



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**BIOELETRODO PARA DETECÇÃO DA AMILASE SALIVAR HUMANA**

**Aluna: Tatiane Vanessa da Silva Santos**

**Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola**

**Co-Orientadora: Prof. Dra. Ana Graci Brito Madurro**

**Uberlândia-MG  
2010**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

## **BIOELETRODO PARA DETECÇÃO DA AMILASE SALIVAR HUMANA**

**Aluna: Tatiane Vanessa da Silva Santos**

**Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola**

**Co-Orientadora: Prof. Dra. Ana Graci Brito Madurro**

**Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Uberlândia como parte dos  
requisitos para obtenção do  
Título de Mestre em Genética e  
Bioquímica (Área Bioquímica)**

**Uberlândia-MG  
2010**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

---

- S237b Santos, Tatiane Vanessa da Silva, 1984-  
Bioeletrodo para detecção da alfa amilase salivar humana  
[manuscrito] / Tatiane Vanessa da Silva Santos. - 2010.  
67 f. : il.
- Orientador: Foued Salmen Espíndola.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.  
Inclui bibliografia.
1. Enzimas - Teses. 2. Amilase - Teses. I. Espíndola, Foued Salmen.  
II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação  
em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.15

---

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

## BIOELETRODO PARA DETECÇÃO DA AMILASE SALIVAR HUMANA

**ALUNA:** Tatiane Vanessa da Silva Santos

### COMISSÃO EXAMINADORA

**Presidente:** Prof.Dr. Foued Salmen Espindola (Orientador)

**Examinadores:**

**Frank Nelson Crespilho**

**João Marcos Madurro**

**Data da Defesa:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

---

Foued Salmen Espindola

## ***Dedicatória***

*À Deus e Nossa Senhora Aparecida por me fortalecer perante aos obstáculos e me ajudar a permanecer firme na fé para conseguir alcançar essa vitória. Aos meus avós, João Bezerra (in memorian) e Olivina (in memorian) por me ensinarem a essência da vida, pelo amor incondicional durante todos os momentos que passamos juntos e pelo grande incentivo no início dessa caminhada. Aos meus amados e queridos pais Vanderlei e Magna por abdicar dos seus próprios sonhos para a realização dos meus, pelo amor, dedicação, confiança e incentivo depositado em mim em todos os momentos da minha vida. À minha amada irmã Talita pelo carinho, companhia durante esses dois anos e por ter sido além de irmã uma grande amiga. À minha querida tia Magda pelo carinho, amor e por sempre estar ao meu lado acreditando e torcendo para que eu alcance meus ideais. Ao meu amor, amigo e companheiro de todas as horas Regis Rezende, pela sua dedicação, amor, carinho, paciência, por sempre me ouvir, acreditar no meu trabalho e me amparar nos momentos de desespero e dificuldade.*

*À todos vocês, amores da minha vida, dedico esta vitória, todo meu trabalho e esforço.*

## **Agradecimentos**

*À Deus e Nossa Senhora Aparecida, pelo dom da vida, por iluminar os meus caminhos durante essa caminhada, por me fortalecer perante às dificuldades e sempre atender as minhas preces.*

*Aos meus amados avós, João Bezerra e Olivina, pessoas magníficas, simples, humildes, que foram o meu maior incentivo no início dessa jornada e que serão eternamente o meu exemplo de vida. Obrigada pelos ensinamentos de fé, sabedoria, amor, carinho, dedicação e confiança durante toda a nossa convivência. Deus nos separou, mas sinto a presença de vocês no meu coração e na minha vida iluminando e abençoando os meus caminhos. A vocês o meu eterno agradecimento.*

*Aos meus queridos pais, Vanderlei e Magna, que sempre dedicaram e sacrificaram as suas vidas para a realização dos meus sonhos. Sempre me incentivaram a erguer e lutar para que eu alcançasse meus objetivos perante tantos obstáculos nesses dois anos. Obrigada por terem sido meus amigos, minha fortaleza, pelo amor, carinho e por tudo que fizeram para a minha formação.*

*À minha irmã e amiga, Talita Cristina, que esteve comigo compartilhando todos os momentos dessa fase da minha vida. Obrigada pelo seu amor, carinho e ótima companhia nesses dois anos.*

*À minha tia, Magda Cristina, que sempre me incentivou a lutar pelos meus sonhos. Obrigada pelo seu amor, carinho e por sempre estar ao meu lado me ajudando em tudo que preciso.*

*Ao meu tio, Carlos Magno, que sempre me encorajou nos meus estudos e acreditou no meu trabalho. Obrigada pela confiança e carinho.*

*À Zuleida e Euder, obrigada por terem sido além de sogra e sogro grandes amigos com quem eu pude contar sempre que precisei. Obrigada por me receber em suas vidas como filha, pelo carinho, amor, dedicação, confiança e principalmente pelas orações.*

*Ao Weder e Márcia, obrigada pelas orações, carinho e por acreditarem no meu trabalho.*

*Ao meu amor, Regis Rezende, que além de namorado, é um grande companheiro e amigo que me ajudou a superar muitos momentos de desespero, angústias, tristezas e dúvidas. Obrigada pelo seu amor, dedicação, paciência e pela grande compreensão durante a minha ausência. Obrigada por me proporcionar tantos momentos alegres e felizes, por sempre me incentivar a crescer e lutar pelos meus ideais, por me fazer acreditar no meu potencial e principalmente por nunca me deixar perder a fé.*

*À Profa. Dra. Rosy Iara Maciel Azambujo Ribeiro por me ensinar o caminho da ciência, pela confiança, pelas oportunidades, por toda sua dedicação e persistência para que eu continuasse os meus estudos.*

*Ao meu orientador, Prof. Dr. Foued Salmen Espindola, pela oportunidade, confiança e contribuição científica para a realização deste trabalho.*

*À minha co-orientadora, Profa. Dra. Ana Graci Brito Madurro, pela receptividade em seu laboratório, pelas grandes contribuições científicas, pela confiança, por me incentivar e acreditar no meu trabalho.*

*Ao Prof. Dr. João Marcos Madurro, pela parceria, incentivo, confiança, e contribuição científica para o desenvolvimento deste trabalho.*

*À Renata Roland Teixeira, pelos ensinamentos científicos, dedicação, paciência e otimismo no decorrer desses dois anos. Por ter sido além de companheira de trabalho uma grande amiga. Por sempre encontrar uma solução para me fazer seguir em frente perante os vários obstáculos encontrados nessa caminhada. Nessa fase de nossas vidas construímos uma história e especialmente uma bela e sincera amizade. Obrigada por tudo que fez por mim para a realização desse trabalho.*

*Ao Diego Leoni Franco, pela paciência em me ensinar eletroquímica, pelas ideias e sugestões, por nunca me deixar desanimar perante as dificuldades encontradas, por toda sua dedicação, esforço, trabalho e pelas excelentes contribuições científicas para a realização e conclusão desse estudo.*

*Ao Miguel Diaz e Olga Lucia, obrigada por terem sido ótimos amigos e companheiros de laboratório, por me ajudar nos experimentos, pelas sugestões e incentivo durante esses dois anos.*

*À Neire Moura pelas contribuições nos experimentos e por me ajudar sempre que precisei.*

*Ao Lucas Franco Ferreira, pelos ensinamentos técnicos e científicos de impedância eletroquímica, pelas sugestões e por sempre ter me ajudado nos momentos que precisei.*

*Ao Érick França, pelas sugestões e importante contribuição na confecção dos polímeros durante o desenvolvimento do trabalho.*

*Aos companheiros do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular -LABIBI, que sempre estiveram prontos a me ajudar na rotina de laboratório.*

*Aos colegas do Laboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia – LAFIP/NANOTEC pela ótima receptividade e por toda ajuda que me prestaram durante os experimentos.*

*Aos técnicos do LABIBI, Ismair, Renata e Zilé por facilitarem o meu trabalho da melhor forma possível.*

*Ao Gerson Fraissat pela paciência e disponibilidade sempre que precisei.*

*Aos funcionários e professores do Instituto de Genética e Bioquímica pela colaboração*

*Ao CNPQ, UFU, Pro Biotec e FAPEMIG pelo apoio financeiro.*

*A vocês o meu sincero e eterno agradecimento. Muito obrigada.*

## Sumário

|                                                                                           |        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Capítulo I .....                                                                          | 2      |
| 1. Saliva Humana: características gerais e composição.....                                | 3      |
| 2. Alfa amilase salivar humana .....                                                      | 5      |
| 3. Anticorpos policlonais .....                                                           | 9      |
| 4. Biossensores.....                                                                      | 11     |
| 4.1. Aspectos gerais .....                                                                | 11     |
| 4.2. Utilização de filmes poliméricos para o desenvolvimento do biossensor...             | 13     |
| 4.3. Tipos de Biossensores.....                                                           | 14     |
| 4.3.1. Biossensores com DNA .....                                                         | 14     |
| 4.3.2. Biossensores enzimáticos .....                                                     | 15     |
| 4.3.3. Imunossensores.....                                                                | 15     |
| 4. 4. Aplicabilidade dos biossensores.....                                                | 17     |
| 5. Referências bibliográficas .....                                                       | 19     |
| <br>Capítulo II .....                                                                     | <br>34 |
| Resumo .....                                                                              | 35     |
| Abstract .....                                                                            | 36     |
| 1. Introduction .....                                                                     | 37     |
| 2. Experiments .....                                                                      | 38     |
| 2.1. Chemicals .....                                                                      | 38     |
| 2.2. Apparatus .....                                                                      | 39     |
| 2.3. Preparation of the enriched fraction of human salivary alpha-amylase<br>(HSAf) ..... | 39     |
| 2.4. Peptide mass fingerprinting (PMF).....                                               | 40     |
| 2.5. Database search.....                                                                 | 40     |
| 2.6. Purification and characterization of the polyclonal antibody (anti-HSAf) ....        | 40     |
| 2.7. Functionalization of graphite electrode surface with poly(3-HPA) .....               | 41     |
| 2.8. Modification of the modified electrode surface with anti-HSAf antibody.....          | 41     |
| 2.9. Interaction antigen–antibody (Ag–Ab) on the electrode modified.....                  | 41     |
| 2.10. Interferent study .....                                                             | 41     |
| 3. Results and Discussion .....                                                           | 41     |

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1. Preparation of the enriched fraction of human salivary alpha-amylase (HSAf) ..... | 41 |
| 3.2. Purification and characterization of the polyclonal antibody.....                 | 42 |
| 3.3 Electrochemical Impedance Spectroscopy study of the modified electrodes .....      | 43 |
| 3.4. Interferent study .....                                                           | 44 |
| 4. Conclusion.....                                                                     | 45 |
| 5. Acknowledgments .....                                                               | 45 |
| 6. Figures and Tables.....                                                             | 46 |
| 7. References .....                                                                    | 54 |

## **Apresentação**

A alfa-amilase salivar humana (HSA) representa 10-20% do teor de proteína total produzido pelas glândulas salivares sendo principalmente sintetizada pelas glândulas parótidas. A função principal da HSA é catalisar a hidrólise de ligações glicosídicas do amido em maltose e dextrinas. Por outro lado, diversos estudos avaliam diferenças na concentração e atividade da HSA com o objetivo de utilizá-la como possível biomarcador para o diagnóstico precoce e acompanhamento de algumas doenças humanas, como por exemplo, o *diabetes mellitus* tipo II, insuficiência renal, síndrome de Down, câncer oral e condições de estresse físico e psicológico. Os métodos convencionais de *Western Blotting* e imunoensaioenzimático (ELISA) são utilizados para determinação da concentração da amilase salivar. Entretanto, algumas doenças humanas necessitam de um diagnóstico precoce para o sucesso do tratamento e métodos altamente sensíveis são necessários para mensurar marcadores de baixos níveis que estão presentes durante as fases iniciais da doença. Desta forma, o desenvolvimento de biossensores é uma alternativa para obtenção de diagnósticos clínicos e laboratoriais realizando análises ultra-sensíveis, precisas, rápidas, não invasivas e em tempo real. Sendo assim, o desenvolvimento deste trabalho tem como objetivo desenvolver um imunossensor impedimétrico para mensuração da alfa-amilase salivar humana com alta especificidade e sensibilidade.

## **Capítulo I**

### **Fundamentação Teórica**

## **1. Saliva Humana: características gerais e composição**

A saliva é uma secreção glandular que é essencial na manutenção da saúde dos tecidos orais. Esse fluido corporal é derivado das secreções dos três principais pares de glândulas salivares (parótida, submandibular e sublingual), de numerosas glândulas salivares menores e fluidos gengivais (EDGAR, 1992, AMERONGEN; VEERMAN, 2002, DODDS; JOHNSON; YEH, 2005).

A secreção salivar é controlada pelo sistema nervoso autônomo via sistemas de transdução de sinal que estimulam mecanismos de transporte de íons e de proteínas secretoras. Os volumes de saliva produzidos variam dependendo do tipo e intensidade da estimulação (DODDS; JOHNSON; YEH, 2005). Alguns fatores como, por exemplo, hipossalivação, xerostomia, radioterapia na região da cabeça e pescoço, medicamentos como os anti-hipertensivos, antidepressivos e anti-histamínicos proporcionam diminuição do fluxo salivar causando alguns desconfortos para os pacientes tais como, dores na língua e mucosa, problemas com o paladar, deglutição, mastigação, fonação, cárie dentária e aumento de infecção (AXELL, 1992, VALDEZ; FOX, 1993).

A saliva é constituída por água e uma mistura complexa de proteínas, enzimas, hormônios, íons e outros compostos. Em relação ao conteúdo protéico, podemos destacar a amilase, lipase, aldolase, anidrase carbônica, mucinas, histatinas, imunoglobulinas, lisozima, lactoferrina, lactoperoxidase, cistatinas, proteínas ricas em prolina, albumina, fibronectina e cromogranina A. Estes componentes salivares apresentam importantes funções biológicas. Dentre elas, a lubrificação, proteção e cicatrização da mucosa, auxílio no início da digestão, regulação da adesão bacteriana, atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, neutralização de taninos, remineralização dos dentes e manutenção do sistema tamponante (HUQ *et al.*, 2007, DENNY *et al.*, 2008, SCHIPPER; SILLETTI; VINGERHOEDS, 2007).

O conteúdo protéico presente na saliva não só desempenha um papel importante em manter a homeostase da cavidade oral, mas também tem sido estudado como possível marcador biológico para detecção de doenças humanas como cânceres, doenças autoimunes, patologias bucais, doenças virais, algumas síndromes e estresse psicológico (HU *et al.*, 2007, RYU *et al.*, 2006,

STEGEREN; WOLF; KINDT, 2008, DOWLING *et al.* , 2008). A utilização desses componentes salivares como diagnóstico de várias patologias é de grande interesse científico, principalmente pela facilidade no procedimento de coleta, que não é invasivo, não necessita de profissional qualificado para execução, não causa dor e nem incômodo aos pacientes como ocorre nas coletas de sangue.

A saliva tem sido alvo para diversas análises proteômicas com o objetivo de caracterizar os constituintes protéicos salivares, além de contribuir na busca de novos biomarcadores para diferentes patologias (HU *et al.* , 2005, 2007). Ryu *et al.* (2006) analisaram o proteoma salivar de indivíduos portadores da Síndrome de Sjogren e de indivíduos saudáveis e identificaram um aumento significativo de  $\beta$ -2 microglobulina, lactoferrina, imunoglobulinas de cadeia leve  $\kappa$ , receptor Ig poliméricos, lisozima C e cistatina C nos pacientes com Síndrome de Sjogren. Por outro lado, verificaram uma redução da amilase, anidrase carbônica VI e duas proteínas ricas em prolina. Essas proteínas estão sendo estudadas como possíveis marcadores para essa síndrome (BALDINI *et al.* , 2008).

A saliva representa um fluido promissor no diagnóstico para a triagem de doença periodontal. Vários mediadores de inflamação crônica e destruição tecidual têm sido detectados em saliva total de pacientes com periodontite. Alfa<sub>2</sub>-macroglobulina,  $\beta$ -glicorunidade, proteína C reativa e cathepsina G são indicadores que apresentaram níveis elevados na saliva total de pacientes com doença periodontal comparado ao grupo controle (LAMSTER *et al.* , 2003, PEDERSON *et al.* , 1995, CHRISTODOULIDES *et al.* , 2005).

A função da saliva para diagnóstico de doenças sistêmicas é também evidente na pesquisa de alguns tipos de cânceres. Nagler *et al.* (2006) verificaram três marcadores tumorais (CYFRA21-1, antígeno polipeptídico tecidual (TPS) e antígeno do câncer (CA125)) na saliva de pacientes com carcinoma de célula escamosa oral. Outro estudo verificou correlação entre auto-anticorpos p53 na saliva com os níveis séricos em pacientes com carcinoma de célula escamosa, sendo que esses anticorpos p53 presentes na saliva podem ser utilizados como um marcador específico para a detecção desse tipo de carcinoma (TAVASSOLI *et al.* , 1998).

Outros estudos identificaram o oncogene c-erbB-2 como sendo uma ferramenta importante no diagnóstico de tumores malignos em tecidos mamários.

Streckfus *et al.* (2000) evidenciaram que os fragmentos solúveis do oncogene c-erbB-2 e o antígeno de câncer (15-3) foram significativamente elevados na saliva e no soro de mulheres com câncer quando comparados à saliva e o soro de pacientes sadios e pacientes com tumores benignos. Dessa forma, o teste salivar para detecção do oncogene c-erbB-2 é sensível, confiável e potencialmente útil no diagnóstico inicial e no acompanhamento do câncer de mama (STRECKFUS *et al.* , 2001).

Além dessas aplicações, a saliva humana também está sendo utilizada na realização de testes para detecção de anticorpos contra o HIV. O monitoramento das cargas de HIV através de testes pela saliva representa uma alternativa não invasiva em relação à quantificação desses anticorpos no sangue e auxilia na identificação de altos níveis de HIV na cavidade oral que podem colocar o paciente em risco de transmissão do vírus por via oral (LAWRENCE, 2002).

Desta forma, a saliva representa uma alternativa promissora para avanços nas técnicas de diagnóstico não invasivo de diversas patologias. Dentre os componentes salivares mais investigados está a alfa-amilase salivar, já que esta representa 10-20% do teor de proteína total produzido pelas glândulas salivares, sendo principalmente sintetizada pelas glândulas parótidas (ZAKOWSKI; BRUNS, 1985).

## **2. Alfa-amilase salivar humana**

A alfa-amilase salivar humana (HSA) é uma enzima produzida pelas células acinares serosas das glândulas parótidas e submandibulares. A HSA é uma proteína da família das hidrolases sendo encontrada na saliva nas formas glicosilada (aproximadamente 62 kDa) e não-glicosilada (aproximadamente 55 kDa). Essa proteína monomérica é constituída de 496 resíduos de aminoácidos, sendo que a estrutura tridimensional (Figura 1) consiste de três domínios A, B e C, onde se encontram os sítios ligantes de cálcio e cloro (RAMASUBBU *et al.* , 1996).

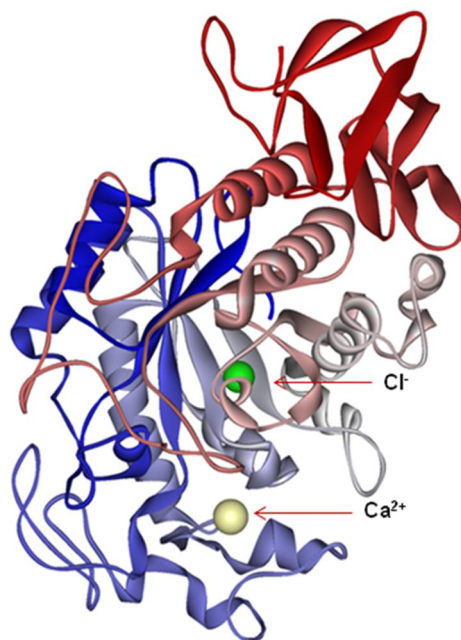


Figura 1. Representação esquemática adaptada da cadeia polipeptídica da alfa amilase salivar humana. A figura indica as localizações dos sítios ligantes de cloro e cálcio. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?pdbId=1SMD>>

O domínio A é constituído de oito cadeias  $\beta$ -barril paralelas rodeadas por um concêntrico cilindro de segmentos alfa-helicoidais e é constituído pelos resíduos 1-99, 170-404. Esse domínio possui o sítio ativo da HSA e alfa-amilases de mamíferos, apresentando um formato de fundo V (BRAYER; LUO; WITHERS, 1995, RAMASUBBU; RAGUNATH; MISHRA, 2003). O sítio ativo é dividido em subsítios ligantes de glicanos e aglicanos (RAMASUBBU; RAGUNATH; MISHRA, 2003), sendo que nessa região duas substituições nos resíduos da HSA podem afetar a ligação do substrato. Na proximidade desta substituição estão os resíduos de Arg 195, onde se liga o íon cloro; Asp 197, onde está o resíduo catalítico e His 201, onde se encontra o sítio ligante de cálcio, que possui a função de estabilizar a estrutura do domínio B (BRAYER; LUO; WITHERS, 1995). O domínio B é constituído a partir dos resíduos 100-169 ocorrendo entre a terceira cadeia  $\beta$  e a  $\alpha$ -hélice da  $\beta$ -barril central do domínio A. O domínio C ocorre a partir dos resíduos 405-496 e forma uma estrutura  $\beta$ -barril antiparalela e é um domínio independente (RAMASUBBU *et al.*, 1996, RAMASUBBU; RAGUNATH; MISHRA, 2003, BRAYER; LUO; WITHERS, 1995). Além disso, em termos de

seqüência primária, o domínio C é o mais variável entre as alfa-amilases de diferentes origens (MACGREGOR, 1988, JESPERSEN *et al.* , 1993).

A função principal da HSA é catalisar a hidrólise de ligações glicosídicas do amido em maltose e dextrinas. Além disso, essa enzima é utilizada como receptor de bactérias na cavidade oral. Várias espécies de estreptococos orais, tais como *Streptococcus gordonii*, se ligam à HSA imobilizada na superfície da hidroxiapatita contribuindo para a formação da placa dental. A HSA ligada às bactérias mantém a atividade enzimática e os produtos podem ser utilizados pelas bactérias como fonte de alimento e metabolizado em ácido láctico. Essa produção de ácido localizada pode levar à dissolução do esmalte, levando à formação da cárie dentária (SCANNAPIECO; TORRES; LEVINE, 1995, RAMASUBBU; RAGUNATH; MISHRA, 2003). Por outro lado, diversos estudos avaliam diferenças na concentração e atividade da HSA com o objetivo de utilizá-la como possível biomarcador para o diagnóstico precoce e acompanhamento de algumas doenças humanas, como por exemplo, o *diabetes mellitus* tipo II, insuficiência renal, síndrome de Down, câncer oral, esquizofrenia e estresse psicológico (AYDIN, 2007, TOMÁS *et al.* , 2008, SHPITZER *et al.* , 2007, SIQUEIRA; NICOLAU, 2002, NATER *et al.* , 2005, INAGAKI *et al.* , 2010).

A saliva de pacientes diabéticos está sendo investigada com o objetivo de determinar um biomarcador para o acompanhamento da doença (LÓPEZ *et al.* , 2003). Dentre as proteínas estudadas, a concentração da alfa-amilase salivar apresentou diferença significativa em pacientes diabéticos obesos e não obesos quando comparado a indivíduos saudáveis, além de apresentar correlação com o nível glicêmico (AYDIN, 2007, DODDS; DODDS, 1997).

A composição bioquímica da saliva também está sendo analisada em pacientes com insuficiência renal crônica e insuficiência renal na fase terminal. Dentre os parâmetros estudados, a HSA apresentou-se elevada em pacientes com insuficiência renal na fase terminal (TOMÁS *et al.* , 2008). Outra aplicação dessa enzima foi evidenciada no estudo de Shirasaki *et al.* (2007), no qual foi verificada uma correlação significativa entre os níveis de HSA e a escala de dor em pacientes que apresentavam dores crônicas.

Por outro lado, uma redução significativa na concentração da HSA pode ser evidenciada na saliva de pacientes que apresentam carcinoma de células

escamosas orais (SHPITZER *et al.* , 2007). Níveis baixos dessa enzima também são encontrados em saliva de crianças portadoras da síndrome de Down, em pessoas que consumiram bebida alcoólica, em pacientes que apresentam hipossalivação induzida por radioterapia e em fumantes (SIQUEIRA; NICOLAU, 2002, ENBERG *et al.* , 2001, ALMSTÅHL; WIKSTRÖM; GROENINK, 2001, NAGLER *et al.* , 2000).

Além disso, a HSA tem sido utilizada no monitoramento da ativação do sistema nervoso simpático adrenomedular (SAM) em resposta a situações de estresse (GRANGER *et al.* , 2007, NATER *et al.* , 2005, ROHLEDER *et al.* , 2006). Níveis elevados dessa enzima são encontrados em indivíduos submetidos a uma sessão de vídeos estressantes (TAKAI *et al.* , 2004, 2007), uma tarefa mental aritmética (NOTO *et al.* , 2005), um pré- exame (BOSCH *et al.* , 2003), um salto de pára-quedas (CHATTERTON *et al.* , 1997), uma apresentação oral em público (FILAIRE *et al.* , 2009) e um simulador de direção no trânsito (YAMAGUCHI; WAKASUGI; SAKAKIMA, 2006). van Stegeren *et al.* (2006) realizaram um estudo utilizando um grupo experimental que ingeriu propanolol (betabloqueador adrenérgico) e outro grupo controle- placebo, submetidos a uma situação de estresse e repouso. Enquanto o grupo placebo apresentou um aumento substancial de HSA subsequente ao teste de estresse, a resposta da enzima para o grupo que ingeriu o propanolol foi atenuada. Esses estudos indicam que o sistema nervoso autônomo tem função importante na secreção da HSA, uma vez que essa enzima é altamente sensível às mudanças relacionadas ao estresse. Além disso, a liberação de alfa amilase é regulada por inervação autonômica da glândula salivar (Turner e sugya, 2002) e agonistas beta-adrenérgicos têm sido capazes de estimular a liberação de alfa amilase, sem aumentar o fluxo salivar (Gallacher e Petersen, 1983). Dessa forma, a HSA pode ser utilizada como um biomarcador indireto para estresse psicológico.

A alfa-amilase salivar humana também possui correlação com o limiar anaeróbio em indivíduos submetidos a um teste ergométrico. A concentração da enzima aumenta de acordo com o incremento de carga e retorna ao nível basal após o exercício físico. No momento de exaustão do estresse físico ocorre um pico de maior concentração dessa enzima (CALVO *et al.* , 1997, OLIVEIRA *et al.* , 2010a). Chatterton *et al.* (1996) verificaram níveis elevados de HSA em

indivíduos que participaram de uma corrida e de um exercício em bicicleta. Outro estudo investigou componentes salivares antes, durante e 1 h após uma maratona de 2 horas e a HSA aumentou significativamente devido a intensidade da atividade física, mantendo-se elevada até 1 h após a maratona (LJUNGBERG *et al.* , 1997). Dessa forma, a HSA está sendo utilizada como possível indicador do limiar anaeróbio e biomarcador de estresse físico em diferentes modalidades de exercícios.

A determinação quantitativa da HSA e de outros constituintes da saliva é realizada através de técnicas, tais como o ensaio imunoenzimático (ELISA) e *Western Blotting* (CALABOZO *et al.* , 2001, CHEUNG *et al.* , 2002, VERDOLIVA; BASILE; FASSINA, 2000). Nessas pesquisas, os anticorpos policlonais são uma ferramenta fundamental, pois interagem de forma específica e sensível com a substância alvo (SHIN; HAYASAWA; LONNERDAL, 2001).

### **3. Anticorpos policlonais**

As imunoglobulinas (Igs) são glicoproteínas presentes no soro e fluidos teciduais de todos os mamíferos. Algumas destas Igs encontram-se nas superfícies celulares ou livres no sangue ou na linfa. Quando estão nas superfícies apresentam função de receptores, enquanto que as livres no sangue ou na linfa funcionam como anticorpos (TIZARD, 2002, TURNER, 1999).

A formação dos anticorpos policlonais (PABs) é resultado da interação de um antígeno e do receptor de imunoglobulina da superfície de alguns linfócitos B (BROWER *et al.* , 1993). Os antígenos são substâncias estranhas que estimulam uma resposta imunológica no organismo. O antígeno promove primeiramente a ativação do sistema macrofágico, seguida da ativação do sistema linfocítico estimulando a resposta imunológica primária. Nessa fase ocorre a maior formação de imunoglobulinas M, resultando na formação de células de memória B e T. Posteriormente, quando o organismo reconhecer o mesmo antígeno desenvolve-se a resposta secundária, sendo a imunoglobulina G a mais predominante nessa fase (FELDMANN, 1999). Deste modo, qualquer antígeno que apresente vários epítomos diferentes estimula o linfócito B formando assim os anticorpos policlonais (BROWER *et al.* , 1993).

Os anticorpos são importantes ferramentas utilizadas por muitos investigadores em suas pesquisas e conduziram muitos avanços na medicina (GALLACHER, 1993, GATHUMBI; USLEBER; MARTLBAUER, 2001). Em pesquisas bioquímicas e biológicas, os PABs são rotineiramente utilizados como ligantes para a preparação de colunas de imunoafinidade (SHIN; HAYASAWA; LONNERDAL, 2001) e como reagentes para a determinação qualitativa e quantitativa de moléculas através de técnicas, tais como o ensaio imunoenzimático (ELISA) e *Western Blotting* (CALABOZO *et al.* , 2001, CHEUNG *et al.* , 2002, VERDOLIVA; BASILE; FASSINA, 2000).

Várias espécies animais podem ser utilizadas para a produção de anticorpos. Os coelhos são mais frequentemente utilizados para a produção de PABs já que apresentam um tamanho conveniente, facilidade de manuseio, vida relativamente longa (5 – 8 anos) e um grande volume de anti-soro produzido (HANLY; ARTWOHL; BENNETT, 1995). A indução de anticorpos policlonais nos coelhos geralmente leva de 4 a 8 semanas, um curto período que favorece aos pesquisadores investirem na produção desses anticorpos. Além disso, o anti-soro policlonal apresenta títulos elevados permitindo utilizá-los em diferentes diluições (LEENAARS *et al.* , 1999).

Pesquisas demonstram a utilização de PABs em diferentes aplicações imunopatológicas e clínicas com a finalidade de investigação científica, diagnóstico e tratamento. A terapia passiva de imunoglobulina policlonal tem sido aplicada com sucesso para prevenir ou controlar a infecção de uma variedade de vírus, incluindo vírus varicela-zóster, vírus da hepatite A, hepatite B, hepatite C, citomegalovírus e vírus da imunodeficiência humana (HIV) (STIEHM *et al.* , 1987, ORENSTEIN *et al.* , 1981, FERREIRA; SILVEIRA, 2006, SCHARF *et al.* , 2001, MIR; BIRERDINC; YOUNOSSI, 2009).

Várias preparações de imunoglobulinas policlonais produzidas a partir de plasma de pessoas HIV- positivas, com títulos elevados de anticorpos, têm sido desenvolvidas e utilizadas na prevenção da transmissão materno-fetal ou no tratamento de casos de inoculação acidental com agulhas contaminadas por profissionais da área da saúde (SCHARF *et al.* , 2001, CAVACINI *et al.* , 2003).

Além disso, os anticorpos policlonais são ferramentas essenciais no diagnóstico de vários tipos de câncer. Estudos evidenciam que a anidrase

carbônica é frequentemente expressa em tumores humanos, desta forma essa enzima é investigada em linhagem celulares de carcinoma de mama e próstata, utilizando anticorpo policlonal anti-anidrase carbônica, para o diagnóstico da doença (LI *et al.* , 2009). O polipeptídeo protimosin  $\alpha$  também é de grande importância clínica, pois seus níveis de expressão estão associados com o diagnóstico precoce de câncer de próstata. O anticorpo policlonal anti-protimosin  $\alpha$  é utilizado para o diagnóstico da doença em técnicas de imunocitoquímica e *Western Blotting* (KLIMENTZOU *et al.* , 2008). Outros autores produziram anticorpo policlonal contra a metalotioneína 2A, que é uma proteína altamente expressa em células de câncer de mama para auxiliar o diagnóstico (MARIKAR; SUN; HUA, 2006).

Diagnósticos baseados em *Western Blotting* e imunoensaioenzimático (ELISA) são utilizados para determinação de marcadores salivares. Entretanto, estas necessitam de equipamentos sofisticados, profissionais qualificados, maior tempo para execução do procedimento, além de alto custo. Uma alternativa para diagnóstico que tem sido utilizada são os biossensores.

## **4. Biossensores**

### **4.1. Aspectos gerais**

Biossensores são dispositivos analíticos que integram a especificidade de um elemento biológico a um transdutor que converte um sinal biológico em um sinal mensurável. Os biossensores catalíticos utilizam enzimas, microorganismos ou tecidos como moléculas de bioreconhecimento. Por outro lado, os biossensores de afinidade utilizam anticorpos ou haptenos, receptores, fragmentos de DNA ou oligonucleotídeos como elementos de reconhecimento biológico (LUPPA; SOKOLL; CHAN, 2001, GOULART *et al.* , 2010).

O elemento de bioreconhecimento de um biossensor interage com o analito alvo, assegurando a seletividade e especificidade do sensor (ARYA; DATTA; MALHOTRA, 2008), sendo que a sensibilidade é altamente influenciada pelo transdutor. O transdutor quantifica um sinal resultante da interação do composto biológico com o analito alvo. Existem vários tipos de transdutores utilizados para detecção de analitos, dentre eles o eletroquímico (amperométrico,

potenciométrico e condutimétrico), óptico, piezoelétrico ou magnético (CASTILLO *et al.* , 2004), bem como diferentes técnicas de imobilização de biomoléculas.

A imobilização das biomoléculas no eletrodo é uma das etapas mais importantes na construção de um biossensor. As técnicas mais comumente utilizadas são adsorção física e ligação covalente. Entretanto, as técnicas de ligação cruzada (*Cross-linking*) e oclusão (*Entrapment*) também podem ser utilizadas.

A adsorção física é o método mais simples e rápido de imobilização, pois não exige qualquer modificação química e necessita apenas de uma solução contendo a biomolécula. Baseia-se na formação de ligações de hidrogênio, forças atrativas de Van der Waals e formação de complexos de transição de elétrons entre a sonda e o analito e a superfície da matriz. As principais vantagens da adsorção são o baixo custo e a facilidade de imobilização (JIANG *et al.* , 2008, SHARMA; SEHGAL; KUMAR, 2003).

A técnica de ligação covalente é realizada entre os grupos funcionais da biomolécula que não são essenciais para a sua atividade biológica com os grupos funcionais da superfície do eletrodo. Normalmente, a imobilização da biomolécula na superfície transdutora por intermédio da ligação covalente ocorre, por exemplo, por meio de ligações via grupos acila, tióis e diazônio. A principal vantagem dessa técnica é a ligação forte do elemento biológico com a matriz suporte (SHARMA; SEHGAL; KUMAR, 2003, GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002).

Na ligação cruzada (*crosslinking*) a interação intermolecular da biomolécula com a superfície do transdutor é feita por intermédio de compostos químicos bifuncionais ou multifuncionais como o glutaraldeído, hexametileno di-isocianato, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno, bisdiazobenzidina que têm a capacidade de ligar as biomoléculas nas superfícies sólidas dos suportes. O resultado da reação da biomolécula com um agente bifuncional forma as ligações covalentes intermoleculares. A principal vantagem do “*crosslinking*” é utilizar condições pouco agressivas tanto de pH como de tampões, mantendo a estrutura original do componente biológico (SHARMA; SEHGAL; KUMAR, 2003, CHAUBEY *et al.* , 2001).

A técnica de oclusão (*Entrapment*) é utilizada quando a biomolécula é preparada juntamente com o produto de modificação da superfície do eletrodo

como, por exemplo, poliacrilamida, amido e nylon. Esses produtos aprisionam os componentes biológicos permitindo assim a imobilização deles sobre a superfície dos transdutores (SHARMA; SEHGAL; KUMAR, 2003, YING-SING; SHI-HUI; DE-RONG, 2000, MALHOTRA; CHAUBEY; SINGH, 2006).

#### **4.2. Utilização de filmes poliméricos para o desenvolvimento do biossensor**

Uma alternativa para facilitar a imobilização das biomoléculas sobre a superfície dos eletrodos condutores são os filmes poliméricos eletropolimerizados (POURNARAS; KORAKI; PRODRAMIDIS, 2008, SAI *et al.* , 2006). Os polímeros condutores são policonjugados com propriedades eletrônicas semelhantes às dos metais que mantém as propriedades convencionais de polímeros orgânicos e podem ser sintetizados quimicamente (MCCULLOUGH, 1998) e eletroquimicamente (HEINZE, 1991).

A polimerização eletroquímica é mais utilizada em aplicações biológicas uma vez que o processo é realizado à temperatura ambiente, os eletrodos apresentam uma maior área de superfície, a espessura do filme pode ser controlada na escala de nanômetro para micrômetro e as propriedades do mesmo podem ser moduladas pela variação de condições de polimerização eletroquímica (PENG *et al.* , 2009).

A polimerização pode ser potenciométrica, amperométrica ou por uma varredura de potencial. Durante a polimerização, os monômeros são oxidados formando cátion-radicais, seguido de reações de acoplamento para formar os oligômeros que, por sua vez, levam à deposição dos polímeros na superfície do eletrodo (WALLACE; SMYTH; ZHAO, 1999, SADKI *et al.* , 2000).

Os polímeros condutores mais amplamente investigados incluem polianilina, poli(fenilenovinileno), polipirrol e politiofeno. Dentre estes, os que mais têm sido estudados são aqueles baseados em polipirrol, devido à alta condutividade, facilidade e flexibilidade durante a preparação, estabilidade e boas propriedades mecânicas (ANSARI; KEIVANI, 2006). Além do polipirrol, outros monômeros funcionais como os aminofenóis estão sendo usados na construção de biossensores. Estas estruturas podem ser classificadas como derivados dos fenóis e da anilina por apresentarem dois grupos funcionais (NH<sub>2</sub> e OH) ligados a

um anel aromático que pode ser oxidado (YAMADA *et al.* , 1995, LAPUENTE *et al.* , 1998). No processo de polimerização de aminofenóis, a posição relativa dos grupos amino e hidroxila são relevantes, pois em cada uma das posições as propriedades, tais como a estabilização do cátion-radical formado e os potenciais de oxidação, podem ser diferentes (SALAVAGIONE *et al.* , 2004).

Alguns estudos mostraram o desenvolvimento de outros filmes poliméricos derivados de 3-aminofenol ou 4-aminofenol sobre a superfície do eletrodo de grafite, utilizando as técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica e impedância (FRANCO *et al.* , 2008, VIEIRA *et al.* , 2006, BRITO-MADURRO *et al.* , 2007). Além disso, um estudo recente apresentou o desenvolvimento de um novo filme polimérico derivado do ácido-3-hidroxifenilacético sobre a superfície do eletrodo de grafite por voltametria cíclica (OLIVEIRA *et al.* , 2010b).

### **4.3. Tipos de Biossensores**

#### **4.3.1. Biossensores com DNA**

Outra abordagem para a utilização de biossensores é evidenciada no desenvolvimento destes dispositivos para DNA (genossensores) que é de grande importância para diversas áreas com aplicações em diagnósticos de DNA, análise de gene, pesquisa ambiental, descoberta de drogas, perícia e tecnologia de alimentos. O diagnóstico precoce de mutações genéticas a nível molecular abre a possibilidade da realização de tratamentos antes da manifestação dos sintomas da doença (SASSOLAS; LECA-BOUVIER; BLUM, 2008).

Os biossensores de DNA consistem da imobilização de uma fita de DNA desnaturado para detectar a sequência complementar por hibridização DNA-DNA, DNA-RNA. Esses dispositivos convertem o evento de hibridização em um sinal elétrico direto. A ocorrência da hibridização é detectada diretamente por meio da oxidação das bases nitrogenadas ou através da utilização de indicadores que intercalam entre os pares de bases do DNA. Os indicadores de hibridização podem ser mediadores, intercaladores, enzimas ou nanopartículas (SASSOLAS; LECA-BOUVIER; BLUM, 2008, TELES; FONSECA, 2008, GOULART *et al.* , 2010).

#### **4.3.2. Biossensores enzimáticos**

Algumas proteínas, como as enzimas, são muito utilizadas na confecção de biossensores. A função da enzima é selecionar o substrato presente na amostra biológica a ser analisada. A cinética da reação enzimática é monitorada pela taxa de formação de produto ou desaparecimento de um reagente. Se o produto ou reagente é eletroativo, a reação pode ser controlada por amperometria. Assim, essas reações eletroquímicas podem ser utilizadas para a construção de biossensores amperométricos (SARMA *et al.* , 2009).

No desenvolvimento de alguns biossensores enzimáticos amperométricos, o ferroceno é utilizado como mediador que transfere facilmente elétrons entre o eletrodo e o centro redox da enzima (SHARMA; SEHGAL; KUMAR, 2003). As enzimas mais utilizadas para o desenvolvimento de biossensores amperométricos são as enzimas oxirredutases (enzimas redox que produzem ou consomem elétrons), que incluem a álcool desidrogenase, aldeído desidrogenase, glicose oxidase, glutaminase, catalase, xantina oxidase, colina oxidase, urease, bilirrubina oxidase e lactato oxidase.

#### **4.3.3. Imunossensores**

Imunossensores são biossensores que utilizam as propriedades de interação entre anticorpos (Ac) e antígenos (Ag) específicos, para obter um sinal correspondente à essa interação. A construção de um imunossensor consiste da modificação de um transdutor com um material biológico que servirá como sonda (Ac ou Ag) para detecção da reação de ligação específica da sonda com o analito alvo (Ac ou Ag). Esse processo consiste de uma transferência de sinal, para responder às mudanças eletroquímicas, ópticas, espectroscópicas ou parâmetros elétricos do receptor causados pela ligação específica (RUAN; YANG; LI, 2002).

Transdutores eletroquímicos são os mais antigos e comuns métodos utilizados nos biossensores. O princípio baseia-se nas propriedades elétricas dos eletrodos que são afetados pela interação Ac-Ag. Esses transdutores podem determinar o nível do analito alvo medindo a variação de potencial, condutância, corrente ou impedância causada pela imunorreação, apresentando alta especificidade e baixos limites de detecção semelhante aos métodos de imunoensaios tradicionais (JIANG *et al.* , 2008).

Os transdutores eletroquímicos mais utilizados no desenvolvimento de imunossensores são os potenciométricos, amperométricos e impedimétricos. O imunossensores potenciométricos são baseados na mensuração de mudanças no potencial induzido pelo marcador utilizado, que ocorrem após a ligação específica do Ac-Ag. Esses imunossensores quantificam a alteração do potencial de um sistema baseado na equação de Nernst. Essas alterações estão relacionadas com a atividade específica do íon quando ocorre um evento de ligação entre antígeno-anticorpo no eletrodo em comparação a um eletrodo de referência (LUPPA; SOKOLL; CHAN, 2001, JIANG *et al.* , 2008, LEONARD *et al.* , 2003, YULAEV *et al.* , 2001, STARODUB *et al.* , 2000).

Nos imunossensores amperométricos a detecção da interação Ac-Ag é dependente da corrente gerada quando uma espécie eletroativa é oxidada ou reduzida na superfície do eletrodo. A detecção é realizada em um potencial elétrico fixo e a corrente é diretamente proporcional à ligação específica do Ac-Ag (PATEL, 2002, PRABHULKAR *et al.* , 2009, GRENNAN *et al.* , 2003).

Os imunossensores impedimétricos mensuram diferentes alterações num campo elétrico. Essas alterações podem ser mensuradas por condutividade elétrica da solução e alteração da capacitância devido à interação Ac-Ag na superfície do eletrodo. Portanto, impedância, condutância, capacitância e resistência são fatores interrelacionados que podem fornecer diferentes formas de monitoramento do sistema analisado (JIANG *et al.* , 2008).

A Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) é frequentemente utilizada para investigar as transformações e processos químicos associados a variação da condutividade em um circuito eletroquímico. Essa técnica atraiu extenso interesse para o avanço da quantificação da interação entre Ac e Ag (JIANG *et al.* , 2008, BALKENHOHL; LISDAT, 2007, RAMANAVICIUS *et al.* , 2009), visto que detecções eletroquímicas diretas são complicadas uma vez que dificilmente ambos compostos biológicos apresentam eletroatividade.

A EIE é geralmente determinada por diferentes frequências, o que permite a caracterização de superfícies, camadas ou membranas. Com a aplicação de uma tensão alternada, a corrente é forçada a fluir através de todos os componentes do sistema impedimétrico (eletrodo de trabalho, material biológico, solução e contra eletrodo) e a impedância mensurada é a soma de todas as

contribuições individuais. A partir desse resultado é realizada a construção de um circuito equivalente que geralmente consiste de resistências e capacitâncias e representa as diferentes propriedades físico-químicas do sistema analisado (LISDAT; SCHÄFER, 2008).

Vários estudos evidenciam a utilização da EIE no desenvolvimento de imunossensores. Radi *et al.* (2009) desenvolveram um imunossensor impedimétrico, utilizando o eletrodo de ouro modificado com 4-carboxifenil para a detecção da ocratoxina A, um metabólito secundário produzido por várias cepas dos fungos *Penicillium* e *Aspergillus*. Hleli *et al.* (2006) mostraram a aplicação de um imunossensor impedimétrico para detecção do pesticida atrazina, sendo que esse imunossensor apresentou alta sensibilidade e uma boa resposta linear em diferentes resistências. Outro estudo apresentou um imunossensor impedimétrico para a detecção do bisfenol A, um desregulador endócrino, a partir da ligação covalente entre um anticorpo policlonal e um grupo ácido carboxílico (RAHMAN *et al.* , 2007).

Outros autores utilizaram a EIE para a detecção de antibióticos. Wu, Lin e Wang (2009) verificaram a interação do antibiótico enrofloxacin a um anticorpo específico imobilizado sobre o eletrodo de ouro funcionalizado com ácido 11-mercapto-undecanóico e Ionescu *et al.* (2007) desenvolveram um imunossensor impedimétrico utilizando um anticorpo específico para o antibiótico ciprofloxacina imobilizado sobre o eletrodo de ouro modificado por um filme de poli(pirrol-NHS). Dessa forma, os imunossensores impedimétricos representam uma técnica interessante para disponibilizar novos métodos de detecção de diferentes substâncias para diversas áreas do conhecimento.

#### **4. 4. Aplicabilidade dos biossensores**

O desenvolvimento de biossensores é uma alternativa para obtenção de diagnósticos clínicos e laboratoriais realizando análises ultra-sensíveis, precisas, rápidas e em tempo real. Além disso, esses dispositivos têm sido utilizados como ferramentas analíticas em várias outras áreas, tais como no monitoramento ambiental, indústria de alimentos, indústria farmacêutica e genética (SHARMA; SEHGAL; KUMAR, 2003, THALER *et al.* , 2009, NAYAK *et al.* , 2009).

Algumas doenças humanas necessitam de um diagnóstico precoce para o sucesso do tratamento e métodos altamente sensíveis são necessários para mensurar marcadores de baixos níveis que estão presentes durante as fases iniciais da doença. Tais métodos devem facilitar a detecção precoce, possibilitando um aumento nas taxas de sobrevivência do paciente. Os biossensores estão sendo estudados para suprir essa necessidade na medicina fornecendo análises rápidas, sensíveis, não invasivas, além de contribuir para o tratamento e acompanhamento progressivo da doença (WANG, 2006, TANSIL *et al.* , 2005, ARMISTEAD; THORP, 2002, WANG; KAWDE, 2001, WANG *et al.* , 1997).

Desta forma, os biossensores representam uma alternativa rápida e de baixo custo para substituir e minimizar o tempo gasto em diagnóstico e análise laboratorial, uma vez que podem detectar uma variedade de moléculas biológicas com alta especificidade e sensibilidade.

## 5. Referências Bibliográficas

ARYA, S. K.; DATTA, M.; MALHOTRA, B. D. Recent advances in cholesterol biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v.23, p.1083–1100, 2008.

AMERONGEN, A. V.; VEERMAN, E. C. Saliva the defender of the oral cavity. **Oral Diseases**, v.8, p.12–22, 2002.

ALMSTÅHL, A.; WIKSTRÖM, M.; GROENINK, J. Lactoferrin, amylase and mucin MUC5B and their relation to the oral microflora in hyposalivation of different origins. **Oral Microbiology and Immunology**, v.16, p.345–352, 2001.

ANSARI, R.; KEIVANI, M. B. Polyaniline Conducting Electroactive Polymers: Thermal and Environmental Stability Studies. **Journal of Chemistry**, v.3, n.13, p.202-217, 2006.

ARMISTEAD, P. M.; THORP, H. H. Electrochemical detection of gene expression in tumor samples: overexpression of rak nuclear tyrosine kinase. **Bioconjugate Chemistry**, v.13, n.2, p.172–176, 2002.

AXELL, T. The oral mucosa as a mirror of general health or disease. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v.100, p.9-16, 1992.

AYDIN, S. A Comparison of Ghrelin, Glucose, Alpha-amylase and Protein Levels in Saliva from Diabetics. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v.40, n.1, p.29-35, 2007.

BALKENHOHL, T.; LISDAT, F. An impedimetric immunosensor for the detection of autoantibodies directed against gliadins. **The Analyst**, v.132, p.314–322, 2007.

BALDINI, C.; GIUSTI, L.; BAZZICHI, L.; LUCACCHINI, A.; BOMBARDIERI, S. Proteomic analysis of the saliva: A clue for understanding primary from secondary Sjögren's syndrome? **Autoimmunity Reviews**. v.7, p.185–191, 2008.

BOSCH, J. A.; DE GEUS, E. J.; VEERMAN, E. C.; HOOGSTRATEN, J.; NIEUW AMERONGEN, A. V. Innate secretory immunity in response to laboratory stressors that evoke distinct patterns of cardiac autonomic activity. **Psychosomatic Medicine**, v.65, n.2, p.245-258, 2003.

BRAYER, G. D.; LUO, Y.; WITHERS, S. G. The structure of human pancreatic alpha amylase at 1.8 Angstrom resolution and comparisons with related enzymes. **Protein Science**, v.4, p.1730-1742, 1995.

BRITO-MADURRO, A.; FERREIRA, L.; VIEIRA, S.; ARIZA, R.; FILHO, L.; MADURRO, J. Immobilization of purine bases on a poly-4-aminophenol matrix. **Journal of Materials Science**, v.42, n.9, p.3238-3243, 2007.

BROWER, E.; HUITEMA, M. G.; KLOK, P. A.; DEWEERD, H.; TERVAERT, J. W.; WEENING, J. J.; KALLENBERG, C. G. Antimyeloperoxidase associated proliferative glomerulonephritis: An animal model. **The Journal of Experimental Medicine**, v.177, n.4, p.905-914, 1993.

CALABOZO, B.; DUFFORT, O.; CARPIZO, J. A.; BARBER, D.; POLO, F. Monoclonal antibodies against the major allergen of *Plantago lanceolata* pollen, Pla 11: affinity chromatography purification of the allergen and development of an ELISA method for Pla 11 measurement. **Allergy**, v.56, p.429-35, 2001.

CALVO, F.; CHICHARRO, J. L.; BANDRES, F.; LUCIA, A.; PEREZ, M.; ALVAREZ, J.; MOJARES, L. L.; VAQUERO, A. F.; LEGIDO, J. C. Anaerobic threshold determination with analysis of salivary amylase. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v.22, p.553-561, 1997.

CASTILLO, J.; GÁSPAR, S.; LETH, S.; NICULESCU, M.; MORTARI, A.; BONTIDEAN, I.; SOUKHAREV, V.; DORNEANU, S. A.; RYABOV, A. D.; CSOREGI, E. Biosensors for life quality design, development and applications. **Sensor and Actuators**, v.102, n.2, p.179-194, 2004.

CAVACINI, L. A.; KUHRT, D.; DUVAL, M.; MAYER, K.; POSNER, M. R. Binding and neutralization activity of human IgG1 and IgG3 from serum of HIV-infected individuals. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v.19, n.9, p.785-792, 2003.

CHATTERTON, R. T.; VOGELSONG, K. M.; LU, Y. C.; ELLMAN, A. B.; HUDGENS, G. A. Salivary alpha-amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. **Clinical Physiology**, v.16, p.433-448, 1996.

CHATTERTON, R. T.; VOGELSONG, K. M.; LU, Y. C.; HUDGENS, G. A. Hormonal responses to psychological stress in men preparing for skydiving. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.82, n.8, p.2503-2509, 1997.

CHAUBEY, A.; GERARD, M.; SINGHAL, R.; SINGH, V. S.; MALHOTRA, B. D. Immobilization of lactate dehydrogenase on electrochemically prepared polypyrrole-polyvinylsulphonate composite films for application to lactate biosensors. **Electrochimica Acta**, v.46, n.5, p.723-729, 2001.

CHEUNG, H. Y. S.; CHAN, K. M.; NG, T. B.; CHENG, C. H. K. Production of a polyclonal antibody against recombinant goldfish prolactin and demonstration of its usefulness in a non-competitive antigen-capture ELISA. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.131, p.37-46, 2002.

CHRISTODOULIDES, N.; MOHANTY, S.; MILLER, C. S.; LANGUB, M. C.; FLORIANO, P. N.; DHARSHAN, P.; ALI M. F.; BERNARD, B.; ROMANOVICZ, D.; ANSLYN, E.; FOX, P. C.; MCDEVITT, J. T. Application of microchip assay system for the measurement of C- reactive protein in human saliva. **Lab on a Chip**, v.5, p.261-269, 2005.

DENNY, P.; HAGEN, F. K.; HARDT, M.; LIAO, L.; YAN, W.; ARELLANNO, M.; BASSILIAN, S.; BEDI, G. S.; BOONTHEUNG, P.; COCIORVA, D.; DELAHUNTY, C. M.; *et al.* The Proteomes of Human Parotid and Submandibular/Sublingual Gland Salivas Collected as the Ductal Secretions. **Journal of Proteome Research**, v.7, n.5, p.1994–2006, 2008.

DODDS, M. W.; DODDS, A. P. Effects of glycemic control on saliva flow rates and protein composition in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v.83, n.4, p.465-70, 1997.

DODDS, M. W. J.; JOHNSON, D. A.; YEH, C. Health benefits of saliva: a review. **Journal of Dentistry**, v.33, p.223-233, 2005.

DOWLING, P.; WORMALD, R.; MELEADY, P.; HENRY, M.; CURRAN, A.; CLYNES, M. Analysis of the saliva proteome from patients with head and neck squamous cell carcinoma reveals differences in abundance levels of proteins associated with tumour progression and metastasis. **Journal of Proteomics**, v.71, p.168-175, 2008.

EDGAR, W. M. Saliva: its secretion, composition and functions. **British Dental Journal**, v.172, p.305–312, 1992.

ENBERG, N.; ALHO, H.; LOIMARANTA, V.; LENANDER-LUMIKARI, M. Saliva flow rate, amylase activity, and protein and electrolyte concentrations in saliva after acute alcohol consumption. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v.92, n.3, p.292-298, 2001.

FELDMANN, Marc. Cooperação celular na resposta por anticorpo. In: ROITT, Ivan; BROSTOFF, Jonathan; MALE, David. **Imunologia**. São Paulo: Manole, 1999. cap.11, p.139-153.

FERREIRA, C. T.; SILVEIRA, T. R. Viral hepatitis prevention by immunization. **The Journal of Pediatrics**, v.82, n.3, p.55-66, 2006.

FILAIRE, E.; DREUX, B.; MASSART, A.; NOURRIT, B.; RAMA, L. M.; TEIXEIRA, A. Salivary alpha-amylase, cortisol and chromogranin A responses to a lecture: impact of sex. **European Journal of Applied Physiology**, v.106, p.71-77, 2009.

FRANCO, D. L.; AFONSO, A. S.; VIEIRA, S. N.; FERREIRA, L. F.; GONÇALVES, R. A.; BRITO-MADURRO, A. G., MADURRO, J. M. Electropolymerization of 3-aminophenol on carbon graphite surface: Electric and morphologic properties. **Materials Chemistry and Physics**, v.107, p.404-409, 2008.

GALLACHER, G. Polyclonal catalytic antibodies. **Biochemical Society Transactions**, v.21, p.1087-1090, 1993.

GALLACHER, D.V.; PETERSON, O.H. Stimulus–secretion coupling in mammalian salivary glands. **International review of physiology**. v.28, p.1-52, 1983.

GATHUMBI, J. K.; USLEBER, E.; MARTLBAUER, E. Production of ultrasensitive antibodies against aflatoxin B1. **Letters in Applied Microbiology**, v.32, p.349-351, 2001.

GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Application of conducting polymers to biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v.17, n.5, p.345-359, 2002.

GRANGER, D. A.; KIVLIGHAN, K. T.; EL-SHEIKH, M.; GORDIS, E. B.; STROUD, L. R. Salivary alpha-amylase in biobehavioral research: recent developments and applications. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1098, p.122-144, 2007.

GRENNAN, K.; STRACHAN, G.; PORTER, A. J.; KILLARD, A. J.; SMYTH, M. R. Atrazine analysis using an amperometric immunosensor based on single-chain antibody fragments and regeneration-free multi-calibrant measurement. **Analytica Chimica Acta**, v.500, p.287–298, 2003.

GOULART, L. R.; VIEIRA, C. U.; FRESCHI, A. P. P.; CAPPARELLI, F. E.; FUJIMURA, P. T.; ALMEIDA, J. F.; FERREIRA, L. F.; GOULART, I. M. B.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. Biomarkers for Serum Diagnosis of Infectious Diseases and Their Potential Application in Novel Sensor Platforms. **Critical Reviews in Immunology**, v.30, n.2, p.201-222, 2010.

HANLY, W. C.; ARTWOHL, J. E.; BENNETT, B. T. Review of Polyclonal Antibody Production Procedures in Mammals and Poultry. **Institute for Laboratory Animal Research**, v.37, n.3, 1995.

HEINZE, J. Electrochemistry of conducting polymers. **Synthetic Metals**, v.43, p.2805-2823, 1991.

HLELI, S.; MARTELET, C.; ABDELGHANI, A.; BURAI, N.; JAFFREZIC-RENAULT, N. Atrazine analysis using an impedimetric immunosensor based on mixed biotinylated self-assembled monolayer. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.113, p.711-717, 2006.

HU, S.; LI, Y.; WONG, D. T.; XIE, Y.; RAMACHANDRAN, P.; LOO, J. A.; LI, Y.; LOO, A. J.; WONG, D. T. Large-scale identification of proteins in human salivary proteome by liquid chromatography/mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis-mass spectrometry. **Journal of Proteomics**, v.5, n.1714–1728, 2005.

HU, S.; YEN, Y.; ANN, D.; WONG, D. T. Implications of salivary proteomics in drug discovery and development: a focus on cancer drug discovery. **Drug Discovery Today**, v.12, n. 21/22, 2007

HUQ, N. L.; CROSS, K. J.; UNG, M.; MYROFORIDIS, H.; VEITH, P. D.; CHEN, D.; STANTON, D.; HE, H.; WARD, B. R.; REYNOLDS, E. C. A Review of the Salivary Proteome and Peptidome and Saliva-derived Peptide Therapeutics. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v.13, p.547-564, 2007.

INAGAKI, T.; MIYAOKA, T.; OKAZAKI, S.; YASUDA, H.; KAWAMUKAI, T.; UTANI, E.; WAKE, R.; HAYASHIDA, M.; HORIGUCHI, J.; TSUJI, S. High salivary alpha-amylase levels in patients with schizophrenia: A pilot study **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, 2010.

IONESCU, R. E.; RENAULT, N. J.; BOUFFIE, L.; GONDRAN, C.; COSNIER, S.; PINACHO, D. G.; MARCO, M. P.; BAEZA, F. J. S.; HEALY, T.; MARTELET, C. Impedimetric immunosensor for the specific label free detection of ciprofloxacin antibiotic. **Biosensors and Bioelectronics**, v.23, p.549–555, 2007.

JESPERSEN, H. M.; MACGREGOR, E. A.; HENRISSAT, B.; SIERKS, M. R.; SVENSSON, B. Starch and glycogen debranching and branching enzymes: Prediction of structural features of the catalytic ( $\alpha/\alpha$ )  $\beta$ -barrel domain and evolutionary relationship to other amylolytic enzymes. **Journal of Protein Chemistry**, v.12, p.791-805, 1993.

JIANG, X.; LI, D.; XU, X.; YING, Y.; LI, Y.; YE, Z.; WANG, J. Immunosensors for detection of pesticide residues. **Biosensors and Bioelectronics**, v.23, p.1577–1587, 2008.

KLIMENTZOU, P.; DROUGOU, A.; FEHRENBACHER, B.; SCHALLER, M.; VOELTER, W. G.; BARBATIS, C.; PARAVATOU-PETSOTAS, M.; LIVANIOU, E. Immunocytological and Preliminary Immunohistochemical Studies of Prothymosin  $\alpha$ , a Human Cancer-associated Polypeptide, With a Well-characterized Polyclonal Antibody. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.56, n.11, p.1023-1031, 2008.

LAMSTER, I. B.; KAUFMAN, E.; GRBIC, J. T.; WINSTON, L. J.; SINGER, R. E. Beta glucuronidase activity in saliva: Relationship to clinical periodontal parameters. **Journal of Periodontology**, v.74, p.353-359, 2003.

LAPUENTE, R.; CASES, F.; GARCES, P.; MORALLON, E.; VAZQUEZ, J. L. A voltammetric and FTIR-ATR study of the electropolymerization of phenol on platinum electrodes in carbonate medium influence of sulfide. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.451, n.1/2, p.163-171, 1998.

LAWRENCE, H. P. Salivary Markers of Systemic Disease: Noninvasive Diagnosis of Disease and Monitoring of General Health. **Journal Canadian Dental Association**, v.68, n.3, p.170-174, 2002.

LEENAARS, P. P. A. M.; HENDRIKSEN, C. F. M.; LEEUW, W. A.; CARAT, F.; DELAHAUT, P.; FISCHER, R.; HALDER, M.; HANLY, W. C.; HARTINGER, J.; HAU, J.; LINDBLAD, E. B.; NICKLAS, W.; OUTSCHOORN, I. M.; TULL, D. E. S. S. The Production of Polyclonal Antibodies in Laboratory Animals. National Research Council. **ATLA**, v.27, p.79-102, 1999.

LEONARD, P.; HEARTY, S.; BRENNAN, J.; DUNNE, L.; QUINN, J.; CHAKRABORTY, T.; O'KENNEDY, R. Advances in biosensors for detection of pathogen in food and water. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, n.1, p.3-13, 2003.

LI, Y.; WANG, H.; OOSTERWIJK, E.; SELMAN, Y.; MIRA, J. C.; MEDRANO, T.; SHIVERICK, K. T.; FROST, S. C. Antibody-specific detection of CAIX in breast and prostate cancers. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.386, p.488-492, 2009.

LISDAT, F.; SCHÄFER, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.391, p.1555–1567, 2008.

LJUNGBERG, G.; ERICSON, T.; EKBLOM, B.; BIRKHED, D. Saliva and marathon running. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v.7, p.214-219, 1997.

LÓPEZ, M. E.; COLLOCA, M. E.; PÁEZ, R. G.; SCHALLMACH, J. N.; KOSS, M. A.; CHERVONAGURA, A. Salivary Characteristics of Diabetic Children. **Brazilian Dental Journal**, v.14, n.1, p.26-31, 2003.

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

MACGREGOR, E.  $\alpha$ -Amylase structure and activity. **Journal of Protein Chemistry**, v.7, p.399-415, 1988.

MALHOTRA, B. D.; CHAUBEY, A.; SINGH, S. P. Prospects of conducting polymers in biosensors. **Analytica Chimica Acta**, v.578, n.1, p.59-74, 2006.

MARIKAR, F. M. M. T.; SUN, Q.; HUA, Z. Production of the Polyclonal Anti-human Metallothionein 2A Antibody with Recombinant Protein Technology. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v.38, n.5, p.305–309, 2006.

MIR, H. M; BIRERDINC, A.; YOUNOSSI, Z. M. Monoclonal and Polyclonal Antibodies Against the HCV Envelope Proteins. **Clinics in Liver Disease**, v.13, n.3, p.477-486, 2009.

MCCULLOUGH, R. D. The chemistry of conducting polythiophenes. **Advanced Materials**, v.10, n.2, p.93–116, 1998.

NAGLER, R.; LISCHINSKY, S.; DIAMOND, E.; DRIGUES, N.; KLEIN, I.; REZNICK, A. Z. Effect of Cigarette Smoke on Salivary Proteins and Enzyme Activities. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.379, p.229-236, 2000.

NAGLER, R.; BAHAR, G.; SHPITZER, T.; FEINMESSER, R. Concomitant analysis of salivary tumor markers a new diagnostic tool for oral cancer. **Clinical Cancer Research**, v.12, p.3979-3984, 2006.

NAYAK, M.; KOTIAN, A.; MARATHE, S.; CHAKRAVORTTY, D. Detection of microorganisms using biosensors- A smarter way towards detection techniques. **Biosensors and Bioelectronics**, v.25, p.661-667, 2009.

NATER, U. M.; ROHLEDER, N.; GAAB, J.; BERGER, S.; JUD, A.; KIRSCHBAUM, C.; EHLERT, U. Human salivary alpha-amylase reactivity in a psychosocial stress paradigm. **International Journal of Psychophysiology**, v.55, p.333-342, 2005.

NOTO, Y.; SATO, T.; KUDO, M.; KURATA, K.; HIROTA, K. The relationship between salivary biomarkers and state-trait anxiety inventory score under mental arithmetic stress: a pilot study. **Anesthesia and Analgesia**, v.101, p.1873-1876, 2005.

OLIVEIRA, V. N.; BESSA, A.; LAMOUNIER, R. P. M. S.; SANTANA, M. G.; MELLO, M. T.; ESPINDOLA, F. S. Changes in the Salivary Biomarkers Induced by an Effort Test. **International Journal of Sports Medicine**, 2010a.

OLIVEIRA, R. M. L.; VIEIRA, S. N.; ALVES, H. C.; FRANÇA, E.G.; FRANCO, D. L.; FERREIRA, L. F.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. Electrochemical and morphological studies of an electroactive material derived from 3-hydroxyphenylacetic acid: a new matrix for oligonucleotide hybridization. **Journal of Materials Science**, v.45, p.475-482, 2010b.

ORENSTEIN, W. A.; HEYMANN, D. L.; ELLIS, R. J.; ROSENBERG, R. L.; NAKANO, J.; HALSEY, N. A.; OVERTURF, G. D.; HAYDEN, G. F.; WITTE, J. J. Prophylaxis of varicella in high-risk children: dose-response effect of zoster immune globulin. **Journal of Pediatrics**, v.98, p.368-373, 1981.

PATEL, P. D. (Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review. **Trends in Analytical Chemistry**, v.21, p.96-115, 2002.

PEDERSON, E. D.; STANKE, S. R.; WHITENER, S. J.; SEBASTIANI, P. T.; LAMBERTS, B. L.; TURNER, D. W. Salivary levels of alpha 2-macroglobulin, alpha 1-antitrypsin, C-reactive protein, cathepsin G and elastase in humans with or without destructive periodontal disease. **Archives of Oral Biology**, v.40, p.1151-1155, 1995.

PENG, H.; ZHANG, L.; SOELLER, C.; TRAVAS-SEJDIC, J. Conducting polymers for electrochemical DNA sensing. **Biomaterials**, v.30, p.2132–2148, 2009.

POURNARAS, A. V.; KORAKI, T.; PRODRUMIDIS, M. I. Development of an impedimetric immunosensor based on electropolymerized polytyramine films for the direct detection of Salmonella typhimurium in pure cultures of type strains and inoculated real samples. **Analytica Chimica Acta**, v.624, p.301–307, 2008.

PRABHULKAR, S.; ALWARAPPAN, S.; LIU, G.; LI, C. Amperometric micro-immunosensor for the detection of tumor biomarker. **Biosensors and Bioelectronics**, v.24, p.3524–3530, 2009.

RADI, A. E.; BERBEL, X. M.; LATES, V.; MARTY, J. L. Label-free impedimetric immunosensor for sensitive detection of ochratoxin A. **Biosensors and Bioelectronics**, v.24, p.1888–1892, 2009.

RAHMAN, M. A.; SHIDDIKY, M. J. A.; PARK, J.; SHIM, Y. An impedimetric immunosensor for the label-free detection of bisphenol A. **Biosensors and Bioelectronics**, v.22, p.2464–2470, 2007.

RAMASUBBU, N.; PALOTH, V.; LUO, Y.; BRAYER, G. D.; LEVINE, M. J. Structure of human salivary alpha-amylase at 1.6 Å resolution: implications for its role in the oral cavity. **Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography**, v.52, p.435-46, 1996.

RAMASUBBU, N.; RAGUNATH, C.; MISHRA, P. J. Probing the Role of a Mobile Loop in Substrate Binding and Enzyme Activity of Human Salivary Amylase. **Journal of Molecular Biology**, v.325, p.1061–1076, 2003.

RAMANAVICIUS, A.; FINKELSTEINAS, A.; CESIULIS, H.; RAMANAVICIENE, A. Electrochemical impedance spectroscopy of polypyrrole based electrochemical immunosensor. **Bioelectrochemistry**, v.79, n.1, p.11-16, 2009.

ROHLEDER, N.; WOLF, J. M.; MALDONADO, E. F.; KIRSCHBAUM, C. The psychosocial stress-induced increase in salivary alpha-amylase is independent of saliva flow rate. **Psychophysiology**, v.43, p.645-652, 2006.

RUAN, C.; YANG, L.; LI, Y. Immunobiosensor Chips for Detection of Escherichia coli O157:H7 Using Electrochemical Impedance Spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v.74, p.4814-4820, 2002.

RYU, O. H.; ATKINSON, J. C.; HOEHN, G. T.; ILLEI, G. G.; HART, T. C. Identification of parotid salivary biomarkers in Sjögren's syndrome by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and two-dimensional difference gel electrophoresis. **Rheumatology**, v.45, p.1077–1086, 2006.

SADKI, S.; SCHOTTLAND, P.; BRODIE, N.; SABOURAUD, G. The mechanisms of pyrrole electropolymerization. **Chemical Society Reviews**, v.29, p.283–293, 2000.

SAI, V. V. R.; MAHAJAN, S.; CONTRACTOR, A. L. Q.; MUKHERJI, S. Immobilization of Antibodies on Polyaniline Films and Its Application in a Piezoelectric Immunosensor. **Analytical Chemistry**, v.78, p.8368-8373, 2006.

SALAVAGIONE, H. J.; ARIAS, J.; GARCÉS, P.; MORALLÓN, E.; BARBERO, C.; VÁZQUEZ, J. L. Spectroelectrochemical study of the oxidation of aminophenols on platinum electrode in acid medium. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 565, n.2, p.375-383, 2004.

SASSOLAS, A.; LECA-BOUVIER, B. D.; BLUM, L. J. DNA Biosensors and Microarrays. **Chemical Reviews**, v.108, p.109-139, 2008.

SARMA, A. K.; VATSYAYAN, P.; GOSWAMI, P.; MINTEER, S. D. Recent advances in material science for developing enzyme electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v.24, p.2313–2322, 2009.

SCANNAPIECO, F. A.; TORRES, G. I.; LEVINE, M. J. Salivary Amylase Promotes Adhesion of Oral Streptococci to Hydroxyapatite. **Journal of Dental Research**, v.74, n.7, p.1360-1366, 1995.

SCHARF, O.; GOLDING, H.; KING, L. R.; ELLE, N.; FRAZIER, D.; GOLDING, B.; SCOTT, D. E. Immunoglobulin G3 from polyclonal human immunodeficiency virus (HIV) immune globulin is more potent than other subclasses in neutralizing HIV type 1. **Journal of Virology**, v.75, p.6558-6565, 2001.

SCHIPPER, R. G.; SILLETTI, E.; VINGERHOEDS, M. H. Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects. **Archives Oral Biology**, v.52, p.1114-1135, 2007.

SHIN, K.; HAYASAWA, H.; LONNERDAL, B. Purification and quantification of lactoperoxidase in human milk with use of immunoabsorbents with antibodies against recombinant human lactoperoxidase. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.984-989, 2001.

SHARMA, S. K.; SEHGAL, N.; KUMAR, A. Biomolecules for development of biosensors and their applications. **Current Applied Physics**, v.3, p.307-316, 2003.

SHPITZER, T.; BAHAR, G.; FEINMESSER, R.; NAGLER, R. M. A comprehensive salivary analysis for oral cancer diagnosis. **Journal of Cancer Research & Clinical Oncology**, v.133, n.9, p.613-617, 2007.

SIQUEIRA, W. L.; NICOLAU, J. Stimulated whole saliva components in children with Down syndrome. **Special Care in Dentistry**, v.22, n.6, p.226-230, 2002.

SHIRASAKI, S.; FUJII, H.; TAKAHASHI, M.; SATO, T.; EBINA, M.; NOTO, Y.; HIROTA, K. Correlation between salivary alpha-amylase activity and pain scale in patients with chronic pain. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v.32, p.120-123, 2007.

STARODUB, N. F.; DZANTIEV, B. B.; STARODUB, V. M.; ZHERDEV, A. V. Immunosensor for the determination of the herbicide simazine based on an ion-selective field-effect transistor. **Analytica Chimica Acta**, v.424, p.37-43, 2000.

STIEHM, R. E.; ASHIDA, E.; KIM, K. S.; WINSTON, D. J.; HAAS, A.; GALE, R. Intravenous immunoglobulins as therapeutic agents. **Annals of Internal Medicine**, v.107, p.367–382, 1987.

STRECKFUS, C.; BIGLER, L.; DELLINGER, T.; DAI, X.; KINGMAN, A.; THIGPEN, J. T. The presence of soluble c-erbB-2 in saliva and serum among women with breast carcinoma: a preliminary study. **Clinical Cancer Research**, v.6, n.6, p.2363-2370, 2000.

STRECKFUS, C.; BIGLER, L.; DELLINGER, T.; DAI, X.; COX, W.J.; MCARTHUR, A.; KINGMAN, A.; THIGPEN, J. T. and others. Reliability assessment of soluble c-erbB-2 concentrations in the saliva of healthy women and men. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v.91, n.2, p.174-179, 2001.

TAKAI, N.; YAMAGUCHI, M.; ARAGAKI, T.; ETO, K.; UCHIHASHI, K.; NISHIKAWA, Y. Effect of psychological stress on the salivary cortisol and amylase levels in healthy young adults. **Archives of Oral Biology**, v.49, p.963-968, 2004.

TAKAI, N.; YAMAGUCHI, M.; ARAGAKI, T.; ETO, K.; UCHIHASHI, K.; NISHIKAWA, Y. Gender-Specific Differences in Salivary Biomarker Responses to Acute Psychological Stress. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1098, p.510–515, 2007.

TANSIL, N C.; XIE, F.; XIE, H.; GAO, Z. An ultrasensitive nucleic acid biosensor based on the catalytic oxidation of guanine by a novel redox threading intercalator. **Chemical Communications**, p.1064–1066, 2005.

TAVASSOLI, M.; BRUNEL, N.; MAHER, R. JOHNSON, N. W.; SOUSSI, T. p53 antibodies in the saliva of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. **International Journal of Cancer**, v.78, p.390-391, 1998.

TELES, F. R. R.; FONSECA, L. P. Trends in DNA biosensors. **Talanta**, v.77, p.606-623, 2008.

THALER, M.; BUHL, A.; WELTER, H.; SCHREIEGG, A.; KEHREL, M.; ALBER, B.; METZGER, J.; LUPPA, P.B. Biosensor analyses of serum autoantibodies: application to antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.393, p.1417–1429, 2009.

TOMÁS, I.; MARINHO, J. S.; LIMERES, J.; SANTOS, M. J.; ARAÚJO, L.; DIZ, P. Changes in salivary composition in patients with renal Failure. **Archives of Oral Biology**, v.53, p.528-532, 2008.

TIZARD, I. R. Anticorpos: formas solúveis de BCR. In: TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**. Tradução de Lucia Jamli Abel. São Paulo: Roca, 2002. p.154-164.

TURNER, Malcolm. Anticorpos e seus receptores. ROITT, Ivan; BROSTOFF, Jonathan; MALE, David. **Imunologia**. São Paulo: Manole, 1999. cap. 06, p.71-82.

TURNER, R.J.; SUGIYA, H. Understanding salivary fluid and protein secretion. **Oral Disease**, v.8, p.3-11, 2002.

VALDEZ, H.; FOX, P. C. Diagnosis and management of salivary dysfunction. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.4, n.3, p.271-277, 1993.

VAN STEGEREN, A.; ROHLEDER, N.; EVERAERD, W.; WOLF, O.T. Salivary  $\alpha$ -amylase as marker for adrenergic activity during stress: effect of betablockade. **Psychoneuroendocrinology**, v.31, p.137–141, 2006.

VAN STEGEREN, A. H.; WOLF, O. T.; KINDT, M. Salivary alpha amylase and cortisol responses to different stress tasks: Impact of sex. **International Journal of Psychophysiology**, v.69, p.33–40, 2008.

VERDOLIVA, A.; BASILE, G.; FASSINA, G. Affinity purification of immunoglobulinss from chicken egg yolk using a new synthetic ligand. **Journal of chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.749, p.233-242, 2000.

VIEIRA, S. N.; FERREIRA, L. F.; FRANCO, D. L.; AFONSO, A. S.; GONÇALVES, R. A.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. Electrochemical Modification of Graphite Electrodes with Poly(4- aminophenol). **Macromolecular Symposia**, v. 245-246, n.1, p.236-242, 2006.

ZAKOWSKI, J. J.; BRUNS, D. E. Biochemistry of human alpha amylase isoenzymes. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v.21, p.283-322, 1985.

WALLACE, G. G.; SMYTH, M.; ZHAO, H. Conducting electroactive polymer-based biosensors. **Trends in Analytical Chemistry**, v.18, n.4, p.245–251, 1999.

WANG, J.; RIVAS, G.; CAI, X.; CHICHARRO, M.; BELEITER, A.; MOWAT, M.; PALECEK, E.; NIELSEN, P. Detection of point mutation in the p53 gene using a peptide nucleic acid biosensor. **Analytica Chimica Acta**, v.344, p.111-118, 1997.

WANG, J.; KAWDE, A. Pencil-based renewable biosensor for label-free electrochemical detection of DNA hybridization. **Analytica Chimica Acta**, v.431, p.219-225, 2001.

WANG, J. Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics. **Biosensors and Bioelectronics**, v.21, p.1887-1892, 2006.

WU, C.; LIN, C.; WANG, W. Development of an enrofloxacin immunosensor based on label-free electrochemical impedance spectroscopy. **Talanta**, v.79, p.62-67, 2009.

YAMADA, K.; TESHIMA, K.; KOBAYASHI, N.; HIROHASHI, R. Electropolymerization of aniline derivatives in non-aqueous solution without a proton donor. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.394, n.1/2, p.71-79, 1995.

YAMAGUCHI, M.; WAKASUGI, J.; SAKAKIMA, J. Evaluation of driver stress using biomarker in motor-vehicle driving simulator. **IEEE Engineering in Medicine and Biology Society Conference Proceedings**, v.1, p.1834-1837, 2006.

YING-SING, F.; SHI-HUI, S.; DE-RONG, Z. Piezoelectric crystal for sensing bacteria by immobilizing antibodies on divinylsulphone activated poly-m-aminophenol film. **Talanta**, v.51, n.1, p.151-158, 2000.

YULAEV, M. F.; SITDIKOV, R. A.; DMITRIEVA, N. M.; YAZYNINA, E. V.; ZHERDEV, A. V.; DZANTIEV, B.B. **Sensors and Actuators. B, Chemical**, v.75, p.129-135, 2001.

O capítulo II está de acordo com as normas da revista Biotechnology Progress  
(<http://www3.interscience.wiley.com/journal/121373624/home>)

## **Capítulo II**

### **Bioelectrode for Detection of Human Salivary Amylase**

## Resumo

A alfa-amilase salivar é uma das proteínas mais abundantes da saliva e diversos estudos avaliam diferenças na concentração e atividade da HSA com o objetivo de utilizá-la como possível biomarcador para o diagnóstico precoce e acompanhamento de algumas doenças. Este estudo descreve a preparação e purificação da alfa-amilase salivar humana e do anticorpo policlonal anti-amilase salivar humana, bem como a sua utilização no desenvolvimento de um novo bioeletrodo baseado na imobilização do anticorpo específico para amilase salivar sobre o eletrodo modificado com ácido poli(3-hidroxifenilacético). O bioeletrodo foi incubado com amilase salivar ou lisozima (interferente salivar) e a interação entre o anticorpo e as enzimas foi analisada por espectroscopia de impedância eletroquímica. Os resultados indicaram especificidade do bioeletrodo para a amilase salivar. O método usado é rápido, de fácil manuseio, preciso e de baixo custo.

Palavras chaves: alfa-amilase salivar, 3-hidroxifenilacético, bioeletrodo, eletrodo modificado, filme polimérico.

## **Abstract**

The salivary alpha-amylase is one of the most abundant protein in saliva and several studies evaluate differences in activity and concentration of HSA in order to use it as a potential biomarker for diagnosis of some diseases. This paper describes the preparation and purification of human salivary alpha-amylase and anti-alpha-amylase polyclonal antibody, as well as its utilization in the development of a novel bioelectrode based on the immobilization of a specific antibody for salivary amylase onto graphite electrode modified with poly(3-hydroxyphenylacetic) acid. The bioelectrode was incubated with salivary amylase or lysozyme (interfering salivary) and the interaction between the antibody and the enzymes was analyzed through electrochemical impedance spectroscopy. The results indicated specificity of the bioelectrode of salivary amylase. The method used is rapid, easy to use, label-free and inexpensive.

**Keywords:** Salivary alpha-amylase, 3-hydroxyphenylacetic acid, bioelectrode, modified electrode, polymeric film

## 1. Introduction

Saliva is a granular secretion essential for the maintenance of oral tissue that contains a wide variety of proteins, peptides and analytes, each with a different function in the oral biology.<sup>1,2,3</sup> Among the proteins, the alpha-amylase is an enzyme involved in the digestion of starch and is also a receptor for the adhesion of bacterial flora, assisting in the formation of dental plaque.<sup>4</sup> A number of alpha-amylase isoforms are secreted by the acinar cells from the submandibular and parotid glands and account for 10-20% of total protein in saliva.<sup>5</sup>

Salivary alpha-amylase has been studied in type 2 diabetes mellitus,<sup>6,7</sup> oral cancer,<sup>8</sup> Down syndrome,<sup>9</sup> hyposalivation,<sup>10</sup> and renal insufficiency<sup>11</sup> in an attempt to find alterations that allow to correlate salivary alpha-amylase with the diagnostic of systemic diseases. Furthermore, data regarding salivary alpha-amylase activity on different stress paradigms, i.e. parachute jumping,<sup>12</sup> academic evaluations,<sup>13</sup> driving<sup>14</sup> and physical exertion,<sup>15,16,17,18,19</sup> reveal an increase after the stressful event when compared with its baseline values, suggesting salivary alpha-amylase as a useful surrogate of the sympathetic adrenomedullary system.

Conventional methods like Western Blotting and immunoassays (ELISA) have been used for the determination of alpha-amylase concentration in saliva. These systems have the disadvantage of being time consuming and often not comparable between laboratories.<sup>20</sup>

Immunosensors are interesting for clinical applications because they offer a number of potential advantages over conventional assay techniques; the detection is fast and the system can easily be automated.<sup>21</sup> An immunosensor is a device based on affinity of the antibody/antigen, in which the immunochemical reaction is coupled to a signal transducer. An ultra-sensitive and label-free approach, electrochemical impedance spectroscopy (EIS), can be used as a transducer to evaluate biomolecular interactions.<sup>22</sup> Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) is a non-destructive steady-state technique capable of probing the relaxation phenomena over a wide range of frequencies.<sup>23,24</sup> It is used for the characterization of bulk and surface properties.

A related approach to probe immobilization is the electrogeneration of functionalized polymers on electrode surface, followed by biomolecule attachment

to the polymer surface. Being a two-step procedure, it allows selecting optimal conditions for each step.

Electropolymerization often leads to electrode passivation with non-conductive films but, unlike chemical polymerization, permits higher flexibility and control of polymerization conditions.<sup>25</sup> Electropolymerization of phenols and aromatic ethers has been investigated for the production of modified electrodes.<sup>26,27,28</sup> Studies have indicated that monomers containing aromatic groups directly bonded to oxygen are easier to polymerize, presenting high reproducibility and mechanical resistance of the obtained film, allowing higher stability of the modified electrode.<sup>29,26,27,28</sup>

Recently, we have reported the preparation of electrodes coated with poly(3-hydroxyphenylacetic acid [poly(3-HPA)]).<sup>30</sup> Those results showed that the polymer prepared in acid medium presents conductivity, and that graphite electrodes coated with these polymers were much more efficient in immobilizing biomolecules when compared with non-coated graphite surfaces.

This work reports the purification and characterization of human salivary alpha-amylase polyclonal antibody aiming at the development of a bioelectrode for the detection of this enzyme. Additionally, to the best of our knowledge, this is the first report about the incorporation of polyclonal antibody in bioelectrodes based on poly(3-hydroxyphenylacetic) and its use for the detection of human salivary alpha-amylase.

## **2. Experiments**

### **2.1. Chemicals**

All reagents used were of analytical grade. Ultra high pure water (Millipore Milli-Q system) was used in the preparation of the solutions. Buffer components (CH<sub>3</sub>COOH, CH<sub>3</sub>COONa, Tris, EDTA, EGTA, NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) and other chemicals (Q-Sepharose resin, human salivary alpha-amylase antibody, lysozyme, trypsin, Freund's complete and incomplete adjuvant, iodoacetamide, DTT, mercaptoethanol) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical, USA (ACS purity). Monomer solutions, 3-hydroxyphenylacetic acid, were prepared in 0.5

mol.L<sup>-1</sup> HClO<sub>4</sub> solution, immediately before their use. All reagents were used as received. The experiments were conducted at room temperature (25 ± 1°C).

## **2.2. Apparatus**

The SDS-PAGE 1D and Western Blotting were performed in the system from Hoefer Pharmacia Biotech Inc. (San Francisco, USA). The protein identification using peptide mass fingerprinting was carried out in a Bruker Reflex IV mass spectrometer. The electropolymerizations were performed in a three-compartment electrochemical cell connected to a 420A-model potentiostat from CH Instruments (Austin, USA). The working electrode was carbon graphite (99.9995%) from Alfa Aesar, in disk form, 6.18mm of diameter. A platinum plate and electrodes of Ag/AgCl, KCl (3 M) were used as auxiliary and reference electrodes, respectively. EIS was performed in an AUTOLAB electrochemical system (PGSTAT302N and FRA2 module) from Eco Chemie (Utrecht, The Netherlands), using potassium ferro/ferricyanide (5mmol.L<sup>-1</sup>) in potassium chloride solution (0.1 mol.L<sup>-1</sup>). The frequency range was from 100KHz to 10Hz using the open-circuit potential system, +0.24V. The voltage amplitude was 10mV.

## **2.3. Preparation of the enriched fraction of human salivary alpha-amylase (HSAf)**

Saliva was collected by the spitting method described by Navazesh<sup>31</sup> with some modifications. Briefly, 10 healthy, non-smoking subjects (Mean 26, SD ±2.5 years of age) performed oral hygiene with toothpaste two hours before sample collection and washed their mouth three times with distilled water immediately before collection. Saliva secretion was stimulated with paraffin and collection was carried out at 16:00h. Saliva was frozen at -20°C for 48h for protein precipitation and later thawed at room temperature, and centrifuged at 12,000g for 10 min at 20°C.<sup>32</sup> Supernatant dialysis and chromatography followed the protocol by Gouveia *et al.*<sup>33</sup> The saliva supernatant was diluted (1:1 v/v) in 50mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), containing 10mM EGTA and 10mM EDTA. A glass column (9 x 2cm) packed with 63mL of Q-Sepharose resin was used. The column was stabilized with 5 volumes of 25mM Tris-HCl pH 8.0, containing 5mM EGTA and 5mM EDTA and a sample of 120mL of diluted saliva was applied into the column.

The excluded volume was collected, dialyzed against 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  and finally lyophilized. Fractions were submitted to SDS-PAGE 1D and Western Blotting. For immunoblotting analysis, the human salivary alpha-amylase antibody (anti-HSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used.

#### **2.4. Peptide mass fingerprinting (PMF)**

The polypeptides immunodetected through Western Blotting with the anti-HSA were stained in the gel and digested for further identification of the proteins. The method employed was based on the reduction of proteins with DTT, alkylation with iodoacetamide and digestion with trypsin. The yielded fragments were submitted to microchromatography using C18 Zip Tips (Millipore, Billerica, USA), followed by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight (MALDI-TOF) in a Bruker Reflex IV mass spectrometer. Known trypsin autolysis peaks and keratin contaminants were removed.

#### **2.5. Database search**

Mascot, assuming  $p < 0.05$ <sup>34</sup> and Profound<sup>35</sup> software, were used to search for the PMF-identified proteins in the NCBI nr database. No restrictions were made regarding the molecular mass or the taxonomy of the proteins. The fragment mass tolerance was  $<0.2$  Da for  $\text{MH}^+$  monoisotopic data, and the “experimental molecular mass” (gel) and “theoretical molecular mass” (database) were compared to verify the assurance of the identification.

#### **2.6. Purification and characterization of the polyclonal antibody (anti-HSAf)**

Initially, a rabbit was dorsally immunized with 500 $\mu\text{g/mL}$  of HSAf and Freund's complete adjuvant. Two booster doses of 250 $\mu\text{g/mL}$  with Freund's incomplete adjuvant were administered at two-week intervals. Blood was collected from the ear vein 1 week before the first dose and 15 days after each immunization. Serum titer was determined through ELISA. The polyclonal antibody anti-HSAf was purified through immunoaffinity method<sup>36</sup> and the specificity of the antibody was verified by Western Blotting.

### **2.7. Functionalization of graphite electrode surface with poly(3-HPA)**

Graphite carbon electrodes were modified with polymer derived from 3-hydroxyphenylacetic acid according to Oliveira *et al.*<sup>30</sup>

### **2.8. Modification of the modified electrode surface with anti-HSAf antibody**

The modified electrode with poly(3-HPA) was pre-treated by applying a potential of -0.2V in acetate buffer, pH 4.7 for 60 seconds. 20ng/ $\mu$ L of antibody anti-HSAf was diluted in the same buffer, added on the modified electrodes and incubated for 1 h at 25°C. The modified electrode with poly(3-HPA)/anti-HSAf was immersed for 30 s in acetate buffer, pH 4.7 and dried with N<sub>2</sub>.

### **2.9. Interaction antigen–antibody (Ag–Ab) on the electrode modified**

For the detection of the target (salivary amylase), an acetate buffer solution containing mercaptoethanol was pre-heated in the presence of the target (HSAf 60ng/ $\mu$ L) at 98°C for 5 minutes, immersed for 30 s and in acetate buffer dried with N<sub>2</sub>. As negative control, a buffer solution containing mercaptoethanol pre-heated in the absence of target was performed.

### **2.10. Interferent study**

The interferent study was performed using lysozyme, an enzyme present in the human saliva, at the same conditions described to the target human salivary amylase.

## **3. Results and Discussion**

### **3.1. Preparation of the enriched fraction of human salivary alpha-amylase (HSAf)**

Figure 1A shows the electrophoretic profile of saliva samples before and after fractioning through ion exchange chromatography with chelating divalent cations. 1D SDS-PAGE analysis reveals the presence of a number of polypeptides

in whole saliva (WS) as well as in the diluted supernatant saliva (S) fractions. On the other hand, the excluded volume (V) is enriched with two polypeptides with a similar Mr to the alpha-amylase. Presence of salivary alpha-amylase in these fractions was confirmed by Western Blotting (Figure 1B) and PMF analysis (Table 1). Immunoblotting analysis showed a cross-reaction of the antibody anti-HSA with the ~58kDa-polypeptides in the WS, S and V samples. Moreover, these polypeptides were later identified through PMF analysis as amylase isoforms with Mr between 56 and 58kDa. That is in agreement with previous proteomic studies which showed amylase isoforms with different molecular mass and isoelectric points.<sup>37,38,39</sup> Hirtz *et al.*<sup>40</sup> identified from a databank amylase native forms with 56kDa as well as 59kDa-isoforms with likely post-translational modifications being responsible for the variation on Mr between the 50 and 70 kDa region as seen on SDS-PAGE 2D.<sup>41</sup> Finally, densitometric analysis (Fig. 1C,  $p < 0.01$ ) proved that production of an enriched fraction of salivary alpha-amylase (HSAf) by ion exchange chromatography as seen in the column excluded volume was effective.

### **3.2 Purification and characterization of the polyclonal antibody**

The polyclonal anti-HSAf antibody purified by immunoaffinity revealed high specific interaction with alpha-amylase as shown on the assay with different proteins. In addition to the sample analyzed here (HSAf), the immunoblotting assay was carried out with human lysozyme (L), human whole saliva (HWS), rat whole saliva (RWS), rat cardiac muscle (RCM), honey (H) and blocking solution skim milk samples in different concentrations, 5mg/mL (B5), 10mg/mL (B10) and 15mg/mL (B15). The electrophoretic profiles from the samples used are shown in figure 2A. Western Blotting analysis revealed that polypeptides from the blocking solution did not interact with the anti-HSAf (Figure 2B), showing that there was no cross-reaction between the antibody and other proteins from the skim milk used in the blocking solution during the purification process. Anti-HSAf interaction occurred only with polypeptides of ~Mr 58kDa from the HSAf, HWS, and RWS samples. Cross-reaction with alpha-amylase present in rat saliva is due to the high homology (85%) between rat and human amylase sequences as demonstrated by Clustal W analysis (Figure 3). That result is in line with the high homology found among amino acid sequences within exon 4 of genes AMY 1 and AMY 2 of human

amylase when compared to nine mammal species.<sup>42</sup> The high specificity of interaction of the anti-HSAf with amylase isoforms supports its potential use in research and diagnostic methods.

### **3.3 Electrochemical Impedance Spectroscopy study of the modified electrodes**

One of the most significant advantages of impedance detection for biosensing is that antibody-antigen binding can be directly detected. Figure 4 shows the complex plane plot, known as the Nyquist plot, representative of the impedance response of a graphite electrode modified with the film or film/antibody or film/antibody-antigen.

The experimental curve displays semicircles combined with a short straight line having a  $\sim 45^\circ$  slope in the high-frequency domain followed by a rather complex behavior in the low-frequency domain. The results suggest that the system is kinetically and mass transfer controlled in the high-frequency domain. Figure 5 shows the equivalent circuit used to fit the experimental data.

The model for the morphology of the electroactive layer that emerges from the results supports the existence of two regions: a more internal region, close to the graphite surface, described by the  $R_{ct,1}$  and  $Q_1$  data, suggesting that electron transfer occurs at the surface of the more internal regions of the film and a more external region when the biomolecules are applied, described by the  $(C_2[R_{ct,2}W])$  combination, supporting that an electron transfer takes place at the more external surface of the electrode. The  $C_2$  capacitance can be taken as a measure of the external surface. Table 2 gathers the fitting results.

The chi-square values ( $\chi^2$ ) of the Kramers-Kronig of the order of  $10^{-2}$ - $10^{-3}$  attest the good quality of the data. Some interesting features came out of the data gathered in Table 2. The solution resistance ( $R_s$ ) is reasonably constant, centered around 5.0. That is a reasonable value considering the electrolyte composition.

For the more internal region electron transfer, it is expected to be easier resulting in lower  $R_{ct,1}$ -values when compared to the  $R_{ct,2}$ -values, as it can be seen in Table 2. The modified electrode with poly(3-HPA) showed significant blocking behavior to electron transfer reaction of the pair redox ferricyanide/ferrocyanide ( $2427 \Omega \text{ cm}^2$ ), indicating electrostatic repulsion with the negatively charged

carboxylate groups of the polymer.<sup>30</sup> That charge repulsion causes higher charge transfer resistance. In presence of the immobilized antibody containing polymeric film, there is a decrease of the charge transfer resistance ( $566 \Omega \text{ cm}^2$ ) onto the electrode surface. That decrease can be attributed to the interaction between the negative charge of polymer and positive charge of the probe, increasing the electrostatic interactions, once that anti-HSAf presents isoelectric point (PI) value 6.1-6.5 and the assay was conducted in pH=4.7. Thus, the presence of a specific interaction between the antibody-antigen provided a resistance increase ( $1345 \Omega \text{ cm}^2$ ), increasing the distance of the interaction antigen-antibody formed with the electrode surface, due to the precipitation or agglutination caused by the antigen-antibody interaction, resulting in decrease of the charge transfer.

Comparison of the  $Q_1$  and  $Q_2$  values results in the sequence poly(3-HPA)/Ab-Ag > poly(3-HPA)/Ab > poly(3-HPA). That capacitance increase indicates that the antigen is immobilized onto the polymer surface and that its elements are in contact with the antibody. This conformational model is consistent with  $R_{ct}$ -values.

Such results are in agreement with the studies of some authors, which verified modifications in the impedimetric systems according to the biomolecule immobilizations over the electrode surface.<sup>43,44</sup> Wu *et al.*<sup>45</sup> using the impedimetric system for the detection of enrofloxacin, verified that the semicircle diameter, illustrated by Nyquist diagram, increased when the antigen-antibody interaction occurred.

### 3.4. Interferent study

To investigate the specificity of the bioelectrode, we utilized lysozyme, a protein present in saliva, secreted by the parotid, submandibular and sublingual glands.<sup>46</sup> Lysozyme was prepared in the same condition as the specific target (HSAf) and the system was analyzed through EIS (Figure 6). Figure 6 shows that the bioelectrode discriminates the salivary amylase of another salivary compound (lysozyme), once that the graphic profile is very similar for the modified electrode in presence or absence of lysozyme. Those results indicate that lysozyme does not interact with the antibody (anti-HSAf), revealing specificity of the bioelectrode.

#### **4. Conclusion**

The production of an enriched fraction of salivary alpha-amylase (HSAf) by ion exchange chromatography was effective, being identified through PMF analysis as some amylase isoforms and the anti-HSAf purified by immunoaffinity revealed high specific interaction with human salivary alpha-amylase. Graphite carbon electrode modified with poly(3-hydroxyphenylacetic acid) was effective for the immobilization of anti-HSAf. The interaction anti-HSAf-human salivary amylase, analyzed through electrochemical impedance spectroscopy, showed a significant modification in the Nyquist plot upon addition of the complementary target, with an increase in the charge transference resistance. Assay using an interfering salivary indicated specificity of the bioelectrode based on poly(3-HPA) and anti-HSAf. The combination of graphite electrode with poly(3-hydroxyphenylacetic acid) is a promising strategy for antigen immobilization and other biological recognition elements, presenting potential for the production of a low-cost label-free biochip.

#### **5. Acknowledgments**

The authors are grateful for the financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Also, we would like to thank teacher Abílio Borghi for the revision of the English manuscript and Lucas Franco Ferreira for the scientific contribution.

## 6. Figures and Tables

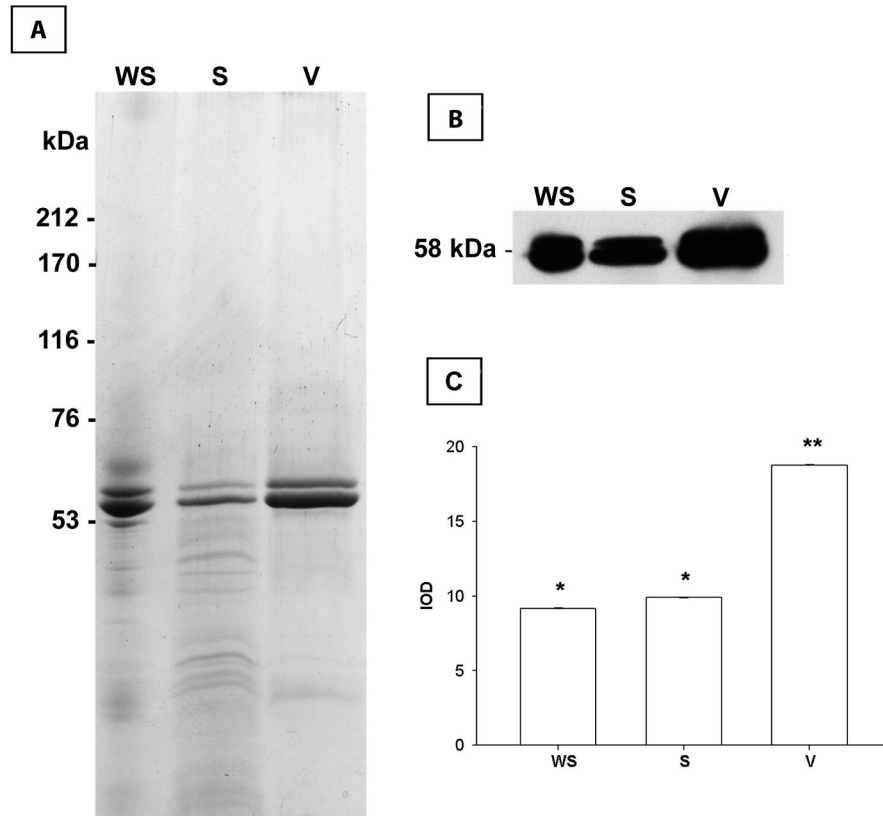


Figure 1. Ion exchange chromatography for production of an enriched fraction of salivary alpha-amylase. In A, Electrophoretic profile of whole saliva (WS), diluted supernatant (S) and excluded volume (V). In B, Western Blotting showing human salivary alpha-amylase immunodetection in WS, S and V. In C, Ion exchange chromatography fraction densitometry for HSAf production. Statistically different ( $p < 0,001$ ). \*WS different from S, \*\*V different from WS and S.

Table 1. Identification of the polypeptides immunodetected with anti-HSA by peptide mass fingerprinting (PMF - MALDI-TOF/TOF MS).

| Protein identification                                                               | Organism            | Protein ID  | Mascot score | Matched peptides | Coverage (%) | pI (Theor.) | Mr (Theor.) kDa |
|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|-------------|--------------|------------------|--------------|-------------|-----------------|
| Chain A, role of the mobile loop in the mechanism of human salivary amylase          |                     | gi 15988376 | 267          | 27               | 49           | 6.21        | 56.171          |
| Chain A, structure solution and refinement of the recombinant human salivary amylase |                     | gi 14719766 | 234          | 20               | 41           | 6.21        | 56.484          |
| AMY1A protein                                                                        | <i>Homo sapiens</i> | gi 47124258 | 229          | 22               | 44           | 8.82        | 56.859          |
| Alpha-amylase 1 precursor                                                            | <i>Homo sapiens</i> | gi 40254482 | 205          | 26               | 47           | 6.47        | 58.415          |
| Alpha-amylase                                                                        | <i>Homo sapiens</i> | gi 178585   | 189          | 22               | 42           | 6.32        | 58.398          |
| Amylase, alpha 1A (salivary)                                                         | <i>Homo sapiens</i> | gi 10280622 | 152          | 20               | 37           | 6.64        | 58.300          |

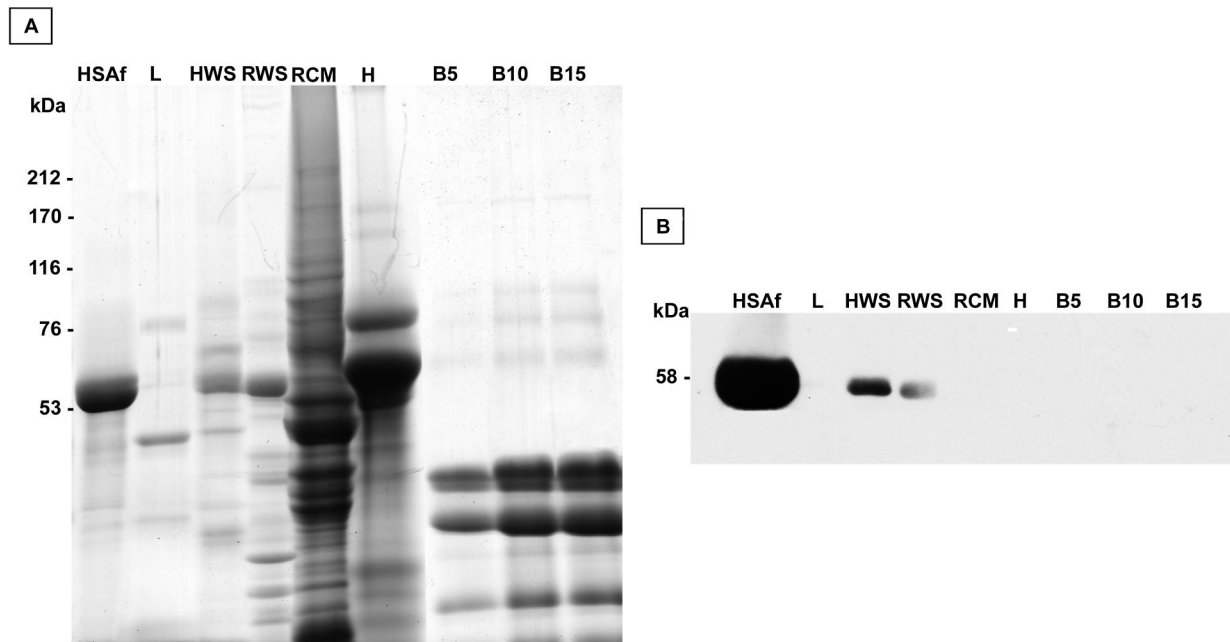


Figure 2. In A. SDS-PAGE 1D electrophoretic profile of polypeptides from the enriched fraction of human salivary alpha-amylase (HSAf), lysozyme (L), human whole saliva (HWS), rat whole saliva (RWS), rat cardiac muscle (RCM), honey (H), and blocking solution skim milk samples in different concentrations, 5mg/mL (B5), 10mg/mL (B10) e 15mg/mL (B15). In B. Immunoblotting showing immunodetection of salivary alpha-amylase polypeptides from HSAf, HWS and RWS samples.

|            |                                                              |                     |                   |                 |            |            |  |
|------------|--------------------------------------------------------------|---------------------|-------------------|-----------------|------------|------------|--|
|            | 10                                                           | 20                  | 30                | 40              | 50         | 60         |  |
| AMY1_HUMAN | MKLF                                                         | WLLFTIGFCWAQYSSNTIQ | GR                | TSIVHLFEWRWVDIA | LECERYLAPK | GFGGVQVSPP |  |
| Q5I0L0_RAT | MKFL                                                         | LLLSLIGLCWAQYDHTFY  | GRSSIVHLFEWRWVDIA | KECERYLAPNG     | FGGGVQVSPP |            |  |
| Prim.cons. | MK2F2LL22IG2CWAQY222T22GR2SIVHLFEWRWVDIA2ECERYLAP2GFGGVQVSPP |                     |                   |                 |            |            |  |

|            |                                                   |                      |                |         |             |           |  |
|------------|---------------------------------------------------|----------------------|----------------|---------|-------------|-----------|--|
|            | 70                                                | 80                   | 90             | 100     | 110         | 120       |  |
| AMY1_HUMAN | NENVA                                             | INHNPFRPWERYQFVSYKLC | TRSGNEDEF      | RNMVTRC | NNVGVRIYVD  | AVINHMCGN |  |
| Q5I0L0_RAT | NENIV                                             | VNSPFRPWERYQPI       | SYKICSRSGNEDEF | DMVNR   | CNNVGVRIYVD | AVINHMCGV |  |
| Prim.cons. | NEN22222PFRPWERYQP2SYK2C2RSGNEDEF2MV2RCNNVGVRIYVD |                      |                |         |             |           |  |

|            |                                                              |                    |          |            |          |             |  |
|------------|--------------------------------------------------------------|--------------------|----------|------------|----------|-------------|--|
|            | 130                                                          | 140                | 150      | 160        | 170      | 180         |  |
| AMY1_HUMAN | AVSAG                                                        | TSSTCGSYFNPGRDFFA  | VPYSGWDF | NDGKCKTGSG | DIENYNDA | TQVRDCRLSGL |  |
| Q5I0L0_RAT | GAEAG                                                        | QSSTCGSYFNPNNRDFPG | VPYSGDF  | NDGKCKTGSG | GIENYNDA | AQVRDCRLSGL |  |
| Prim.cons. | 222AG2SSTCGSYFNP22RDFP2VPYSG2DFNDGKCKTGSG2IENYNDA2QVRDCRLSGL |                    |          |            |          |             |  |

|            |                                                             |        |        |               |              |               |     |
|------------|-------------------------------------------------------------|--------|--------|---------------|--------------|---------------|-----|
|            | 190                                                         | 200    | 210    | 220           | 230          | 240           |     |
| AMY1_HUMAN | LDLAL                                                       | GKDYVR | SKIAEY | MNHLIDIGVAGFR | IDASKHMWPGDI | KAIDLKLNLSNWF | PEG |
| Q5I0L0_RAT | LDLAL                                                       | EKDYVR | TKVADY | MNHLIDIGVAGFR | LDASKHMWPGDI | KAVLDKLNLSNWF | SEG |
| Prim.cons. | LDLAL2KDYVR2K2A2YMNHLIDIGVAGFR2DASKHMWPGDIKA2LDKLNLSN2WF2EG |        |        |               |              |               |     |

|            |                                                          |      |        |         |           |           |        |
|------------|----------------------------------------------------------|------|--------|---------|-----------|-----------|--------|
|            | 250                                                      | 260  | 270    | 280     | 290       | 300       |        |
| AMY1_HUMAN | SKPFI                                                    | YQEV | IDLGGE | PIKSSDY | FGNGRVTE  | FKYGAKLGT | VIRKWN |
| Q5I0L0_RAT | SKPFI                                                    | YQEV | IDLGGE | AVSSNE  | YFGNGRVTE | FKYGAKLGT | VLRKWD |
| Prim.cons. | SKPFIYQEVIDLGGE22S22YFGNGRVTEFKYGAKLGT2V2RKW2GEKM2YLNWGE |      |        |         |           |           |        |

|            |                                                   |                 |          |                  |         |             |  |
|------------|---------------------------------------------------|-----------------|----------|------------------|---------|-------------|--|
|            | 310                                               | 320             | 330      | 340              | 350     | 360         |  |
| AMY1_HUMAN | FMP                                               | SDRALVFVDNHDNQR | GHGAGGAS | ILTFWDARLYKMAVGF | MLAHPYG | FTRVMSSYRWP |  |
| Q5I0L0_RAT | FMP                                               | SDRALVFVDNHDNQR | GHGAGGSS | ILTFWDARLYKMAVGF | MLAHPYG | FTRVMSSFHWP |  |
| Prim.cons. | FMPSDRALVFVDNHDNQRGHGAGG2SILTFWDARLYKMAVGFMLAHPYG |                 |          |                  |         |             |  |

|            |                                                              |                |          |               |          |            |  |
|------------|--------------------------------------------------------------|----------------|----------|---------------|----------|------------|--|
|            | 370                                                          | 380            | 390      | 400           | 410      | 420        |  |
| AMY1_HUMAN | RYFENG                                                       | KDVNDWVGPPNDNG | VTKEVTIN | PDTCGNDWVCEHR | WRQIRNMV | NFRNVVDGQP |  |
| Q5I0L0_RAT | RYFENG                                                       | KDVNDWVGPPNNG  | ATKEVTIN | SDTCGNDWVCEHR | WRQIRNMV | AFRNVVNGQP |  |
| Prim.cons. | RYFENGKDVNDWVGPPN2NG2TKEVTIN2D2TCGNDWVCEHRWRQIRNMV2FRNVV2GQP |                |          |               |          |            |  |

|            |                                                             |                 |            |       |              |                |  |
|------------|-------------------------------------------------------------|-----------------|------------|-------|--------------|----------------|--|
|            | 430                                                         | 440             | 450        | 460   | 470          | 480            |  |
| AMY1_HUMAN | FTN                                                         | WYDNGSNQVAFGRGN | RGFIVFNDDW | TFSLT | LTQGLPAGTYCD | VISGDKINGNCTGI |  |
| Q5I0L0_RAT | FAN                                                         | WWDNGSNQVAFGRGN | KGFIVFNDDW | DLST  | LTQGLPAGTYCD | VISGDKVDGNCTGI |  |
| Prim.cons. | F2NW2DNGSNQVAFGRGN2GFIVFNDDW22S2TLTQGLPAGTYCDVISGDK22GNCTGI |                 |            |       |              |                |  |

|            |                                  |           |          |        |
|------------|----------------------------------|-----------|----------|--------|
|            | 490                              | 500       | 510      |        |
| AMY1_HUMAN | KIYV                             | SDDGKAHFS | ISNSAEDP | FFIAIH |
| Q5I0L0_RAT | KVYV                             | SGDGNAYFS | ISNSAEDP | FFIAIH |
| Prim.cons. | K2YV22DG2A2FSISNSAEDPFFIAIH2ESK2 |           |          |        |

Alignment data :  
 Alignment length : 511  
 Identity (\*) : 435 is 85.13 %  
 Strongly similar (.) : 42 is 8.22 %  
 Weakly similar ( ) : 22 is 4.31 %  
 Different : 12 is 2.35 %  
 Sequence 0001 : AMY1\_HUMAN ( 511 residues).  
 Sequence 0002 : Q5I0L0\_RAT ( 511 residues).

Figure 3. Human salivary alpha-amylase and rat alpha-amylase identity analysis by ClustalW. The (\*) indicates identity between both proteins.

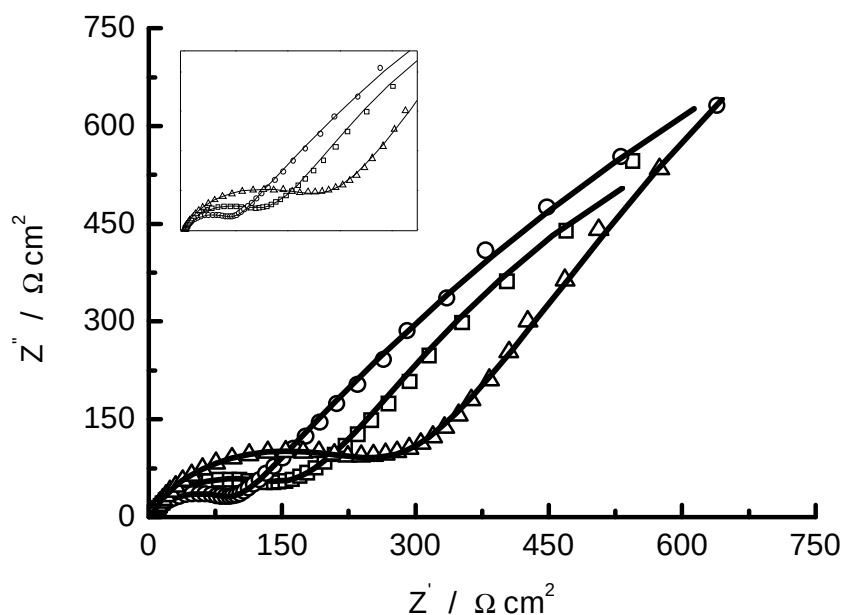


Figure 4. Nyquist diagram for EIS measurements in 5 mmol.L<sup>-1</sup> K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>/K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> containing 0.1 mol.L<sup>-1</sup> KCl solution recorded from graphite electrode modified with: poly(3-HPA) (Δ); poly(3-HPA)/anti-HSAf (○) and poly(3-HPA)/ anti-HSAf-HSAf (□). E<sub>ap</sub> = +0.24 V; Amplitude = 10 mV; frequency range (100KHz to 10 Hz). The continuous lines represent the fitting to the equivalent circuit. Inset: amplification of high frequencies region.

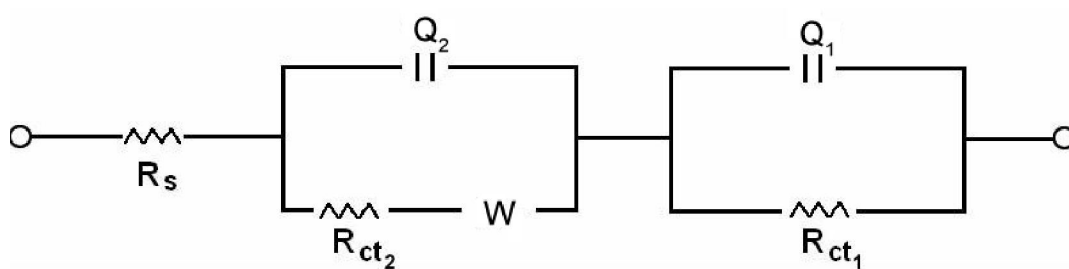


Figure 5. Equivalent electrical circuit used to fit the experimental impedance data.  
 $R_s$ : the resistance of the solution,  $R_{ct}$ : charge transfer resistances,  $Q$ : capacitance;  
 $W$ : Warburg impedance.

Table 2. The fitting values of the equivalent circuit elements.

|                                              | <i>poly(3-HPA)</i>    | <i>Poly(3-HPA)/Ab</i> | <i>poly(3-HPA)/Ab-Ag</i> |
|----------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|
| $R_s / (\Omega \text{ cm}^2)$                | 4.95                  | 5.00                  | 3.08                     |
| $Q_1 / (\text{mF cm}^{-2})$                  | 0.18                  | 0.21                  | 0.22                     |
| $n_1$                                        | 0.81                  | 0.79                  | 0.80                     |
| $R_{ct,1} / (\Omega \text{ cm}^2)$           | 86.7                  | 144.9                 | 253.6                    |
| $W / (\Omega \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1/2})$ | 0.01650               | 0.00786               | 0.00766                  |
| $Q_2 / (\text{mF cm}^{-2})$                  | 11.10                 | 31.54                 | 35.90                    |
| $n_2$                                        | 0.72                  | 1.00                  | 1.00                     |
| $R_{ct,2} / (\Omega \text{ cm}^2)$           | 2427                  | 566                   | 1345                     |
| $\chi^2$                                     | $9.98 \times 10^{-3}$ | $2.11 \times 10^{-2}$ | $7.39 \times 10^{-3}$    |

Q is the capacitance,  $n_1$ ,  $n_2$  is the phase angle displacement, W is the Warburg impedance and  $R_{ct}$  is the resistance of charge transfer.

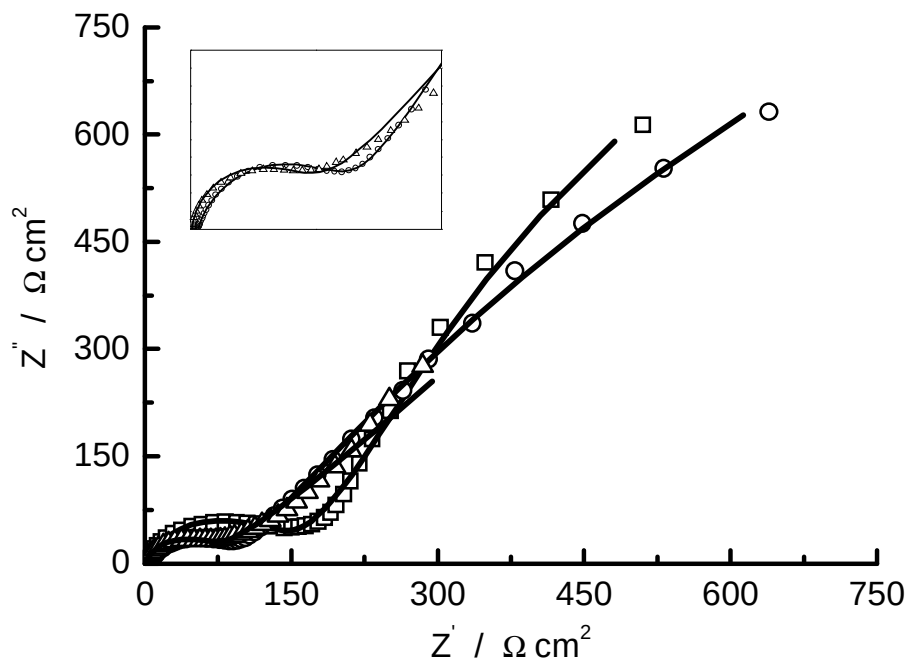


Figure 6. Nyquist diagram from EIS obtained in 5 mmol.L<sup>-1</sup> K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>/K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> containing 0.1 mol.L<sup>-1</sup> KCl solution recorded from poly(3-HPA)/antibody (Δ), and poly(3-HPA)/antibody-lysozyme (○). E<sub>ap</sub> = +0.24 V, amplitude = 10 mV, frequency range (100KHz to 10 Hz). The continuous lines represent the fitting to the equivalent circuit. Inset: amplification of high frequencies region.

## 7. References

1. Huq NL, Cross KJ, Ung M, Myroforidis H, Veith PD, Chen D, Stanton D, He H, Ward BR, Reynolds EC. A Review of the Salivary Proteome and Peptidome and Saliva-derived Peptide Therapeutics. *Int.J. Pept. Res. Ther.* 2007;13: 547–564.
2. Denny P, Hagen F K, Hardt M, Liao L, Yan W, Arellanno M, Bassilian S, Bedi GS, Boontheung P, Cociorva D, Delahunty CM, *et al.* The Proteomes of Human Parotid and Submandibular/Sublingual Gland Salivas Collected as the Ductal Secretions. *J Proteome Res.* 2008;7(5):1994–2006.
3. Schipper RG, Silletti E, Vingerhoeds MH. Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects. *Arch Oral Biol.* 2007; 52:1114-1135.
4. Scannapieco FA, Torres GI, Levine MJ. Salivary Amylase Promotes Adhesion of Oral Streptococci to Hydroxyapatite. *J Dent Res.* 1995; 74(7): 1360-1366.
5. Zakowski JJ, Bruns DE. Biochemistry of human alpha amylase isoenzymes. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1985;21: 283-322.
6. Aydin SA. Comparison of Ghrelin, Glucose, Alpha-amylase and Protein Levels in Saliva from Diabetics. *J Bio Mol B.* 2007; 40(1): 29-35.
7. Dodds MW, Dodds AP. Effects of glycemic control on saliva flow rates and protein composition in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997;83(4):465-70.
8. Shpitzer T, Bahar G, Feinmesser R, Nagler RM. A comprehensive salivary analysis for oral cancer diagnosis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2007;133(9):613-617.
9. Siqueira WL, Nicolau J. Stimulated whole saliva components in children with Down syndrome. *Spec Care Dentist.* 2002;22(6):226-230.
10. Almståhl A, Wikström M, Groenink J. Lactoferrin, amylase and mucin MUC5B and their relation to the oral microflora in hyposalivation of different origins. *Oral Microbiol Immunol.* 2001;16:345-352.

11. Tomás I, Marinho JS, Limeres J, Santos MJ, Araújo L, Diz P. Changes in salivary composition in patients with renal Failure. *Arch Oral Biol.* 2008;53: 528-532.
12. Chatterton RT, Vogelsong KM, Lu YC, Hudgens GA. Hormonal responses to psychological stress in men preparing for skydiving. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(8): 2503-2509.
13. Bosch JA, De Geus EJ, Veerman EC, Hoogstraten J, Nieuw Amerongen AV. Innate secretory immunity in response to laboratory stressors that evoke distinct patterns of cardiac autonomic activity. *Psychosom Med.* 2003;65(2):245-258.
14. Yamaguchi M, Wakasugi J, Sakakima J. Evaluation of driver stress using biomarker in motor-vehicle driving simulator. *Conf Proc IEEE Eng Med Bio. Soc.* 2006;1: 1834-1837.
15. Chatterton RT, Vogelsong KM, Lu YC, Ellman AB, Hudgens GA. Salivary alpha-amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. *Clin Physiol.* 1996;16: 433-448.
16. Ljungberg G, Ericson T, Ekblom B, Birkhed D. Saliva and marathon running. *Scand J Med Sci Sports.* 1997;7:214-219.
17. Steerenberg PA, Van Asperen, IA, Van Nieuw Amerongen A, Biewenga A, Mol D, Medema GJ. Salivary levels of immunoglobulin A in triathletes. *Eur J Oral Sci.* 1997;105:305-309.
18. Chicharro JL, Pérez M, Carvajal A, Bandrés F, Lucia A. The salivary amylase, lactate and electromyographic response to exercise. *Jpn J Physiol.* 1999;49:551-554.
19. Oliveira VN, Bessa A, Lamounier RPMS, Santana MG, Mello MT, Espindola, FS. Changes in the Salivary Biomarkers Induced by an Effort Test. *Int J Sports Med.* 2010;31(6):377-381.
20. Severs AH, Schasfoort RBM. An immunosensor for syphilis screening based on surface plasmon resonance. *Biosens Bioelectron.* 1993; 8:185-189.
21. Viking TP, Askendal A, Liedberg B, Lindahl T, Tengvall P. Immobilized chicken antibodies improve the detection of serum antigens with surface plasmon resonance (SPR). *Biosens Bioelectron.* 1998;13(12):1257–1262.

22. Katz E, Willner I. Probing Biomolecular Interactions at Conductive and Semiconductive Surfaces by Impedance Spectroscopy: Routes to Impedimetric Immunosensors, DNA-Sensors, and Enzyme Biosensors *Electroanal.* 2003;15(11):913-947.
23. Macdonald JR. Impedance Spectroscopy Emphasizing Solid Materials and Systems (Ed.). New York: John Wiley & Sons, Inc., 1987.
24. Pejčić B, De Marco R. Impedance spectroscopy: Over 35 years of electrochemical sensor optimization. *Electrochim Acta.* 2006;51:6217-6229.
25. Ramanavicius A, Ramanaviciene A, Malinauskas A. Electrochemical Sensors Based on Conducting polymer – Polypyrrole. *Electrochim Acta.* 2006;51:6025 -6037.
26. Ferreira LF, Boodts JFC, Madurro AGB, Madurro JM. Gold electrodes modified with poly(4-aminophenol): incorporation of nitrogenated bases and an oligonucleotide. *Polym Int.* 2008;57(4):644–650.
27. Menezes HA, Maia G. Films formed by the electrooxidation of *p*-aminophenol (*p*-Aph) in aqueous medium: What do they look like? *J Electroanal Chem.* 2006;586(10):39–48.
28. Lofrano RCZ, Madurro JM, Abrantes LM, Romero JR. Electrocatalytic hydrogenation of carbonylic compounds using an electrode with platinum particles dispersed in films of poly-[allyl ether *p*-(2-aminoethyl) phenol]. *J Mol Catalys A Chemical.* 2004;218(1):73–79.
29. Silva TAR, Ferreira LF, Boodts JFC, Eiras SP, Madurro JM, Madurro AGB. Poly(4-hydroxyphenylacetic acid): a new material for immobilization of biomolecules. *Polym Eng Sci.* 2008;48(10):1963–1970.
30. Oliveira RML, Vieira SN, Alves HC, França EG, Franco DL, Ferreira LF, Brito-Madurro AG, Madurro JM. Electrochemical and morphological studies of an electroactive material derived from 3-hydroxyphenylacetic acid: a new matrix for oligonucleotide hybridization. *J Mater Sci.* 2010; 45:475-482.
31. Navazesh M. Methods for collecting saliva. *Ann N Y Acad Sci.* 1993; 694:72-77.
32. Francis CA, Hector MP, Proctor GB. Precipitation of specific proteins by freeze-thawing of human saliva. *Arch. Oral Biol.* 2000; 45:601-606.

33. Gouveia NM, Moura VL, Lacerda RF, Alves FV, Furtado FB, Espindola LS, Tavares M, Pereira PS, França SC, Espindola FS. Inhibition Human Salivary Alpha-Amylase Activity with Hydroalcoholic Crude Extract and Fractions of Pouteria SP. In: XXXVII Annual Meeting of SBBQ and XI Congress of the PABMB, 2008, Águas de Lindóia. Annals of XXXVII Annual Meeting of SBBQ and XI Congress of the PABMB.
34. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophor.* 1999; 20:3551-3567.
35. Zhang W, Chait BT. ProFound: an expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information. *Anal Chem.* 2000; 72: 2482-2489.
36. Olmsted JB. Analysis of cytoskeletal structures using blot-purified monospecific antibodies. *Methods Enzymol.* 1986; 134:467-472.
37. Hu S, Li Y, Wong DT, Xie Y, Ramachandran P, Loo JA, Li Y, Loo JA, Wong DT. Large-scale identification of proteins in human salivary proteome by liquid chromatography/mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis-mass spectrometry. *J Proteomics.* 2005;5:1714–1728.
38. Guo T, Rudnick PA, Wang W, Lee CS, Devoe DL, Balgley BM. Characterization of the human salivary proteome by capillary isoelectric focusing/nanoreversed-phase liquid chromatography coupled with ESI-tandem MS. *J Proteome Res.* 2006;5:1469–1478.
39. Messana I, Loffredo F, Inzitari R, Cabras T, Giardina B, Onnis G, Piludu M, Castagnola M. The coupling of RP-HPLC and ESI-MS in the study of small peptides and proteins secreted in vitro by human salivary glands that are soluble in acidic solution. *Euro J Morphol.* 2003;41:103–106.
40. Hirtz C, Chevalier F, Centeno D, Rofidal V, Egea JC, Rossignol M, Sommerer N, Péreère DD. MS characterization of multiple forms of alpha amylase in human saliva. *J Proteomics.* 2005;5: 4597-4607.
41. Hardt M, Thomas LR, Dixon SE, Newport G, Agabian N, Prakobphol A, Hall SC, Witkowska, HE, Fisher SJ. Toward Defining the Human Parotid Gland Salivary Proteome and Peptidome: Identification and Characterization Using

- 2D SDS-PAGE, Ultrafiltration, HPLC and Mass Spectrometry. *Biochem.* 2005; 44: 2885-2899.
- 42.Redondo R AF, Santos FR. Evolutionary studies on an  $\alpha$ -amylase gene segment in bats and other mammals. *Genetica.* 2006;126:199–213.
- 43.Ouerghi O, Touhami A, Jaffrezic-Renault N, Martelet C, Ben Ouada H, Cosnier S. Impedimetric immunosensor using avidin–biotin for antibody immobilization. *Bioelectrochemistry.* 2002;56:131-133.
- 44.Radi AE, Berbel XM, Lates V, Marty JL. Label-free impedimetric immunosensor for sensitive detection of ochratoxin A. *Biosens Bioelectron.* 2009; 24:1888–1892.
- 45.Wu C, Lin C, Wang W. Development of an enrofloxacin immunosensor based on label-free electrochemical impedance spectroscopy. *Talanta.* 2009;79:62-67.
- 46.Scannapieco FA, Solomon L, Wadenya RO. Emergence in human dental plaque and host distribution of amylase binding streptococci. *J Dent Res.* 1994;73:1627-1635.