

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

IMOBILIZAÇÃO DE CONCAVALINA A EM BICAMADAS LIPÍDICAS
AUTOMONTADAS VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE
BIOSSENSORES

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO, 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

IMOBILIZAÇÃO DE CONCAVALINA A EM BICAMADAS LIPÍDICAS
AUTOMONTADAS VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE
BIOSSENSORES

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Nutrição como requisito para conclusão do
Curso de Bacharel em Nutrição

Aluno: Jordana Sirlaide Lima da Silva
Orientador: César Augusto Souza de Andrade

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO, 2010

[reservado para ficha catalográfica]

[reservado para folha de aprovação]

Dedicatória

Aos meus pais, Joana e Maurício, aos meus irmãos, Mavyson e Maclebson. Enfim a toda minha família.

Agradecimentos

A Deus, por me dar saúde e força de vontade para vencer todos os meus obstáculos;

Aos meus pais, Joana e Maurício, pelo amor, apoio, preocupação e bons exemplos, que me alicerçaram na caminhada da vida;

Aos meus irmãos, Mavyson e Maclebson, pelo incentivo e descontração;

Ao meu namorado, Diogenes, por todo amor e compreensão nesta etapa de minha vida;

A toda minha família, que sempre torceu por mim;

Ao meu orientador, Prof. César Augusto Souza de Andrade, pela confiança, apoio, incentivo e orientação;

À Prof.^a Maria Danielly Lima de Oliveira, pela grande contribuição na realização deste trabalho;

À FACEPE, pelo apoio financeiro;

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

Resumo

Membranas de bicamada lipídica (MBL) têm sido extensivamente utilizada na fabricação de dispositivos eletrônicos biomoleculares devido às vantagens de miniaturização, baixo custo, biorreconhecimento interfacial e transdução do sinal. Lectinas são proteínas de origem não imunológica que possuem a capacidade de ligação específica a carboidratos ou polissacarídeos. Em adição, Concanavalina A é uma lectina glicose-manose específica obtida da *Canavalia ensiformis*, um tipo de leguminosa conhecida popularmente como feijão-de-porco. Agregados não covalentes de lipídios e proteínas auto-organizados têm sido considerados como um fator crucial na determinação da estrutura da membrana e estabilidade. Esses materiais automontados têm encontrado um número crescente de aplicações em eletrônica, biotecnologia e sensores. Neste trabalho, foi feita a avaliação das características eletroquímicas da deposição de lipídios e sistema lectina-MBL na superfície de eletrodo de ouro, através das técnicas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e voltametria cíclica (VC). As medidas de EIE foram realizadas numa faixa de frequência entre 100mHz a 100KHz e de VC com potencial de -0,2V a 0,7V com velocidade de varredura de 50mV/s, ambas feitas em solução de ferro-ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$) (1:1) como indicador redox. Nas medidas de VC e EIE houve bloqueio da superfície do eletrodo com queda da resposta amperométrica e aumento da resistência de transferência de carga do eletrodo após entrar em contato com o lipídio e a lectina. A incubação do sistema lectina-MBL numa solução da glicoproteína ovoalbumina (100µg/mL) resultou na diminuição da resposta amperométrica e aumento da resposta impedanciométrica, demonstrando a retenção da bioatividade da lectina. Estes resultados indicam um progresso na relação de interação do sistema misto lectina-MBL, fornecendo parâmetros para a utilização desse sistema na confecção de um biossensor impedanciométrico para detecção de açúcares.

Descritores: Concanavalina A, biossensor, impedância, bioeletroquímica

Sumário

Introdução com justificativa.....	9
Revisão da Literatura.....	12
1. Membranas Biológicas.....	12
2. Lectinas.....	15
2.1 Lectinas de Leguminosas.....	17
2.2 Concanavalina A.....	18
3. Biossensores.....	20
4. Técnicas Eletroanalíticas.....	22
4.1 Voltametria Cíclica.....	23
4.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....	25
Objetivos.....	27
Objetivo Geral.....	27
Objetivos Específicos.....	27
Metodologia.....	28
1. Materiais.....	28
2. Metodologia.....	28
2.1 Preparação das MBLs e Imobilização de Concanavalina A.....	28
2.2 Medidas de impedância eletroquímica e voltametria cíclica.....	29
Resultados e Discussões.....	31
1. Caracterização Eletroquímica.....	31
1.1 Determinação do tempo de incubação na solução de ConA.....	31
1.2 Avaliação da atividade biológica de ConA.....	32
Conclusões.....	37
Apoio Financeiro.....	38
Referências.....	39

Introdução com justificativa

As células vivas são delimitadas por uma membrana plasmática (MP) que é um elemento essencial em todos os organismos vivos. A MP é um arranjo de lipídios, proteínas e carboidratos os quais realizam diversas funções incluindo transporte molecular específico, interação com receptores, atividade enzimática e controle das interações celulares. Em adição, o estudo da estrutura e funções das proteínas presentes na MP tem sido um imenso desafio desde que, em geral, estas proteínas devem permanecer na matriz lipídica para reter sua estrutura nativa e atividade biológica (Wu *et al.*, 2001).

Diversos tipos de modelos de membrana têm sido utilizados em pesquisas, dentre as quais podemos destacar as vesículas lipídicas (lipossomas), membrana de bicamada lipídica (MBL), monocamadas de Langmuir-Blodgett, dentre outros. O sistema MBL tem sido extensivamente empregado como modelo experimental de biomembranas (Tien *et al.*, 1974), biossensores (Liua *et al.*, 2007) e dispositivos eletrônicos biomoleculares (Naumowicza *et al.*, 2005). Contudo, a MBL é uma estrutura relativamente frágil e há a necessidade do desenvolvimento de métodos para avaliação destas estruturas sem a perda dos seus aspectos funcionais. A estabilidade mecânica de MBL em suportes sólidos (s-MBL) como, por exemplo, eletrodos de ouro, pode ser melhorada em várias ordens de magnitude e manter suas propriedades dinâmicas por longo tempo (Tien, 1989), permitindo a imobilização de diversas moléculas como proteínas, sem ocorrer a perda da atividade biológica.

Lectinas são proteínas de origem não imunológica que aglutinam células e precipitam carboidratos complexos ou polissacarídeos. Sua interação com polissacarídeos se assemelha as reações enzima-substrato e antígeno-anticorpo. Lectinas são modelos úteis para avaliação das interações proteína-carboidrato devido ao alto grau de especificidade a carboidratos apresentado por esta classe de moléculas. Atualmente, as lectinas estão atraindo muito interesse na pesquisa, sendo usadas como ferramentas nas áreas da pesquisa biológica, médica e

biotecnológica. A aplicação das lectinas pode ser ampla e variada, devido as suas propriedades biológicas como, por exemplo, na investigação estrutural e funcional de carboidratos complexos, especialmente glicoproteínas, e na observação de mudanças que ocorrem na superfície celular durante os processos fisiológicos e patológicos, desde a diferenciação celular ao câncer. Além disso, pode ser aplicada na avaliação de toxicidade para células e animais (Sharon & Lis, 1990). A Concanavalina A (Con A) é uma lectina obtida de um tipo de leguminosa, a *Canavalia ensiformis* (conhecida popularmente como feijão-de-porco) e inibida por α -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.

Desta forma, agregados não covalentes de lipídios e proteínas auto-organizados (Andrade *et al.*, 2005) tem sido considerado como um fator crucial na determinação da estrutura da membrana e estabilidade. Os vários modos de auto-organização em tais sistemas são ditados pela termodinâmica e variações das propriedades do sistema bem como a transição de um tipo de morfologia em outro, o qual pode ocorrer como resultado de modificações sutis no balanço de forças intermoleculares (Wennerstrom, 2000). Portanto, a interação existente entre filmes mistos de proteína-fosfolipídio são convenientes modelos das principais características dos processos existentes nas membranas. Em adição, os sistemas baseados em s-MBL são a melhor escolha para o desenvolvimento de novas classes de biossensores eletroquímicos, justamente pela facilidade de reproduzir os eventos que ocorrem nas membranas biológicas presentes nas células vivas.

O princípio básico do funcionamento de um biossensor é a produção de um sinal eletrônico que é proporcional à concentração de um determinado elemento biológico em estudo ou um grupo de substâncias. A interação das biomoléculas pode ser avaliada através de técnicas eletroquímicas, tais como a voltametria cíclica (VC) e a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). 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. Essas medidas podem então ser relacionadas com algum parâmetro químico intrínseco do analito (Wang, 1994).

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 (Dong *et al.*, 2001; Katz e Willner, 2003). A técnica tem como base a aplicação de um potencial ou corrente alternada, sendo uma delas a variável controlada, medindo-se a intensidade e diferença de fase da outra variável. As medidas são realizadas em uma faixa de frequências, de forma que diferentes processos físicos e químicos possam ser separados por suas constantes de tempo (MacDonald, 1987).

A voltametria é uma técnica eletroanalítica que se baseia nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície. Essa técnica é classificada como dinâmica, pois a cela eletroquímica é operada na presença de corrente elétrica ($i > 0$) que, por sua vez, é medida em função da aplicação controlada de um potencial. Assim, nessa técnica, as informações sobre o analito são obtidas por meio da medição da magnitude da corrente elétrica que surge no eletrodo de trabalho ao se aplicar um potencial entre um eletrodo de trabalho e um eletrodo auxiliar. O parâmetro ajustado é o potencial (E) e o parâmetro medido é a corrente resultante (i). O registro da corrente em função do potencial é denominado voltamograma e a magnitude da corrente obtida pela transferência de elétrons durante um processo de oxirredução pode ser relacionada com a quantidade de analito presente na interface do eletrodo e, conseqüentemente, na cela eletroquímica (Skoog, 2002).

O presente trabalho apresenta caráter inter e multidisciplinar, associando diversas áreas de conhecimento como a biotecnologia e a físico-química interfacial. Portanto, visamos avaliar os parâmetros físico-químicos da interação da lectina a MBL (LecMBL), formadas por lipídios carregados e zwitteriônicos, e posteriormente aplicá-lo na detecção de açúcares.

Revisão da Literatura

1. Membranas Biológicas

As membranas celulares são fundamentais para a vida da célula. A membrana plasmática (MP) engloba a célula, define os seus limites e mantém diferenças essenciais entre o citosol e o ambiente extracelular (Alberts *et al.*, 2004). Apesar das suas funções diferenciadas todas as membranas biológicas têm uma estrutura geral em comum: são constituídas por proteínas, lipídios e carboidratos presentes em glicoproteínas e glicolipídios, os quais realizam diversas funções incluindo transporte molecular específico, interação com receptores, atividade enzimática e controle das interações celulares. As proporções relativas de proteínas e lipídios variam com o tipo de membrana, refletindo a diversidade dos papéis biológicos (Lehninger, 2002). Em adição, o estudo da estrutura e funções das proteínas presentes na MP, as quais são responsáveis por estas atividades tem sido um imenso desafio desde que, em geral, estas proteínas devem permanecer na matriz lipídica para reter sua estrutura nativa e atividade biológica (Wang *et al.*, 2001).

As membranas celulares são estruturas dinâmicas, fluidas e a maioria das moléculas são capazes de se mover através do plano das membranas. As moléculas lipídicas arranjam-se como uma dupla camada contínua de espessura aproximada de 5nm. Esta bicamada lipídica é responsável pela estrutura fluida básica da membrana e serve como uma barreira relativamente impermeável à passagem da maioria dos solutos polares ou carregados, mas permeáveis aos compostos não-polares (Lehninger, 2002). As moléculas protéicas que atravessam a bicamada lipídica servem de mediadores para praticamente todas as outras funções da membrana como, por exemplo, o transporte de moléculas específicas ou catálise de reações associadas à membrana, como a síntese de ATP. Na membrana plasmática, algumas proteínas servem de ligantes estruturais que conectam o citoesqueleto por meio da bicamada lipídica, tanto à matriz celular quanto às células

adjacentes, enquanto outros servem como receptores para detectar e transdução de sinais químicos no ambiente celular (Alberts *et al.*, 2004).

A evidência proveniente tanto da microscopia eletrônica e de estudos da composição química, bem como de estudos físicos de permeabilidade e da mobilidade individual de moléculas de proteínas e lipídios dentro da membrana resultou no desenvolvimento do modelo do mosaico fluido para a estrutura das membranas plasmáticas (Fig. 1).

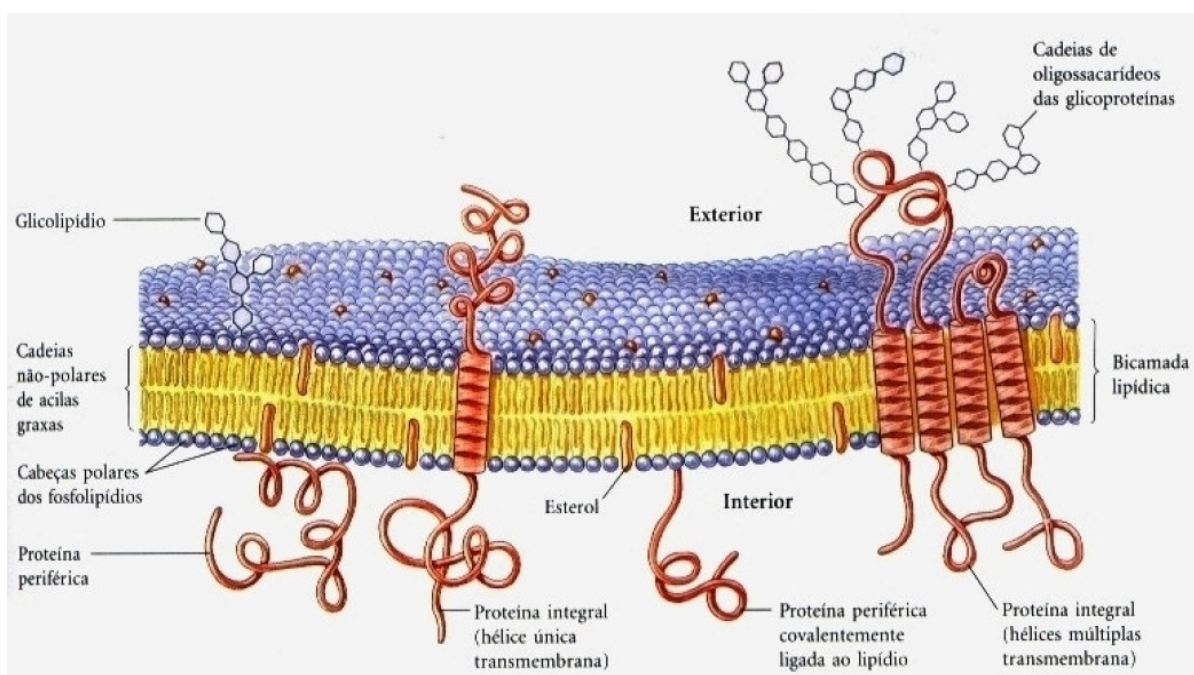


Figura 1 – Modelo do mosaico fluido para a estrutura da membrana (Lehninger, 2002).

No modelo do mosaico fluido, fosfolipídios e esteróis formam uma bicamada lipídica na qual as regiões apolares são orientadas para o centro e os grupos polares para o exterior. Na bicamada lipídica as proteínas globulares estão incrustadas em intervalos irregulares mantidas pelas interações hidrofóbicas entre os lipídios da membrana e os domínios hidrofóbicos nas proteínas. Algumas proteínas projetam-se num dos lados da membrana, enquanto outras possuem domínios expostos em ambos os lados. O mosaico da membrana é fluido pelo fato das interações entre seus componentes não serem covalentes, resultando numa liberdade para as

moléculas individuais de lipídios e das proteínas se movimentarem lateralmente no plano da membrana (Lehninger, 2002).

Diversos tipos de modelos de membrana têm sido utilizados em pesquisas, dentre os quais podemos destacar as vesículas lipídicas (lipossomas), membrana de bicamada lipídica (MBL), dentre outros. Tais modelos são resultado da capacidade dos lipídios de formarem espontaneamente agregados lipídicos microscópicos quando misturados com a água, através do agrupamento das suas porções hidrofóbicas e seus grupos hidrofílicos interagindo com a água que os cerca.

Dependendo de condições definidas e a natureza dos lipídios, três tipos de agregados de lipídios podem se formar quando lipídios anfipáticos são misturados com a água (Fig. 2), como seguem:

- 1) Micelas: estruturas esféricas contendo de algumas dúzias a alguns milhares de moléculas arranjadas com suas regiões hidrofóbicas agregadas no interior, excluindo-se a água e seus grupos hidrofílicos na superfície em contato com a água (Fig. 2a);
- 2) Bicamada: estrutura em que duas monocamadas de lipídios resultam numa lâmina bidimensional (Fig. 2b). As porções hidrofóbicas em cada monocamada são excluídas da água e interagem entre si. Os grupos hidrofílicos interagem com a água na superfície da bicamada e pelo fato de estar transitoriamente em contato com a mesma, a bicamada é relativamente instável;
- 3) Lipossoma: estrutura em que a bicamada se dobra para formar uma esfera oca denominada de vesícula (Fig. 2c) (Lehninger, 2002).

O sistema MBL tem sido extensivamente empregado como modelo experimental de biomembranas (Tien *et al.*, 1974), biossensores (Liua *et al.*, 2007) e dispositivos eletrônicos biomoleculares (Naumowicza *et al.*, 2005). Contudo, a MBL é uma estrutura relativamente frágil e há a necessidade do desenvolvimento de métodos para avaliação destas estruturas sem a perda dos seus aspectos funcionais. A estabilidade mecânica de MBL em suportes sólidos (s-MBL) como, por exemplo, eletrodo de ouro, pode ser melhorada em várias ordens de magnitude e manter suas propriedades dinâmicas por longo tempo (Tien, 1989), permitindo a

imobilização de diversas moléculas como proteínas sem ocorrer a perda da atividade biológica.

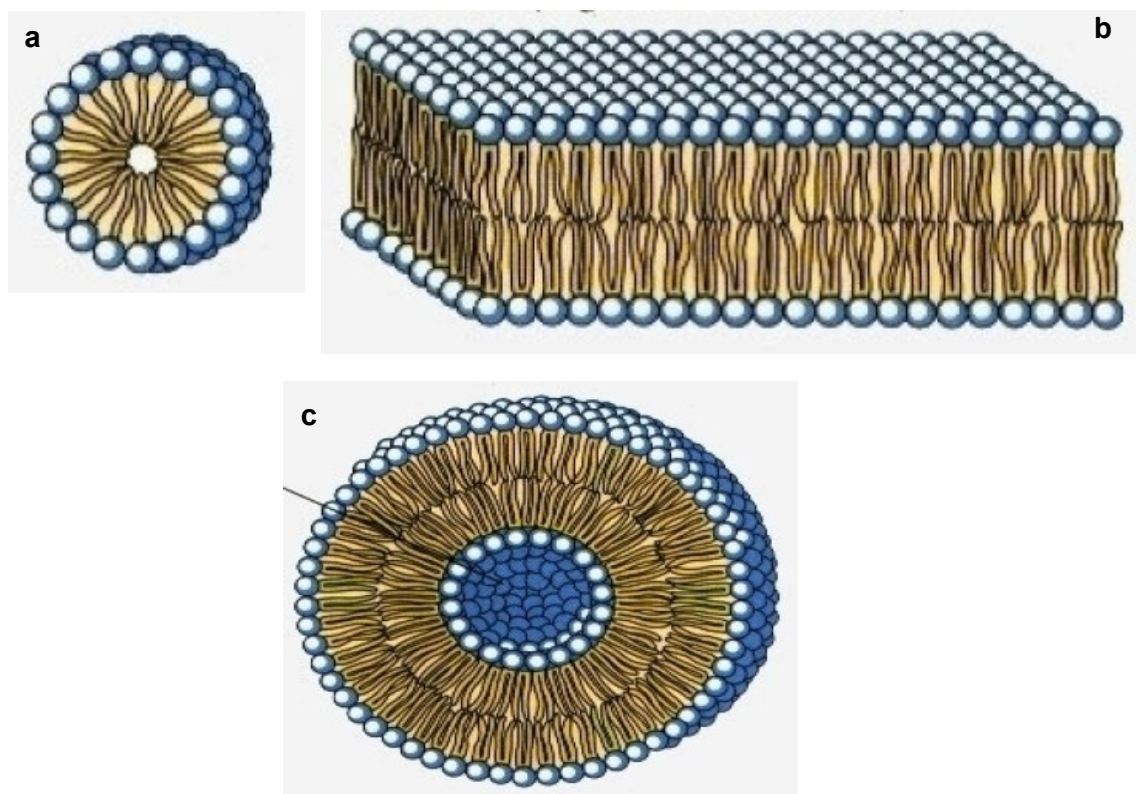


Figura 2. Representação esquemática de agregados lipídicos: (a) micela; (b) bicamada e (c) lipossoma (Adaptado de Lehninger, 2002).

2. Lectinas

Lectinas são proteínas de origem não imunológica que aglutinam células e precipitam carboidratos complexos ou polissacarídeos, podendo ser encontradas em quase todos os organismos, dos quais se incluem as plantas, vertebrados, invertebrados, bactérias e vírus. Sua interação com polissacarídeos se assemelha as reações enzima-substrato e antígeno-anticorpo.

A história da pesquisa com lectinas iniciou em 1888 quando Hermann Stillmark observou que extratos de *Ricinus comuni* causavam aglutinação de eritrócitos, sendo o ingrediente ativo uma proteína denominada de ricina. 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 Shapleigh 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 (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 (Peumans & 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 (Peumans & 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 (Peumans & Van Damme, 1996).

Portanto, de acordo com as diferentes especificidades por açúcares apresentadas pelas lectinas, Makela sugeriu, em 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 são modelos úteis para avaliação das interações proteína-carboidrato devido ao alto grau de especificidade a carboidratos apresentado por esta classe de moléculas. Além disso, as lectinas podem promover estimulação mitogênica de linfócitos e aglutinação de células cancerosas (Lis & Sharon, 1973; Liener, 1981; Janeway, 1997). Dessa forma, devido as suas propriedades biológicas, as lectinas estão atraindo muito interesse na pesquisa, sendo usadas como ferramentas nas áreas da pesquisa biológica, médicas, e biotecnológica. A aplicação das lectinas pode ser ampla e variada, como por exemplo, na investigação estrutural e funcional de carboidratos complexos, separação e caracterização de glicoproteínas, acompanhamento de mudanças na superfície celular durante processos fisiológicos e patológicos na diferenciação de células cancerígenas e na marcação de células sangüíneas e bactérias, dentre outras (Sharon & Lis, 1990).

2.1 Lectinas de Leguminosas

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 atualmente, 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 é a que possui a estrutura tridimensional mais bem estudada e tem sua interação por moléculas de carboidratos bem conhecida (Moreira *et al.*, 1991). Tal interação justifica seu uso nas áreas tecnológicas e de pesquisas de adsorção.

2.2 Concanavalina A

Concanavalina A (ConA) é uma lectina de leguminosa, obtida da *Canavalia ensiformis* (conhecida popularmente como feijão-de-porco) e inibida por α -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. Essa lectina foi isolada pela primeira vez em 1936 por Sumner e Howel (Goldstein *et al.*, 1977), sendo, até agora, 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, ligadas por ligações polares, pontes de hidrogênio e por interações eletrostáticas (Reeke *et al.*, 1975; Bouckaert *et al.*, 2000). A estrutura do monômero da Concanavalina A é globular e com dimensões de 42 Å x 40 Å x 39 Å. A ConA é constituída apenas de duas folhas β 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 (Ca^{2+} , Mg^{2+} , 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.3) 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.

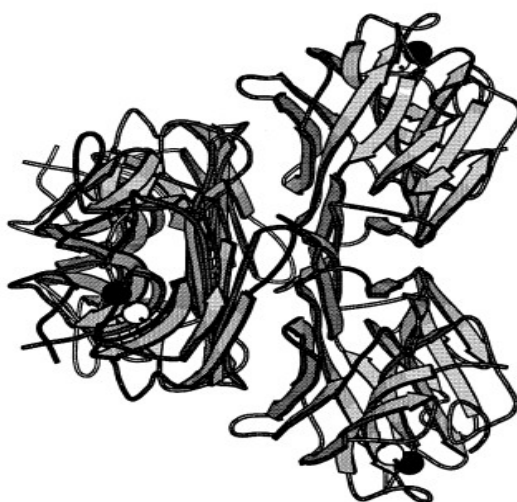


Figura 3. Tetrâmero de Concanavalina A (Loris *et al.*, 1998).

3. Biossensores

Os biossensores podem ser definidos como sensores químicos 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 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, liberação de gases, emissão ou absorção de luz, emissão de calor, variação de massa, mudança no estado de oxidação do analito, etc; e a segunda, converte a energia destes eventos numa forma mensurável, como variação de corrente, potencial, temperatura, entre 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) (Figura 4).

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 utilizado 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).

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 o emprego na agricultura (Velasco & Mottram, 2003) e no monitoramento e controles ambientais (Rogers, 2006), até diferentes segmentos industriais, especialmente nos ramos alimentícios e farmacêuticos (Janneway *et al.*, 1997; Ballerstadt *et al.*, 2006; Kappel *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).

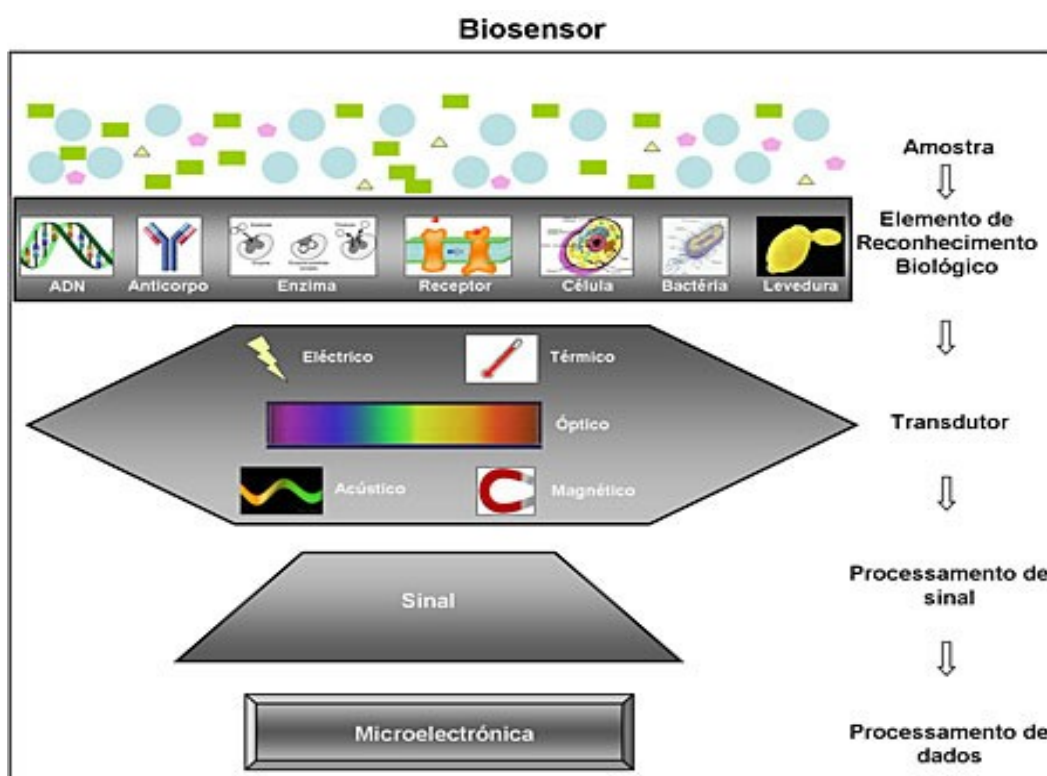


Figura 4. Componentes de um biossensor. (Disponível em <http://naturaLink.sapo.pt/article.aspx?menuid=6&cid=26399&bl=1&vicwall=true>)

4. 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 uma gama variada 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 oxido-redução das espécies analíticas de interesse num potencial aplicado específico; (ii) seletividade decorrente dos processos de oxido-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 (*surface plasmon resonance* - SPR) (Kim *et al.*, 2005), espectroscopia de impedância eletroquímica (*electrochemical impedance spectroscopy* - EIS) (Schweiss *et al.*, 2003), voltametria cíclica, microscopia de força

atômica (Stoica *et al.*, 2003), microbalança de cristal de quartzo (*quartz crystal microbalance* - QCM) (Pavey *et al.*, 2003), dentre outros.

4.1 Voltametria Cíclica

A voltametria é uma técnica eletroanalítica que se baseia nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície. A voltametria cíclica (VC) é a técnica mais comumente usada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos. A eficiência desta técnica resulta de sua habilidade de rapidamente fornecer informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos (Wang, 1994). Essa técnica é classificada como dinâmica, pois a cela eletroquímica é operada na presença de corrente elétrica ($i > 0$) que, por sua vez, é medida em função da aplicação controlada de um potencial (Skoog *et al.*, 2002). Assim, nessa técnica, as informações sobre o analito são obtidas por meio da mensuração da magnitude da corrente elétrica que surge no eletrodo de trabalho ao se aplicar um potencial entre um eletrodo de trabalho e um eletrodo auxiliar. O parâmetro ajustado é o potencial (E) e o parâmetro medido é a corrente resultante (i). O registro da corrente em função do potencial é denominado voltamograma e a magnitude da corrente obtida pela transferência de elétrons durante um processo de oxirredução, pode ser relacionada com a quantidade de analito presente na interface do eletrodo e conseqüentemente na cela eletroquímica (Skoog *et al.*, 2002).

Inicia-se a aplicação do potencial de um valor no qual nenhuma redução ocorre e com o aumento do potencial para regiões mais negativas (catódica) ocorre à redução do composto em solução, gerando um pico de corrente proporcional à concentração deste composto. Em adição, quando o potencial atingir um valor no qual nenhuma reação de redução ocorre, o potencial é varrido no sentido inverso até o valor inicial, e no caso de uma reação reversível, os produtos que tiverem sido gerados no sentido direto (e se localizam ainda próximos à superfície do eletrodo)

serão oxidados, gerando um pico simétrico ao pico da redução. O tipo de voltamograma gerado depende do tipo de mecanismo redox que o composto em questão sofre no eletrodo, o que faz da VC uma ferramenta valiosa para estudos mecanísticos.

Existem dois componentes principais que determinam as reações que ocorrem no eletrodo, existe a transferência difusional de massa do analito em solução para a superfície do eletrodo e a transferência heterogênea de carga entre o analito e o eletrodo, em alguns casos ainda pode ocorrer reações químicas acopladas a algum destes processos.

A forma de aplicação do potencial na voltametria cíclica está representada na Fig. 5, onde o potencial é varrido linearmente com o tempo no eletrodo de trabalho estacionário, em uma solução sem agitação, usando um potencial triangular. Dependendo da informação desejada, simples ou múltiplos ciclos podem ser utilizados. Durante a varredura do potencial, o potenciostato mede a corrente resultante desta corrente versus o potencial aplicado.

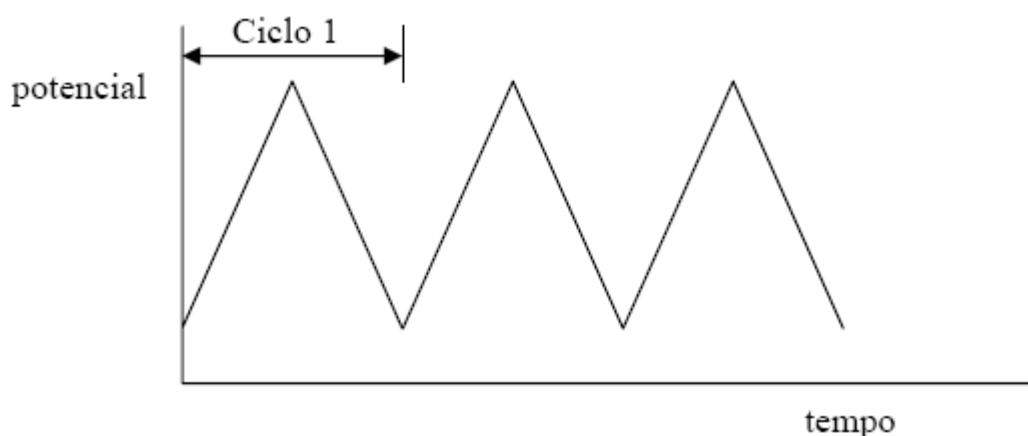


Figura 5. Forma de aplicação do potencial para VC: potencial com varredura linear

4.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (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 técnica de espectroscopia de impedância 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 (Dong *et al.*, 2001; Katz & Willner, 2003).

A técnica de EIE envolve a aplicação de uma perturbação de potencial ou de corrente no sistema sob 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 freqüência, pois a onda de potencial é senoidal. Uma vez que a perturbação no sistema sob investigação é de pequena amplitude é possível empregar a técnica para a análise de etapas de um mecanismo reacional (Bard & Faulkner, 1980; Sluyters-Rehbech, 1994).

Na EIS 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.

Objetivos

Objetivo Geral

- Avaliação da termodinâmica de interação LecMBL visando o desenvolvimento de um biossensor para açúcares.

Objetivos Específicos

- Adsorção de lipídios e sistemas mistos de LecMBL na superfície de eletrodos de ouro;
- Avaliação das características eletroquímicas dos filmes de lipídios e LecMBL em superfícies metálicas;
- Estudo das propriedades interfaciais da deposição de lipídios e LecMBL sobre superfície de eletrodo sólido (espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria cíclica);
- Determinação das correntes de pico anódicas e catódicas dos voltamogramas cíclicos;
- Utilização de técnicas de espectroscopia de impedância para caracterização da interação LecMBL e amostras de açúcares.

Metodologia

1. Materiais

A lectina Concanavalina A, glicoproteína ovoalbumina, glicose, glicogênio e fosfatidilcolina de soja (Epikuron – EP) todos com 99% de pureza foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). A água para o preparo das soluções foi ultrapura sendo obtida do equipamento MilliQ Plus (EUA). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico com elevado grau de pureza. Os eletrodos de ouro (Au), contra-eletrodo de platina e de referência foram adquiridos da Autolab (Holanda).

2. Metodologia

2.1 Preparação das MBLs e Imobilização de Con A

Inicialmente, o eletrodo de ouro foi polido em lixa e depois sobre feltro com uma suspensão de alumina com granulação de 0,5µm e colocado sob sonicação por 2 minutos em água deionizada. Em seguida, o eletrodo foi seco e uma alíquota de 5µL da solução do lipídio EP (1mg/ml) dissolvido em clorofórmio foi depositada na superfície do eletrodo. Posteriormente, o eletrodo foi imerso numa solução de tampão fosfato de sódio (TFS) pH 7,0 contendo Con A (500µg/ml) por 10 minutos, permitindo a sua adsorção na camada auto-montada de lipídio.

O sistema Au-Ep-ConA foi utilizado para detecção dos açúcares glicose (monossacarídeo) na concentração de 200µg/ml, glicogênio (polissacarídeo) e ovoalbumina (glicoproteína) nas concentrações de 100µg/ml.

O sistema ainda foi utilizado na detecção da glicoproteína ovoalbumina nas concentrações de 50µg/ml, 100µg/ml e 150µg/ml com o objetivo de avaliar a viabilidade e sensibilidade do sistema desenvolvido.

2.2 Medidas de impedância eletroquímica e voltametria cíclica

Os experimentos de EIE e VC foram realizados no potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT302N (Holanda) com interface com um analisador lock-in numa célula convencional de três eletrodos (Fig. 6). O eletrodo de trabalho utilizado foi o de ouro modificado com a lectina, o eletrodo de platina como contra eletrodo e o de referência foi o Ag/AgCl saturado com KCl.

As medidas de impedância eletroquímica foram realizadas em solução de ferro-ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$) (1:1), numa faixa de frequência entre 100 mHz a 100 KHz com um potencial de amplitude alternada de 10 mV (Oliveira *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008).

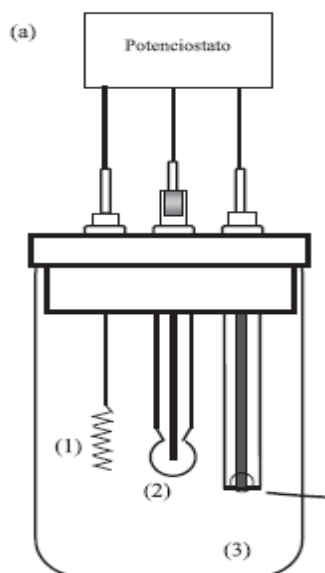


Figura 6. Representação de cela eletroquímica utilizada nos experimentos de EIE e VC. 1) eletrodo auxiliar, 2) eletrodo de referência e 3) eletrodo de trabalho.

Os experimentos de VC foram realizados após cada etapa da montagem do eletrodo na presença de uma solução de 10 mM de $(K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6])$ (1:1) como indicador redox em NaCl (Oliveira *et al.*, 2008). A partir destes experimentos foram obtidas as correntes de pico anódicas, catódicas e as áreas de cada voltamograma cíclico.

Resultados e Discussões

Na análise dos parâmetros físico-químicos da interação da lectina a MBL (LecMBL) na superfície de eletrodo de ouro foram utilizadas duas técnicas: a Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) e a Voltametria Cíclica (VC).

1. Caracterização eletroquímica

Nas medidas de VC e EIE podem-se obter informações referentes à modificação da superfície do eletrodo de trabalho após adsorção do sistema Au-MBL-Lectina (Au-Ep-ConA) e, conseqüentemente, da sensibilidade do sistema.

1.1 Determinação do tempo de incubação na solução de ConA

Uma análise prévia de parâmetros necessários para utilização do biossensor Au-Ep foi realizada com o objetivo de estabelecer as melhores condições para se trabalhar com a lectina ConA.

Inicialmente, durante a montagem do sistema houve a necessidade da determinação do tempo de incubação na solução de tampão fosfato contendo a lectina ConA para avaliar qual o tempo necessário para permitir a sua máxima adsorção na camada automontada do lipídio. Foram testados os tempos de 5, 10 e 15 min, onde podemos observar que houve adsorção de ConA nos tempos pré-determinados (Fig.7). Desta forma, houve uma diminuição dos picos anódicos e catódicos da VC, sendo que esta diminuição apresenta um comportamento linear de adsorção indicando que quanto maior o tempo maior será a concentração do material depositado sobre o eletrodo (Oliveira, 2008).

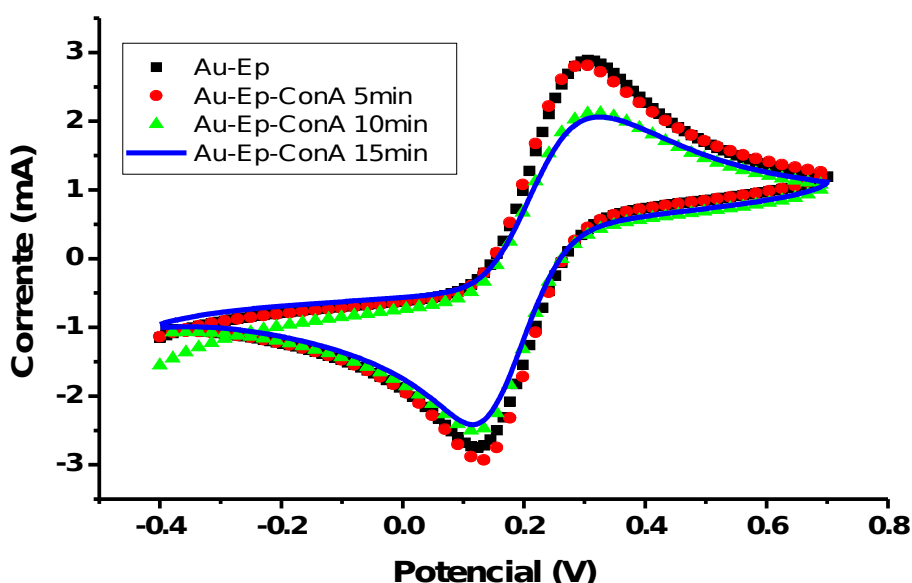


Figura 7. Voltamogramas cíclicos do tempo de incubação do sistema Au-Ep-ConA em solução de 10mM de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ em TFS pH 7,4 com velocidade de varredura de 50mV/s.

De acordo com os resultados obtidos, selecionamos o tempo de 10 min porque houve saturação na resposta e, desta forma, não há a necessidade de tempos superiores a este.

1.2 Avaliação da atividade biológica da ConA

Para avaliarmos a bioatividade da lectina, o sistema Au-Ep-ConA foi testado com soluções contendo uma glicoproteína isolada de ovo, a ovoalbumina, que sendo uma glicoproteína possui resíduos sacarídicos permitindo que a lectina interaja. Além disso, testamos um polissacarídeo (glicogênio) e um monossacarídeo (glicose). Em adição, a ConA exibe elevada afinidade para α -D-glicose, α -D-manose (Sumner *et al.*, 1935), glicogênio e ovoalbumina (Correia *et al.*, 1995). Essa lectina

reconhece monossacarídeos e glicoproteínas que são inibidores da aglutinação dos eritrócitos (Correia *et al.*, 1995; Sharon, 1998).

Ao avaliar a bioatividade de Con A no sistema Au-Ep, verificamos que o sistema foi capaz de interagir especificamente com a glicoproteína ovoalbumina em faixas de concentrações que variam de 50-150 μ g/mL.

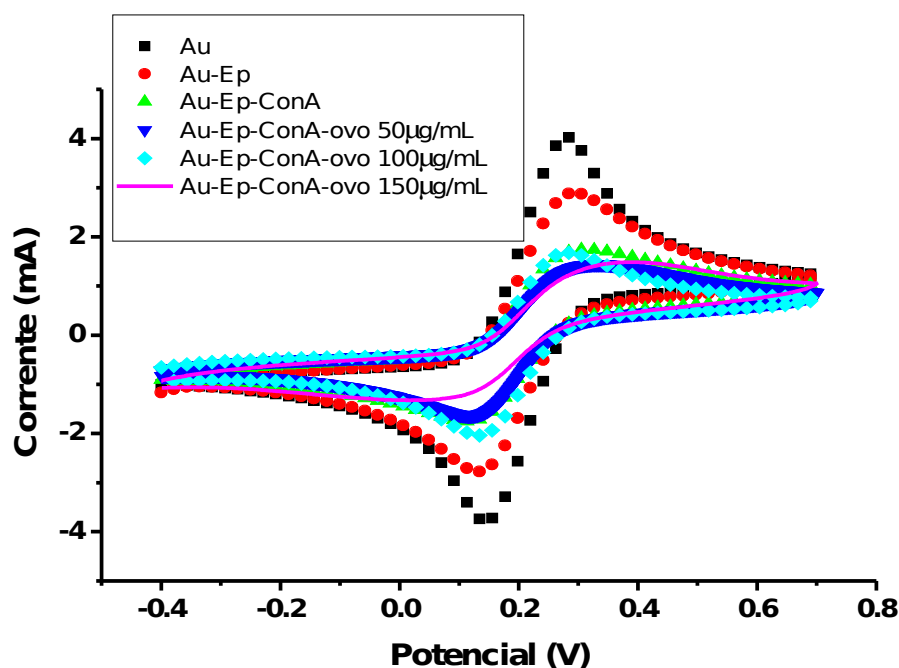


Figura 8. Voltamogramas cíclicos do efeito da concentração de ovoalbumina no sistema Au-Lectina-MBL (Au-Ep-ConA) em solução de 10mM de $K_3[Fe(CN)_6]$ / $K_4[Fe(CN)_6]$ em TFS pH 7,4 com velocidade de varredura de 50mV/s.

As lectinas reconhecem uma fração da ovoalbumina que contém resíduos de Man7 e Man8 nas cadeias oligo-manose (Mandal *et al.*, 1994). Os resultados presentes na Fig. 8 mostram claramente que a ConA foi capaz de reconhecer a glicoproteína ovoalbumina, que pode ser observado pela diminuição da resposta amperométrica do sistema, demonstrando a retenção da bioatividade da lectina; e fornecem parâmetros para utilização desse sistema para detecção da presença e/ou

concentração de ovoalbumina nos alimentos, já que essa proteína está bastante envolvida em processos de alergias alimentares (Castello *et al.*, 2004).

As lectinas podem se ligar a moléculas de carboidratos contidas em glicoconjugados celulares, estando associadas a uma variedade de respostas biológicas como atividade mitogênica e processos de transdução de sinal (Loris *et al.*, 1998). Dessa forma, o estudo da interação proteína-carboidrato é de grande importância para mapear as propriedades da superfície celular. Em adição, o estudo da interação de ConA com glicose, glicogênio e ovoalbumina propicia uma melhor compreensão desta interação.

Podemos evidenciar que a lectina ConA (Fig. 9) reteve sua atividade biológica uma vez que houve interação da ConA aos açúcares ovoalbumina, glicose e glicogênio. Após o contato do sistema Au-Ep-ConA à ovoalbumina foi observado uma diminuição na resposta amperométrica do sistema, sendo evidenciado pela diminuição das correntes de pico anódico e catódico do voltamograma. No entanto, para a glicose e glicogênio foi observado um aumento da resposta amperométrica do sistema, o que refere reconhecimento distinto para os diferentes tipos de açúcares testados.

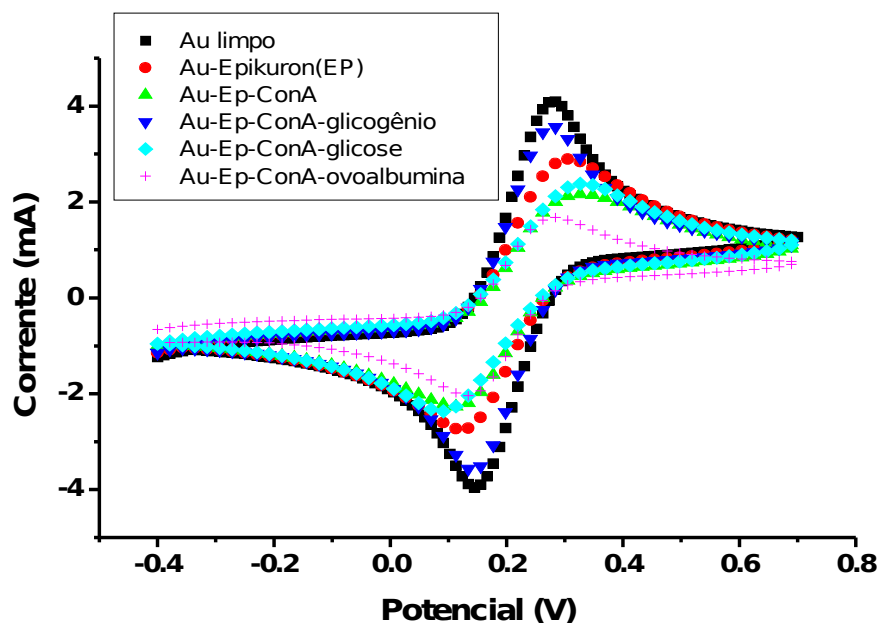


Figura 9. Voltamogramas cíclicos da interação de Con A com diferentes açúcares em solução de 10mM de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ em TFS pH 7,4 com velocidade de varredura de 50mV/s.

A espectroscopia de impedância é um método eficaz para explorar as características da superfície modificada do eletrodo (Hall *et al.*, 1995; Ren e Pickup, 1997). Na EIE o diâmetro do semicírculo é igual à resistência de transferência de elétrons. Esta resistência controla a cinética de transferência do par redox na interface do eletrodo (Oliveira, 2008). Dessa forma, ao avaliarmos as respostas impedanciométricas (Fig. 10) do sistema Au-Ep-ConA frente ao monossacarídeo glicose, ao polissacarídeo glicogênio e a glicoproteína ovoalbumina, foi observado um aumento do diâmetro do semicírculo quando a lectina interagiu com a ovoalbumina. No entanto, para as respostas com glicose e glicogênio foi verificada uma redução no diâmetro do semicírculo para ambas. Em adição, pode-se observar um aumento no Zre quando se tem o biossensor em contato com a ovoalbumina, indicando boa seletividade de ConA para essa glicoproteína.

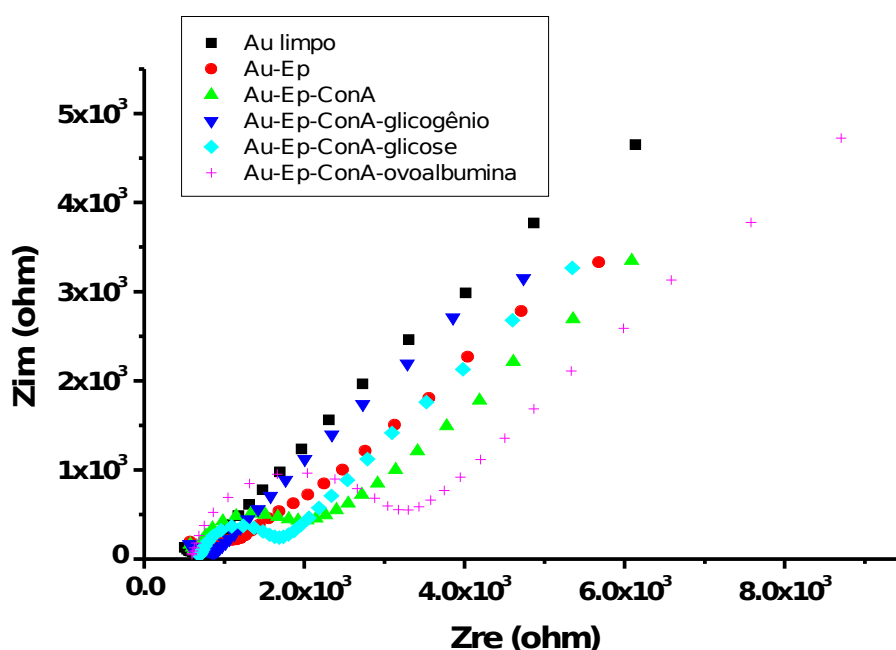


Figura 10. Impedância eletroquímica da interação de Con A com diferentes açúcares em solução de 10mM de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ em TFS pH 7,4.

Dessa forma, a resposta impedanciométrica do biossensor Au-EP-ConA foi modificada quando em contato com os ligantes ovoalbumina, glicose e glicogênio,

onde para a ovoalbumina houve um aumento do Zre (evidenciado pelo aumento do semicírculo), enquanto para glicose e glicogênio houve queda do Zre (evidenciado pela diminuição do semicírculo), o que demonstra a possibilidade do sistema em reconhecer diferentes tipos de carboidratos. Estes resultados estão de acordo com os voltamogramas apresentados na Fig. 9, obtendo-se uma maior resistência à transferência de elétrons na interface eletrodo-solução devido à interação entre a lectina e a glicoproteína.

Diante do exposto, observamos que as medidas de VC e impedância realizadas no processo de montagem do biossensor Au-EP-ConA e consequente aplicação do sistema para detecção de açúcares, mostraram informações relativas às reações de transferência de elétrons entre o eletrodo e os íons presentes na solução. Quando as lectinas interagem com açúcares ocorre uma maior alteração na interface (Oliveira, 2008), a qual foi evidenciada pelo aumento nos valores da resistência à transferência de carga e queda da resposta amperométrica do sistema quando ConA interagiu com ovoalbumina.

Através dos dados observados, podemos verificar que ConA manteve sua atividade biológica durante o processo de automontagem do biossensor, o que demonstra a possibilidade de se trabalhar com o sistema de membrana de bicamada lipídica (s-MBL) para o desenvolvimento de um biossensor. Outros estudos mostraram que proteínas como a horseradish peroxidase (HRP) mantiveram-se ativas quando em contato com o s-MBL, demonstrando que esse sistema fornece um ambiente biológico favorável para as proteínas que mantenham suas funções e conservem suas estruturas nativas (Wu *et al.*, 2001).

Conclusões

A lectina ConA adsorveu na camada automontada de lipídio sobre eletrodo de ouro formando o sistema lectina-MBL. O processo de adsorção da lectina sobre a MBL está associado ao bloqueio que o sistema provoca alterando a reação de transferência de elétrons da solução de ferro-ferricianeto de potássio.

As análises de espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria cíclica demonstraram bloqueio da superfície do eletrodo à presença do sistema Au-Ep-ConA.

Verificou-se a sensibilidade do sistema frente a diferentes carboidratos tais como, monossacarídeo (glicose), polissacarídeo (glicogênio) e a glicoproteína (ovoalbumina). O sistema apresentou diferentes respostas para cada carboidrato, mostrando-se mais sensível à ovoalbumina através do aumento da resistência à transferência de elétrons e diminuição da resposta amperométrica.

O biossensor Ep-ConA apresentou boa resposta eletroquímica e estabilidade devido à presença do s-MBL. Como um modelo de membrana biológica, s-MBL poderia fornecer um ambiente biológico favorável para a lectina manter sua atividade biológica de reconhecimento a carboidratos. Assim, s-BLM é uma escolha ideal para imobilizar proteínas para o desenvolvimento de novas classes de biossensores eletroquímicos para detecção de glicoproteínas e açúcares.

Apoio Financeiro

Bolsa de Iniciação Científica da FACEPE.

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.

ALBERTS, BRUCE. **Biologia molecular da célula** / Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts e Peter Walter; tradução Ana Beatriz Gorini da Veiga et al. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, p. 583.

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

ALVES, V. A.; DA SILVA, L. A.; BOODTS, J. F. C. Electrochemical impedance spectroscopic study of dimensionally stable anode corrosion. **J. Appl. Electrochem**, v. 28, p. 899-905, 1998.

ANDRADE, C.A.S., BASZKIN, A., SANTOS-MAGALHÃES, N.S., COELHO, L.C.B.B., DE MELO, C.P. Mixed monolayers of *Bauhinia monandra* and Concanavalin A lectins with phospholipids, part II. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 289, p. 379-385, 2005.

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.

BHATIA, R. B.; BRINKER, C. J.; GUPTA, A. K.; SINGH, A. K. Aqueous Sol-Gel Process for Protein Encapsulation. **Chem. Mater.**, v.12, p. 2434, 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 TiO₂ Nanoporous in Ag. **J. Phys. Chem. 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.

BUENO, P. R.; LEITE, E. R.; GIRALDI, T. R.; BULHÕES, L. O. S.; LONGO, E. Nanostructure Li ion insertion electrodes. 2. Tin dioxide nanocrystalline layers and discussion on nanoscale effect. **J. Phys. Chem. B**. v. 107, p. 8878-8883, 2003.

CASTELLO, M. A.; HEVIA, X.; GÓMEZ, I. M.; CASTRO, A. R.; RODRÍGUEZ, C. J. Algunas consideraciones sobre las reacciones adversas por alimentos. **Revista Cubana de Medicina Geral Integral**, v. 20, p. 5-6, 2004.

CHANDRA, N.; PRABU, M. M.; SUGUNA, K.; VIJAYAN, M. Structural similarity and functional diversity in proteins containing the legume lectin fold. **Prot. 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.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1 form of *Cratylia mollis* Mart (Camaratu Bean). **B. Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 55, p. 261, 1995.

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, n. 6, 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. **J. Braz. Chem. Soc.** 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 Mol. Biol.**, v. 22, p. 1187-1190, 1993.

DE OLIVEIRA, H.P., ANDRADE, C.A.S., DE MELO, C.P. Electrical impedance spectroscopy investigation of surfactant-magnetite-polypyrrole-particles. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 319, p. 441-449, 2008.

DE OLIVEIRA, H.P., ANDRADE, C.A.S., DE MELO, C.P. Optical and dielectric properties of polypyrrole nanoparticles in a polyvinylalcohol matrix. **Synthetic Metals**. v. 155, p. 631-634, 2005.

DONG, S., LUO, G., FENG, J., LI, Q.W., GAO, H. Imunoassay 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.

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 desnuration of proteins: intermediates and unfolded states. **Biochemistry**, v. 33, p. 12504-12511, 1994.

FUJIWARA, H.; TOYOSHIMA, Y.; KONDO, M.; MATSUDA, ^a Application of real-time in situ spectroscopic ellipsometry and infraed spectroscopy for characterizing interface structure of a-Si:H layer. **Sol. Energy Mater. Sol. 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**. p. 14. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2008.

GOLDSTEIN, I. J.; MURPHY, L. A.; EBISU, S. Lectins as carbohydrate-binding proteins. **Pure & Appl. Chem.**, v. 49, p. 1095-1103, 1997.

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

HALL, E. A. H.; SKINNER, N. G.; JUNG, C.; SZUNERITS, S. Investigating polymers and conducting metals as transduction mediators or immobilization matrices. **Electroanalysis**, v. 7, p.830-837, 1995.

HEYWOOD, V. H. **The leguminosae – a sistematic 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.

HULANICKI, A.; GLAB, S.; INGMAN, F. Chemical Sensors: Definitions and Classification. **Pure Appl. Chem.** v. 63, p. 1247-1250, 1991.

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

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

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

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.

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

KIM, S. H.; CHOI, S. W.; SUH, H. J.; JIN, S. H.; GAL, Y. S.; KOH, K.; **Dyes Pigm.** v. 55, p. 17, 2002.

LASIA, A.; J. Impedance of Prous-Electrodes. **Electroanal. Chem.** v. 397, p. 27-33, 1995.

LASIA, A.; J. Nature of the two semi-circles observad on the complex plane plots on porous electrodes in the presence of a concentration gradient. **Electroanal. Chem.** v. 500, p. 30-35, 2001.

LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L., COX, M.M. **Lehninger principles of biochemistry.** 4th ed.; W.H. Freeman: New York, 2005.

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.

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

LIUA, N., GAO, Z., ZHOU, H.Y., YUE, M. **Biosensors & Bioelectronics.** v. 22, n. 9, p. 2371, 2007.

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

MACDONALD, J. R. Impedance Spectroscopy. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 20, p. 289-305, 1992.

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

MANDAL, D. K.; KISHORE, N.; BREWER, C. F. **Biochemistry**, v. 33, p. 1149, 1994.

MOREIRA, R. A.; AINOUEZ, 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.

MULCHANDANI, A.; BASSI, A. S. **Crit. Rev. Biotechnol.** v. 15, p. 105, 1995.

NAUMOWICZA, M., PETELSKAA, A.D., FIGASZEWSKI, Z.A. **Electrochimica Acta**. v. 50, n. 10, p. 2155, 2005.

OLIVEIRA, M.D.L., ANDRADE, C.A.S., DE OLIVEIRA, H.P., DE MELO, C.P. **Determinação do ponto isoelétrico de proteínas a partir do uso de diagramas de relaxação dielétrica**. PI 0602995-7, 2006.

OLIVEIRA, M.D.L., CORREIA, M.T.S., COELHO, L.C.B.B., DINIZ, F.B. Electrochemical evaluation of lectin-sugar interaction on gold electrode modified with colloidal gold and polyvinyl butyral. **Colloids and Surfaces B. Biointerfaces**. v. 66, p. 13-19, 2008.

OLIVEIRA, M. D. L. **Estudo bioeletroquímico de nanosistemas híbridos de nanopartículas de ouro e lectinas para o desenvolvimento de sensores**. Recife, 2008. 174 pgs. Tese de Doutorado – Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco.

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.

PACHECO, W. F. **Desenvolvimento e comparação de métodos voltamétricos para a determinação de ciclofenil e primaquina em medicamentos em urina**. Rio de Janeiro, 2004. 111 pgs. Dissertação de Mestrado – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

PAVEY, K. D.; HUNTER, A. C.; PAUL, F.; **Biosens. Bioelectron.** v. 18, p. 1349, 2003.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T.; **Química Nova**, v. 25, p. 1012, 2002.

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.

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

REN, X.; PICKUP, P. G. An impedance study of electron transport and electron transfer in composite polypyrrole + polystyrene-sulphonate films. **J. Electroanal. Chem.**, v. 420, p. 251-257, 1997.

ROGERS, K. R. Recent advances in biosensor techniques for environmental monitoring. **Analytica Chimica Acta**, v. 568, n. 1-2, p. 222-231, 2006.

SANTOS, A. D.; GORTON, L.; KUBOTA, L. T. **Electrochim. Acta**, v. 47, p. 3351, 2002.

SCHAEFFER, H.E., BREITFELLER, J.M., KROHN, D.L. **Visual Science**. v. 23, p. 530, 1982.

SCHWEISS, R.; WERNER, C.; KNOLL, W.; **J. Electroanal. Chem.** v. 540, p. 145, 2003.

SHARON, N., LIS, H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. **Science**, Washington DC, v. 177, n. 53, p. 949-959, 1972.

SHARON, N.; LIS, H. **The FASEB Journal**. v. 4, n. 14, p. 3198-3208, 1990.

SHARON, N. Lectins: From obscurity into the limelight. **Protein Science**, v. 7, p. 2042-2048, 1998.

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.

SKOOG, A. D.; HOLLER F. J.; NIEMAN T. A.; **Princípios de análise instrumental**. 5a Edição, Porto Alegre, Bookman, 2002.

SLUYTERS-REHBECH, M.; **Pure Appl. Chem.** v. 66, p. 1931, 1994.

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.; **Mater. Sci. Eng. B.** v. 101, p. 222, 2003.

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

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

TIEN, H.T. **Bilayer lipid membranes (BLM): Theory and practice**. Marcell Dekker, New York, 1974.

TIEN, H.T. **Progress in Surface Science**. v. 30, p. 1, 1989.

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

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

VIJAYAN, M.; CHANDRA, N.; Lectins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, p. 707-714, 1999.

WANG, J. **Anal. Electrochem**. VCH publishers: New York, 1994.

WENNERSTROM, H. IN: BASZKIN, A., NORDE W. (Eds.), **Interfacial Interactions in Physical Chemistry of Biological Interfaces**, Dekker, New York, 2000.

WU,Z.; WANG, B.; CHENG, Z.; YANG, X.; DONG, S.; WANG, E. A facile approach to immobilize protein for biosensor: self-assembled supported bilayer lipid membranes on glassy carbon electrode. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 16, p. 47-52, 2001.