



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO  
AMBIENTE - PPGSHMA**

**Jordana Sirlaide Lima da Silva**

**BIOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO BASEADO EM  
CONCANAVALINA A E FILMES DE POLIANILINA  
PARA DETECÇÃO DE LIPOPOLISSACARÍDEO E  
ÁCIDO LIPOTEICÓICO BACTERIANOS**

**Vitória de Santo Antão**

**2013**

**Jordana Sirlaide Lima da Silva**

**BIOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO BASEADO EM  
CONCANAVALINA A E FILMES DE POLIANILINA  
PARA DETECÇÃO DE LIPOPOLISSACARÍDEO E  
ÁCIDO LIPOTEICÓICO BACTERIANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Danielly Lima de Oliveira

**Vitória de Santo Antão**

**2013**

Catálogo na Fonte  
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.  
Bibliotecária Ana Ligia Feliciano dos Santos, CRB4: 1650

S586b Silva, Jordana Sirlaide Lima da.

Biossensor impedimétrico baseado em concanavalina A e filmes de polianilina para detecção de lipopolissacarídeo e ácido lipoteicóico bacterianos. / Jordana Sirlaide Lima da Silva. Vitória de Santo Antão: O Autor, 2013.  
xiii, 74 folhas: il.; gráf.

Orientador: César Augusto Souza de Andrade.

Co-orientador: Maria Danielly Lima de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Saúde Humana e Meio Ambiente, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Biossensor eletroquímico. 2. Lipopolissacarídeos. 3. Ácido lipoteicóico. I. Andrade, César Augusto Souza de (Orientador). II. Oliveira, Maria Danielly Lima de (Co-orientador). III. Título.

574.192 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-18/2013



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE - Mestrado Acadêmico



Dissertação de Mestrado apresentada por **Jordana Sirlaide Lima da Silva** à Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, sob o título "BIOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO BASEADO EM CONCANAVALINA A E FILMES DE POLIANILINA PARA DETECÇÃO DE ÁCIDO LIPOTEICÓICO E LIPOPOLISSACARÍDEO BACTERIANOS" orientada pelo Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade, aprovada no dia 29 de maio de 2013 pela Banca Examinadora composta pelos seguintes professores:

---

**Dr. César Augusto Souza de Andrade**

Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente - CAV/UFPE

---

**Dra. Edvane Borges da Silva**

Núcleo de Biologia - CAV/UFPE

---

**Dra. Renata Francisca da Silva Santos**

Departamento de Física – UFPE

Autor

---

**Jordana Sirlaide Lima da Silva**



A meus pais, Joana e Maurício, por todo amor e dedicação.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. César Augusto Souza de Andrade pela orientação, grande paciência e dedicação que teve ao longo deste tempo na elaboração deste trabalho.

A Profª Maria Danielly Lima de Oliveira pela co-orientação, apoio e dedicação para a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Celso P. de Melo por ter permitido a utilização do seu laboratório para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores, corpo técnico administrativo e amigos do Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da UFPE.

A CAPES pela bolsa de estudos e suporte financeiro.

Aos amigos do Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Gilcélia, Jéssica, Débora, Maurília, Karen, Elton, Vinícius, Jair, Beatriz e Estefanie.

A minha família, principalmente, por todo amor e apoio incondicional em todas as etapas desta caminhada.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	Vii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	IX
<b>RESUMO</b>	X
<b>ABSTRACT</b>	Xi
<b>CAPÍTULO 1</b>	12
<b>1.1 Introdução</b>	12
<b>1.2 Objetivos</b>	14
<b>1.2.1 Objetivo Geral</b>	14
<b>1.2.2. Objetivos Específicos</b>	14
<b>1.3 Revisão da Literatura</b>	15
<b>1.3.1 Polímeros Condutores</b>	15
<b>1.3.1.1 Polianilina</b>	17
<b>1.3.1.2 Síntese de Polianilinas</b>	19
<b>1.3.2 Lectinas</b>	20
<b>1.3.2.1 Concanavalina A</b>	22
<b>1.3.3 Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas</b>	24
<b>1.3.4 Biossensores</b>	27
<b>1.3.4.1 Biossensores Impedimétricos</b>	29
<b>1.3.4.2 Biossensores Amperométricos</b>	29
<b>1.3.4.3 Biossensores Potenciométricos</b>	30
<b>1.3.5 Técnicas Eletroanalíticas</b>	30
<b>1.3.6 Espectroscopia de Impedância</b>	31
<b>1.3.7 Microscopia Eletrônica de Varredura</b>	32
<b>1.3.8 Espectroscopia Raman</b>	34
<b>CAPÍTULO 2</b>	36
<b>Impedimetric biosensor based on Concanavalin A and polyaniline films for bacterial lipopolysaccharide and lipoteichoic acid detection</b>	
<b>2.1. Resumo</b>	37
<b>2.2 Abstract</b>	37
<b>2.3 Introdução</b>	38

<b>2.4 Material e Métodos</b>	<b>39</b>
<b>2.4.1 Materials</b>	<b>39</b>
<b>2.4.2 Synthesis of PANi films</b>	<b>40</b>
<b>2.4.3 Immobilization of ConA on PANi films and LPS detection</b>	<b>40</b>
<b>2.4.4 Dielectric measurements</b>	<b>40</b>
<b>2.4.5 Scanning electron microscopy measurements</b>	<b>40</b>
<b>2.4.6 Raman spectroscopy</b>	<b>40</b>
<b>2.5 Resultados e Discussão</b>	<b>41</b>
<b>2.5.1 Morphological analysis</b>	<b>41</b>
<b>2.5.2 Raman analysis</b>	<b>42</b>
<b>2.5.3 Electrical impedance spectroscopy measurements</b>	<b>43</b>
<b>2.5.4 LPS recognition</b>	<b>44</b>
<b>2.6 Conclusões</b>	<b>46</b>
<b>2.7 Referências Bibliográficas</b>	<b>47</b>
<b>CAPÍTULO 3</b>	<b>50</b>
<b>DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES</b>	
<b>3.1 Análise Morfológica</b>	<b>50</b>
<b>3.2 Análise Espectral (Raman)</b>	<b>51</b>
<b>3.3 Medidas de Espectroscopia de Impedância Elétrica</b>	<b>52</b>
<b>3.4 Reconhecimento de LPS</b>	<b>54</b>
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>57</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>59</b>

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1	Representações das fórmulas estruturais de alguns polímeros condutores	16
Figura 2	Estrutura das polianilinas na forma básica	17
Figura 3	Representações das formas mais comuns da PANi	18
Figura 4	Estrutura tridimensional da Concanavalina A	24
Figura 5	Estrutura do ácido lipoteicóico do <i>S. aureus</i>	25
Figura 6	Estrutura do lipopolissacarídeo de <i>E. coli</i>	26
Figura 7	Componentes de um biossensor	28
Figura 8	Representação esquemática geral do MEV	33
Figura 9	Espalhamento de luz: (a) espalhamento inelástico (região Stokes); (b) espalhamento elástico (Rayleigh); (c) espalhamento inelástico (região anti-Stokes)	35
Figura 10	SEM images of PANI film (a), PANIG-ConA-BSA (b), PANIG-ConA-BSA- <i>E. coli</i> (c) and PANIG-ConA-BSA- <i>S. aureus</i> (d).	41
Figura 11	Raman spectra of PANI, PANIG-ConA-BSA, PANIG-ConA-BSA- <i>E. coli</i> and PANIG-ConA-BSA- <i>S. aureus</i> .	42
Figura 12	Nyquist diagrams of the stepwise process, as follow: PANI films (curve a), PANIG (curve b), PANIG-ConA (curve c) and PANIG-ConA-BSA (curve d).	43
Figura 13	Nyquist diagrams of PANI, PANIG, PaniG-ConA-BSA, and LPS from <i>E. coli</i> (a) and lipoteichoic acid from <i>S. aureus</i> (b) at different concentrations. (■)- PANI, (●)- PANIG, (▲)-PANIG-ConA, (▼)-PANIG-ConA-BSA,(◆)-PANIG-ConA LPS/TLA <sub>50</sub> µg/mL, (+)-PANIG-ConA-LPS/TLA <sub>100</sub> µg/mL, (x)-PANIG-ConA-LPS/TLA <sub>125</sub> µg/mL, (*)-PANIG-ConA-LPS/TLA <sub>150</sub> µg/mL, (-)PANIG-ConA-LPS/TLA <sub>200</sub> µg/mL	45
Figura 14	Nyquist diagrams of different response of PANIG-ConA-BSA system to LPS from <i>E. coli</i> and lipoteichoic acid from <i>S. aureus</i> at fixed concentration (200µg/mL).	46
Figura 15	Imagens de MEV: filme de PANI (a), PANIG-ConA-BSA (b), PANIG-ConA-BSA- <i>E. coli</i> (c) and PANIG-ConA-BSA- <i>S. aureus</i> (d).	50
Figura 16	Espectro de Raman de PANI, PANIG-ConA, PANIG-ConA- <i>E. coli</i> e PANIG-ConA- <i>S. aureus</i> .	51
Figura 17	Diagramas de Nyquist do processo de montagem: filme de PANI	53

(curva a), PANIG (curva b), PANIG-ConA (curva c) e PANIG-ConA-BSA (curva d).

- Figura 18 Diagramas de Nyquist de PANI, PANIG, PANIG-ConA-BSA, e LPS de *E. coli* (a) e ácido lipoteicóico de *S. aureus* (b) em diferentes concentrações. (■)- PANI, (●)- PANIG, (▲)-PANIG-ConA, (▼)- PANIG-ConA-BSA, (◆)-PANIG-ConA LPS/TLA<sub>50µg/mL</sub>, (+)-PANIG-ConA-LPS/TLA<sub>100µg/mL</sub>, (x)-PANIG-ConA-LPS/TLA<sub>125µg/mL</sub>, (\*)-PANIG-ConA-LPS/TLA<sub>150µg/mL</sub>, (-)PANIG-ConA-LPS/TLA<sub>200µg/mL</sub>. 55
- Figura 19 Impedância elétrica das diferentes respostas do sistema PANIG-ConA-BSA para LPS de *E. coli* e LTA de *S. aureus* em concentração fixa (200 µg/mL). 56

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

BSA	Albumina do soro bovino
ConA	Concanavalina A
EIE	Espectrosocopia de Impedância Elétrica
EIS	Electrical Impedance Spectroscopy
ER	Espectroscopia Raman
H	Hora
Hz	Hertz
k $\Omega$	Quiloohm
kV	Quilovolt
LAL	Limulus amoebocyte lysate
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Ácido lipoteicóico
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Min	Minuto
mL	Mililitro
mV	Milivolt
Nm	Nanometro
PANi	Polianilina
PANiG	Polianilina + Glutaraldeído
PC	Polímeros Condutores
RCT	Resistência à transferência de carga
Re	Resistência à passagem de elétrons
SEM	Scanning Electronic Microscopy
Zim	Impedância imaginária
Zre	Impedância real
$\mu$ g	Micrograma
°C	Graus Celsius

## RESUMO

Neste trabalho, relatamos o desenvolvimento de um novo biossensor eletroquímico com base na interação de Concanavalina A (ConA) e filmes finos de polianilina (PANI) para detecção de lipopolissacarídeos (LPS) de *Escherichia coli* e ácido lipoteicóico de *Staphylococcus aureus*. O biossensor impedimétrico foi fabricado por automontagem da lectina ConA em eletrodo de aço modificado com PANI por meio de ligação covalente através do glutaraldeído. Espectroscopia de impedância elétrica (EIE), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia Raman foram utilizadas para caracterizar o processo de montagem do eletrodo modificado e demonstraram que a ConA foi capaz de interagir com o LPS e ácido lipoteicóico testados. Em adição, medidas de EIE revelaram que a resistência à transferência de carga (RCT) aumenta consideravelmente após a reação da lectina com açúcares específicos presentes na molécula de LPS e ácido lipoteicóico. Os resultados mostraram que a lectina ConA manteve a sua atividade biológica e mudou a resposta eletroquímica. O bioeletrodo exibe uma resposta de impedância eletroquímica a lectina-lipopolissacarídeo/ácido lipoteicóico, num intervalo linear, com valores máximos de RCT em 200 µg/mL para *E. coli* (1,50 kΩ) e *S. aureus* (1,80 kΩ). Assim, o sistema de reconhecimento proporciona uma interface biomimética adequada para a detecção de componentes de bactérias gram-positivas e gram-negativas.

**Palavras-Chave:** lectina, espectroscopia de impedância elétrica, endotoxina, polianilina.

## ABSTRACT

In this work, we report the development of a new electrochemical biosensor based on Concanavalina A (ConA) and polyaniline (PANI) thin films interactions for detection of lipopolysaccharides (LPS) from *Escherichia coli* and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*. The impedimetric biosensor is fabricated by self-assembled ConA lectin on the PANI-modified steel electrode through covalent binding by using glutaraldehyde.. Electrical impedance spectroscopy (EIS), scanning electron microscope (SEM) and Raman spectroscopy were applied to characterize the assembly process of the modified electrode and showed that ConA was able to interact with lipoteichoic acid and LPS tested. The EIS measurements revealed that the resistance charge transfer (RCT) increases considerably after lectin reaction with specific sugars present in the lipopolysaccharide and lipoteichoic acid molecules. The results showed that ConA lectin retained its activity and changed the electrochemical response. The bioelectrode exhibits an electrochemical impedance response to lectin-lipopolysaccharide/lipoteichoic acid, in a linear range with maximum values of RCT at 200  $\mu\text{g/mL}$  to *E. coli* (1.50 k $\Omega$ ), and *S. aureus* (1.80 k $\Omega$ ). Thus, the recognition system provides an appropriate biomimetic interface for detection of constituents of gram-positive and gram-negative bacteria.

**Keywords:** Lectin, electrical impedance spectroscopy, endotoxin, polyaniline



# CAPÍTULO 1

## 1.1 Introdução

Nas células vivas diversas proteínas preservam sua funcionalidade mesmo quando estão ancoradas a uma superfície como filmes poliméricos. O ancoramento destas proteínas, denominadas integrais, é necessário para todas as funções propostas, sendo estabelecido pelo segmento terminal e formado por aminoácidos apolares (VERGE'RES *et al.*, 1995) ou por meio de uma cadeia alquílica composta por no mínimo dezesseis grupos metílenos (CASEY *et al.*, 1995). Esta estratégia natural de interação hidrofóbica pode ser aplicada no desenvolvimento de biossensores através do pré-revestimento de eletrodos metálicos com filmes poliméricos.

Os biossensores são sistemas de biorreconhecimento cujo agente de reconhecimento é um componente biológico com algum tipo de atividade, o que significa que um processo bioquímico pode ser a fonte do sinal analítico. Além disso, uma das principais características dos biossensores é a alta seletividade a determinados analitos e a sua resposta é proporcional à concentração de um determinado elemento biológico em estudo ou um grupo de substâncias.

Em adição, biossensores preparados utilizando polímeros condutores como camada de suporte possui tempo de resposta rápido e alta estabilidade operacional (MU E XUE, 1996). A polianilina (PANI) é um dos mais promissores PC devido às suas propriedades únicas, tais como a boa estabilidade ambiental, facilidade de síntese, simplicidade do processo de dopagem e sua elevada condutividade (SKOTHEIM *et al.*, 1998; WU *et al.*, 2010). Desta forma, a PANi é um material potencialmente atraente para aplicações em engenharia bioquímica e desenvolvimento de biossensores (WANG *et al.*, 2010).

Lectinas são modelos úteis para avaliação das interações proteína-carboidrato devido ao alto grau de especificidade a carboidratos apresentado por esta classe de moléculas. Concanavalina A (Con A), uma lectina obtida da *Canavalia ensiformis*, é inibida por  $\alpha$ -D-mano- ou glico-piranosídeos e tem sido extensivamente estudada devido a diversas

aplicações médicas (SCHAEFFER *et al.*, 1982; BRÜCK *et al.*, 2001), resultante da capacidade de ligação a carboidratos.

Na parede celular bacteriana são encontrados polissacarídeos que compõem as endotoxinas, lipopolissacarídeos (LPS) e o ácido lipoteicóico (LTA), presentes em bactérias. LPS são o maior componente estrutural exposto na superfície da membrana externa de bactérias Gram-negativas (PRESTON *et al.*, 1996). Enquanto o LTA pode ser encontrado em bactérias Gram-positivas (SEO *et al.*, 2008). Os efeitos da exposição de humanos às endotoxinas incluem febre, diarreia, vômitos, choque séptico e coagulação intravascular disseminada (ALEXANDER & RIETSCHEL, 2001). Desta forma, a detecção de LPS e LTA bacterianos desempenha um importante papel na pesquisa, indústria, controle alimentar e saúde pública (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Os indivíduos com sistema imunológico comprometido são predispostos à infecção por LPS bacterianos de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e pode ser fatal se ocorrer em órgãos vitais. Devido a isto, faz-se necessário um diagnóstico preciso para que se possa prescrever o uso de antibióticos específicos para o tratamento rápido do paciente e minimizar o desenvolvimento de resistência bacteriana.

Técnicas já estabelecidas para a quantificação de endotoxinas existem na indústria farmacêutica (BANG, 1956; LEVIN *et al.*, 1970). Atualmente, o método padrão para a determinação da concentração de LPS é o ensaio lisado do amebócito de *Limulus* (LAL). O ensaio LAL utiliza a hemolinfa de caranguejo-ferradura (*Limulus*), que coagula naturalmente na presença de LPS. O ensaio LAL padrão é relativamente complexo, exigindo operadores qualificados e várias fases de análise (BARNETT *et al.*, 2012). Diante disto, biossensores tem sido relatados para a detecção de LPS baseados em técnicas eletroanalíticas como espectroscopia de impedância elétrica (EIE).

A presente dissertação apresenta caráter inter e multidisciplinar, associando diversas áreas de conhecimento como a biotecnologia e a físico-química de interfaces. Portanto, visamos avaliar a interação da lectina ConA com filmes de PANi, e posteriormente aplica-lo no desenvolvimento de um biossensor para identificação de lipopolissacarídeos e ácido lipoteicóico bacterianos.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1. Objetivo geral

Avaliação da termodinâmica da interação PANi-lectina visando o desenvolvimento de um biossensor impedimétrico para detecção de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* e do ácido lipoteicóico de *Staphylococcus aureus*.

### 1.2.2. Objetivos específicos

- Obtenção de filmes eletroquímicos de PANi e adsorção da lectina na superfície de eletrodos metálicos modificados com PANi;
- Avaliação das características dielétricas dos filmes de PANi e superfícies de PANi-lectina modificada quimicamente por um agente ligante (glutaraldeído);
- Estudo das propriedades interfaciais do filme de PANi e PANi-lectina sobre superfície de eletrodo sólido por meio da técnica de espectroscopia de impedância elétrica;
- Utilização das técnicas de EIE e Raman para caracterização da interação lectina-eletrodo, PANi-lectina e amostras de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* e ácido lipoteicóico de *Staphylococcus aureus* em diferentes concentrações;
- Análise morfológica do sistema PANi-lectina, PANi-lectina-LPS e PANi-lectina-LTA utilizando microscopia eletrônica de varredura.

## 1.3 Revisão da Literatura

### 1.3.1 Polímeros Condutores

Uma classe específica de polímeros, conhecidos como polímeros condutores (PC) ou polímeros conjugados (Fig. 1), vem sendo extensivamente estudada devido às propriedades elétricas e ópticas que satisfazem as mais diversas áreas como a microeletrônica, química analítica, biotecnologia, dentre outras (GIZELI & LOWE, 1996; MU & XUE *et al.*, 1996; OKAMOTO *et al.*, 1998; GIL & KUBOTA, 1999; GURUNATHAN *et al.*, 1999; HU & CHU *et al.*, 2001; ANGELOPOULOS, 2001; ZHANG *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2010; MINKSTIMIENE *et al.*, 2010; HU *et al.*, 2012; TAMBOLI *et al.*, 2012). Esses polímeros podem combinar as propriedades mecânicas e processabilidade dos polímeros convencionais com um comportamento elétrico, óptico e magnético semelhante a dos metais e semicondutores inorgânicos. Esta característica faz com que estes materiais se enquadrem na categoria dos chamados metais sintéticos (MACDIARMID & EPSTEIN, 1991).

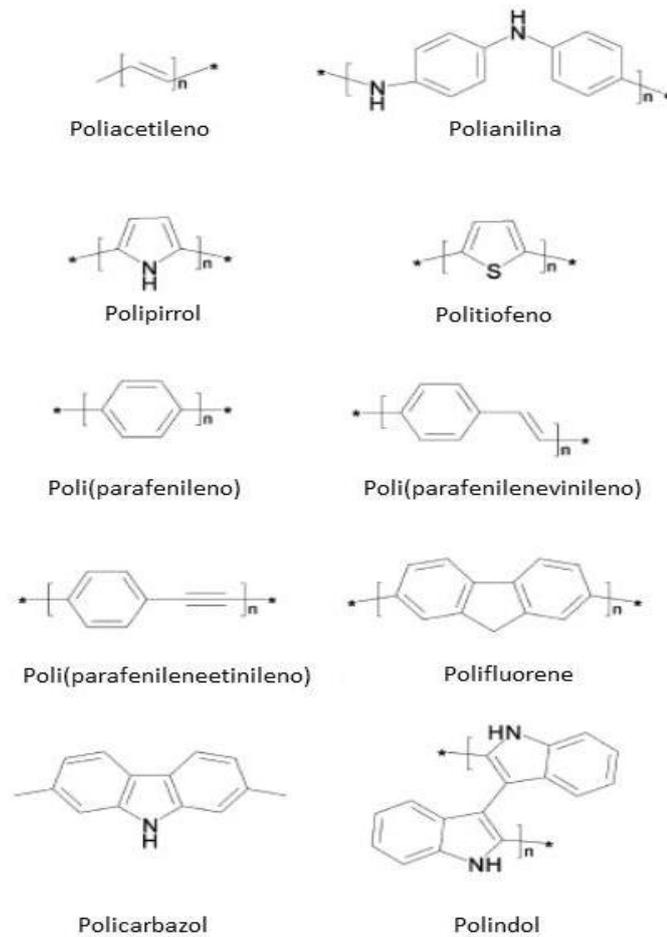


Figura 1 – Representações das fórmulas estruturais de alguns polímeros condutores (Fonte: Adaptado de LANGE *et al.*, 2008).

O primeiro polímero condutor foi obtido em 1977 (CHIANG *et al.*, 1977), pela exposição do poliacetileno na forma isolante à agentes dopantes, oxidantes ou redutores, tornando-o condutor elétrico intrínseco. O polímero neutro na forma isolante é convertido num complexo iônico (consistindo de um cátion (ou ânion) polimérico e um contraíon) que é a forma reduzida do agente oxidante (ou a forma oxidada do agente redutor).

Um importante critério na seleção de polímeros potencialmente condutores é a facilidade com que o sistema pode ser oxidado ou reduzido. Isto leva à escolha de polímeros com insaturações conjugadas, que possuam baixo potencial de oxidação. Os elétrons de caráter  $\pi$  podem ser facilmente removidos ou adicionados, para formar um íon polimérico, sem a destruição das ligações necessárias para a estabilidade da macromolécula (MATTOSO, 1996).

A condução elétrica ocorre pelo fenômeno de conjugação de ligações duplas, resultando na sobreposição de seus orbitais moleculares parcialmente preenchidos e permitindo o livre movimento dos elétrons entre essas lacunas.

Os PC são conhecidos em aplicações físicas e físico-químicas, tais como inibidores de corrosão (MENEGUZZI, 2000), capacitores compactos, revestimento eletrostático (JONAS & HEYWANG, 1994), proteção eletromagnética de computadores, dispositivos de “janela inteligente” (BASSO, 2000) - a qual varia a quantidade de luz transmitida -, entre outras. Devido a algumas vantagens como baixo custo, propriedades biológicas inertes, capacidade de exclusão de interferentes, alta velocidade de transferência de elétrons e facilidade de síntese sobre qualquer superfície metálica, independente da forma (SAXENA & MALHOTRA, 2003), os PC tem sido utilizados para confecção de sensores.

### 1.3.1.1 Polianilina

A polianilina (PANI) é conhecida desde 1862 como negro de anilina (LETHEBY, 1862). Dentre várias aplicações a PANi pode ser utilizada em baterias plásticas, sensores, superfícies condutoras, proteção contra corrosão, diodos emissores de luz, dispositivos fotovoltaicos e músculos artificiais (MACDIARMID, 2001; GERARD *et al.*, 2002; KANG *et al.*, 1998; BARROS *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2010; QAISER *et al.*, 2011; HU & CHU, 2011; HU *et al.*, 2012). A PANi possui em sua estrutura um átomo de nitrogênio entre os anéis fenila da cadeia (Fig. 2).

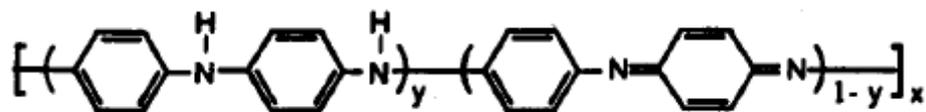


Figura 2 – Estrutura das polianilinas na forma básica (Fonte: MATTOSO, 1996).

Observa-se que a forma base da polianilina é composta por  $y$  e  $(1-y)$  unidades repetitivas das espécies reduzidas e oxidadas respectivamente. O valor de  $y$  pode variar continuamente entre 1 para o polímero completamente reduzido (contendo somente nitrogênios amina) e zero, no caso do polímero completamente oxidado (contendo somente nitrogênios imina) (HUANG *et al.*, 1986). A presença do átomo de nitrogênio confere à cadeia uma flexibilidade química que leva a existência de vários estados fundamentais que correspondem a diferentes estados de oxidação do polímero, que são designados pelos

termos leucoesmeraldina (forma mais reduzida), esmeraldina (forma intermediária) e pernigranilina (forma mais oxidada) (KANG *et al.*, 1998; MAIA *et al.*, 2000) (Fig. 3).

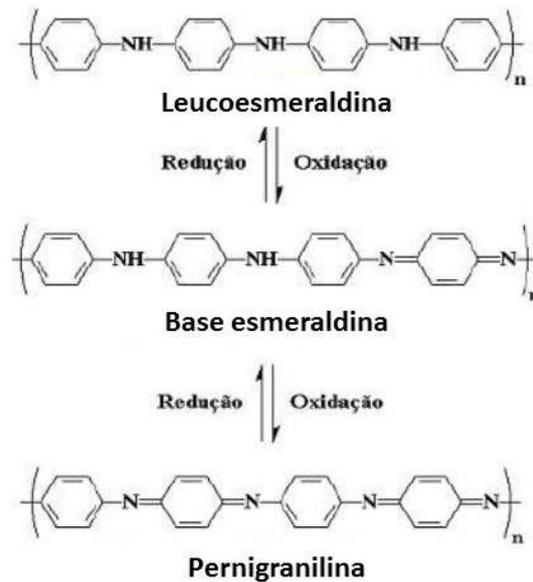


Figura 3 – Representações das formas mais comuns da PANi (Fonte: Adaptado de GOSPODINOVA & TERLEMEZYAN, 1998).

A polianilina e seus derivados destacam-se do ponto de vista tecnológico por apresentar as maiores possibilidades de aplicações, devido a sua excelente estabilidade química no estado dopado em condições ambientais, solubilidade, processabilidade, baixo custo, facilidade de polimerização e dopagem, em relação aos demais polímeros condutores (MATTOSO, 1996). Na aplicação como sensor a PANi e seus derivados destacam-se principalmente por sua alta seletividade a líquidos e gases (TOKO, 2000), podendo ser sensível também à umidade e proporcionando ainda a incorporação de materiais biologicamente ativos para aplicações em biossensores (XU *et al.*, 2006). A condutividade da PANi depende de sua habilidade no transporte de cargas ao longo da cadeia e transporte entre cadeias, qualquer interação com a PANi que altere estes processos afetará suas propriedades elétricas. Este é um princípio químico que habilita a PANi a ser usada como camada seletiva em sensores químicos, e devido sua sensibilidade à temperatura ambiente fácil deposição sobre uma variedade de substratos e ricas modificações estruturais, tem-se tornado atrativa para aplicações em sensores (HUANG *et al.*, 2004).

Toda a versatilidade da polianilina e seu potencial tecnológico são demonstrados dado o número de trabalhos envolvendo este polímero com as mais diversas aplicações tecnológicas desde unidades sensoriais (GE *et al.*, 2007) passando pela microeletrônica (MATTOSO, 1996) à ótica (LIU *et al.*, 2006).

### 1.3.1.2 Síntese de Polianilinas

A polianilina pode ser sintetizada na forma de pó por oxidação química, ou na forma de filmes finos pela oxidação eletroquímica do monômero sobre eletrodos de diferentes materiais inertes. A síntese química convencional (MACDIARMID *et al.*, 1987; YANG & CHEN, 1995) da PANi tem a grande vantagem de produzir um polímero de alto peso molecular e de elevada pureza, em grandes quantidades e na forma de pó verde, o qual pode ser obtido diretamente no estado dopado. Entretanto, a síntese eletroquímica (WANG *et al.*, 1987; GERARD *et al.*, 2002) da PANi possui algumas vantagens sobre a síntese química: não necessita de agente oxidante e catalisador; facilidade de caracterização *in situ* por técnicas espectroscópicas; e o polímero é obtido diretamente na forma de filmes finos.

A síntese química da polianilina (MACDIARMID *et al.*, 1987; GENIES *et al.*, 1990; MANOHAR *et al.*, 1991) pode ser conduzida utilizando-se uma variedade de agentes oxidantes (( $\text{NH}_4$ ) $2\text{S}_2\text{O}_8$ ,  $\text{MnO}_2$ ,  $\text{Cr}_2\text{O}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{K}_2\text{ClO}_3$ ), e meios ácidos (inorgânicos:  $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{HClO}_4$ ,  $\text{HPF}_6$ ), poliácidos (poli(vinil sulfônico) e poli(estireno sulfônico)) e ácidos funcionalizados (cânforssulfônico e dodecilbenzeno sulfônico), sendo o sistema mais comum o peroxidissulfato de amônio em soluções aquosas de  $\text{HCl}$  com pH entre 0 e 2. No método de síntese química usual, utiliza-se ácido clorídrico ou sulfúrico (pH variando entre 0 e 2) com persulfato de amônio como oxidante. O pH da síntese é um dos fatores que mais influencia a estrutura do polímero obtido (GENIES *et al.*, 1990).

A síntese eletroquímica é realizada pela oxidação anódica da anilina sobre um eletrodo de metal inerte como platina ou ouro, vidro condutor ou outros metais menos comuns como o carbono vítreo. Os métodos de polimerização mais utilizados são os de corrente e potencial controlados. Neste último caso, para a formação de um filme de polianilina o potencial pode permanecer fixo, em geral, com um valor entre 0,7 V e 1,2 V, ou por voltametria cíclica com o potencial sendo ciclado entre -0,2 V e 1,2 V com uma velocidade de varredura de 10 a 100 mV/s. (MATTOSO, 1996). O eletrólito é uma solução ácida ( $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HBF}_4$ ,  $\text{HClO}_4$ ,  $\text{CF}_3\text{COOH}$ , ácido poli(vinil sulfônico) – PVS, etc), que influi decisivamente nas propriedades do polímero (peso molecular, morfologia, condutividade, solubilidade, etc). A concentração do eletrólito, por exemplo, influencia a taxa

de eletrodeposição e o peso molecular do polímero (YOSHIKAWA *et al.*, 1989; MATTOSO *et al.*, 1994), e o tipo de ânion, a morfologia (WANG, 1987) e solubilidade da polianilina (SANTOS *et al.*, 1995).

### 1.3.2 Lectinas

As lectinas são definidas como proteínas de origem não imune que se ligam de maneira reversível a carboidratos ou substâncias que contenham açúcares, tais como glicoproteínas. Têm capacidade em aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados devido a sua capacidade específica de reconhecimento e ligação sem, entretanto, alterar a estrutura de nenhum glicosil ligante (LIENER *et al.*, 1986).

A história da pesquisa com lectinas iniciou em 1888 quando Hermann Stillmark observou que extratos de *Ricinus communis* causavam aglutinação de eritrócitos, sendo o ingrediente ativo uma proteína denominada de ricina (KENNEDY *et al.*, 1995). Desta forma, a palavra aglutinina foi largamente utilizada para descrever moléculas e extratos que causam aglutinação de eritrócitos e outras células. Contudo, apenas em 1954 que Boyd e Shapleig introduziram o termo lectina para enfatizar a habilidade de algumas aglutininas de plantas em discriminar eritrócitos de diferentes tipos sanguíneos, devido a reações com os resíduos de açúcares expostos na superfície destas células (SHARON & LIS, 2004). No processo de interação, as lectinas formam com os carboidratos estruturas complexas que apresentam constantes de associação elevadas, culminando freqüentemente em fenômenos de agregação.

O termo lectina foi redefinido com base em critérios funcionais e estruturais, sendo atualmente definida como todas as proteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico que se liga reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos. As diferenças estruturais entre as diversas lectinas se devem à variação do número de subunidades por moléculas e pela natureza dos polipeptídeos (PNEUMANS & VAN DAMME, 1996). Em função dessa nova definição, as lectinas têm sido subdivididas em três classes: merolectinas, hololectinas e quimerolectinas.

- Merolectinas: são proteínas exclusivamente formadas por um domínio de ligação a carboidratos. São pequenas e incapazes de aglutinar células por causa de sua natureza monovalente (DE BOLLE *et al.*, 1993).

- Hololectinas: também são formadas exclusivamente por domínios de ligação a carboidratos, mas contém pelo menos dois desses domínios. Elas compreendem a

maioria das lectinas de plantas e se comportam como verdadeiras aglutininas (PNEUMANS & VAN DAMME, 1996).

- Quimerolectinas: são a fusão de proteínas contendo um ou mais domínios de ligação a carboidratos e um domínio não relacionado, o qual apresenta atividade catalítica bem definida ou outra atividade biológica e atua independente do domínio de ligação a carboidratos (PNEUMANS & VAN DAMME, 1996).

Portanto, de acordo com as diferentes especificidades por açúcares apresentadas pelas lectinas, Makela sugeriu (MAKELA, 1957) que as mesmas fossem classificadas em quatro grupos, conforme a configuração relativa dos átomos de carbono C3 e C4 no anel piranosídeo do açúcar responsável pela ligação específica. Desta forma, ao grupo I pertencem as lectinas específicas por L-fucose; ao grupo II aquelas que se ligam especificamente a D-galactose e N-acetil-galactosamina; ao grupo III incluem-se as específicas por D-glicose e D-manose e ao grupo IV aquelas capazes de se ligar a D-idose, D-gulose, L-glicose e L-xilose.

Lectinas estão largamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em seres unicelulares (IMBERT *et al.*, 2004), animais (MOURA *et al.*, 2006) e vegetais (LEITE *et al.*, 2005). Em vegetais, as lectinas são freqüentemente isoladas de sementes (LATHA *et al.*, 2006) e, em menores proporções, de outros tecidos vegetais, tais como folhas (COELHO & SILVA, 2000), cascas (INA *et al.*, 2005), raízes (WANG & NG, 2006) e flores (SUSEELAN *et al.*, 2002). As lectinas de plantas que são produzidas em órgãos de estocagem (sementes, na maioria, mas também tubérculos, bulbos e raízes, dependendo da planta) dominam o cenário da lectinologia por serem encontradas em quantidades preparativas.

As lectinas, por terem a habilidade de se ligar a mono e oligossacarídeos, apresentam uma variedade de efeitos biológicos, alguns dos quais servindo como base para a aplicação de lectinas na investigação de atividades químicas e biológicas, tais como ação contra insetos (COELHO *et al.*, 2007), fungos (SITOHY *et al.*, 2007), bactérias (SANTI-GADELHA *et al.*, 2006) e inibição do crescimento de células tumorais (PETROSSIAN *et al.*, 2007). Em adição, lectinas têm sido utilizadas na detecção e separação de glicoconjugados (PAIVA *et al.*, 2006), na determinação de tipos sanguíneos e diagnósticos de processos de desenvolvimento, diferenciação e transformação neoplásica (LI *et al.*, 2007) e no tratamento de condições pré-cancerosas (WROBLEWSKI *et al.*, 2001).

Muitas substâncias, inclusive proteínas, estão sendo avaliadas quanto ao seu efeito antimicrobiano. As proteínas antimicrobianas, em animais, constituem parte do sistema imune inato. Em plantas, elas também estão envolvidas no mecanismo de defesa (YE & NG,

2001). Proteínas isoladas de tecidos vegetais mostraram forte atividade antibacteriana (ORDÓÑEZ *et al.*, 2006) e antifúngica (WANG & BUNKERS, 2000; WANG & NG, 2003).

A habilidade que lectinas de plantas têm em reagir com carboidratos expostos na superfície celular de micróbios tornou possível o emprego dessas biomoléculas como sondas-diagnóstico para identificação de bactérias patogênicas, que estão baseadas na reação de aglutinação seletiva entre lectina e bactéria (DOYLE & SLIFKIN, 1994).

Dessa forma, as complicações decorrentes de infecções por bactérias é um desafio para a medicina bem como, a busca de produtos bioativos que venha a mitigar esses tipos de infecções se perpetua como um grande desafio da ciência. Assim, o desenvolvimento de pesquisas que visem o desenvolvimento de dispositivos que utilizem lectinas para detecção desses patógenos torna-se um grande aliado na ciência na busca de compostos que possam combater as infecções por microrganismos patológicos de maneira mais rápida e eficaz.

#### **1.3.2.1 Concanavalina A**

Lectinas de leguminosas constituem uma grande família de proteínas homólogas, estruturalmente similares e com especificidades distintas para carboidratos. Elas são o grupo de lectinas vegetais mais bem estudado e caracterizado (SHARON, 2007). Além disso, em torno de 210 seqüências de lectinas de leguminosas são conhecidas, sendo todas homólogas (CHANDRA *et al.*, 2006). A família das lectinas de leguminosas compreende aproximadamente 650 gêneros e 18.000 espécies, sendo a maior família das lectinas (HEYWOOD, 1971).

Apesar de terem essencialmente a mesma estrutura terciária, as lectinas de leguminosas exibem uma considerável diversidade no modo que seus monômeros se agregam em dímeros e tetrâmeros com pequenas alterações na seqüência de aminoácidos (CHANDRA *et al.*, 2001; SRINIVAS *et al.*, 2001). As lectinas da família das leguminosas possuem elevados teores de aminoácidos básicos e hidroxilados (MOREIRA *et al.*, 1991). De modo geral, as lectinas de plantas apresentam grande heterogeneidade, sendo normalmente ricas em aminoácidos hidrofóbicos e ácidos, perfazendo até mais de 30% do conteúdo de aminoácidos e são pobres em aminoácidos sulfurados (LIS & SHARON, 1998).

Dentre as lectinas de leguminosas, a Concanavalina A (ConA) é a que possui a estrutura tridimensional melhor estudada e tem sua interação por moléculas de carboidratos bem conhecida (MOREIRA *et al.*, 1991). Tais características justificam seu uso nas áreas tecnológicas e de pesquisas de adsorção/interfaces.

A ConA é uma lectina obtida da *Canavalia ensiformis*, conhecido como feijão-deporco, e inibida por  $\alpha$ -D-manose ou glico-piranosídeos e tem sido estudada devido a diversas aplicações (SCHAEFFER *et al.*, 1982; BRÜCK *et al.*, 2001; SHEN *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2011; HU *et al.*, 2012; SAFINA, 2012), resultante da capacidade de ligação a carboidratos. Essa lectina foi isolada pela primeira vez em 1936 por Sumner e Howel (GOLDSTEIN *et al.*, 1997), sendo a lectina de leguminosa melhor caracterizada.

A ConA foi a primeira lectina de leguminosa a ser sequenciada e analisada quanto à sua estrutura tridimensional. A proteína consiste de quatro subunidades idênticas, unidas por ligações polares, ligações de hidrogênio e por interações eletrostáticas (REEKE *et al.*, 1975; BOUCKAERT *et al.*, 2000). A estrutura do monômero da ConA é globular e com dimensões de 42 Å x 40 Å x 39 Å. A ConA é constituída apenas de duas folhas  $\beta$  antiparalelas pregueadas, uma com seis fitas de forma quase plana e outra com sete fitas de forma côncava apresentando um total de 237 aminoácidos e peso molecular de 27kDa. Os sítios específicos aos carboidratos localizam-se em uma depressão no topo da superfície de cada subunidade. Contudo, para estes sítios formarem ligações com carboidratos é necessária a presença de íons metálicos divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) que, além de favorecer as ligações com carboidratos, conferem em alto grau de estabilidade estrutural na proteína, protegendo-a contra a inativação pelo calor e aumentando a resistência à hidrólise enzimática (EDELMAN *et al.*, 1972). Portanto, quando a ConA é dita ativada ou na forma ativa, ela contém os íons em sua estrutura, apresentando uma melhor ordenação estrutural, pois estes formam ligações com aminoácidos da proteína.

A ConA foi agrupada e classificada como uma proteína hololectina de classe III, devido à sua especificidade a D-glicose e D-manose (ALLEN & NEUBERGER, 1973) e também pela resistência a concentrações elevadas de ácidos (FINK *et al.*, 1994). A ConA é uma proteína polimérica cujo grau de associação é dependente de algumas variáveis, sendo a mais importante delas o valor do pH do meio. Entre o pH 2,0 e 5,5 a Con A existe como dímero de duas subunidades ligadas covalentemente com peso molecular de 55kDa. Em adição, em valores de pH acima de 5,5 encontra-se na forma tetramérica (Fig. 4) com peso molecular de 110kDa e com dímeros de 60 Å x 70 Å x 70 Å, sendo esta a forma a qual apresenta sítio específico a carboidrato (AGRAWAL & GOLDSTEIN, 1965; OLSON & LIENER, 1967; LORIS *et al.*, 1998). Os dímeros da estrutura tetramérica são estabilizados por ligações de hidrogênio e seis pontes em seu interior.

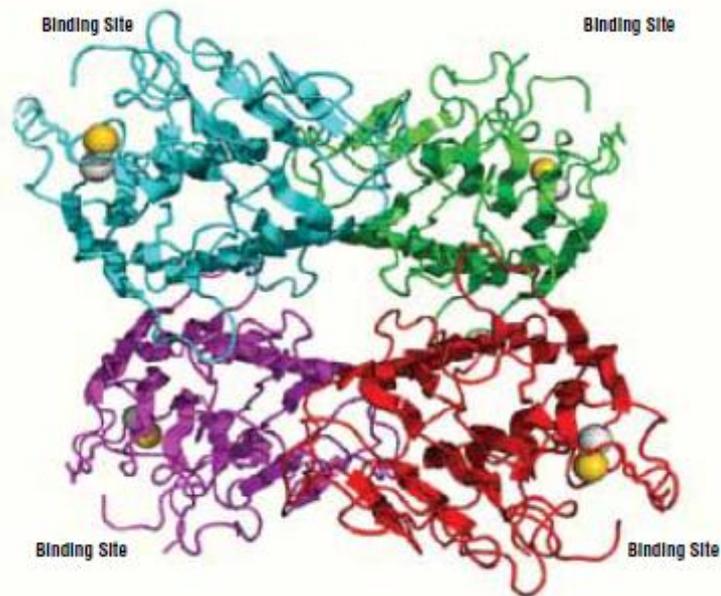


Figura 4 – Estrutura tridimensional da Concanavalina A (Fonte: Disponível em <http://chromblog.thermoscientific.com/blog/bid/86144/HPLC-Lectin-Column-for-Glycans-Glycopeptides-Glycoproteins>).

### 1.3.3 Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas

Na maioria das células bacterianas a parede celular protege o delicado protoplasma de choques mecânicos e osmóticos. A parede celular também determina a forma da célula e funciona como uma barreira molecular, impedindo que muitos compostos atinjam a superfície da membrana plasmática (PELCZAR, 1980). Contudo, a parede celular não deve ser vista meramente como uma proteção inerte, ela possui papel ativo na regulação e captação de moléculas pela célula e no reconhecimento celular por outros organismos (SINGLETON, 1992).

De acordo com a estrutura observada na parede celular, as eubactérias são divididas em dois grupos, gram-positivas e gram-negativas. A estrutura básica da parede celular de ambos os grupos é formada por moléculas de peptideoglicano, formando uma camada externa à membrana citoplasmática como uma rede contínua de polissacarídeos ligados por pontes peptídicas, cobrindo toda a superfície celular como uma macromolécula gigante (GLASER, 1973).

Na parede celular de bactérias Gram-positivas o peptideoglicano é o principal constituinte. Nestes microrganismos a parede celular é bastante grossa, chegando a ter de 30 à 100 nm de espessura (SHARON, 1975). Além disso, a parede celular dos organismos

Gram-positivos pode ainda apresentar ácidos teicóicos e ácidos lipoteicóicos, que são polímeros (Gutiérrez-Venegas & Cardoso-Jiménez, 2006).

O peptidoglicano e o ácido lipoteicóico (LTA) são os dois componentes principais que tem relação com o desenvolvimento de sepsis. Modelos experimentais tanto *in vivo* quanto *in vitro* mostraram que o LTA estimula respostas inflamatórias, e que este componente está associado a infecções específico (Gutiérrez-Venegas & Cardoso-Jiménez, 2006). Além disso, o LTA é descrito como responsável pela produção de óxido nítrico, choque séptico e falência múltipla dos órgãos provocados por infecções com *Staphylococcus aureus* (DE KIMPE *et al.*, 1995; KENGATHARAN *et al.*, 1998; SEO *et al.*, 2008).

O LTA de *S. aureus* é composto por cadeias lineares de poliglicerolfosfato (comprimento médio com 23 unidades de repetição), que estão ligadas a uma membrana âncora composta de Glc<sub>2</sub>-DAG (Fig. 5). Na posição 2 (indicada por X) tem-se repetidas subunidades de glicerolfosfato que podem não estar substituídas (hidrogênio), esterificada com D-alanil, ou ligados a N-acetilglucosamina (NAG) (GRÜNDLING & SCHNEEWIND, 2007).

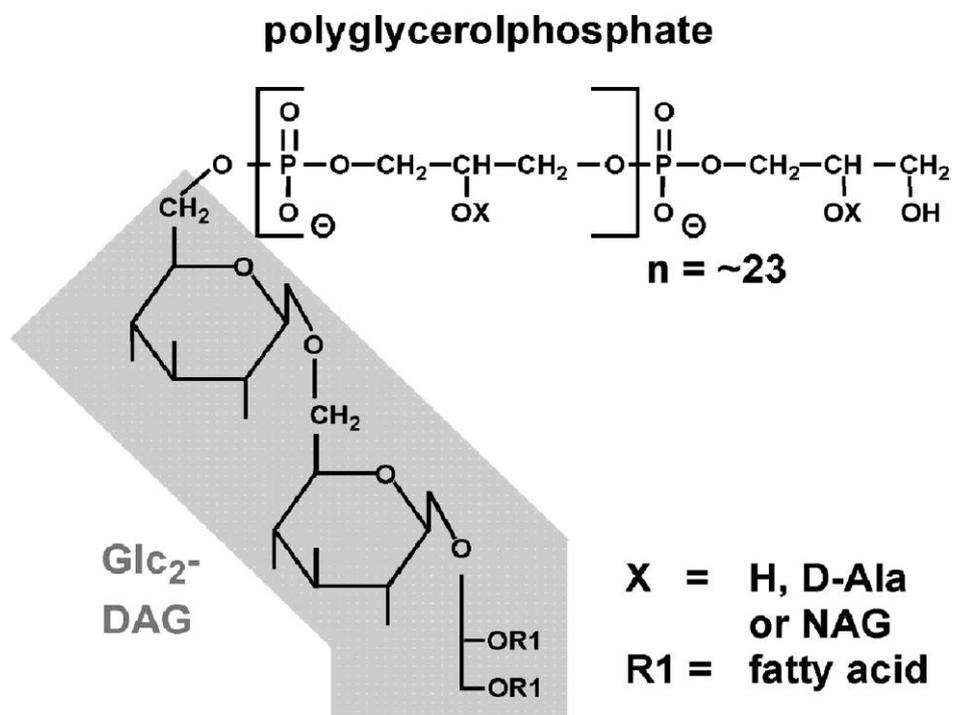


Figura 5 – Estrutura do ácido lipoteicóico de *S. aureus* (Fonte: Disponível em <http://jb.asm.org/content/189/6/2521/F1.large.jpg>)

A parede celular de bactérias Gram-negativas apresenta uma maior complexidade e é muitas vezes descrita pelo termo envelope celular. Neste caso uma fina porção de peptidoglicana, muitas vezes monocamada, encontra-se comprimida entre a membrana plasmática e uma membrana externa (SHARON, 1975). A membrana externa das bactérias Gram-negativas contém proteínas, fosfolípidos e lipoproteínas, mas o componente principal são os lipopolissacarídeos (LPS), responsáveis por aproximadamente 60% do peso seco desta camada. O LPS é uma molécula complexa que consiste de três regiões: uma região polissacarídica específica, denominada antígeno O (Ag-O), uma região polissacarídica conservada (core) e um componente lipídico chamado lipídio A (Fig. 6) (GOLDBERG & PIER, 1996).

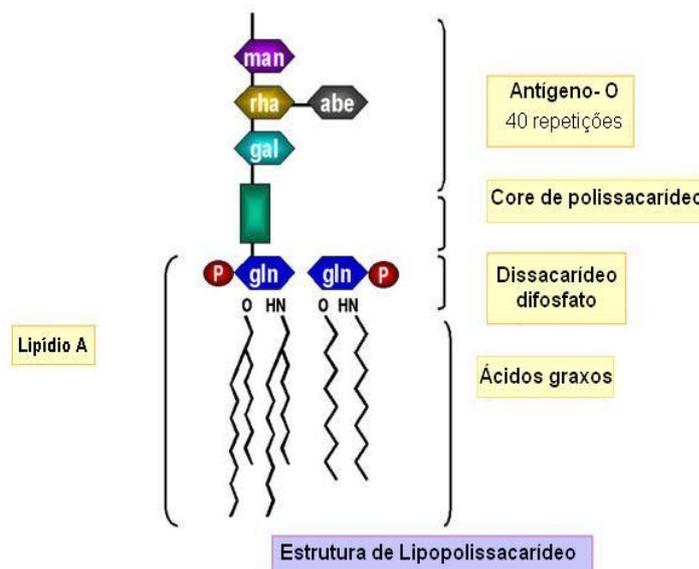


Figura 6 – Estrutura de lipopolissacarídeo (Fonte: Disponível em [pathmicro.med.sc.edu/portuguese/lipo-portuguese.jpg](http://pathmicro.med.sc.edu/portuguese/lipo-portuguese.jpg))

Esta classe de compostos desempenha um papel fundamental em processos químicos mediados por estas bactérias como o reconhecimento e ligação de metais, adesão a superfícies e reações de óxido-redução. LPS são também os mais comuns agentes causadores de doenças nosocomiais que levam a infecções crônicas e agudas em pacientes de queimaduras, deficiência imunológica e fibrose cística (SOARES *et al.*, 2008). Em adição, a presença de LPS no organismo resulta numa variedade de efeitos biológicos como choque séptico e coagulopatias em humanos. Estes efeitos biológicos resultam em coagulação intravascular disseminada, aumento de septicemia aguda e falência múltipla de

órgãos (HURLEY, 1995; OPAL *et al.*, 1999; MCADAM *et al.*, 2000; ALEXANDER & RIETSCHER, 2001).

A *E. coli* é a causa mais comum de infecções do trato urinário e também é responsável por várias doenças gastrointestinais, incluindo diarreia do viajante e diarreia infantil. No entanto, o LPS de *E. coli* por si só pode ser o agente causador de uma série de doenças e, é composto por repetitivas subunidades de resíduos de açúcares de glicosamina, galactosamina, glicose, galactose e ramnose (MCINTIRE *et al.*, 1967).

Diante do exposto, faz-se necessário um diagnóstico preciso para que se possa seguir o uso de antibióticos específicos para tratar rapidamente o paciente e minimizar o desenvolvimento de resistência bacteriana.

#### **1.3.4 Biossensores**

Os biossensores podem ser definidos como um sensor químico cujo elemento de reconhecimento é um componente biológico ativo, o que significa que um processo bioquímico é a fonte do sinal analítico. Assim uma das principais características dos biossensores é a sua alta seletividade com relação a um determinado analito (HULANICKI *et al.*, 1991; FATIBELLO-FILHO & CAPELATO, 1992).

A construção de um biossensor baseia-se na comunicação entre duas partes: o componente biológico ativo (a camada de reconhecimento) e um transdutor. A primeira faz o reconhecimento de uma determinada substância por meio de uma reação bioquímica específica, gerando uma variação na concentração de prótons, a liberação de gases, a emissão ou a absorção de luz, a emissão de calor, uma variação de massa, uma mudança no estado de oxidação do analito, entre outros; e a segunda, converte a energia destes eventos numa forma mensurável, como uma variação de corrente, potencial, temperatura e outros (MULCHANDANI & BASSI, 1995). Desta forma, diferentes componentes biológicos podem ser utilizados na construção de biossensores, tais como organismos, tecidos, células, organelas, membranas, enzimas, receptores, anticorpos, ácidos nucleicos e macromoléculas orgânicas (TURNER *et al.*, 1987; BHATIA *et al.*, 2000) (Fig. 7).

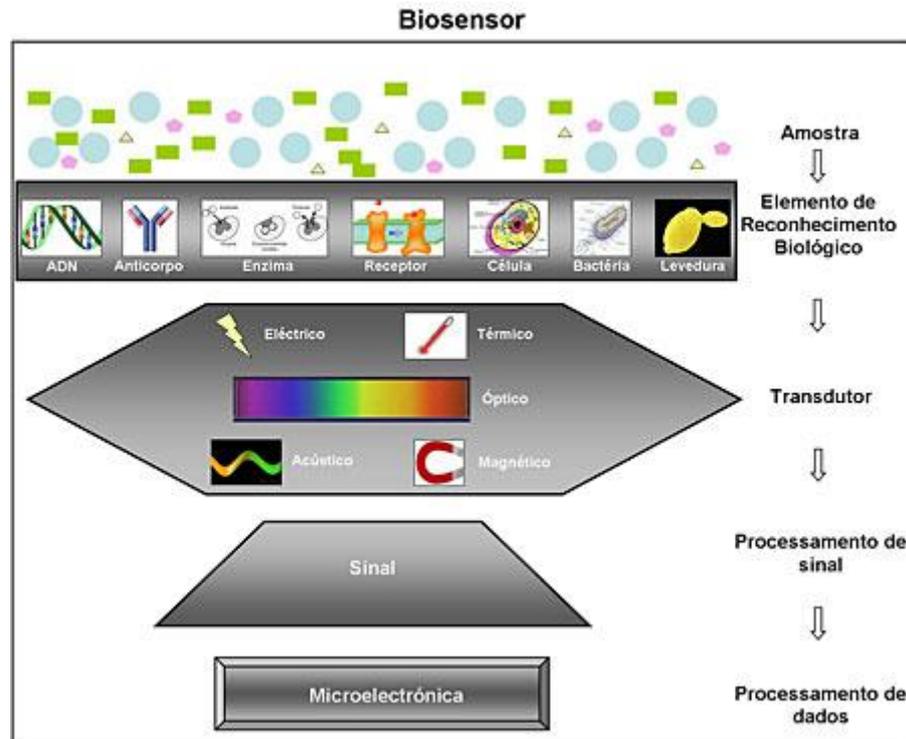


Figura 7 – Componentes de um biossensor. (Fonte: Disponível em <http://naturlink.sapo.pt/article.aspx?menuid=6&cid=26399&bl=1&vicwall=true>).

O primeiro biossensor foi construído em 1962 por Clark e Lion baseado na imobilização da enzima glicose oxidase sobre eletrodo e foi comercializado em 1975 por *Yellow Springs Instruments*. Este dispositivo foi aplicado como teste rápido de glicose no sangue de diabéticos (POHANKA & SKLÁDAL, 2008). Em 1977, foi desenvolvido o primeiro dispositivo que utilizava microorganismos vivos imobilizados na superfície de um eletrodo sensível à amônia. Esse dispositivo era aplicado na detecção do aminoácido arginina e seus criadores o denominaram de sensor bio-seletivo e, posteriormente, denominado como biossensor, termo que vem sendo utilizado até o momento para designar a união entre um material biológico e um transdutor físico. Desde então, a área de biossensores tem evoluído muito devido a sua potencial aplicabilidade (CUNHA *et al.*, 2003; ROGERS, 2006; HOA *et al.*, 2007; VELUSAMY *et al.*, 2010; SHINDE *et al.*, 2012; HU *et al.*, 2012).

As vantagens dos biossensores em relação às técnicas convencionais não se limitam à sensibilidade e seletividade, mas ao fato de, geralmente, dispensarem um elaborado pré-tratamento da amostra (praticidade), rapidez nas análises e gastos mínimos de reagentes, proporcionando assim, agilidade na obtenção dos resultados e redução no custo financeiro (FURTADO *et al.*, 2008).

As aplicações dos biossensores vão desde a utilização na agricultura (VELASCO & MOTTRAM, 2003), no monitoramento e controles ambientais (ROGERS, 2006), até diferentes segmentos industriais, especialmente nos ramos alimentícios e farmacêuticos (JANNEWAY *et al.*, 1997; KAPPEL *et al.*, 2006; BALLERSTADT *et al.*, 2006). Porém, o ramo de biossensores está centrado principalmente no campo de diagnóstico clínico. Neste campo o mais conhecido é o biossensor eletroquímico para acompanhamento do nível de glicose no sangue (FURTADO *et al.*, 2008).

#### **1.3.4.1 Biossensores Impedimétricos**

A integração da impedância com a tecnologia de reconhecimento biológico para a detecção de agentes patogênicos tem levado ao desenvolvimento de biossensores impedimétricos que estão encontrando uso generalizado (YANG & BASHIR, 2008). A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) está desempenhando um papel importante no desenvolvimento de biossensores. Em medições de EIS, um estímulo elétrico AC controlado entre 5 e 10 mV é aplicado sobre uma faixa de frequências, e isto faz com que uma corrente flua através do biossensor, de acordo com diferentes processos. EIS é um técnica amplamente utilizada para investigar interações de bioafinidade na superfícies de polímeros eletricamente condutores e pode ser empregada para investigar a detecção 'labelfree' de analitos através de transdução impedimétrica (TULLY *et al.*, 2008; VELUSAMY *et al.*, 2010).

#### **1.3.4.2 Biossensores Amperométricos**

Os biossensores amperométricos baseiam-se em reações de transferência de elétrons (oxi-redução) entre o material biocatalítico e o analito com um eletrodo de referência polarizado a uma tensão pré-determinada (WANG, 1999).

O princípio de funcionamento de um biossensor amperométrico é a medida da corrente produzida por uma reação química entre espécies eletroativas. Esta reação química ocorre num potencial determinado e a corrente gerada está relacionada com a espécie em solução. Assim estes biossensores dependem tipicamente de um sistema biológico que converta cataliticamente analitos inativos eletroquimicamente em produtos que possam ser oxidados ou reduzidos em um eletrodo operante, o qual é mantido em um potencial específico de acordo com um eletrodo de referência. A corrente produzida pela

reação redox é linearmente proporcional à concentração do produto eletroativo, a qual é proporcional ao analito (substrato da enzima) não eletroativo (MELO, 2008).

#### **1.3.4.3 Biossensores Potenciométricos**

Os biossensores potenciométricos são dispositivos do tipo íons-seletivos e são constituídos por uma membrana contendo biocatalisadores imobilizados onde ocorre a reação catalisada enzimaticamente. Neste tipo de biossensor, a geração de prótons  $H^+$  altera o pH do meio e uma diferença de potencial é criada entre um eletrodo de referência e o eletrodo íon-seletivo (KURALAY *et al.*, 2005). Os eletrodos de íons seletivos apresentam as vantagens de serem rápidos, sensíveis, de baixo custo e apresentarem simplicidade na medição, onde somente a medição do pH é necessária, não um sistema polarográfico como requer os sensores amperométricos. Em geral a faixa analítica destes sensores é de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  mol e como sua resposta é logarítmica, já que o potencial elétrico desenvolvido pelo eletrodo é proporcional ao logaritmo da atividade do íon em solução, a precisão da medida é constante por toda sua faixa dinâmica (SALGADO, 2001).

#### **1.3.5 Técnicas Eletroanalíticas**

Os métodos eletroanalíticos fazem uso das propriedades elétricas mensuráveis (corrente, potencial e carga) de um analito quando este é submetido a uma diferença de potencial entre eletrodos em uma cela eletroquímica. Tais medidas podem então ser relacionadas com algum parâmetro químico intrínseco do analito (WANG, 1994). Existe um variado número de técnicas eletroanalíticas que têm sido utilizadas para várias aplicações, entre elas o monitoramento ambiental, análises biomédicas, controle de qualidade de produtos e processos industriais. Os métodos eletroanalíticos oferecem uma série de vantagens, tais como (i) seletividade e especificidade das determinações resultantes da oxidação-redução das espécies analíticas de interesse num potencial aplicado específico; (ii) seletividade decorrente dos processos de oxidação-redução do analito em eletrodo de trabalho feito com material específico; (iii) grande sensibilidade e baixos limites de detecção resultante das técnicas de pré-concentração e modos de aquisição de sinal que proporciona ambiente com baixo sinal de fundo (BRETT & BRETT, 1998).

O desenvolvimento de dispositivos sensores tem como premissa básica a avaliação de processos interfaciais e superficiais, uma vez que estes processos são de fundamental importância no entendimento dos mecanismos de interação entre o sistema de

reconhecimento e o analito (SWALEN *et al.*, 1987; JACOBSON & WINKELER, 2000). Além disso, o estudo de processos interfaciais e superficiais é de grande relevância para a escolha do método de imobilização de espécies sobre a superfície de eletrodos e a avaliação de problemas associados aos métodos de imobilização. Assim, o estudo destes processos pode auxiliar na escolha do melhor meio de imobilização a ser utilizado e indicar as principais características (vantagens e desvantagens) associadas a cada método de imobilização (PEREIRA *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2002).

Desta forma, há de se ressaltar a relevante importância que tem adquirido as técnicas capazes de avaliar fenômenos em superfícies e interfaces, incluindo métodos espectroscópicos, microscópicos e/ou acústicos como espectroscopia de reflexão total atenuada, elipsometria (FUJIWARA *et al.*, 2001), ressonância de plásmons de superfície (KIM *et al.*, 2005), espectroscopia de impedância eletroquímica (SCHWEISS *et al.*, 2003), voltametria cíclica, microscopia de força atômica (STOICA *et al.*, 2003), microbalança de cristal de quartzo (PAVEY *et al.*), dentre outros.

### **1.3.6 Espectroscopia de Impedância Elétrica**

A técnica de Espectroscopia de Impedância Elétrica (EIE) fornece uma visão completa e detalhada das características elétricas da interface eletrodo/solução (LASIA, 1995; LASIA, 2001), e tais informações são de grande interesse na eletroquímica aplicada ou básica. A EIE é uma técnica de caracterização elétrica que permite estudar o comportamento geral de um sistema quando um número grande de processos intercorrelacionados ocorre em diferentes velocidades. Atualmente, a EIE é utilizada em ampla gama de estudos, abrangendo desde o transporte eletrônico em dispositivos semicondutores até o estudo de processos cinéticos eletroquímicos das mais diferentes naturezas, ou seja, processos que ocorrem em baterias de íons lítio (Bueno, 2003), células fotovoltaicas (BISQUERT *et al.*, 2000; GRÄTZEL, 2001), sistemas de corrosão e/ou processos eletrocatalíticos (ALVES *et al.*, 1998; DE ANDRADE *et al.*, 1998).

EIE é um método efetivo para verificar as propriedades interfaciais de uma superfície modificada e é freqüentemente utilizada no sentido de compreender transformações químicas e processos associados com os suportes condutores (KATZ & WILLNER, 2003; DONG *et al.*, 2001).

A técnica de EIE envolve a aplicação de uma perturbação de potencial ou de corrente no sistema sobre investigação. A perturbação do sistema é feita mediante a aplicação de um potencial contínuo (potencial central aplicado) sobre a qual é superposta

uma variação senoidal de potencial com pequena amplitude. Este método de aplicação do potencial possibilita que o sistema seja perturbado empregando poucos milivolts de forma a tornar possível a investigação de fenômenos eletroquímicos próximos ao estado de equilíbrio. Além disto, é possível perturbar o sistema usando diferentes valores de frequência, pois a onda de potencial é senoidal. Uma vez que a perturbação no sistema em investigação é de pequena amplitude é possível empregar a técnica para a análise de etapas de um mecanismo reacional (BARD & FAULKNER, 1980).

Na EIE surge uma corrente de natureza senoidal como resultado da aplicação de um potencial senoidal ao sistema. Mediante um monitoramento das relações entre o potencial aplicado e a corrente são obtidas a impedância do sistema e o ângulo de fase (defasagem da corrente em relação ao potencial aplicado) (DAMOS *et al.*, 2004).

O conceito de impedância, originalmente introduzido para descrever a resposta de sistemas compostos por capacitâncias, resistências e indutâncias, estendeu-se aos sistemas eletroquímicos, uma vez que inúmeros processos podem contribuir para a relação entre a corrente e o potencial do sistema. Assim, a partir das medidas da impedância e ângulo de fase é possível avaliar processos como transporte de carga (incluindo estimativa de velocidade de transferência), condutividade de filmes, capacitância redox e de dupla camada, coeficientes de difusão de portadores de carga (JIANG & KUCERNAK, 2002), entre outros.

A obtenção de informações a partir dos dados de impedância eletroquímica pode ser conduzida mediante a utilização de diferentes modelos de medida, como circuitos equivalentes ou modelos matemáticos.

### **1.3.7 Microscopia Eletrônica de Varredura**

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é a técnica de caracterização microestrutural mais versátil hoje disponível, encontrando aplicações em diversos campos do conhecimento, mais particularmente engenharia e ciências de materiais, engenharias metalúrgica e de minas, geociências e ciências biológicas, dentre outros. A interação de um fino feixe de elétrons focalizado sobre a área ou o microvolume a ser analisado gera uma série de sinais que podem ser focalizados para caracterizar propriedades da amostra, tais como composição, superfície topográficas, cristalografia, etc (GOLDSTEIN *et al.*, 1992).

O esquema representativo de um MEV é apresentado na Figura 8. Basicamente o MEV pode ser subdividido em duas partes principais: a coluna e a câmara de amostras.

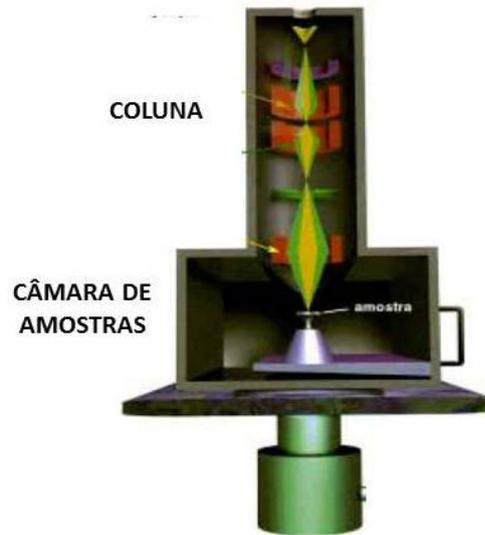


Figura 8 – Esquema geral do MEV (Fonte: Disponível em <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/microscopio/microscopia-eletronica-de-varredura-3.php>)

O princípio de um MEV consiste em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica cuja varredura está perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente. Por um sistema de bobinas de deflexão, o feixe pode ser guiado de modo a varrer a superfície da amostra segundo uma malha retangular. O sinal de imagem resulta da interação do feixe incidente com a superfície da amostra. O sinal recolhido pelo detector é utilizado para modular o brilho do monitor, permitindo a observação. A maioria dos instrumentos usa como fonte de elétrons um filamento de tungstênio (W) aquecido, operando numa faixa de tensões de aceleração de 1 a 50 kV. O feixe é acelerado pela alta tensão criada entre o filamento e o ânodo. Ele é, em seguida, focalizado sobre a amostra por uma série de três lentes eletromagnéticas com um spot menor que 4 nm (DEDAVID, 2007). O feixe interagindo com a amostra produz elétrons e fótons que podem ser coletados por detectores adequados e convertidas em um sinal de vídeo. Quando o feixe primário incide na amostra, parte dos elétrons difunde-se e constitui um volume de interação cuja forma depende principalmente da tensão de aceleração e do número atômico da amostra. Neste volume, os elétrons e as ondas eletromagnéticas produzidos são utilizados para formar as imagens ou para efetuar análises físico-químicas. Para serem detectados, as partículas e/ou os raios eletromagnéticos resultantes da

interação do feixe eletrônico com a amostra devem retornar à superfície da amostra e daí atingirem o detector. A profundidade máxima de detecção, portanto, a resolução espacial, depende da energia com que estas partículas ou raios atingem o detector, ou são capturadas pelo mesmo. Por exemplo: elétrons retroespalhados possuem maior energia do que os elétrons secundários, assim, o detector de elétrons retroespalhados irá operar na faixa de energia maior e o de elétrons secundários na faixa menor. A imagem formada a partir do sinal captado na varredura eletrônica de uma superfície pode apresentar diferentes características, uma vez que a imagem resulta da amplificação de um sinal obtido de uma interação entre o feixe eletrônico e o material da amostra. Diferentes sinais podem ser emitidos pela amostra. Dentre os sinais emitidos, os mais utilizados para obtenção da imagem são originários dos elétrons secundários e/ou dos elétrons retroespalhados (DEDAVID, 2007).

### 1.3.8 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman (ER) é uma técnica de espectroscopia vibracional usada para determinação de estrutura molecular e para a identificação e quantificação de materiais (SOUZA *et al.*, 2012). A ER mensura o espalhamento inelástico de uma radiação monocromática que incide sobre uma molécula. Esse efeito Raman é um processo de troca de energia entre a luz e a molécula, podendo ser absorvida, transmitida ou espalhada (MANOHARAN *et al.*, 1995).

A radiação emitida pode gerar espalhamento Stokes, espalhamento anti-Stokes e espalhamento Rayleigh (Fig. 9). Quando grande parte da luz espalhada pode ter a mesma frequência que a luz incidente temos o espalhamento Rayleigh (elástico). Entretanto, uma pequena fração da luz incidente pode ter sua energia diminuída (espalhamento Stokes) ou aumentada (espalhamento anti-Stokes) (espalhamento Raman – inelástico) (SALA, 1996; LINDON *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2012).

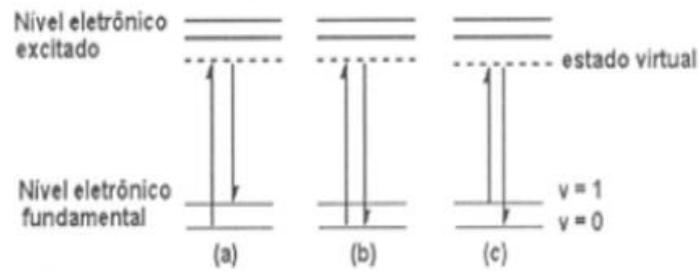


Figura 9 – Espalhamento de luz: (a) espalhamento inelástico (região Stokes); (b) espalhamento elástico (Rayleigh); (c) espalhamento inelástico (região anti-Stokes) (Fonte: FARIA *et al.*, 1997).

Visto que a energia da luz é proporcional à frequência, a mudança de frequência da luz espalhada inelasticamente é igual à frequência vibracional da molécula espalhada. Esse processo de troca de energia entre molécula, luz espalhada e luz incidente é conhecido como efeito Raman. Do ponto de vista energético, o processo de espalhamento Raman pode ser descrito como a transição de uma molécula do estado fundamental para um estado vibracional excitado, acompanhada por uma absorção simultânea de um fóton incidente e emissão de um fóton espalhado (Raman). A luz Raman espalhada pode ser coletada por um espectrômetro, onde sua intensidade é mostrada em função de sua mudança de frequência (deslocamento Raman). Visto que cada amostra molecular possui seu próprio conjunto vibracional molecular, o espectro Raman de uma amostra em particular consistirá de uma série de picos, cada um deslocado pela sua frequência vibracional característica daquela molécula, fornecendo assim a identificação para a molécula que está sendo estudada. O deslocamento Raman é frequentemente medido em comprimento de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ), uma unidade conveniente para relacionar a mudança de frequência da luz espalhada em relação à frequência da luz incidente.

## **CAPÍTULO 2**

### **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**

#### **Impedimetric biosensor based on Concanavalin A and polyaniline films for bacterial lipopolysaccharide and lipoteichoic acid detection**

J. S. L. da Silva<sup>1</sup>, M. D. L. Oliveira<sup>2</sup>, C. P de Melo<sup>3</sup>, C. A. S. Andrade<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco, 55608-680 Vitória de Santo Antão, PE, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

<sup>3</sup>Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

\*To whom correspondence should be addressed.

C.A.S. Andrade, Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil

Phone: +55-81-2126.8450; Fax: +55-81-2126.8547

E-mail: csrandrade@gmail.com

## 2.1 Resumo

Neste trabalho, relatamos o desenvolvimento de um novo biossensor eletroquímico com base na interação de Concanavalina A (ConA) e filmes finos de polianilina (PANI) para detecção de lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) de *Escherichia coli* e ácido lipoteicóico de *Staphylococcus aureus*. O biossensor impedimétrico foi fabricado por automontagem da lectina ConA em eletrodo de aço modificado com PANI por meio de ligação covalente através do glutaraldeído. ConA é usada como um elemento de reconhecimento de LPS bacteriano. Espectroscopia de impedância elétrica (EIE), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia Raman foram utilizadas para caracterizar o processo de montagem do eletrodo modificado. As medições de EIE revelou que a resistência à transferência de carga (RCT) aumenta consideravelmente após a reação da lectina com açúcares específicos presentes na molécula de lipopolissacarídeo. Os resultados mostraram que a lectina ConA manteve a sua atividade e mudou a resposta eletroquímica. O bioeletrodo exibe uma resposta de impedância eletroquímica a lectina-lipopolissacarídeo, num intervalo linear, com valores máximos de RCT em 200 µg/mL para *E. coli* (1,50 KΩ) e *S. aureus* (1,80 KΩ). Assim, o sistema de reconhecimento proporciona uma interface biomimética adequada para a detecção de componentes de bactérias gram-positivas e gram-negativas.

## 2.2 Abstract

In this paper, we report the development of a new electrochemical biosensor based on Concanavalina A (ConA) and polyaniline (PANI) thin films interactions for detection of bacterial lipopolysaccharides (LPS) from *Escherichia coli* and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*. The impedimetric biosensor is fabricated by self-assembled ConA lectin on the PANI-modified steel electrode through covalent binding by using glutaraldehyde. ConA is used as a recognition element for bacterial LPS. Electrical impedance spectroscopy (EIS), scanning electron microscope (SEM) and Raman spectroscopy were applied to characterize the assembly process of the modified electrode. The EIS measurements revealed that the resistance charge transfer (RCT) increases considerably after lectin reaction with specific sugars present in the lipopolysaccharide molecule. The results showed that ConA lectin retained its activity and changed the electrochemical response. The bioelectrode exhibits an electrochemical impedance response to lectin-lipopolysaccharide, in a linear range with maximum values of RCT at 200 µg/mL to *E. coli* (1.50 kΩ), and *S. aureus* (1.80 kΩ). Thus, the recognition system provides an appropriate biomimetic interface for detection of constituents of gram-positive and gram-negative bacteria.

### 2.3 Introduction

Lipopolysaccharides (LPS), also named as endotoxins, are essential in the structure and function of the external membrane of gram-negative bacteria cell walls [1]. LPS are composed by three different domains: a) lipid A that is anchored to the membrane by the hydrophobic portions of the structure; b) core oligosaccharide, a domain that connects lipid A to antigen O and is divided into the inner core and the outer core; and c) O polysaccharide, which is the hydrophilic and immunodominant domain of LPS and is an oligosaccharide of repeated units that is projected from the core toward the exterior of the bacterial surface [2].

Increasing concern regarding the microbiological safety of food, water, dairy products, industrial waste, and pharmaceutical preparations has provided urgency for detection methods that are fast, sensitive, specific, reliable, and quantitative for quality assurance in order to prevent infections and epidemics [3]. In addition, due to the ubiquity and lethality of endotoxins, many pharmaceutical products are rigorously tested for the presence of contaminating LPS or gram-negative bacteria [3]. The exposition of the body to LPS, excessively or systemically (as when LPS enters the blood stream), can result in a systemic inflammatory reaction, leading to multiple organ failure, shock and potentially death [4].

*Escherichia coli* is the most common cause of urinary tract infections and is also responsible for many different gastrointestinal diseases [4]. Structural study of *E. coli* K-12 O-antigen showed that the repetitive subunit of O-antigen consists of glucose, N-acetylglucosamine, galactose and rhamnose [5]. An important cell wall component of the gram-positive microorganism *Staphylococcus aureus* is the lipoteichoic acid (LTA). That molecule is able to induce the production of proinflammatory cytokines by monocytes in vitro [6]. LTA is a polymer of glycerolphosphate and sugar containing two groups acyl latter conferred the property of the membrane anchor cell [6]. LTA can cause several features of septic shock, such as leukocytopenia, thrombocytopenia, renal failure and hypotension [7].

Established techniques for the quantification of endotoxins exist in the pharmaceutical industry [8, 9]. Currently, the standard method for the determination of LPS concentration is the *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) assay. The LAL assay uses the hemolymph of horseshoe crabs (*Limulus*) which naturally clots in the presence of LPS. The standard LAL assay is relatively complex, requiring skilled operators and normally requiring multiple stages of analysis [10]. Biosensor systems have been reported for LPS detection based on electrochemical method [11-15]. Thus, is mandatory the development of biosensors for specific LPS detection in order to ensure pharmaceutical product quality and prevent contamination by these compounds.

The immobilization of recognition elements is a crucial step in the biosensors development and lectins have been extensively used. Lectins are proteins of non-immune origin that agglutinate cells and precipitate complex carbohydrates or polysaccharides. Concanavalin A (Con A) is a lectin obtained from *Canavalia ensiformis* and recognizes  $\alpha$ -D-mannose,  $\alpha$ -D-glucose and glycoproteins. Con A has been extensively studied because of various medical applications due to its ability to bind carbohydrates [16, 17].

The association between conducting polymers (CP) and lectins is an alternative strategy to the development of biodevices [18]. Polyaniline (PANI) is a typical CP due to its high conductivity, unique redox properties, good environmental stability, ease of synthesis, and unusual doping/dedoping chemistry [19]. Nanostructured PANI offers higher effective surface area and a suitable matrix for the immobilization of biomolecules [20].

Electrical impedance spectroscopy (EIS) is an effective method to check the interfacial properties of a modified surface and is often used in order to understand chemical transformations and processes associated with conducting media and can be used in characterization of the electrical properties in biological interfaces [21]. Thus, the interactions between biomolecules can be evaluated by using EIS. In addition, electrochemical techniques are promising for the development of point-of-care testing of LPS due to its characteristics such as rapid analysis time, reliable detection, ease of handling, and simple and inexpensive set-up for measuring [22].

In this work we developed a rapid and sensitive dielectric biosensor for detection of LPS from *E. coli* and LTA from *S. aureus* using ConA lectin as a selective recognition element and PANI as a support layer. The stepwise assembly process of the biosensor was characterized by means of EIS, scanning electronic microscopy (SEM) and Raman spectroscopy. The developed bioelectrode could be an alternative to LPS detection based on lectin recognition.

## 2.4 Materials and Methods

### 2.4.1 Materials

Concanavalin A, ovalbumin, glucose and glycogen were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Glutaraldehyde was obtained from J. T. Baker (USA). Aniline monomer (VETEC, Brazil) was distilled under vacuum and, subsequently, stored in a dark recipient at low temperature prior to use. All chemicals and solvents were of analytical-grade and used as received, without further purification. High-purity water was obtained after a Milli-Q plus (Billerica, USA) treatment.

#### 2.4.2 Synthesis of PANI films

A source-measure unit (Keithley 237, USA) was used for electrical polymerization of aniline. The aniline monomer was dissolved in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0 M. Two stainless steel electrodes were inserted into the aniline solution and applied a constant potential of 2.0 mV during 2 min for film formation [23]. After that, the PANI film was dried for 30 min at room temperature.

#### 2.4.3 Immobilization of ConA on PANI films and LPS detection

PANI film was incubated in 0.1 M pH 6.0 PBS (phosphate buffer saline) containing 2.5% glutaraldehyde (v/v) during 2 h for chemical modification, resulting in glutaraldehyde-modified PANI films (PANIG). Subsequently, PANIG was incubated in ConA (200 µg/mL) for 2 h and immersed in a solution of bovine serum albumin (BSA) for 5 min obtaining PANIG-ConA-BSA system. BSA was used to fill the remaining active sites on the PANIG-ConA surface. Finally, PANIG-ConA-BSA-modified electrodes were tested against LPS from *E. coli* and LTA from *S. aureus* at different concentrations (50 µg/mL, 75 µg/mL, 100 µg/mL, 125 µg/mL, 150 µg/mL and 200 µg/mL) diluted in deionized water at room temperature.

#### 2.4.4 Dielectric measurements

The impedance measurements were performed using a SI 1260 (Solartron Instruments, UK) gain/phase impedance analyzer operating in the (10<sup>-1</sup>-10<sup>6</sup>) Hz frequency range [23]. A 10 mV excitation, with no external polarization, was applied to each aqueous solution analyzed through two 65 mm × 20 mm parallel plates of steel, set 25 mm apart. All EIS measurements were performed in triplicate using at least three different sensors.

#### 2.4.5 Scanning electron microscopy measurements

The scanning electron microscopy images were obtained from a JSM 5900 (JEOL Instruments, Japan) at an acceleration voltage of 15 kV and a working distance of 5 µm. After drying at room temperature, a thin gold layer was deposited on top of the samples using a SCD 050 sputter coater (Bal-Tec, USA) [24].

#### 2.4.6 Raman Spectroscopy

The Raman spectra of the thin films are obtained in the region of 300 to 1800 cm<sup>-1</sup> directly from pure samples. Raman spectroscopy is carried out using a ProRaman-L735 (Enwave optronics, USA). Samples were excited with a 735 nm diode laser [25]. The

resolution was set to  $4\text{ cm}^{-1}$  in back scattering mode. All Raman data acquisitions were obtained at room temperature ( $\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

## 2.5 Results and Discussion

### 2.5.1 Morphological analysis

The morphology of the different stages of the biosensor assembly was analyzed by SEM. The PANI film on the stainless steel electrode surface was dark green, dense and uniform when observed macroscopically. SEM images (Fig. 10a) show that the PANI film covered uniformly dense and compact the electrode surface. Furthermore, the film polymerized was densely ordered spherical structures, which can adhere strongly to the surface of the electrode. Images PANIG-ConA-BSA (Fig. 10b) exhibit clusters formed, guided the formation of fibrillar morphology, homogeneously distributed on the surface of the electrode. We observe the formation of some agglomerates in Figs. 10c-d, for the PANIG-ConA-BSA system when in contact with LPS from *E. coli* and *S. aureus*, respectively.

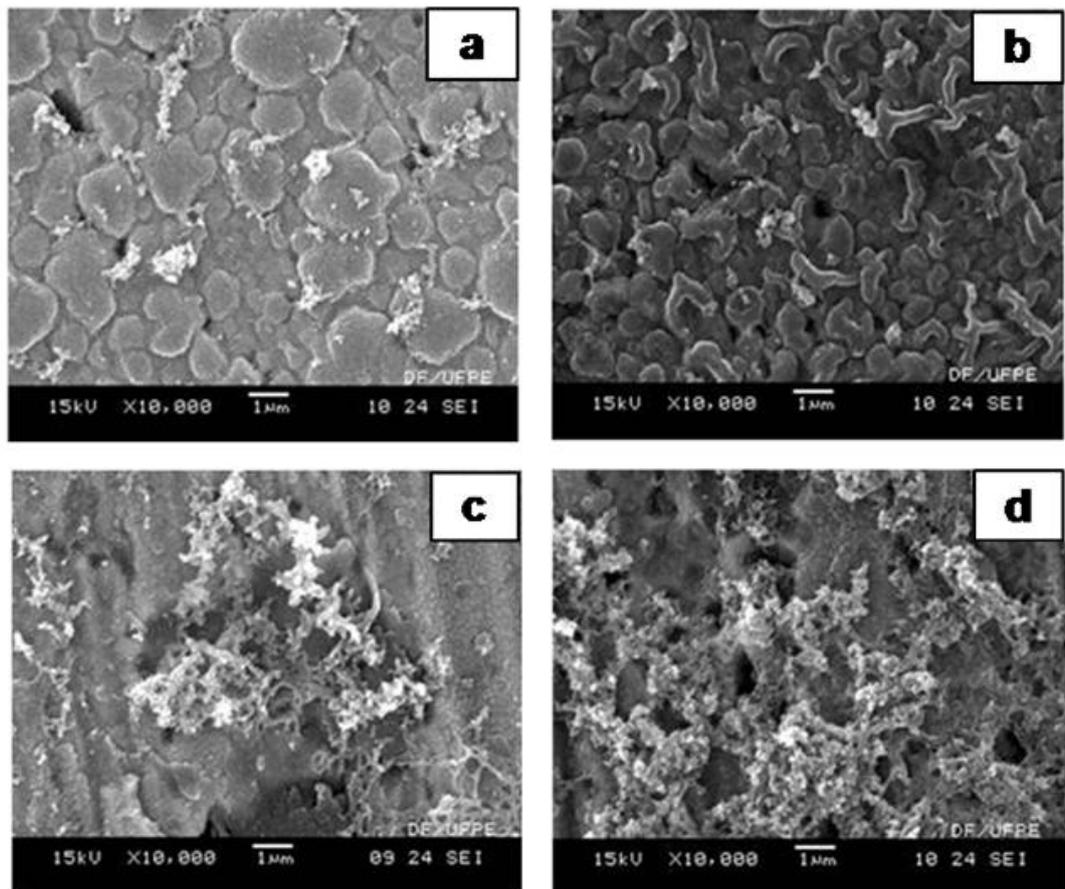


Figure 10. SEM images of PANI film (a), PANIG-ConA-BSA (b), PANIG-ConA-BSA-*E. coli* (c) and PANIG-ConA-BSA-*S. aureus* (d).

### 2.5.2 Raman analysis

The PANI Raman spectra (Fig. 11) revealed a region corresponding to C-C ring stretching vibrations, between 1650 and 1520  $\text{cm}^{-1}$ ; C-N stretch modes, between 1520 and 1210  $\text{cm}^{-1}$ ; and a region corresponding to the deformation of C-H bond, between 1210 and 1100  $\text{cm}^{-1}$  [25]. The major bands in the form of PANI emeraldine salt are 1166 and 1220  $\text{cm}^{-1}$  corresponding to the deformations  $\beta(\text{C-H})$  in quinoid rings. Also, stretch  $\nu(\text{C-N})$  of quinoid rings, 1485 and 1620  $\text{cm}^{-1}$ , stretch  $\nu(\text{C=N})$  in quinoid units and stretch  $\nu(\text{C=C})$  of benzenes rings are observed [26, 27]. It is important to note that the quantity of protein binding to polymer matrix is far too small to be detected in the Raman. In spite of the small quantities of LPS and LTA adsorbed on the biosensor surface, it is possible to observe a weak signal corresponding to the bands of glycosidic bonds and sugar rings (800-1100  $\text{cm}^{-1}$ ) [28].

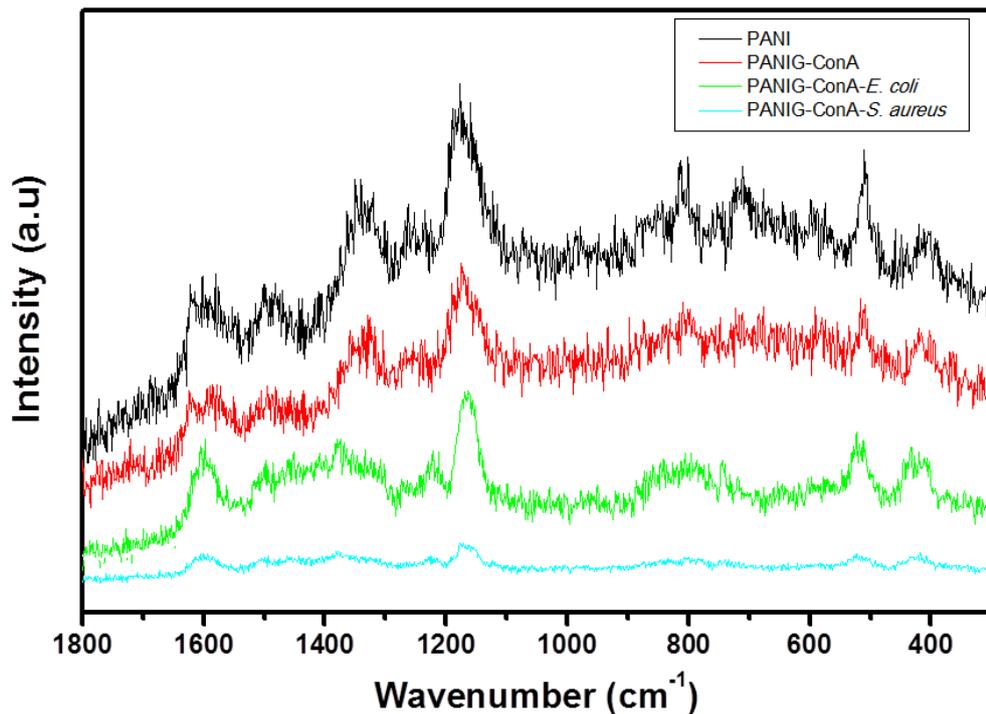


Figure 11. Raman spectra of PANI, PANIG-ConA-BSA, PANIG-ConA-BSA-E. coli and PANIG-ConA-BSA-S. aureus.

### 2.5.3 Electrical impedance spectroscopy measurements

Nyquist plots of impedance spectra of stepwise processes are shown in Fig. 12. A significant difference in the impedance spectra is observed after the electrode modification and subsequently adsorption of ConA.

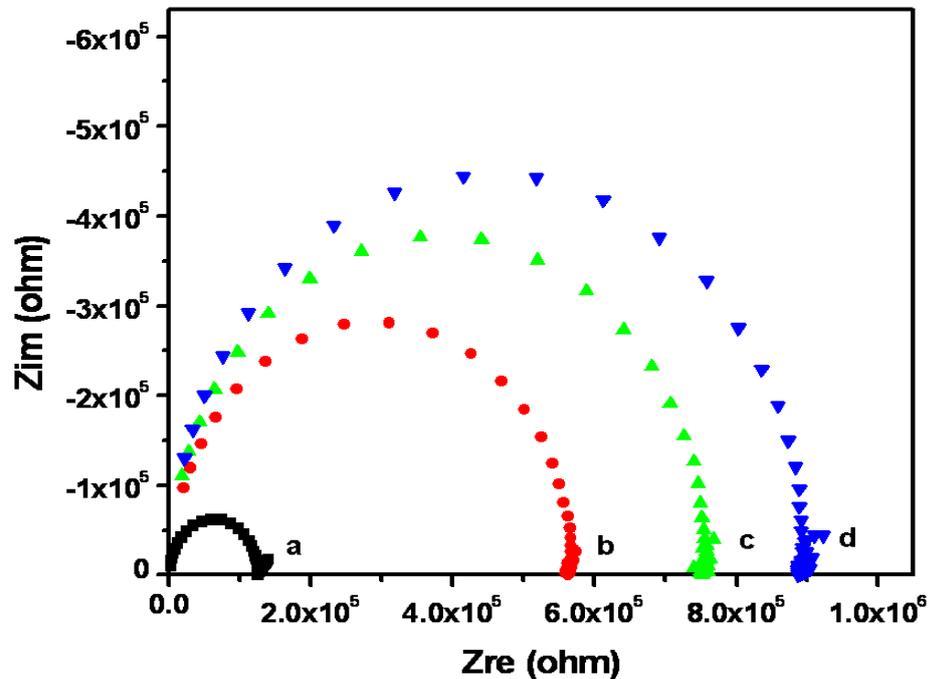


Figure 12. Nyquist diagrams of the stepwise process, as follow: PANI films (curve a), PANIG (curve b), PANIG-ConA (curve c) and PANIG-ConA-BSA (curve d).

The glutaraldehyde-modified PANI surface results in an increase of Re (curve b) as compared to pristine PANI film (curve a). It is worth to note that glutaraldehyde molecules can obstruct the charge transfer and contributed to the increase of the semicircle diameter. After being modified with the ConA, the EI of the PANIG-ConA-modified electrode shows a higher interfacial charge transfer resistance (RCT) (curve c). The impedance change in the modified process showed that the ConA lectin adhered to the PANI on steel electrode surface. When the PANIG-ConA-BSA was finally obtained, the interfacial resistance increased again, which indicated the formation of the sensor layer and the subsequent introduction of BSA hindering the electron transfer (curve d). Bovine serum albumin (BSA) was used to fill the remaining active sites on the PANIG-ConA modified electrode

The sequence of measurements PANI, PANIG, PANIG-ConA and PANIG-ConA-BSA demonstrate the blockage of the electrode surface, confirming that the amount of material

immobilized and/or adsorbed on the electrode surface directly correlates with the impedance.

#### 2.5.4 LPS recognition

The biosystem PANIG-ConA-BSA was used as the sensing basis for electrochemical impedance analyses to LPS or LTA detection. Our results demonstrate that ConA lectin retains its biological capability to recognize carbohydrates after exposition on the electrode surface by a bio-recognition process when the PANIG-ConA-BSA system interacted with glycoconjugates from *E. coli* and *S. aureus* (Fig. 13).

In addition, we could observe an increase in the diameter of a semicircle when PANIG-ConA-BSA system being in contacted with LPS and lipoteichoic acid. The ConA-bacterial LPS binding process may be related to the carbohydrates, glucose and mannose, imparting a LPS sensing mechanism on the ConA interface, a process similar to that observed for lectin CramoLL [15]. Con A lectin exhibits high affinity for  $\alpha$ -D-glucose and  $\alpha$ -D-mannose, but has also been reported interaction with complex carbohydrates, including glycoproteins fetuin and ovalbumin [29].

LPS from *E. coli* is composed of repeating subunits of sugar residues of glucosamine, galactosamine, glucose, galactose and rhamnose [30]. As expected, the experimental results demonstrated that ConA sensor system interacts with the glycosyl residues on the *E. coli* LPS structure.

Among polymers recognized by ConA, we can highlight the teichoic acids. In addition, teichoic acids, a common constituent of the cell wall, cytoplasm, and occasionally the capsule of gram-positive bacteria, may react with lectins by virtue of the D-Glc or GlcNAc residues found in some forms of this polymer [31].

Also, the capability of ConA to react with glucosylated teichoic acids from staphylococci and other organisms has been reported [32]. It is worthy to note that ConA binds to teichoic acids from *S. aureus* in which GlcNAc residues are  $\alpha$ -linked [33]. ConA shows different responses to *E. coli* and *S. aureus* due to the composition of LPS and LTA structures these pathogens.

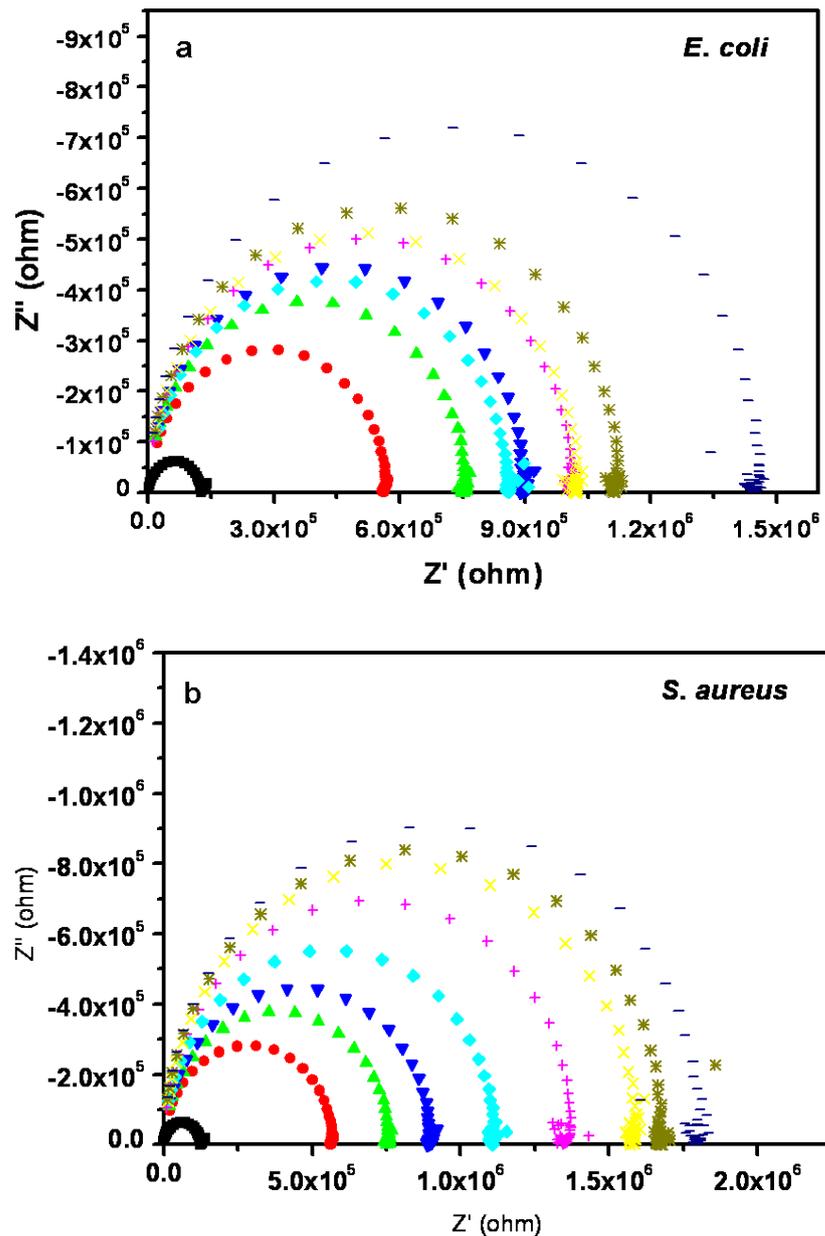


Figure 13. Nyquist diagrams of PANI, PANIG, PaniG-ConA-BSA, and LPS from *E. coli* (a) and lipoteichoic acid from *S. aureus* (b) at different concentrations. (■)- PANI, (●)- PANIG, (▲)-PANIG-ConA, (▼)-PANIG-ConA-BSA, (◆)-PANIG-ConA LPS/TLA<sub>50µg/mL</sub>, (+)- PANIG-ConA-LPS/TLA<sub>100µg/mL</sub>, (x)-PANIG-ConA-LPS/TLA<sub>125µg/mL</sub>, (·)-PANIG-ConA-LPS/TLA<sub>150µg/mL</sub>, (-)PANIG-ConA-LPS/TLA<sub>200µg/mL</sub>

It can be observed in Figure 14 that the diameter of semicircles for ConA system with LPS from *E. coli* and *S. aureus* were higher than to the system without LPS. Moreover, the obtained bioelectrode exhibited an electrochemical impedance response to

lectin-lipopolyssacharide, in a linear range with maximum values of RCT at fixed concentration (200  $\mu\text{g/mL}$ ) to *E. coli* (1.50  $\text{K}\Omega$ ) and *S. aureus* (1.80  $\text{K}\Omega$ ).

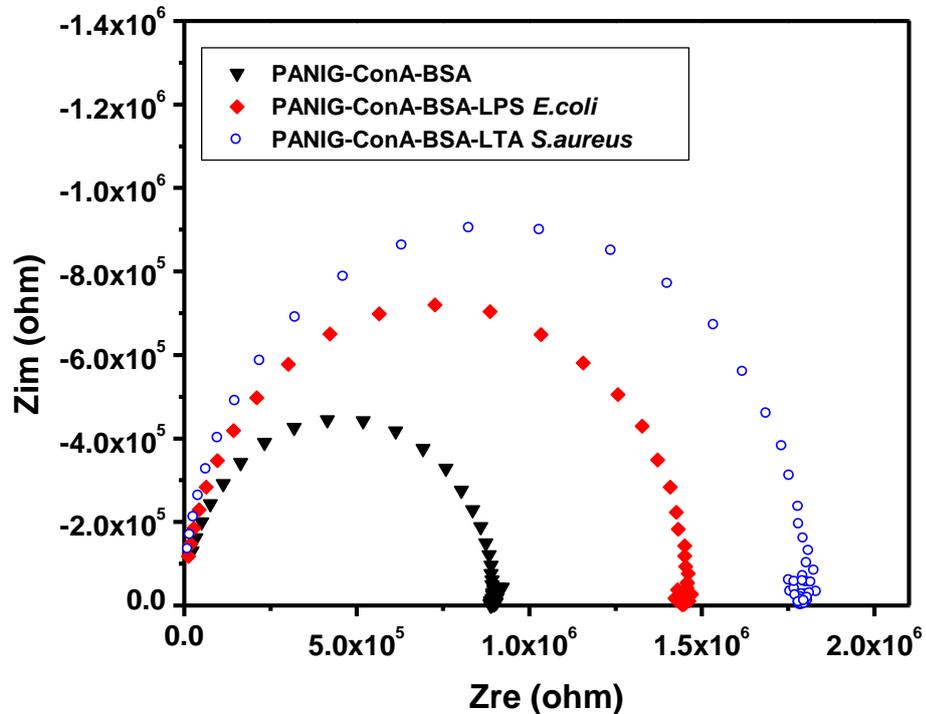


Figure 14. Nyquist diagrams of different response of PANIG-ConA-BSA system to LPS from *E. coli* and lipoteichoic acid from *S. aureus* at fixed concentration (200  $\mu\text{g/mL}$ ).

The EIS is an useful technique to discriminate the different molecular characteristics of the tested biomolecules. In addition, analytical methods, such as EIS, represent an alternative technique for evaluate the interaction between lectin and constituents of gram-positive and gram-negative bacteria.

## 2.6 Conclusion

In the present work, a strategy for the development of electrochemical biosensor for bacterial lipopolysaccharides based on conducting polymer and lectin has been proposed. The biosensor showed good electrical response. EIS were applied to evaluate the detection of LPS and showed that ConA was capable to interact with LPS from *E. coli* and lipoteichoic acid from *S. aureus*, thereby demonstrating that the PANIG-ConA-BSA system can be used to detect these endotoxins in contaminated samples. The recognition system provides an appropriate biomimetic interface for detection of bacterial LPS and LTA.

## 2.7 References

- [1] R.E. Reyes, C.R. González, R.C. Jiménez, M.O. Herrera, A.A. Andrade, Mechanisms of O-Antigen Structural Variation of Bacterial Lipopolysaccharide (LPS), in: D.N. Karunaratne (Ed.), *The Complex World of Polysaccharides*, 2012.
- [2] T.J. Silhavy, D. Kahne, S. Walker, *The bacterial cell envelope*, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2 (2010) a000414.
- [3] S.S. Iqbal, M.W. Mayo, J.G. Bruno, B.V. Bronk, C.A. Batt, J.P. Chambers, A review of molecular recognition technologies for detection of biological threat agents, *Biosens. Bioelectron.* 15 (2000) 549-578.
- [4] C. Erridge, E. Bennett-Guerrero, I.R. Poxton, Structure and function of lipopolysaccharides, *Microbes Infect.* 4 (2002) 837-851.
- [5] G. Stevenson, B. Neal, D. Liu, M. Hobbs, N.H. Packer, M. Batley, J.W. Redmond, L. Lindquist, P. Reeves, Structure of the O-Antigen of *Escherichia-Coli-K-12* and the Sequence of Its Rfb Gene-Cluster, *Journal of Bacteriology* 176 (1994) 4144-4156.
- [6] H. Aoki, M. Kodama, T. Tani, K. Hanasawa, Treatment of sepsis by extracorporeal elimination of endotoxin using polymyxin B immobilized fiber, *Am. J. Surg.* 167 (1994) 412-417.
- [7] J.S. Spika, P.K. Peterson, B.J. Wilkinson, D.E. Hammerschmidt, H.A. Verbrug, J. Verhoef, P.G. Quie, Role of peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* in leukopenia, thrombocytopenia, and complement activation associated with bacteraemia, *J. Infect. Dis.* 146 (1982) 227-233.
- [8] F.B. Bang, A bacterial disease of *Limulus polyphemus.*, *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 98 (1956).
- [9] J. Levin, P.A. Tomasulo, R.S. Oser, Detection of endotoxin in human blood and demonstration of an inhibitor, *J. Lab. Clin. Med.* 75 (1970) 903-911.
- [10] M.J. Barnett, J.L. Wadham, M. Jackson, D.C. Cullen, In-Field Implementation of a Recombinant Factor C Assay for the Detection of Lipopolysaccharide as a Biomarker of Extant Life within Glacial Environments, *Biosensors* 2 (2012) 83-100.
- [11] P. Ertl, M. Wagner, E. Corton, S.R. Mikkelsen, Rapid identification of viable *Escherichia coli* subspecies with an electrochemical screen-printed biosensor array, *Biosens. Bioelectron.* 18 (2003) 907-916.
- [12] G. Priano, F. Battaglini, The Use of an Antimicrobial Protein for Endotoxin Detection in a Competitive Electrochemical Assay, *Anal. Chem.* 77 (2005) 4976-4984.

- [13] P. Ertl, S.R. Mikkelsen, Electrochemical Biosensor Array for the Identification of Microorganisms Based on Lectin-Lipopolysaccharide Recognition, *Anal. Chem.* 73 (2001) 4241-4248.
- [14] D. Kato, S. Iijima, R. Kurita, Y. Sato, J. Jia, S. Yabuki, F. Mizutani, O. Niwa, Electrochemically amplified detection for lipopolysaccharide using ferrocenylboronic acid, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 1527-1531.
- [15] M.D.L. Oliveira, C.A.S. Andrade, M.T.S. Correia, L.C.B.B. Coelho, P.R. Singh, X. Zeng, Impedimetric biosensor based on self-assembled hybrid cystein-gold nanoparticles and CramoLL lectin for bacterial lipopolysaccharide recognition, *J. Colloid Interface Sci.* 362 (2011) 194-201.
- [16] A. Brück, R. Abu-dahab, G. Borchard, U.F. Schäfer, C.-M. Lehr, Lectin-Functionalized Liposomes for Pulmonary Drug Delivery: Interaction with Human Alveolar Epithelial Cells, *Journal of Drug Targeting* 9 (2001) 241-251.
- [17] H.E. Schaeffer, J.M. Breiffeller, D.L. Krohn, Lectin-mediated attachment of liposomes to cornea: influence on transcorneal drug flux., *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 23 (1982) 530-533.
- [18] F. Hu, S. Chen, C. Wang, R. Yuan, Y. Xiang, C. Wang, Multi-wall carbon nanotube-polyaniline biosensor based on lectin-carbohydrate affinity for ultrasensitive detection of Con A, *Biosens. Bioelectron.* 34 (2012) 202-207.
- [19] Q. Wu, Y.X. Xu, Z.Y. Yao, A.R. Liu, G.Q. Shi, Supercapacitors based on flexible graphene/polyaniline nanofiber composite films, *ACS Nano* 4 (2010) 1963-1970.
- [20] D. Wan, S.J. Yuan, G.L. Li, K.G. Neoh, E.T. Kang, Glucose biosensor from covalent immobilization of chitosan-coupled carbon nanotubes on polyaniline-modified gold electrode, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2 (2010) 3083-3091.
- [21] E. Katz, I. Willner, Probing Biomolecular Interactions at Conductive and Semiconductive Surfaces by Impedance Spectroscopy: Routes to Impedimetric Immunosensors, DNA-Sensors, and Enzyme Biosensors, *Electroanalysis* 15 (2003) 913-917.
- [22] S. Iijima, D. Kato, S. Yabuki, O. Niwa, F. Mizutani, Enzymatically amplified electrochemical detection for lipopolysaccharide using ferrocene-attached polymyxin B and its analogue, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 2080-2084
- [23] C.A.S. Andrade, H.P. de Oliveira, M.D.L. Oliveira, M.T.S. Correia, L.C.B.B. Coelho, C.P. de Melo, Protein unfolding studied by fluorescence methods and electrical impedance spectroscopy: The cases of *Cratylia mollis* and Concanavalin A, *Coll. Surf. B: Biointerf.* 88 (2011) 100- 107.

- [24] M.D.L. Oliveira, D.S.P. Abdalla, D.F. Guilherme, T.E.S. Faulin, C.A.S. Andrade, Impedimetric immunosensor for electronegative low density lipoprotein (LDL-) based on monoclonal antibody adsorbed on (polyvinyl formal) gold nanoparticles matrix, *Sens. Act. B-Chem.* 155 (2011) 775-781.
- [25] E.C. Gomes, M.A.S. Oliveira, Chemical Polymerization of Aniline in Hydrochloric Acid (HCl) and Formic Acid (HCOOH) Media. Differences Between the Two Synthesized Polyanilines, *Amer. J. Pol. Sci.* 2 (2012) 5-13.
- [26] C.M.S. Izumi, H.F. Brito, A.M.D.C. Ferreira, V.R.L. Constantino, M.L.A. Temperini, Spectroscopic investigation of the interactions between emeraldine base polyaniline in Eu (III) ions, *Synth. Met.* 159 (2009) 377-384.
- [27] G.M. Nascimento, M.L.A. Temperini, Studies on the resonance Raman spectra of polyaniline obtained with near-IR excitation, *J. Raman Spectrosc.* 39 (2008) 772-778.
- [28] O. Samek, H.H. Telle, L.G. Harris, M. Bloomfield, D. Mack, Raman spectroscopy for rapid discrimination of *Staphylococcus epidermidis* clones related to medical device-associated infections, *Laser Phys. Lett.* 5 (2008) 465-470.
- [29] J.B. Sumner, S.F. Howell, A. Zeissig, Concanavalin A and hemagglutination, *Science* 82 (1935) 65-66.
- [30] F.C. McIntire, H.W. Sievert, G.H. Barlow, R.A. Finley, A.Y. Lee, Chemical, physical, biological properties of a lipopolysaccharide from *Escherichia coli* K-235, *Biochemistry* 6 (1967) 2363-2372.
- [31] S.A. Barker, P.J. Somers, Bacterial and fungal polysaccharides, in: W. Pigman, D. Horton (Eds.), *The carbohydrates. Chemistry and Biochemistry, IIB*, Academic Press, New York, 1970, pp. 569–587.
- [32] T.G. Pistole, Interaction of bacteria and fungi with lectins and lectin-like substances, *Ann. Rev. Microbiol.* 35 (1981) 85-112.
- [33] W.J. Reeder, R.D. EKstedt, Study of the interaction of concanavalin A with staphylococcal teichoic acids, *J. Immunol.* 106 (1971) 334-340.

## CAPÍTULO 3

### DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

#### 3.1 Análise morfológica

A morfologia das diferentes etapas da montagem foi analisada por meio de medições de MEV.

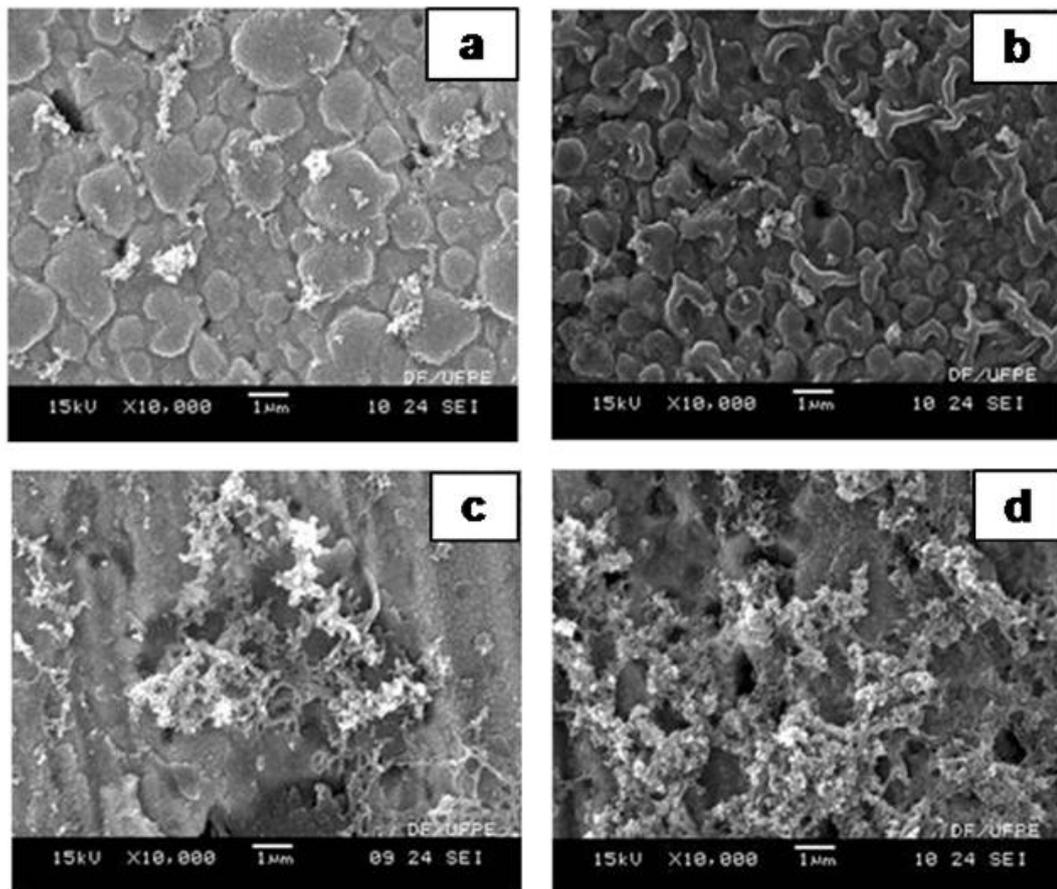


Figura 15 – Imagens de MEV: filme de PANI (a), PANIG-ConA-BSA (b), PANIG-ConA-BSA-*E. coli* (c) and PANIG-ConA-BSA-*S. aureus* (d).

O filme de PANi na superfície do eletrodo de aço inoxidável era verde escuro, denso e uniforme quando observado macroscopicamente. Imagens de MEV (Fig. 15a) mostram que o filme PANi denso e compacto, cobrindo uniformemente a superfície do eletrodo. Além disso, o filme polimerizado foi densamente ordenado em estruturas esféricas que podem aderir fortemente à superfície do eletrodo. Imagens de PANIG-ConA-BSA (Fig. 15b) exibem a formação de aglomerados distribuídos de forma homogênea sobre a superfície do eletrodo. Observa-se a formação de alguns aglomerados nas Figs. 15c-d, para o sistema PANIG-ConA-BSA quando em contato com LPS de *E. coli* e LTA de *S. aureus*, respectivamente.

### 3.2 Análise Espectral (Raman)

Fig. 16 mostra os espectros de Raman de PANi, PANIG-ConA, PANIG-ConA-*E. coli*, PANIG-ConA-*S. aureus*.

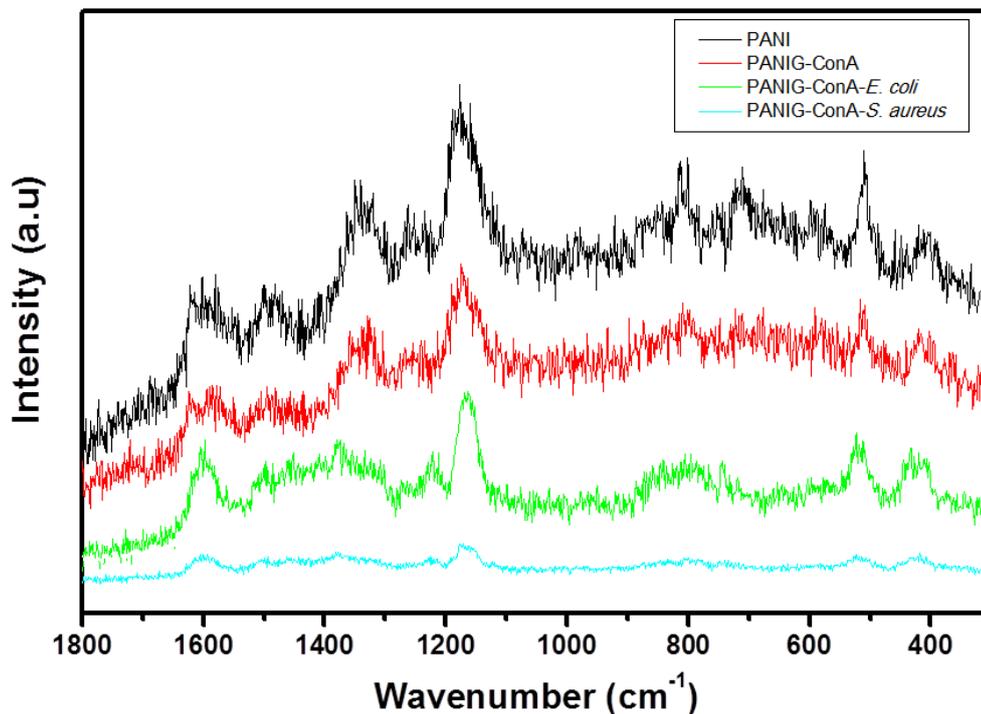


Figura 16 – Espectro de Raman de PANi, PANIG-ConA, PANIG-ConA-*E. coli* e PANIG-ConA-*S. aureus*.

O espectro de Raman da PANI (Fig. 16) revelou regiões correspondentes a estiramentos C–C dos anéis de vibração, entre 1650 e 1520  $\text{cm}^{-1}$ , modos de estiramento C–N, entre 1520 e 1210  $\text{cm}^{-1}$ , e região correspondente à deformação de ligações C–H, entre 1210 e 1100  $\text{cm}^{-1}$  (GOMES & OLIVEIRA *et al.*, 2012). Além disso, as bandas principais, na forma de sal de esmeraldina de polianilina encontrados nas amostras (Fig. 16) são as seguintes: 1166, 1220  $\text{cm}^{-1}$  correspondentes às deformações  $\beta$ (C–H) em anéis quinóides, estiramento  $\nu$ (C–N) de anéis quinóides, 1485 e 1620  $\text{cm}^{-1}$ , estiramento  $\nu$ (C=N) em unidades quinóides e estiramento  $\nu$ (C=C) de anéis benzenóide.(NASCIMENTO & TEMPERINE, 2008; IZUMI *et al.*, 2009). É importante notar que a quantidade de proteína ligada à matriz polimérica é pequena para ser detectada no Raman. Apesar das quantidades reduzidas de LPS e LTA adsorvidas sobre a superfície do biossensor, é possível observar um sinal fraco correspondente a bandas de ligações glicosídicas e os anéis de açúcar (800-1100  $\text{cm}^{-1}$ ) (SAMEK *et al.*, 2008).

### 3.3 Medidas de Espectroscopia Impedância Elétrica

Nyquist dos espectros de impedância de processo de montagem são mostradas na Fig. 17. Uma diferença significativa no espectro de impedância é observada após a modificação do eletrodo e, subsequentemente, a adsorção de ConA.

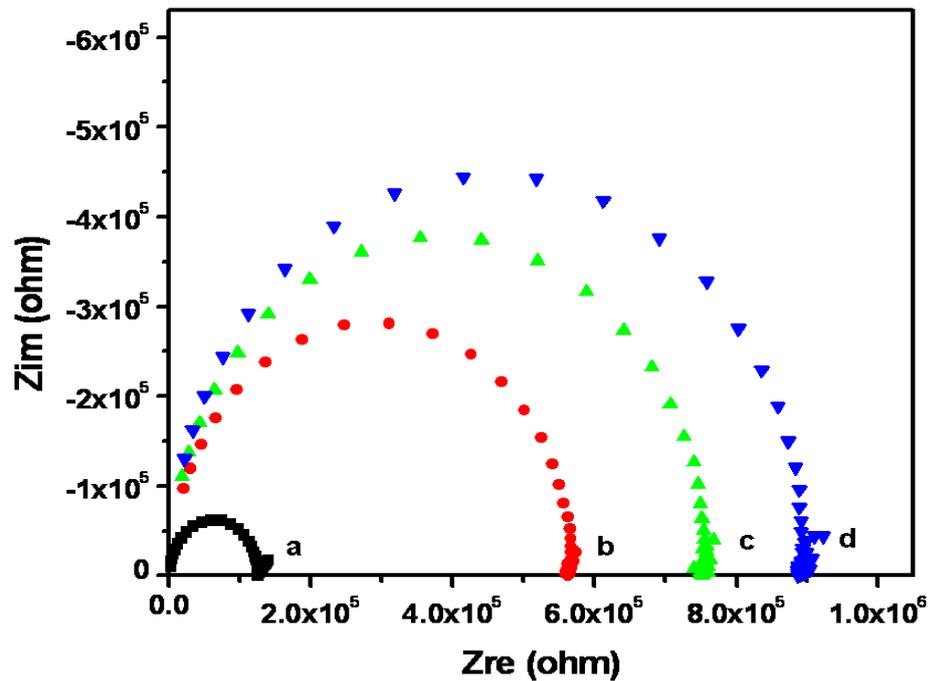


Figura 17 – Diagramas de Nyquist do processo de montagem: filme de PANI (curva a), PANIG (curva b), PANIG-ConA (curva c) e PANIG-ConA-BSA (curva d).

Pode-se observar que após a interação do glutaraldeído com os grupos funcionais do filme de polianilina, houve um aumento de Re (curva b) em relação ao filme de PANi puro (curva a). Vale a pena notar que as moléculas de glutaraldeído pode obstruir a transferência de carga e contribuiu para o aumento do diâmetro do semicírculo. Depois de ter sido modificado com a ConA, a EI do eletrodo modificado com PANIG-ConA mostra uma resistência à transferência de carga interfacial (RCT) mais elevada (curva c). A variação da impedância no processo de modificação mostrou que a lectina ConA aderida à PANI na superfície do eletrodo de aço. Quando o sistema PANIG-ConA-BSA foi finalmente obtido, houve o aumento da resistência interfacial novamente, o que indicou a formação da camada sensora e a introdução subsequente de BSA impedindo a transferência de elétrons (curva d). Albumina do soro bovino (BSA) foi utilizada para preencher os sítios ativos remanescentes na superfície do eletrodo modificado com PANIG-ConA.

A sequência de medições PANI, PANIG, PANIG-ConA e PANIG-ConA-BSA demonstrou o bloqueio da superfície do eletrodo, confirmando que a quantidade de material imobilizada e/ou adsorvido sobre a superfície do eletrodo se correlaciona diretamente com a impedância.

### 3.4 Reconhecimento de LPS

O biosistema PANIG-ConA-BSA foi utilizado como base sensora por análises de impedância elétrica para detecção de LPS ou LTA. Os nossos resultados demonstram que a lectina ConA mantém a sua capacidade biológica para reconhecer carboidratos após a exposição na superfície do eletrodo por um processo de bio-reconhecimento, quando o sistema PANIG-ConA-BSA interagiu com glicoconjugados de *E. coli* e *S. aureus* (Fig. 18).

Além disso, pode-se observar um aumento do diâmetro do semicírculo, quando o sistema PANIG-ConA-BSA entra em contato com LPS e ácido lipoteicóico. O processo de ligação de LPS bacteriano com ConA pode estar relacionado com os carboidratos, glicose e manose, resultando em um mecanismo de detecção de LPS na interface da ConA, um processo semelhante ao observado para a lectina Cramoll (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

O LPS de *E. coli* é composto de subunidades repetidas de resíduos dos açúcares de glucosamina, galactosamina, glicose, galactose e ramnose (MCINTIRE *et al.*, 1967). Como esperado, os resultados experimentais demonstraram que o sistema sensor de ConA interage com os resíduos glicosil na estrutura do LPS de *E. coli*.

Entre os polímeros reconhecidos pela ConA, podemos destacar os ácidos lipoteicóicos. Além disso, os ácidos lipoteicóico, um constituinte comum da parede celular, citoplasma, e, ocasionalmente, da cápsula de bactérias Gram-positivas, podem reagir com lectinas em virtude de resíduos D-Glc ou GlcNAc encontrados em algumas formas deste polímero (BARKER & SOMERS, 1970).

Além disso, a capacidade da ConA de reagir com ácidos lipoteicóicos glicosilados de estafilococos e outros organismos tem sido relatada (PISTOLE, 1981). Vale salientar que a ConA se liga ao ácido lipoteicóico de *S. aureus*, no qual resíduos de GlcNAc estão ligados (REEDER & EKSTEDT, 1971). A ConA mostra respostas diferentes a *E. coli* e *S. aureus* devido à composição das estruturas de LPS e LTA desses agentes patogênicos.

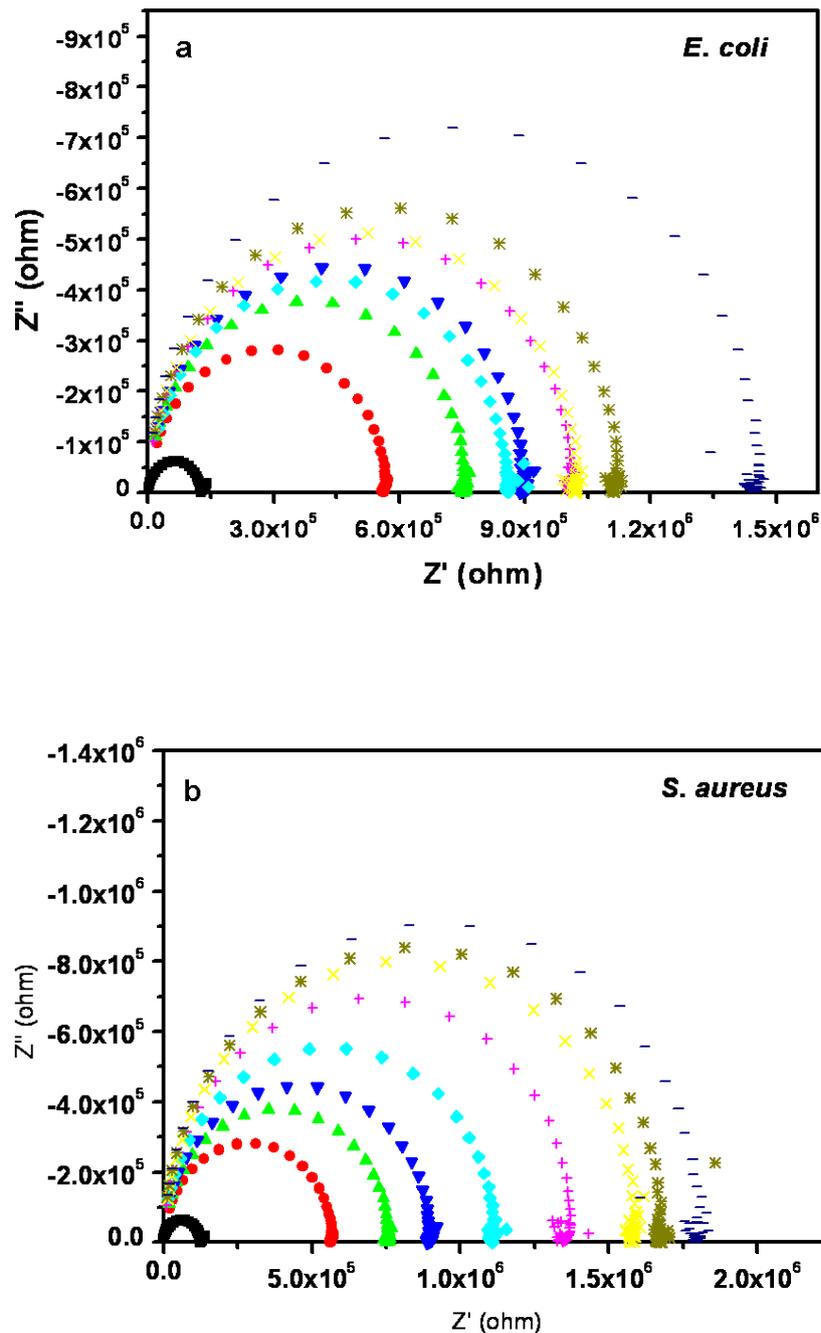


Figura 18 – Diagramas de Nyquist de PANI, PANIG, PaniG-ConA-BSA, e LPS de *E. coli* (a) e ácido lipoteicóico de *S. aureus* (b) em diferentes concentrações. (■)- PANI, (●)- PANIG, (▲)-PANIG-ConA, (▼)-PANIG-ConA-BSA,(◆)-PANIG-ConA-BSA-LPS/TLA<sub>50</sub>μg/mL, (+)-PANIG-ConA-BSA-LPS/TLA<sub>100</sub>μg/mL, (x)-PANIG-ConA-BSA-LPS/TLA<sub>125</sub>μg/mL, (\*)-PANIG-ConA-BSA-LPS/TLA<sub>150</sub>μg/mL, (-)PANIG-ConA-BSA-LPS/TLA<sub>200</sub>μg/mL.

Pode ser observado na Fig. 19, que o diâmetro dos semicírculos do sistema de ConA com LPS de *E. coli* e LTA de *S. aureus* foram superiores ao do sistema sem LPS. Além

disso, o bioeletrodo obtido apresentou uma resposta impedância eletroquímica para lectina-lipopolissacarídeo/ácido lipoteicóico, num intervalo linear, com valores máximos de RCT em concentração fixa (200  $\mu\text{g/mL}$ ) para *E. coli* (1,50 k $\Omega$ ) e *S. aureus* (1,80 k $\Omega$ ) .

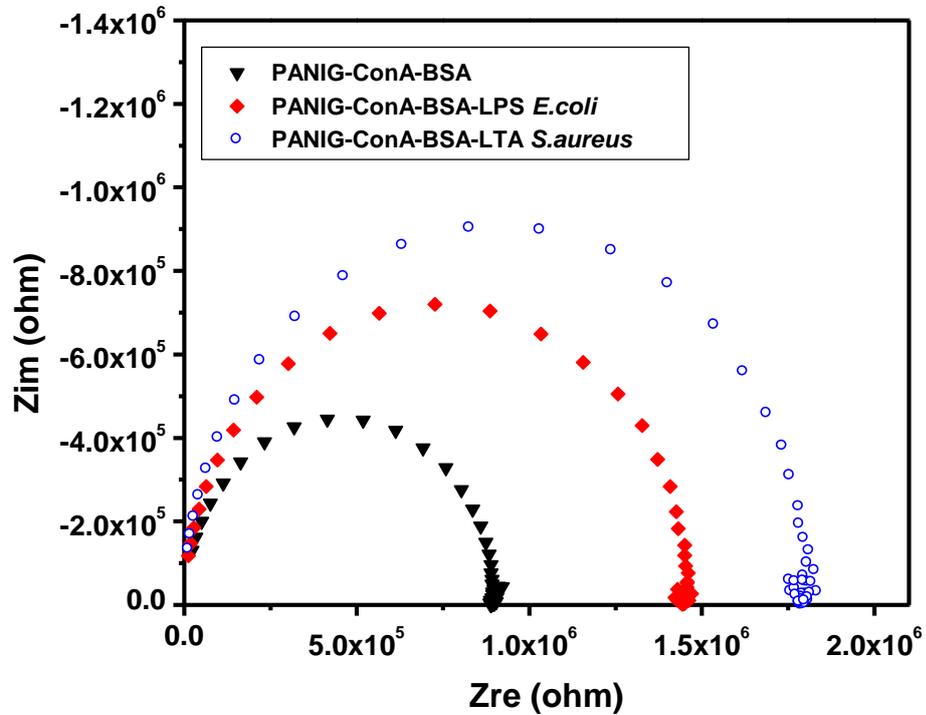


Figure 19 – Impedância elétrica das diferentes respostas do sistema PANIG-ConA-BSA para LPS de *E. coli* e LTA de *S. aureus* em concentração fixa (200  $\mu\text{g/mL}$ ).

A EIE é uma técnica útil para discriminar as diferentes características moleculares das biomoléculas testadas. Além disso, os métodos de análise, tais como EIE, representam uma técnica alternativa para avaliar a interação entre a lectina e constituintes de bactérias gram-positivas e gram-negativas.

## CONCLUSÕES

No presente trabalho, foi proposta uma estratégia para o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para detectar lipopolissacarídeo e ácido lipoteicóico bacterianos baseado em polímero condutor e lectina.

Espectroscopia de impedância elétrica, espectroscopia Raman e Microscopia eletrônica de varredura foram utilizadas para caracterizar o processo de montagem do eletrodo modificado e, os resultados demonstram que a lectina ConA mantém a sua capacidade biológica para reconhecer carboidratos após a exposição na superfície do eletrodo por um processo de biorreconhecimento, quando o sistema PANIG-ConA-BSA interagiu com glicoconjugados de *E. coli* e *S. aureus*.

Apesar das quantidades reduzidas de LPS e LTA adsorvidas sobre a superfície do biossensor, foi possível observar, através do espectro Raman, um sinal fraco correspondente a bandas de ligações glicosídicas e os anéis de açúcar.

O biossensor apresentou boa resposta elétrica para lectina-lipopolissacarídeo/ácido lipoteicóico, num intervalo linear, com valores máximos de RCT em concentração fixa (200 µg/mL) para *E. coli* (1,50 kΩ) e *S. aureus* (1,80 kΩ).

Dessa forma, o sistema de reconhecimento proporciona uma interface biomimética apropriada para a detecção de LPS e ácido lipoteicóico bacterianos.

## PERSPECTIVAS

A caracterização dos filmes polianilina e da lectina Concanavalina A realizada neste trabalho forneceu uma quantidade de informações que subsidiariam o desenvolvimento de novos projetos. Dentre as diferentes possibilidades discutidas ao longo da realização desta dissertação de mestrado, poderiam ser citadas as seguintes linhas de pesquisa:

- Avaliar o sistema de reconhecimento frente a outros LPS;
- Imobilização de mais tipos de lectinas, além da ConA, sobre a matriz polimérica;
- Estudo da influência da albumina do soro bovino (BSA) e glicina (Gli) no bloqueio dos sítios ativos remanescentes;
- Avaliação da influência do pH e da concentração lectínica sobre a adsorção física das lectinas.

## REFERÊNCIAS

AGRAWAL, B. B.; GOLDSTEIN, I. J. Specific binding of Concanavalin A to cross-linked dextran gels. **Biochemical Journal**, v. 96, p. 23c-25c, 1965.

ALEXANDER, C.; RIETSCHEL, E.T. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. **Journal of Endotoxin Research**, v. 7, p. 167-202, 2001.

ALLEN, A. K.; NEWBERGER, A. The purification and properties of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 219-230, 1995.

ALVES, V. A.; DA SILVA, L. A.; BOODTS, J. F. C.; J. Electrochemical impedance spectroscopic study of dimensionally stable anode corrosion. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 28, p. 899, 1998.

ANDRADE, C. A. S.; OLIVEIRA, H. P.; OLIVEIRA, M. D. L.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; MELO, C. P. Protein unfolding studied by fluorescence methods and electrical impedance spectroscopy: The cases of *Cratylia mollis* and *Concanavalin A*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 88, p. 100-102, 2011.

ANGELOPOULOS, M. Conducting polymers in microelectronics. **IBM Journal of Research and Development**, v. 45, p. 57-75, 2001.

BALLERSTADT, R.; EVANS, C.; MCNICHOLS, R.; GOWDA, A. Concanavalin A for in vivo glucose sensing: A biotoxicity review. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 22, p. 275-284, 2006.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**, Wiley: New York, 1980.

BARKER, S. A.; SOMERS, P. J. **Bacterial and fungal polysaccharides**, in: W. Pigman, D. Horton (Eds.), *The carbohydrates. Chemistry and Biochemistry*, IIB, Academic Press, New York, 1970, p. 569–587.

BARROS, R.A.; AZEVEDO, W. M.; AGUIAR, F. M. Photo-induced polymerization of polyaniline. **Materials Characterization**, v. 50, p. 131-134, 2003.

BASSO, M. A. **Síntese e Caracterização de PDAN**. Porto Alegre, 2000. 106 pgs. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BHATIA, R. B.; BRINKER, C. J.; GUPTA, A. K.; SINGH, A. K. Aqueous Sol-Gel Process for Protein Encapsulation. **Chemistry of Materials**, v. 12, p. 2434-2441, 2000.

BISQUERT, J.; GARCIA-BELMONTE, G.; FABREGAT-SANTIAGO, F.; FERRIOLS, N. S.; BOGDANOFF, P.; PEREIRA, E. C. Doubling Exponent Models for the Analysis of Porous Film Electrodes by Impedance, Relaxation of TiO<sub>2</sub> Nanoporous in Ag. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, p. 2287, 2000.

BOUCKAERT, J.; DEWALLEF, Y.; POORTMANS, F.; WYNS, L.; LORIS, R. The structural features of concanavalin A governing non-proline peptide isomerization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 19778-19787, 2000.

BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Electroanalysis**. Oxford Chemistry Primer, v. 64, Oxford Science Publications, 1998.

BRÜCK, A.; ABU-DAHAB, R.; BORCHARD, G.; SCHÄFER, U.F.; LEHR, C. M. Lectin-functionalized liposomes for pulmonary drug delivery: Interaction with human alveolar epithelial cells. **Journal of Drug Targeting**, v. 9, p. 241, 2001.

CASEY, P. J.; BUSS, J. E. Lipid modifications of proteins. **Methods in Enzymology**, v. 250, p. 754, 1995.

CHANDRA, N.; PRABU, M. M.; SUGUNA, K.; VIJAYAN, M. Structural similarity and functional diversity in proteins containing the legume lectin fold. **Protein Engineering**, v. 14, p. 857-866, 2001.

CHANDRA, N. R.; KUMAR, N.; JEYAKANI, J.; SINGH, D. D.; GOWDA, S. B.; PRATHIMA, M. N. Lectin: a plant lectin database. **Glycobiology**, v. 16, p. 938-946, 2006.

CHIANG, C. K.; FINCHER, C. R.; PARK, Y. W.; HEEGER, A. J.; SHIRAKAWA, H.; LOUIS, E. J.; GRAU, S. C. MACDIARMID, A. G. Electrical Conductivity in Doped Polyacetylene. **Physical Review Letters**, v. 39, p. 1098-1101, 1977.

COELHO, L. C. B. B.; SILVA, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of Bauhinia monandra. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 295-300, 2000.

COELHO, M. B.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R.. Insecticidal action of Annona coriacea lectin against the flour moth Anagasta kuehniella and the rice moth Corcyra cephalonica (Lepidoptera: Pyralidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, p. 406-414, 2007.

CUNHA, F. G. C.; MORAES, I. R.; NART, F. C. 5-Halogen substituted uracil: General trends for adsorption behavior studied by cyclic voltametry and in situ STM. **Acta Microscópica**, v. 12, p. 24-28, 2003.

DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L. T. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (Bio) sensores. **Química Nova**, v. 27, p. 970-979, 2004.

DE ANDRADE, A. R.; BOODTS, J. F. C. Electrochemical behavior of 4-keto isophorone in non-aqueous medium in the presence of carbon dioxide. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, p. 157-161, 1998.

DE BOLLE, M. F. C.; DAVID, K. M. M.; REES, S. B.; VANDERLEYDEN, J.; CAMMUE, B. P. A. Cloning and Characterization of a cDNA Encoding an Antimicrobial Chitin-binding Protein from Amaranth, *Amaranthus candatus*. **Plant Molecular Biology**, v. 22, p. 1187-1190, 1993.

DEDAVID, B. A. **Microscopia eletrônica de varredura : aplicações e preparação de amostras : materiais poliméricos, metálicos e semicondutores** [recurso eletrônico] / Berenice Anina Dedavid, Carmem Isse Gomes, Giovanna Machado. 60 p. Porto Alegre : EDIPUCRS, 2007.

DE KIMPE, S. J.; KENGATHARAN, M.; THIEMERMAN, C.; VANE, J. R. The cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus act synergy to cause shock and multiple organ failure. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 125, p. 68-72, 1995.

DOYLE, R. J.; SLIFKIN, M. **Lectin-Microorganism Interactions**, New York: Marcel Decker, Inc., 1994.

DONG, S.; LUO, G.; FENG, J.; LI, Q.W.; GAO, H. Immunoassay of Staphylococcal Enterotoxin C1 by FTIR Spectroscopy and Electrochemical Gold Electrode. **Electroanalysis**, v. 13, p. 30-33, 2001.

EDELMAN, G. M.; CUNNINGHAM, B. A.; REEKE, G. N.; BECKER, J. W.; WAXDAL, M. J.; WANG, J. L. The Covalent and Three-dimensional Structure of Concanavalin A. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of American**, v. 69, p. 2580-2584, 1972.

ERRIDGE, C.; BENNETT-GUERRERO, E.; POXTON, I. R. Structure and function of lipopolysaccharides. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 837–851, 2002.

FARIA, D. L. A.; SANTOS, L. G. C.; GONÇALVES, N. S. Uma demonstração sobre o espalhamento inelástico de luz: repetindo o experimento de Raman. **Química Nova**, v. 20, p. 319-323, 1997.

FATIBELLO-FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores. **Química Nova**, v. 15, p. 28, 1992.

FINK, A. L.; CALCIANO, L. J.; GOTO, Y.; KUROTSU, T.; PALLEROS, D. R. Classification of acid denaturation of proteins: intermediates and unfolded states. **Biochemistry**, v. 33, p. 12504-12511, 1994.

FUJIWARA, H.; TOYOSHIMA, Y.; KONDO, M.; MATSUDA, <sup>a</sup> Application of real-time in situ spectroscopic ellipsometry and infraed spectroscopy for characterizing interface structure of a-Si:H layer. **Solar Energy Materials and Solar Cells**, v. 66, p. 209-215, 2001.

FURTADO, R. F.; DUTRA, R. A. F.; ALVES, C. R.; PIMENTA, M. G. R.; GUEDES, M. I. F. **Aplicações de Biossensores na Análise de Alimentos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2008, p. 14.

GE, C.; ARMSTRONG, N. R.; SAAVEDRA, S. S. pH-sensing properties poly(aniline) ultrathin films self-assembled on indium-tin oxide. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 1401-1410, 2007.

GENIÈS, E. M.; BOYLE, A.; LAPKOWSKI, M.; TSINTAVIS, C. Polyaniline: a historical survey. **Synthetic Metals**, v. 36, p. 139-182, 1990.

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

GIL, E.; KUBOTA, L. Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica. **Química Nova**, v. 6, p. 874-879, 1999.

GIZELI, E.; LOWE, C. Immunosensors. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, p. 66-71, 1996.

GOLDBERG, J. B.; PIER, G. B. Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharides and pathogenesis. **Trends in Microbiology**, v. 4, p. 490, 1996.

GOLDSTEIN, I. J.; HOLLERMAN, C. E.; MERRICK, J. M. Protein-carbohydrate interaction. I. The interaction of polysaccharides with concanavalin A. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 97, p. 68, 1965.

GOLDSTEIN, J. I. **Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis – A textbook for biologist, materials scientists and geologists**. New York: Plenum Press, 1992.

GOLDSTEIN, I. J.; MURPHY, L. A.; EBISU, S. Lectins as carbohydrate-binding proteins. **Pure & Applied Chemistry**, v. 49, p. 1095, 1997.

GOMES, E. C.; OLIVEIRA, M. A. S. Chemical Polymerization of Aniline in Hydrochloric Acid (HCl) and Formic Acid (HCOOH) Media. Differences Between the Two Synthesized Polyanilines. **American Journal of Political Science**, v. 2, p. 5-13, 2012.

GOSPODINOVA, N.; TERLEMEZYAN, L. Conducting polymers prepared by oxidative polymerization: polyaniline. **Progress in Polymer Science**, v. 23, p. 1443-1484, 1998.

GRÄTZEL, M. Photoelectrochemical cells. **Nature**, v. 414, p. 338-344, 2001.

GRÜNDLING, A.; SCHNEEWIND, O. Genes Required for Glycolipid Synthesis and Lipoteichoic Acid Anchoring in Staphylococcus aureus. **Journal of Bacteriology**, v. 89, p. 2521–2530, 2007.

GURUNATHAN, K.; MURUGAN, A. V.; MARIMUTHU, R.; MULIK, U. P.; AMALNERKAR, D. P. Electrochemically synthesized conducting polymeric materials for application towards technology in electronics, optoelectronics and energy storage devices. **Materials Chemistry and Physics**, v. 61, p. 173-191, 1999.

GUSTAFSSON, G.; CAO, Y.; TREACY, G. M.; KLAVETTER, F.; COLANERI, N.; HEEGER, A. J. Flexible light-emitting diodes made from soluble conducting polymers. **Nature**, v. 477, p. 357, 1992.

HEYWOOD, V. H. **The leguminosae – a systematic purview**, In: Chemotaxomy of the Leguminosae. Harbone, J. B.; Turner, B. L., p. 1-29. Academic Press: London and New York, 1971.,

HOA, X. D.; KIRK, A. G.; TABRIZIAN, M. Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: A review of recent progress. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 23, n. 2, p. 151-160, 2007.

HU, F.; CHEN, S.; WANG, C.; YUAN, R.; XIANG, Y.; WANG, C. Multi-wall carbon nanotube-polyaniline biosensor based on lectin-carbohydrate affinity for ultrasensitive detection of ConA. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 34, p. 202-207, 2012.

HUANG, W. S.; HUMPHREY, B. D.; MACDIARMID, A. G. Polyaniline, a novel conducting polymer. Morphology and chemistry of its oxidation and reduction in aqueous electrolytes. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1**, v. 82, p. 2385, 1986.

HUANG, J.; VIRJL, S.; WEILLER, B. H.; KANER, R. B. Nanostructured polyaniline sensors. **Chemical European Journal**, v. 10, p. 1314-1319, 2004.

HULANICKI, A.; GLAB, S.; INGMAN, F. Chemical Sensors: Definitions and Classification. **Pure & Applied Chemistry**, v. 63, p. 1247, 1991.

HURLEY, J.C. Reappraisal with meta-analysis of bacteremia, endotoxemia, and mortality in gram-negative sepsis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1278-1282, 1995.

IMBERT, A. *et al.* Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition. **Microbes and Infection**, v. 6, p. 221-228, 2004.

INA, C. *et al.* Screening for and purification of novel self-aggregatable lectins reveal a new functional lectin group in the bark of leguminous trees. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1726, p. 21-27, 2005.

IZUMI, C. M. S.; BRITO, H. F.; FERREIRA, A.M.D.C.; CONSTANTINO, V.R.L.; TEMPERINI, M.L.A. Spectroscopic investigation of the interactions between emeraldine base polyaniline in Eu (III) ions, **Synthetic Metals**, v. 159, p. 377-384, 2009.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; CAPRA, J. D. **Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença**. 2 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

JACOBSON, G. A.; WINKELER, M. **Material Performance**, v. 39, p. 120, 2000.

JIANG, J.; KUCERNAK, A. Nanostructured platinum as a electrocatalyst for the electrooxidation of formic acid. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 520, p. 64-70, 2002.

JONAS, F.; HEYWANG, G. Technical applications for conductive polymers. **Electrochimica Acta**, v. 39, p. 1345-1347, 1994.

KANG, E.T.; NEOH, K. G.; TAN, K. L. Polyaniline: A polymer with many interesting intrinsic redox states. **Progress in Polymer Science**, v. 23, p. 277-324, 1998.

KAPPEL, N. D.; PROLE, F.; GAUGLITZ, G. Development of a TIRF-based biosensor for sensitive detection of progesterone in bovine milk. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 22, p. 2295-2300, 2007.

KAUSAITE-MINKSTIMIENE, A.; MAZEIKO, V.; RAMANAVICIENE, A.; RAMANAVICIUS, A. Enzymatically synthesized polyaniline layer for extension of linear detection region of amperometric glucose biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, p. 790-797, 2010.

KATZ, E., WILLNER I. Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: Routes to impedimetric immunosensors, DNA-sensors, and enzyme biosensors. **Electroanalysis**, v. 15, p. 913-917, 2003.

KENGATHARAN, K. M.; DE, K. S; ROBSON, C.; FOSTES, S. J.; THIEMERMANN, C. Mechanism of gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 188, p. 305-315, 1998.

KENNEDY, J. F. *et al.* Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 219-30, 1995.

KIM, S. H.; CHOI, S. W.; SUH, H. J.; JIN, S. H.; GAL, Y. S.; KOH, K. Surface plasmon resonance spectroscopy on the interaction of a self-assembled monolayer with linear hydrocarbon such as pentane, hexane, heptane and octane. **Dyes and Pigments**, v. 55, p. 17-25, 2002.

KURALAY, F.; ÖZYÖRÜK, H.; YILDIZ, A. Potentiometric enzyme electrode for urea determination using immobilized urease in poly(vinylferrocenium) film. **Sensors and Actuators B Chemical**, v. 109, p. 194-199, 2005.

LASIA, A. J. Impedance of Prous-Electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 397, p. 27-33, 1995.

LASIA, A. J. Nature of the two semi-circles observed on the complex plane plots on porous electrodes in the presence of a concentration gradient. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 500, p. 30-35, 2001.

LATHA, V. L.; RAO, R. N.; NADIMPALLI, S. K. Affinity purification, physicochemical and immunological characterization of a galactose-specific lectin from the seeds of Dolichos lablab (Indian lablab beans). **Protein Expression and Purification**, v. 45, p. 296-306, 2006.

LEBLANC, L.; DUFOUR, E. Monitoring the identity of bacteria using their intrinsic fluorescence. **FEMS Microbiology Letters**, v. 211, p. 147-153, 2002.

LEITE, Y.F. M. M. *et al.* Purification of a lectin from the marine red alga Gracilaria ornata and its effect on the development of the cowpea weevil Callosobruchus maculatus (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1724, p. 137-145, 2005.

LETHEBY, H. On the production of a blue substance by the electrolysis of sulphate of aniline. **Journal of the Chemical Society**, v. 15, p 161, 1862.

LI, Y. R. *et al.* A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom Pleurotus citrinopileatus. **Biochimica et Biophysica Acta**, in press, 2007.

LIENER, I.E. **The nutritional significance of the plant lectins.** In: ORY, R.L. Antinutrients and natural toxicants in foods. Westport: Food & Nutrition Press, p.143-157, 1981.

LINDON, J. C.; TRANTER, J. E.; HOLMES, J. L. **Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry.** Amsterdam: Elsevier, 2000.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 637-674, 1998.

LIU, Z.; GUO, W.; FU, D.; CHEN, W. P-N Heterojunction diodes made by assembly of ITO/nano-crystalline TiO<sub>2</sub>/polyaniline/ITO. **Synthetic Metals**, v. 156, p. 414-416, 2006.

LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1383, p. 9-36, 1998.

MACDIARMID, A.G.; CHIANG, J. C.; RICHTER, A. F.; EPSTEIN, A. J. Polyaniline: a new concept in conducting polymers. **Synthetic Metals**, v. 18, p. 285-290, 1987.

MACDIARMID, A. G.; EPSTEIN, A. J. **Proceedings of the first conference on frontiers of polymer research**. Índia: 1991.

MACDIARMID, A.G. Synthetic metals: a novel role for organic polymers. **Synthetic Metals**, v. 125, p. 11-22, 2001.

MAIA, D.J.; PAOLI, M. A.; ALVES, O, L.; ZARBIN, A. J. G.; NEVES, S. Síntese de polímeros condutores em matrizes sólidas hospedeiras. **Química Nova**, v. 23, p. 204-215, 2000.

MAKELA, D. Studies on hemagglutinins of leguminous seeds. **Annals of Medical and Experimental Biology Fenniae**, v. 35, p. 1-156, 1957.

MALACRINO, P.; ZAPPAROLI, G.; TORRIANI, S.; DELLAGLIO, F. Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry. **Journal of Microbiological Methods**, v. 45, p. 127-134, 2001.

MANOHAR, S. K.; MACDIARMID, A. G.; EPSTEIN, A. J. Polyaniline: Pernigraniline, an isolable intermediate in the conventional chemical synthesis of emeraldine. **Synthetic Metals**, v. 711, p. 41-43, 1991.

MANOHARAN, M.; WANG, Y.; FELD, M. S. Histochemical analysis of biological tissues using Raman spectroscopy. **Spectrochimica ACTA**, v. 52, p. 215-249, 1995.

MATTOSO, L. H. C.; BULHÕES, L. O. S.; FARIA, R. M.; MACDIARMID, A. G. Synthesis, doping and processing of high-molecular-weight poly(o-methoxyaniline). **Journal Polymer Chemistry**, v. 32, p. 2147, 1994.

MATTOSO, L. H. Polianilinas: Síntese, Estrutura e Propriedades. **Química Nova**, v. 19, p. 388-399, 1996.

McADAM, B.F.; MARDINI, I.A.; HABIB, A.; BURKE, A.; LAWSON, J.A.; KAPOOR, S.; FITZGERALD, G.A. Effect of regulated expression of human cyclooxygenase isoforms on eicosanoid and isoeicosanoid production in inflammation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 105, 1473-1482, 2000.

McINTIRE, F. C.; SIEVERT, H., W.; BARLOW, G. H.; FINLEY, R. A.; LEE, A. Y. Chemical, Physical, and Biological Properties of a Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* K-235. **Biochemistry**, v. 6, p. 2363, 1967.

MELO, A. F. **Desenvolvimento preliminar de um biossensor enzimático para determinação de taninos hidrolisáveis**. Rio de Janeiro, 2008. 127 pgs. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

MENEGUZZI, A. **Eletrossíntese de filmes de polímeros a partir de naftilaminas substituídas sobre metais oxidáveis e síntese química. Aplicação na proteção contra a corrosão**. Porto Alegre, 200. 141 pgs. Tese de Doutorado – Programa de pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MENG, J.H.; ZHAO, S.H.; DOYLE, M.P.; KRESOVICH, S. Polymerase chain reaction for detecting *Escherichia coli* O157:H7. **International Journal of Food Microbiology**, v. 32, p. 103-113, 1996.

MOREIRA, R. A.; AINOUIZ, J. L.; DE OLIVEIRA, J. T.; CAVADA, B. S. Plant lectins, chemical and biological aspects. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 211-218, 1991.

MOURA, R. M. *et al.* CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 145, p. 517-523, 2006.

MU, S.; XUE, H. Bioelectrochemical characteristics of glucose oxidase immobilized in a polyaniline film. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 31, p. 155-160, 1996.

MULCHANDANI, A.; BASSI, A. S. Principles and applications of biosensors for bioprocess monitoring and control. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 15, p. 105-124, 1995.

NASCIMENTO, G. M.; TEMPERINI, M. L. A. Studies on the resonance Raman spectra of polyaniline obtained with near-IR excitation. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 39, p. 772-778, 2008.

OLIVEIRA, M. D. L.; ANDRADE, C. A. S.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; SINGH, P. R.; ZENG, X. Impedimetric biosensor based on self-assemble hybrid cystein-gold nanoparticles and CramoLL lectin for bacterial lipopolysaccharide recognition. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 362, p. 194-201, 2011.

OLSON, M. O.; LIENER, I. E. Some physical and chemical properties of concanavalin A, the phytohemagglutinin of the jack bean. **Biochemistry**, v. 6, p. 105-111, 1967.

OPAL, S. M.; SCANNON, P. J.; VINCENT, J. L.; WHITE, M.; CARROLL, S. F.; PALARDY, J. E.; PAREJO, N. A.; PRIBBLE, J. P.; LEMKE, J. H. Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, p. 1584–1589, 1999.

ORDÓÑEZ R. M. *et al.* Antimicrobial activity of glycosidase inhibitory protein isolated from *Cyphomandra betacea* Sendt fruit. **Peptides**, v. 27, p.1187-1191, 2006.

PAIVA, P. M. G., *et al.* Purification and primary structure determination of two Bowman-Birk type trypsin isoinhibitors from *Cratylia mollis* seeds. **Phytochemistry**, v. 67, p. 545-552, 2006.

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

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

PETROSSIAN, K.; BANNER, L. R.; OPPENHEIMER, S. B. Lectin binding and effects in culture on human cancer and non-cancer cell lines: Examination of issues of interest in drug design strategies. **Acta Histochemica**, v. 109, p. 491-500, 2007.

PISTOLE, T. G. Interaction of bacteria and fungi with lectins and lectin-like substances. **Annual Review of Microbiology**, v. 35, p. 85-112, 1981.

PNEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in food. **Trends in Food Science Technology**, v. 7, p. 132-138, 1996.

POHANKA, M.; SKÁDAL, P. Electrochemical biosensors – principles and applications. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 6, p. 57-64, 2008.

PRESTON, A.; MANDRELL, R. E.; GIBSON, B. W.; APICELLA, M. A. The lipooligosaccharides of pathogenic gram-negative bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 22, p. 139–180, 1996.

REEDER, W. J.; EKSTEDT, R. D. Study of the interaction of concanavalin A with staphylococcal teichoic acids. **The Journal of Immunology**, v. 106, p. 334-340, 1971.

REEKE, G. N.; BECKER, J. W.; EDELMAN, G. M. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. IV Atomic coordinates, hydrogen bonding, and quaternary structure. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 1525-1547, 1975.

ROGERS, K. R. Recent advances in biosensor techniques for environmental monitoring. **Analytica Chimica Acta**, v. 568, p. 222-231, 2006.

ROTH, S.; GRAUPNER, W. Conductive polymers: Evaluation of industrial applications. **Synthetic Metals**, v. 3623, p. 55-57, 1993.

SAFINA, G. Application of surface plasmon resonance for the detection of carbohydrates, glycoconjugates, and measurement of the carbohydrate-specific interactions: A comparison with conventional analytical techniques. A critical review. **Analytica Chimica Acta**, v. 712, p. 9-29, 2012.

SALA, O. **Fundamentos da espectroscopia Raman e no Infravermelho**. São Paulo, Ed. UNESP: 1996, p. 13-15.

SALGADO, A. M. **Desenvolvimento e aplicação de sensores e sistemas de monitoração de biomassa, etanol e de substrato por modelo**. Rio de Janeiro, 2001. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

SAMEK, O.; TELLE, H. H.; HARRIS, L. G.; BLOOMFIELD, M.; MACK, D. Raman spectroscopy for rapid discrimination of *Staphylococcus epidermidis* clones related to medical device-associated infections, **Laser Physics Letters**, v. 5, p. 465-470, 2008.

SANTI-GADELHA, T. *et al.* Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, p.1050-1055, 2006.

SANTOS Jr, J. R.; MALMONGE, J. A.; SILVA, A. J. G. C.; MOTHEO, A. J.; MASCARENHAS, Y. P.; MATTOSO, L. H. C. Characteristics of polyaniline electropolymerized in camphor sulfonic acid. **Synthetic Metals**, v. 69, p. 141, 1995.

SANTOS, A. D.; GORTON, L.; KUBOTA, L. T. Nile blue adsorbed onto silica gel modified with niobium oxide for electrocatalytic oxidation of NADH. **Electrochimica Acta**, v. 47, p. 3351, 2002.

SAXENA, V.; MALHOTRA, B. D. Prospects of conducting polymers in molecular electronics. **Current Applied Physics**, v.3, p. 293-305, 2003.

SCHAEFFER, H.E.; BREITFELLER, J.M.; KROHN, D.L. Lectin-mediated attachment of liposomes to cornea: influence on transcorneal drug flux. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 23, p. 530, 1982.

SCHWEISS, R.; WERNER, C.; KNOLL, W. Impedance spectroscopy studies of interfacial acid /base reactions of self-assembled monolayers. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 540, p. 145, 2003.

SEO, H. S.; MICHALEK, S. M.; NAHM, M. H. Lipoteichoic acid is important in innate immune responses to gram-positive bacteria. **Infection and Immunity**, v. 76, p. 206-213, 2008.

SHARON, N.; LIS, H. History of Lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, p. 53R-62R, 2004.

SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific Reagents and Biological Recognition Molecules. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 2753-2763, 2007.

SHINDE, S. B.; FERNANDES, C. B.; PATRAVALE, V. B. Recent trends in in-vitro nanodiagnostic for detection of pathogens. **Journal of Controlled Release**, v. 159, p. 164-180, 2012.

SITOHY, M.; DOHEIM, M.; BADR, H. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seeds. **Food Chemistry**, v. 104, p. 971-979, 2007.

SKORTHEIM, T. A.; ELSENBAUMER, R.L.; REYNOLDS, J. R. **Handbook of Conducting Polymers**, 2nd ed., Marcel Dekker, New York, 1998.

SOARES, T. A.; STRAATSMA, T. P.; LINS, R. D. Influence of the B-band O-antigen chain in the Structure and Electrostatics of the Lipopolysaccharide Membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 19, p. 312, 2008.

SOUZA, R. A. *et al.* Influence of creatine supplementation on bone quality in the ovariectomized rat model: an FT-Raman spectroscopy study. **Lasers in Medical Science**, v. 27, p. 487-495, 2012.

SPERVESLAGE, J.; STACKEBRANDT, E.; LEMBKE, F.W.; KOCH, C. Detection of bacterial contamination, including Bacillus spores, in dry growth media and in milk by identification of their 16S rDNA by polymerase chain reaction. **Journal of Microbiological Methods**, v. 26, p. 219-224, 1996.

SQUIRRELL, D. J.; PRICE, R. L.; MURPHY, M. J. Rapid and specific detection of bacteria using bioluminescence. **Analytica Chimica Acta**, v. 457, p. 109-114, 2002.

SRINIVAS, V. R.; REDDY, G. B.; AHMAD, N.; SWAMINATHAN, C. P.; MITRA, N.; SURDIA, A. Legume lectin family, the natural mutants of the quaternary state', provide insights into the relationship between proteins stability and oligomerization. **Biochemical et Biophysica Acta**, v. 1527, p. 102-111, 2001.

STOICA, T. F.; TEODORESCU, V. S.; BLANCHIN, M. G.; STOICA, T. A.; GERTNER, M.; LOSENDO, M.; ZAHARESCU, M. Morphology, structure and optical properties of sol-gel ITO thin films. **Materials Science and Engineering: B**, v. 101, p. 222, 2003.

SUMNER, J. B.; HOWELL, S. F.; ZEISSIG, A. Conacnavalin A and hemagglutination. **Science**, v.82, p. 65-66, 1935.

SUSEELAN, K. N.; MITRA, R.; PANDEY, R.; SAINIS, K. B.; KRISHNA, T. G. Purification and characterization of a lectin from wild sunflower (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 407, p. 241-247, 2002.

SWALEN, J. D; ALLARA, D. L.; ANDRADE, J. D.; CHANDROSS, E. A. GAROFF, S.; ISRAELACHVILI, J.; MCMARTHY, T. J.; MURRAY, R.; PEASE, R. F.; RABOLT, J. F.; WYNNE, K. J.; YU, H. **Langmuir**, v. 3, p.932, 1987.

VELASCO, G. M.; MOTTRAM, T. Biosensor technology addressing agricultural problems. **Biosystems Engineering**, v. 84, p. 1-12, 2003.

VELUSAMY, V.; ARSHAK, K.; KOROSTYNSKA, O.; OLIWA, K.; ADLEY, C. An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 232-254, 2010.

VERGE`RES, G.; RAMSDEN, J.J.; WASKELL, L. The carboxyl terminus of the membrane-binding domain of cytochrome b5 spans the bilayer of the endoplasmic reticulum. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 3414-3422, 1995.

TAMBOLI, M. S.; KULLCARNI, M. V.; PATIL, R. H.; GADE, W. N.; NAVALE, S. C.; KALE, B. B. Nanowires of silver-polyaniline nanocomposite synthesized via in situ polymerization and its novel functionality as an antibacterial agent. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 92, p. 35-41, 2012.

TOKO, K. Taste sensor. **Sensors and Actuators B**, v. 64, p. 205-215, 2000.

TULLY, E.; HIGSON, S. P.; KENNEDY, R. O. The development of a 'labelless' immunosensor for the detection of *Listeria monocytogenes* cell surface protein Internalin B. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, p. 906-912, 2008.

TURNER, A. P. F.; KARUBE, Y.; WILSON, G. S. **Biosensors: Fundamentals and Applications**, Oxford University Press: New York, 1987.

WAN, D.; YUAN, S. J.; LI, G.L.; NEOH, K.G.; KANG, E.T. Glucose biosensor from covalent immobilization of chitosan-coupled carbon nanotubes on polyaniline-modified gold electrode. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 2, p. 3083-3091, 2010.

WANG, B.; TANG, J.; WANG, F. Electrochemical Polymerization of Aniline. **Synthetic Metals**, v. 18, p. 324, 1988.

WANG, J. Amperometric biosensor for clinical and therapeutic drug monitoring a review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 19, p. 43-59, 1999.

WANG, H. X.; BUNKERS, G. J. Potent heterologous antifungal proteins from cheeseweed (*Malva parviflora*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 279, p. 669-673, 2000.

WANG, H.X.; NG, T. B. Purification of Castamollin, a novel antifungal protein from Chinese chestnuts. **Protein Expression & Purification**, v. 32, p. 44-51, 2003.

WANG, H. X.; NG, T. B. Concurrent isolation of a Kunitz-type trypsin inhibitor with antifungal activity and a novel lectin from *Pseudostellaria heterophylla* roots. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 342, p. 349-353, 2006.

WANG, L. P.; WANG, W.; DI, L.; LU, Y.N.; WANG, J. Y. Protein adsorption under electrical stimulation of neural probe coated with polyaniline. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 80, p. 72-78, 2010.

WANG, J. **Analytical Electrochemistry**. VCH publishers: New York, 1994.

WHITTAKER, P.; MOSSOBA, M.M.; AL-KHALDI, S.; FRY, F.S.; DUNKEL, V.C.; TALL, B.D.; YURAWECZ, M.P. Identification of foodborne bacteria by infrared spectroscopy using cellular fatty acid methyl esters. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, p. 709-716, 2003.

WROBLEWSKI, S. *et al.* Potencial of lectin-N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymerdrug conjugates for the tratament of pre-cancerous conditions. **Journal of Controlled Release**, v. 74, p. 283-293, 2001.

XU, X. H.; REN, G. L.; CHENG, J.; LIU, Q.; LI, D. G.; CHEN, Q. Self-assembly of polyaniline-grafted chitosan/glucose oxidase nanolayered films for electrochemical biosensor applications. **Journal Materials Science**, v. 41, p. 4974-4977, 2006.

YANG, S. M.; CHEN, J. T. The effect of synthesis conditions on the properties of polyaniline film. **Synthetic Metals**, v. 69, p. 153-154, 1995.

YANG, L.; BASHIR, R. Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 135-150, 2008.

YE, X. Y.; NG, T. B. Peptides from pinto bean and red bean with sequence homology to cowpea 10-KDA protein precursor exhibit antifungal, mitogenic, and HIV-1 reverse transcriptase-inhibitory activities. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.285, p. 424-429, 2001.

YOSHIKAWA, K.; YOSHIOKA, K.; KITANI, A.; SASAKI, K. Preparation of highly conducting polyanilines. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 270, 421, 1989.