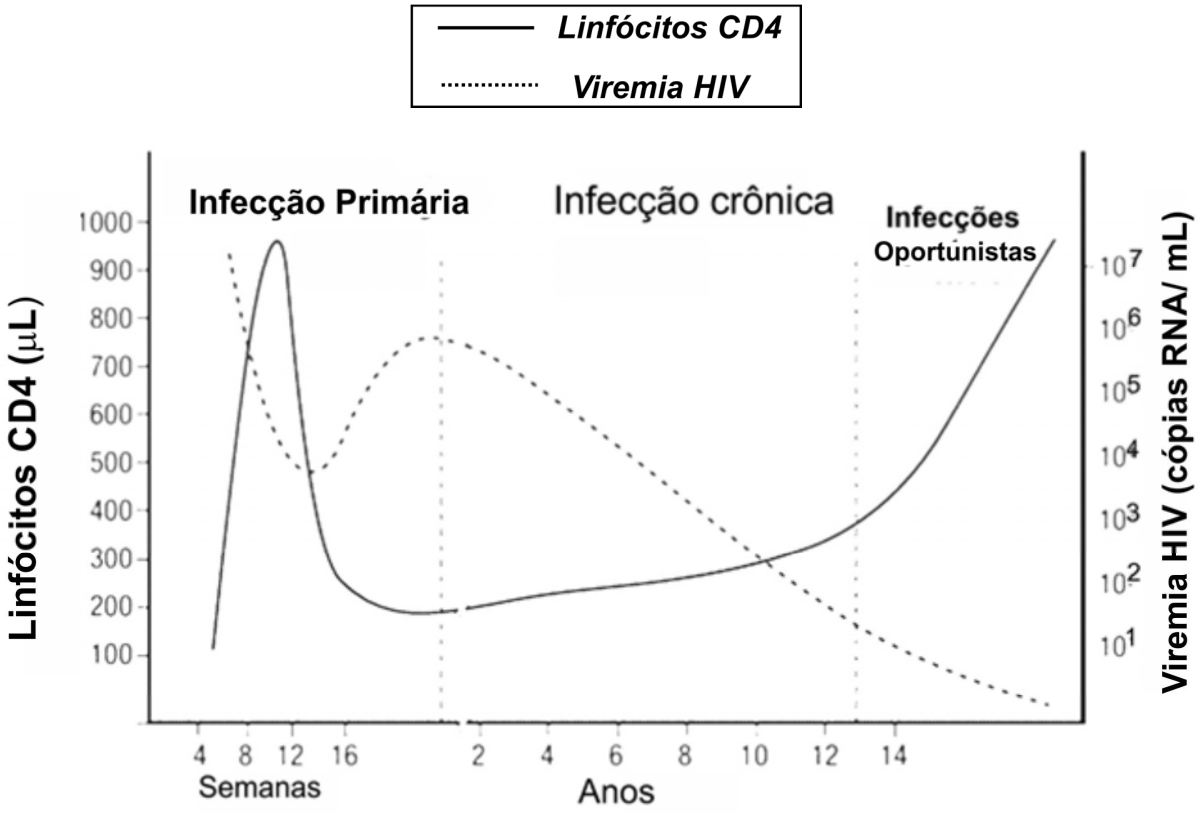


Figura 1.4 Natural histórico do surgimento do vírus HIV. Três fases do vírus: (i) Infecção primária, decaimento exorbitante de linfócitos CD4. (ii) Infecção crônica, o decaimento de linfócitos CD4 diminui lentamente. (iii) Infecções oportunistas. Nesta fase surgem as doenças devido ao sistema imunológico debilitado, e quando o portador não recebe o tratamento adequado pode ocasionar na sua morte. Figura adaptada [33]

1.5 Alternativas de testes para diagnóstico da infecção pelo HIV

1.5.1 ELISA (Enzime-linked Immunosorbent Assay)

ELISA é uma poderosa ferramenta para a detecção e quantificação de uma proteína específica em uma mistura complexa. Primeiramente descrita por Engavall e Perlmann em 1971, o método permite a análise de amostras de proteínas imobilizadas em poços de microplacas utilizando anticorpos específicos [36].

O método ELISA tem sido amplamente utilizado em diversas áreas, como diagnóstico de doenças, detecção de alergias provocadas por alimentação, entre outras, mas não é esperada uma aprovação significativa por laboratórios de descoberta de doenças precoces [37-38].

Experimentalmente o ELISA é um processo que inclui várias etapas: imobilização do analito em uma microplaca contendo 96 poços, ligação entre anticorpo e seu antígeno imobilizado, bloqueio de sítios de ligação e diversos processos de lavagem.

A superfície dos poços das microplacas usadas em um imunoensaio é fabricada de poliestireno ou derivado do poliestireno com a capacidade de ligar-se com uma variedade de moléculas incluindo proteínas, peptídeos, pequenas moléculas, carboidratos, lipídios e DNA. O poliestireno possui uma superfície altamente hidrofóbica capaz de interagir com a proteína [39 - 40].

1.5.2 Ensaio ELISA indireto

Neste tipo, baseiam-se os ensaios de primeira e segunda geração** para diagnósticos de HIV. As amostras contendo os anticorpos são adicionadas no suporte sólido (poços da microplaca), onde os antígenos específicos do HIV já se encontram adsorvidos. Caso a amostra contenha os anticorpos (anti-HIV) eles interagem com os antígenos adsorvidos no suporte. Um anticorpo conjugado a uma enzima específica é adicionado ao suporte, associando com o complexo antígeno-anticorpo. Em seguida, adiciona-se um substrato-enzima que interage com o complexo gerando um produto, uma substância que fornece uma coloração típica [40-44].

A diferença entre os ensaios de primeira e segunda geração é a utilização de antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos originados de regiões específicas de proteínas do vírus. A introdução de antígenos recombinantes fornece um aumento de sensibilidade e especificidade, aliás, promove uma diminuição do período da janela imunológica [40-44]

1.5.3 Ensaio ELISA-sanduíche

Os ensaios de terceira e quarta geração para diagnóstico da infecção pelo vírus HIV são baseados no ensaio ELISA-sanduíche, que fornece maior especificidade e sensibilidade [44]. É medida a quantidade do antígeno entre duas camadas. Assim, o antígeno deve conter múltiplos epítopos para reagir com dois anticorpos presentes. A Figura 1.5 esquematiza o ensaio. Inicialmente, a primeira camada do anticorpo, denominada anticorpo primário, é imobilizado na superfície dos poços da microplaca. Após o bloqueio dos sítios hidrofóbicos, a superfície da

---

***Significa os primeiros testes para a detecção, para cada geração um novo update é desenvolvido, o objetivo é o aumento de sensibilidade e reduzir a janela imunológica [44].*

microplaca com as amostras contendo concentração desconhecida de antígenos são incubadas para assegurar o máximo de anticorpos primários que se ligarão ao antígeno. Este complexo anticorpo-antígeno é depois reconhecido pela adição de um segundo anticorpo de detecção, no qual, irão ligar-se firmemente ao antígeno pelos seus epítopos livres. O sinal de ligação é então amplificado por um anticorpo secundário marcado com enzima e a reação entre esta enzima e o seu substrato colorimétrico irá produzir um sinal visível, posteriormente medido por espectrofotometria [40-44].

Nos ensaios de terceira geração, os antígenos são peptídeos sintéticos e detectam os anticorpos IgG, enquanto os ensaios de quarta geração detectam simultaneamente IgG e IgM e o antígeno viral p24. Utilizando o antígeno viral p24 há uma diminuição da janela imunológica [44].

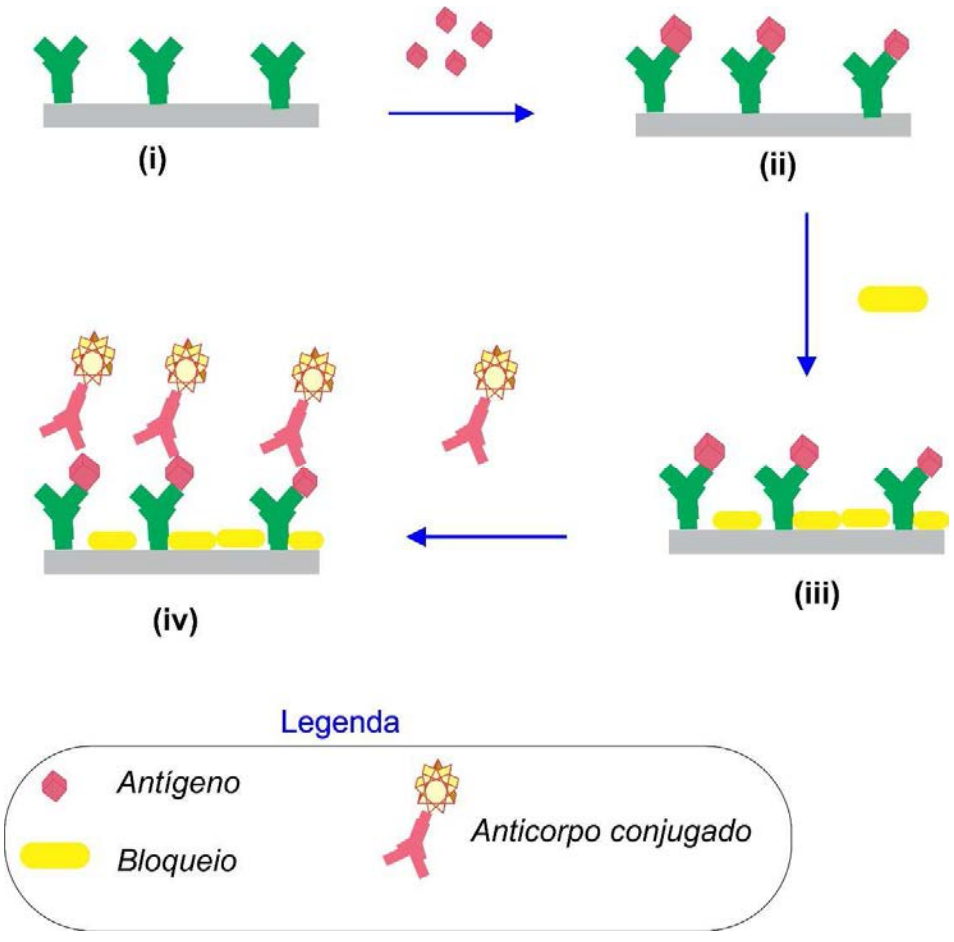


Figura 1.5 Esquema ilustrativo do ensaio-sanduíche. (i) Anticorpo imobilizado no suporte sólido (poços) (ii) Interação do anticorpo com o antígeno. (iii) Bloqueio da superfície para reduzir ligação não especifica. (iv) Imobilização do anticorpo conjugado. Figura adaptada [44].

1.5.4 Testes Rápidos (TRs)

Os testes rápidos (TRs) vêm sendo cada vez mais utilizados para o diagnóstico da infecção, pela alta especificidade e sensibilidade, associado as vantagens de apresentarem resultados em no máximo 40 minutos, podem ser lidos a olho nu e não necessitam de equipamentos especiais para sua execução. Isso permite que os testes TR possam ser usados em lugares de difícil acesso para a implantação de um laboratório, proporcionando o fácil acesso da população que possuem dificuldades ou mesmo impossibilidade de realizar o teste para diagnóstico da infecção pelo vírus HIV [44-46].

Os TRs são baseados no fluxo lateral (*lateral flow*) que utilizam interação antígeno-anticorpo para a detecção, são procedimentos simples para detectar a presença ou ausência de analitos alvo numa mistura de teste complexa. Atualmente, estes TRs são amplamente usados nos diagnósticos de doenças, como o caso da infecção causado pelo HIV e também disponível para o teste de gravidez [44-46].

O ensaio de fluxo lateral é um exemplo importante da forma de ensaio sanduíche. A Figura *1.6* exibe uma típica configuração do teste fluxo lateral Os principais componentes são: amostra pad, (i), pad conjugado, *(ii)*, membrana de nitrocelulose, *(iii)* contendo o anticorpo especifíco para analitos alvo e um pad absorção, (iv). O kit de teste de fluxo lateral, geralmente tem uma entrada para receber uma amostra biológica. [47].

A fase estacionária é constituída de um anticorpo ou antígeno que estão ligados quimicamente a um suporte . A passagem da amostra contendo o analito (antígenos/ anticorpos ou vice versa) da fase estacionária permite que haja uma interação, funcionando como uma extração por fase sólida [48].

Na fase móvel um ligante fixado na matriz sólida interage com um analito de natureza biológica (anticorpos ou enzimas). Essa interação pode ser por complexação, formação de ligações covalentes, associação enzima substrato ou pela formação de estruturas terciárias. Neste tipo de ensaio, a amostra biológica migra como um líquido através da superfície da membrana de nitrocelulose que é o substrato ou transportador do teste rápido por ação de capilaridade do meio [47-48].

A área do conjugado contém partículas de ouro coloidal, adsorvidas com antígeno ou um anticorpo especifico para o analito específico. Assim, o conjugado seco é preso na membrana de nitrocelulose e quando a amostra é aplicada ela passa pela área do conjugado, reidratando o ouro coloidal, formando um complexo que se move pela membrana em direção da partícula de captura onde ela foi imobilizada, produzindo um sinal de diferente coloração. Uma segunda linha de reação, denominada linha de controle, se forma pela capturado conjugado livre, que permite a confirmação da migração da fase móvel [48-49].

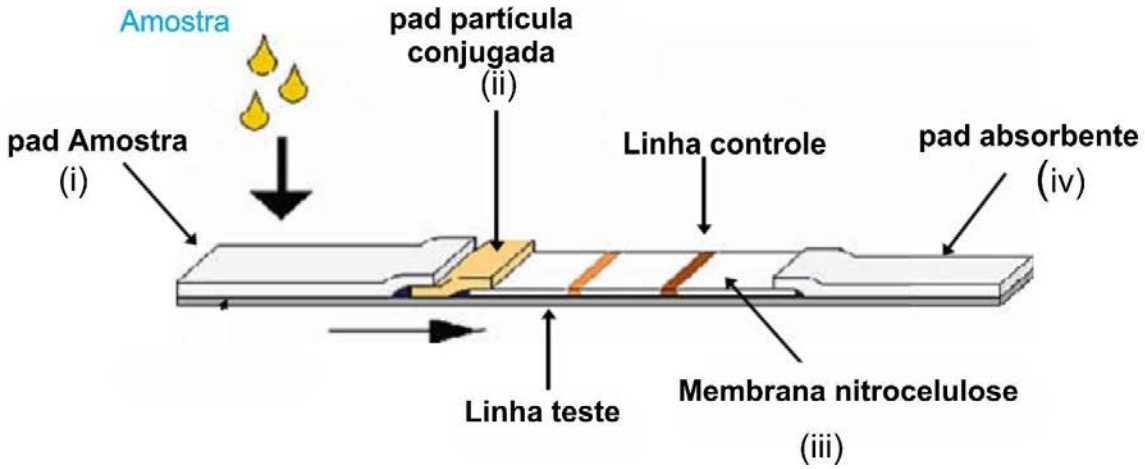


Figura 1.6 Típica configuração do teste fluxo lateral. (i) Quando um teste é executado, a amostra é adicionada à extremidade próxima da fita. (ii) A amostra tratada migra através desta região para a região de conjugado, em que um conjugado de partículas foi imobilizado. Esta partícula é conjugada a um dos componentes biológicos específicos do ensaio (antigeno ou anticorpo. A amostra é remobilizada com conjugado seco e o analito na amostra interage com o conjugado ambos migram para a próxima tira, que é a matriz reacional. (iii) A matriz reacional é uma membrana porosa, em que o outro componente biológico específico do ensaio é imobilizado (proteinas, anticorpos ou antígenos), Componentes biológicos foram imobilizadas em áreas específicas da membrana onde servem para capturar o analito e fazendo migrar por linhas de captura. (iv) Os reagentes em excesso movem – se ao passar as linhas de captura e são aprisionados. Os resultados são interpretados na matriz de reação como a presença ou ausência de do conjugado capturado, sendo lido a ollho nu. Figura adaptada [49]

Embora estes testes sejam sensíveis e rápidos existe uma janela imunológica em que o indivíduo pode estar infectado e carregando o vírus que não é detectado por testes convencionais. Portanto, a detecção precoce é essencial diminuindo as chances de transmissão e aumentam a expectativa de vida dos pacientes.

2 ESPALHAMENTO RAMAN

O espalhamento inelástico foi descrito teoricamente pelo físico australiano A. Smekal em 1923 e mais tarde observado (1928) pelo físico indiano C.V Raman que emprestou o nome ao fenômeno. É interessante observar que Raman verificou o efeito com ferramentas ópticas rudimentares (somente usando filtros), e usando o sol como fonte de luz e seus próprios olhos como detector [50]. O descobrimento deu a ele o prêmio Nobel em 1930 e uma enorme contribuição para a ciência até os dias atuais.

O espalhamento de luz em uma molécula ocorre quando um fóton incidente a perturba, excitando-a para um estado virtual (auto-estado da molécula + radiação) podendo ser elástico ou inelástico. O espalhamento elástico (espalhamento Rayleigh), o fóton incidente (hw_0) é o mesmo do emitido (hw_v) [51]. Neste caso temos uma situação interessante observado quando o céu está azul em um dia claro, como observado na Figura 2.1 (a). A cor do céu é resultado do espalhamento Rayleigh. O espalhamento Rayleigh é proporcional ao inverso da quarta potência do comprimento de onda e a luz violeta é portanto mais espalhada mais que a vermelha. Isto sugere que, quando olhamos para o céu em uma direção que não é para o sol, a cor deve ser azul. Isto se deve por duas razões: em primeiro lugar, a energia solar que chega aos nossos olhos principalmente com componentes de menores comprimentos de onda. Em segundo lugar, a sensibilidade maior dos nossos olhos para o espectro próximo a 550 nm. O resultado desses fatores demonstra que o céu é percebido como azul (Figura 2.1(a)). No pôr do sol, quando é possível olhar na direção do sol, a dispersão irá remover a luz azul, preferencialmente, o céu aparece vermelho. O efeito ocorre quando a luz é refletida em um ângulo raso a partir de nuvens de poeira fina na alta atmosfera e, é registrado um pôr do sol espetacular [52-53], como representado na Figura 2.1(b).

(a) **(b)**

Figura 2.1(a) Luz solar espalhada por moléculas na atmosfera gerando a coloração azul do céu (b) Quando estamos no pôr-do-sol a luz acaba tendo um caminho maior para percorrer. Assim, neste trajeto da luz, muitas das cores foram espalhadas restando apenas luz amarela-vermelha para enxergarmos. Fotos adquiridas pelo autor.

No efeito Raman ocorre o espalhamento inelástico da luz incidente. A Figura 2.2 (a) exibe uma representação de uma molécula diatômica interagindo com radiação eletromagnética sofrendo espalhamento e a Figura 2.2 (b) mostra o diagrama de energia relacionado com a interação.

No espalhamento Stokes a frequência do fotón (w_0) espalhado é menor do que a frequência do fóton incidente assim, a energia é E= $h(w_0 - w_v)$. No espalhamento Anti-Stokes o fotón espalhado é mais energético que o incidente, logo a energia é E=$h(w_0 + w_v)$ [54].

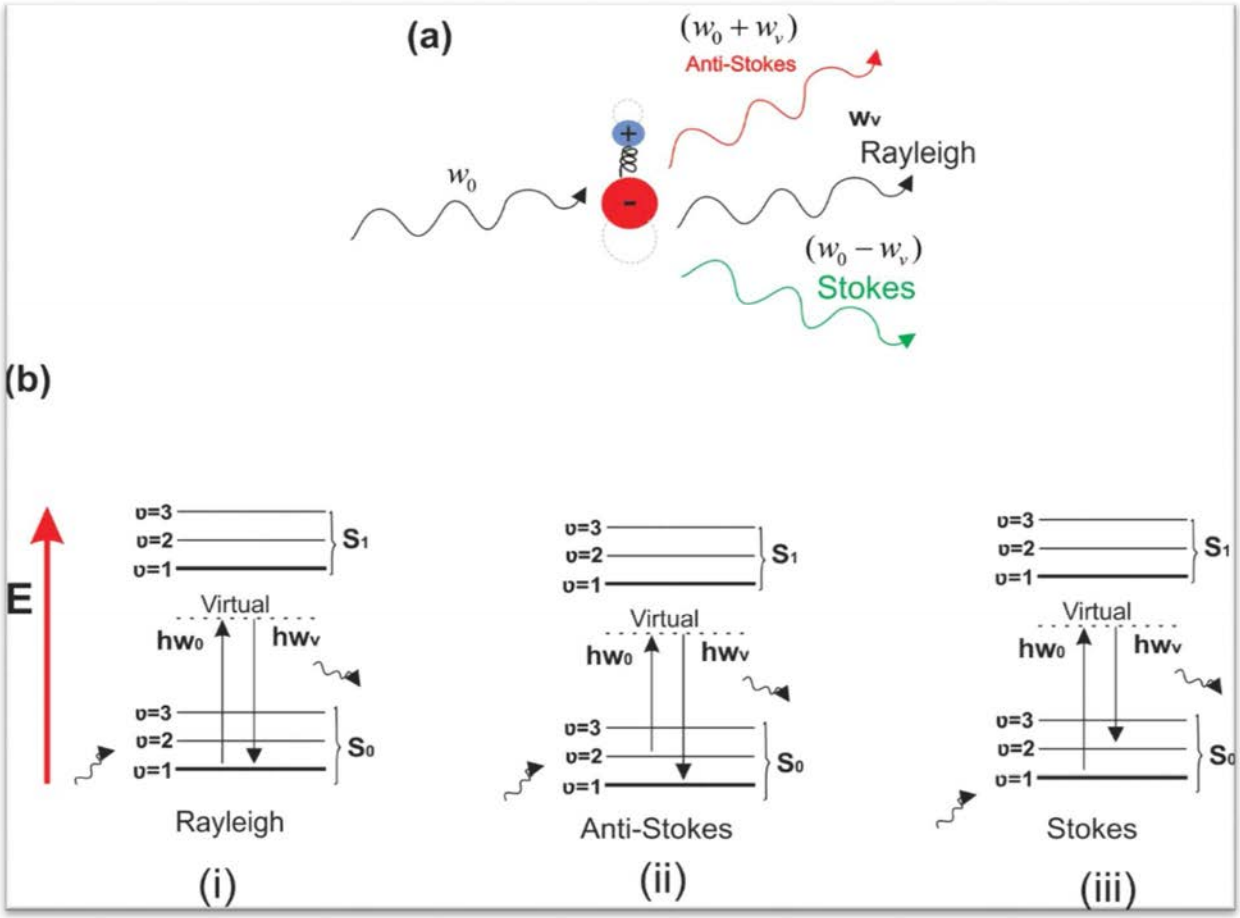


Figura 2.2(a) Molécula diatômica interagindo com uma radiação eletromagnética e sofrendo espalhamento (b) Diagrama de energia do espalhamento. (i) Espalhamento Rayleigh ($w_0 = w_v$), (ii).Espalhamento anti-Stokes $(w_0 + w_v)$, neste processo o fóton incidente provém de uma energia da vibração molecular inicialmente existente e é, portanto, espalhada com uma energia mais elevada. (iii) Espalhamento Stokes $(w_o - w_v)$, neste processo o fóton incidente cria uma vibração molecular, assim dispersa com uma energia reduzida. Figura adaptada [43,54,57].

O efeito Raman é devido ao espalhamento inelástico da radiação monocromática que incide em uma molécula [55]. Além disso, sua atividade está ligada a variação da polarizabilidade produzido pelo campo elétrico da radiação [55]

Classicamente, o vetor do momento dipolo induzido oscila com a sobreposição da frequência [55] e pode ser escrito;

$$P = \alpha E \tag{2.1}$$

Onde α é a polarizabilidade da molécula e *E* é o vetor do campo elétrico da radiação incidente. Assim o modo normal vibracional de uma molécula Qk muda a medida que a molécula vibra. Desde modo, a polarizabilidade (α) pode ser desenvolvida por uma série de Taylor em função da coordenada interna Q_K, única coordenada normal em estudo[55];

$$\alpha = \alpha_0 + (\frac{d\alpha}{dQ_k})_0 + Q_k + ... \tag{2.2}$$

Onde o subscrito zero indica a molécula na posição do equilíbrio. Os termos de ordem mais elevada foram desprezados devido à pequena variação da coordenada Qk. Considerando a coordenada Qk e o campo elétrico como;

$$Q_k = Q_{k_0} \cos(2\pi w_v t) \text{ e } E = E_0 \cos(2\pi w_0 t) \tag{2.3}$$

Sendo w_v e w_0, respectivamente, a frequência vibracional e da radiação incidente, o momento de dipolo induzido ficará [55];

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi w_0 t) + \frac{1}{2}\frac{d\alpha}{dQ_k} Q_{k_0} E_0 \{\cos[2\pi(w_0 + w_v)t] + \cos[2\pi(w_0 - w_v)t]\} \tag{2.4}$$

Através da esquação 2.4 verifica-se quando a molécula é perturbada por uma vibração, possui três componentes com frequências do momento de dipolo elétrico, o primeiro termo com frequência (w_0) correspondente ao espalhamento Rayleight, os componentes com frequência ($w_0 - w_v$) e ($w_0 + w_v$) correspondem ao espalhamento Raman Stokes e anti-Stokes[55], respectivamente. Para o espalhamento Raman requer que pelos menos um componente seja diferente de zero para este termo $(\frac{d\alpha}{dQ_k})_0 \neq 0$, ou seja, deve haver variação da polarizabilidade[54-56]. Este termo refere-se como Raman-ativo.

2.1 Seção de choque Raman

A eficiência do processo de espalhamento Raman é definida pela secção de choque, σ [m^2]. A Tabela 1 exibe as aproximações da seção de choque das espectroscopias. A Figura 2.3 mostra uma representação esquemática do conceito de seção de choque [57].

Por definição, para um determinado processo óptico o sinal produzido por este processo é caracterizado pela sua intensidade (proporcional ao número de fótons por unidade de tempo envolvido no processo), a eventos de espalhamento em relação à densidade de potência incidente S_{INC} [W/m^2], na posição da molécula;

$$P = \sigma S_{INC} \tag{2.5}$$

Por exemplo, numa absorção óptica, a seção de choque σ_{abs} [m^2] de uma molécula corresponde à área efetiva de um feixe incidente na molécula que irá absorver cada fóton [57-58,60-61]. Em uma situação experimental, é quase sempre o caso que detectamos a radiação espalhada em uma determinada região. A partir da definição de seção choque Raman, a diferencial absoluta [em m^2/sr] $\frac{d\sigma_{RS}}{d\Omega}$ é dada como;

$$\langle I_{RS}^{SM} \rangle = \frac{d\sigma_{RS}}{d\Omega} S_0 \delta\Omega \tag{2.6}$$

Onde S_0 é a intensidade do laser incidente [W/m^2] na posição da molécula e $\delta\Omega$ [sr] é um ângulo sólido pequeno para coleta de luz, o qual por sua vez se relaciona com a abertura óptica numérica da coleta. A intensidade do espalhamento Raman, $\langle I_{RS}^{SM} \rangle$, é o sinal obtido por um modo vibracional, em média de todas as orientações no espaço da molécula [57,60].

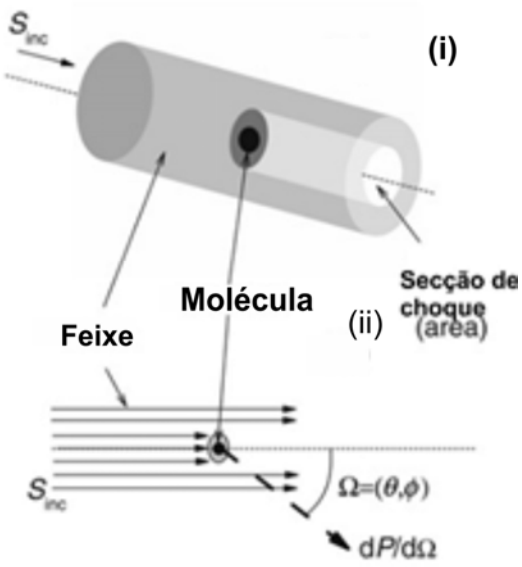


Figura 2.3(i) Representação esquemática do conceito de seção de choque, como uma área cortada do feixe incidente (ii) Similar representação esquemática ilustrando um espalhamento diferencial. Figura adaptada da referência [57].

A detecção em todas as direções é obtida a partir da seção de choque total Raman;

$$\sigma = \int \frac{d\sigma_{RS}}{d\Omega}(\Omega) d\Omega \tag{2.7}$$

Tabela 2-1 Aproximação da ordem de magnitude para seção de choque (por molécula) para vários processos de espectroscopia [58]

Processo	Seção choque de	σ/cm^2
Absorção	Ultravioleta	10^{-18}
Absorção	Infravermelho	10^{-21}
Emissão	Fluorescência	10^{-19}
Espalhamento	Espalhamento Raman	10^{-29}
Espalhamento	Raman Ressonante	10^{-24}
Espalhamento	SER(R)S	10^{-15}
Espalhamento	SERS	10^{-15}

2.2 Espalhamento Raman Ressonante

O espalhamento Raman apresenta baixa seção de choque, $\frac{d\sigma_{RS}}{d\Omega}$, como descrito anteriormente. Mas, pode sofrer um aumento de intensidade por várias ordens de magnitude quando a frequência de excitação da luz (laser), w_0, é próxima à frequência de transição eletrônica da molécula. Isto é conhecido como espalhamento Raman ressonante

No espalhamento Raman ressonante o estado virtual não existe e a luz incidente interage com um verdadeiro estado da molécula. Devido a este efeito, muito experimentos Raman são realizados com moléculas conhecidas como *corantes*, ou seja, moléculas que absorvem em comprimento de onda próximo ao visível.

Nesta tese, foi utilizado o corante Azul do Nilo A (NBA, do inglês *Nile Blue A*) que apresenta máximo de absorção próximo em 600 nm.

2.3 SERS (SURFACE ENHANCED RAMAN SPECTROSCOPY)

O efeito SERS foi descoberto em 1974 por Fleischaman que observou grande intensificação do sinal Raman da piridina, na presença de uma superfície rugosa de um eletrodo de prata (Ag). A intensificação inicialmente foi atribuída a área superficial elevada devido a sucessivos ciclos de oxi-redução realizados no eletrodo [66-68].

Jeanmaire e Van Duyne [69], e Albrecht e Creighton [70] evidenciaram a intensificação devido à ocorrência da piridina absorvida em eletrodo de prata. Os autores observaram o aumento de intensidade num valor de 10^6 ordens de magnitude de seção de choque Raman em comparação a molécula em ambiente aquoso. O efeito foi denominado SERS (*Surface-enhanced Raman spectroscopy*).

Em poucas palavras, o efeito SERS tem como caraterística a amplificação da intensidade Raman em várias ordens de magnitude. A amplificação do sinal em SERS vem, principalmente, através da interação da luz electromagnética com oscilações de carga na superfície de metais (Au, Ag ou Cu), conhecidos como ressonância de plasmons. Para se beneficiar deste efeito, as moléculas devem ser adsorvidas na superfície do metal, ou pelo menos estar muito próximas (~máximo de 10 nm) [57].

Assim a espectroscopia Raman intensificada por superfície (*Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*), pode ser resumida em:

-Substrato metálico, ou seja, nanoestrutura metálica (Ag, Au e Cu) à qual deve estar incorporada a molécula de análise. Neste trabalho utilizamos colóides metálicos de Au.

-Intensificação - Aumento da intensidade Raman de determinados modos vibracionais de moléculas nas proximidades da nanostrutura metálica, devido a ressonância de plasmons do substrato metálico (tópicos 2.31 e 2.34 descritos a seguir)

2.3.1 Nanopartículas metálicas

Quando suspensões de nanopartículas metálicas são iluminadas pela luz, notamos um comportamento diferente na coloração. Este efeito não é novo, tem sido verificado desde a antiguidade, como por exemplo, o cálice de Licurgo (século IV), Figura 2.5. Ou em igrejas antigas da Europa (século IV) quando eram incoporadas nanopartículas metálicas nos vidros das janelas,

como por exemplo, em Sainte Chapélle ou Catedral Notre Dame ambas em Paris, representada pela Figura 2.6. O interesse científico na cor de nanopartículas iniciou-se quando Faraday sintetizou o famoso Fluido ***Ruby*** fazendo reagir cloreto de ouro com fósforo na presença de disulfeto de carbono (CS_2). Faraday propôs que a coloração era devido à redução dos íons de ouro. Depois disso, Mie explicou as mudanças de coloração e sua dependência com composição do metal, bem como do ambiente circundante [71].

(i) **(ii)**

Figura 2.4 Cálice de Licurgo fabricado em matriz vítrea e com a coloração dependente do ângulo de incidência da luz visível sobre a sua superfície [74]. (i) Quando a luz ao ser transmitida observa-se uma coloração vermelha. [74-75] (ii) A cor verde resulta da reflexão da luz pela superfície do cálice. Figura retirada da referência [74].

Figura 2.5 Catedral Notre Dame em Paris. Figura retirada da referência [76]

2.3.1.1 Plasmons de superfície

Plasmon é uma *quasi*-particula (oscilações coletivas), representada por oscilações de carga do plasma (elétrons na superfície). [57,77-83]. Quando um metal nanoestruturado é iluminado com radiação eletromagnética de frequência adequada é possível excitar os plasmons de superfície levando a observação de cores características [79, 83]. Para os metais (Cu, Ag e Au) a frequência de plasmon ocorre na região do visível [57-58,80].

A Figura 2.6 exibe a interação entre o campo elétrico incidente da luz e os elétrons livres da nanopartícula que tem dimensões menores que o comprimento de onda da luz. O campo elétrico pode causar o movimento dos elétrons livres para fora da partícula em um sentido, criando um dipolo que pode alternar com a direção de alteração do campo elétrico. Quando a frequência do dipolo é aproximadamente igual à luz incidente a condição de ressonância é satisfeita. Tais condições referem-se à ressonância de plasmons localizados na superfície (LSPR do *inglês Localizaed Surface Plasmon Ressonance*) [78-79,83-87].

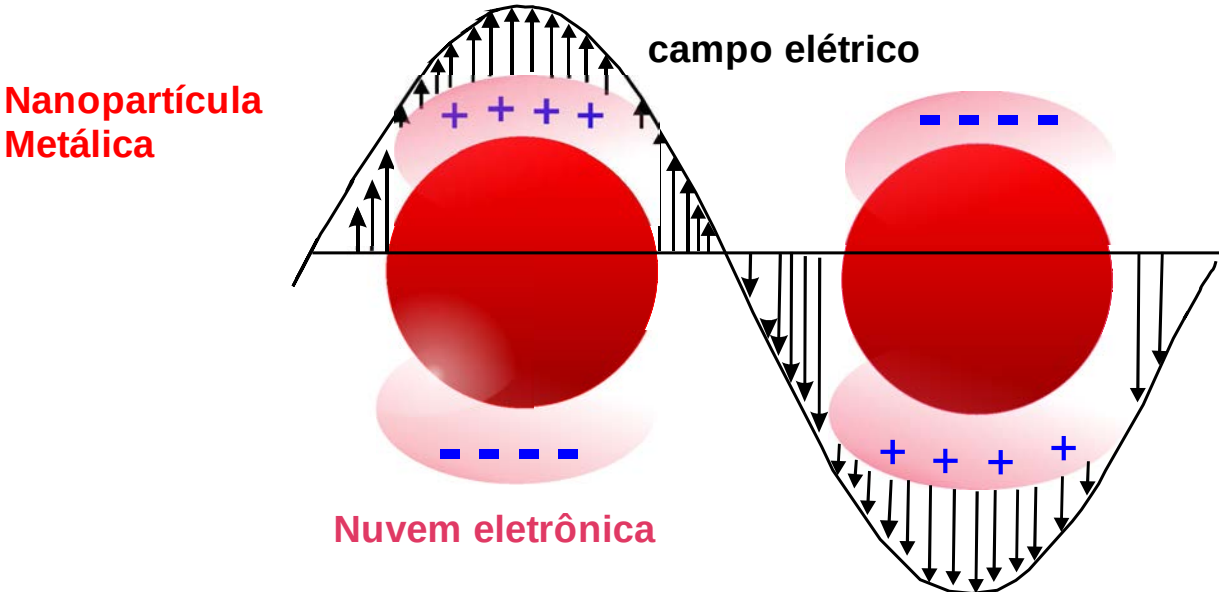


Figura 2.6 Representação esquemática dos plasmons se propagando em nanopartículas metálicas. Figura adaptada [78].

Para uma nanopartícula de poucos nanômetros (~50 nm), é considerado somente um modo de dipolo de interação e assume que o campo elétrico da luz é constante (aproximação *quase-estática*). No limite de dipolo *quase-estática* de uma partícula esférica, a oscilação da superfície de plasmon é dominada pelo modo dipolar dada pela polarizabilidade;

$$\alpha = 3\varepsilon_0 V\left(\frac{\varepsilon-\varepsilon_m}{\varepsilon+2\varepsilon_m}\right) \tag{2.8}$$

Onde V é o volume da partícula, ε_0 é a permissividade no vácuo, ε_m é a constante dieléctrica do meio circundante, ε é a função dielétrica do metal, no qual é complexa e dependente da frequência, $\varepsilon(w)=\varepsilon_r+i\varepsilon_i(w)$, onde ε_r é a parte real da função dielétrica e ε_i é a parte imaginária [88].

A partir da polarizabilidade, a absorção apresenta um comportamento de ressonância quando os denominadores ficam próximo de zero (Equação 2.8). Assim, é possível encontrar uma ressonância quando;

$$[\varepsilon_r(w)+2\varepsilon_m]^2+[\varepsilon_i(w)]^2 = mínimo \tag{2.12}$$

Isso significa que ε_r é negativa. Além disso, ε_i pode ser pequena, por exemplo $\varepsilon_i < 1$ a condição de ressonância segue;

$$\varepsilon_r = -2\varepsilon_m \tag{2.13}$$

Os coeficientes de absorção e espalhamento serão representados em termos da polarizabilidade dipolar, dados por [71];

$$\delta_{sca}(w) = \frac{8\pi^2 w^4}{3c^2}\left|\alpha(w)\right|^2 \quad (2.9)$$

$$\sigma_{abs}(w) = \frac{2\pi w}{c}\mathrm{Im}\{\alpha(w)\} \quad (2.10$$

$$\sigma_{ext} = \sigma_{abs} + \sigma_{sca} \quad (2.11)$$

Onde c é a velocidade da luz e *w* é a frequência

Observa-se pelas equações acima, que a absorção de luz é proporcional à polarizabilidade, enquanto que o espalhamento é o quadrado do volume. Portanto, o espalhamento prevalece para partículas grandes e a absorção prevalece para partículas pequenas [71, 88].

Existem casos que as nanopartículas metálicas são separadas por poucos nanômetros, fazendo com que os plasmons de superfície interajam entre si e, como resultado, o campo espalhado a partir de uma partícula se sobrepõe com as outras que estão suficientemente próximas. Assim, os plasmons de superfície irão ser acoplados e dependentes da força de interação. Em algumas regiões entre as partículas esta interação pode criar campos elétricos locais extremamente altos [78-79].

Para os metais nobres, a primeira característica da função dielétrica de acordo com Johnson e Christy [89-90] é que sua parte real é negativa, explicando sua alta refletividade, pois a grande maioria dos metais possuem a parte real da função dielétrica positiva, isso também explica a transparência da maioria dos metais. A parte real da função dielétrica está relacionada ao espalhamento[89-95].

Por outro lado, a parte imaginária das funções dielétricas está relacionada à absorção, ou seja, o quanto o material perdeu, por exemplo quanto de luz incidente no material é absorvida. A prata (Ag) apresenta banda de absorção em aproximadamente 300 nm, sendo assim não apresenta

contribuição na região do visível (400-700nm). Isso justifica a ampla utilização em SERS com este material [93-95].

Cobre (Cu) e Ouro (Au) apresentam banda de absorção entre 500 e 600 nm. Porém, a banda de absorção em região próxima a 600 nm do ouro apresenta componente imaginária semelhante ao da prata, isso justifica sua grande utilização em SERS. Além disso, o ouro apresenta maior estabilidade e não oxida em temperatura ambiente justificando sua maior utilização quando comparado com a prata [89-90, 94].

2.3.1.2 Efeito do Tamanho

A frequência de ressonância depende fortemente do tamanho da partícula, de tal modo que controla a distribuição espacial de cargas de polarização através da separação de cargas da superfície. Na aproximação *quase-estática*, são observados modos de ressonância de plasmon de superfície localizada (LSPR) no qual são atribuídos a excitação dos modos de ressonância dipolar. Com o aumento do tamanho a banda de plasmon é deslocada devido à diminuição da força restauradora entre as cargas opostas [83]. Um aumento do tamanho da nanopartícula o espectro de absorção tem contribuição de ambos modos dipolar e multipolar. Em uma condição geral para estes modos é dado por;

$$\frac{\varepsilon_r}{\varepsilon_m} = -\left[\frac{l+1}{l}\right] \tag{2.14}$$

Onde l é a ordem do modo de ressonância.

O efeito de tamanho foi examinado pelo El-Sayed e colaboradores [87]. Na Figura 2.7 os autores mostraram as nanopartículas de ouro com diâmetro médio compreendido entre 9 e 99 nm, As bandas de plasmon são deslocadas para maiores comprimentos de onda com o aumento do tamanho das partículas [87 -88].

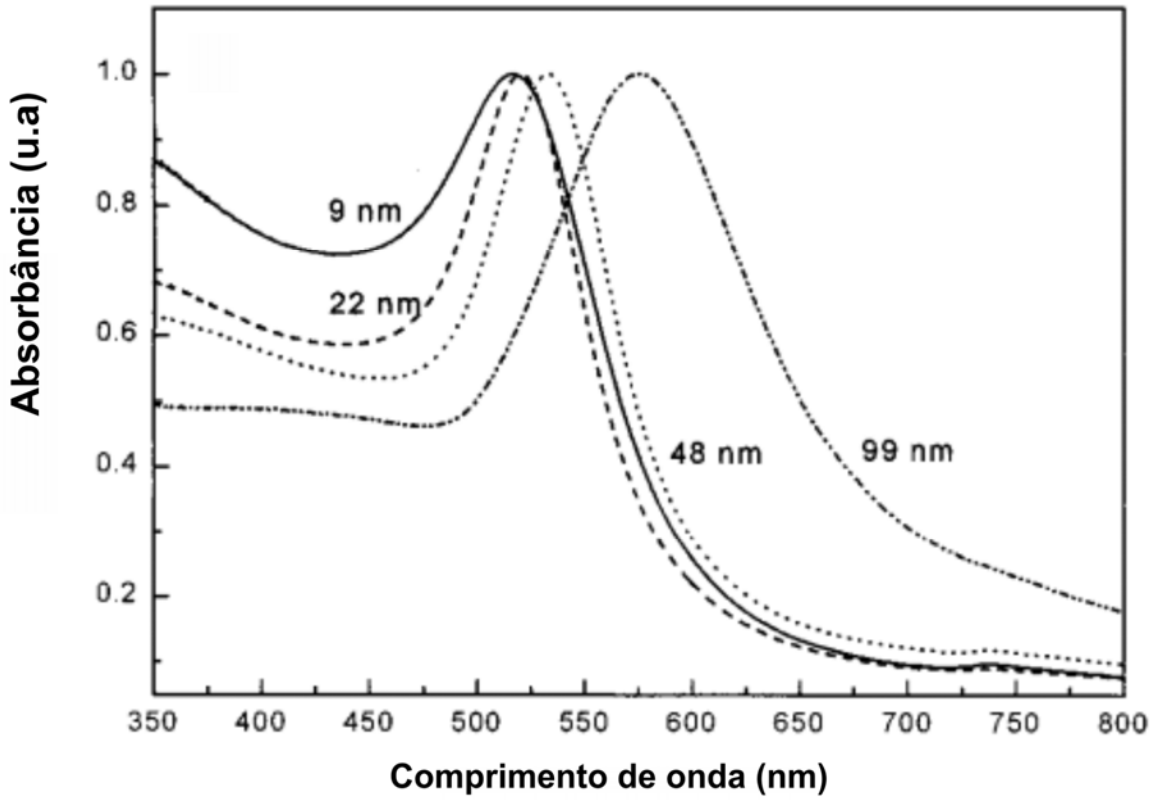


Figura 2.7 Espectros de absorção de suspensões aquosas de nanopartículas de ouro com diferentes tamanhos (9, 22, 48 e 99 nm). Os espectros foram normalizados no máximo de absorção (517, 521, 533 e 575 nm). Figura adaptada [87].

Os dois principais mecanismos (eletromagnético e químico) normalmente utilizados para a explicação do efeito SERS vem apresentados a seguir [57-58,65];

2.3.2 Fator de intensificação SERS e Mecanismo Eletromagnético

O fator de intensificação do efeito Raman pode ser da ordem de 10^6-10^8 e o mecanismo eletromagnético pode levar a este valor [57-58, 65, 86,94,96].

Um esquema simplificado para o entendimento do conceito de intensificação eletromagnético é representado na Figura 2.8. Uma nanoestutura metálica é uma esfera com a constante dielétrica complexa em um ambiente circundante ε_m com constante dielétrica ε [97]

O diâmetro da esfera ($2r$) é pequeno quando comparado ao comprimento de onda da luz. A molécula é vicinal na esfera (distância d) e é exposta a um campo eletromagnético E_M, o qual é a superposição do campo incidente E_o e o campo de dipolo E_{SP} induzido na esfera metálica. [82-83,86, 97].

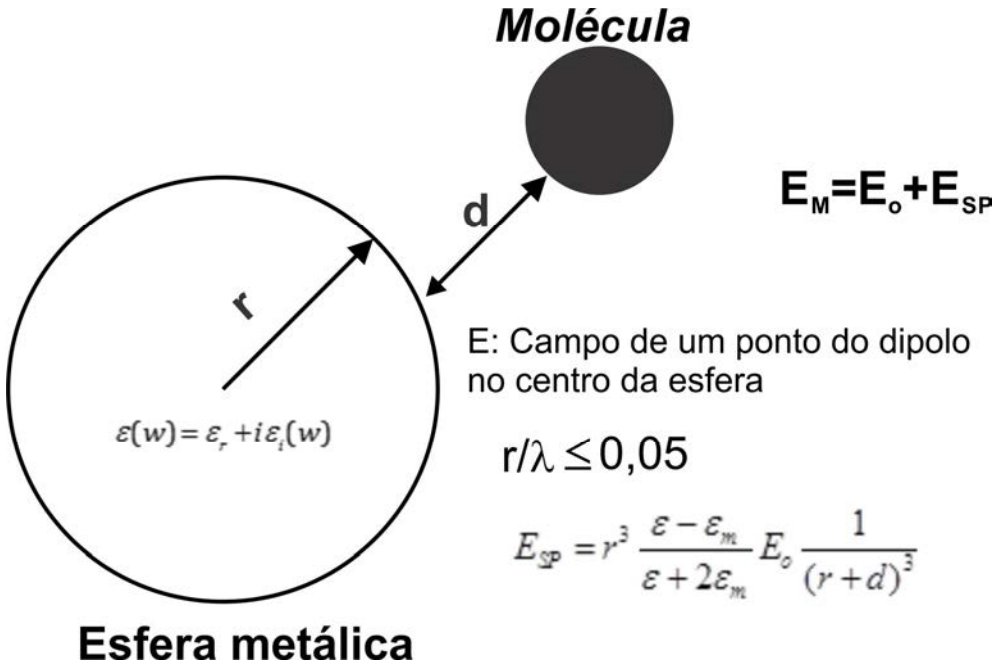


Figura 2.8 Esquema representativo para o entendimento do conceito de intensificação do SERS eletromagnético. Figura adaptada de [97].

O fator de intensificação do campo *(A(w))* é o raio do campo na posição da molécula e o campo de incidente;

$$A(w)=\frac{E_{M}(w)}{E_o}\sim\frac{\varepsilon_r(w)-\varepsilon_m}{\varepsilon_r(w)+2\varepsilon_m}\left(\frac{r}{r+d}\right)^3 \qquad (2.15)$$

Onde $A(w)$ é particularmente forte quando a parte real de ε_r é igual à ($-2\varepsilon_m$). Adicionalmente, para uma forte intensificação eletromagnética a parte imaginária da constante dielétrica precisa ser pequena. Esta condição descreve a excitação de ressonância dos plasmon de superfície, conforme já mencionado anteriormente.

De forma análoga o campo do laser, o espalhamento Stokes e anti-Stokes irão ser intensificados caso estejam em ressonância com a superfície de plasmon da esfera metálica. Considerando os efeitos de intensificação do laser e campo Stokes, o fator de intensificação para o sinal Stokes, pode ser escrito como;

$$G_{em}(w_s) = |A(w_L)|^2 |A(w_s)^2 \sim \left|\frac{\varepsilon_r(w_L)-\varepsilon_m}{\varepsilon_r(w_L)+2\varepsilon_m}\right|^2 \left|\frac{\varepsilon_r(w_s)-\varepsilon_m}{\varepsilon_r(w_s)+2\varepsilon_m}\right|^2 \left(\frac{r}{r+d}\right)^{12} \qquad 2.16$$

Onde $A(w_L)$ e $A(w_s)$ são os fatores de intensificação do laser e do espalhamento Stokes, respectivamente. A equação 2.16 é simples e já descreve as propriedades importantes e peculiaridades da intensificação eletromagnética SERS. Outro fator importante através da equação 2.6 é que G_{em} é frequentemente aproximado assumindo que $A(w_L)$ e $A(w_s)$ sejam semelhantes e, consequentemente $G_{em} = |A(w)|^4$, mostrando um aumento de intensificação que aumenta com a quarta potência do campo local da nanoestrutura metálica, sendo particularmente forte quando a excitação e o campo espalhado estão em ressonância com os plasmons de superfície.

Além disso, a equação 2.16 mostra que a intensificação eletromagnética é um efeito de longo alcance, o que significa que a molécula não necessariamente precisa estar em contato direto com o substrato SERS, mas aumenta fortemente com o aumento da proximidade das partículas descritas pelo decaimento do campo de dipolo da distância $(1/d)^3$ (equação 2.15) para a quarta potência o que resulta em $(1/d)^{12}$.

Com isso, algumas considerações importantes devem ser notadas.

- ✓ A excitação da ressonância dos plasmons de superfície pode ocorrer em uma partícula isolada, agregados de nanopartículas ou em superfícies rugosas. O plasmon de ressonância é determinado pelas propriedades ópticas do material, tamanho e forma da nanoestrutura;
- ✓ Quando a molécula é adsorvida na superfície da nanopartícula metálica, contribuições do metal podem alterar magnitude, simetria e propriedades de ressonância da polarizabilidade Raman da molécula isolada;

- ✓ Excitação SERS é um fenômeno de campo próximo. A interação entre plasmons de partículas vizinhas aumenta o fator de intensificação [96-97].

A Figura 2.9 representa um comportamento interessante. Quando as nanopartículas metálicas estão suficientemente próximas, os plasmons de superfície interagem entre si, resultando em um fenômeno conhecido como *hot spot*. As moléculas adsorvidas nesta região (*hot spot)* apresentarão espectros com forte intensificação [96-102].

Uma vez que as intensidades Raman são produtos escalares da intensidade do campo incidente e a polarizabilidade, não é de surpreender que existem dois mecanismos normalmente considerados para SERS, um envolve melhoramento na intensidade do campo, como resultado da ressonância de plasmon de excitação e o outro, a melhoria na polarizabilidade devido aos efeitos químicos, tais como, de transferência de carga e estados excitados [65,96].

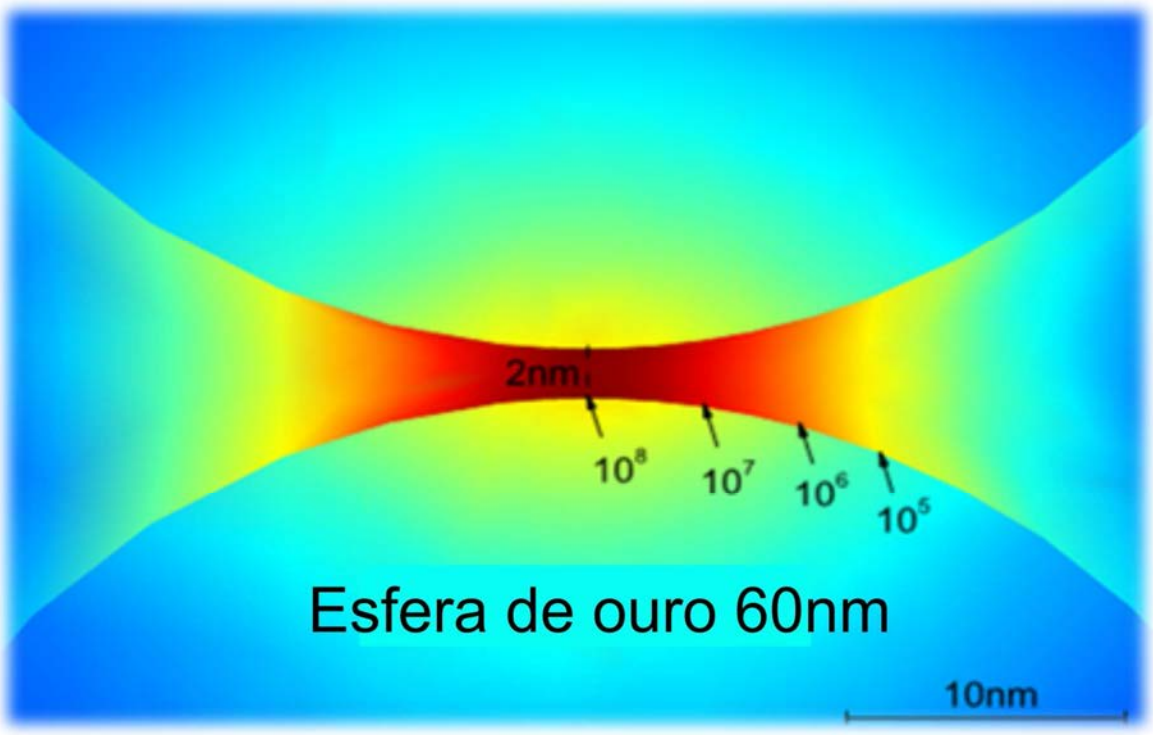


Figura 2.9 Fator de intensificação em um *hot-spot* com nanopartículas separadas até 2 nm. Figura adaptada [102]

2.3.3 Mecanismo Químico

O mecanismo químico é resultado da interação eletrônica entre a nanoestrutura metálica e a molécula adsorvida [57-58,96-97,99]. O efeito é menos pronunciado resultando em um fator de intensificação de ~ 10^2, mas tem sua importante característica. Otto descreveu em seu artigo [103] que sem o mecanismo eletromagnético não haveria sinal SERS, mas o mecanismo químico determina o que é observado. Isso mostra a fundamental importância do espectro observado em SERS, no qual contém as informações sobre o adsorbato e o seu ambiente em particular, orientação da intensidade com a nanoestrutura, sua orientação espacial e as propriedades de polarização do campo elétrico local [57-58].

A Figura 2.10 mostra o mecanismo de transferência de carga para uma molécula adsorvida em uma superfície. O mecanismo químico acontece quando há uma energia de separação (*gap*) entre os orbitais moleculares de alta energia (HOMO) e os orbitais desocupados de baixa energia (LUMO), no qual há uma redistribuição do nível de energia da molécula absorvida sobre uma superfície rugosa. Assim ocorre transferência de carga entre o metal e o absorbato. Todo o processo pode ser identificado pelas seguidas etapas;

- ✓ Etapa 1: Um par de elétrons buraco do metal é criado por fótons incidente com energia hw_o e um elétron é excitado como um *hot-eletron*;
- ✓ Etapa 2: O *hot-eletron* tunela em acessíveis níveis de vacância, de tal o LUMO do absorbato é transferido para o estado excitado;
- ✓ Etapa 3: Um íon negativo criado na etapa 2 tem uma geometria de equlíbrio diferente da molécula adsorvida original e o elétron irá retornar para o metal, e irá relaxar durante o processo de transferência de carga;
- ✓ Etapa 4: O elétron irá recombinar com o buraco criado na etapa 1, o que leva a um estado vibracional excitado e a molécula irá emitir um deslocamento Raman com fóton de energia *hw*.

Geralmente, o efeito químico de contribuição SERS tem um curto alcance. Este mecanismo depende da molécula absorvida, geometria da ligação e nível de energia da molécula adsorvida [57-58, 99,103].

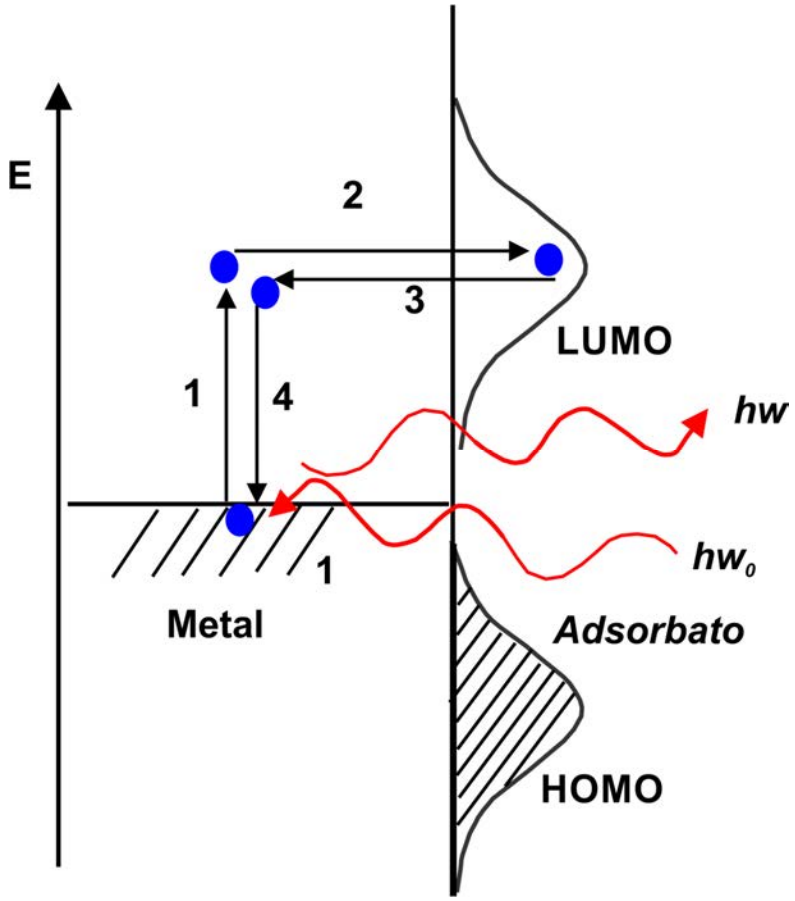


Figura 2.10. Representação esquemática para o processo de transferência de cargas para uma molécula adsorvida em uma superfície. Figura adaptada [100]

3 Biossensores

O conceito básico dos biossensores foi proposto por Clark e Lyons que apresentaram em um seminário o termo *eletrodo enzimático* [104-107]. Eles desenvolveram um amperímetro sensível à glicose usando a enzima glicose oxidase, fisicamente imobilizada em uma membrana de cuprofane (celulose regenerada) acoplada em um eletrodo de oxigênio. Updike e Hicks melhoraram o sensor pela imobilização daquela enzima em gelatina [106-109]. Desde então, os biossensores têm grande importância devida à enorme capacidade de resolver problemas analíticos e desafios nas diversas áreas, tais como, segurança alimentar [110], monitoramento ambiental [11], farmacologia [112], medicina [113-114], entre outros. Estas aplicações associadas com o baixo custo e alta eficiência dos dispositivos são amplamente usadas no nosso dia a dia [106-107].

Um biossensor é definido de acordo com a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), como sendo um dispositivo integrado que é capaz de proporcionar informação analítica específica, utilizando um elemento de bioreconhecimento que está em contato direto com o transdutor [15]. A Figura 3.1 mostra as partes típicas de um biosensor: (a) bioreceptores que ligam especificamente no analito, (b) arquitetura de interface onde acontece a interação biológica específica dando origem ao sinal (c) elemento transdutor-converte o sinal em sinal eletrônico e amplificado pelo detector usando uma referência apropriada e, então enviada ao processador (d) software de um computador descreve o processo a ser investigado, (e) finalmente é apresentada a um sinal mensurável. [106, 116].

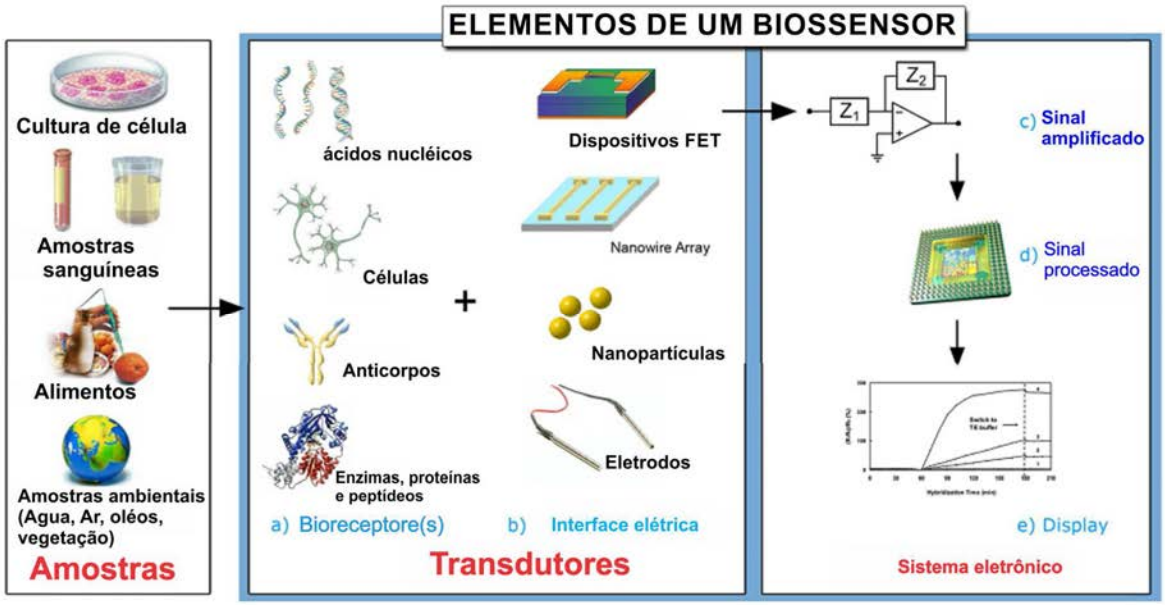


Figura 3.1 Elementos básicos de um biossensor. Adaptado [106,116].

Um biossensor ideal deve apresentar as seguintes características:

(a) A reação deve ser independente de parâmetros físicos como pH, agitação e temperatura. Isto irá permitir a análise de amostras com pré-tratamento mínimo. Se a reação envolve cofatores e coenzimas estas devem de preferência também ser co-imobilizadas com a enzima.

(b) A resposta deve ser exata, precisa, reprodutível e linear na faixa de concentração de interesse, sem diluição ou concentração. Além disso, a resposta deve ser livre de ruído.

(c) Caso o biossensor seja usado para monitorar situações clínicas a *sonda* deve ser minúscula e biocompatível, não tendo efeitos tóxicos ou antigênicos.

(d) Para uma medida rápida do analito em amostras reais é desejável que o biossensor proporcione análise em tempo real.

(e) O biossensor completo deve ser barato, pequeno, portátil e capaz de ser utilizado por qualquer pessoa [116].

3.1 Imunosensor e Imunoensaios

Um imunosensor é um tipo de biosensor baseado na reação imunológica, isto é, na interação do anticorpo (Ab) e antígeno (Ag) na superfície do transdutor [116-117]. Em geral, o princípio dos imunosensores são baseados no fato do reconhecimento específico, imunoquímico de anticorpos imobilizados sobre um transdutor de antígenos na amostra, para produzir sinais analíticos que variam com a concentração do analito de interesse. Os méritos dos imunosensores são provenientes da afinidade e seletividade da reação entre antígeno-anticorpo, produzindo uma ligação altamente específica devido as diferentes forças de interação, basicamente interações eletrostáticas, forças de Van der Waals e ligações hidrogênio [119].

A alta especificidade é obtida pelo reconhecimento molecular do analito alvo (geralmente antígenos) por anticorpos (elemento de reconhecimento biológico) para formar um complexo estável sobre a superfície de um imunosensor. Além disso, a sensibilidade depende de fatores incluindo a alta afinidade analito, anticorpo específico, orientação após ter sido imobilizado no imunoensaio ou na superfície do imunosensor e sistema de detecção apropriado para medição analítica.

Dependendo da tecnologia empregada no transdutor, os imunosensores podem ser classificados em três classes: ópticos, eletroquímicos e piezelétricos [119]. Além disso, com base no formato do imunoensaio usado que pode ser direto (o dispositivo detecta a diferença da mudança por corrente, resistência, massa, calor ou propriedades ópticas) ou indireto (usa-se sondas para detecção no imunoensaio) [121].

3.2 Princípios do Imunoensaio

Os anticorpos são glicoproteínas conhecidas como imunoglobulinas (Ig). Existem cincos classes de glicoproteínas (IgG, IgM, IgA, IgD e IgE) também descritos na Tabela 3.1 [122], que diferem nas suas propriedades físico químicas e na sequências dos aminoácidos. O IgG é mais abundante da classe (~70%) e mais frequentemente usado em técnicas de imunoensaios. A Figura 3.2 mostra um esquema do anticorpo IgG. O IgG possui a forma de Y baseada em duas cadeias polipeptídicas. O peso molecular da menor cadeia (cadeia leve) é de aproximadamente 25000 Da, enquanto o da maior cadeia (cadeia pesada) é de aproximadamente 50000 Da. Em cada molécula IgG, há duas cadeias leves e duas cadeias pesadas que são mantidas unidas por ligações disulfeto

[118]. Ambas as cadeias leves e pesadas são divididas em um domínio constante (C) e um variável (V) baseada na sequência de aminoácidos. A cadeia leve tem um domínio único (V_L) e uma constante única (C_L). A cadeia pesada consiste de um único domínio (V_H) e três domínios constantes (C_H1, C_H2, C_H3). Em geral, a molécula de anticorpo pode ser dividida em dois principais fragmentos, o fragmento não antigênico (denotado como Fc) e o fragmento antigênico ($F(ab´)_2$) [123] como indicado na Figura 3.2.

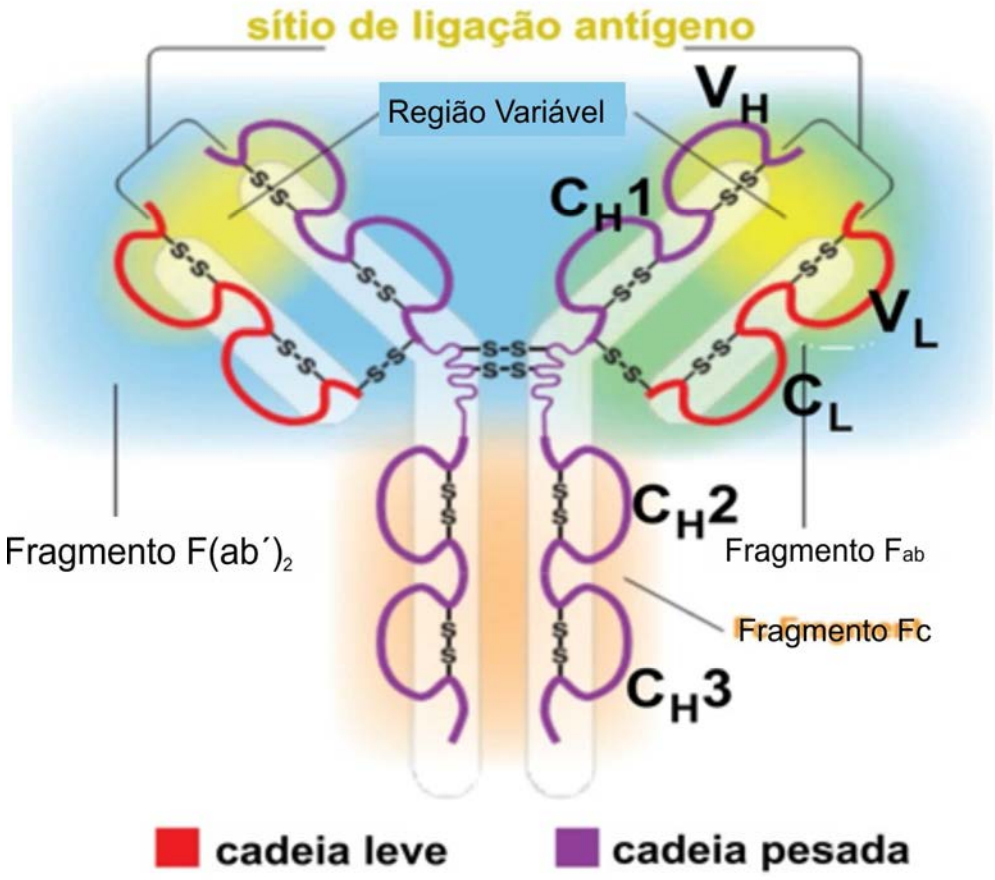


Figura 3.2 Esquema ilustrativo da forma Y da estrutura do anticorpo. Na região entre a cadeia leve e a cadeia pesada ocorre a ligação antigênica. O braço aberto da forma Y é geralmente denotado como Fab enquanto a porção não antigênica é referida como Fc. Figura adaptada [123].

Tabela 3-1.Propriedades e abundância de imunoglobulina [122]

Classe	Concentração em soro adulto	Propriedades características
IgG	12 mg/mL	Único que atravessa a placenta
IgE	0,3 mg/mL	Predominante na resposta alérgica
IgM	1,0 mg/mL	Lisa bactéria por ativação de outros componentes do soro
IgA	1,8 mg/mL	Encontrado em secreções (saliva e lágrima)
IgD	30 mg/mL	Encontrado em linfócitos

Os anticorpos podem ser monoclonais ou policlonais. O anticorpo policlonal pode reconhecer uma variedade de epítopos (pequeno sítio de um antígeno que possui um complementar especifico para a ligação com um anticorpo) em um antígeno que pode ser uma característica especialmente útil em alguns procedimentos experimentais. Uma vez que estas misturas de anticorpos policlonais reagem com vários epítopos sobre a superfície do antígeno, serão mais tolerantes a pequenas alterações no antígeno [123].

Por outro lado, anticorpos monoclonais reagem com um único epítopo no antígeno, no entanto, eles são mais vulneráveis à perda do epítopo. A especificidade de anticorpos monoclonais torna extremamente eficiente a ligação do antígeno dentro de um mistura de moléculas relacionadas [124-126].

Um antígeno é qualquer substância que induz uma resposta imune quando introduzido no tecido do animal susceptível é capaz de se combinar com os anticorpos específicos formados.

Antígenos são geralmente moléculas com alto peso molecular, comumente proteínas ou polissacarídeos. Em um determinado tempo suficiente, qualquer substância estranha será identificada pelo sistema imunológico e provocará a produção de anticorpos específicos. No entanto, esta resposta imunológica específica é altamente variável e depende do tamanho, estrutura e composição dos antígenos. Os antígenos que induzem fortes respostas imunitárias são referidos como sendo fortemente imunogênicos [125].

Em um imunoensaio, o anticorpo combina-se especificamente com o correspondente antígeno ou hapteno (substância de baixo peso molecular que por si não é imunogênica, mas pode se ligar ao anticorpo específico), formando um complexo [127] de acordo com a Equação 3.1. A afinidade de interação entre um anticorpo (Ab) e um antígeno (Ag) pode geralmente ser descrita pela expressão de equilíbrio, de acordo com a expressão 3.2 [119,127]:

$$Ag + Ab \rightleftharpoons AgAb \tag{3.1}$$

$$Ka = \frac{[Ag.Ab]}{[\mathrm{Ag}][\mathrm{Ab}]} \tag{3.2}$$

Onde, *Ka* é a constante de afinidade para a interação e Ag-Ab é o complexo formado entre Ab e o específico Ag. Valores típicos valores de *Ka* variam de 10^6 a 10^{12} L.mol^{-1} [119,127].

3.3 Biossensores usando ensaios sanduíche SERS

Conforme já mencionado, SERS é uma técnica de espectroscopia vibracional ultrasensível que detecta moléculas próximas à superfície de nanoestruturas plasmônicas, resultado de um importante aumento de intensidade comparado com a espectroscopia Raman normal. A aplicação clássica envolve a detecção direta de vários analitos ligados a um substrato SERS metálico, produzindo informação com base nos espectros SERS dos analitos [128].

Nos últimos anos novas alternativas têm sido desenvolvidas para a melhoria do sinal Raman. Uma técnica descrita em vários exemplos da literatura [129-132] e também descrita nesse

trabalho de doutoramento, combina nanoestruturas metálicas com moléculas orgânicas específicas apresentando uma banda bem característica. Esse sistema é conhecido como sonda *SERS* [131-134]. Neste sistema, as nanopartículas metálicas são recobertas com moléculas orgânicas (normalmente corantes), que em geral apresentam banda de absorção no mesmo comprimento de onda do laser Raman incidente. Esse efeito é chamado de SERS ressonante (SERRS), conforme discutido no capítulo 2.

O desenvolvimento de sondas *SERS* é considerado um avanço para análise espectroscópica de amostras biológicas, pois oferece grandes vantagens tais como: (a) alta sensibilidade para análises de pequenas quantidades de amostras; (b) tempo de vida extremamente curto, que impede o *photoblenching*, transferência de energia do estado excitado dos marcadores (corantes); (c) alto contraste, que pode ser alcançado usando excitação no infravermelho próximo a fim de minimizar a autofluorescência de tecidos e células, permitindo as sondas SERS (*SERS probes*) possam ser usados para geração de imagens não invasiva em pacientes vivos [132].

Uma sonda *SERS* é composta por: uma nanoestrutura metálica, geralmente uma nanopartícula de prata (AgNPs) ou nanopartícula de ouro (AuNPs), uma molécula orgânica com uma banda bem característica e um anticorpo conjugado. As nanoestruturas metálicas fornecem um forte sinal espectroscópico devido aos campos ópticos locais em superfícies metálicas. A mudança da composição química, tamanho e estrutura do núcleo de metal podem afetar as propriedades das sondas *SERS*. Além disso, essas moléculas orgânicas devem ser ancoradas à nanoestrutura metálica para gerar a impressão digital do SERS [132-134].

A imobilização sobre a superfície metálica é descrita como uma monocamada auto-montada (SAM do inglês *self assembled monolayer)*. Existem diversos tipos de substratos e optamos pelo ouro neste trabalho, pois apresenta características bem interessantes, tais como: a) facilidade de obtenção na forma de filmes ou colóides; b) Au é inerte, isto é, não oxida a temperatura abaixo da temperatura de fusão, não reage com O_2 atmosférico - estas propriedades facilitam a manipulação; c) alta afinidade com grupos tióis, d) baixa toxicidade, sendo compatível com células, isto é, as células podem aderir sem qualquer evidência de toxicidade [135-136].

Geralmente, três tipos de organotióis são usados imobilizados sobre a superfície de ouro como: alcanotiois ($H\text{-}S(CH_2)_nX$, diaquildisulfitos ($(X(CH_2)_mS\text{-}S(CH_2)_nX$) e dialquilsulfitos

(($X(CH_2)_mS(CH_2)_nX$, onde m e n são número de grupo metileno e X representa o grupo funcional final do grupo da cadeia alquil ($-CH_3$, -OH, -COOH) [135].

Um organotiol imobilizado na superfície consiste de três partes: A Figura 3.3 representa estas partes. (i) Tiol no grupo calda que forma uma ligação forte covalente com o substrato (ii) espaçador, sendo uma cadeia de hidrocarbonetos (variável comprimento de carbonos) o que estabiliza o SAM através de interações Van de Walls e (iii) grupo terminal (cabeça), que pode ter diferentes funções, uma pequena mudança no grupo terminal podem alterar as propriedades químicas e físicas da camada [135-136].

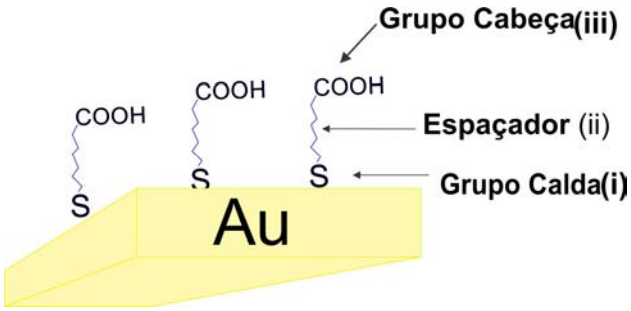


Figura 3.3 Esquema de formação do organotiol imobilizado em uma superficie de ouro Figura adaptada [137].

As aplicações usando SAMs são as mais diversas, tais como em nanofabricação, biossensores e imunossensores.

O primeiro relato de ensaio *sanduíche* SERS foi demostrado por Porter e colaboradores [138] usando nanopartículas de ouro para detecção em SERS. O ensaio foi capaz de detectar IgG com alta precisão. Com isso abriu se um novo caminho para um novo método de detecção altamente sensível, usando um formato de ensaio *sanduíche* em que o analito de interesse é diagnosticado indiretamente entre um suporte (SAM) e as nanopartículas ancoradas com a molécula marcadora (*SERS probe* ou sondas *SERS*) que irá gerar o sinal de interesse.

Tipicamente, imunoensaios baseados em SERS são conhecidas por ser uma técnica de detecção de diagnóstico de doenças, pois combina a facilidade, à versatilibilidade de síntese,

produzindo sistemas com alta sensibilidade. Alguns requisitos importantes para um imunoensaio SERS para aplicações em diagnósticos são uma resposta reprodutível e uniforme, período de vida estável e a simplicidade de fabricação [130-132].

Uma importante aplicação usando essa metodologia foi proposta por Yoon e colaboradores [139] que demostraram a possibilidade de detecção de câncer de próstata. Neste tipo de imunoensaio sanduíche SERS os autores usaram para capturar antígenos em uma camada imobilizada de anticorpos em que o substrato de ouro foi imobilizado sobre uma SAM. As nanopartículas de ouro foram revestidas com uma molécula sonda e detectou-se o espectro SERS da sonda. Neste trabalho os autores observaram que o PSA (anticorpo do câncer de próstata) estava presente.

Doria e colaboradores [140] propuseram uma superfície imobilizada com anticorpos e nanopartículas de ouro ancoradas com com MBA (ácido 4 mercaptobenzoico) funcionalizado com um anticorpo. Neste trabalho os autores conseguiram detectar o antígeno do vírus da hepatite B em concentrações abaixo 5000 ppm.

Zengin e colaboradores [141] desenvolveram um ensaio em sanduíche altamente sensível para a detecção da proteína τ (proteína específica do mal de Alzhemeir) utilizando uma combinação de anticorpos monoclonais anti-τ, nanopartículas magnéticas e sonda SERS. As partículas de sílica magnéticas foram revestidas com poli (metacrilato de 2-hidroxietilo) e em seguida com anticorpos anti-τ de monoclonais. A utilização de partículas magnéticas permite a separação por meio de um íma. As amostras isoladas formam o sanduíche com o substrato de SERS composto de anticorpos policlonais anti-τ e 5,5-ditiobis (ácido 2-dinitrobenzóico) em nanopartículas de ouro. Neste trabalho os autores, mostraram que o limite de detecção do ensaio sanduíche foi abaixo de 25 fM

Uma aplicação usando esta metodologia envolve detecção em tempo real da glicose sendo de enorme importância para quem sofre de diabetes. No trabalho, os autores [142] apresentaram um sistema de detecção de glicose transcutânea usando SERS *in vivo*. O dispositivo foi utilizado ao longo de 17 dias, e mais importante, os autores relataram que entre os dias 6 e 17, os níveis de glicose medidos foram encontrados para estar dentro dos níveis clinicamente relevantes. A superfície de nanoesferas de prata foi funcionalizada com uma mistura de SAM e implantada

subcutaneamente em ratos (*Sprague-Dawley*). A concentração de glicose foi monitorada no fluído intersticial em seis ratos separados. A alta precisão, e medições de glicose estáveis consistentes, fornecem a promessa para um dispositivo implantável como sensor de glicose em tempo real.

3.3.1 Redução da ligação não especifíca

Uma dificuldade encontrada por pesquisadores da àrea de biossensores é a adsorção de proteínas sobre as superfícies, que muitas vezes leva a alterações conformacionais de moléculas da proteína, causando a perda de atividade. Aliás, a presença de moléculas ligadas irreversivelmente num biossensor pode fazer medidas de outras moléculas não específicas.

Os resultados de adsorção não-específicas ocorrem de várias formas através de forças interativas entre proteínas e superfícies, tais como: interação hidrofóbica/hidrofílica, forças de Van der Waals, ligação de hidrogênio e interações iônicas. Estudos mostram que a adsorção de proteína sobre superfícies ocorre devido às interações entre a as regiões hidrofóbicas. Mais ainda, as proteínas maiores são mais prováveis de interagir com as superfícies, porque eles podem entrar em contato em mais sítios locais de adsorção [143-144]. Adsorção também depende da estabilidade da estrutura da proteína, devido a um desdobramento da estrutura da proteína, que podem levar a um aumento da liberdade conformacional da cadeia.[145].

A adsorção não específica de proteínas sobre a superfície conduz a incrustação do biossensor induzindo alterações na disponibilidade da superfície do analito. Ligações não específica de biomoléculas são portanto, uma grande desvantagem da aplicação de biossensor. Diante disso, a sua eliminação ou redução necessita de ser seriamente considerada durante o desenvolvimento de biossensores [146].

A ligação não específica sobre uma superfície do sensor pode ser alterada pela mudança da química da superfície do biossensor, modificando a concentração de proteína e também variando a força iônica, pH e temperatura das soluções tampão [143,146].

Uma alternativa para contornar a ligação não específica é imobilizar a superfície com polímeros [36]. Neste trabalho foi utilizado o polietileno glicol (PEG) [146-147]. O PEG têm sido amplamente utilizado como um biomaterial devido a sua baixa toxicidade, baixa imunogenicidade, e autores constataram que a ligação covalente de PEG sobre superfícies retarda grandemente a

adsorção de proteínas [36-39]. A resistência do PEG para a adsorção de proteínas é geralmente considerado um efeito estérico de repulsão, em que o polímero impede a proteína de atingir a superfície do substrato para absorver [147]

Michel e colaboradores [148] desenvolveram um estudo de mudança de conformação e adsorção de diferentes proteínas em superfíce de nióbio modificado com o PEG. O estudo determinou a relação entre a densidade da superfície PEG, proteína adsorvida, grau de proteína e mudanças de conformação. A superfície com PEG reduz não só a quantidade de proteínas adsorvidas, mas também reduz o grau desnaturação da proteína. O grau de desnaturação depende tanto do tipo de proteína quanto da densidade de superfície de cadeias de PEG.

OBJETIVOS

Objetivos Geral

- *Desenvolvimento de uma prova de conceito para detecção do peptídeo p17-1 do vírus HIV baseado em SERS.*

Objetivos Específicos

- ✓ *Construção de duas plataformas de imunoensaio com MUA e PEG;*
- ✓ *Preparação de nanopartículas de ouro modificadas pela molécula sonda SERS azul do Nilo A (NBA);*
- ✓ *Mapeamento SERS e tratatamento estatístico dos experimentos;*
- ✓ *Comparação das duas plataformas SERS a fim de verificar a redução da ligação não especifica.*

4 Seção Experimental

4.1 Reagentes

Em todos os experimentos foram utilizados água ultrapura (Banstead Nanopure, resistividade 18.2 Ω-cm). Foram também utilizados os reagentes como: Ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA, ≥ 99%, Sigma Aldrich), cloreto de ouro trihidratado ($HAuCl_4.3H_2O$, ≥ 99,9%, Sigma Aldrich), citrato de sódio dihidratado (≥ 99%, FG), perclorato de azul do Nilo A (NBA, 95%, Sigma Aldrich), Etil dimetilaminopropilcarbodiimida e sulfo-N-hidroxisuccinimida (EDC e sulfo-NHS, ambos da ProteoChem, USA), HS-PEG-COOH e HS-PEG-CH_3 (Peso Molecular = 3000 e 5000 Da, ambos da Rapp Polymere Tuebingen, Germany), anticorpo monoclonal IgG HIV p17 (Peso molecular = 17 KDa, Santa Cruz Biotechonology, USA), p17-1 peptídeo (sequência *LSGGELDRWEKIRLPGG*, ≥ 98%, RS Synthesis, USA), albumina de soro bovino (BSA, ≥ 96 %, Sigma Aldrich).

4.2 Preparação das Nanopartículas de ouro (AuNPs)

As nanopartículas de ouro foram sintetizadas pela redução do Au (III) com a presença de citrato de sódio como descrito no protocolo de Turkevich [149]. 340 µL foram diluídos de uma solução aquosa de 10,1 mM do cloreto áurico, agitado e aquecido até uma temperatura de 100 ºC. Subsequentemente, foram adicionados rapidamente 5 mL de uma solução de citrato de sódio (1%) mantendo agitação e o aquecimento constante, durante uma hora. A Figura 4.1 mostra a formação das nanopartículas de ouro quando pronta.

Figura 4.1 Ilustração da suspensão de AuNPs.

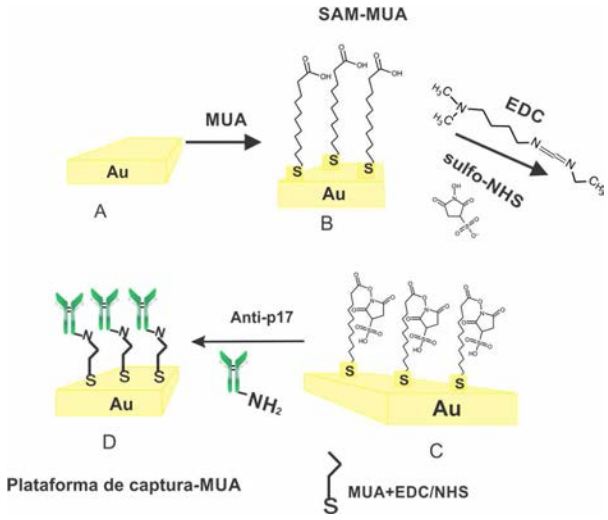
4.3 Construção das plataformas de ensaio MUA e PEG.

No esquema representativo da Figura 4.2 (i e ii) mostra a construção das plataformas de capturas. Foram desenvolvidas duas plataformas de captura (plataforma de captura-MUA e plataforma de captura-PEG).

Superfícies de vidro recobertas com ouro (100 nm) por eletrodeposição (5 nm Cu + 100 nm Au), Figura A **(i e ii)**, foram imersas em uma solução etanólica de MUA (10 mM) por 24 horas, Figura B**(i).** Para a formação da plataforma-PEG, as superficies de ouro foram imersas em uma mistura de solução aquosa de PEG (CH_3-PEG-SH e COOH-PEG-SH, proporção 1:3, respectivamente), por 2 horas, Figura B **(ii).** Posteriormente, as amostras foram cuidadosamente lavadas e secas com nitrogênio ultrapuro. Este processo de ambas as etapas é conhecido como monocamada auto-montada (SAM) e para descrições posteriores serão mencionadas como SAM-MUA e SAM-PEG, respectivamente. Ambas as amostras **(SAM-MUA, (i) e SAM-PEG, (ii))** seguiram para um processo de ativação dos grupos funcionais COOH que ocorreu pela adição da solução de EDC (40 µL de 20 mg/mL) seguindo pela adição da solução sulfo-NHS (40 µL de 55 mg/mL). A mistura foi deixada incubada por duas horas, Figura C **(i e ii)**.

As superfícies de ouro modificadas **(i e ii)** foram imersas em uma solução contendo 100 µL do anti-p17 (100 µg/mL) em solução tampão PBS por seis horas. Estas etapas do trabalho, foram descritas como plataforma de captura MUA e plataforma de captura PEG, representada pela Figura **D (i e ii).**

(i)



(ii)

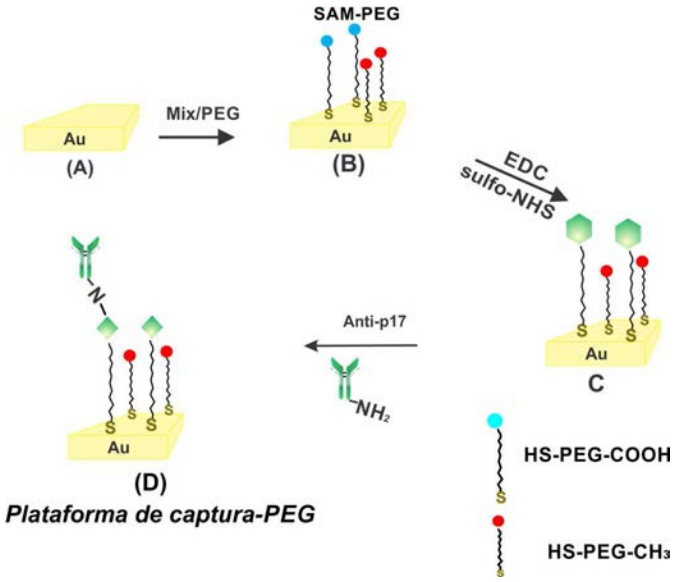


Figura 4.2 Representação esquemática da formação da plataforma de captura MUA (i) e PEG (ii). (A) Superfície de ouro, (B)Mobilização de MUA e PEG na superfície, (C) Ativação da superfície com EDC/sulfo-NHS, (D)Funcionalização com anti-p17. Figuras elaboradas pelo autor.

4.4 Construção do eletrodo com a superficie de ouro e voltametria ciclíca

Duas superfícies de ouro foram lavadas exaustivamente com solventes orgânicos (etanol, metanol e álcool iso-propílico) para remoção de impurezas. No qual, uma superficie de ouro foi imobilizada com MUA formando a SAM, como descrito anteriormente (seção 4.3 (i)). As áreas geométricas da superficíe ouro (Au), e superfície modificada (Au + SAM) (ambas, eletrodo de trabalho) foram pré-definidas com a fita adesiva de galvanoplastia, (1KFA25 Kapton tape®), perfuradas com um alicate furador, e fixadas sobre os eletrodos de trabalho (Au e Au + SAM). Para o contato elétrico, foi utilizada uma lâmina de cobre (fio de cobre laminado e polido com lixa 3M 800) fixado com uma fita de PTFE (politetrafluoretileno) conforme mostra a Figura 4.3. Uma célula eletroquímica de compartimento único com volume de 5 mL foi utilizada para as medidas, juntamente com um sistema de três eletrodos: Au (A_{geom} = 0,56 cm^2), Au + SAM (A_{geo}=0,53 cm^2), Ag|AgCl|$KCl_{(sat)}$ e fio de platina, como eletrodo de trabalho (Au, Au + SAM), referência e auxiliar, respectivamente. Para os estudos de voltametria cíclica, foram utilizados um intervalo de potencial de –0,45 a +0,45 V em solução tampão fosfato salino (PBS) 0,1 M pH 7,0 na presença do par redox $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 1,2 $mmol.L^{-1}$, com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1}

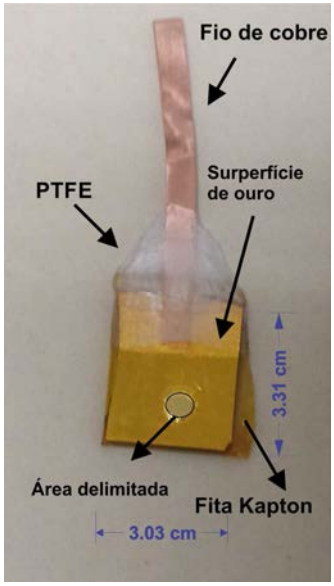


Figura 4.3 Construção de um eletrodo a partir da superficie de ouro, com área delimitada para calcular o grau de recobrimento da superfície. Foto adquirida pelo autor.

4.5 Preparação das sondas SERS

As sondas SERS foram produzidas seguindo o procedimento descrito por Shaw e Brolo [134]. A Figura 4.4 representa o processo de formação. Nanopartículas de ouro (AuNPs), *etapa (i)*, foram ancoradas com o corante NBA (1 µM), *etapa (ii)* e posteriormente adicionado HCOO-PEG-SH, *etapa (iii*).

Em 1 mL da solução de AuNPs, foram adicionados 600 µL da solução de NBA, cuidadosamente gota-a-gota com agitação constante. A suspensão permaneceu por 15 minutos sob agitação constante. Então, foram adicionados 600 µL da solução de HCOO-PEG-SH, permanecendo durante 20 minutos sob agitação.

O excesso do reagente foi removido por centrifugação, *etapa (iv)* (13000 rpm por 7 min.) resultando em partículas modificadas, que foram re-suspensas em 1 mL água ultrapura (esse processo foi realizado 4 vezes).

O processo de ativação dos grupos funcionais COOH que ocorreu pela adição da solução de EDC (40 µL de 20 mg/mL) seguindo pela adição da solução sulfo-NHS (40 µL de 55 mg/mL), *etapa (v).* A mistura foi agitada constantemente durante 30 minutos.

O anticorpo anti-p17 foi funcionalizado na superficíe das nanopartículas com a adição de 100 µL de anti-p17 (100 µg/mL) em solução tampão PBS pH 7,4 para o frasco de reação, *etapa (vi).*

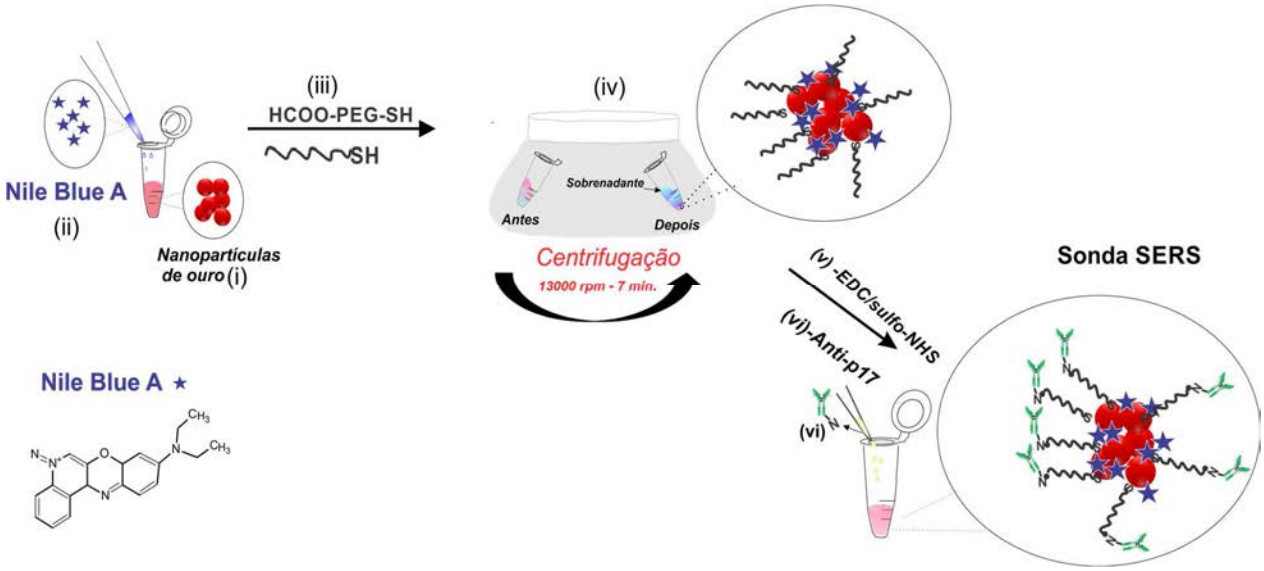
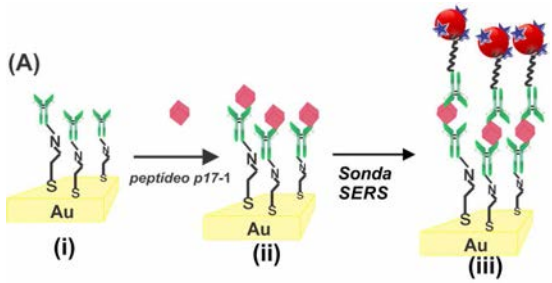


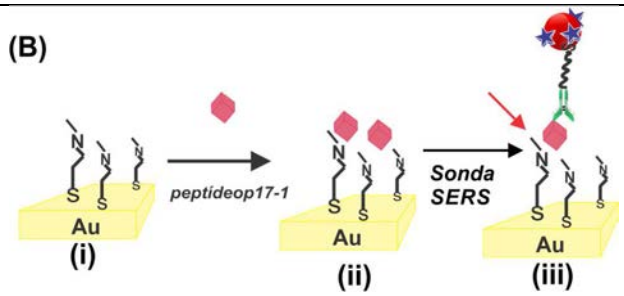
Figura 4.4 Representação esquemática para a formação da sonda SERS. Figura elaborada pelo autor.

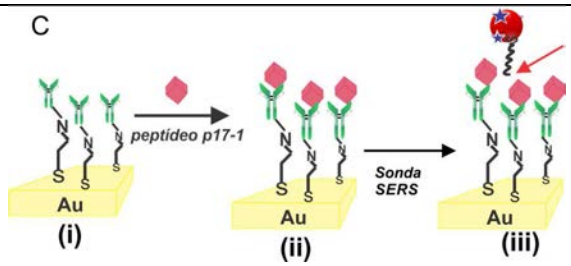
4.6 Protocolo de formação do Imunoensaio Sanduíche

A Figura 4.5 mostra o esquema do ensaio experimental com os diferentes controles. Neste esquema é proposto um ensaio sanduíche usando a plataforma de captura e a sonda SERS ambas foram funcionalizadas com o anti-p17, formando um sanduíche com o peptídeo p17-1 sequência *LSGGELDRWEKIRLPGG*. Neste caso, 200 µL do peptídeo (0.1 µM) em solução tampão fosfato PBS foram pipetados diretamente na plataforma de captura. Na Figura 4.5B mostra o primeiro controle negativo, 200 µL do peptídeo (0,1 µM) em solução tampão (PBS) foram pipetados diretamente na plataforma de captura, mas com a ausência do anti-p17. A Figura 4.5C mostra um outro controle negativo, de maneira similar o procedimento descrito em 4.5A *etapa(ii*), porém com a ausência do anti-p17 na sonda SERS. Finalmente, a Figura 4.5D representa um controle negativo, neste caso foram adicionados na plataforma de captura e na sonda SERS o anti-p17, mas 200 µL da proteína BSA (0,1 µM) em solução tampão PBS ao invés do peptídeo p17-1, formando o sanduíche com a proteína BSA. Em todas as plataformas de captura da Figura 4.5 *etapas (ii)*, as amostras foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. Após o procedimento de incubação, as amostras foram lavadas (água ultrapura) várias vezes. Em todos os experimentos Figura 4.5 *etapas (iii),* foram adicionados 200 µL da sonda SERS e o tempo de incubação foi de 3 horas. Todas as amostras foram lavadas várias vezes com água ultrapura e secas com nitrogênio antes dos experimentos SERS.

Importante observar que foram representados na Figura 4.5 somente o procedimento para a formação do ensaio ***sanduíche*** com a plataforma de captura-MUA, mas foram realizados o mesmo procedimento para o ensaio sanduíche-PEG.


(A)
peptídeo p17-1
Sonda
SERS
Au
(i)
Au
(ii)
Au
(iii)


(B)
peptídeop17-1
Sonda
SERS
Au
(i)
Au
(ii)
Au
(iii)


C
peptídeo p17-1
Sonda
SERS
Au
(i)
Au
(ii)
Au
(iii)

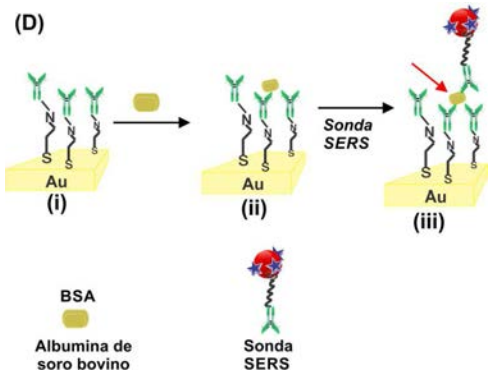


Figura 4.5. Representação esquemática de preparação do ensaio imunológico, ensaio sanduiche. (A). Ensaio sanduíche completo, experimental (B) plataforma de captura MUA sem o anti-p17, controle (i) (C) SERS probes sem o anti-p17, controle (ii) e, (D) Ensaio sanduiche utilizando o analito (BSA), controle (iii). Todas as etapas (A, B, C e D) no processo (i), descrevem a plataforma de captura MUA. As setas indicam as diferenças entre os controles. Figuras elaboradas pelo autor.

4.7 Medidas SERS

Os espectros SERS foram obtidos usando um microRaman Renishaw In Via microscope. Um laser de Hélio-Neônio (632.3 nm) foi usado para excitação das amostras. A resolução espacial do mapeamento SERS foi de 1 µm x 1 µm, com um tempo de exposição de 10 segundos. As medidas foram realizadas utilizando o modo Streamline PlusRaman imaging (Renishaw Inc., Hoffman Estates, IL), isso reduz o sinal ruído e os mapeamentos são realizados mais rapidamente. A área obtida foi de ~100 µm x 100 µm, resultando em aproximadamente 13000 espectros para cada ensaio *sanduíche.* As medidas SERS, correspondem a banda de maior de intensidade do NBA em 595 cm^{-1}. Considerando a absorção do NBA há contribuição, de ambos, Raman ressonante e SERS. Essas situações de duplo aumento da intensidade são descritas na literatura como SERS ressonante ou SER(R)S [150].

Um tratamento comum de erros em histogramas onde o número de contagens em cada bin é assumido levando em conta a distribuição de Poisson, no qual, correspondem $349x\sigma\sqrt[3]{N}$ onde, σ é o desvio padrão e N é a população, ou seja, o número de eventos [151].

Os testes de hipótese têm como base de rejeição ou não da hipótese baseados no p-valor. Para estes experimentos, os valores obtidos para p-valor têm como resultado zero para os controles e

para o experimental, pois os experimentos são grandes suficientes e tendem a se ajustar estatisticamente a uma Gausiana. Um teste estatístico chamado de teste *Cohen´s d* foi realizado, de modo que este teste não é baseado no p-valor, para comparar os resultados obtidos [152-153]. Todos os resultados foram tratados pelo *software Matlab*.

4.8 Medidas de PM-IRRAS (do inglês *Polarization modulation infrared reflection absorption* spectroscopy)

As medidas de PM-IRRAS foram realizadas usando um Equinox 55 (Bruker) equipado por um modulador fotoelástico (*PEM-90 with II/ZS50 ZnSe 50 kHz optical head, HINDS Instruments Inc*.) e um detector MCT IR, resfriado por N_2 liquído (Kolmar Technologies). Uma configuração de reflexão externa foi usada. A soma e a diferença dos interferogramas foram processadas pela transformada de Fourier para produzir a refletividade diferencial $\frac{\Delta R}{R} = (Rp - Rs)/(Rp + Rs)$ que é o sinal PM-IRRAS. O tempo de aquisição foi de 20 minutos para a espectro de diferença (diferença entre o feixe p-polarizado e s-polarizada) e 5 minutos para a soma espectro (soma dos feixes p e s-polarizados). A resolução foi de 2 cm^{-1}. Os espectros finais foram obtidos pela divisão da diferença e soma dos espectros.

4.9 Microscopia de força atômica (AFM)

As medidas de AFM scans foram obtidas em microscópio *Agilent 5500 SPM AC mode III*. O instrumento foi equipado com uma ponta de silício revestida com alumínio com frequência de ressonância 204-297 Khz e constante de Força 10-130 $N.m^{-1}$ Os scans obtidos da análise foram o modo de não contato. As imagens foram analisadas pelo *software Gwyddion*.

4.10 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Um microscópio Hitachi S-4800 foi usado para adquirir imagens com alta magnificação da superficie das amostras. Todas as imagens foram obtidas com voltagem de aceleração de 1 KV e magnificação de 50000x. Foram obtidas quinze imagens para cada ensaio em diferentes regiões. Eventuais diferenças das áreas obtidas foram registradas nas análises. Portanto, uma média foi realizada em todas as imagens obtidas.

5 Resultados e Discussão

5.1 Caracterização da plataforma SAM-MUA

O protocolo mais comum para a formação do SAM é imersão do substrato limpo em solução etanólica de tióis (1-10 mM) por aproximadamente 18-24 horas. Este procedimento foi utilizado, pois proporciona uma estrutura bem ordenada da SAM [154]. A Figura 5.1 mostra uma representação esquemática para a formação da SAM-MUA Neste trabalho de doutorado, foram usados substratos de vidro recobertos com ouro (100 nm) por eletrodeposição, *etapa (i)*, que foram limpos exaustivamente com solvente orgânico (metanol, etanol e iso-propanol) para remoção de impurezas e posteriormente os substratos foram secos com nitrogênio ultrapuro. Os substratos foram imersos em uma solução etanólica de MUA (10 mM) por 24 horas, *etapa (ii).* Monocamadas auto-montadas são formadas espontaneamente pela adsorção de um organotiol com afinidade especifíca do seu grupo calda com o substrato. A Figura 5.1, *etapa (iii*) mostra um esquema dos constituintes formados pela SAM (calda, espaçador e cabeça). Uma densa camada de organotiol pode ser obtido rapidamente a partir de uma solução milimolar, mas o processo de organização requer tempo para ordenar as moléculas e minimizar os defeitos da SAM. Existem inúmeros fatores que podem afetar a estrutura da SAM tais como, temperatura, concentração do organotiol, tempo de imersão e estrutura da cadeia do organotiol (tamanho do espaçador). [154-155]

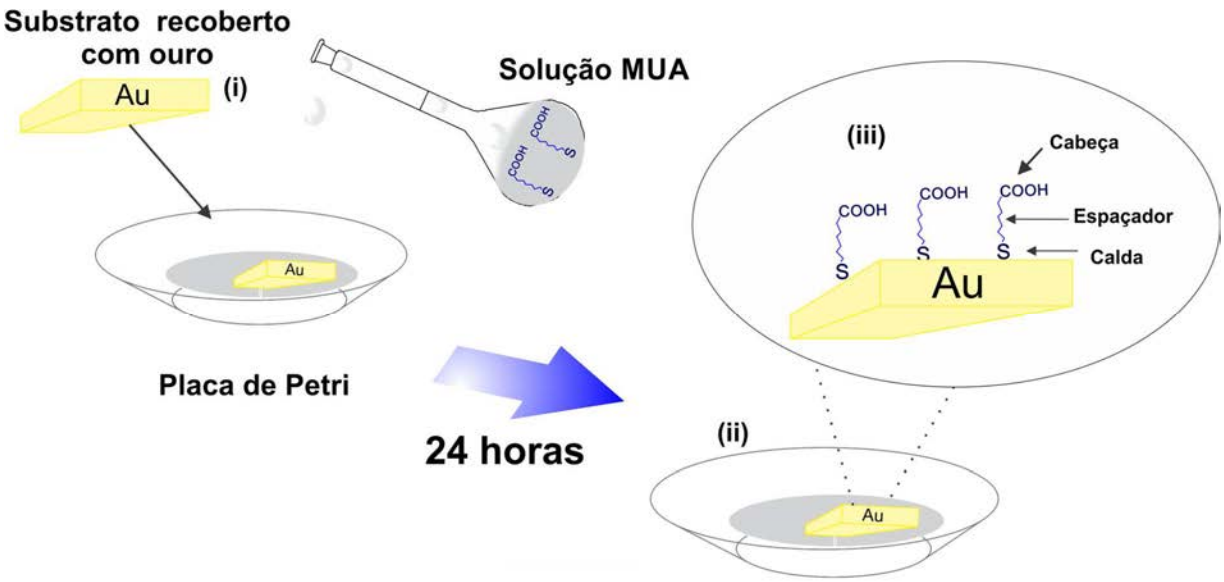


Figura 5.1 Representação esquemática para a formação da SAM com MUA. (i) substrato de vidro recoberto com ouro (100 nm), (ii) Mobilização com solução de MUA, (iii) Representação de uma SAM. Figura adaptada [137,156]

Um estudo de voltametria cíclica foi realizado para se obter informação sobre o grau de recobrimento da superfície. Foram realizados voltamogramas cíclicos da superfície de ouro e, posteriormente recoberto com a solução de MUA (SAM). Os voltamogramas (Figura 5.2) foram obtidos em solução tampão fosfato salino (PBS) pH 6,5 contendo 1,2 mmol.L^{-1} de solução $[Fe(CN)_6]^{3/4-}$ à 100 mV.s^{-1}.

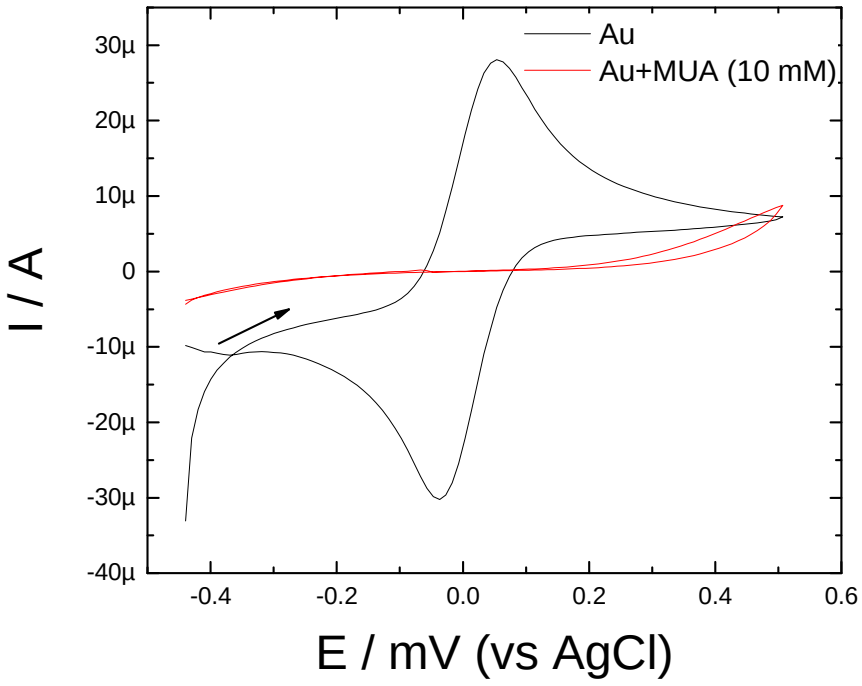


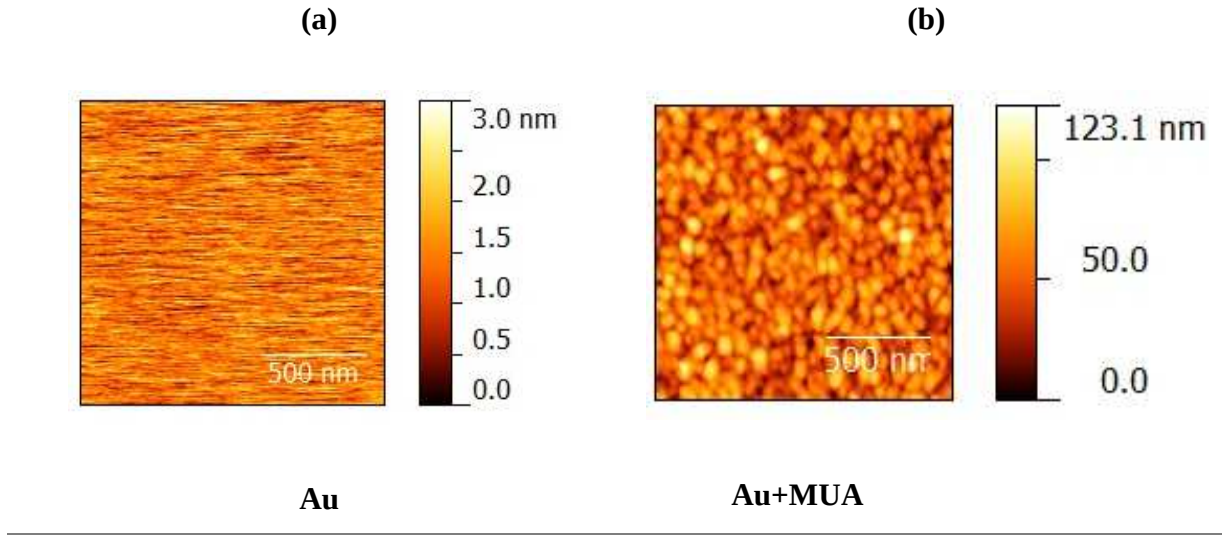
Figura 5.2 Voltamogramas ciclícos obtidos do substrato de ouro (-) e do substrato de ouro modificado com MUA formando a SAM (-) em uma solução 1,2 mM de [Fe(CN)6]3/4- em tampão fosfato 0,1M pH 6,5 at 100 mV.s-1

Observa-se pela Figura 5.2 o voltamograma cíclico quando o substrato de ouro modificado com MUA, onde ocorreu uma passivação da superfície eletródica, assim não foi possível observar uma definição dos picos anôdicos e catódicos. Isso ocorreu devido ao alto grau de recobrimento da superfície que dificulta a transferência de elétrons [157].

Mendes [157] mostrou em seu trabalho de doutoramento eletrodos de ouro modificados com diferentes organotióis (Cisteamina, Cisteína, MPA (ácido mercaptopropiônico), MBA (ácido mercaptobenzóico), ALP (ácido lipóico) e MUA), a fim de obter informações em relação ao grau de recobrimento da superfície modificada, bem como as irregularidades superficiais. A autora mostrou por voltametria ciclíca as diferentes modificações e calculou o grau de recobrimento das mesmas, não sendo possível obter o grau de recobrimento com MUA devido a ausência dos picos anôdicos e catódicos. Isto sugere que modificações com MUA com um tempo e concentração

adequados, promovem alto grau de recobrimento dificultando o processo de transferência de cargas.

A técnica de microscopia de força atômica (AFM) proporciona imagens diretas da estrutura incluindo defeitos do filme (substrato) ou do crescimento do filme [158]. As Figuras 5.3 (a) e (b) mostram as topografias da superfície do substrato de ouro e do substrato de ouro modificado com MUA (SAM). Foram observadas as rugosidades média *2,81 ± 0,16* nm e 13,28 ± 1,90 nm para a superfície recoberta com ouro e a monocamada com organotiol (MUA), respectivamente. O resultado mostrou o aumento do crescimento da monocamada quando imobilizadas com o organotiol. Na Figura 5.3(c) observa-se a linha de perfil da topografia correspondente as áreas topográficas das Figuras 5.3(a) e (b). Este resultado está de acordo com os experimentos de voltametria ciclíca que mostra um crescimento da superfície quando modificada com a monocamada.



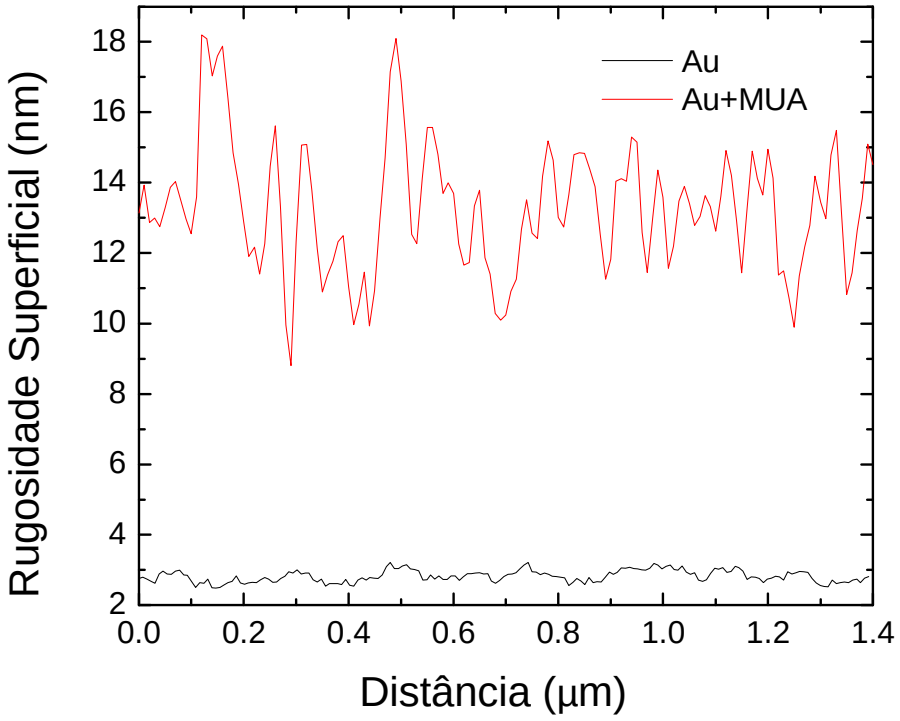


Figura 5.3 Imagens topográfica de AFM para o substrato de ouro e substrato de ouro modificado com MUA (a) e (b), respectivamente. (c) Perfil da rugosidade obtida em ((a) e (b)), onde observou-se a rugosidade média ((-) 2,81 ± 0.16) e (-)13,28 ± 1.90) nm, respectivamente.

A técnica de PM-IRRAS foi usada para monitorar a mobilização da superfície, assim como a organização da adsorção. Foram monitoradas as superfícies de ouro, SAM e as funcionalizações com (SAM-MUA, plataforma de captura-MUA e funcionalizada com o peptídeo p17-1, descritas

na seção experimental). A Figura 5.4 (A) apresenta o PEM (modulador fotoelástico) com centro em 3000 cm^{-1} enquanto a Figura 4 (B) mostra o PEM com centro em 1700 cm^{-1}. Observa-se na Figura 4(A) duas bandas bem características que aparecem na região U(C-H) em 2849 cm^{-1} e 2918 cm^{-1} que correspondem ao estiramento assimétrico e simétrico da cadeia CH_2 e CH_3, respectivamente [159]. A Tabela 5.1 mostra as frequências atribuídas para Figura 5.4 (B)

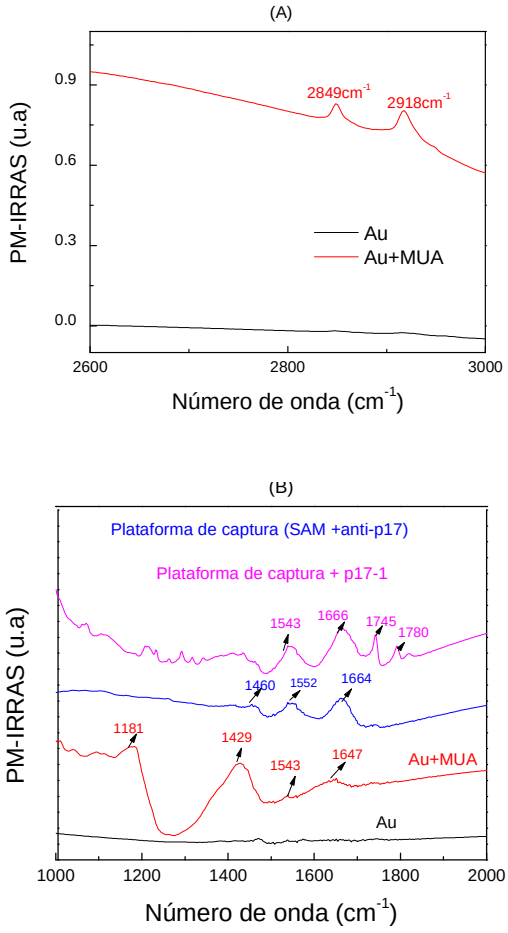


Figura 5.4 PM-IRRAS. (A) Modulador fotoelástico (PEM) em 3000 cm-1(B) PEM em 1700 cm^{-1}.

Tabela 5-1. Modo de atribuição da superfície de ouro modificada com MUA (SAM) e plataforma de captura e plataforma funcionalizada o peptídeo.

MUA Freq. (cm^{-1})	***Atribuição***
1429	Deformação (COH)
1543	Deformação (CH_2)
1647	Estiramento (C=O)
Anti-p17 e p17 Freq. (cm^{-1})	
1400-1700	Estiramento de amida I e Amida II [158]

5.2 Caracterização das Nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro (AuNPs) foram sintetizadas pelo método de Turkevich [149]. A reação do cloreto áurico com citrato de sódio, produziu suspensões de nanopartículas de ouro com uma coloração vermelha, Figura 4.1 (seção experimental). A coloração obtida foi associada à frequência de oscilação dos elétrons em resposta ao campo eletromagnético alternante da radiação incidente [161-163]. Os íons citrato participam do processo de redução do ouro e também ajudam a promover a estabilização das nanopartículas formadas [164]. Observa-se na Figura 5.5, o espectro de absorção com máximo em aproximadamente 520 nm.

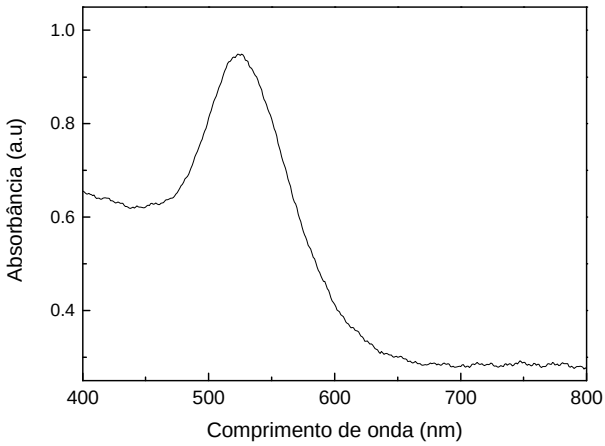


Figura 5.5. Espectro de absorção da suspensão aquosa de AuNPs

O micróscopio de transmissão de alta resolução (HR-TEM) foi utilizado para determinar o tamanho da AuNPs. As Figuras 5.6(a) e (b) exibem as micrografias das AuNPs e sua distribuição. A média da distribuição do tamanho foi de aproximadamente 16 nm.

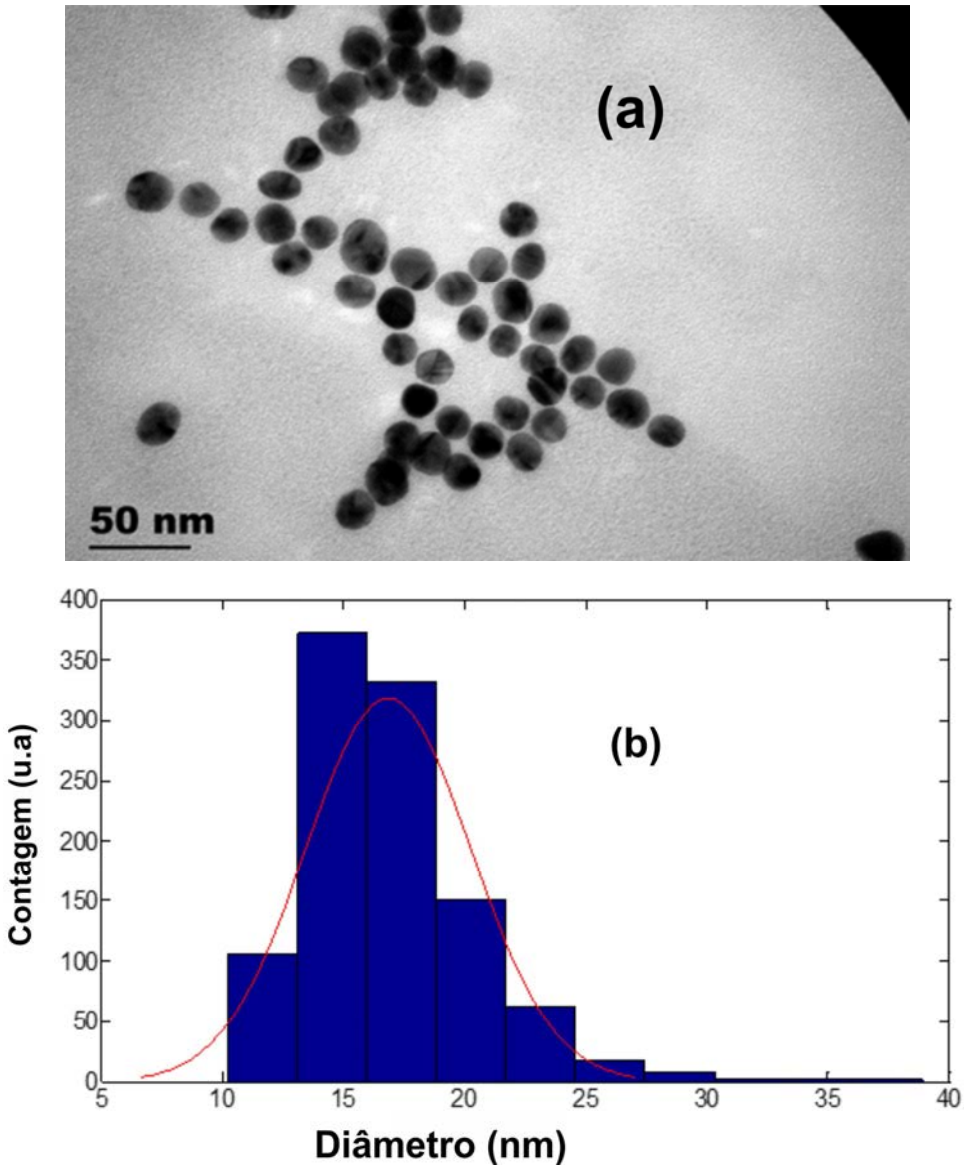


Figura 5.6. (a) Imagem de HR-TEM das AuNPs; (b) Distribuição do tamanho das AuNPs com diâmetro médio de 16 nm.

5.3 Características do Azul do Nilo A (NBA)

A Figura 5.7 exibe o espectro de absorção característico do Azul do Nilo A com máximo de absorção próximo em 600 nm.

O comprimento de onda utilizado do laser foi de 632,3 nm permitindo portanto a obtenção de espectros envolvendo o efeito Raman ressonante, conforme descrito em tópicos anteriores.

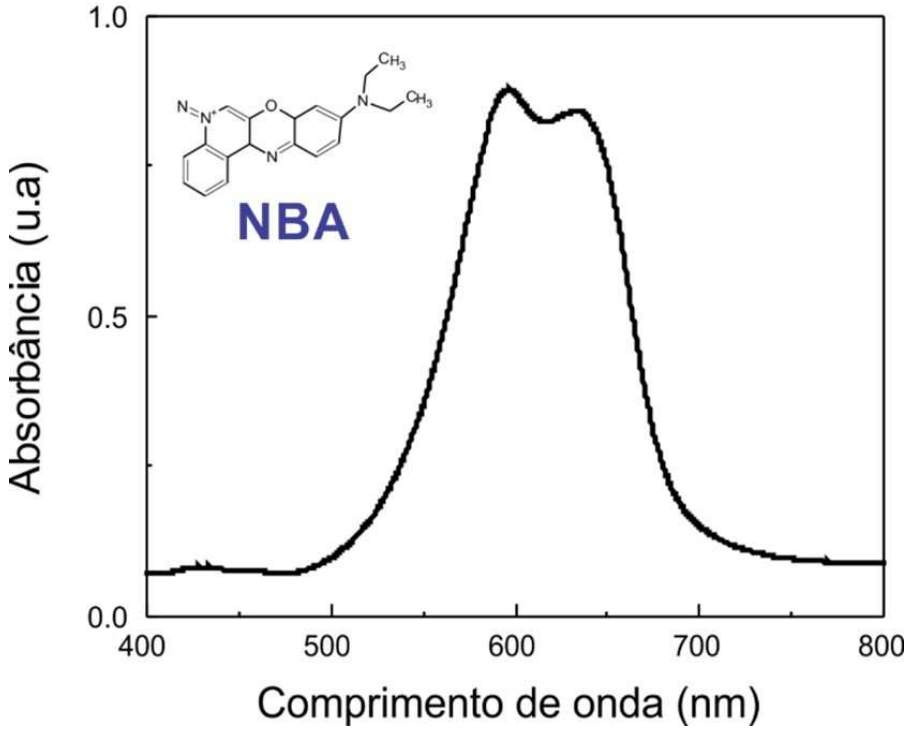


Figura 5.7 Espectro de absorção da solução aquosa do NBA.

5.4 Mapeamento SERS

A homogeneidade da superfície foi monitorada pelo mapeamento SERS. A Figura 5.8 exibe um esquema da área mapeada, onde foram obtidos espectros SERS ao passo de 1 µm x 1 µm, cobrindo uma área de aproximadamente 100 x 100 μm^2.

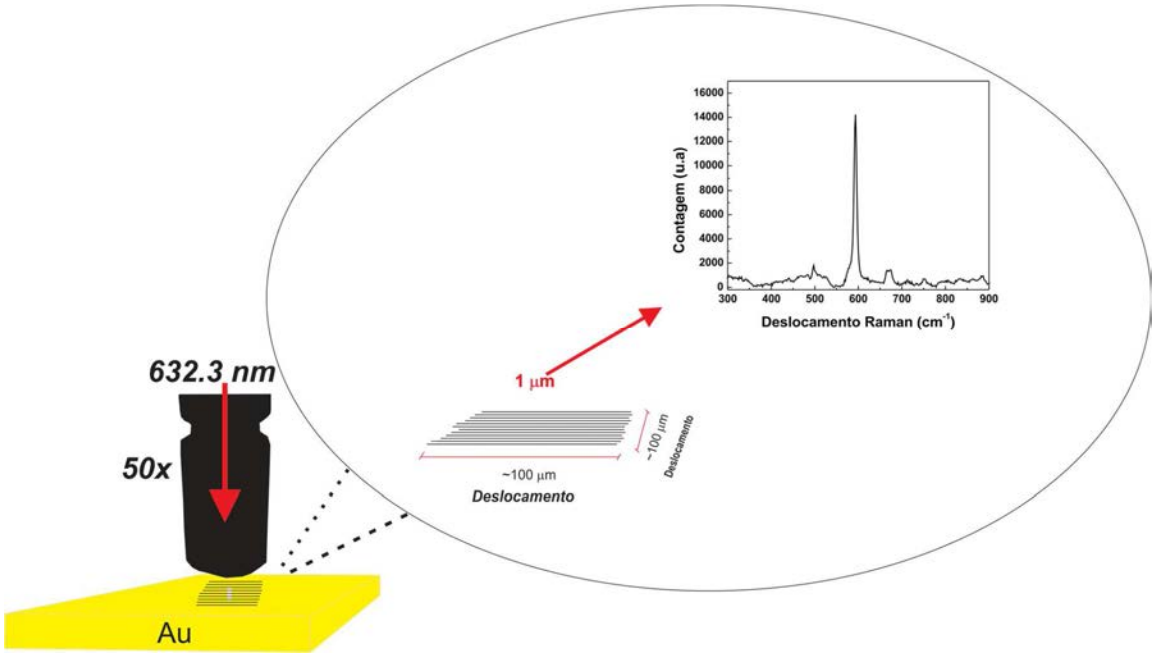


Figura 5.8 Representação esquemática da área mapeada. Trajetória percorrida pelo estágio do espectrômetro MicroRaman Renishaw In Via nos mapeamentos obtidos. Foram obtidos espectros SERS ao passo de 1 µm x 1 µm, cobrindo uma área de aproximadamente 100 x 100 µm2. Obtendo aproximadamente treze mil espectros. A Figura também mostra o espectro SERS característico do NBA. Figura elaborada pelo autor.

A funcionalização das sondas SERS propicia que as moléculas de analito (peptídeo p17-1) sejam distribuídas uniformemente sobre a área de substrato (plataforma de captura). A parte formada pela sonda SERS funcionalizada sobre um analito (peptídeo) e imobilizada sobre uma plataforma de captura é descrita como ensaio sanduíche. Uma área relativamente grande (100 x 100 μm^2*)* foi realizada para o mapeamento Raman, pois fornece uma maior confiabilidade estatística e reprodutibilidade na intensidade do sinal SERS, respondendo por flutuações de intensidade *spot-to-spot* ocorrendo tanto em superfícies com grande distribuição de partículas ou com baixa abundância de partículas (controles) [164]

Yang e colaboradores [164] relataram uma abordagem baseada em SERS para detecção qualitativa de biomoléculas. Um substrato SERS contendo nanopillars de silício decorados com ouro foram funcionalizados com aptâmeros para detecção sensível e específica de moléculas alvo. Os autores descreveram a vasopressina (TVP) modificada com TAMRA (5-carboxitetrametilrodamina). Essas moléculas quando modificadas puderam ser identificadas no

regime picomolar (1 pM a 1 nM) especificamente quando capturadas por aptâmeros sobre o substrato de SERS nanoestruturado.

A Figura 5.9(a) mostra o mapeamento SERS correspondente à plataforma de captura–MUA funcionalizado com o peptídeo p17-1, e ancorado com a sonda *SERS (*ensaio sanduíche completo, experimental*)*. A presença da região azul claro observada na Figura 5.9(a) corresponde a superfície adsorvida com o peptídeo p17-1 ancorado com sondas *SERS,* resultando em uma específica detecção do ensaio. Também observou-se pela Figura 5.9(b), uma alta intensidade SERS, no qual corresponde ao espectro característico do NBA que significa uma maior interação da sonda SERS com a plataforma de ensaio.

Por outro lado, a superfície com região em azul escuro significa ausência de sinal, Figuras 5.10, 11 e 12 (controles). No caso dos controles apresentarem uma região em azul claro, correspondem a uma ligação não específica. A ligação não específica leva a resultados falso-positivos e proporciona resultados incorretos em ensaios biológicos. Em virtude disso, não gera uma resposta precisa sobre a superfície de referência que está ligada ao nosso sistema de análise [162]. Neste trabalho, foi observada a interação da sonda SERS na superfície e apresentou o sinal característico do NBA, porém em menor intensidade quando comparado com o ensaio *sanduíche* completo. No entanto, a Figura 5.10 (controle (i)) observou-se uma intensidade maior em relação aos outros controles (Figuras 5.11 e 5.12) isso ocorreu devido a maior interação do grupo COOH (MUA) com o peptídeo (grupo NH_2), resultando assim a um sinal SERS elevado, embora com menor intensidade quando comparado com *o ensaio sanduíche* completo.

Lee e colaboradores [165] desenvolveram um marcador de câncer altamente reprodutível usando mapeamento SERS. Os autores desenvolveram moléculas sonda Raman ancoradas com nanoesferas, que foram funcionalizadas com anticorpos e, imobilizadas em um antígeno especifico. Foram mapeadas três áreas cada uma contendo 12 x 9 pixels, e utilizado uma ampla faixa de concentração ($0\text{-}10^{-4}$ g/ mL) do antígeno. O ensaio SERS exibiu boa correlação entre a concentração e a intensidade e o limite de detecção foi determinado 0.1 pg/mL. Esse resultado foi superior em 3 ordens de magnitude quando comparado com o método ELISA convencional.

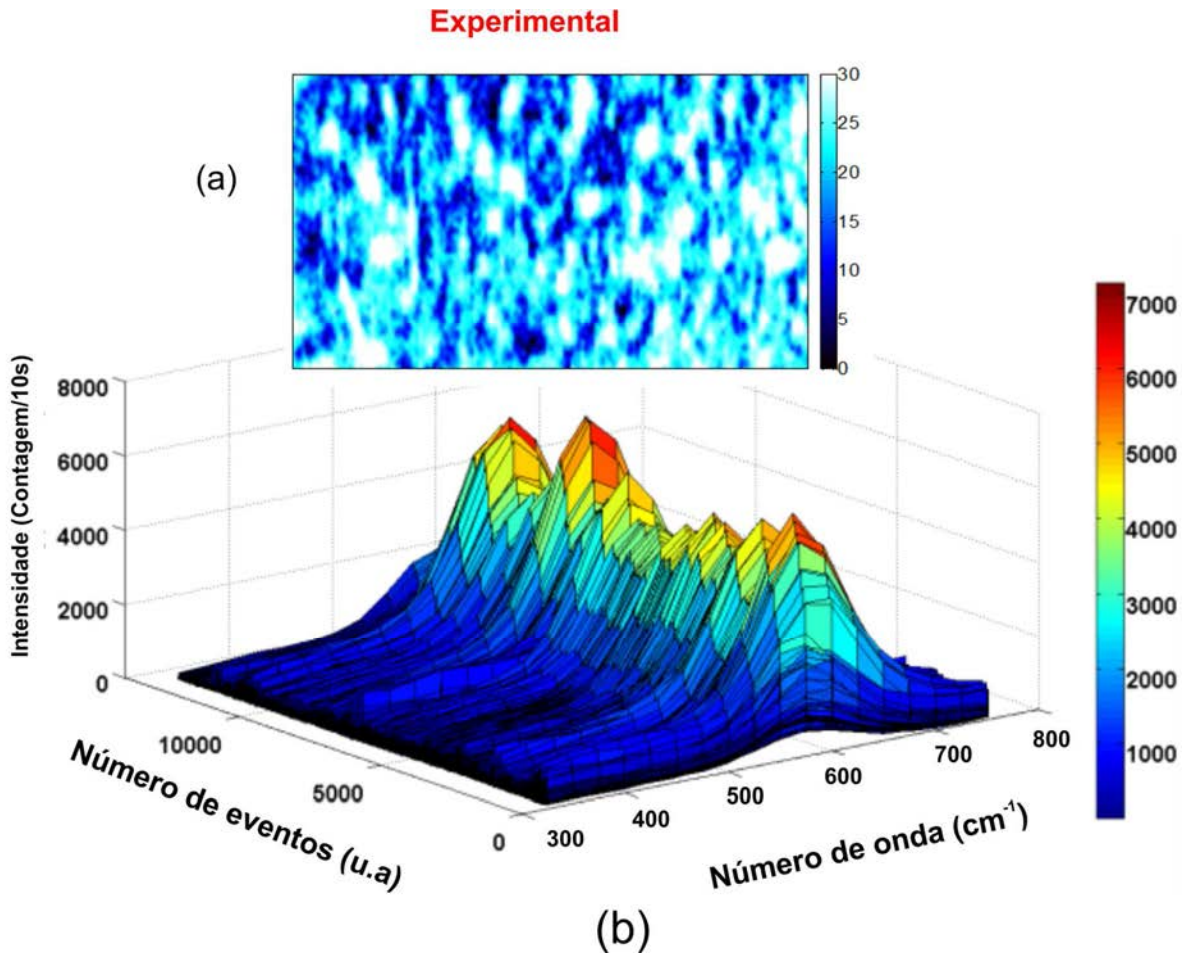


Figura 5.9. (a)Mapeamento SERS do teste sanduíche completo. Cada região em azul claro corresponde o máximo de intensidade SERS. (b) Espectro SERS característico do NBA correspondente a área mapeada com máxima intensidade do sinal em 595 cm-1 Observou-se uma alta intensidade exibida também pela grande quantidade de região em azul claro (mapeamento SERS).

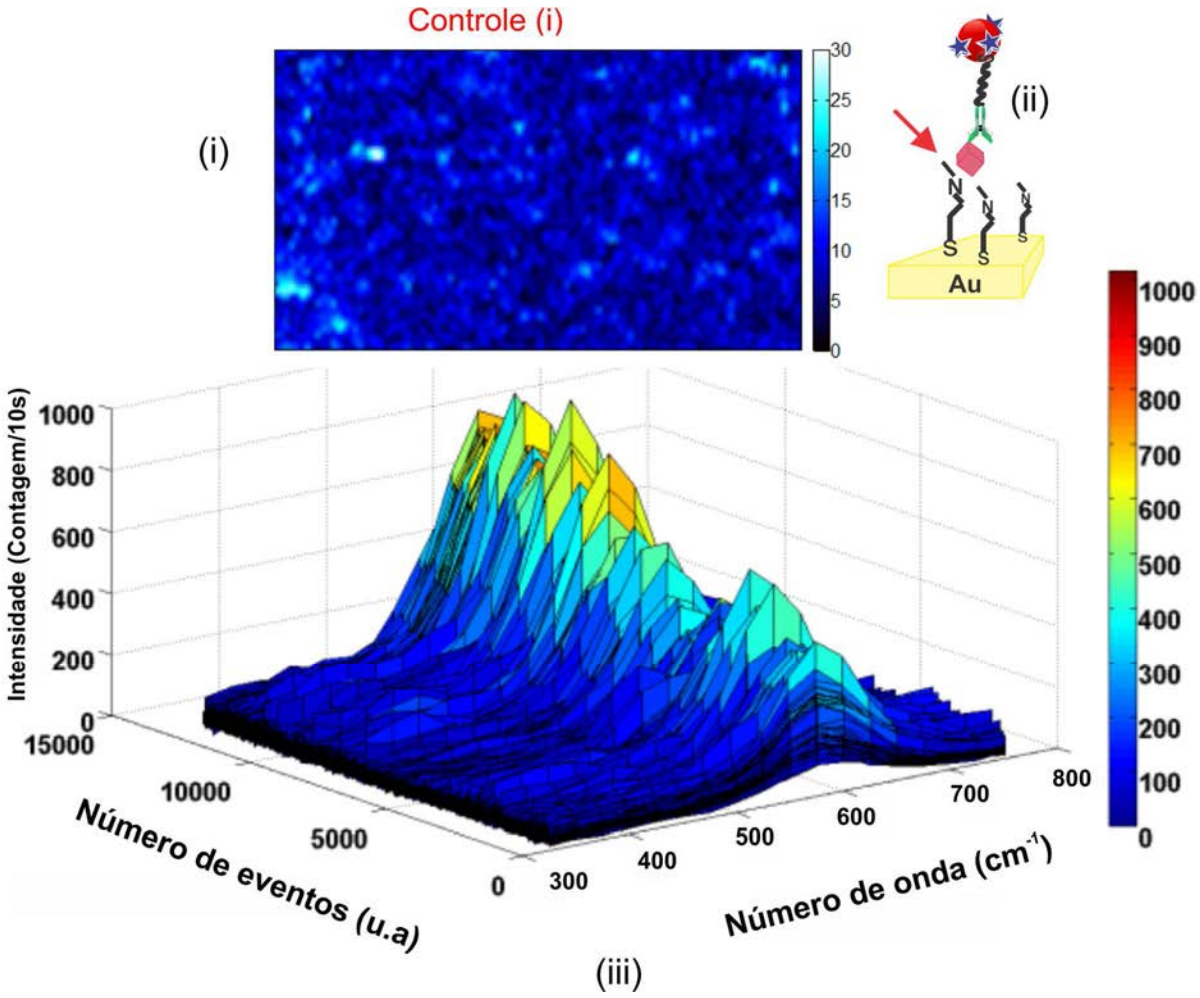


Figura 5.10 (i) Mapeamento SERS do controle, a área que representa a região em azul escuro apresenta ausência de sinal. Regiões em azul claro correspondem a uma ligação não especifica. (ii)Representação esquemática do controle mostrando a ausência de um anticorpo na plataforma de ensaio. (iii)Espectro SERS característico do NBA correspondente a área mapeada com máxima intensidade do sinal em 595 cm-1. O espectro exibe uma menor intensidade SERS mostrada também pela quantidade menor de região em azul claro (mapeamento). Observou-se também uma menor intensidade SERS quando comparado com o experimental.

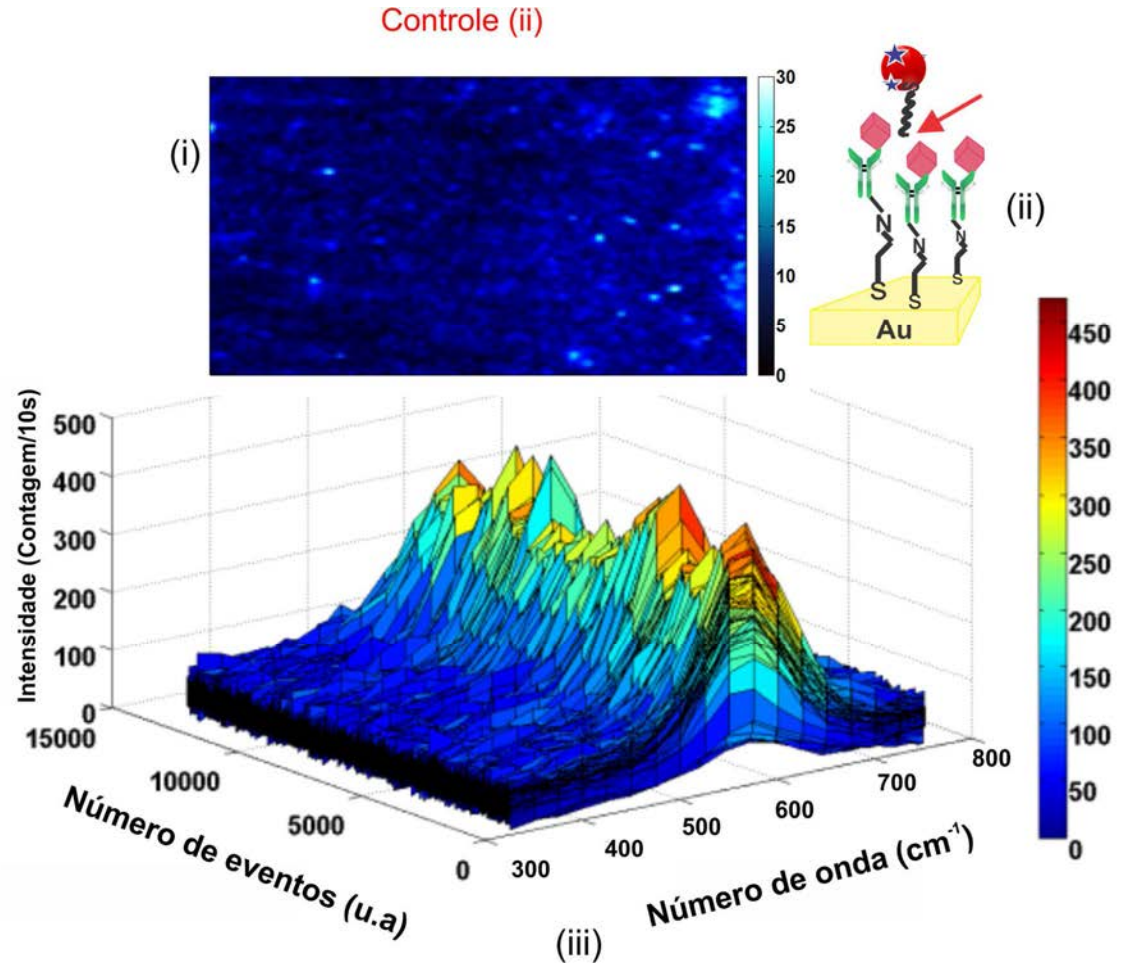


Figura 5.11 (i) Mapeamento SERS do controle, a área em azul escuro representa ausência de sinal e a presença de regiões em azul claro, corresponde a uma ligação não especifica. (ii)Representação esquemática do controle mostrando a ausência de um anticorpo na sonda SERS (iii)Espectro SERS característico do NBA correspondente a área mapeada com máxima intensidade do sinal em 595 cm-1. O espectro SERS exibiu uma menor intensidade, também mostrado pela maior área azul escuro no mapeamento.

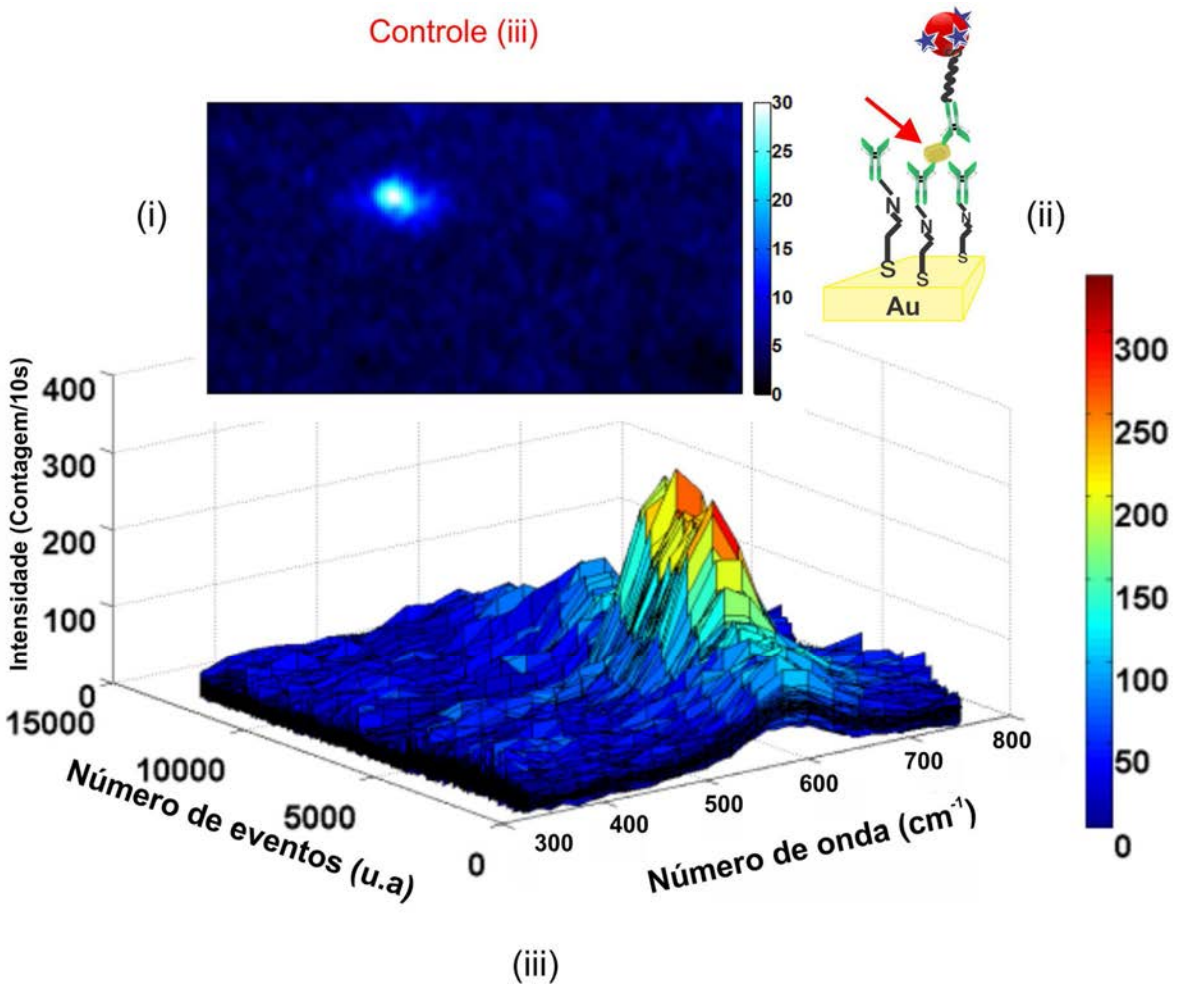


Figura 5.12 (i) Mapeamento SERS do controle, a área em azul escuro representa ausência de sinal e a presença de regiões em azul claro, corresponde a uma ligação não especifica. (ii)Representação esquemática do controle mostrando a presença de um diferente analito (Albumina de soro bovino, BSA), (iii)Espectro SERS característico do NBA correspondente a área mapeada com máxima intensidade do sinal em 595 cm-1. O espectro SERS mostrou a um pequeno aumento de intensidade que compreende a região em azul claro.

Para confirmação destes resultados foram obtidas imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As imagens nos permitem a visualização da distribuição de nanopartículas (sonda SERS) na área mapeada (~100 x 100 μm^2). As Figuras 5.13 (experimental) e 5.14 (controles) apresentam estes resultados. Uma média e desvio padrão das AuNPs foram realizadas a partir destas imagens (quinze imagens MEV), a Figura 5.15 mostra cada ensaio, o que corresponde o número de nanopartículas de ouro por área NPs/μm^{-2}.

Na Figura 5.15 observou-se uma grande quantidade de nanopartículas (sonda SERS) adsorvidas quando analisado o ensaio *sanduíche* completo-experimental comparado com os controles. Isso ocorreu devido a aproximação das AuNPs formando aglomerados. Quando as nanopartículas de ouro são separadas por poucos nanômetros (*hot-spot*) há um acoplamento entre as exitações eletrônicas e as nanopartículas produzem sinais com maiores intensidades [166].

Shaw e Brolo [134] investigaram várias superfícies biotinilados que tinham sido expostas a nanopartículas com PEG (concebidos para o mapeamento SERS de amostras biológicas) funcionalizados com estreptavidina (definido como sonda SERS). As superfícies foram mapeadas com um microscópio eletrônico de varredura e com um microscópio Raman. Distribuições estatísticas dos clusters com sondas SERS e intensidades SERS mapeados nas superfícies foram então apresentados. Verificou-se que houve uma relação polinomial entre intensidade SERS e tamanho do cluster.

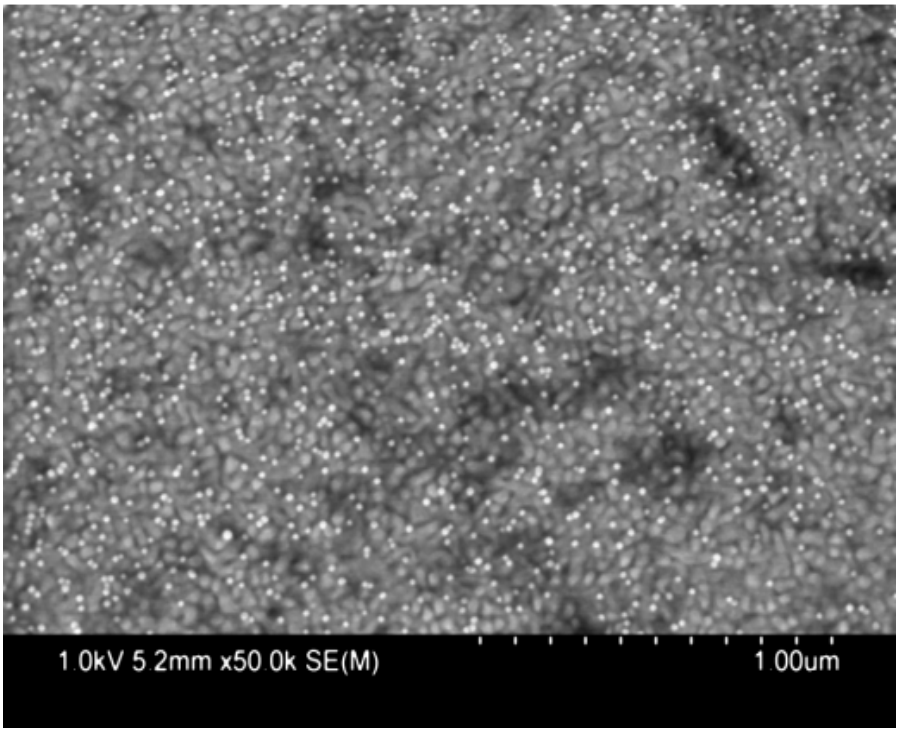


Figura 5.13 Imagem MEV correspondente ao ensaio sanduiche completo, experimental. Os pontos claros significam a presença de AuNPs (sonda SERS) nesta superfície. Observou-se uma grande quantidade de nanopartículas adsorvidas nesta superfície e separadas por poucos nanômetros (*hot-spot*), o que pressupõe-se que há uma alta intensidade SERS quando o laser incidente interage com essas nanopartículas.

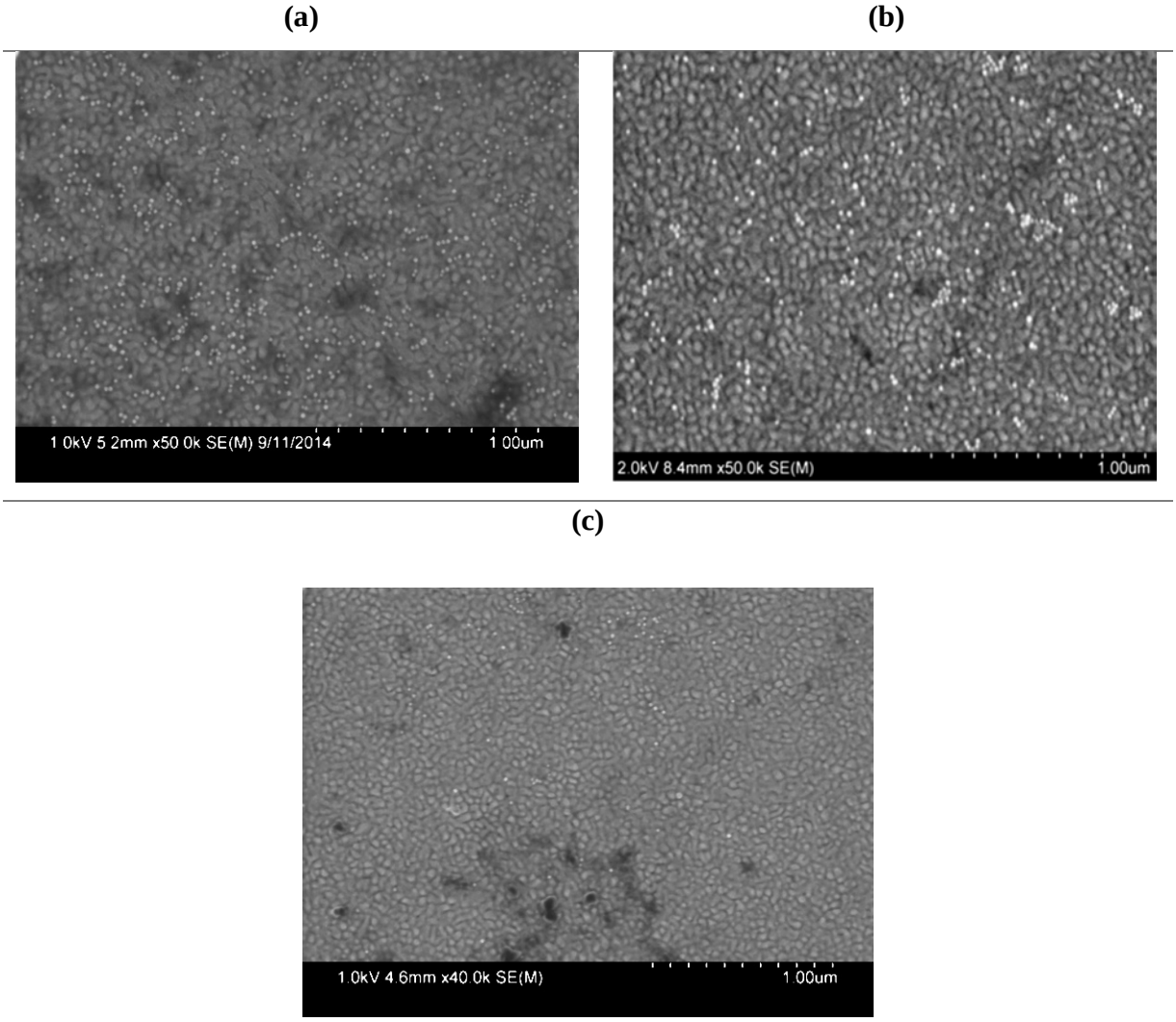


Figura 5.14 Imagens MEV das NPs adsorvidas nos controles (a), (b) e (c), correspondentes aos controles (i), (ii) e (iii), respectivamente. Observou-se, uma diminuição das nanopartículas adsorvidas que consequentemente provoca uma diminuição do sinal SERS.

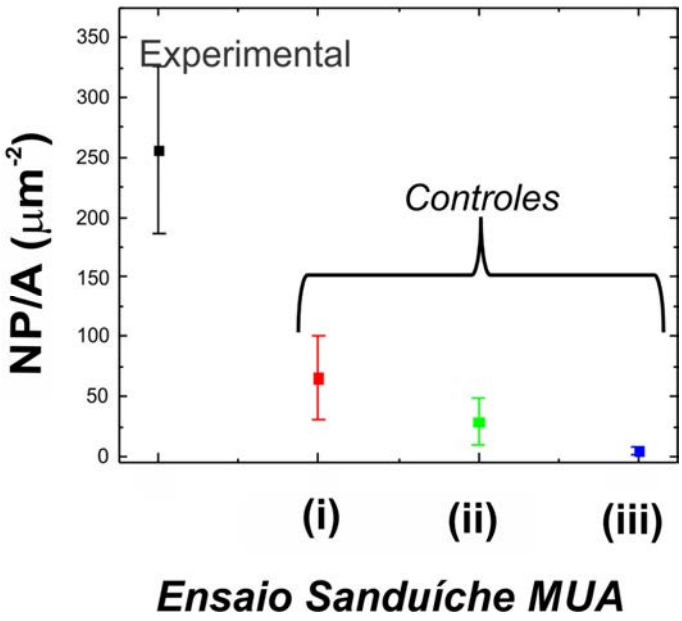


Figura 5.15. Número de nanopartículas adsorvidas por unidade de área das quinze imagens obtidas do MEV (média e desvio padrão) para cada ensaio.

5.5 Tratamento estatístico

A sensiblidade do teste estatístico depende do tamanho da amostra. Para amostras grandes mais precisos os padrões populacionais, ou seja, os valores tendem a ajustar a uma distribuição estatística normal quando realizados estudos com amostras grandes, além disso, apresentam alta sensiblidade. Por outro lado, em amostras pequenas gera uma incerteza considerável [167].

Para confirmação e entendimento da distribuição da área mapeada foram determinados em histogramas, a intensidade do sinal SERS. A Figura 5.16 (**a)** mostra o histograma da distribuição estatística da intensidade SERS (~13000 espectros obtidos em um experimento). O histograma da Figura 5.16 **(a)** reflete em um log normal da distribuição distorcida para maiores valores de intensidade a um número relativamente pequeno de eventos (cada evento corresponde a 1 μm^2 da região da sonda SERS pelo laser). Este resultado é consistente devido as regiões que correspondem à presença de *hot-spot* resultando assim em um forte aumento da intensidade SERS.

Por outro lado, nos histogramas dos controles, Figuras 5.17 e 5.18(a) ocorre eventos positivos (característico do sinal da sonda SERS). Porém, estas distribuições de intensidade são menores quando comparadas com a Figura 5.16(a). Isto está correlacionado a um número menor da sonda SERS adsorvida.

Além da distribuição estatística da intensidade, foram realizados testes em relação a média e o desvio padrão [153] do experimental em relação aos controles (Figuras 5.18 e 19 **(b)**). Este teste mostra o quanto os controles estão contribuindo para o experimental. Normalmente, chamado de teste de *Cohen´s d* dado pela equação 5.1;

$$d = \frac{\bar{x}_{\exp} - \bar{x}_{Control}}{SD^*} \tag{5.1}$$

Onde, $\bar{x}_{\text{exp}}$ e $\bar{x}_{control}$ são expressados a média do experimental e o do controle, respectivamente. E. SD^* é o desvio padrão do experimental e do controle, representado pela equação 5.2;

$$SD^* = \frac{SD_{\text{exp}} + SD_{Control}}{2} \tag{5.2}$$

O teste de *Cohen´s d* foi classificado como pequeno (d < 0,2), médio (0,2 > d ≤ 0,5) e grande deslocamento (d ≥ 0.5) [153]. Estas designações de pequena, média e grande não levam em conta outras variáveis, mas fornecem uma estimativa das populações. Entre dois grupos significa a dimensão do efeito.

Neste trabalho de doutorado foram calculados os valores de *Cohen´s d* a partir da média e do desvio padrão do experimental para cada um dos controles (como se prevê a partir da definição). Os insets das Figuras 5.16, 5.17 e 5.18(b) mostram os valores obtidos. Foi observado a partir deste teste, que houve pouca influência dos controles em relação ao experimental. Isto decorreu devido a presença de poucas nanopartículas da sonda SERS adsorvidas, contribuindo para o baixo sinal SERS dos controles, como foi observado anteriormente nos mapeamentos SERS e pelas microscopias MEV. Observa-se ainda, um menor valor de *Cohen´s d* do controle (i) comparado com os demais controles. Isso ocorreu devido à presença do grupo NH_2 do peptídeo p17-1 interagindo prontamente com os grupos carboxílicos do MUA (SAM). Porém, este teste de *Cohen´s d* possui valor de deslocamento grande o que indica pouca influência do controle.

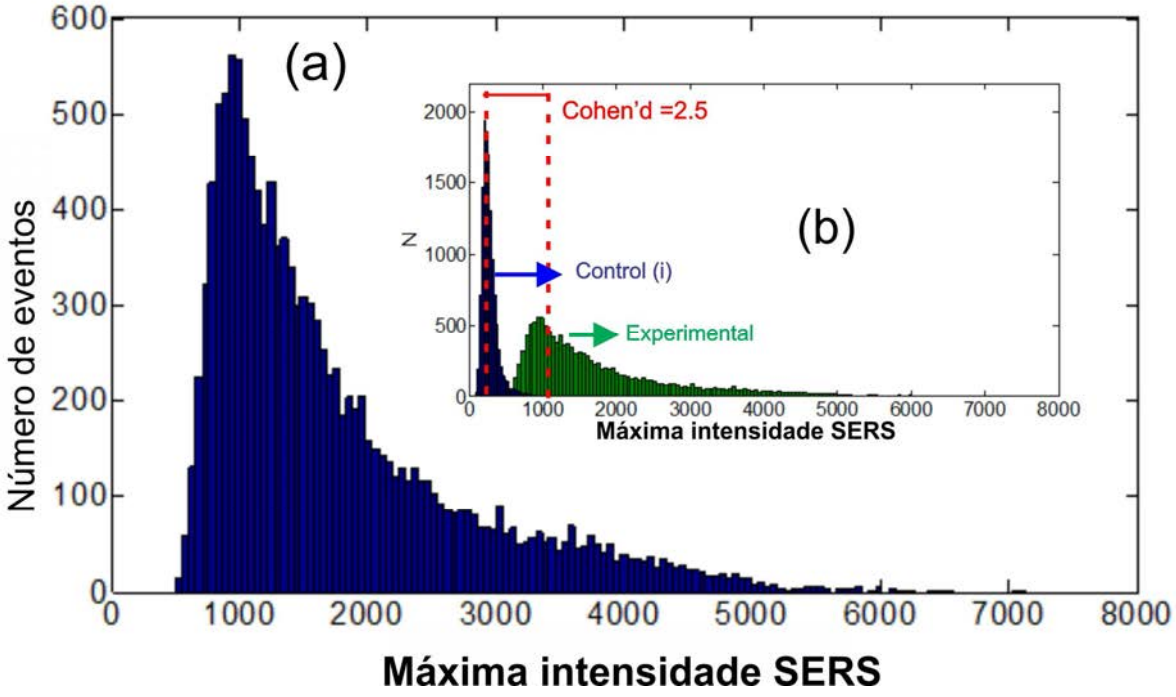


Figura 5.16 (a) Distribuição da máxima intensidade SERS para ensaio sanduiche, experimental. (b) Inset da distribuição da máxima intensidade entre o experimental e o controle (i). O valor de Cohen´s d mostra o deslocamente entre eles. O tamanho do Bin corresponde à $3{,}49\ \sigma\ x\sqrt[3]{N}$.

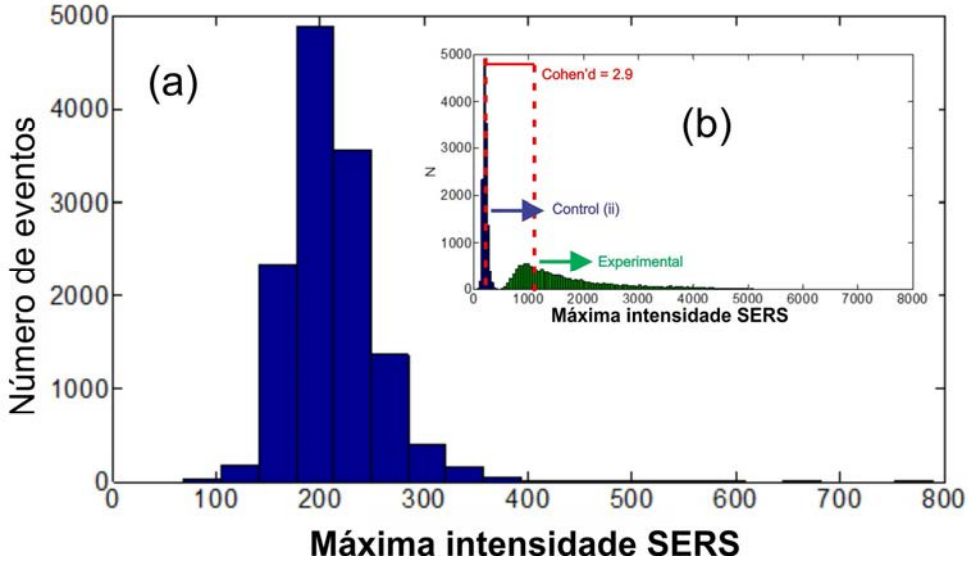


Figura 5.17 (a) Distribuição da máxima intensidade SERS para o controle (ii) (b) Inset da distribuição da máxima intensidade entre o experimental e o controle (ii) O valor de Cohen´s d mostra o deslocamente entre eles. O tamanho do Bin corresponde à 3,49 σ x$\sqrt[3]{N}$.

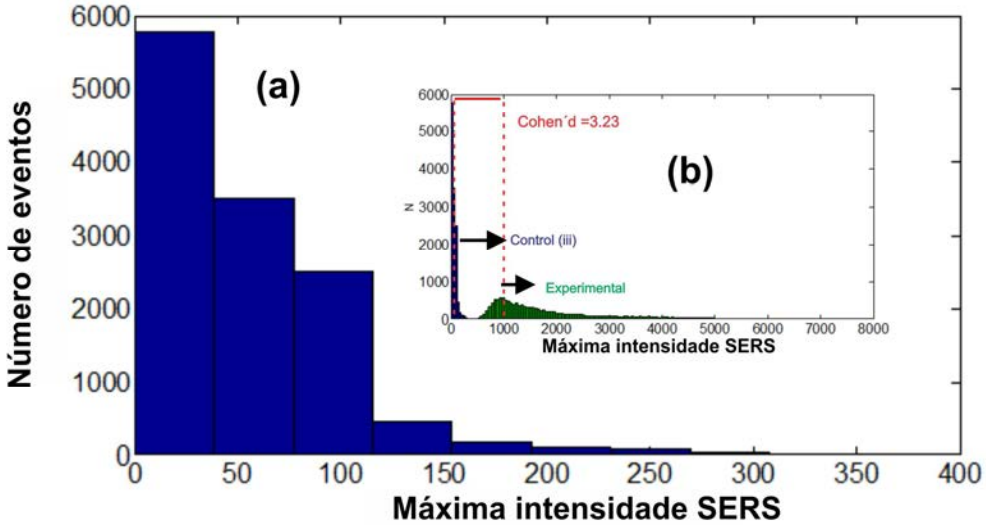


Figura 5.18 (a) Distribuição da máxima intensidade SERS para o controle (iii) (b) Inset da distribuição da máxima intensidade entre o experimental e o controle (iii.) O valor de Cohen´d mostra o deslocamente entre eles. O tamanho do Bin corresponde à 3,49 σ x$\sqrt[3]{N}$.

Através dos resultados obtidos dos mapeamentos SERS e MEV, podemos notar uma maior quantidade de nanopartículas na superfície provenientes das sondas SERS resultando assim um sinal mais intenso para *o ensaio sanduíche* experimental quando comparado com os controles. Observou -se também esse comportamento pelo log normal da distribuição para maiores valores de intensidade para o ensaio experimental. A partir do valor do teste *Cohen´s d* foram observados grandes deslocamentos do experimental em relação aos controles mostrando assim pouca influência dos mesmos.

5.6 Plataforma de ensaio usando PEG.

Como já mencionado, uma ligação não específica prejudica os resultados obtidos proporcionando resultados falso-positivos e incorretos em ensaios biológicos. Com o intuito de redução da ligação não especifica, as plataformas de ensaio foram obtidas utilizando PEG (descritos anteriormente na seção experimental 4.3(ii)).

No capítulo 3, foi descrito que o PEG impede a adsorção de proteínas na superfície, pois pelo efeito de repulsão estérica o polímero impede a proteína de atingir a superfície do substrato para adsorver [168].

A repulsão estérica foi proposta primeiramente por De Gennes [169] usando cálculos teóricos, e mais tarde melhorada por Szleifer [170]. Ambos os autores atribuíram que a repulsão estérica é associada à compressão da cadeia quando a proteína se aproxima da superfície.

O efeito de repulsão estérica evita a adsorção de proteína sobre as cadeias de PEG ligadas a uma superfície e, está relacionada com a energia livre positiva associado à compressão, ou seja, a restrição da liberdade conformacional

Jeon e colaboradores [171] consideram o equilíbrio entre a repulsão estérica, atração de Van der Waals e interação hidrófobica entre a proteína em solução e a superfície de PEG. Eles descobriram que a força resultante determina que a adsorção de superfície do PEG apresentado é dependente da espessura das camadas imobilizadas. Devido à solvatação e a entropia conformacional da cadeia do PEG, elas entram em contato com a proteína atingindo a interface por difusão e compressão da superfície imobilizada com o PEG.

Neste trabalho, foram imobilizados na superfície de ouro uma mistura de PEG (SH-PEG-COOH/SH-PEG-CH_3) por duas horas, como mostrado na seção 4.3(ii). Nesta plataforma de captura–PEG não foram realizadas medidas de caracterização da superfície do SAM-PEG (AFM e voltametria).

Conforme mencionado na seção 5.3, foram mapeadas regiões semelhantes aos experimentos anteriores (ensaio sanduíche MUA). A Figura 5.8 mostra uma representação esquemática da área mapeada, para a qual foram os espectros SERS ao passo de 1µm x 1µm, cobrindo uma área de aproximadamente 100 x 100 μm^2 obtendo ~13000 espectros.

A redução de ligação não especifica é uma condição desejada para aplicações em biossensores, embora seja inevitável não haver qualquer tipo de sinal interferindo nas análises, no qual se busca uma máxima de redução quando comparando resultados do experimental em relação aos controles.

Munoz e colaboradores [172] descreveram um chip biossensor usando poli (etileno glicol) (PEG) como uma alternativa aos chips biossensores à base de dextrano. Para o estudo de interações foram realizados em proteína-heparina. Os autores observaram que quando as superfícies eram imobilizadas com PEG apresentavam uma redução da ligação não especifica.

A Figura 5.19 apresenta os espectros da intensidade SERS (~13000) para o ensaio *sanduíche* experimental-PEG e com sua respectiva imagem de microscopia de varredura. O espectro mostra o comportamento da intensidade SERS com o número de eventos em relação à banda de intensidade máximo do NBA. Notou -se ainda uma maior intensidade para cada evento o que significa que uma grande quantidade de sonda SERS estão adsorvidas na superfície. Isso é comprovado visualizando o mapeamento MEV que mostra a quantidade de nanopartículas que estão distribuidas nesta área. As imagens para cada ensaio correspondem ao número de nanopartículas de ouro por área NP/A μm^{-2}. Notou-se também pelos controles (Figura 5.20) o comportamento da intensidade SERS com o número de eventos, e se observa que os controles tiveram praticamente a mesma intensidade (400 Contagens/10s), no entanto, para uma redução da ligação não especifica os valores da máxima intensidade deveriam estar abaixo de 100 Contagens/10s, se comparado com a máxima intensidade obtida no ensaio sanduíche-MUA.

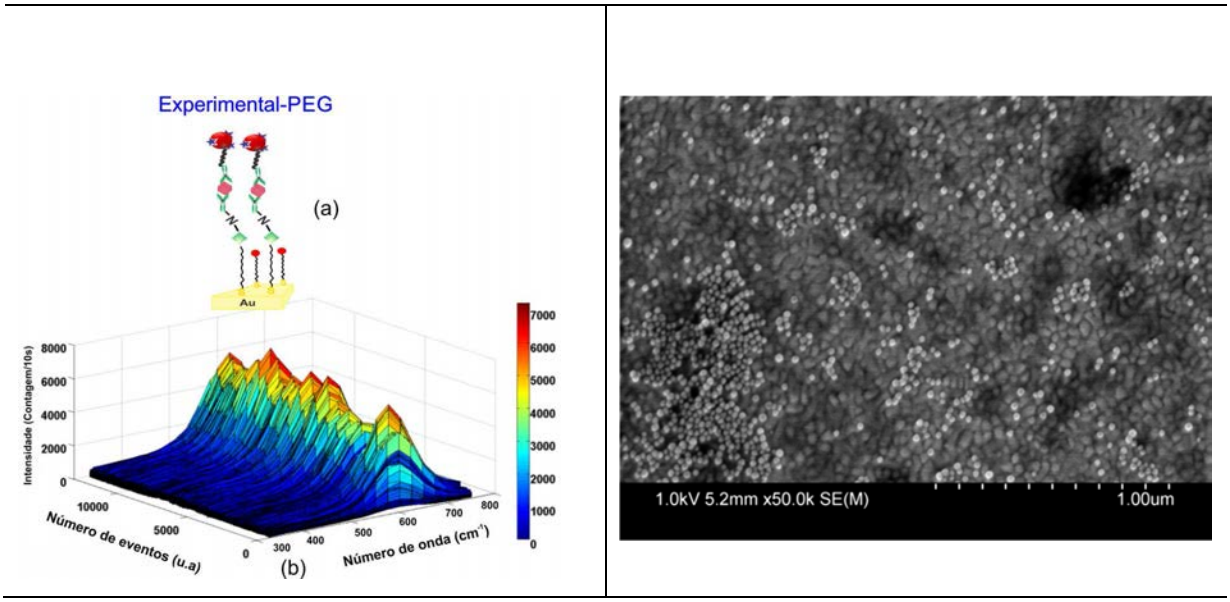
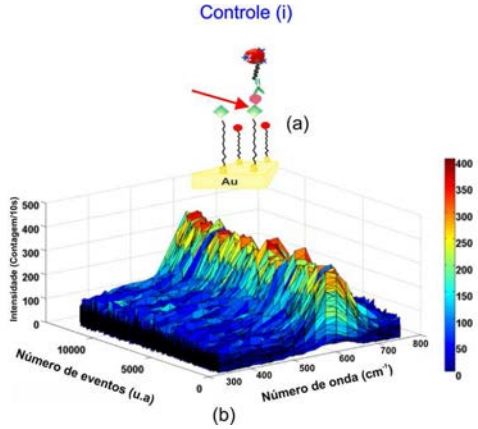
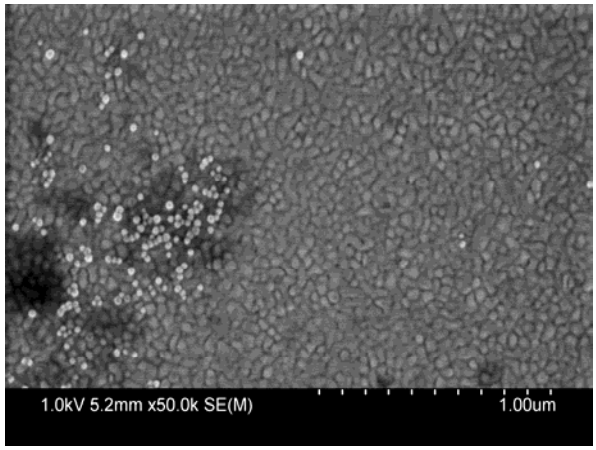
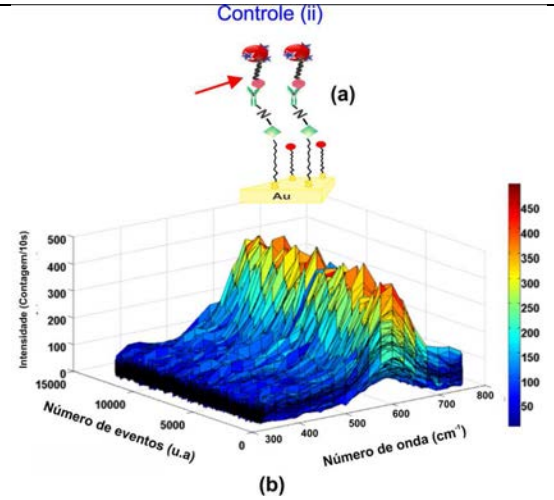
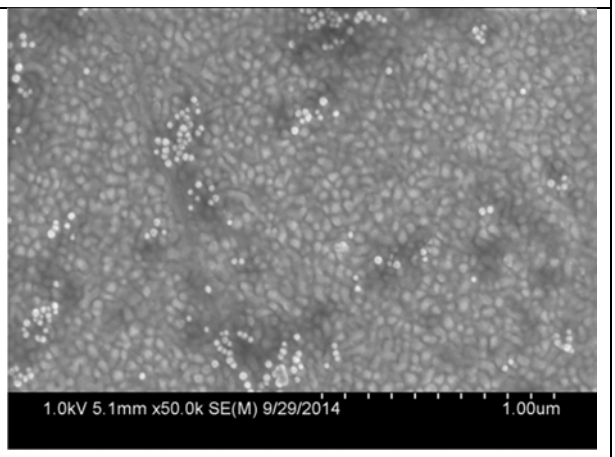


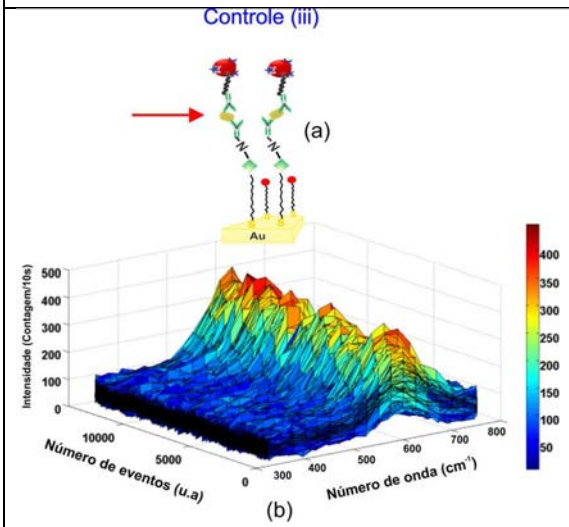
Figura 5.19 (a) Esquema representativo do ensaio Sanduíche completo usando a plataforma de captura-PEG (b) Espectro da intensidade SERS em relação ao número de eventos. (ii) Imagem de MEV correspondente a superfície do gráfico b.


Controle (i)
(a)
Au
Intensidade (Contagem/10s)
Número de eventos (u.a)
Número de onda (cm-1)
(b)


1.0kV 5.2mm x50.0k SE(M)
1.00um


Controle (ii)
(a)
Au
Intensidade (Contagem/10s)
Número de eventos (u.a)
Número de onda (cm-1)
(b)


1.0kV 5.1mm x50.0k SE(M) 9/29/2014
1.00um


Controle (iii)
(a)
Au
Intensidade (Contagem/10s)
Número de eventos (u.a)
Número de onda (cm-1)
(b)

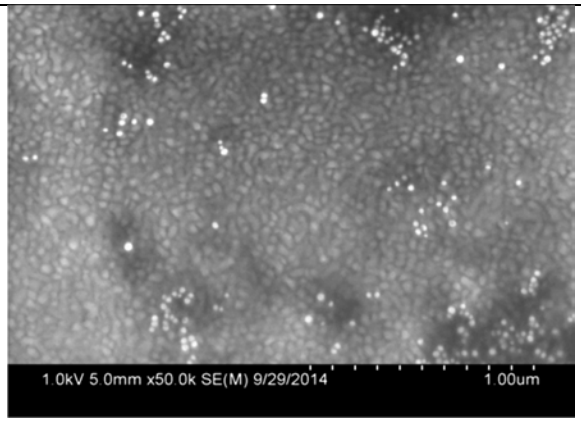

1.0kV 5.0mm x50.0k SE(M) 9/29/2014
1.00um

Figura 5.20 (a) Esquema representativo do sanduíche da plataforma de captura usando PEG para os controles. As setas indicativas mostram as diferenças entre cada ensaio. (b) Espectro da intensidade SERS pelo o número de eventos relativo a banda com máximo intensidade do NBA em 595 cm^{-1}. (ii) Cada imagem MEV corresponde ao espectro de intensidade SERS ao lado.

As Figuras 5.21 (a) e (b) mostram a média e desvio padrão das imagens (quinze imagens MEV para cada ensaio) para ambos os ensaios *sanduíche* (PEG e MUA), respectivamente. Na Figura 5.21 (a) observa-se que há uma quantidade semelhante de nanopartículas por área quando comparado com a Figura 5.21 (b), nos controles. No entanto, verifica-se uma maior intensidade SERS nos controles para o sanduiche-PEG. Observando novamente as imagens MEV *sanduích*e-PEG verifica-se que apesar de haver uma quantidade baixa de nanopartículas por unidade de área, as nanopartículas estão mais próximas entre si, em alguns casos formando-se aglomerados de nanopartículas.

Estes resultados sugerem que não houve uma formação eficiente da SAM com PEG (preparados com tempo de incubação de duas horas). Para formação da SAM, um parâmetro de extrema importância que deve ser levado em conta, é o tempo de incubação e a concentração. Estudos indicam que a formação da monocamada inicial é muito rápida, com uma monocamada que pode ser alcançada dentro de segundos a minutos. Porém, essa monocamada inicialmente formada não está bem ordenada e deve conter defeitos. Ao longo do tempo, as camadas tornam-se mais ordenadas. O tempo de automontagem relatados variam por toda a literatura, mas normalmente são 2 horas a 2 dias [172-175].

Li e colaboradores [175] fizeram um estudo do tempo de organização do decanotiol para a formação da SAM em substrato de ouro. As SAMs foram preparadas por imersão do substrato de ouro em uma solução etanólica contendo 1 μM de decanotiol em diferentes tempos de imersão. Os autores acompanharam o processo e estrutura de formação da SAM por STM (termo em inglês *scanning tunneling microscope*). Com 30 segundos de imersão ocorreu uma pequena organização e as moléculas podem ser observadas randomicamente neste inicial estágio. Com 5 minutos de imersão, as cadeias alquilas sobrepõem-se umas as outras. Em 3 dias de imersão do substrato de ouro sobre o decanotiol, os autores observaram uma organização do decanotiol.

Neste trabalho foram depositadas as nanopartículas de ouro (sonda SERS) sobre a monocamada (plataforma de captura-PEG) e agregados foram observados. Agregados

necessariamente contém uma junção entre nanopartículas e teoricamente confirma-se a localização *hot-spot* [176]. Acredita-se que ocorreu um processo de agregação das nanopartículas na plataforma de captura PEG devido a uma estruturação não bem ordenada da SAM-PEG, assim comprometendo as etapas posteriores. Um estudo mais detalhado nesta etapa de formação da SAM-PEG é sugerido.

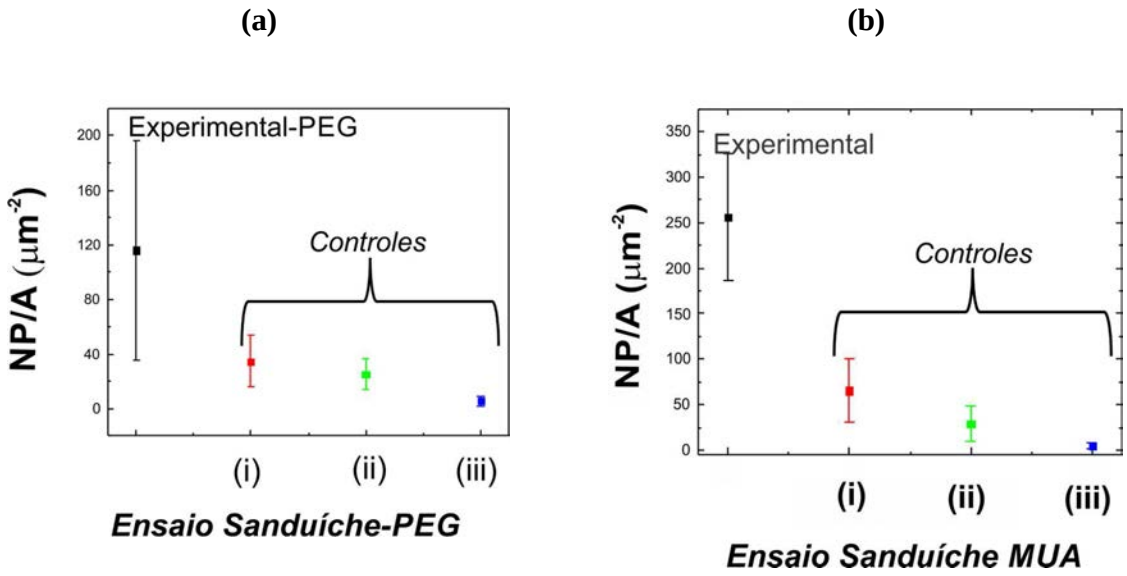


Figura 5.21 (a e b) Média e desvio padrão correspondentes as imagens de MEV (quinze imagens para cada ensaio). (a) Ensaio sanduíche-PEG. (b)Ensaio sanduíche-MUA.

5.7 Comparação entre os ensaios

Similarmente ao experimento realizado com os ensaios sanduíche MUA, a Figura 5.22 (a) mostra o histograma da distribuição estatística obtido para o ensaio sanduíche experimental PEG. Observa-se no histograma um log normal da distribuição deslocada para maiores valores de intensidade SERS. O resultado é a presença da grande quantidade de nanopartículas aglomeradas, produzindo campo plasmônicos grandes (*hot-spot*), como consequência o espalhamento SERS nestas regiões deve ser intensificado [176].

O *inset* da Figura 5.22 (b) mostra a distribuição da intensidade SERS para o experimental e o controle (i). Observa-se no valor do teste *Cohen´s* d que há um grande deslocamento entre os dois grupos. Esta informação resulta que os controles não interferem no ensaio PEG experimental.

No entanto, o objetivo desta etapa é a redução da ligação não especifica. Assim foram comparados pelo teste *Cohen´s d* os controles de ambos ensaios *sanduíches* (MUA e PEG). Observa-se, pelas Figuras 5.23 que houve um grande deslocamento entre os controles, no entanto a curva de máxima distribuição para os controles-MUA estão deslocados para as regiões mais próximas de zero quando comparadas com as curvas de distribuição PEG. Regiões próximas de zero (controles), significa que as distribuições da intensidade SERS estão mais deslocados para baixos valores. Assim a curva do log normal da distribuição está deslocada para menores valores de intensidade SERS. Observa-se uma redução de nanopartículas do ensaio sanduíche controles-PEG quando comparado com o experimental-PEG. No entanto, quando comparado com o ensaio sanduíche-MUA a curva de distribuição estatística foi deslocado para maiores valores.

Através destas comparações dos ensaios sanduíche PEG e MUA, verificou-se que a redução da ligação não específica não foi eficiente. Isto pode ter decorrido da formação não ordenada da SAM-PEG, comprometendo as funcionalizações posteriores.

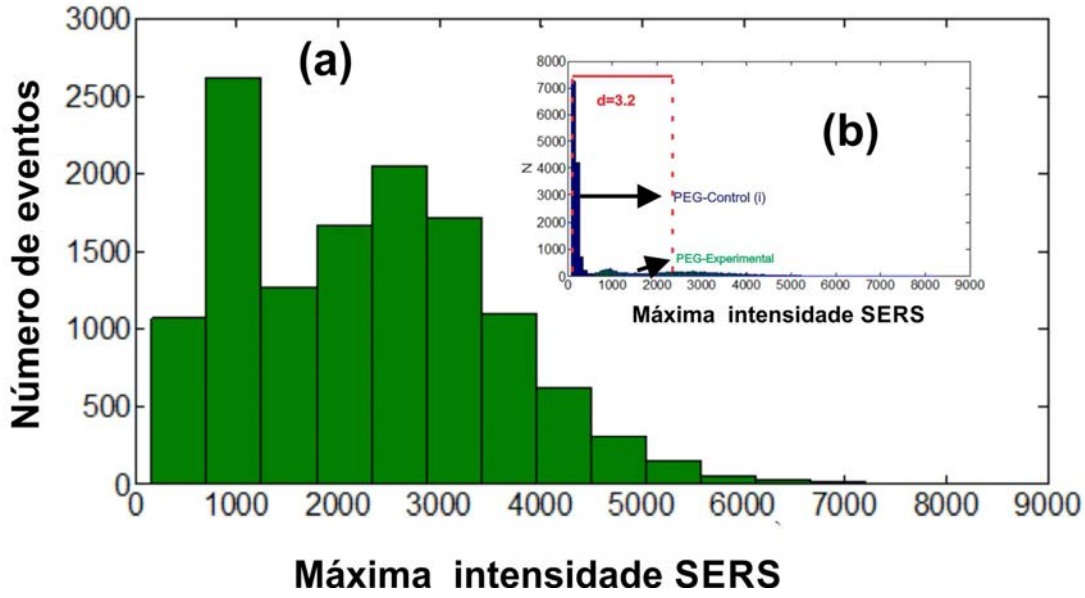


Figura 5.22 (a) Distribuição da máxima intensidade SERS para o ensaio sanduiche completo. (b) Distribuição da máxima intensidade entre o experimental e o controle (iii) mostrando o deslocamente entre eles, exibido pelo valor de Cohen´d.

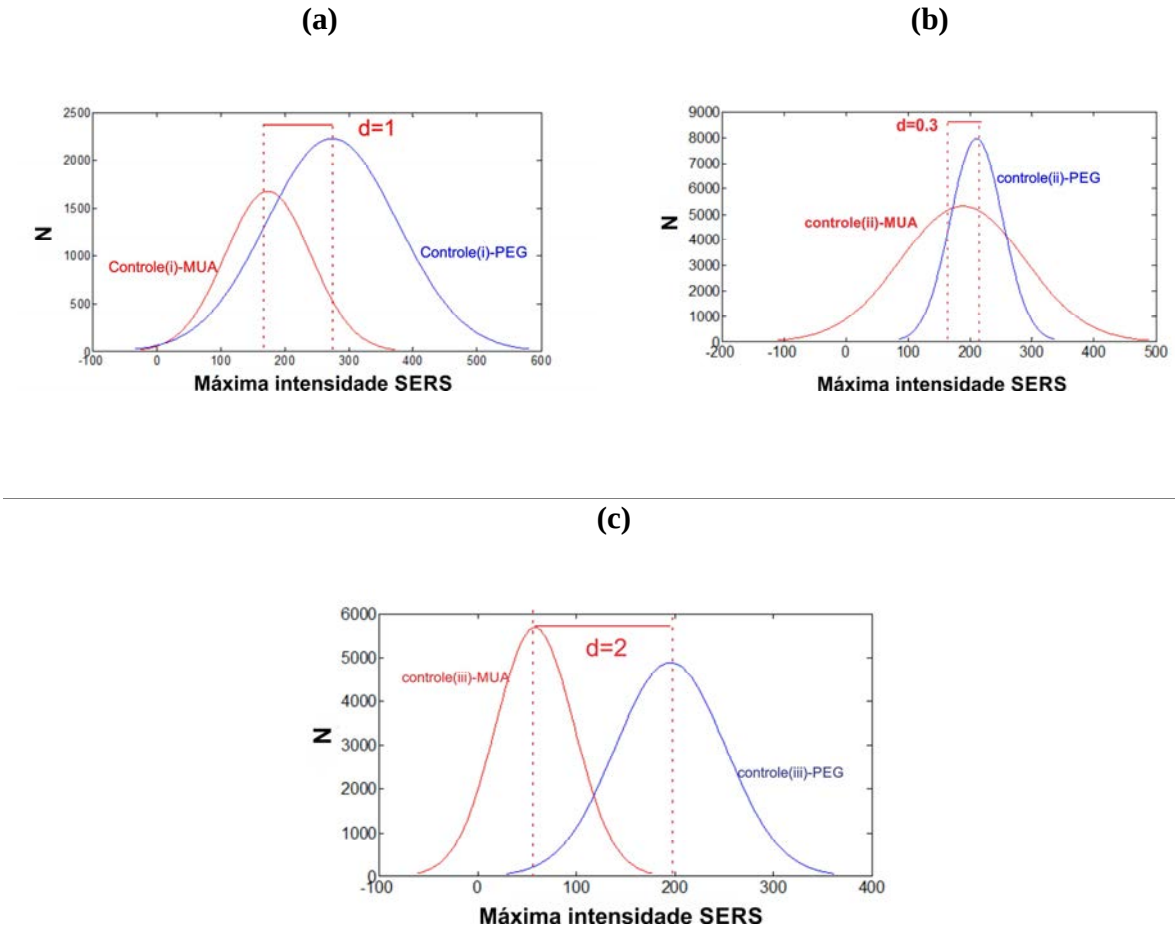


Figura 5.23 Distribuição da máxima intensidade entre os controles do teste sanduíche correspondentes as plataformas de captura-MUA (-) e plataforma de captura-PEG (-). Os valores de Cohen´d > 0,5 significam que houve um grande deslocamento (a) e (c). Em, (b) observa-se um médio deslocamento, apesar que ambas as curvas de distribuição estão deslocadas para regiões próxima de zero.

6 Conclusão

Neste trabalho foi descrita uma prova de conceito de formação de ensaio *sanduíche* para diganóstico de vírus HIV utilizando o peptídeo (p17-1) baseado em SERS. O ensaio *sanduíche* foi baseado em duas plataformas, com MUA e PEG. A SAM-MUA foi caracterizada por AFM e voltametria ciclíca, observou-se um crescimento do filme quando o substrato de ouro foi modifcado com MUA dado pelo alto valor da média da rugosidade e ausência dos picos de anôdicos e catódicos.

No ensaio sanduíche MUA foi verificado a presença da maior região azul claro que representou a forte interação do peptídeo p17-1 com a sonda SERS observado através do mapeamento. Fato comprovado pelas imagens MEV que nos mostra a maior quantidade de nanopartículas por área e também pela alta intensidade dos espectros SERS quando comparados com os controles.

Além disso no ensaio sanduíche MUA, foram realizados histogramas da distribuição estatística que mostrou um log normal da distribuição distorcido para maiores valores de intensidade SERS. Através do teste estatístico *Cohen´s d* observou-se pouca influência dos controles em relação ao experimental.

Para verificação da redução não específica foi utilizada o teste *sanduíche* usando PEG. Foi observado uma alta intensidade do sinal SERS e pelas imagens de MEV observou-se uma grande quantidade de nanopartículas adsorvidas por área quando comparado com os controles-PEG. Porém, quando estes resultados do ensaio *sanduíche*-PEG foram comparados com o ensaio *sanduíche*-MUA, foi observado que não houve uma redução da ligação não específica. Fato comprovado pelo maior deslocamento da curva de distribuição estatística para regiões próximas de zero para o ensaio-MUA.

No entanto, apesar de haver ligação não especifica para o teste *sanduíche*-MUA pode-se verificar que o teste experimental não é afetado, fato comprovado pelo grande deslocamento valor do teste de *Cohen´s d* quando comparado com os controles. Além disso, quando comparado com os ensaios-PEG, observou-se a distribuição estítistica dos controles deslocada para valores próximos a zero. Assim, sugere-se que futuramente esta prova de conceito possa ser aplicada em testes em soros contaminados.

7 Perspectivas

Como perspectiva deste trabalho como já mencionado, sugere-se;

- Aplicação do ensaio sanducíche MUA futuramente em testes em soros contaminado.
- Fazer a comparação com o teste ELISA
- Desenvolvimento da SAM-PEG em tempos maiores de incubação para haver se afeta da formação do sanduíche PEG, para verificação da redução da ligação não específica.

Referências

1 ARORA, V.; KADIAN, M.; SHARMA, K.; YADAV, M. A challenge towards defeating AIDS: a review. **World J. Pharm. Pharm. Sci.**, v. 4, n. 3, p. 1321-1338, Feb. 2015.

2 FENALES-BELASIO, E.; RAIMONDO, M.; SULIGOI, B.; BUTTO, S. HIV virology and phatogenetic mechanism of infection: a brief overview. **Ann. Ist. Super Sanita**, v. 46, n. 1, p. 5-14, Feb. 2010.

3 CLOYD, M. N.; CHEN, J. J. Y.; ADEQBOYEGA, P.; WANG, L. How does HIV cause AIDS? The homing theory. **Mol**. **Med. Today**, v. 6, n. 3, p. 108-111, Mar. 2000.

4 BARCELAR JUNIOR, A. J.; ANDRADE, A. L. V.; FERREIRA, A. A. G.; OLIVEIRA, S. M. A.; PINHEIRO, T. S. Human immunodeficiency virus: a review. **Braz. J. Surg. Clin. Res.**, v. 9, n. 2, p. 43-48, Dec. 2014.

5 GIRARD, M. P.; OSMANOV, S.; ASSOSSOU, O. M.; KIENY, M-P. Human immunodeficiency virus (HIV) immunopathogenesis and vaccine development: a review. **Vaccine**, v. 29, n. 2, p. 6191-6218, June 2011.

6 PICKER, L. J.; HANSEN, S. G.; LIFSON, J. D. New paradigmas for HIV/AIDS vaccine development. **Annu. Rev. Med.**, v. 63, n. 3, p. 95-111, Feb. 2012.

7 McMICHAEL, A. J.; BORROW, P.; TOMARAZ, G. D.; GEONETILILEKE, N.; HAYNES, B. F. The imune response during accute HIV-1 infections: clue for vacines development. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 10, n. 2, p. 11-23, Dec. 2010.

8 DEEKS, S. G.; AUTRAN, B.; BERKOUT, B.; BENKIRANE, M.; CAIRMS, S.; CHOMONT, N.; CHUN, T.-K.; CHURCHIL, M.; KATIAMA, C.; MASCIO, M.; LAFEULLADE, D.; LANDAY, A.; LADERAMAN, M.; LEWIN, S. R.; MANDERALLI, F.; MARGOLLIS, S.; MARKOWITS, M.; MARTINEZ-PICADO, J.; MULLINS, J. I.; MELLORS, J.; MORENO, S.; UNA, S.; PALMER, S.; PENICAUD, M.-C.; PETERLIN, M.; POLI, G.; ROUTY, J.-P.; ROUZIOUX, C.; SILVESTRI, G.; STEVENSON, M.; TELENTI, A.; LIN, C. T.; WOLLFREY, A.; ZAIA, J.; BARRE-SINOUSSI, F. Towards and HIV cure: a global scientific strategy. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 12, n. 8, p. 607-614, July 2012.

9 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **HIV/AIDS**. Disponível em: <http://www.who.int/gho/hiv/en/>. Acesso em: 12 jan. 2015.

10 UNAIDS. **Global report**. Genova, 2012. Disponível em: <http://www.unaids.org.br/documentos/UNAIDS_gr2012_em_en.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2015.

11 WATTS, J. M.; DANG, K. K.; GORELICK, R. J.; LEONARD, C. W.; BESS, J. W.; SWANTROM, R.; BURCH, C. L.; WEEKS, K. M. Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. **Nature**, v. 460, n. 6, p. 711-721, Aug. 2009.

12 ROSSI, J.; JUNE, C.; KOHN, D. B. Genetic therapies against HIV. **Nat. Biotec.**, v. 25, n. 12, p. 1444-1454, Dec. 2007.

13 AIDSINFO. **The HIV life cycle**. 2014. Disponível em: <http://aidsinfo.nih.gov/education-materials/fact-sheets/19/73/the-hiv-life-cycle> Acesso em: 15 jan. 2015.

14 ROUX, K. H.; TAYLOR, K. A. AIDS virus envelope spike. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 17, n. 4, p. 244-252, Mar. 2007.

15 MORAES, P. A. B. **Síntese e avaliação da atividade biológica de derivados aminoglicosideos com potenciais inibidores na replicacao do virus HIV-1**. 2012. 234 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

16 FRANKEI, A. D.; YOUNG, J. A. T. HIV fifteen proteins and RNA. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 67, n. 1, p. 1-25, July 1998.

17 TURNER, B. G.; SUMMERS, M. F. Structural biology of HIV. **J. Mol. Biol.**, v. 285, n. 1, p .1-32, Jan. 1999.

18 SIERRA, S.; KUPTER, B.; KAISER, R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. **J. Clin. Virol.**, v. 34, n. 5, p. 233-244, Sept. 2005.

19 BARRE-SINOUSSI, F.; ROSS, A. L.; DELFRAISSY, J.-F. Past, present and future: 30 years of HIV research. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.11, n.12, p. 877-833, Dec. 2013.

20 FREED, E. O. HIV replication. **Somat. Cell Mol. Genet**., v. 26, n. 6, p. 13-33, Nov. 2001.

21 ENGELMANN, A.; CHEREPANOV, P. The structural biology of HIV mechanistic and therapeutic insights. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 10, n. 10, p. 279-290, Abr. 2012.

22 GANSER-PORNILOS, B. K.; YEAGER, M.; PORNILLOS, O. Assembly and arquicture of HIV. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 726, p. 441-465, 2012.

23 FREED, E. O. HIV-1 gag proteins, diverse in the virus life cycle. **Virology**, v. 251, n. 3, p. 1-15, Nov. 1998.

24 GANSER-PORNILLOS, B. K.; YEAGER, M.; SUNDQUIST, W. The structural biology of HIV assembly. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 18, n. 2, p. 203-217, Apr. 2008.

25 BUKRINSKAYA, A. HIV matrix protein a mysterious regulator of the viral life cycle. **Virus Res.**, v. 124, n. 2, p. 1-11, Mar. 2007.

26 FIORENTINI, S.; MARINI, E.; CARACCIOLO, S.; CARUSO, A. Functions of HIV matrix protein p17. **New Microbiol.,** v. 29, n. 1, p.1-10, Jan. 2006.

27 YORKUNOVA, G. K.; LUPANDIN, S. I.; BUKRINSKAYA, A. G. HIV-1 assembly iniciated by p17 matrix protein. **Mol. Biol.**, v. 45, n. 5, p. 811-815, Oct. 2011.

28 FIORENTINI, S.; GIAGULLI, C.; CACCURI, F.; MAGIERA, A. K.; CARUSO, A. HIV-1 matrix protein p17 a candidate antigen for therapeutic vaccines against AIDS. **J. Clin. Pharm. Ther.**, v. 128, n. 3, p. 433-444, Dec. 2010.

29 FIORENTINI, S.; MARINI, E.; BOZZO, L.; TRAININI, L.; SAADOUNE, L.; AVOILLO, M.; PONTILLO, A.; BONFANTI, C.; CARUSO, A. Preclinical studies on immunogenicity of HIV-1 p17 based synthetic peptide AT20- K1H. **Biopolymers**, v. 76, n. 4, p. 334-339, Oct. 2004.

30 LOTTERBERGER, J.; SALVETTI, J. L.; BELTRAMINI, L. M.; TONARELLI, G. Antibody recognition of synthetic peptide mimicking immunodominant regions of HIV-1 p24 and p17 proteins. **Rev. Argent. Microbiol.**, v. 36, n. 4, p .151-157, Oct. 2004.

31 SAPSFORD, K. E.; BLANCO-CANOSA, J. B.; DAWSON, P. E.; MEDINTZ, I. L. Detection of HIV-1 specific monoclonal antibodies using enhancement of dye-labeled antigenic peptides. **Bioconjugate Chem.**, v. 21, n. 2, p. 393-398, Dec. 2010.

32 PETRI, L.; FERREIRA, M.; MORAES, M. L. Toward preserving the structure of the antigenic peptide p17-1 from the HIV-1 p17 protein in nanostructured films. **Nanosci. Nanotechnol.**, v. 11, n. 8, p. 6705-6709, Aug. 2011.

33 CONSTANTINE, N. T.; ZINK, H. HIV testing after two decades of evolution. **Indian. J. Med.**, v. 21, n. 2, p. 519-538, Apr. 2005.

34 PATEL, P.; BENNEDTT, B.; SULLIVAN, T.; PARKER, M. M.; HEFFELFINGER, J. D.; SULLIVAN, P.; CDC AHI STUDY GROUP. Rapid HIV screening: missed opportunities for HIV diagnosis and prevention. **J. Clin. Virol.**, v. 54, n. 1, p. 2-47, Jan. 2012.

35 BRANSON, B. M.; STEKLER, J. D. Detection of acute HIV infection: we can't close the window. **J**. **Infect. Dis.**, v. 205, n. 4, p. 521-524, Dec. 2011.

36 ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, n. 9, p. 871-874, Feb. 1971.

37 SHAFFIE, H.; LIDSTONE, E. A.; JAHNAIR, M.; HANHAUSER, E.; HENRICH, T. J.; KURITZES, D. R.; CUNNINGHAM, B. T.; DEMIRIC, U. Nanostructured optical photonic crystal biosensor for HIV viral measurement. **Scien. Reports**, v. 4, Feb. 2014. doi:10.1038/srep04116.

38 XU, L.; ZHONG, C.; ZHENG, X. S.; FENG, J.-M.; REN, B. Label-free detection of native proteins by surface-enhanced Raman. **Anal. Chem.**, v. 86, n. 4, p. 2238-2245, Jan. 2014.

39 NIETO, A.; GAYA, A.; MORENO, C.; JANSA, M.; VIVES, J. Adsorption-desorption of antigen to polystyrene plates used in ELISA. **Ann. Inst. Pasteur. Immunol.**, v. 132, n. 2, p. 167-172, Apr. 1986.

40 BUTLER, J. E.; NI, L.; NESSLER, R.; JOSHI, K. S.; SUTER, M.; ROSENBERG, B.; CHANG, J.; BROWN, W. R.; CANTARERO, L. A. The physical and functional behavior of capture antibodies adsorbed on polystyrene. **J. Immunol. Methods**, v. 150, n. 2, p. 77-79, Feb. 1992.

41 THERMO SCIENTIFIC. **ELISA technical guide and protocols**. Rockford, 2010. Disponível em: <https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/TR0065-ELISA-guide.pdf>. Acesso em: 03 jun. 2015.

42 KEMMENY, D. M.; CHALLACOMBE, S. J. **ELISA and other solid phase immunoassays**: theoretical and practical aspects. Toronto: Wiley, 2007. 378 p.

43 O'KENNEDY, R.; BYRNE, M.; O'FAGAIN, C.; BERNS, G. Experimental sectons: a review of enzyme-immunoassay and ad of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of immunoglobulin concentrations. **Biochem. Educ.**, v. 8, n. 3, Apr. 1990.

44 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. **Manual técnico para diagnóstico de infecção pelo HIV**. Brasília, DF, 2013.

45 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. **Testes Rápidos HIV com amostras de fluido oral**. Brasília, DF, 2014.

46 PESCE, M. A.; CHOW, K. F.; HOD, E.; SPITALNIK, S. L. Rapid HIV antibody testing: methods and clinical utilization. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 126, p. S61-S70, Apr. 2006. Suppl. 1.

47 POSTHUMA-TRUMPIE, G. A.; KORF, J.; AMERONGEN, A. V. Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses,opportunities and threats. A literature survey. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 393, n. 2, p. 569-582, Aug. 2009.

48 KENFE, F.R. **Método imunocromatográfico para pesquisa do anticorpo em triagem ou diagnóstico da hepatite C**: desenvolvimento e aplicação clínica. 2012. 254 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

49 O'FARRELL, B. Evolution in lateral flow–based immunoassay systems. In: WONG, R. C.; TSE, H. Y. (Ed.). **Lateral flow immunoassay**. New York: Springer, 2009. Chap. 1, p. 1-33.

50 RAMAN, C. V. The new type of secondary radiation. **Nature**, v. 121, n. 2, p. 501-502, July 1928.

51 PECORA, R.; BERNE, B. J**. Dynamic light scattering with applications to chemistry, biology and physics**. Toronto: Courier Corporation, 2000. 376 p.

52 KERKER, M. **The scattering of light and other eletromagnetic radiation physical chemistry**. 16th ed. New York: Academic Press Science, 2013. 686 p.

53 TILLEY, R. J. D. **Colour and the optical properties of materials**: an exploration of the relationship between light, the optical properties of materials and colour. 2nd ed. Toronto: John Wiley and Sons, 2011. 526 p.

54 LONG D. A. **The Raman effect**: a unifield treatment of the theory of raman scattering by molecules. Toronto: John Wiley and Sons, 2002. 624 p.

55 SALA, O. **Fundamentos da espectroscopia Raman e infravermelho**. 2. ed. São Paulo: Ed. Unesp, 2008. 276 p.

56 FERRARO, J. R.; NAKAMOTO, K.; BROWN, C. W. **Introductory Raman spectroscopy**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2003. 434 p.

57 LE RU, E.; ETCHEGOIN, P. **Principles of surfasse-enhanced Raman spectroscopy and related plasmonic effects**. New York: Elsevier, 2009. 623 p.

58 AROCA, R. **Surface-enhanced vibrational spectroscopy**. Toronto: John Wiley and Sons, 2009. 260 p.

59 PENNY, C. M.; GOLDMAN, L. M.; LAPP, M. Raman scattering cross sections. **Nat. Phys. Sci.**, v. 235, n. 4, p. 111-112, Feb. 1972.

60 SHROTTER, H. W.; KLOCKNER, H. W. Raman scattering cross sections in gases and liquids. **Top. Curr. Phys.**, v. 11, n. 3, p. 123-166, Oct.1 979.

61 REIGUE, A.; AUGUIE, B.; ETCHEGOIN, P. G.; LE RU, E. CW measurements of resonance Raman Profils line-wedths and cross sections of fluorescence dyes: aplications to Nile Blue A in water and ethanol. **J. Raman Spectros.**, v. 44, n. 4, p. 573-581, Jan. 2013.

62 SMITH, E.; DENT, G. **Modern Raman spectroscopy**: a pratical approach. Toronto: John Wiley and Sons, 2013. 373 p.

63 PARKER, F. S. **Aplications of infrared Raman a resonance Raman spectroscopy in biochemistry**. New York: Springer, 1983. 568 p.

64 LAKOWICK, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3rd ed. New York: Springer, 2006. 275 p.

65 KNEIPP, K.; KNEIPP, H.; MOSKOVITS, M.(Ed.). **Surface- enhanced Raman scattering**: physics and aplications. New York: Springer, 2006. 466 p. (Topic in applied physics, v. 103).

66 WEITZ, D. A.; GAROFF, J. I.; NITZAN, A. The enhancement of Raman scattering resonance Raman scattering and fluorescence from molecules adsorved on roogh silver surface. **J. Chem. Phys.**, v. 78, n. 2, p. 5325-5338, Jan. 1983.

67 FLEISCHAMANN, M.; HENDRA, P. J.; McQUILLAN, A. J. Raman spectra of pyridine adsorved at silver electrode. **Chem. Phys. Lett.**, v. 26, n. 2, p. 163-166, May 1974.

68 McQUILLAN, A. J. The discovery of surface-enhanced Raman scattering. **Notes Rec. R. Soc.**, v. 63, p. 105-109, Jan. 2009.

69 JEANMAIRE, D. L.; VAN DUYNE, R. P. Surface Raman electrochemistry. Part 1. Heterocycle aromatic and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode. **J. Electroanal. Chem**., v. 84, n. 2, p. 1-20, May 1977.

70 ALBRECHT, M. G.; CREIGHTON, J. A. Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 99, n. 3, p. 5145-5219, May 1977.

71 BOHREN, C. F.; HUFFMAN, D. R. **Absorption and scattering of light by small particles**. New York: Wiley, 1983. 544 p.

72 RINGE, E.; SHARMA, B.; HENRY, A.-I.; MARKS, L. D.; VAN DUYNE, R. P. Single nanoparticles plasmonics. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 15, n. 12, p. 4110-4129, Mar. 2013.

73 VINES, F.; GOMES, J. R. B.; ILLAS, F. Understading the reactivity of metallic nanoparticles: beyond the extended surface model for catalysis. **Chem. Soc. Rev.**, v. 43, n. 1, p. 4922-4939, Jan. 2014.

74 BRISTISH MUSEUM. **The lycurgus cup**. Disponível em: <www.britishmuseum.org.explore/lycurguscup>. Acesso em: 23 abr. 2015.

75 MARTINS, M. A.; TRINDADE, T. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico. **Quím. Nova**, v. 35, n. 7, p. 1434-1446, jun. 2012.

76 HORIKOSHI, S.; SERPONE, N. Introduction nanoparticles. In: HORIKOSHI, S.; SERPONE, N. (Ed.). **Microwaves in nanoparticles synthesis**: fundamentals and aplications. Toronto: John Wiley and Sons, 2013. Chap. 2, 1-22 p.

77 FAN, X.; ZHANG, W. Light scattering and surface plasmonics on small spherical particles. **Light**: Sci. Applic, v. 3, June 2014. doi:10.1038/lsa.2014.60.

78 LU, X.; RYCENGA, M.; SKRABALAK, S. E.; WILEY, B.; XIA, Y. Chemical synthesis of novel plasmonics nanoparticles. **Annu. Rev. Phys. Chem.**, v. 60, n. 4, p. 167-192, May 2009.

79 KELLY, K. L.; CORONADO, E.; ZHAO, L. L.; SCHATZ, G. G. The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment. **J. Phys. Chem**. **B**, v. 107, n. 3, p. 668-677, Aug. 2003.

80 TAME, M. S.; McENERY, K. R.; OZDEMIR, B. K.; LEE, J.; MAYER, S. A.; KIM, M. S. Quantum plasmonics. **Nat. Phys.**, v. 9, n. 3, p. 329-340, June 2013.

81 JUVE, V.; CARDINAL, M. F.; LOMBARDI, A.; CRUT, A.; MAIOLI, P.; PEREZ-JUSTE, J.; LIZ-MARZAN, L. M.; FATTI, N.; VALLE, F. Size dependent surface plasmon resonance bradening in nanospherical, single gold nanorods. **Nano Lett.**, v. 13, n. 5, p. 2234-2240, Apr. 2013.

82 STEWART, M. E.; ANDERTON, C. R.; THOMPSON, L. B.; MARTA, J.; ROGERS, J. A.; NUZZO, R. G. Nanostructured plasmonic sensor. **Chem. Rev.**, v. 108, n. 2, p. 494-521, Jan. 2008.

83 GARCIA, M. A. Surface plasmon in metallic nanoparticles fundamentals and applications. **J. Phys. D**: Appl. Phys., v. 44, n. 2, p. 1-20, June 2011.

84 SCHOLL, J.; KOH, A. L.; DIONNE, J. A. Quantum plasmon resonance of individual metallic nanoparticles. **Nature**, v. 483, n. 7390, p. 421-428, Mar. 2012.

85 AHMADIVAND, A.; GOLMOHAMMAD, S. Comprehensive investigations of metal nobles nanoparticles, shape, size, and material on the optical response of optimal plasmonics Y-Spilter waveguides. **Opt. Comm.**, v. 310, n. 3, p. 1-11, Jan. 2014.

86 HALAS, N.; LAL, S.; CHANG, W.; NORDIANDER, P. Plasmons in strongly coupled metallic nanostructures. **Chem. Soc. Rev.**, v. 111, n. 6, p. 3913-3961, May 2011.

87 LINK, S.; EL-SAYED, M. A. Size and temperature dependence of the plasmon adsorption of colloidal gold nanoparticles. **J. Phys. Chem. B**, v. 103, n. 21, p. 4212-4217, May 1999.

88 JAIN, P. K.; HUANG, X.; EL-SAYED, I. H.; EL-SAYED, M. A. Review of some interesting surface plasmon resonance-enhanced properties of noble metal

nanoparticles and their applications to biosystems. **Plasmonics**, v. 2, n. 1, p. 107-118, July 2007.

89 JOHNSON, P. B.; CHRISTY, R. W. Optical constants of the noble metals. **Phys. Rev. B**, v. 6, n. 12, p**.** 4370-4379, Dec. 1972.

90 RIOUX, D.; VALLIERES, S.; SEBASTIEN, B.; MUNOZ, P.; MAZUR, E.; MEUNIER, M. An analytic model for the dielectric function of Au, Ag, and their alloys. **Adv. Opt. Mat.**, v. 2, n. 2, p. 176-182, Dec. 2013.

91 JAIN, P. K.; LEE, S. S.; EL SAYED, M. A. Calcuted absorption and scattering proprieties of gold nanoparticles of different size, shape and composition: applications in biology, imaging and biomedicine. **J. Phys. Chem. B**, v. 110, n. 14, p. 7238-7248, Apr. 2006.

92 SERNELIUS, E. **Surface modes in physics**. Berlim: Wiley, 2001. 370 p.

93 FOX, M. **Optical properties of solids**. Oxford: Oxford University Press, 2007. 276 p.

94 SANTOS, D. P. **Espalhamento Raman intensificado pela surperfície (SERS) no regime de detecção de uma mólecula**. 2013. 225 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

95 HE, Y.; ZENG, T. First principles anomodel of dieletric functions of silver nanoparticles. **J. Phys. Chem.**, v. 114, n. 3, p. 18023-18030, Apr. 2010.

96 MOSKOVITS, M. Surface-enhanced Raman spectroscopy: a brief retrospective. **J. Raman Spectrosc.**, v. 36, n. 7, p. 485-496, July 2005.

97 KNEEIP, K.; KNEEIP, H.; ITZKAN, I.; DASARI, R. R.; FELD, M. S. Surface-enhanced Raman scattering and biophysics. **J. Phys**.: Condens. Matter., v. 14, n. 18, p. 597-624, Dec. 2002.

98 SALA, F. della; D'AGOSTINO, S. **Handbook molecular plasmonics**. London: CRC Press, 2013. 498 p.

99 CIALLA, D.; MARZ, A.; BOHNE, R.; THEIL, F.; WEBER, K.; SCHIMITT, M.; POPP, J. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): progress and trends. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 403, n. 1, p. 27-54, Dec. 2012.

100 TIAN, Z-Q.; REN, B. Surface spectroscopy of electrode surface.Encyclopedia of electrochemistry. Ed. Wiley, 2007. DOI: 10.1002/9783527610426.bard030306.

101 Le RU, E.; ETCHEGOIN, P. G. Single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy. **Annu. Rev. Phys. Chem.**, v. 63, n. 4, p. 65-87, Jan. 2012.

102 ETCHEGOIN, P. G.; Le RU, E. C. A perspective on single molecule SERS: current status and future challenges. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 10, n. 40, p. 6079-6089, July 2008.

103 OTTO, A. The 'chemical' (electronic) contribution to surface-enhanced Raman scattering. **J. Raman Spectros.**, v. 36, n. 2, p. 497-509, Jan. 2005.

104 CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 102, n. 3, p. 29-45, Oct.1962.

105 WANG, J. Glucose biosensors: 40 years of advances and challenges. **Electroanalysis**, v. 13, n. 12, p. 983-998, Aug. 2001.

106 TURNER, A. P. F. Biosensor sense and sensitivity. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, n. 8, p. 31-84, Apr. 2013.

107 KRISTH, J.; SILTANEN, C.; ZHOU, Q.; REVZIN, A.; SIMONIAN, A. Biosensor technology: recent advances in threat agent detection and medicine. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, n. 22, p. 8733-8768, Nov. 2013.

108 MOHANTY, S. P.; KOUGIANOS, E. Biosensors: a tutorial review. **IEEE Potentials**, v. 25, n. 2, p. 35-40, Apr. 2006.

109 FATIBELLO FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biosensores. **Quím. Nova**, v. 15, n. 1, p. 28-39, out. 1992.

110 WARRINER, K.; REDDY, S. M.; NAMVAR, A.; NEETHIRAJAN, S. Developments in nanoparticles for use in biosensors to assess food safety and quality. **Trends Food Sci. Tech.**, v. 40, n. 2, p. 183-199, Dec. 2014.

111 KUMAR, S. Biosafety and biosecurity issues in biotechnology research. **Biosafety**, v. 4, n. 1, Feb. 2015. doi:10.4172/2167-0331.1000e153.

112 FANG, Y. Label-free drug discovery. **Front Pharmacol.**, v. 5, n. 52, Mar. 2014. doi:10.3389/fphar.2014.00052.

113 TELES, F. Biosensors for medical mycology. **Fut. Med.**, v. 10, n. 3, p. 98-111, Nov. 2013.

114 LEE, J.-H.; KIM, B.-C.; OH, B.-K.; CHOI, J.-W. Hight sensitive localized surface plasmon resonance imunosensor for Label-free detection HIV-1. **Nanomed Nanotech.**, v. 9, n. 7, p. 1018-1026, Oct. 2013.

115 THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURT, R. A.; WILSON, G. S. Eletrochemical biosensor recommendation, definitions and classifications. **Biosens. Bioelectron.**, v. 13, n. 2, p. 121-131, Jan. 2001.

116 GRISHABER, D.; MacKENZIE, R.; VOROS, J.; REIMHITE, A. Eletrochemical biosensor-sensor principles and architetures. **Sensors**, v. 8, n. 3, p. 1400-1458, Mar. 2008.

117 GUBALA, V.; KLEIN, R.; TEMPIETON, D. M.; SHEWENK, M. Immunodiagnostics and immunosensor design. **Pure Appl. Chem.**, v. 86, n. 10, p. 1539-1571, Oct. 2014.

118 LUPPA, P. B.; SOKOLL, L. J.; CHAN, D. W. Immunosensors principles and applications to clinical chemistry. **Clin. Chim. Acta**, v. 314, n. 2, p. 1-26, Dec. 2001.

119 COSNIER, S. (Ed.). **Electrochemical biosensor**. Boca Raton: Pan Stanford, 2014. 400 p. (Pan stanford series on the hightech of biotechnology).

120 PEI, X.; ZHANG, B.; TANG, J.; LIU, B.; LAI, W.; TANG, D. Sandwich type immunosensors and immunoassays exploting nanostructure labells: a review. **Anal. Chim. Acta**, v. 758, n. 3, p. 1-18, Jan. 2013.

121 DARWISH, I. A. Imunoassay, methods and their applications in pharmaceutical analysis: basic methodology and recent advances. **Int. J. Biomed. Sci.**, v. 2, n. 3, p. 219-235, Sept. 2006.

122 GIL, E. S.; KUBOTA, L. T. Alguns aspectos de imunoensaios aplicados a quimica analitica. **Quím. Nova**, v. 22, n. 6, p. 874-881, Dez. 1999.

123 INTRODUCTION to antibodies. 2nd ed. Temecula: Chemicon International. Disponível em: <https://biochem.wisc.edu/sites/default/files/labs/weibel/methods/Introduction_to_Antibodies.pdf>. Acesso em: 03 jun. 2015.

124 ZOVALI, M. Natural antibodies. In: CULLEN, K. E. **Encyclopedia of life science**. New York: Facts On File, 2009. (Abstract). Disponivel em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0001213.pub2/abstract>. Acesso em: 03 jun. 2015.

125 KILLARD, A. J.; DEASY, B.; O'KENEDDY, R.; SYMTH, M. R. Antibodies production functions and applications in biosensors. **Trac-Trends Anal. Chem.**, v. 14, n. 6, p. 257-266, June 1995.

126 JUSTINO, C. I. L.; ROCHA, T. A. S.; DUARTE, A. C. Review of analytical figures of merit of sensors and biosensors in clinical applications. **Trac-Trends Anal. Chem.**, v. 29, n. 10, p. 1172-1183, Nov. 2010.

127 RICARDI, C. S.; COSTA, P. I.; YAMANAKA, H. Imunosensor amperimétrico. **Quím. Nova**, v. 25, n. 2, p. 316-320, abr. 2002.

128 LIU, L. G.; ZHENG, W.; ZHANG, P.; CHEN, F. Biosensing based on surface-enhanced Raman spectroscopy. In: LI, J.; WU, N. **Biosensensors based on nanomaterials and nanodevices**. New York: CRC Press, 2013. Chap. 6, p. 111-153.

129 GUVEN, B.; DUDAK, F. C.; BOYACI, I. H.; TAMER, U.; OZSOZ, M. SERS-based direct and sandwich assay methods for mir-21 detection. **Analyst**, v. 139, n. 5, p. 1141-1147, Mar. 2014.

130 LI, M.; CUSHING, S. K.; WU, N. Plasmon-enhanced optical sensors: a review. **Analyst**, v. 140, n. 2, p. 386-406, Oct. 2015.

131 HOWES, P. D.; RANA, S.; STEVENS, M. M. Plasmonics nanomaterials for biodiagnostics. **Chem. Rev. Soc.**, v. 43, n. 11, p. 3813-3994, June 2014.

132 WANG, Y.; YAN, B.; CHEN, L. SERS tags: novel optical nanoprobes for bioanalysis. **Chem. Rev.**, v. 113, n. 3, p. 1391-1428, Dec. 2012.

133 FAN, M.; FAI, F.-J.; CHOU, H.-L.; HWANG, B.-J.; BROLO, A. G. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) from Au:Ag bimetallic nanoparticles: the effect of the molecular probe. **Chem. Sci.**, v. 4, n. 1, p. 509-515, Oct. 2013.

134 SHAW, C. P.; FAN, M.; LANE, C.; JIRASEK, A. I.; BROLO, A. Statistical correlation between sers intensity and nanoparticle cluster size. **J. Phys. Chem. C**, v. 117, n. 1, p. 16596-16605, June 2013.

135 LOVE, J. C.; ESTROFF, L. A.; KRIEBEL, J. K.; NUZZO, R.; WHITESIDES, G. M. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. **Chem. Rev.**, v. 105, n. 4, p. 1103-1169, July 2005.

136 VERICAT, C.; VELA, M. E.; BENITEZ, G.; CARRO, P.; SALVAREZZA, R. C. Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system. **Chem. Soc. Rev.**, v. 39, n. 5, p. 1805-1834, Feb. 2010.

[137] TANAKA, M.; HAYASHI, SHIGEAKI, M. The roles of water molecules at the interface of medical polymers. Polym. J. V. 45, p. 701-710, Jan. 2013.

138 NI, J.; LIPERT, R.J.; DAWSON, B.; PORTER, M. Immunoassay readout method using extrinsic raman labels adsorbed on immunogold colloids. **Anal. Chem.**, v .71, n. 21, p. 4903-4908, Nov. 1999.

139 YOON, K. J.; SEO, H. Y.; HWANG, H.; PYON, D.; EOM, I.-Y.; HAHN, J. H.; JUNG, Y. M. Bioanalytical application of SERS immunoassay for detection of prostate-specific antigen. **Bull. Korean Chem. Soc.**, v. 31, n. 5, p. 1215-1219, Mar. 2010.

140 DORIA, G.; CONDE, J.; VEIGAS, B.; GIESTAS, L.; ALMEIDA, C.; ASSUNCAO, M.; ROSA, J.; BAPTISTA, P. Noble metal nanoparticles for biosensing applications. **Sensors**, v. 12, n. 2, p. 1657-1687, Dec. 2012.

141 ZENGIN, A.; TAMER, U.; CAYKARA, T. A SERS-based sandwich assay for ultrasensitive and selective detection of Alzheimer's tau protein. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 9, p. 3001-3009, Sept. 2013.

142 MA, K.; YUEN, J. M.; SHAN, N. C.; WALSH, J. T.; GLUKSBERG, M. R.; Van DUYNE, R. P. In vivo, transcutaneous glucose sensing using surface-enhanced spatially offset Raman spectroscopy: multiple rats, improved hypoglycemic accuracy, low incident power, and continuous monitoring for greater than 17 days. **Anal. Chem.**, v. 23, n. 1, p. 9146-9152, Dec. 2011.

143 SHEDGE, H. Y. **Specific and non-specific binding of proteins and nucleic acids on chemically modified reticulated vitreous carbon electrodes**. 2009. 119 f. Dissertation (Master of Science Chemistry) - Departament Chemistry, Clemson University, Clemson, 2009.

144 WERTZ, C. F.; SANTORE, M. M. Effect of surface hydrophobicity on adsorption and relaxation kinetics of albumin and fibrinogen: single-species and competitive behavior. **Langmuir**, v. 17, n. 10, p. 3006-3016, Apr. 2001.

145 ANDRADE, J. D. Protein adsorption and materials biocompatibility: a tutorial review and suggested hypotheses. In: ANDRADE, J. D.; GLOCKNER, G.; HLADY, V.; KLOSINSKI, P.; LIPATOVA, T. E.; PENCZEK, S.; PLATÉ, N. A.; VALUEV, L. I. (Ed.). **Biopolymers/non-exclusion HPLC**. Utah: Springer, 1986. Chap. 1, p. 1-63. (Advances in polymer science, 79).

146 DHRUV, H. D. **Controlling nonspecific adsorption of proteins at biointerfaces for biosensor and biomedical applications**. 2009. 221 f. Dissertation (Doctor of Phylosophy) - Departament Biological and Irrigation Engineering, Utah State University, Logan, 2009.

147 HARDER, P.; GRUNZE, M.; DAHINT, R.; WHITESIDES, G. M.; LAIBINIS, P. E. Molecular conformation in oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayerson gold and silver surfaces determines their ability to resist protein adsorption. **J. Phys. Chem. B**, v. 102, n. 2, p. 426-436, Aug. 1998.

148MICHEL, R.; PASCHE, S.; P TEXTOR, M.; CASTNER, D. V. Influence of peg architecture on protein adsorption and conformation. **Langmuir**, v. 21, n. 26, p. 12327-12332, Nov. 2005.

149 TURKEVICH, J. Colloidal gold. Part I. **Gold Bull**., v. 18, n. 3, p. 86-91, Sept.1985.

150 IZUMI, C. M. S.; MOFFIT, M. G.; BROLO, A. G. Statistics on surface-enhanced resonance Raman scattering from single nanoshells. **Phys. Chem. C**, v. 115, n. 2, p. 19104-19109, Aug. 2011.

151 BROWN, L. D.; CAI, T. T.; DASGUPTA, A. Interval estimation for a binomial proportion. **Stat. Sci.**, v. 16, n. 2, p. 101-133, Sept. 2001.

152 AGRESTI, A.; COULL, B. A. Approximate is better than “exact” for interval estimation of binomial proportions. **Am. Stat.**, v. 52, n. 2, p. 119-126, May 2001.

153 COHEN, J. **Statistical power analysis for the behavior sciences**. 2nd ed. Michigan: Lawrence Erlbaum, 1988. 474 p.

154 HEREIBER, F. R. Structure and growth of self-assembling monolayers. **Prog. Surf. Sci.**, v. 25, n. 3, p. 151-256, Oct. 2000.

155 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. **Chem. Rev.**, v. 105, n. 4, p. 1103-1169, Jan. 2005.

[156] LEE, J.; CHOI, I.; YEO, W-S. Preparation of gradient surfaces by using a simple chemical reaction and investigation of cell adhesion on two components gradient. Chem. Eur. J.,v.19, n.18, p. 5609-5616, Apr. 2013.

157 MENDES, R. K. **Investigação dos efeitos dos procedimentos de imobilização em monocamadas auto-organizadas da enzima peroxidase no desenvolvimento de um biossensor**. 2006. 128 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

158 WEST, P.; EATON, A. **Atomic force microscopy**. Oxford: Oxford University Press, 2010. 256 p.

159 OLIVEIRA, R. M.; FERREIRA, J.; SANTOS, M. J. L.; FARIA, R. M.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Probing the functionalization of gold surfaces and protein adsorption by PM-IRRAS. **Chem. Phys. Chem.**, v. 12, n. 2, p. 1736-1740, Apr. 2011.

160 DOGLIA, S. M. Protein aggregation studied in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy. In: UVERSKY, V. N.; PERNNYAKOV, E. E. A. (Ed.). **Methods in protein structure and stability analysis**: vibrational spectroscopy. New York: Nova Science, 2007. Chap. 7, p. 249-265.

161 MAHMOUD, M. A.; O´NEIL, D.; EL-SAYED, M. Shape and symmetry-dependent mechanical properties of metallic gold and silver on the nanoscale. **Nano Let.**, v. 14, n. 2, p. 743-748, Sept. 2014.

162 SAHA, K.; AGASTI, S. S.; LI, K. X.; ROTELLO, V. M. Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. **Chem. Soc.**, v. 112, n. 2, p. 2739-2779, Feb. 2012.

163 SENEY, C. S.; GUTZMAN, B. M.; GODDARD, R. U. Correlation of size and surface-enhanced Raman scattering activity of optical and spectroscopic properties for silver nanoparticles. **J. Phys. Chem. C**, v. 113, n. 2, p. 74-80, Oct. 2009.

164 YANG, J.; PALLA, M.; BOSCO, F. G.; RINDZEVICIUS, T.; ALSTRON, T.S.; SCHIMDT. M. S.; BOISEN, A.; LU, J.; LIN, Q. Surface-enhanced Raman spectroscopy based quantitative bioassay on aptamer-functionalized nanopillars using large-area Raman mapping. **ACS Nano**, v. 7, n. 6, p. 5350-5359, May 2013.

165 LEE, M.; LEE, S.; LEE, J.-H.; LIM, H.-W.; SEONG, G. H.; LEE, E. K.; CHANG, S-L.; OH, C. K.; CHOO, J. Highly reproducible immunoassay of cancer markers on a gold-patterned microarray chip using surface-enhanced Raman scattering imaging. **Biosens. Bioelectron.**, v. 26, n. 5, p. 2135-2141, Jan. 2011.

166 MAHER, R. C. SERS hot spots. In: KUMAR, C. S. S. R. (Ed.). **Raman spectroscopy for nanomaterials characterization**. New York: Springer, 2012. Chap. 10, p. 215-260.

167 FRITZ, C. O.; MORRIS, P. Effect sizes estimates: current use, calculations and interpretation. **J. Exp. Psychol.**, v. 141, n. 4, p. 2-18, Aug. 2012.

168 WEL, Q.; BECHERER, T.; ANGIOLETTI-UBERTI, S.; DZUBIELLA, J.; WISCHKE, C.; HAAG, R. Protein interactions with polymer coatings and biomaterials. **Angew. Chem. Int. Edit.**, v. 53, n. 31, p. 8004-8031, July 2014.

169 GENNES, P. G. de. Polymers at an interface: a simplified view. **Adv. Colloid Interface Sci.**, v. 27, n. 2, p.189-209, July 1987.

170 WU, J.; WANG, Z.; CHEN, S. Investigation of the interaction between poly (ethylene glycol) and protein molecules using low field nuclear magnetic resonance. **Acta Biomater.**, v. 9, n. 5, p. 6414-6420, May 2013.

171 JEON, S. I.; LEE, J. H.; ANDRADE, J. D.; GENNES, P. G. de. Protein-surface interactions in the presence polythilene oxide-effect of protein size. **J**. **Colloid Inter. Sci.**, v. 142, n. 1 p. 159-166, Aug. 1991.

172 MUNOZ, E. V.; YU, H.; HALLOCK, J.; EDENS, E.; LINHARD, R. J. Poly(ethylene glycol)-based biosensor chip to study heparin–protein interactions. **Anal Biochem.**, v. 343, n. 1, p. 176-178, Aug. 2005.

173 HYOTYLA, J. T.; DENG, J.; LIM, R. Y. H. Synthetic protein targeting by the intrinsic biorecognition functionality of poly(ethylene glycol) using peg antibodies as biohybrid molecular adaptors. **ACS Nano**, v. 5, n. 6, p. 5180-5187, May 2011.

174 JASTY, S.; GRAHAM, D.; BOECKL, M. Molecular self monolayer. **Mat. Sci.**, v. 1, n. 2, p. 3-7 Apr. 2006.

175 LI, S.-S.; XU, L.-P.; WANG, L.-J.; WANG, S.-T.; JIANG, L. Time-dependent organization and wettability of decanethiol self-assembled monolayer on au(111) investigated with STM. **J. Phys. Chem. B**, v. 110, n. 2, p. 1794-1799, Nov. 2006.

176 KLEINMAN, S.; FRONTIERA, R.; HENRY, A.-I.; DIERINGER, J. A.; VAN DUYNE, R. P. Creating, characterizing, and controlling chemistry with SERS hot spots. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 15, n. 1, p. 21-36, Sept. 2013.