



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**Centro de Ciências Exatas e da Natureza**  
**Departamento de Química Fundamental**  
**Programa de Pós-Graduação em Química**

## **Tese de Doutorado**

**Estudo bioeletroquímico de nanosistemas  
híbridos de nanopartículas de ouro e lectinas  
para o desenvolvimento de sensores**

**Maria Danielly Lima de Oliveira**

**Recife-PE Brasil**

**Dezembro / 2008**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

# **Estudo bioeletroquímico de nanosistemas híbridos de nanopartículas de ouro e lectinas para o desenvolvimento de sensores**

**Maria Danielly Lima de Oliveira**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFPE como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química.

**Orientador: Prof. Dr. Flamarion Borges Diniz**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia**

**Recife-PE Brasil**

**Dezembro / 2008**

Oliveira, Maria Danielly Lima de

Estudo bioeletroquímico de nanosistemas híbridos de nanopartículas de ouro e lectinas para o desenvolvimento de sensores / Maria Danielly Lima de Oliveira. – Recife : O Autor, 2008.

xvi, 174 folhas : fig., tab.

Tese(doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Química Fundamental, 2008.

Inclui bibliografia.

1.Físico-química. 2.Biossensores. 3.Lectinas. 4. Nanopartículas. I. Título.

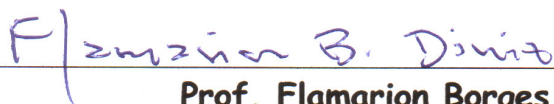
541.3

CDD (22.ed.)

FQ 2009-003

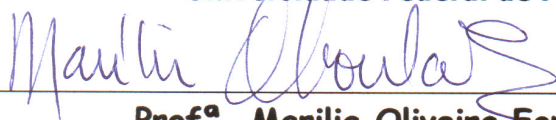
Tese submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutor em Química.

Aprovada:



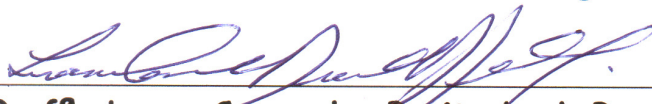
**Prof. Flamarion Borges Diniz**  
(Orientador)

Departamento de Química Fundamental  
Universidade Federal de Pernambuco



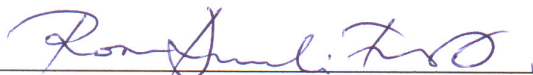
**Prof<sup>a</sup>. Marília Oliveira Fonseca Goulart**

Instituto de Química e Biotecnologia  
Universidade Federal de Alagoas



**Prof<sup>a</sup>. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho**

Departamento de Bioquímica  
Universidade Federal de Pernambuco



**Prof<sup>a</sup>. Rosa Amália Fireman Dutra**

Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade de Pernambuco



**Prof<sup>a</sup>. Madalena Carneiro da Cunha Areias**

Departamento de Química Fundamental  
Universidade Federal de Pernambuco

*"Estudo Bioeletroquímico de nanossistemas híbridos de nanopartículas de ouro e lectinas para o desenvolvimento de sensores".*

por

**Maria Danielly Lima de Oliveira**

Departamento de Química Fundamental  
Centro de Ciências Exatas e da Natureza  
Universidade Federal de Pernambuco  
Recife-PE-Brasil  
18 de Dezembro de 2008



**Dedicatória,**

*Aos meus pais, Miriam e Benedito e irmão Daniel por todo amor e carinho...*

*Ao meu César pelo amor, companheirismo e incentivo...*

*...dedico.*

## AGRADECIMENTOS

- A Deus por ter me dado forças para suportar os empecilhos encontrados nesta caminhada e por iluminar a minha vida;
- Ao Prof. Dr. Flamarion Borges Diniz, pela confiança, dedicação e estímulo, que com profissionalismo e amizade ensinou-me a enfrentar os desafios e a procurar soluções para a realização deste trabalho;
- À Prof. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia, pela co-orientação desta tese, apoio, otimismo e confiança dispensados desde o início da minha carreira científica;
- Aos amigos do laboratório, Gilvaldo, Rômulo, Kléber, Thatiana, Gilson, Daniele Cabral e Thiago que foram companheiros, solidários e pacientes nessa fase de aprendizado e estudo;
- Aos amigos do laboratório de eletrossíntese orgânica pelo apoio estrutural para a finalização desta;
- A todos os funcionários do Deptº de Química Fundamental, em especial, Maurílio e Patrícia, que me acolheram e forneceram subsídios para o andamento desta;
- Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Muito Obrigada!

# SUMÁRIO

	<b>Página</b>
Sumário	i
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	xii
Lista de abreviaturas	xiii
Resumo	xv
Abstract	xvi

## *Capítulo I*

<b>1. Lectinas</b>	3
1.1.1 Denominação e definição	3
1.1.2 Propriedades biológicas	6
1.1.3 Características estruturais e classificação	8
1.1.4 Mecanismo de ação	9
<b>1.2 Dengue</b>	10
1.2.1 Manifestações sorológicas da Dengue	14
1.2.2 Diagnóstico da Dengue	16
<b>1.3 Interface eletroquímica</b>	18
1.3.1 Processos que ocorrem no eletrodo	18
1.3.2 Capacitância e carga de um eletrodo	19
1.3.3 Dupla camada elétrica	20
1.3.4 Potencial Zeta	21
1.3.5 Fatores que afetam a taxa de reação do eletrodo	23
<b>1.4 Modificação de superfícies eletroquímicas</b>	24
1.4.1 Nanopartículas	24
1.4.2 Uso de Nanopartículas	26
1.4.3 Adsorção de proteínas sobre superfícies	27
1.4.4 Superfícies quimicamente modificadas	29
<b>1.5 Construção de Biossensores</b>	31
<b>1.6 Técnicas de caracterização eletroquímica</b>	36
1.6.1 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)	36
1.6.2 Impedância em circuitos elétricos	41
1.6.3 Voltametria cíclica	47
<b>1.7 Microscopia de força atômica (AFM)</b>	51
<b>1.8 Microscopias eletrônicas de varredura e de transmissão</b>	52
<b>1.9 Objetivos</b>	55

## *Capítulo II*

<b>2.1 Materiais e Métodos</b>	57
2.1.1 Materiais e reagentes	57
2.1.2 Preparo do ouro coloidal	57
2.1.3 Imobilização de Con A e CramoLL	58
2.1.4 Bioreconhecimento de glicoproteínas do soro de pacientes contaminados com Dengue	58
2.1.5 Medidas de espectroscopia na região do UV-visível	59
2.1.6 Medidas de espectroscopia de fluorescência	59
2.1.7 Medidas de tamanho de partícula e potencial zeta ( $\zeta$ )	60
2.1.8 Caracterização por microscopia de varredura eletrônica	

(MEV), microscopia de força atômica (MFA) e microscopia eletrônica de transmissão	61
2.1.9 Medidas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância	61
<i>Capítulo III</i>	
<b>3.1 Resultados e Discussão</b>	64
3.1.1 Caracterização do sistema coloidal nanoAu-ConA e nanoAu-ConA-PVB	65
<b>3.2 Caracterização eletroquímica</b>	75
<b>3.3 Avaliação da atividade biológica da Con A em eletrodos de platina modificados</b>	87
<b>3.4 Avaliação da atividade biológica da Con A e CramoLL em eletrodos de ouro modificados</b>	95
<b>3.5 Avaliação da atividade biológica de Con A frente aos soros humanos contaminados com febre da Dengue e febre hemorrágica da Dengue</b>	128
<i>Capítulo IV</i>	
<b>4. Conclusões</b>	159
<i>Capítulo V</i>	
<b>5. Referências Bibliográficas</b>	163
<i>Apêndice</i>	
<b>Atividades de pesquisa</b>	173

## LISTA DE FIGURAS

Página

### CAPÍTULO I

- Figura 1.** Fotografia do feijão Camaratu. 5
- Figura 2.** Modelo de monômero de Cra Iso-1 (azul) e Con A (amarelo) (<http://webenligne.cermav.cnrs.fr/lectines/>). 6
- Figura 3.** Imagem do mosquito *Aedes aegypti*. Disponível em: [www.ipueiras.ce.gov.br](http://www.ipueiras.ce.gov.br). 11
- Figura 4.** Ciclo de contágio com o vírus da Dengue (Disponível em: [www.secom.unb.br](http://www.secom.unb.br)). 12
- Figura 5.** Interface metal-solução como um capacitor com uma carga negativa (a) e (b) positiva sobre o metal. 20
- Figura 6.** Modelo da dupla camada elétrica (Electric Double Layer, [www.chemistry.nmsu.edu/.../double\\_layer.html](http://www.chemistry.nmsu.edu/.../double_layer.html)). 22
- Figura 7.** Representação esquemática de um biossensor eletroquímico. 31
- Figura 8.** Métodos de imobilização de biomoléculas. B: biomolécula. 32
- Figura 9.** Célula eletroanalítica típica de três eletrodos para uso em EIE (a): (1) eletrodo auxiliar, (2) eletrodo de referência e (3) eletrodo de trabalho diagrama de esquemático de um circuito de Randles superimposto à interface eletrodo/eletrólito (b), diagrama de impedância (diagrama de Nyquist) referente ao circuito equivalente apresentado na figura (c) e diagrama de Bode correspondente ao diagrama de Nyquist apresentado (d). 38
- Figura 10.** Circuitos elétricos equivalentes para interface eletrodo/solução e correspondentes curvas de corrente-potencial ( $i - \Delta E$ ): altamente polarizável (a), reversível (b) e intermediário (c) (de Carvalho et al. 2006). 42
- Figura 11.** Circuito equivalente de Randles para uma interface eletrodo-solução 44
- Figura 12.** Resposta do circuito de Randles idealizada no plano de impedância complexa 45
- Figura 13.** Formas de aplicação do potencial para a voltametria cíclica: a) potencial com varredura linear e b) potencial do tipo escada. ([www.maxwell.lambda.ele.puc-rio.br/cgi-bin/PRG\\_0599.EXE/5180\\_2.PDF](http://www.maxwell.lambda.ele.puc-rio.br/cgi-bin/PRG_0599.EXE/5180_2.PDF))

NrOcoSis=13343&CdLinPrg=pt).	50
<b>Figura 14.</b> Projeção de várias espécies microestruturais contidas em uma lâmina fina	54
<b><i>CAPÍTULO II</i></b>	
<b>Figura 15.</b> - Representação da modificação do eletrodo de trabalho.	58
<b>Figura 16.</b> Representação da cela eletroquímica utilizada nos experimentos. 1) Eletrodo auxiliar, 2) Eletrodo de referência e 3) Eletrodo de trabalho.	61
<b><i>CAPÍTULO III</i></b>	
<b>Figura 17.</b> Espectro de UV-visível-NIR das nanopartículas de Au puras e com lectina ConA.	66
<b>Figura 18.</b> Espectro de fluorescência de ConA no seu estado nativo e do sistema nanopartícula de Au-ConA.	67
<b>Figura 19.</b> Distribuição de tamanho de partículas do colóide de ouro em função do volume (a), em função da intensidade (b), distribuição do sistema nanoAu-conA em função do volume (c) e da intensidade (d).	69
<b>Figura 20.</b> Medida do potencial zeta de solução da lectina Con A (amostra 1), do colóide de ouro (amostra 2) e do sistema nanoAu-conA (amostra 3).	71
<b>Figura 21.</b> Micrografias de microscopia de varredura de nanoAu-conA (a), PVB (b), nanoAu-PVB (c), nanoAu-Con A-PVB (d) e maior aumento de nanoAu-Con A-PVB (e).	72
<b>Figura 22.</b> Representação da formação do compósito polivinilbutiral-nanopartícula de Au-ConA adsorvido na superfície do eletrodo.	74
<b>Figura 23.</b> Imagens de microscopia de força atômica de nanoAu-ConA. a) presença de nanopartículas isoladas e em aglomerados, b) visualização de uma nanopartícula de ouro isolada.	75
<b>Figura 24.</b> Avaliação do tempo de incubação de nanoAu-Con A-PVB em solução ferro/ferricianeto (em TFS 10mM em H <sub>2</sub> O pH 7,4). a) Voltamogramas cíclicos (velocidade de varredura foi de 50 mV.s <sup>-1</sup> e E <sub>0</sub> = 0,1V, E <sub>1</sub> = 0,7 V e E <sub>2</sub> = - 0,2V), b) diagramas de Nyquist. ● Tempo de 10 min; ■ Tempo de 20 min; ▲ Tempo de 30 min.	77

- Figura 25.** Diagrama de Nyquist da avaliação do efeito da concentração de Con A, em solução ferro/ferricianeto (em TFS 10mM em H<sub>2</sub>O pH 7,4). a) ■ Eletrodo Pt limpo; ■ Con A 25 µg/mL; ■ Con A 50 µg/mL; ■ Con A 100 µg/mL; ■ Con A 200 µg/mL, b) Valor de Zre em função da concentração. 78
- Figura 26.** Diagrama de Nyquist da avaliação do efeito da concentração de ConA no sistema com PVB, em solução ferro/ferricianeto (em TFS 10mM em H<sub>2</sub>O pH 7,4). a) ■ Eletrodo Pt limpo; ■ ConA 25 µg/mL; ■ ConA 50 µg/mL; ■ ConA 100 µg/mL; ■ ConA 200 µg/mL; b) Valor de Zre em função da concentração. 79
- Figura 27.** Correntes de pico dos voltamogramas cíclicos do sistema nanoAu-ConA em solução ferro/ferricianeto (TFS 10mM em H<sub>2</sub>O pH 7,4). ■ Corrente de pico catódico ( $i_{p_{cat}}$ ); ○ Corrente de pico anódico ( $i_{p_{an}}$ ). 81
- Figura 28.** Correntes de pico dos voltamogramas cíclicos do sistema nanoAu-ConA-PVB em solução ferro/ferricianeto (TFS 10mM em H<sub>2</sub>O pH 7,4). ■ Corrente de pico catódico ( $i_{p_{cat}}$ ); ○ Corrente de pico anódico ( $i_{p_{an}}$ ). 82
- Figura 29.** Influência do pH sobre a adsorção da lectina Con A (200 µg/mL). 83
- Figura 30.** Comportamento das correntes de pico dos voltamogramas cíclicos obtidos para avaliação da adsorção de Con A em diferentes pH. 86
- Figura 31.** Voltamogramas dos diferentes eletrodos em solução ferro/ferricianeto (em TFS 10mM em H<sub>2</sub>O pH 7,4), Velocidade de varredura foi de 50 mV.s<sup>-1</sup> e  $E_0 = 0,1V$ ,  $E_1 = 0,7 V$  e  $E_2 = - 0,2V$ . a) Etapas de montagem do biossensor. a) Sem BSA: ■ Eletrodo de platina; □ Eletrodo Pt+nanoAu; ● Eletrodo Pt+nanoAu+Con A; ◇ Eletrodo Pt+nanoAu+Con A+PVB, ▲ Eletrodo Pt+nanoAu+Con A+PVB+ovoalbumina, b) com BSA: ■ Eletrodo de platina; ◇ Eletrodo Pt+nanoAu+Con A+PVB; ◆ Eletrodo Pt+nanoAu+Con A+PVB+BSA; ▲ Eletrodo Pt+nanoAu+Con A+PVB+BSA+ovoalbumina. 89
- Figura 32.** Diagrama de Nyquist dos diferentes eletrodos em solução ferro/ferricianeto (em TFS 10mM em H<sub>2</sub>O pH 7,4). a) Sem BSA: ■ Eletrodo de platina; □ Eletrodo Pt+nanoAu; ● Eletrodo Pt+nanoAu+conA; ◇ Eletrodo Pt+nanoAu+Con A+PVB, ▲ Eletrodo Pt+nanoAu+Con A+PVB+ovoalbumina, b) com BSA: ● Eletrodo de platina; ▲ Eletrodo

Pt+nanoAu+Con A+PVB; ■ Eletrodo  
Pt+nanoAu+Con A+PVB+BSA; ○ Eletrodo  
Pt+nanoAu+Con A+PVB+BSA+ovoalbumina. 91

**Figura 33.** Montagem do biossensor com CramoLL.  
a) Voltamogramas cíclicos (VCs): ■ Eletrodo de platina; ○ Eletrodo Pt+nanoAu; ▲ Eletrodo Pt+nanoAu+CramoLL; ◇ Eletrodo Pt+nanoAu+CramoLL+PVB, b) Diagrama de Nyquist: ■ Eletrodo de platina; ○ Eletrodo Pt+nanoAu; ▲ Eletrodo Pt+nanoAu+CramoLL; ◇ Eletrodo Pt+nanoAu+CramoLL+PVB. 93

**Figura 34.** Comportamento eletroquímico das lectinas CramoLL e Con A sobre eletrodo de Pt. a) Voltamogramas cíclicos (VCs): ■ Eletrodo Pt+nanoAu+CramoLL+PVB; ○ Eletrodo Pt+nanoAu+Con A+PVB. 94

**Figura 35.** Voltamogramas cíclicos (VCs) dos diferentes eletrodos.  
a) Etapas de montagem do biossensor: ■ Eletrodo de ouro; □ Eletrodo Au+nanoAu; ◆ Eletrodo Au+nanoAu+CramoLL; ◇ Eletrodo Au+nanoAu+CramoLL+PVB, b) Interação com açúcares: ◆ Eletrodo de ouro; □ Eletrodo Au+nanoAu+CramoLL+PVB; ◇ Eletrodo Au+nanoAu+CramoLL+PVB+BSA+ovoalbumina; ◆ Eletrodo Au+nanoAu+CramoLL+PVB+BSA+glicogênio; ● Eletrodo Au+nanoAu+CramoLL+PVB+BSA+glicose. 96

**Figura 36.** Área dos voltamogramas cíclicos (VCs) dos diferentes eletrodos em solução ferro/ferricianeto para sistema com CramoLL (em TFS 10mM em H<sub>2</sub>O pH 7,4), Velocidade de varredura foi de 50 mV.s<sup>-1</sup> e E<sub>0</sub> = 0,1V, E<sub>1</sub> = 0,7 V e E<sub>2</sub> = - 0,2V. 97

**Figura 37.** Espectroscopia de impedância (EI) dos diferentes eletrodos em solução ferro/ferricianeto (em TFS 10mM em H<sub>2</sub>O pH 7,4) , Velocidade de varredura foi de 50 mV.s<sup>-1</sup> e E<sub>0</sub> = 0,1V, E<sub>1</sub> = 0,7 V e E<sub>2</sub> = - 0,2V.  
a) Etapas de montagem do biossensor: ■ Eletrodo de ouro; □ Eletrodo Au+nanoAu; ◆ Eletrodo Au+nanoAu+CramoLL; ◇ Eletrodo Au+nanoAu+CramoLL+PVB, ▲ Eletrodo Au+nanoAu+CramoLL+PVB+BSA; ● Eletrodo Au+nanoAu+CramoLL+PVB+BSA+ovoalbumina; ◆ Eletrodo Au+nanoAu+CramoLL+PVB+BSA+glicogênio; × Eletrodo Au+nanoAu+CramoLL+PVB+BSA+glicose, b) Valor de Zre obtido após cada etapa da montagem. As etapas 1-8 correspondem aos diagramas de Nyquist em a). 98

**Figura 38.** Voltamogramas dos diferentes eletrodos em solução ferro/ferricianeto (em TFS 10mM em H<sub>2</sub>O pH 7,4) , Velocidade de varredura foi de 50 mV.s<sup>-1</sup> e E<sub>0</sub> = 0,1V, E<sub>1</sub> = 0,7 V e E<sub>2</sub> = - 0,2V. a) Etapas de



montagem do biossensor: ■ Eletrodo de ouro; □ Eletrodo Au+nanoAu; ◆ Eletrodo Au+nanoAu+Con A; ◇ Eletrodo Au+nanoAu+Con A+PVB, b) Interação com açúcares: ■ Eletrodo de ouro; ▲ Eletrodo Au+nanoAu+Con A+PVB+BSA; □ Eletrodo Au+nanoAu+Con A+PVB+BSA+ovoalbumina; ◆ Eletrodo Au+nanoAu+Con A+PVB+BSA+glicogênio; ● Eletrodo Au+nanoAu+Con A+PVB+BSA+glicose. 99

**Figura 39.** Área dos voltamogramas cíclicos (VCs) dos diferentes eletrodos em solução ferro/ferricianeto para sistema com Con A (em TFS 10mM em H<sub>2</sub>O pH 7,4), Velocidade de varredura foi de 50 mV.s<sup>-1</sup> e E<sub>0</sub> = 0,1V, E<sub>1</sub> = 0,7 V e E<sub>2</sub> = - 0,2V. 101

**Figura 40.** Espectroscopia de impedância dos diferentes eletrodos em solução ferro/ferricianeto (em TFS 10mM em H<sub>2</sub>O pH 7,4) , Velocidade de varredura foi de 50 mV.s<sup>-1</sup> e E<sub>0</sub> = 0,1V, E<sub>1</sub> = 0,7 V e E<sub>2</sub> = - 0,2V. a) Etapas de montagem do biossensor: ■ Eletrodo de ouro; □ Eletrodo Au+nanoAu; ▼ Eletrodo Au+nanoAu+Con A; ◇ Eletrodo Au+nanoAu+Con A+PVB, ▼ Eletrodo Au+nanoAu+Con A+PVB+BSA; ● Eletrodo Au+nanoAu+Con A+PVB+BSA+ovoalbumina; ◆ Eletrodo Au+nanoAu+Con A+PVB+BSA+glicogênio; × Eletrodo Au+nanoAu+Con A+PVB+BSA+glicose, b) Valor de Zre obtido após cada etapa da montagem. As etapas 1-8 correspondem aos diagramas de Nyquist em a). 103

**Figura 41.** a) Circuito equivalente 1; b) ajuste entre a curva experimental do sistema nanoAu-ConA; c) ajuste entre a curva experimental do sistema nanoAu-ConA-PVB; d) ajuste entre a curva experimental do sistema nanoAu-ConA-PVB-BSA-ovoalbumina. ●-Corresponde aos dados experimentais e × - corresponde aos dados teóricos. 107

**Figura 42.** a) Circuito equivalente 2; b) ajuste entre a curva experimental do sistema nanoAu-ConA; c) ajuste entre a curva experimental do sistema nanoAu-ConA-PVB; d) ajuste entre a curva experimental do sistema nanoAu-ConA-PVB-BSA-ovoalbumina. ● - Corresponde aos dados experimentais e × - corresponde aos dados teóricos. 108

**Figura 43.** a) Circuito equivalente 1; b) ajuste entre a curva experimental do sistema nanoAu-CramoLL; c) ajuste entre a curva experimental do sistema nanoAu-CramoLL-PVB; d) ajuste entre a curva experimental do sistema nanoAu-CramoLL-PVB-BSA-ovoalbumina. ● - Corresponde aos dados experimentais e × - corresponde aos dados teóricos. 109

**Figura 44.** a) Circuito equivalente 2; b) ajuste entre a curva experimental do sistema nanoAu-CramoLL; c) ajuste entre a curva experimental do sistema nanoAu-CramoLL-PVB; d) ajuste entre a curva experimental do sistema

- nanoAu-CramoLL-PVB-BSA-ovoalbumina. ● – Corresponde aos dados experimentais e × - corresponde aos dados teóricos. 110
- Figura 45.** Circuito equivalente aplicado para o ajuste das medidas de impedância na presença do par redox  $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ .  $R_\Omega$  - a resistência ohmica da solução eletrolítica,  $Q$  - associado com a capacitância da dupla camada elétrica,  $Z_w$  - a impedância de Warburg,  $R_{CT}$  - resistência de transferência de elétrons. 111
- Figura 46.** Gráficos de Nyquist das etapas de imobilização das lectinas: (a) ■ - AuNp-ConA-PVB, ▲ -AuNp-ConA-PVB-BSA, ◆ - AuNp-ConA-PVB-BSA-ovalbumina, (b) ■ - AuNp-CramoLL, + AuNp-CramoLL-PVB-BSA, ◆ - AuNp-CramoLL-PVB-BSA-ovalbumina. As linhas sólidas na figura representam o ajuste. 113
- Figura 47.** Os diagramas apresentam o  $\Delta R_{CT\%}$  para os sistemas que correspondem ao nanoAu-ConA-PVB-BSA (a) e nanoAu-CramoLL-PVB-BSA (b) após ser incubado com diferentes concentrações de ovoalbumina em tampão TFS (pH 7.4), representadas por 200  $\mu\text{g/mL}$ , 150  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$  e 25  $\mu\text{g/mL}$ . 118
- Figura 48.** Voltamogramas cíclicos dos eletrodos nos diferentes estágios: (a) ■ – Eletrodo de ouro limpo, ● - nanoAu-ConA, ▲ - nanoAu-ConA-PVB, ▼ - nanoAu-ConA-PVB-BSA, × - nanoAu-ConA-PVB-BSA-glicose e + - nanoAu-ConA-PVB-BSA-ovoalbumina, ◇ nanoAu-ConA-PVB-BSA-glicogênio, (b) ■ – Eletrodo de ouro limpo, ● - nanoAu-CramoLL, ▲ - nanoAu-CramoLL-PVB, ▼ - nanoAu-CramoLL-PVB-BSA, × - nanoAu-CramoLL-PVB-BSA-glicose e + - nanoAu-CramoLL-PVB-BSA-ovoalbumina, ◇ nanoAu-CramoLL-PVB-BSA-glicogênio. Eletrólito suporte  $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ , 10 mM, 1:1 + 0.15 M NaCl em 10 mM com pH 7,4; velocidade de varredura de 50  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . 121
- Figura 49.** Voltamogramas cíclicos (VCs) dos diferentes eletrodos em solução ferro/ferricianeto (em TFS 10mM em  $\text{H}_2\text{O}$  pH 7,4) , Velocidade de varredura foi de 50  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  e  $E_0 = 0,1\text{V}$ ,  $E_1 = 0,7\text{V}$  e  $E_2 = -0,2\text{V}$ . a) Sistema sem lectinas: ■ Eletrodo de ouro; □ Eletrodo Au+nanoAu+PVB; ▲ Eletrodo Au+nanoAu+PVB+BSA; ◆ Eletrodo Au+nanoAu+PVB+BSA+ovoalbumina, b) Presença das lectinas: ▲ Eletrodo Au+nanoAu+PVB+BSA; □ Eletrodo Au+nanoAu+ConA+PVB+BSA; ◆ Eletrodo Au+nanoAu+CramoLL+PVB+BSA. 124
- Figura 50.** Área dos voltamogramas cíclicos (VCs) dos diferentes eletrodos em solução ferro/ferricianeto (em TFS 10mM em  $\text{H}_2\text{O}$  pH 7,4) na ausência de lectinas.

- Velocidade de varredura foi de 50 mV.s<sup>-1</sup> e E<sub>0</sub> = 0,1V, E<sub>1</sub> = 0,7 V e E<sub>2</sub> = - 0,2V. 125
- Figura 51.** Diagrama de Nyquist dos diferentes eletrodos em solução ferro/ferricianeto (em TFS 10mM em H<sub>2</sub>O pH 7,4) , Velocidade de varredura foi de 50 mV.s<sup>-1</sup> e E<sub>0</sub> = 0,1V, E<sub>1</sub> = 0,7 V e E<sub>2</sub> = - 0,2V. a) Sistema sem lectinas: ■ Eletrodo de ouro; □ Eletrodo Au+nanoAu+PVB; ▲ Eletrodo Au+nanoAu+PVB+BSA; ◇ Eletrodo Au+nanoAu+PVB+BSA+ovoalbumina, b) Presença das lectinas: ▲ Eletrodo Au+nanoAu+PVB+BSA; □ Eletrodo Au+nanoAu+ConA+PVB+BSA; ◆ Eletrodo Au+nanoAu+CramoLL+PVB+BSA. 127
- Figura 52.** Gráfico de Bode para o sistema sem lectinas: • Eletrodo de ouro; □ Eletrodo Au+nanoAu+PVB; ▲ Eletrodo Au+nanoAu+PVB+BSA; ◇ Eletrodo Au+nanoAu+PVB+BSA+ovoalbumina. 127
- Figura 53.** Diagrama de Nyquist das etapas de imobilização das glicoproteínas do soro de pacientes: eletrodo de ouro limpo (■), eletrodo de ouro-nanoAu-PVB (○), nanoAu-ConA-PVB-BSA (●), nanoAu-ConA-PVB-BSA-GS 1:50 (◇), nanoAu-ConA-PVB-BSA-GS 1:30 (◀), nanoAu-ConA-PVB-BSA-GS1:10 (+). 130
- Figura 54.** Medidas de impedância eletroquímica na diluição de 1:30 em solução de ferricianeto de potássio 10mM em tampão fosfato de sódio pH 7,4. a) eletrodo limpo, b) sistema com febre do Dengue e c) sistema com febre hemorrágica. 131
- Figura 55.** Medidas de impedância eletroquímica na diluição de 1:30 em solução de ferricianeto de potássio 10mM em tampão fosfato de sódio pH 7,4. Detalhe: Impedância de eletrodo limpo. 132
- Figura 56.** Diagrama de Nyquist demonstrado a reprodutibilidade das amostras de ConADC (a), ConADneg (b) e ConADH (c). 133
- Figura 57.** Diagrama de Nyquist demonstrado a reprodutibilidade das amostras de ConADC (a), ConADneg (b) e ConADH (c) de repetições para os mesmos soros analisados. 134
- Figura 58.** Diagrama de Nyquist para os sistemas ConADC, ConADneg e ConADH na diluição de 1:30. 135
- Figura 59.** Imagens representativas de TEM demonstrando os sistemas de AuNP-ConA (a), glicoproteínas do soro de pacientes infectados por febre do Dengue induzindo agregação de AuNP-ConA (b), glicoproteínas de pacientes infectados por febre hemorrágica do Dengue induzindo agregação de AuNP-ConA (c) e glicoproteínas do soro negativo para o Dengue (d). 136

- Figura 60.** Gráfico de Bode para o sistema ConA na presença de glicoproteínas do soro: ○ Eletrodo de ouro limpo; ▲ Eletrodo Au+nanoAu+ConA+PVB+BSA; ◇ Eletrodo Au+nanoAu+ConA+PVB+BSA+GS(Dneg 1:30); × Eletrodo Au+nanoAu+ConA+PVB+BSA+GS(DH 1:30) e ♦ Eletrodo Au+nanoAu+ConA+PVB+BSA+GS(DC 1:30). 137
- Figura 61.** Diagramas de Nyquist das etapas de reconhecimento das glicoproteínas do plasma (1:30): nanoAu-ConA-PVB-BSA eletrodo modificado (□), nanoAu-ConA-PVB-BSA-Dnegativo (▲), nanoAu-ConA-PVB-BSA-DH (◇), nanoAu-ConA-PVB-BSA-DC (●). 138
- Figura 62.** Variação do  $\Delta R_{CT\%}$  para os sistemas que correspondem a nanoAu-ConA-PVB-BSA-GSDC (▲), nanoAu-ConA-PVB-BSA-GSDH (●) e nanoAu-ConA-PVB-BSA-GSDneg após incubação nos soros em diferentes diluições em TFS (pH 7,4), representadas por 1:10, 1:30, 1:50 e 1:80. 142
- Figura 63.** Relação dos valores de Q versus  $R_{CT}$ . DN- soro negativo, DC- Dengue clássica e DH-Dengue hemorrágica. 144
- Figura 64.** Diferenciação entre os sorotipos através da relação entre os elementos n, Q, e  $R_{CT}$ . - soro negativo, - pacientes com Dengue hemorrágica e - pacientes com Dengue clássica. 145
- Figura 65.** Voltamogramas cíclicos (VCs) dos eletrodos em diferentes estágios em diferentes diluições: Eletrodo de ouro limpo (■), nanoAu-ConA-PVB-BSA (♦), nanoAu-ConA-PVB-BSA-DC/DH/Dneg 1:10 (●), nanoAu-ConA-PVB-BSA-DC/DH/Dneg 1:30 (←), nanoAu-ConA-PVB-BSA-DC/DH/Dneg 1:50 (◀), nanoAu-ConA-PVB-BSA-DC/DH/Dneg 1:80 (○). Eletrólito suporte 10 mM  $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$  1:1 + 0.15 M NaCl em solução de TFS pH 7.4, 10mM; velocidade de varredura de 50 mV.s<sup>-1</sup>. 149
- Figura 66.** Dependência das correntes de pico em função da diluição. Eletrólito suporte 10 mM  $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$  1:1 + 0.15 M NaCl em solução de TFS pH 7.4, 10mM; velocidade de varredura de 50 mV.s<sup>-1</sup>. Au-ConA-PVB-BSA-DH (○), Au-ConA-PVB-BSA-Dneg (Δ) e Au-ConA-PVB-BSA-DC (■). 150
- Figura 67.** Voltamogramas cíclicos (VCs) dos eletrodos em diferentes estágios na diluição de 1:30: Eletrodo de ouro limpo (■), nanoAu-ConA-PVB-BSA (○), nanoAu-ConA-PVB-BSA-GSnegativo (●), nanoAu-ConA-PVB-BSA-GSDH (.....), nanoAu-ConA-PVB-BSA-GSDC (—). Eletrólito suporte 10 mM  $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$  1:1 + 0.15 M NaCl em solução de TFS pH 7.4, 10mM; velocidade de varredura de 50 mV.s<sup>-1</sup>. 151

**Figura 68.** Voltamogramas cíclicos em diferentes sorotipos da Dengue para três pacientes na diluição de 1:30 em solução de ferro-ferricianeto de potássio 10mM em tampão fosfato de sódio pH 7,4. a) Soro negativo, b) febre do Dengue e c) febre hemorrágica do Dengue. P1-paciente nº1, P2-paciente nº2 e P3-paciente nº3. 153

**Figura 69.** Medidas de voltametria linear na diluição de 1:30 em solução de ferricianeto de potássio 10mM em tampão fosfato de sódio pH 7,4. a) Sistema com febre do Dengue, b) sistema com febre hemorrágica e c) sistema com soro negativo. P1-paciente nº1, P2-paciente nº2 e P3-paciente nº3. 155

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1</b> - Resultados da impedância ajustados para os eletrodos modificados da Figura 45.	114
<b>Tabela 2</b> - Resultados de impedância da interação lectina-açúcar ajustados a partir da Fig.46.	120
<b>Tabela 3</b> - Deslocamento da corrente anódica para o eletrodo modificado nanoAu-ConA/CramoLL-PVB-modificado com 200 µg/mL de açúcar.	123
<b>Tabela 4</b> - Resultado de impedância ajustado para os eletrodos modificados na Fig. 62.	140
<b>Tabela 5</b> - Resultados de impedância ajustados referente à interação lectina-glicoproteína da Fig. 62.	141

## LISTA DE ABREVIATURAS

C	capacitância (F)
$C_{dl}$	capacitância da dupla camada (F)
E	potencial (V)
$i_{pa}$	corrente de pico anódica (A)
$i_{pc}$	corrente de pico catódica
$R_{CT}$	resistência de transferência de elétron ( $\Omega$ )
$R_{\Omega}$	resistência ôhmica oferecida pela solução no transporte dos íons entre o eletrodo de trabalho e o de referência ( $\Omega$ )
$\Delta R_{CT}\%$	percentual relativo da interação entre a lectina e o carboidrato
$\Delta i\%$	percentual relativo da corrente de pico anódica da lectina e o carboidrato
Z	impedância ( $\Omega$ )
$Z_f$	impedância faradáica ( $\Omega$ )
$Z_{im}$	componente capacitiva ou imaginária na medida de impedância ( $\Omega$ )
$Z_{re}$	componente resistivo ou real na medida de impedância ( $\Omega$ )

$Z_w$  ou W impedância de Warburg que indica a resistência na transferência de massa ( $\Omega$ )

DC soro de pacientes com dengue clássica

DH soro de pacientes com dengue hemorrágica

GS glicoproteínas do soro



## RESUMO

As nanopartículas de ouro (nanoAu) facilitam a transferência de elétrons e podem ser facilmente modificadas com uma grande variedade de biomoléculas. O objetivo deste trabalho foi imobilizar as lectinas *Concanavalina A* (Con A) e *Cratylia mollis* (CramoLL) sobre a superfície de eletrodos de platina (Pt) e de ouro (Au) modificados com nanopartículas de ouro e polivinilbutiral (PVB) e em seguida realizar detecção de glicoproteínas em soro de pacientes contaminados com o vírus da Dengue clássica (DC), Dengue hemorrágica (DH) e soro negativo (Dneg). A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), numa faixa de frequência de 100 mHz a 100 KHz, e a voltametria cíclica (VC), com voltagem de -0,2 a 0,7 V, foram realizadas na presença de  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  (1:1), 10 mM, como par redox. As medidas de EIE e VC demonstraram que as reações do par redox sobre o eletrodo de Pt e Au foram bloqueados devidos a mudanças na impedância da interface eletrodo/solução. Os sistemas adsorvidos nanoAu-Con A-PVB e nanoAu-CramoLL-PVB sobre a superfície dos eletrodos de Pt e Au modificados proporcionaram um aumento da parte real da impedância ( $Z_{re}$ ). Voltamogramas cíclicos característicos de um processo redox limitado por difusão foram observados em eletrodos de platina/ouro e após a modificação destes eletrodos com nanoAu-ConA-PVB e nanoAu-CramoLL-PVB, uma diminuição das correntes de pico catódicas e anódicas foi observada. A EIE e VC evidenciaram a interação entre as lectinas estudadas com glicose, glicogênio e ovalbumina. Através do sistema nanoAu-ConA-PVB pôde-se observar diferenças no padrão de reconhecimento para os soros testados, através das respostas impedanciométricas e voltamétricas. Nossos resultados indicaram uma sensibilidade para a detecção de glicoproteínas e desta forma os sistemas podem ser aplicados na construção de biossensor para diagnóstico de doenças.

Palavras-chave: Lectinas, impedância, voltametria cíclica, nanopartículas e polímero.

## ABSTRACT

Gold nanoparticles (AuNp) allow the electron transfer and can be easily modified with a wide range biomolecules. The aim of this work was to immobilize Con A and CramoLL lectins on the surface of platinum (Pt) and gold (Au) electrode modified with AuNp and polyvinylbutiral (PVB). Subsequently, was performed the detection assay for glycoproteins present in serum from patients contaminated by classic Dengue fever (DC), hemorrhagic Dengue (DH) and negative serum (Dneg). Electrochemical impedance spectroscopy (EIS), frequency range from 100 mHz to 100 KHz, and cyclic voltammetry (CV), scan range -0.2 to 0.7 V, were performed in the presence of a 10 mM  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  (1:1) solution as a redox probe. EIS and CV measurements showed that redox probe reactions on the Pt and Au electrode were blocked due to the impedance change. Adsorbed Con A-AuNp-PVB and CramoLL-AuNp-PVB systems on the surface of modified Pt and Au electrode provoke an increase of the real part of impedance. Well-defined cyclic voltammograms characteristic of a diffusion-limited redox process, are observed at the bare platinum/gold and after these electrodes were modified with Con A-AuNp-PVB or CramoLL-AuNp-PVB, an obvious decrease in the anodic and cathodic peaks was observed. The EI and CV showed the interaction between the studied lectins with glucose, glycogen and ovalbumin. We observed differences in the pattern recognition for tested serum by use of nanoAu-ConA-PVB systems; by impedance and voltammetry response. Our results indicate an improvement of the sensitivity for detection of sugars that can be applicable to construction of carbohydrate biosensor.

Key-words: Lectins, impedance, cyclic voltammetry, nanoparticles and polymer.

# *CAPÍTULO I*

## 1.1 LECTINAS

### 1.1.1 Denominação e definição

O termo “lectina” (do latim *legere*, pegar, escolher) foi primeiro empregado por Boyd e Shapleigh, em 1954, para descrever aglutininas grupo sanguíneo-específicas encontradas em sementes e outras partes de determinadas plantas. Atualmente, esse termo se refere a uma classe de proteínas de origem não imunológica, largamente distribuídas na natureza podendo originar-se de plantas e bactérias que aglutinam células, precipitam polissacarídeos ou glicoconjugados (Liener *et al.*, 1986) e possuindo estruturas similares ou distintas (Correia e Coelho, 1995; Tavares *et al.*, 1996), e que reconhecem carboidratos livres ou ligados a superfícies celulares através de sítios de ligação nos quais a hidrofobicidade é a principal força de interação (Kennedy *et al.*, 1995).

As lectinas são multivalentes, possuindo dois ou mais sítios de ligação para açúcar, promovendo aglutinação de células animais e de plantas e precipitação de polissacarídeos, glicoproteínas, peptidoglicanos, ácido teicóico, glicolípídeos, dentre outros. A especificidade das lectinas é definida pelo monossacarídeo ou oligossacarídeos que inibe as reações de precipitação ou aglutinação induzidas por lectinas (Kompella e Lee, 2001). Várias centenas de lectinas demonstraram, através de análises detalhadas, que elas são um grupo grande e heterogêneo de proteínas que diferem fortemente quanto à especificidade aos carboidratos, estrutura molecular e atividade biológica (Van Damme *et al.*, 1996).

O início da pesquisa de lectinas animais pôde provavelmente ter ocorrido por volta de 1860, com a observação da coagulação sanguínea pelo veneno de cobra (Yamazaki *et al.*, 2000). Os estudos de lectinas tiveram maior interesse em 1960, pela

verificação de que a proteína de *Phaseolus vulgaris* (PHA – fitohemaglutinina) estimula linfócitos, resultando em divisão mitótica, e da aglutinina de *Triticum vulgare*, do gérmen de trigo, aglutinar mais intensamente células transformadas do que normais (Sharon e Lis, 1987). Com a descoberta de Inbar e Sachs (1969) de que a lectina de *Canavalia ensiformis*, *Concanavalina A* (ConA), também aglutinava preferencialmente células malignas, é que as lectinas tiveram um impulso na sua aplicação.

As proteínas vegetais com atividade hemaglutinante foram, logo de início, denominadas de aglutininas, hemaglutininas, fitohemaglutininas (Allen e Brilliant, 1969), apesar de ter sido proposto por Boyd e Shalpleigh (1954) o termo “lectina” às proteínas com estruturas diversas e com a característica comum de seletividade na interação de carboidratos. Em animais, as lectinas de membranas parecem participar na endocitose e na translocação intracelular de glicoproteínas (Ashweel e Harford, 1982), na ligação de bactérias a células epiteliais (Ashkenazi e Mirelman, 1984) e na regulação da migração e adesão celular (Gabiús *et al.*, 1985). Para as lectinas solúveis de vertebrados, foi proposta uma função comum: a de ligar glicoconjugados presentes em células (Kennedy *et al.*, 1995; Barondes *et al.*, 1984). A primeira lectina a ser purificada foi a ConA, extraída da *Canavalia ensiformis* (feijão de porco), que é uma das mais amplamente avaliadas em suas características e aplicações (Correia e Coelho, 1995).

No Brasil mais precisamente no estado de Pernambuco, uma lectina tem sido purificada e caracterizada a partir de sementes de uma planta nativa do Nordeste brasileiro de *Cratylia mollis* (CramoLL) isolada do feijão camaratu (Fig.1), que é uma planta leguminosa nativa da região semi-árida de Pernambuco, pertencente à família *Phaseoleae*, subfamília *Dioclineae*, a qual abrange o gênero *Canavalia*, botanicamente relacionada a *Cratylia mollis* (Correia e Coelho, 1995).

Esta lectina, denominada Cra lectina, é fortemente inibida por metil  $\alpha$ -D-manosídeo e conforme, portanto com a classe de lectinas ligantes de glicose/manose, similar às isoladas da *Canavalia ensiformis* (Concanavalina A, ConA) e *Lens culinaris* (lectina de lentilha) (Lima *et al.*, 1997). Cra Possui forte ligação para tecidos humanos com câncer maligno (Beltrão *et al.*, 1998), particularmente para aqueles de glândulas mamárias, útero e cérebro.



Figura 1 – Fotografia do feijão Camaratu.

Estudos por cristalografia e raios-X revelaram duas diferentes formas cristalinas da Cra (Tavares *et al.*, 1996). O modelo do monômero de Cra Iso-1 constituído a partir destes estudos está apresentado na Fig. 2.

Além da similaridade de reconhecimento para carboidratos, bem como possuem regiões homólogas em suas estruturas, as lectinas Cra e ConA apresentam algumas diferenças. Características estruturais obtidas por cromatografia líquida de rápida resolução de proteínas e por cromatografia líquida de alta pressão mostraram que estas duas lectinas têm diferentes padrões de eluições e diferentes ligações específicas para tumores humanos benignos e malignos (Tavares *et al.*, 1996).

A caracterização físico-química de lectinas é importante para explicar seu comportamento em diferentes propriedades biológicas (Souza *et al.*, 2001). A estabilidade e integridade estrutural de proteínas oligoméricas são determinadas por suas interações inter e intracadeias. Lectinas de legumes podem servir como um excelente modelo para estudos de desdobramento de proteínas diméricas e tetraméricas, e o efeito da oligomerização na sua estabilidade e integridade estrutural. Sendo, tais lectinas, admiravelmente similares nas suas estruturas primária, secundária e terciária (Srinavas *et al.*, 2001).

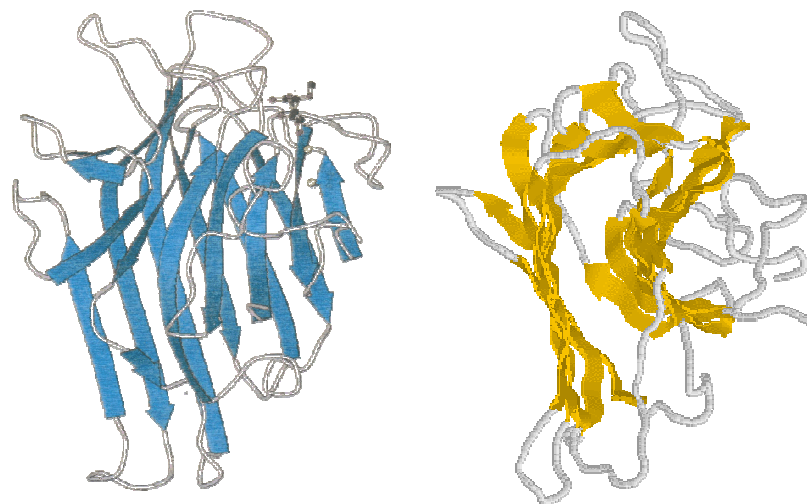


Figura 2 – Modelo de monômero de Cra Iso-1 (azul) e ConA (amarelo)

<http://webenligne.cermav.cnrs.fr/lectines/>.

### ***1.1.2 Propriedades biológicas***

As lectinas ou hemaglutininas podem ser caracterizadas e detectadas por sua habilidade em aglutinar eritrócitos, em certos casos com alta especificidade (Lis e Sharon, 1973; Askar, 1986). Algumas lectinas são específicas em suas reações com grupos sanguíneos humanos ABO, MN e subgrupo A1 (Sharon e Lis, 1972). Todos estes efeitos são produzidos pela habilidade das lectinas de se ligarem a tipos específicos de açúcares na superfície celular (Deshpande e Damodaran, 1990).

Além dessas propriedades, as lectinas podem promover estimulação mitogênica de linfócitos e aglutinação de células cancerosas (Lis e Sharon, 1973; Liener, 1981). Embora muitas lectinas reconheçam e se liguem a açúcares simples tais como glicose, manose, galactose, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina ou fucose, a afinidade é muito maior para com os constituintes de glicoproteínas: ácido siálico e N-acetilgalactosamina contendo cadeias de glicanos, encontrados em animais e seres humanos (Nicolson, 1974; Peumans e Van Damme, 1996).

A especificidade das lectinas com relação a diferentes carboidratos possibilita a sua utilização em pesquisas nas áreas biológica e médica como, por exemplo, a investigação da superfície de células, caracterização de eritrócitos, como agentes mitogênicos, caracterização de estágios de desenvolvimento de microorganismos diversos, purificação de glicoproteínas, morfologia de neurônios e identificação de conexões neurais no sistema nervoso central (Kennedy *et al.*, 1995).

As lectinas são encontradas em uma ampla variedade de espécies de plantas e animais, entretanto, estas substâncias estão presentes em maior quantidade em grãos de leguminosas e gramíneas (Mancini Filho *et al.*, 1979). Martin-Cabrejas *et al.* (1995) encontraram quantidades consideráveis de inibidores de tripsina/quimotripsina e  $\alpha$ -amilase e elevada atividade de lectinas em cinco cultivos de feijões (*Phaseolus vulgaris*) frescos e estocados por cinco anos. Muitas lectinas também já foram isoladas e caracterizadas de diversas variedades de cogumelos (Kawagishi *et al.*, 1996). Exemplos de lectinas bem caracterizadas são: ConA presente em *Jack bean* (*Canavalia ensiformis*), aglutinina da soja e aglutinina do gérmen de trigo (Sharon e Lis, 1972). O fato das lectinas terem larga distribuição em plantas sugere alguma importância fisiológica para estas substâncias (Liener, 1976; Etzler, 1985). As funções das lectinas podem ser variadas e parecem ter relação com os estádios de maturação e germinação



das sementes (Howard *et al.*, 1972), assim como parecem ter relação com os mecanismos de defesa da planta contra o ataque de fungos (Liener, 1976).

### ***1.1.3 Características estruturais e classificação***

Em geral, lectinas de plantas são oligômeros formados de duas ou mais subunidades, idênticas ou não; geralmente possuem estrutura tetramérica (Moreira *et al.*, 1991). As diferenças estruturais entre as diversas lectinas se devem à variação do número de subunidades por molécula e pela natureza dos polipeptídios. Pontes dissulfeto, pontes de hidrogênio e também as interações hidrofóbicas podem estar presentes nas subunidades de associação (Kennedy *et al.*, 1995). As especificidades e afinidades dos sítios associados são alcançadas principalmente por pontes de hidrogênio, com a ajuda de forças de van der Waals e interações hidrofóbicas com resíduos de aminoácidos aromáticos que estão próximos às porções hidrofóbicas de monossacarídeos (Sharon, 1993) contribuindo para a estabilidade e especificidade dos complexos formados.

Estas lectinas exibem uma elevada homologia, possuindo um total de 20% de resíduos de aminoácidos invariáveis, dentre os quais estão incluídos aqueles envolvidos na ligação a monossacarídeos e, a maioria dos que coordenam os íons metálicos muitas vezes necessários para a atividade da lectina. Em relação à estrutura global das lectinas de plantas, estas podem ser divididas em três principais tipos distintos: as merolectinas, as hololectinas e as quimerolectinas. As merolectinas são proteínas formadas exclusivamente por um domínio de ligação a carboidrato; são proteínas pequenas, formadas por um único polipeptídeo e, por conta de sua natureza monovalente, são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. As quimerolectinas são a fusão de proteínas contendo um domínio não relacionado, tal domínio possui uma

atividade catalítica bem definida ou não apresenta nenhuma atividade biológica que atua de forma independente (Peumans e Van Damme, 1995). As hololectinas também são exclusivamente formadas de domínios de ligação a carboidratos, mas contêm dois ou mais destes domínios que são idênticos ou muito semelhantes; este grupo compreende todas as lectinas que possuem múltiplos sítios de ligação, sendo capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Dentro deste grupo estão as lectinas de leguminosas tais como a lectina de ConA e de CramoLL.

#### ***1.1.4 Mecanismo de Ação***

Lectinas são proteínas versáteis largamente distribuídas, que podem ligar estruturas de carboidratos presentes em oligossacarídeos, glicoproteínas ou glicoconjugados (Sharon e Lis, 1990). Nas lectinas, os sítios de ligação a carboidratos, promovem o reconhecimento de carboidratos ligante específico, se combinando a este de acordo com o modelo chave-fechadura (Kennedy *et al.*, 1995). As lectinas fazem uso de diversas interações químicas fracas para produzir reconhecimento altamente seletivo a seus carboidratos ligados a uma superfície (Sharma e Surolia, 1997). Esta interação fraca entre a lectina e o carboidrato emprega estratégias para aumentar tanto a afinidade como a especificidade através de subsítios e subunidades. Esta ligação ao carboidrato é diretamente responsável pela atividade biológica (Peumans e Van Damme, 1998).

A habilidade que as lectinas possuem no reconhecimento de carboidratos faz delas uma excelente ferramenta de investigação para o desenvolvimento de biossensores, portanto, estudos de adsorção destas biomoléculas em superfícies metálicas vêm favorecendo a compreensão dos processos que governam a interação bioespecífica das lectinas.

## 1.2. DENGUE

O *Aedes aegypti* é o mosquito transmissor da Dengue e da febre amarela urbana. Possivelmente, chegou às Américas nos navios que traziam escravos da África. Menor que os mosquitos comuns, o *Aedes aegypti* é preto com pequenos riscos brancos no dorso, na cabeça e nas pernas. Suas asas são translúcidas e o ruído que produzem é praticamente inaudível ao ser humano (Hemingway *et al.*, 2000).

O *Aedes aegypti* (Fig. 3) é um mosquito urbano, embora já tenha sido encontrado na zona rural. Acredita-se, porém, que para lá tenha sido levado em recipientes que continham ovos ou larvas. Próprio das regiões tropical e subtropical, não resiste a baixas temperaturas nem a altitudes elevadas. O mosquito desenvolve-se por metamorfose completa e seu ciclo de vida, é composto por quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto.



Figura 3 – Imagem do mosquito *Aedes aegypti* (Disponível em: [www.ipueiras.ce.gov.br](http://www.ipueiras.ce.gov.br)).

As fêmeas preferem o sangue humano como fonte de proteína ao de qualquer outro animal vertebrado (Fig. 4). Em geral, escolhem pés e tornozelos porque voam baixo e atacam no período da manhã ou entardecer. Sua saliva possui uma substância anestésica, que torna quase indolor a picada. Tanto as fêmeas quanto os machos abrigam-se dentro das casas ou nos terrenos ao redor.

A infecção provocada por um ou mais tipos de vírus de Dengue é comum em pessoas que vivem em países tropicais e subtropicais na maioria das grandes e pequenas cidades e cerca de 50-100 milhões de indivíduos são infectados a cada ano (Halstead, 1988). Estudos genéticos de cepas do vírus da Dengue forneceram a evidência que os quatro vírus da Dengue estão relacionados com um ancestral comum, identificado em populações de primatas, e que cerca de 500 anos atrás, todos os vírus emergiram separadamente dentro do ciclo de transmissão urbana (Wang *et al.*, 2000).

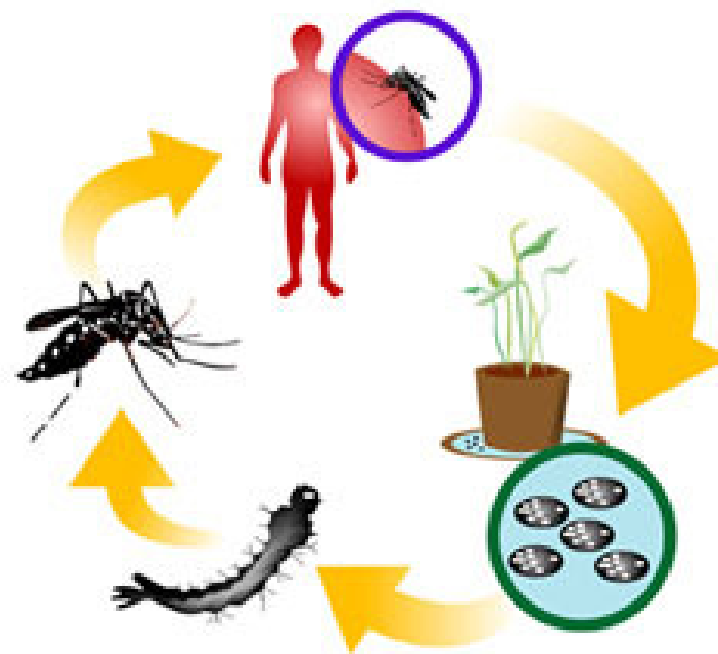


Figura 4 – Ciclo de contágio com o vírus da Dengue (Disponível em: [www.secom.unb.br](http://www.secom.unb.br)).

As infecções humanas se instalam com qualquer um dos sorotipos da Dengue (1, 2, 3 ou 4) podendo desencadear duas síndromes bem conhecidas, a febre da Dengue e a Dengue hemorrágica (febre hemorrágica da Dengue ou síndrome do choque), além disso, pode desencadear respostas intermediárias, ou nenhuma resposta clínica. A Dengue hemorrágica é acompanhada por lesões dos capilares sangüíneos acompanhados de trombocitopenia, alteração na hemostase, e alterações no fígado indicados pelo aumento nos níveis plasmáticos de aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase (Kuo *et al.*, 1992).

O termo febre hemorrágica descreve as alterações vasculares que são observadas. Algumas alterações como perda de fluido tecidual e que quando não repostos prontamente leva ao choque, o qual se prolongado leva a complicações gastrointestinais e hemorragia. A hemorragia, algumas vezes severa, pode acompanhar a febre do Dengue, comumente em indivíduos adultos.

Por mais de duas décadas, tem-se feito esforços para identificar mecanismos que estão subjacentes ao aparecimento súbito do aumento da permeabilidade vascular e de eventos hemorrágicos, processos estes relacionados a resposta das células T do sistema imune. Pesquisas têm sido realizadas com o principal objetivo de estudar as infecções secundárias da Dengue, ignorando assim a importância da sorologia da Dengue, por exemplo, casos de Dengue hemorrágica na infância, que está relacionado às manifestações primárias da Dengue (Halstead *et al.*, 2006). Durante o estágio da infecção secundária, altas concentrações de interferon  $\alpha$  são observadas 2-3 após a febre (Kurane *et al.*, 1993).

No final do período do estado febril e coincidentemente com o aparecimento da permeabilidade vascular, altas concentrações de interleucina 2 e interferon  $\gamma$  são observados. Uma grande quantidade de fator de necrose tumoral e fator de inibição da

migração dos macrófagos estão correlacionados com a severidade da doença Dengue (Chen *et al.*, 2006). Variadas concentrações de fator de necrose tumoral do tipo 75 ou fator de necrose  $\alpha$  tem sido relatado em casos de Dengue hemorrágica (Bethell *et al.*, 1998). Elevadas concentrações de CCL2, uma proteína que reduz a resistência das junções das células do endotélio vascular, têm sido vistas em pacientes com Dengue hemorrágica (Lee *et al.*, 2006).

A produção de muitas destas citocinas ou fatores celulares podem ser induzidos *in vitro* pela incubação do linfócito T humano (sensível ao antígeno) com as células de Dengue infectadas, usualmente os monócitos. Os epítomos dominantes que interagem com os linfócitos T são peptídeos da proteína não estrutural NS3 (Okamoto *et al.*, 1998).

### ***1.2.1. Manifestações sorológicas da Dengue***

A febre do Dengue (FD) é uma doença caracterizada por dor de cabeça, dor retro-orbital, mialgia, artralgia, rash cutâneo e em alguns casos, manifestações hemorrágicas. A febre hemorrágica da Dengue (FHD) é definida por sinais hemorrágicos, hemoconcentração e outras evidências de lesões vasculares tais como ascites, efusão pleural e hipoalbumemia, que pode progredir para o estado de choque e morte (Avila-Aguero *et al.*, 2004).

O mecanismo exato da FHD não é bem compreendido, no entanto, é de conhecimento que esta síndrome envolve processos imunopatológicos associados com infecções seqüenciais com sorotipos diferenciados da Dengue (Guzman e Kouri, 2002). Os fatores de virulência viral assim como os fatores genéticos e fatores do hospedeiro são também determinantes da severidade da doença (Chaturvedi *et al.*, 2006; Rico-Hesse, 2003).

Alguns autores têm relatado que FHD é uma alteração da reação imune Th1/Th2 (Chaturvedi *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2005). Em infecções da Dengue pode-se observar a presença de níveis plasmáticos elevados de interleucinas e de glicoproteínas. Na FD têm-se níveis elevados de interleucina-10 (IL-10) e baixos níveis de interferon  $\gamma$  (IFN). Em contraste, os níveis de sVCAM-1 são maiores na DHF em comparação aos níveis em soros de pacientes com DF, o sVCAM é um membro da superfamília imunoglobulina, sendo uma sialoglicoproteína expressa pela membrana do endotélio. Este tipo de proteína está envolvido nos processos de adesão celular, e no desenvolvimento da aterosclerose e artrite reumatóide.

Os níveis de IFN  $\alpha$  e  $\gamma$  são maiores em pacientes com a infecção primária que para a secundária (Yeh *et al.*, 2006). As informações referentes aos níveis de citocinas foram confirmados através de diversos estudos e realmente para os pacientes com infecção secundária possuem níveis elevados de IL-10 e de sVCAM-1, mas baixos níveis de IFN $\alpha$  e IFN $\gamma$ . Níveis elevados de IL-10 e baixo de IFN $\gamma$  em pacientes com infecção secundária podem ser relatados devido à presença de anticorpos heterotípicos e fenômenos de reconhecimento anticorpo dependentes (Chen *et al.*, 2001; Perez *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2001).

Os fatores de risco que predispõe a uma anormal manifestação em FD e FHD, são heterogêneos em sua etiologia e com variedades em diferentes organismos (Wahid *et al.*, 2000). Em pacientes com DHF, as anormalidades hemostáticas adquiridas incluem deficiências no fator de coagulação, hiper-fibrinolises, insuficiência hepática e disfunção plaquetária, os quais são bastante comuns. Em contraste, pacientes com FD raramente tem coagulopatias ou lesões vasculares (Srichaikul e Nimmannitya, 2000). De fato os pacientes com FHD possuem menor conteúdo plaquetário e níveis elevados de sVCAM-1 o que pode estar relacionado às lesões vasculares. Os pacientes com

lesões vasculares possuem efusão pleural ou ascite devido aos níveis elevados de sVCAM-1, no entanto, a principal patofisiologia da FHD se deve ao aumento da permeabilidade vascular.

Outra manifestação da Dengue é a presença da glicoproteína NS1 em soro de pacientes contaminados. A proteína NS1 é encontrada associada com as membranas no citoplasma das células infectadas. Quando as células são infectadas com o vírus da Dengue, elas exibem a NS1 sobre a superfície celular ou secretam NS1 dentro do sangue. Por isso muitas glicoproteínas NS1 existem no sangue durante a fase de viremia. Em adição, anticorpos anti-NS1 possuem a habilidade de proteger os animais contra o vírus.

A NS1 secretada é encontrada para ativar complementos na presença ou na ausência de anticorpos específicos e interage com a proteína complementar de regulação, a clusterina, que leva a formação do complexo imune e subsequente fuga para o plasma (Kurosu *et al.*, 2007, Avirutnan *et al.*, 2006). A correlação entre os níveis de NS1 secretada e a severidade da doença tem sido observada (Avirutnan *et al.*, 2006).

Ao contrário da forma secretada, a NS1 associada a superfície celular requer ligação cruzada de anticorpos específicos para induzir eficientemente a ativação de complementos e a transdução de sinais intra- celulares em resposta a infecção do vírus da Dengue (Jacobs *et al.*, 2000).

Assim a NS1 secretada presta-se para o diagnóstico da Dengue, uma vez que é uma glicoproteína solúvel detectada em pacientes com infecção viral aguda, ou seja, coincide com a FHD (Falconar, 1997). Ela é encontrada altamente conservada para todos os sorotipos da Dengue, circulando em níveis elevados durante os primeiros dias da doença, e está correlacionado com o desenvolvimento da FHD (Dussart *et al.*, 2006, Libraty *et al.*, 2002).



### **1.2.2. Diagnóstico da Dengue**

Até o momento não há um tratamento terapêutico específico para a infecção com o vírus da Dengue. No entanto, uma vacina está sendo desenvolvida (Edelman, 2007). A prevenção da doença é o principal objetivo no combate ao Dengue, este fato se deve aos esforços na erradicação do mosquito, o que apresenta avanço limitado. Conseqüentemente, um diagnóstico rápido e apropriado é de fundamental importância para a implementação de um tratamento adequado.

Os sintomas iniciais da infecção pelo vírus da Dengue são muito similares aos da influenza, sarampo, malária, tifo, febre amarela, e outras infecções virais, que levam a um diagnóstico problemático se baseados nos sintomas. Os ensaios de enzima-imunoensaio (ELISA) para a detecção de anticorpos IgG e IgM para o vírus da Dengue são valiosos para a detecção desta infecção, no entanto, o ensaio ELISA possui o inconveniente de uma reação cruzada com outras flavivirose e requer no mínimo de 5 dias de pós infecção para que tenham-se quantidades suficientes de resposta imune para detectar anticorpos no paciente (Chakravarti *et al.*, 2000).

Outras ferramentas convencionais para o diagnóstico do vírus da Dengue são a cultura de tecido e a imunofluorescência, as quais possuem a desvantagem decorrente da limitação em termos de especificidade, sensibilidade, facilidade para o uso e tempo de reação (Vene *et al.*, 1995, Young *et al.*, 2000).

Recentemente, ensaios moleculares baseados na amplificação de ácidos nucleicos têm sido descritos. Todos eles utilizam a reação em cadeia da polimerase (PCR) onde o material genético inicial, RNA genômico é transformado em DNA (Kow *et al.*, 2001). Além disso, o PCR requer uma instrumentação de ciclo térmico. No entanto, tais instrumentos são caros sendo um desafio atual a miniaturização destes sistemas. O produto de reação do PCR é a dupla fita de DNA, que primeiramente deve

ser desnaturada antes do método de detecção por hibridização. Desta forma, o sistema TaqMan (Laue *et al.*, 1999) é muito efetivo na detecção dos produtos amplificados produzidos em tempo real, a instrumentação requerida é grande, cara e não susceptível para aplicação de campo.

Há a necessidade do desenvolvimento de um novo sistema de detecção que possua sensibilidade e que os dados possam ser detectados e processados rapidamente. Estudos têm sido realizados com a microbalança de cristal de quartzo (MCQ), técnica esta destinada a pesquisa de cinética, diagnóstico médico e detecção de microrganismos patogênicos (Zhou *et al.*, 2002). Alguns esforços têm sido realizados com o intuito de imobilizar anticorpos monoclonais contra os antígenos do vírus da Dengue para detecção de antígenos virais através da MCQ (Su *et al.*, 2003), a partir do qual foi desenvolvido imuno-chips de detecção de pacientes contaminados com o vírus da Dengue através da utilização de soro humano (Wu *et al.*, 2005).

A MCQ assim como a ferramenta de espectroscopia de impedância eletroquímica presta-se para o estudo de fenômenos de especificidade entre biomoléculas, podendo desta forma serem utilizadas no estudo do desenvolvimento de biossensores. Portanto, nosso principal objetivo nesta Tese é explorar a capacidade de reconhecimento de glicoproteínas das lectinas, para detecção de glicoproteínas diferenciais em soro de pacientes contaminados com a febre da Dengue e com a febre hemorrágica da Dengue através da espectroscopia de impedância eletroquímica.

## 1.3 INTERFACE ELETROQUÍMICA

### 1.3.1 Processos que ocorrem no eletrodo

Dois tipos de processos ocorrem no eletrodo (faradáicos e não-faradáicos). Quando tais reações são governadas pela lei de Faraday (onde a corrente é proporcional a quantidade de eletricidade que passa), são chamados de processos faradáicos (Bard *et al.*, 2000). Os eletrodos em que os processos faradáicos ocorrem são chamados de eletrodos de transferência de carga. Em algumas condições, uma dada interface eletrodo solução mostra um potencial onde nenhuma reação de transferência de carga ocorre, pois tais reações são termodinamicamente ou cineticamente desfavoráveis.

No entanto, processos tais como adsorção e dessorção podem ocorrer, e a estrutura da interface eletrodo-solução pode mudar com a alteração do potencial ou composição da solução. Estes processos são chamados processos não-faradáicos. Nestes processos a carga não atravessa a interface, e a corrente externa pode fluir quando o potencial, a área do eletrodo ou a composição da solução modifica. Ambos os processos faradáicos e não-faradáicos acontecem quando as reações do eletrodo estão ocorrendo. Os processos faradáicos são usualmente de interesse primário na investigação de uma reação do eletrodo (exceto em estudos da natureza da interface eletrodo-solução) e os efeitos dos processos não faradáicos são importantes para se obter informações sobre a transferência de carga e reações associadas (Bard *et al.*, 2000).

### 1.3.2 Capacitância e carga de um eletrodo

Um capacitor é um elemento de circuito elétrico composto de duas placas condutoras separadas por um material dielétrico, sendo seu comportamento governado pela seguinte equação,

$$\frac{q}{E} = C \quad (\text{Eq. 1})$$

onde  $q$  é a carga armazenada sobre o capacitor (coulombs, C),  $E$  é o potencial que atravessa o capacitor (volts, V) e  $C$  é a capacitância (Farads, F). Quando um potencial é aplicado através de um capacitor, a carga é acumulada sobre este metal até que satisfaça a Eq. 1, esta carga consiste de um excesso de elétrons sobre uma das placas e uma deficiência de elétrons sobre a outra, onde a magnitude da corrente depende da resistência no circuito. Desde que a carga não pode atravessar a interface de um eletrodo idealmente polarizado quando o potencial é alterado, o comportamento da interface eletrodo-solução é análoga a de um capacitor (Bard *et al.*, 2000). Num dado potencial há uma carga sobre o eletrodo metálico e uma carga na solução (Fig. 5).

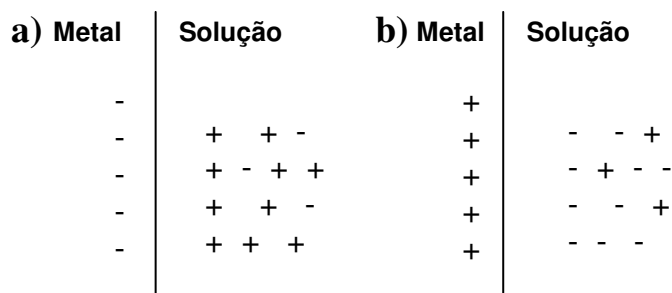


Figura 5 – Interface metal-solução como um capacitor com uma carga negativa (a) e positiva (b) sobre o metal.

A carga sobre o metal pode ser positiva ou negativa dependendo da solução, do potencial e da composição da solução. A carga sobre o metal representa um excesso ou deficiência de elétrons e residem numa camada muito fina ( $< 0,1 \text{ \AA}$ ) sobre a superfície do metal. A carga na solução é constituída de um excesso de cátions ou ânions na vizinhança da superfície do eletrodo. O arranjo das espécies carregadas e a orientação

do dipolo existente na interface metal-solução é chamada de dupla camada elétrica. Num dado potencial a interface eletrodo solução é caracterizada como uma capacitância da dupla-camada,  $C_d$  (Bard *et al.*, 2000).

### **1.3.3 Dupla camada elétrica**

A teoria da dupla camada elétrica trata da distribuição de íons, e, portanto da intensidade dos potenciais elétricos que ocorrem na superfície carregada. Esta é uma primeira etapa necessária para compreender muitas observações experimentais referentes a propriedades eletrocinéticas, estabilidade, dentre outros, de sistemas coloidais formados por partículas carregadas. A maior parte das substâncias adquire uma carga elétrica superficial quando postas em contato com um meio polar, por exemplo, aquoso. Os possíveis mecanismos de criação dessas cargas são a ionização, adsorção de íons ou dissolução de íons. Essa carga superficial influencia a distribuição no meio polar dos íons próximos a ela (Duncan, 1974).

Inicialmente a atração faz com que alguns íons positivos formem uma rígida camada adjacente ao redor da superfície das moléculas, sendo esta camada conhecida como camada de Stern. Outros íons positivos adicionais são atraídos pela molécula negativa, mas estes são rejeitados pela camada de Stern, assim como por outros íons positivos que tentam aproximar-se da molécula. Este equilíbrio dinâmico resulta na formação de uma camada difusa de contra-íons. Os contra-íons têm uma alta concentração próxima da superfície, a qual diminui gradualmente com a distância até que se obtenha o equilíbrio com os íons da solução.

Na camada difusa há uma deficiência de íons negativos, chamados co-íons, pois têm a mesma carga que a molécula. Sua concentração incrementa gradualmente ao afastar-se da molécula. Os contra-íons da camada de Stern mais os co-íons e contra-íons

da camada difusa são os que juntos formam a dupla camada. Considerando que a carga elétrica dos sólidos suspensos numa solução aquosa atrai uma atmosfera de íons de carga contrária, sendo parte dessa atmosfera difusa. A Fig. 6 representa a dupla camada elétrica numa interface sólido/eletrólito.

#### ***1.3.4 Potencial Zeta***

Quase todos os materiais macroscópicos ou particulados adquirem uma carga elétrica superficial quando estão em contato com um líquido. O potencial zeta é um indicador dessa carga e é importante nos estudos de química de superfície, visto que pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões ou emulsões coloidais. Estudos eletroquímicos onde há formação de interface entre metal e solução de eletrólitos representam uma aproximação do que ocorre nos sistemas partícula meio aquoso e têm contribuído consideravelmente para o estudo das interfaces. A medida do potencial zeta é, com frequência, a chave para compreender processos de dispersão e agregação em aplicações tão diversas quanto à purificação de água, moldes cerâmicos ou formulação de tintas e cosméticos.

Os processos de adsorção de proteínas nas superfícies metálicas alteram o comportamento da dupla camada elétrica da interface eletrodo-solução de modo que alteram a cinética de transferência de elétrons do eletrodo.

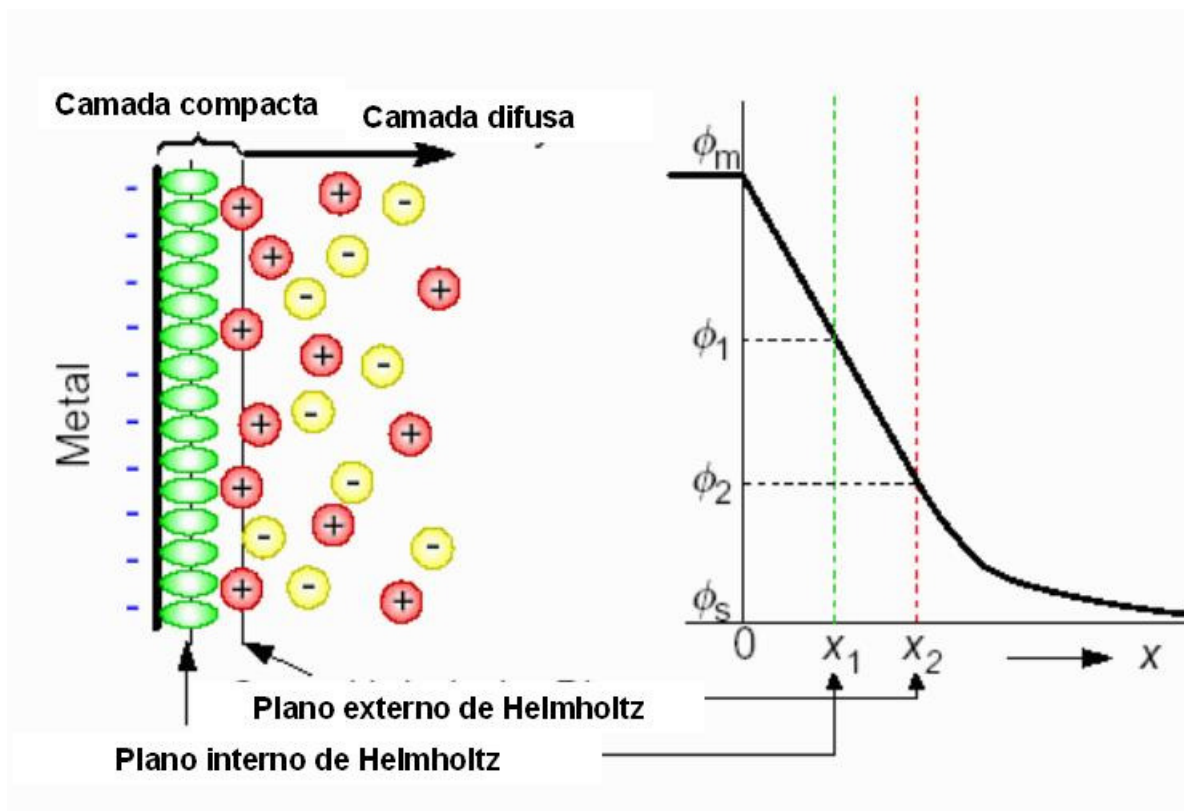


Figura 6 - Modelo da dupla camada elétrica (Electric Double Layer,

[www.chemistry.nmsu.edu/.../double\\_layer.html](http://www.chemistry.nmsu.edu/.../double_layer.html) ).

Existem algumas formas de modificação das superfícies eletroquímicas para o desenvolvimento de biossensores estas por sua vez são exploradas com o objetivo de promover um aumento das respostas eletroquímicas e manter a estabilidade das biomoléculas tais como as lectinas.

### 1.3.5 Fatores que afetam a taxa de reação do eletrodo

Considerando uma reação completa do eletrodo,  $O + ne \leftrightarrow R$ , compostos de uma série de etapas que causam a conversão das espécies dissolvidas oxidadas (O) para uma forma reduzida (R) ambos em solução, ela pode ser governada pelos seguintes processos (Bard *et al.*, 2000):

- 1- Transferência de massa (ex: de O do volume da solução para a superfície do eletrodo);

- 2- Transferência de elétrons na superfície do eletrodo;
- 3- Reações químicas precedidas ou seguidas de transferência de elétrons. Estes devem ser processos homogêneos (ex: decomposição ou dimerização), ou heterogêneo (ex: decomposição catalítica) sobre a superfície do eletrodo;
- 4- Outras reações de superfície, tais como a adsorção, dessorção, ou cristalização (eletrodeposição).

As reações mais simples envolvem apenas a transferência de massa de um reagente para o eletrodo, transferência de elétrons heterogênea envolvendo espécies não-adsorvidas e transferência de massa do produto para o volume da solução (Bard *et al.*, 2000).

## **1.4. MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIES ELETROQUÍMICAS**

### ***1.4.1 Nanopartículas***

Nos últimos anos a nanotecnologia tornou-se numa das mais importantes e atrativas áreas de investigação, nos campo da Ciência dos Materiais, Física, Química, Engenharia e Biologia. O corrente interesse na área da nanotecnologia remonta aos anos compreendidos entre 1996 e 1998 em que a Fundação Nacional para a Investigação Científica dos EUA (National Science Foundation) decidiu realizar estudos na área da nanotecnologia, tendo por objetivo fazer uma avaliação das suas potencialidades, nomeadamente na inovação tecnológica.

O prefixo nano é utilizado para estruturas nanodimensionadas (escala de  $10^{-9}$ m), as quais necessitam de ampliação com valores superiores a 10 milhões de vezes. A nanotecnologia refere-se a tecnologias em que a matéria é manipulada à escala atômica



e molecular para criação de novos materiais e processos com características funcionais diferentes dos materiais comuns.

A junção da nanoengenharia com a biologia permite a manipulação dos sistemas vivos e/ou construção de materiais biologicamente inspirados a nível molecular sendo, atualmente, um dos grandes desafios no desenvolvimento de biossensores.

Uma classe especial de partículas coloidais é formada pelas nanopartículas, que são partículas de dimensões nanométricas. Esta é uma região de dimensões em que as partículas são formadas por apenas alguns átomos ou moléculas, ou poucas dezenas. Portanto é uma região muito especial, em que a matéria apresenta propriedades intermediárias entre as dos átomos isolados e a dos sólidos ou líquidos em dimensões microscópicas ou macroscópicas.

Observações sobre as peculiaridades óticas de materiais nanoparticulados são muito antigas. Faraday observou as diferentes cores do ouro coloidal (cujos sóis são azuis ou vermelhos, dependendo dos métodos de preparação) e corretamente atribuiu essas diferenças a mudanças em tamanhos de partículas de ouro.

Atualmente, um dos novos materiais, que ocupa muitos pesquisadores, é o silício poroso que é um material nanoparticulado que possui grande analogia com o ouro coloidal de Faraday. O silício monocristalino não luminesce significativamente no visível. Contudo, nanopartículas ou outras nanoestruturas do silício luminescem fortemente, o que é atribuído ao efeito do confinamento quântico, ou seja, o efeito do tamanho das partículas sobre os níveis de energia dos elétrons que elas contêm. Este assunto recebeu muita atenção, por causa da expectativa de que a luminescência do silício poroso venha a ser a base de dispositivos optoeletrônicos integralmente baseados em silício.

Além das suas peculiares propriedades eletrônicas e óticas, nanopartículas apresentam outra propriedade fascinante, a superplasticidade. Isto é, um sólido rígido e pouco deformável pode ser moldado em objetos, mesmo à temperatura ambiente ou temperaturas moderadas, com relativa facilidade (desde que esteja na forma de nanopartículas). A origem da superplasticidade é bastante simples, e pode ser resumida em uma série de tres afirmações e uma conclusão:

- a) a plasticidade de um sólido depende do seu volume livre, isto é, do volume que não é efetivamente ocupado pelas nuvens eletrônicas dos átomos constituintes;
- b) o volume livre, em um sólido particulado, é maior na sua superfície que no seu interior, devido às distâncias interatômicas serem maiores na superfície;
- c) nanopartículas têm uma elevada relação área superficial / volume, portanto: nanopartículas têm um volume livre maior que partículas do mesmo material mas de dimensões maiores, e são mais plásticas que estas.

#### ***1.4.2 Uso de Nanopartículas***

As nanopartículas possuem propriedades físicas e químicas não-usuais, dependendo do seu tamanho, formato e agentes estabilizantes. A catálise pode ser considerada como uma das mais populares aplicações dos metais de transição, especialmente os metais nobres, devido à elevada atividade catalítica para muitas das reações químicas. As nanopartículas também facilitam a transferência de elétrons e podem ser facilmente modificadas com uma grande variedade de biomoléculas e ligantes. Tais características e ainda a fácil miniaturização de dispositivos em dimensões nano fazem das nanopartículas susceptíveis para aplicação em sensores químicos/bioquímicos. Nos últimos anos tem aumentado o interesse do uso das nanopartículas na eletroquímica (Chiou *et al.*, 1996, Zheng *et al.*, 2000).

A modificação da superfície do eletrodo, com nanopartículas metálicas tem levado ao desenvolvimento de vários sensores eletroquímicos. Em particular, as nanopartículas de platina, têm sido intensamente investigadas para o desenvolvimento de eletrodos (Gamez *et al.*, 1996, Antoine *et al.*, 2001). Filmes de platina nanoestruturados foram eletrodepositados sobre microeletrodos para aumentar a área de superfície com elevação das características de transporte de massa e mostrou ser um excelente sensor amperométrico para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em larga faixa de concentração (Evans *et al.*, 2002).

Em adição, as nanopartículas de ouro (Yu *et al.*, 2003, Pan *et al.*, 2003), e nanopartículas de SiO<sub>2</sub> (Hilliard *et al.*, 2002, Chen *et al.*, 1996) estão sendo largamente utilizadas na construção de biossensores eletroquímicos. A combinação de materiais nanométricos e biomoléculas são de interesse na biotecnologia e química bioanalítica, pois as nanopartículas (especialmente as nanopartículas de ouro) podem promover um bom desempenho dos biossensores pelo aumento da área de superfície específica e uma excelente biocompatibilidade.

#### **1.4.3 Adsorção de proteínas sobre superfícies**

O comportamento interfacial das proteínas em superfícies tem atraído muita atenção nos últimos anos em consequência da necessidade imobilizar enzimas e proteínas para a purificação, separação, e aplicações biotecnológicas (Fitzgerald *et al.*, 1989), e da necessidade de impedir a aderência de proteínas às superfícies, devido aos custos e aos problemas encontrados em superfícies industriais (Dejong *et al.*, 1997, Changani *et al.*, 1997), membranas de microfiltração (Marshall *et al.*, 2003, James *et al.*, 2003), em dispositivos de implantes e biossensores médicos (Khan *et al.*, 1996, Kanagaraja *et al.*, 1996).

A interação entre proteínas e superfícies é sensível a alguns fatores que incluem a conformação, concentração da proteína na solução, pH, força iônica e temperatura do eletrólito, e a carga da superfície e as características de superfície dos metais em que a adsorção ocorre. Conseqüentemente, estudos que conduzem a uma compreensão fundamental das propriedades e dos mecanismos que governam a adsorção das proteínas são particularmente importantes.

O interesse no estudo da adsorção de lectinas em superfícies metálicas tem promovido a elucidação dos fenômenos que governam sua adsorção, a interação bioespecífica com açúcares, e proporcionado o desenvolvimento de biossensores para carboidratos. A avaliação eletroquímica da interação proteína-carboidrato adsorvida em superfície metálica tem solucionado problemas, tais como a heterogeneidade, complexidade de estudos com superfícies celulares, e fraca afinidade de ligação, que são limitadas pelas interações multivalentes das lectinas com os complexos de açúcares na superfície celular e com os receptores protéicos que contêm múltiplos domínios de reconhecimento a carboidrato (Boggs *et al.*, 2004).

Estudos de avaliação da interação de ConA-manose adsorvidos sobre eletrodo de carbono vítreo permitiram demonstrar que o processo de sua interação à carboidratos não foi afetado pela adsorção em filmes de colágeno. A interação foi verificada através de modificações na resposta do eletrodo. Através deste método houve seletividade da ConA em relação à manose, enquanto que não houve reconhecimento sítio-específico para glicose e galactose (Sugawara *et al.*, 2006).

Uma das vantagens do processo de adsorção das lectinas em superfícies metálicas é a possibilidade de obter a constante de afinidade da interação lectina-carboidrato através de técnicas como voltametria cíclica, microbalança de cristal de quartzo, superfície de banda de plásmons e microscopia de força atômica, elucidando

eventos que governam a interação. Esta análise pôde ser verificada em estudos da lectina ConA com manose, galactose e lactose em monocamadas auto-montadas de azido-açúcares (Zhang *et al.*, 2006).

Os estudos com as lectinas em superfícies para o desenvolvimento de sensores não servem apenas para obter informações sobre a cinética e dados termodinâmicos do reconhecimento lectina-açúcar, ensaios mitogênicos, purificação de glicoproteínas, isolamento de antígeno viral, estudos de aglutinação celular, agregação bacteriana dentre outros, mas também podem ser usados para compreender as forças que governam estas interações.

#### ***1.4.4 Superfícies quimicamente modificadas***

O desenvolvimento de sensores eletroquímicos é uma das áreas de maior e mais rápido crescimento dentro da química analítica, principalmente, devido aos desafios impostos pelas necessidades analíticas da indústria nos seus diversos ramos, no controle e vigência ambiental e investigações bioanalíticas (Gifford *et al.*, 2006). Inicialmente, se utilizaram para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos os denominados eletrodos base, os quais são compostos por metais ou ligas, grafite ou metais líquidos. Tais eletrodos eram úteis para a determinação de algumas espécies químicas de interesse, mas apresentavam dificuldade de discriminar entre compostos alvos que possuíam característica redox similares, e sofriam com a passivação gradual de sua superfície, que é consequência principal da adsorção dos produtos da própria reação de óxido-redução utilizada na detecção, ou ainda, dos subprodutos destas reações que podem se polimerizar e se depositar sobre a superfície dos eletrodos (Li *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2000).

Com o objetivo de minimizar os supracitados problemas surgiram os eletrodos

modificados. Através das modificações é possível manipular e controlar, conforme a finalidade da modificação, as propriedades físico-químicas da superfície eletródica, de forma a alterar a reatividade e seletividade do sensor base, favorecendo assim, características que podem contornar, efetivamente, muitos dos problemas apresentados pelos sensores eletroquímicos tradicionais, como sensibilidade ou seletividade (Freire *et al.*, 2003, Pereira *et al.*, 2002).

Na busca de maior seletividade e eficiência na transferência eletrônica voltada para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos nasceram os biossensores, definidos como um dispositivo que incorpora um elemento biológico de reconhecimento intimamente conectado a um transdutor (Eggins *et al.*, 1996). Este componente biológico pode ser um microrganismo, um anticorpo, oligonucleotídeos, lectinas, enzimas ou qualquer outra biomolécula que possa interagir com substratos alvo (Sotomayor *et al.*, 2002). As enzimas e os transdutores amperométricos são, respectivamente, os componentes biológicos e transdutores mais comumente utilizados na confecção de biossensores (Chaubey *et al.*, 2002, Prodomidis *et al.*, 2002).

O grande interesse por este tipo de dispositivo deve-se à combinação da alta seletividade das enzimas em reconhecer compostos alvos com o acompanhamento direto da reação biocatalítica através de um sinal de corrente (Chaubey *et al.*, 2002), o que permite a determinação de vários compostos de interesse de forma rápida, simples e direta.

O acoplamento eletrônico entre estas enzimas e o eletrodo nos biossensores pode ser realizado por meio de diferentes mecanismos: **a)** pela eletroatividade do substrato ou produto enzimático, biossensores de primeira geração (Zhang *et al.*, 2000); **b)** pelo auxílio de mediadores, livres em solução ou imobilizados juntamente com a enzima, biossensores de segunda geração (Chaubey *et al.*, 2002); e finalmente **c)** pela

transferência eletrônica direta entre a superfície do eletrodo e o centro ativo da enzima, biossensores de terceira geração (Jia *et al.*, 2002).

Várias estratégias de imobilização de enzimas na superfície de eletrodos como a ligação covalente cruzada com glutaraldeído, a adsorção, a oclusão em matrizes poliméricas e adsorção são relatadas na literatura (Andreescu *et al.*, 2004, Deisingh *et al.*, 2004). A imobilização do elemento biológico empregando-se monocamadas auto-organizadas permite um maior controle da distância e orientação do centro de óxido-redução em relação à superfície do eletrodo, facilitando a construção e o desempenho dos biossensores (Gilard *et al.*, 2001).

### **1.5 Construção de Biossensores**

Os biossensores são instrumentos analíticos que possuem um sensor biológico conectado ou integrado ao transdutor. O elemento biológico é capaz de detectar a presença, atividade ou concentração de um analito químico em solução (D’Orazio *et al.*, 2003). Como sensores biológicos podem ser utilizados: enzimas, anticorpos, células de plantas e animais, fragmentos de DNA ou lipídios. O transdutor pode ser um eletrodo, fibra óptica ou quartzo oscilante (Kauffmann *et al.*, 2002). O objetivo do biossensor é produzir um sinal eletrônico que é proporcional a concentração de uma substância química específica ou um grupo de substâncias (Fig. 7).

O sensor biológico se integra ao transdutor de três formas: preso a uma membrana que é fixada na superfície do transdutor, adsorvido na superfície do transdutor ou ligado através de ligações covalentes diretamente no transdutor, na qual faz parte a construção em polímeros.



Figura 7 – Representação esquemática de um biossensor eletroquímico.

O reconhecimento de moléculas incorporadas apresenta um elevado nível de seletividade, mas é vulnerável a condições extremas de variação de temperatura, pH e força iônica (Karyakin *et al.*, 1999). Moléculas biológicas tais como enzimas, anticorpos, DNA, etc., podem ser fixadas em uma matriz. A atividade de moléculas imobilizadas depende da área superficial, porosidade, caráter hidrofílico da matriz imobilizada, condições de reação e metodologia escolhida para a imobilização.

As técnicas de imobilização de materiais mais utilizadas para desenho e desenvolvimento de biossensores são: adsorção, armadilha (*entrapment*), ligação cruzada (*cross-linking*) e ligação covalente (Fig. 8).

Biossensores apresentam aplicações na indústria farmacêutica, na detecção de doenças hereditárias, monitoramento ambiental para o controle de poluição, detecção de substâncias químicas perigosas e na indústria de alimentos.

A detecção de drogas, genes e outras substâncias biológicas por biossensores com DNA são baseados em fenômenos da química dos ácidos nucleicos como, por exemplo, hibridização e ligação a drogas. A hibridização envolve a imobilização de uma sonda de nucleotídeo, ligando-se a uma seqüência complementar ao oligonucleotídeo alvo ou de um fragmento de DNA. Por outro lado, drogas ou intercalantes de bases podem se inserir na dupla fita do DNA, sendo observada mudança eletroquímica no sistema (Cunningham *et al.*, 1998).



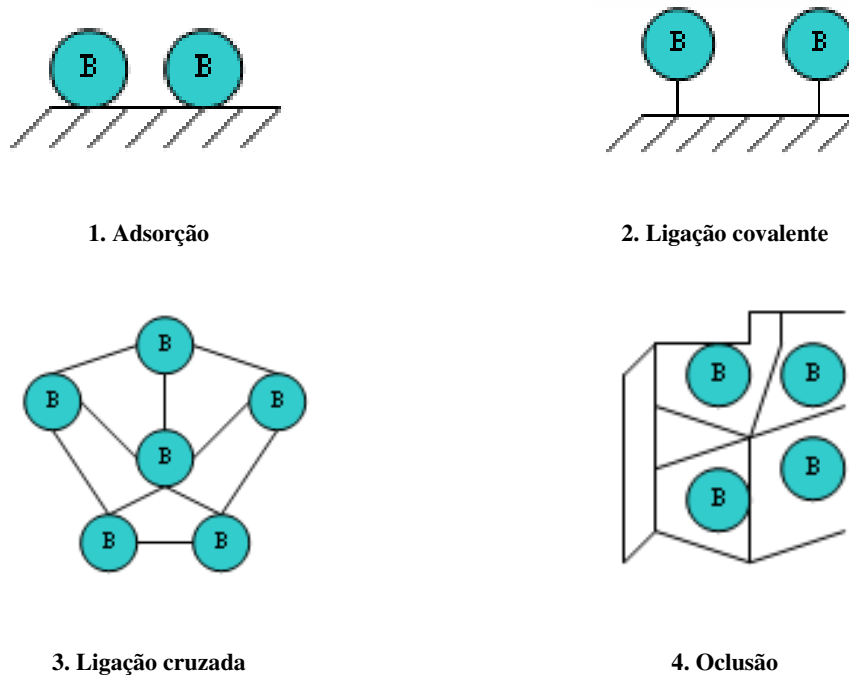


Figura 8 - Métodos de imobilização de biomoléculas. B: biomolécula.

O sequenciamento completo do genoma de alguns organismos incluindo o genoma humano leva a necessidade de novas metodologias de detecção de DNA e seus polimorfismos. A maior parte dos métodos se baseia na imobilização de fragmentos curtos de DNA de oligodeoxinucleotídeos na superfície de óxidos de metais, carbono vítreo ou polímeros (Wang *et al.*, 1996; Mazzarra *et al.*, 1994).

Os imunossensores têm proporcionado a detecção de doenças e patógenos. Pathirana *et al.* (2002) utilizaram um imunossensor para detecção e quantificação da bactéria patogênica *Salmonella typhimurium* através da imobilização de um anticorpo na superfície de um cristal de quartzo. A ligação entre a bactéria e a superfície muda os parâmetros de ressonância do cristal que são quantificados pela voltagem de saída do sensor. O biossensor teve um limite de detecção, de  $10^2$  a  $10^5$  unidades formadoras de colônia (UFC)/mL, inferior à dose infecciosa de *Samonella* ( $10^5$  UFC/mL). O sensor preservou 75% da sua sensibilidade por um período de 32 dias.

Os biossensores enzimáticos apresentam como principal vantagem à especificidade, seletividade e pequeno tempo de resposta; e como desvantagens a possibilidade de instabilidade (imobilização em suportes ou utilização das enzimas naturalmente imobilizadas dentro das células) e em algumas reações não há a necessidade de co-fatores. Salgado *et al.* (1997), desenvolveu um biossensor de sacarose imobilizando as enzimas invertase e mutarotase (por ligação cruzada) em pérolas de vidro. O transdutor utilizado foi um eletrodo de pH. O biossensor foi integrado em um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) e a faixa de medição foi de 5 – 20 g/L apresentando boa linearidade e reprodutibilidade e ganho de 5,2 mV.L/g.

A utilização de microorganismos evita as etapas de purificação, preservando a enzima em seu ambiente natural protegendo-a da inativação por agentes tóxicos externos, tais como, metais pesados. O uso de células é limitado pela baixa especificidade quando comparada com os biossensores contendo a enzima pura e pelo maior tempo de resposta. No entanto, quando a célula é permeabilizada a maioria dos cofatores de baixo peso molecular saem da célula, minimizando reações não-desejadas (D'Souza *et al.*, 2001).

No caso da enzima de interesse estar localizada no periplasma as células podem ser empregadas sem permeabilização. Tkac *et al.* (2001) utilizou células de *Gluconobacter oxydans* (conhecida como bom oxidante de etanol) retidas na superfície de um eletrodo amperométrico por uma membrana de acetato celulose. O sensor exibiu boa estabilidade operacional. A sensibilidade do sensor foi de 3,5  $\mu\text{A}/\text{mM}$  e uma faixa linear de 2 – 270  $\mu\text{M}$  com um tempo de resposta de 13s. No entanto o sensor não é específico para etanol, detectando também propanol e butanol com a mesma sensibilidade (Tkac *et al.*, 2001).

Recentemente têm sido desenvolvidos vários tipos de sensores utilizando lectinas, seja para a identificação das mesmas ou com o intuito de investigar a interação lectina-carboidrato. Os métodos de investigação variam desde a adsorção direta das lectinas em superfícies metálicas ou através de superfícies modificadas.

A especificidade das lectinas às moléculas de carboidrato tem permitido o desenvolvimento de sensores específicos para açúcares, bem como de imunossensores para detecção de lectinas. Eletrodo de platina modificado por silanização foi utilizado em estudos para a adsorção das lectinas WGA (lectina de gérmen de trigo) e proBI. A partir disso, foi realizado um ensaio de reconhecimento destas lectinas utilizando seus anticorpos específicos (Sadik *et al.*, 2007).

No desenvolvimento de sensores para monitorar a interação de proteína-ligante em sistemas *in vivo* foi desenvolvido um sistema com colágeno em superfície de eletrodo de carbono vítreo para avaliar a interação entre ConA e o monossacarídeo manose. Através da técnica eletroquímica de voltametria cíclica pôde-se verificar que a lectina ConA tinha a seletividade de reconhecimento para este sacarídeo quando em filmes de colágeno, mostrando esta metodologia ser promissora no advento de um biossensor (Sugawara *et al.*, 2006).

Sensores não aliados a técnicas eletroquímicas também estão sendo propostos na literatura utilizando a espectroscopia na faixa do UV-vis, tal como o desenvolvimento de um filme de ConA-glicogênio em superfície de quartzo que é sensível a presença de D-glicose e D-manose, sofrendo desintegração quando em contato com estes sacarídeos, podendo desta forma ser utilizado tanto como sistemas biossensíveis quanto para sistemas de liberação controlada (Sato *et al.*, 2005).

As superfícies modificadas com carboidratos também têm atraído a atenção no desenvolvimento de sensores para lectinas de diferentes especificidades. O uso de

azido-açúcares (manose, lactose e galactose) mostrou ser eficiente para diferenciar a lectina ConA da lectina de *Erythrina cristagalli* (ECL), através da voltametria cíclica e da impedância eletroquímica (Zhang *et al.*, 2006).

Podemos observar a importância em caracterizar e avaliar o desenvolvimento de biossensores. Desta forma, técnicas como a espectroscopia de impedância eletroquímica, voltametria cíclica, microscopias de força atômica e eletrônica de varredura se destinam para avaliar alterações do comportamento eletroquímico da interface eletrodo-solução pela presença de biomoléculas, bem como a observação de características morfológicas que elucidam pormenores de uma superfície modificada.

## **1.6 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA**

### ***1.6.1 Espectroscopia de impedância eletroquímica (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 superimposta uma variação senoidal de potencial de 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 sob investigação é de pequena amplitude é possível empregar a técnica para a análise de etapas de um mecanismo reacional (Sluyters-Rehbech, 1994; Bard, 2001).

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).

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, entre outros (Jiang *et al.*, 2002).

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. A aplicação de circuitos equivalentes tem como fundamento as similaridades entre o comportamento da célula eletroquímica (Fig. 9a) e um circuito elétrico de resistores, capacitores e indutores. Uma equivalência típica entre um circuito equivalente e um sistema eletroquímico é apresentada na Figura 9b. O comportamento similar da dupla camada elétrica a um capacitor de placas paralelas (modelo de Helmholtz) e a resistência à transferência de carga na interface eletrodo/solução é conduzida pelos íons em solução, o efeito resistivo na solução sobre a migração dos íons é representado por uma resistência  $R_w$ . Por outro lado, a introdução de elementos capacitivos em um circuito promove uma defasagem entre a corrente e o potencial. Desta forma, uma representação comum para a impedância em sistemas compostos por resistores e capacitores é através de um diagrama de fasores no qual a impedância apresenta uma componente real (resistiva) e imaginária (capacitiva).

Para o circuito equivalente apresentado (Fig. 9b) as componentes real ( $Z'$ ) e imaginária ( $Z''$ ) da impedância do sistema são:

$$Z' = R_{\Omega} + \frac{R_{ct}}{1 + \omega^2 C_d^2 R_{ct}^2} \quad \text{e} \quad Z'' = \frac{\omega C_d R_{ct}^2}{1 + \omega^2 C_d^2 R_{ct}^2} \quad (\text{Eq. 2})$$

onde,  $R_{\Omega}$  - resistência da solução,  $R_{CT}$  - resistência à transferência de carga,  $\omega$  - frequência angular e  $C_d$  - capacitância da dupla camada elétrica.

Conforme pode ser observado nas expressões (Eq. 2) na região de altas frequências a componente real da impedância tende a  $R_{\Omega} + R_{CT}$ . Ao avaliar este comportamento é possível inferir como obter informações sobre a resistência da solução na região de altas frequências e na região de baixas frequências sobre os processos de eletrodo (resistência à transferência de carga).

Pode ser verificado na expressão anterior que um gráfico de  $Z'$  em função de  $Z''$  resulta num comportamento circular (Fig. 9a) com raio de  $R_{CT}/2$  e centro em  $Z' = R_{\Omega} + R_{CT}/2$  e  $Z'' = 0$ . Neste contexto, a representação gráfica  $Z''$  (componente imaginária da impedância) vs  $Z'$  (componente real da impedância), também denominado diagrama de Nyquist ou gráfico de Cole-Cole (Fig. 9c), pode fornecer informações sobre as possíveis naturezas dos elementos que constituem a impedância do sistema (Zoltowski, 1994; Alves *et al.*, 2002).

Adicionalmente, representações de  $\log |Z|$  ( $|Z|$  - módulo da impedância) e  $\varphi$  (ângulo de fase) vs  $\log \omega$  ( $\omega$  - frequência), chamadas de curvas de Bode (Fig. 9d), são de grande importância para a interpretação de dados provenientes da EIE, pois as informações obtidas a partir destes gráficos podem ser complementares às obtidas no diagrama de Nyquist. Conforme pode ser observado na Fig. 9d, as alterações no módulo da impedância indicam os efeitos da resistência à transferência de carga no sistema.

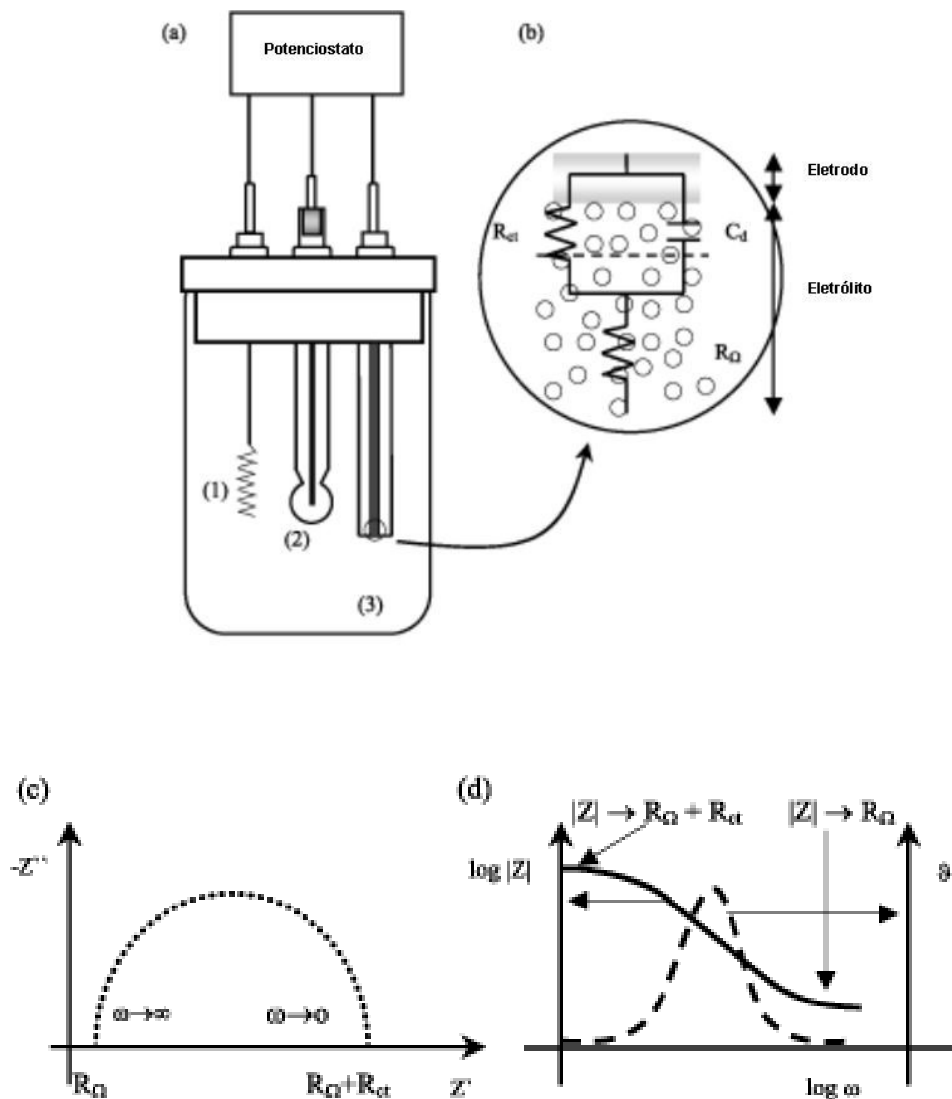


Figura 9 – Célula eletroanalítica típica de três eletrodos para uso em EIE (a): (1) eletrodo auxiliar, (2) eletrodo de referência e (3) eletrodo de trabalho diagrama de esquemático de um circuito de Randles superimposto à interface eletrodo/eletrolito (b), diagrama de impedância (diagrama de Nyquist) referente ao circuito equivalente apresentado na figura (c) e diagrama de Bode correspondente ao diagrama de Nyquist apresentado (d).

Por outro lado, à medida que a frequência do sistema é aumentada observam-se alterações no ângulo de fase entre o potencial aplicado e a corrente resultante. Esta alteração no ângulo de fase possibilita a obtenção de informações sobre a componente

capacitiva do sistema, uma vez que as componentes capacitivas introduzem um comportamento co-senoidal na corrente (Sluyters-Rehbech, 1994).

Desta forma, os efeitos da transferência de carga ( $R_{CT}$ ), da dupla camada elétrica ( $C_d$ ), bem como os efeitos da solução sobre a migração de íons ( $R_w$ ), podem ser obtidos mediante a avaliação de diagramas de Nyquist e curvas de Bode.

Adicionalmente, nos sistemas que apresentam efeitos significativos da impedância à transferência de massa ( $Z_{tm}$ ) a introdução de um elemento denominado impedância de Warburg é feita com o propósito de simular as características do sistema experimental, tanto em processos que sofrem difusão linear, esférica ou sob convecção forçada. Neste contexto, um grande conjunto de fatores pode influenciar a impedância do sistema, como processos faradáicos, adsorção de espécies eletroativas e não-eletroativas, reações no eletrodo envolvendo a formação de intermediários estáveis e heterogeneidade de superfícies, de forma a proporcionar à EIE um amplo campo de aplicação.

A espectroscopia de impedância eletroquímica tem sido amplamente aplicada, com propósito complementar aos mais variados setores da eletroquímica, como cinética de eletrodo, estudos de dupla camada, processos em baterias, investigação sobre processos de corrosão, eletroquímica em estado sólido e bioeletroquímica (Fey *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2001; Salkind *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2002).

Mediante o emprego de EIE, Heiduschka e colaboradores (Rickert *et al.*, 1996) caracterizaram monocamadas auto-organizadas mistas de undecanotiol sobre ouro modificadas com fragmentos de antígeno viral (epítomos), com o propósito de reduzir a necessidade de métodos de separação entre o antígeno e o anticorpo, minimizando o dano ao receptor. Uma vez confeccionadas as monocamadas, as medidas de impedância



foram utilizadas para permitir o cálculo da componente capacitiva do sistema, para o monitoramento contínuo de interações entre o antígeno e o anticorpo.

Ouerghi e colaboradores (2001) aplicaram a EIE num sistema contendo poli-2-ciano-etilpirrol modificado com anticorpo policlonal de coelho como sensor para o antígeno policlonal de coelho. A EIE foi aplicada na investigação do aumento da resistência do polímero, associado com o incremento da resistência à transferência de carga, bem como para avaliar a redução da impedância difusional do sistema, pois possibilita obter informações relevantes sobre as condições de operação otimizadas do eletrodo de trabalho.

As aplicações analíticas da EIE têm se estendido às investigações de hibridização de oligômeros de DNA, mediante o acompanhamento da impedância total do sistema. Estas investigações são possíveis, pois a impedância total do sistema está associada ao aumento da componente capacitiva do sistema. Além disso, a componente capacitiva do sistema é resultante de mudanças na densidade e mobilidade de íons associados com a reação de hibridização (Guisseppi-Elie *et al.*, 2004). Um trabalho de estudo do DNA (Strasak *et al.*, 2002), teve o propósito de avaliar diferenças entre a conformação duplo-hélice e a conformação simples, bem como a cinética de adsorção e mobilidade de segmento de polinucleotídeos adsorvidos, avaliaram a capacitância diferencial em eletrodos contendo DNA adsorvido.

### ***1.6.2 Impedância em circuitos elétricos***

As reações na interface eletroquímica abrangem tópicos tais como a natureza da interface eletrodo-solução, termodinâmica e cinética de reações de eletrodo, bem como efeitos de transporte de massa. Por sua vez, as reações eletroquímicas são, em essência, reações químicas e como regra ocorrem de acordo com princípios químicos gerais.

Há, contudo, certas características das reações eletroquímicas que são únicas. Algumas delas envolvem a transferência de elétrons (sendo categorizadas, portanto, como reações de óxido-redução); são heterogêneas em natureza, o que implica em cinética heterogênea e, portanto, depende das dimensões, da área do eletrodo e das propriedades de interface do eletrodo (MacDonald, 1987); a corrente é uma medida simples da velocidade da reação; mudanças na velocidade da reação são induzidas pelo potencial e, a passagem da corrente através de uma célula eletroquímica representa a transição entre condutividade eletrônica (no eletrodo) e condutividade iônica (na solução). O último item indicado implica que a corrente seria controlada não somente pela resistência da solução, mas em grande extensão pela impedância da interface entre eletrodo e solução.

Esta última, por sua vez, depende de fatores relacionados à velocidade de transferência dos elétrons que fluem através da superfície do eletrodo (processo cinético), da capacitância interfacial e das limitações de transporte de massa. É muito importante entender como a interface eletrodo/solução se comporta. A representação de uma interface eletrificada simples, isto é, quando a interface se comporta até certo ponto analogamente a uma combinação em paralelo de um resistor  $R_{CT}$  e um capacitor  $C_{dl}$ , pode ser feita por um modelo de circuito equivalente (Fig. 10).

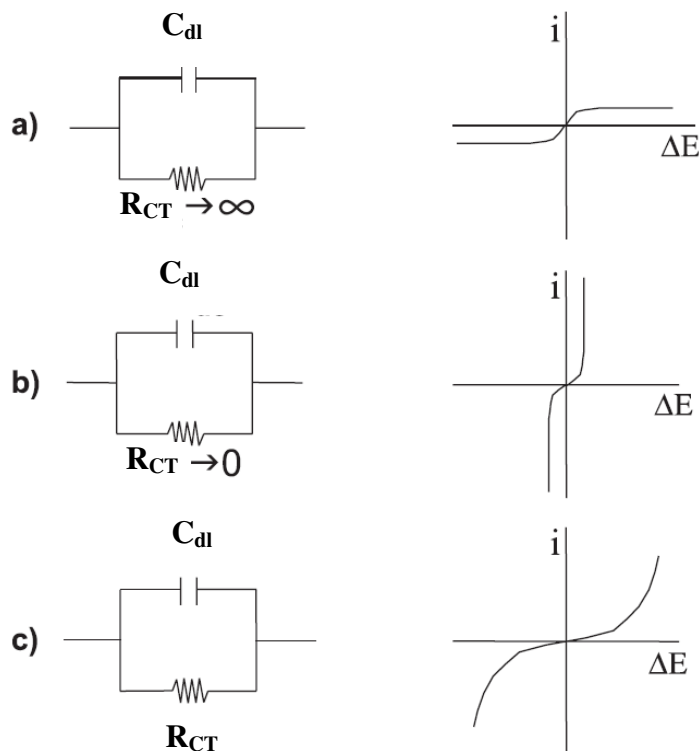


Figura 10 - Circuitos elétricos equivalentes para interface eletrodo/solução e correspondentes curvas de corrente-potencial ( $i - \Delta E$ ): altamente polarizável (a), reversível (b) e intermediário (c) (de Carvalho *et al.* 2006).

O  $R_{CT}$  representa a relação entre corrente e potencial associada com o processo de transferência de carga, a  $C_{dl}$  representa a capacitância associada com a dupla camada elétrica, sendo ambos os parâmetros dependentes do potencial.

A Fig. 10a corresponde à situação em que  $R_{CT}$  é muito grande. Nessas condições o potencial na interface pode ser modificado substancialmente sem ocasionar fluxo significativo de corrente. Esta interface é chamada de interface polarizável. A Fig. 10b corresponde à situação oposta (i.e.,  $R_{CT}$  é muito pequena), onde o potencial é fixado pela composição da solução. Qualquer mudança no potencial causa um fluxo substancial de corrente até que uma nova situação seja estabelecida na interface, sendo a

mesma denominada de interface não polarizável. A Fig. 10c representa o caso intermediário, em que o  $R_{CT}$  tem certo valor finito.

No desenvolvimento de modelos baseado em métodos de EIE, a resposta da célula eletroquímica é convencionalmente descrita por um circuito equivalente ou por equações cinéticas que levam às funções de impedância. De maneira geral, os modelos de impedância consistem em estabelecer equações que incluem a equação de Nernst-Planck e de Poisson, além de condições de contorno apropriadas ao sistema. Geralmente é desejável um modelo que tenha solução analítica. Os modelos podem ser expressos em termos de análogos de circuito elétrico, neste caso, a cada frequência, um circuito equivalente fornece uma representação total da distribuição de potencial elétrico no sistema e cabe ao analista relacionar qual é o modelo físico que está por trás do circuito elétrico proposto.

Uma representação típica de um sistema composto por capacitores e resistores é o circuito equivalente de Randles (Fig. 11) o qual é útil para a análise da impedância causada por uma reação de óxido-redução em uma interface eletrodo-solução (Boukamp, 1996).

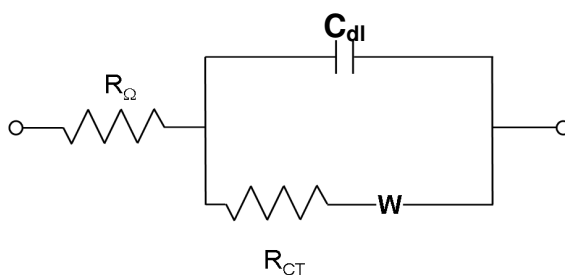


Figura 11 – Circuito equivalente de Randles para uma interface eletrodo-solução.

Estão presentes quatro elementos neste circuito: a resistência da solução eletrolítica,  $R_{\Omega}$ , a impedância de Warburg,  $Z_W$  ou  $W$ , a capacitância da dupla camada elétrica,  $C_{dl}$ , e a resistência de transferência de carga,  $R_{CT}$ . Os componentes,  $R_{\Omega}$  e  $Z_W$ ,

representam as propriedades da solução eletrolítica e a difusão do par redox estudado, respectivamente.

No circuito acima, a resistência ôhmica está em série indicando que a corrente capacitiva e a faradáica passam pela solução, no entanto, a presença dos elementos em paralelo é devido à separação da corrente para o processo capacitivo e processo faradáico. A capacitância da dupla camada elétrica é representada por  $C_{dl}$  por possuir a característica de capacitor.

Este modelo prevê que a corrente faradáica resultante das transferências eletrônicas na interface está sempre associada ao componente capacitivo. Os componentes do circuito e as diferentes regiões de resposta em frequência representam o processo eletroquímico global. A região de alta frequência está associada com a resistência da solução eletrolítica,  $R_{\Omega}$ . A região de frequências intermediárias está associada com a transferência de carga na interface,  $R_{CT}$ . O efeito de relaxação correspondente é apresentado no plano complexo ( $jZ'' - Z'$ ) com um semicírculo, cuja constante de tempo é dada pelo produto  $R_{CT}C_{dl}$  (Fig. 12).

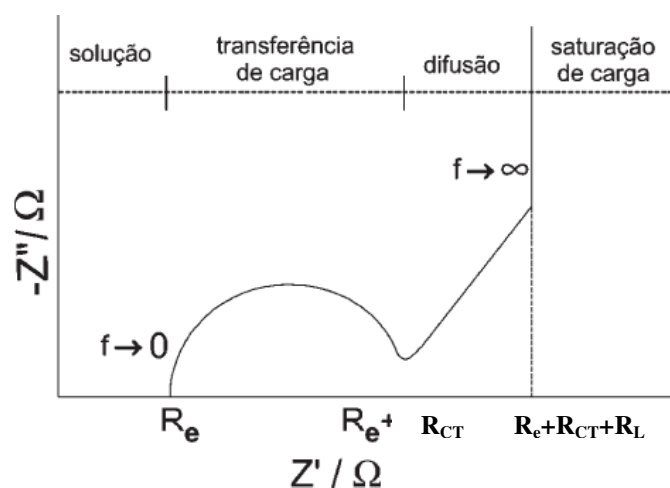


Figura 12 – Resposta do circuito de Randles idealizada no plano de impedância complexa.

Dois parâmetros são obtidos da análise do semicírculo:  $R_{CT}$  que é a medida do diâmetro e a frequência de relaxação característica,  $f_c$ , obtida no valor máximo do semicírculo. Em baixas frequências a impedância é caracterizada por processos de transporte de massa por difusão. Duas regiões podem ser identificadas no plano de impedância complexa: uma região linear com ângulo de fase  $\pi/4$ , correspondendo à difusão semi-infinita e representada pela impedância de Warburg e uma segunda região linear ainda em baixas frequências com um ângulo de fase de  $\pi/2$ , associada com uma resposta puramente capacitiva. Considerando uma reação de eletrodo onde a etapa mais lenta está relacionada ao transporte iônico em direção a interface, é razoável considerar que a cinética da reação é limitada por difusão. Nestas condições o processo de difusão é progressivamente limitado pela acumulação de carga eletrônica na interface do eletrodo, resultando em uma capacitância  $C_L$ , a qual pode ser obtida como segue:

$$C_L = L^2 / 3DR_L \quad (\text{Eq. 3})$$

sendo que  $L$  é a espessura do eletrodo,  $D$  o coeficiente de difusão do íon no eletrólito e  $R_L$  é a resistência limite determinada pela intersecção com o eixo real.

O circuito de Randles descreve adequadamente os processos que ocorrem na região de altas frequências. Contudo, na região de baixa frequência, para eletrodos porosos, a análise é complexa e a interpretação física da  $C_L$  não pode ser descrita como uma capacitância pura, sendo representada por um elemento de fase constante (CPE).

Uma vez escolhido o circuito elétrico que melhor descreve o processo, podem-se relacionar as propriedades físicas ou químicas com elementos do circuito e extrair valores numéricos de todos estes elementos, através de simulações dos dados

experimentais, geralmente utilizando-se o método de mínimos quadrados não-linear, com o auxílio de um programa computacional adequado.

Embora existam diferenças na complexidade e na estratégia de modelagem (e ocasionalmente há pontos que são conflitantes) entre as diversas teorias, estas apresentam similaridades estruturais importantes, sendo que em muitos aspectos são equivalentes. Em certos casos usando-se a aproximação de circuito equivalente (CE) é possível que sistemas com difusão pura e sistemas com difusão e migração tenham a mesma função de impedância, apesar de apresentarem diferentes valores em alguns parâmetros.

Os elementos de um circuito equivalente representam os vários processos envolvidos no transporte de massa e carga. A análise dos gráficos obtidos pela técnica de espectroscopia de impedância é simples quando há o envolvimento dos elementos, resistência e capacitância, estando relacionados a processos físicos específicos. No entanto, o processo torna-se mais intrincado à medida que os processos químicos tornam-se complexos necessitando de circuitos elétricos mais complexos.

Alguns programas foram desenvolvidos para facilitar a modelagem dos dados experimentais aos circuitos equivalentes. Dentre estes programas tem-se o EQUIVCRT, desenvolvido por Boukamp (1996) que ajusta todos os parâmetros do circuito equivalente. O EQUIVCRT emprega o ajuste não linear de mínimos quadrados, e o parâmetro  $S$  nos fornece a qualidade do ajuste (Eq. 4).

$$S = \sum_i W \left[ (Zre_i - Zre(\omega_i))^2 \right] - \left[ (Zim_i - Zim(\omega_i))^2 \right] \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde,  $Z_{re_i}$  e  $Z_{im_i}$  são os parâmetros experimentais,  $Z_{re}(\omega_i)$  e  $Z_{im}(\omega_i)$  são os parâmetros calculados pelo programa segundo o modelo escolhido.

Para a utilização do EQUIVCRT deve-se descrever o circuito elétrico que mais se adequar ao sistema em análise. Deve-se considerar que os circuitos elétricos podem ser representados por elementos simples ou complexos.

Um elemento simples é um elemento com dois terminais e está relacionado com um processo simples tal como a resistência, a solução e a capacitância da dupla camada, os quais podem ser representados por R, resistência, C, capacitância, L, indutância e W, impedância de Warburg. Já um elemento complexo pode ser definido como uma caixa complexa com dois terminais contendo elementos em série e/ou paralelo.

### ***1.6.3 Voltametria cíclica***

A voltametria cíclica 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 (Brett e Brett, 1996).

Inicia-se a aplicação do potencial de um valor, no qual nenhuma redução ocorre, com o aumento do potencial para regiões mais negativas (catódica) ocorre a redução do composto em solução, gerando um pico de corrente proporcional à concentração deste composto quando o potencial já tiver atingido um valor no qual nenhuma reação de redução ocorre. Posteriormente, 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 voltametria cíclica uma ferramenta valiosa para estudos mecanísticos (Lojou *et al.*, 2006).

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 equação de Butler-Volmer, equação básica da cinética eletroquímica, expressa estas relações.

$$\frac{i}{nF} = Ca_{(0,t)}K_s \exp\left[-\frac{\alpha n_a F}{RT}(E_{pc} - E^\circ)\right] - Cb_{(0,t)}K_s \exp\left[\frac{(1-\alpha)n_a}{RT}(E_{pc} - E^\circ)\right] \quad (\text{Eq. 5})$$

Para uma reação reversível, ou seja, uma reação que ocorre com velocidade suficientemente alta para estabelecer um equilíbrio dinâmico na interface, a equação de Butler-Volmer se reduz na equação de Nerst, pois como a cinética da reação de transferência de carga é rápida, apenas a etapa de transferência de massa irá ditar as regras do processo. A corrente do pico (em amperes) neste caso é dada por:

$$i_{pc} = (2,69 \times 10^5) n^{2/3} A D_0^{1/2} v^{1/2} C_0 \quad (\text{Eq. 6})$$

Sendo que  $n$  é o número de elétrons envolvidos no processo,  $A$ , é a área do eletrodo ( $\text{cm}^2$ ),  $D_0$  é o coeficiente de difusão ( $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) e  $C_0$  é a concentração da espécie em solução ( $\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$ ),  $v$  é a velocidade de varredura ( $\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$ ).

Para uma reação reversível a corrente de pico varia linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura. Outros critérios para reversibilidade são a razão

da corrente de pico anódico e catódico igual a unidade e independente de  $v$ , sendo o potencial de pico invariável com a velocidade de varredura de potencial.

Quando a velocidade de transferência de carga é lenta comparada com a velocidade de varredura, as concentrações das espécies oxidadas (O) e reduzida (R) não serão mais função apenas do potencial, não possuindo, portanto um comportamento nerstiano. Neste caso, os termos  $\alpha$  (coeficiente de transferência) e  $K_s$  (velocidade de transferência de carga) devem ser considerados. Nestas circunstâncias, a equação que descreve a corrente de pico ( $i_{pc}$ ) é dada por:

$$i_{pc} = (2,99 \times 10^5) n(\alpha n)^{1/2} A C_0 D_0^{1/2} v^{1/2} \quad (\text{Eq. 7})$$

Nestes casos, o voltamograma costuma apresentar apenas pico anódico, que irá deslocar-se como aumento da velocidade de varredura. Além disso, este pico varia também com  $\alpha$  e  $K_s$ . Para uma reação eletroquímica quase-reversível a corrente é controlada tanto pela etapa de transferência de massa como pela etapa de transferência de carga. Sendo, portanto, a equação de Nernst apenas aproximadamente satisfeita.

A forma de aplicação do potencial na voltametria cíclica está representada na Fig. 13, o potencial é varrido linearmente com o tempo no eletrodo de trabalho estacionário, em uma solução sem agitação, usando um potencial em forma de triângulo (Fig. 13a). 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. Em alguns casos, instrumentos digitais não possuem este mesmo padrão de aplicação de potencial. Porém, o potencial é aplicado na forma de escada (staircase) como pode ser visto na Fig. 13b, com degraus de potenciais pequenos (da ordem de 10 mV) e tempo de duração pequena (50 ms), onde a corrente é lida apenas no final deste intervalo. Esse método substitui a contento a varredura linear.

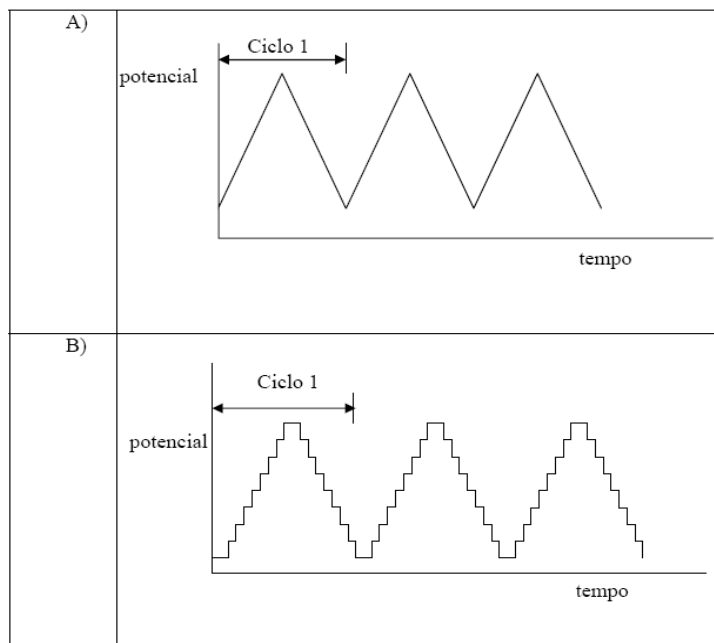


Figura 13 – Formas de aplicação do potencial para a voltametria cíclica: a) potencial com varredura linear e b) potencial do tipo escada ([www.maxwell.lambda.ele.puc-rio.br/cgi-bin/PRG\\_0599.EXE/5180\\_2.PDF?NrOcoSis=13343&CdLinPrg=pt](http://www.maxwell.lambda.ele.puc-rio.br/cgi-bin/PRG_0599.EXE/5180_2.PDF?NrOcoSis=13343&CdLinPrg=pt)).

O objetivo desta variação é conseguir uma minimização da contribuição da corrente capacitiva na corrente total. Como as etapas de potencial são pequenas, as equações para as respostas da voltametria cíclica são consideradas como idênticas das provenientes da voltametria cíclica de varredura linear.

### ***1.7 Microscopia de força atômica (AFM)***

Há um grande número de microscopias de força, das quais a primeira versão foi o AFM, ou microscopia de força atômica. Nesta, uma agulha ("tip") varre a superfície de uma amostra, e a força entre amostra e agulha provoca um deslocamento da agulha, que é detectado e utilizado para a formação de uma imagem (Fukui, 1992).

Para compreender a natureza e intensidade das forças entre a agulha e a superfície, é preciso considerar as forças de atração entre duas superfícies, que é um

tema tratado exhaustivamente pela química coloidal. Estas forças resultam das forças de London e Van der Waals entre átomos das duas superfícies, e dependem essencialmente de dois fatores: as constantes de Hamaker da superfície e da amostra, e da distância entre elas. A análise de curvas de força versus distância entre duas superfícies (no ar) mostra que a força é atrativa, mas muito pequena a distâncias superiores a cerca de 10nm (nanômetros), torna-se importante a distâncias de cerca de 1nm e passa a ser repulsiva quando as nuvens eletrônicas dos átomos formadores das superfícies começam a se interpenetrar (Eisenschitz *et al.*, 1930).

Portanto, existem várias maneiras de se varrer a superfície: a agulha pode estar em contacto com a superfície, pode estar em não contacto, sujeita a força constante, pode estar em contacto intermitente e ainda pode-se observar o deslocamento vertical da agulha tanto quanto o seu deslocamento lateral. Além disso, a amostra pode vibrar com uma frequência determinada, o que gera uma variação periódica da força entre amostra e agulha; isso permite a formação de imagens através de medidas de força ou de fase (Fukui, 1992).

Além disso, a força entre a agulha e a superfície pode ser muito alterada, modificando-se a agulha: esta pode ser polarizada eletricamente, pode receber um revestimento magnético, pode ser recoberta com diferentes substâncias químicas, tudo isto de maneira a funcionar como uma sonda de várias propriedades da superfície, ou de seus diferentes domínios.

Os microscópios de varredura de força criaram um grande número de possibilidades de aquisição de informação experimental, que até recentemente eram impensáveis. De grande interesse para a química é a possibilidade de se fazer medidas diretas de força, envolvendo quantidades mínimas ou mesmo uma única molécula, que está criando uma bioquímica baseada na observação de reações de moléculas isoladas.

A utilização da microscopia de força atômica tem propiciado a caracterização de superfícies de filmes automontados de carboidratos modificados e lectina ConA, podendo-se desta forma diferenciar uma superfície antes e após a interação deste biossensor com os açúcares (Zhang *et al.*, 2006). Eletrodos enzimáticos também têm sido caracterizados por esta técnica que revelam características morfológicas de cada etapa do processo de adsorção, desta forma o biossensor contendo a enzima peroxidase automontada em nanopartículas de ouro e rede sol-gel pôde ser avaliado (Jia *et al.*, 2002).

### ***1.8 Microscopias eletrônicas de varredura e de transmissão***

As microscopias eletrônicas tiveram e têm um papel importantíssimo no estudo de sólidos. Suas principais versões são: a microscopia eletrônica de transmissão (TEM), a de varredura (SEM) e a de transmissão com varredura (STEM). A microscopia de varredura é de longe a forma mais popular de microscopia eletrônica, por várias características:

1. As imagens têm aparência familiar, e são mais fáceis de interpretar que as de transmissão;
2. A obtenção de imagens e a preparação de amostras são mais simples e menos trabalhosas;
3. Custo dos equipamentos é menor, e o aprendizado necessário para conseguir usar os microscópios é relativamente simples;
4. Imagens que contém informação microquímica são obtidas com relativa facilidade, seja usando detectores de elétrons retroespalhados, seja usando-se detectores de raios-X produzidos pelo feixe de elétrons.

Microscópios de varredura contemporâneos têm duas vantagens importantes sobre equipamentos mais antigos:

1. Os microscópios “ambientais” (ESEM) permitem que se obtenham imagens de amostras sob pressão relativamente elevada, o que impede a secagem drástica de materiais sensíveis à perda de água, como a maioria das amostras biológicas;
2. Os microscópios de alta resolução, cujo feixe é produzido por emissão de campo (FESEM) alcançam resolução de 1nm (e mesmo superior), o que os leva até o domínio de nanoestruturas e de pequenos agregados supramoleculares.

A microscopia de varredura revela a textura de superfícies modificadas com biomoléculas. O bioconjugado constituído por nanopartículas de ouro, enzima endoglucanase e poliuretano pôde ser caracterizado através da avaliação de superfície de Si cobertas de nanopartículas, endonuclease e poliuretano antes e após a bioconjugação (Phadtare *et al.*, 2004). A enzima se dispõe na superfície das esferas isoladas do polímero, enquanto que após a conjugação um aglomerado é evidente.

Em microscopia eletrônica de transmissão a imagem observada é a projeção de uma determinada espessura do material, havendo uma diferença com relação ao observado numa superfície. A Fig. 14 apresenta a projeção de uma lâmina fina conforme observada no microscópio de transmissão (Sawer e Grubb, 1994). Como pode observado, ocorre uma projeção das linhas, áreas e volumes de interesse, podendo ocorrer superposição.

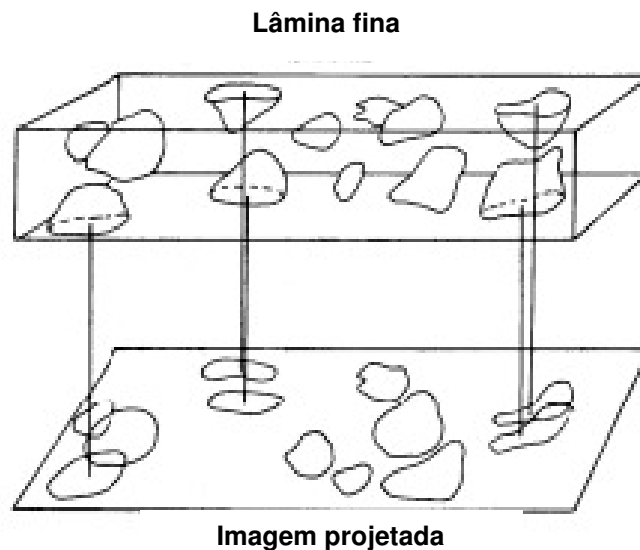


Figura 14 - Projeção de várias espécies microestruturais contidas em uma lâmina fina.

O contraste nas imagens formadas em MET tem diversas origens, tais como diferença de espessura, diferença de densidade ou de coeficiente de absorção de elétrons (contraste de massa), difração e campos elásticos de tensão.

Alguns autores obtiveram informações relevantes sobre a aglutinação observadas com proteínas em nanopartículas de ouro, tal como foi observado com fibrinogênio quando posto em contato com o anticorpo anti-fibrina (Roy *et al.*, 2007). Desta forma este método presta-se para a identificação de interações entre biomoléculas, sendo uma excelente ferramenta de caracterização.

Nosso objetivo nesta Tese é o desenvolvimento de um biossensor por impedância eletroquímica, para carboidratos utilizando eletrodo de platina e de ouro modificados com ouro coloidal e polivinilbutiral como elemento de transdução de sinal e as lectinas ConA e CramoLL imobilizadas sobre o eletrodo como elemento de reconhecimento seletivo.

## **1.9 Objetivos**

### **1.9.1 Objetivo geral**

- Desenvolvimento de um sistema biossensível baseado em lectinas (ConA e CramoLL) para a detecção de glicoproteínas por impedância eletroquímica e voltametria cíclica

### **1.9.2 Objetivos específicos**

s

- Avaliação de cada etapa de modificação dos eletrodos metálicos (platina e ouro) através de técnicas eletroquímicas;
- Verificar o bioreconhecimento das lectinas ConA e CramoLL aos açúcares (glicose, glicogênio e ovoalbumina), via espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria cíclica;
- Identificar o circuito equivalente que satisfaz a resposta impedanciométrica;
- Caracterizar o sistema nanoAu-ConA-PVB-BSA frente aos soros contaminados com os diferentes sorotipos da dengue por espectroscopia de impedância e voltametria cíclica;
- Diferenciar o padrão de glicoproteínas do soro de pacientes com febre do dengue (dengue clássica), febre hemorrágica do dengue (dengue hemorrágica) e pacientes com soro negativo.



## *CAPÍTULO II*

## **2.1. MATERIAIS E MÉTODOS**

### ***2.1.1 Materiais e reagentes***

A lectina Concanavalina A (tipo IV), soro albumina bovina (BSA, 99%), ácido tetracloroáurico e polivinilbutiral foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, USA). O estabilizante citrato trissódico (99% de pureza) foi adquirido da Fluka (Buchs SG, Switzerland). A glicose foi obtida de Rydel-de Haën AG (Seelze, Germany). Os eletrodos de disco de platina e de ouro (2,3 mm de diâmetro) foram adquiridos da Bio Analytical Systems (West Lafayette, IN, USA), modelo MF 2013. Os reagentes químicos foram todos de grau analítico e as soluções foram preparadas usando água ultrapura obtida do sistema nanopure milli-Q (Billerica, MA, USA).

### ***2.1.2 Preparo do ouro coloidal***

Uma solução aquosa de nanopartículas de ouro (1%, p/v) foi preparada pelo procedimento de redução do ácido tetracloroáurico com citrato de tri-sódio, que atua como estabilizante a uma temperatura de 60°C por 35 minutos (Frens, 1973).

Foi preparada uma solução de H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> e diluída em água (1:100). Posteriormente, foi preparada uma solução de citrato de tri-sódio a 1%. As duas soluções foram aquecidas em separado em um balão de fundo redondo até atingir 60°C.

Em seguida, a solução de citrato de tri-sódio foi inserida no balão contendo a outra solução sob agitação com o auxílio de uma seringa de Hamilton, para evitar contato com o ar. Após esta etapa a mistura aquecida por 35 minutos com temperatura de 60°C obtendo-se um colóide róseo no final da reação.

### **2.1.3 Imobilização de ConA e CramoLL**

Inicialmente o eletrodo de trabalho foi polido sobre um disco de feltro com uma suspensão de alumina com granulação de 0,05  $\mu\text{m}$  e colocado sob sonicação por 5 minutos. Inicialmente os eletrodos de Pt e Au com 0,2 mm de diâmetro cada, foram submetidos a um potencial fixo de +1,5 V por um período de 2 min e posteriormente a 0,5 V por 45 s, com uma solução de NaOH 0,1 M para torná-lo anódico.

O eletrodo de trabalho, carregado positivamente, foi imerso dentro de uma solução homogênea contendo a lectina ConA ou a lectina CramoLL, nanopartículas de ouro e PVB ocorrendo adsorção dos mesmos ao eletrodo pela técnica de automontagem onde cada camada de moléculas são adicionadas passo a passo.

Foi preparada uma mistura de lectina (200  $\mu\text{g/mL}$ ) em tampão fosfato de sódio (TFS) pH 7,0 em água, e ouro coloidal numa proporção de 1:2 (v/v), ou seja, 300  $\mu\text{L}$  do ouro coloidal para 150  $\mu\text{L}$  da lectina, sendo a mistura agitada vigorosamente a temperatura de 4°C em um banho de gelo durante 10 min. Após este período foram adicionados 3 mL de polivinilbutiral (2% p/v) ao béquer contendo nanopartículas de ouro e lectinas e agitado vigorosamente até a completa homogeneização.

Posteriormente o eletrodo de platina (Pt) e/ou eletrodo de ouro (Au) foi imerso à mistura contendo nanopartículas de ouro, lectina (ConA/CramoLL) e polivinilbutiral por 30 min e então o eletrodo de Pt/Au foi removido (Fig. 15) e seco com o auxílio de um jato de nitrogênio. Após a modificação, o eletrodo foi incubado em uma solução de albumina do soro bovino, BSA (0,2 % p/v) por 20 min a temperatura ambiente para bloquear os grupos ativos remanescentes presentes no eletrodo.

Os sistemas compostos por nanoAu-ConA-PVB-BSA e nanoAu-CramoLL-PVB-BSA foram utilizados para a detecção dos açúcares glicose (monossacarídeo),

glicogênio (polissacarídeo), ovoalbumina (glicoproteína) e lactose (dissacarídeo), nas concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ .

Os sistemas compostos pelas lectinas foram explorados na análise de detecção da glicoproteína ovoalbumina, onde foram avaliadas as respostas impedanciométricas e voltamétricas para as concentrações de 25, 50, 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$  com o objetivo de avaliar a sensibilidade e viabilidade dos sistemas desenvolvidos.

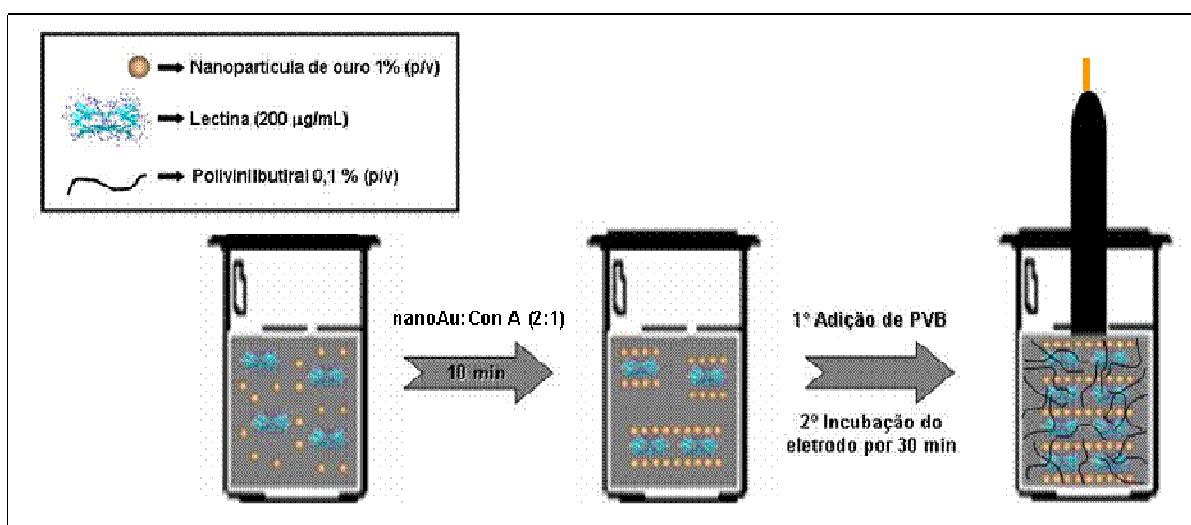


Figura 15 - Representação da modificação do eletrodo de trabalho.

#### ***2.1.4 Bioreconhecimento de glicoproteínas do soro de pacientes contaminados com Dengue***

Após a obtenção do sistema nanoAu-ConA-PVB-BSA, o eletrodo foi lavado com água para remover as moléculas que não se adsorveram no eletrodo, posteriormente o sistema foi exposto às glicoproteínas do soro (GS) de pacientes infectados pela febre da Dengue (FD), com febre hemorrágica da Dengue (FHD) e com soro de pacientes não contaminados.

Os soros foram diluídos em tampão fosfato de sódio (TFS) 10 mM em pH 7,4 nas proporções de 1:10, 1:30, 1:50 e 1:80.

Os eletrodos de ouro modificados com o sistema nanoAu-ConA-PVB-BSA foram expostos aos soros durante tempo de 10 min a temperatura ambiente. Em seguida o eletrodo foi lavado com água para remover as moléculas não adsorvidas a eletrodo e subsequentemente foram realizadas as medidas de voltametria cíclica, voltametria de varredura linear e impedância eletroquímica.

### ***2.1.5 Medidas de espectroscopia na região do UV-visível-NIR***

A interação da lectina ConA com as nanopartículas de ouro através das forças de interação eletrostática foi avaliada pela espectroscopia UV-vis-NIR com um espectrofotômetro modelo CARY 5 (Austrália). Foram utilizadas duas cubetas de quartzo, onde inicialmente o equipamento foi calibrado com água e em seguida as análises foram realizadas utilizando uma das cubetas como referência e a outra a amostra em análise. As medidas foram obtidas pela análise das amostras contendo apenas as nanopartículas de ouro, e com as nanopartículas de ouro em contato com a lectina ConA. Assim foram obtidos dois espectros na faixa de varredura de 280 a 800 nm.

### ***2.1.6 Medidas de espectroscopia de fluorescência***

As propriedades de fotoluminescência foram avaliadas num espectrofluorímetro PC1 (ISS, USA) a  $25 \pm 1^\circ \text{C}$ . As amostras foram colocadas numa cubeta de quartzo de 5 mL com caminho óptico de 1 cm e excitados na região de 280 nm, enquanto que o espectro de emissão foi gravado de 300 a 500 nm. Foram realizadas medidas da solução

da lectina ConA na concentração de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e do sistema nanoAu-ConA na proporção de 3:1 das nanopartículas de ouro e a lectina ConA.

### ***2.1.7 Medidas de tamanho de partícula e potencial zeta ( $\zeta$ )***

A distribuição do tamanho de partícula do colóide de ouro foi medida através do método de espalhamento de luz, e o potencial zeta foi obtido através do método de mobilidade eletroforética utilizando o equipamento Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., UK). A análise do tamanho de partícula foi realizada para o colóide de ouro e para o sistema contendo nanopartículas de ouro e ConA (nanoAu-ConA). O potencial zeta foi medido para a lectina ConA, nanopartículas de ouro e nanopartículas de ouro-ConA. As análises foram realizadas em cubetas descartáveis onde as amostras foram injetadas com o auxílio de seringas descartáveis.

### ***2.1.8 Caracterização por microscopia de varredura eletrônica (MEV), microscopia de força atômica (MFA) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM)***

As amostras para as medidas na microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram preparadas pela incubação e formação do filme de nanopartículas de ouro e ConA (nanoAu-ConA), polivinilbutiral (PVB), nanopartículas de ouro com polivinilbutiral (nanoAu-PVB) e nanopartícula de ouro, ConA e PVB (nanoAu-ConA-PVB).

As medidas de MEV de nanoAu-ConA-PVB foram realizada para confirmar a adsorção de ConA sobre as nanopartículas de ouro e a interação com PVB. Estas medidas foram realizadas em um microscópio de varredura eletrônica JSM 5900 (JEOL instruments, Japão).

As amostras foram adicionadas sobre a superfície de eletrodos de disco de ouro e em seguida as superfícies foram secas com o auxílio de um jato de gás nitrogênio, após

esta etapa foi realizada a deposição de ouro sobre a superfície do eletrodo modificado e posteriormente realizadas as análises de superfícies.

As medidas de microscopia de força atômica (MFA) foram realizadas pelo modo de não-contato numa frequência e pressão constante de 100 kHz e 0,6 N/m, respectivamente. As medidas no MFA foram realizadas sobre lamínulas de vidro hidrofílicas após submetê-las a sonicação em etanol, clorofórmio e água, e em seguida secas com gás nitrogênio e então submetidas à análise.

As amostras com o sistema nanoAu-ConA em contato com os soros de pacientes com febre do Dengue, febre hemorrágica do Dengue e paciente com soro negativo foram analisadas através da microscopia eletrônica de transmissão. Foram obtidas microfotografias utilizando grades de cobre (400 mesh) cobertas, por carbono numa voltagem de 80 kV em um microscópio Tecnai G<sup>2</sup> Spirit (FEI Company, USA) equipado com uma câmera do tipo CCD.

### ***2.1.9 Medidas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância***

Os experimentos de voltametria cíclica e de espectroscopia de impedância foram realizados em um potenciostato EG&G PAR 263 A (USA) com interface com um analisador lock-in PerkinElmer 5210 (USA) numa célula convencional de três eletrodos (Fig. 16). Os eletrodos de trabalho utilizados foram de platina ou ouro modificados com nanopartículas de ouro, polivinil butiral e lectinas ConA e CramoLL, eletrodo de ouro como contra eletrodo e o de referência foi o Ag/AgCl saturado com KCl.

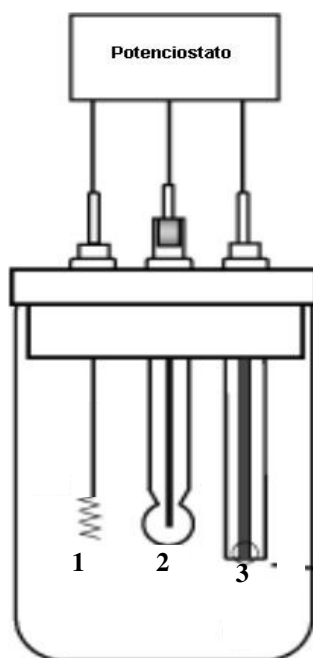


Figura 16 - Representação da cela eletroquímica utilizada nos experimentos. 1) Eletrodo auxiliar, 2) Eletrodo de referência e 3) Eletrodo de trabalho.

Os experimentos de voltametria cíclica foram realizados após cada etapa da montagem do eletrodo na presença de uma solução de 10 mM de ferro-ferricianeto de potássio,  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ , (1:1) como indicador redox em NaCl 0,15M. A presença do par redox tem a função de indicar um possível bloqueio da superfície do eletrodo de trabalho, uma vez que estas espécies apresentam picos de corrente anódico/catódico bem definidos. A varredura de potencial foi de  $-0,2$  a  $0,7$  V com velocidade de varredura de  $50\text{mV/s}$ .

As medidas de impedância eletroquímica foram realizadas na mesma solução de ferro-ferricianeto de potássio utilizado com par redox numa faixa de frequência entre  $100$  mHz a  $100$  KHz com um potencial de amplitude alternada de  $10$  mV em potencial de circuito aberto. As medidas de impedância eletroquímica foram realizadas após cada etapa de modificação do eletrodo de trabalho. Para se observar diferenças nas respostas



impedanciométricas do sistema nanoAu-ConA-PVB-BSA em contato com os diferentes soros de pacientes contaminados e não contaminados com a dengue, foram aplicados potenciais no eletrodo de trabalho na faixa de -0,1 a 0,4 V.

Após cada medida foram coletados os gráficos de Nyquist e de Bode através dos quais realizou-se a obtenção das resistências de transferência de carga e capacitância da dupla camada elétrica.

# *CAPÍTULO III*

### 3.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As lectinas são proteínas oligoméricas que se ligam especifica e reversivelmente a carboidratos estando presentes em microrganismos (vírus, bactérias e fungos), animais e plantas (Lis e Sharon, 1998). Existem lectinas que pertencem à família das leguminosas (Prabu *et al.*, 1999) e de animais, tais como, as galectinas (Barondes *et al.*, 1994). No entanto, o tecido mais rico em lectinas são as sementes das plantas leguminosas, sendo atualmente as mais estudadas. Sua especificidade para glicoconjugados tem encontrado muitas aplicações em pesquisa biotecnológica (Sharon e Lis, 1990). A lectina de *Canavalia ensiformis* (feijão de porco), conhecida como *Concanavalina A* (ConA), é uma lectina específica para glicose/manose (Glc/Man). De acordo com o pH do meio em que se encontra, esta lectina pode assumir duas conformações, em pH 5 se encontra na forma de dímero, enquanto que, em pH alcalino (acima de 7) a conformação de tetrâmero é predominante. Adicionalmente, é importante salientar que a ConA também exibe elevada afinidade para oligossacarídeos presentes nas glicoproteínas e glicolipídios (Mandal *et al.*, 1994).

A lectina de *Cratylia mollis* (feijão Camaratu), conhecida como CramoLL (Cra), da família *Fabaceae*, pertence a classe das lectinas que se ligam a manose/glicose e têm sido purificada e caracterizada das sementes de uma planta nativa do Nordeste brasileiro. A lectina em seu estado nativo tem um PI de 8,5-8,6 e uma cadeia polipeptídica principal de 31 kDa (Correia e Coelho, 1995). Assim como a ConA, a lectina CramoLL reconhece oligossacarídeos presentes nas glicoproteínas e glicolipídeos.

A adsorção de lectinas e pequenas moléculas sobre a superfície de nanopartículas metálicas é uma estratégia de detecção das interações específicas entre as lectinas e carboidratos, permitindo desta forma a captação dos efeitos desta interação.

Nanopartículas de ouro coloidal têm sido extensivamente aplicadas como um suporte de imobilização de biomoléculas, retendo a bioatividade de tais moléculas, como por exemplo, proteínas (Brown *et al.*, 1996), enzimas (Willner *et al.*, 1994) e anticorpos (Dequarie *et al.*, 2000) além de promover uma direta transferência de elétrons das proteínas imobilizadas para a superfície do eletrodo (Xiao *et al.*, 2000). Muitos imunossensores são baseados em métodos de imobilização sobre uma membrana polimérica, camada de silano, filmes de Langmuir-Blodgett e filmes automontados. Recentemente, um imunossensor potenciométrico para detecção do antígeno da difteria foi desenvolvido com o uso de nanopartículas de ouro e polímero polivinil butiral através da técnica de adsorção por interação eletrostática (Tang *et al.*, 2004). Tem sido relatado que algumas proteínas, por exemplo, a glicose oxidase e a peroxidase, retêm sua atividade biológica após terem sido adsorvidas sobre as nanopartículas de ouro (Tang *et al.*, 2000, Lei *et al.*, 2004).

O uso de nanopartículas metálicas tem sido de fundamental importância devido a sua habilidade de evitar a perda da atividade biológica de proteínas, já que com o estabelecimento do contato das proteínas com a interface metálica do eletrodo de trabalho as mesmas podem sofrer desnaturação o que leva a perda da sua atividade biológica (Martin *et al.*, 1998).

### **3.1.1 Caracterização do sistema coloidal nanoAu-ConA e nanoAu-ConA-PVB**

O espectro de UV-visível-NIR da solução de nanopartículas de ouro e a solução de nanopartículas de ouro após a adição da lectina ConA pode ser visualizado na Fig. 17. A ressonância de superfície de plásmons da solução coloidal de ouro pode ser claramente vista em cerca de 527 nm (Fig. 17).

Para a interação da solução coloidal com a lectina ConA, a amostra foi mantida sob agitação, e pôde ser visualizada uma queda da intensidade da ressonância de superfície de plásmons devido à diminuição na concentração das nanopartículas de ouro na solução (Fig. 17). Comportamento similar foi observado por Phadtare e colaboradores (2004) quando foi realizada a interação de microesferas de nanopartículas de ouro-poliuretano com endonuclease, não havendo modificação do sítio catalítico desta enzima já que a mesma permanecia com a sua atividade catalítica. A banda de plásmons é deslocada para 531 nm (Fig. 17) indicando uma agregação das nanopartículas de ouro, o que indica a possibilidade da lectina ter adsorvido sobre a superfície das nanopartículas de ouro possivelmente por interações eletrostáticas (Sastry *et al.*, 2002).

Em alguns estudos as nanopartículas de ouro são usadas extensivamente em análise biomimética em sistemas de imobilização para estudar macromoléculas, tais como proteínas, enzimas e anticorpos (Gu *et al.*, 2004). O uso das nanopartículas possibilita reter as propriedades biológicas das macromoléculas testadas (Xiao *et al.*, 1999), além das nanopartículas de ouro promover um aumento da sensibilidade das reações redox.

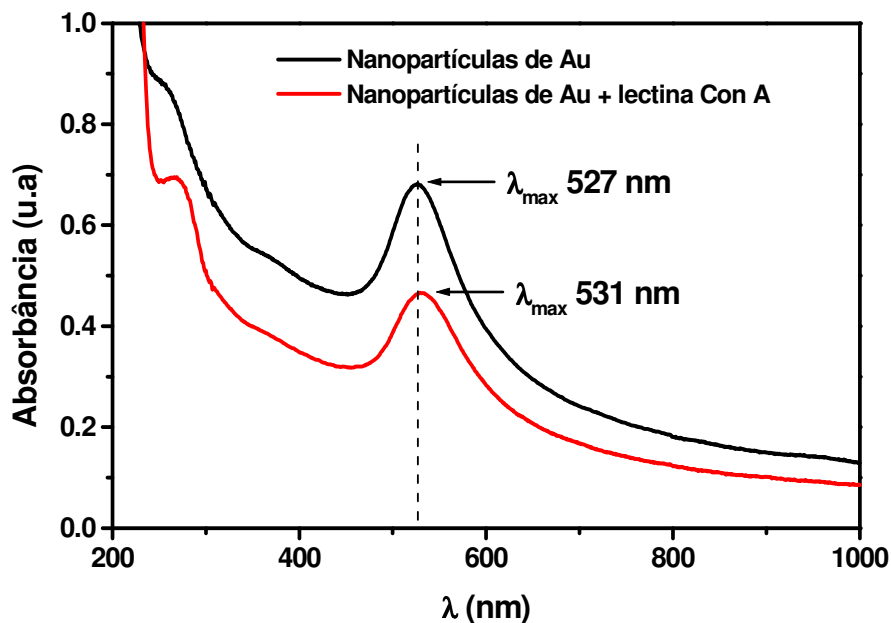


Figura 17 – Espectro de UV-visível-NIR das nanopartículas de Au puras e com lectina ConA.

A técnica de espectroscopia de fluorescência foi utilizada para monitorar a interação da lectina ConA as nanopartículas de ouro (Fig. 18). O processo de adsorção da ConA as nanopartículas resulta na diminuição da intensidade da fluorescência, tal resposta confirma a interação da ConA com a nanopartícula de ouro. A diminuição da fluorescência pode ser devido a novos caminhos de transição de elétrons do estado fundamental ( $S_0$ ) para o estado excitado ( $S_1$ ) e finalmente retornando para o  $S_0$ , através da interação entre a proteína e as nanopartículas, ou seja, a fluorescência emitida pelos aminoácidos aromáticos das proteínas pode ter as transições modificadas pela presença do gás de elétrons presentes na superfície das nanopartículas de ouro. Tal afirmação pode ser confirmada a partir de cálculos de segunda derivada, os quais indicam possíveis modificações que possam ocorrer na arquitetura molecular através de processos que provoquem desnaturação protéica.

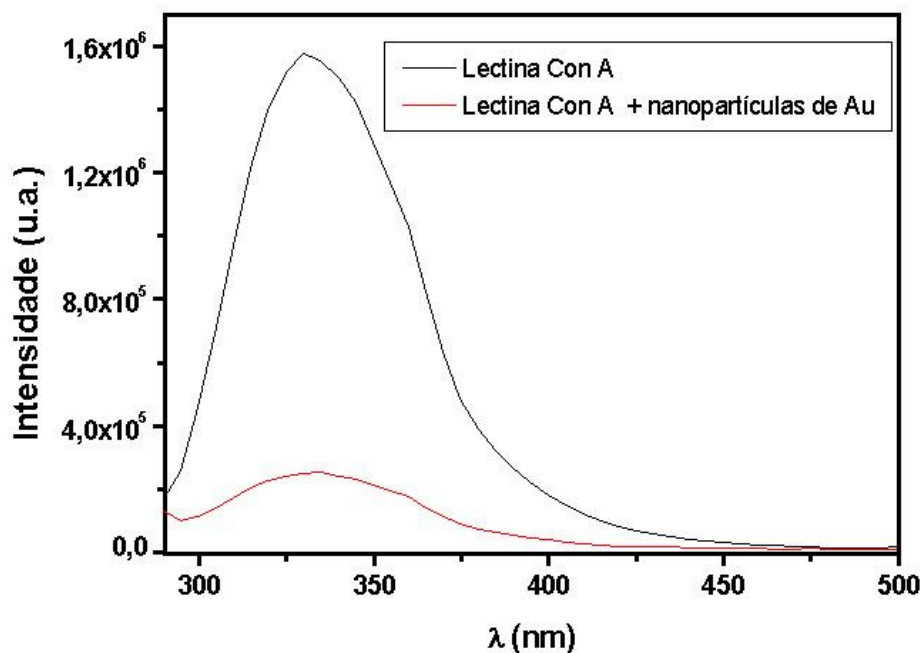


Figura 18 – Espectro de fluorescência de ConA no seu estado nativo e do sistema nanopartícula de Au-ConA.

A partir da Fig. 18 pode ser visualizado que não houve deslocamento no máximo da luminescência da proteína, fluorescência esta atribuída ao aminoácido triptófano, indicando que não houve modificação da arquitetura molecular da lectina, demonstrando desta forma, que não houve exposição do resíduo de triptófano de um ambiente hidrofóbico para um hidrofílico.

Pode ser verificado que a distribuição do tamanho de partículas de ouro depende do modo como os dados são apresentados, em relação ao volume e a intensidade. A Figura 19a (volume  $\times$  tamanho de partículas) demonstra que o colóide possui predominantemente uma população de nanopartículas homogêneas e com tamanho menor que 4 nm. Contrariamente, ao se analisar a intensidade de luz espalhada  $\times$  tamanho de partículas se observa um sistema heterogêneo e aglomerados de 1 a 100 nm (Fig. 19b). Portanto, esta análise mostra que dispomos de uma população de partículas heterogênea e uma distribuição bimodal.

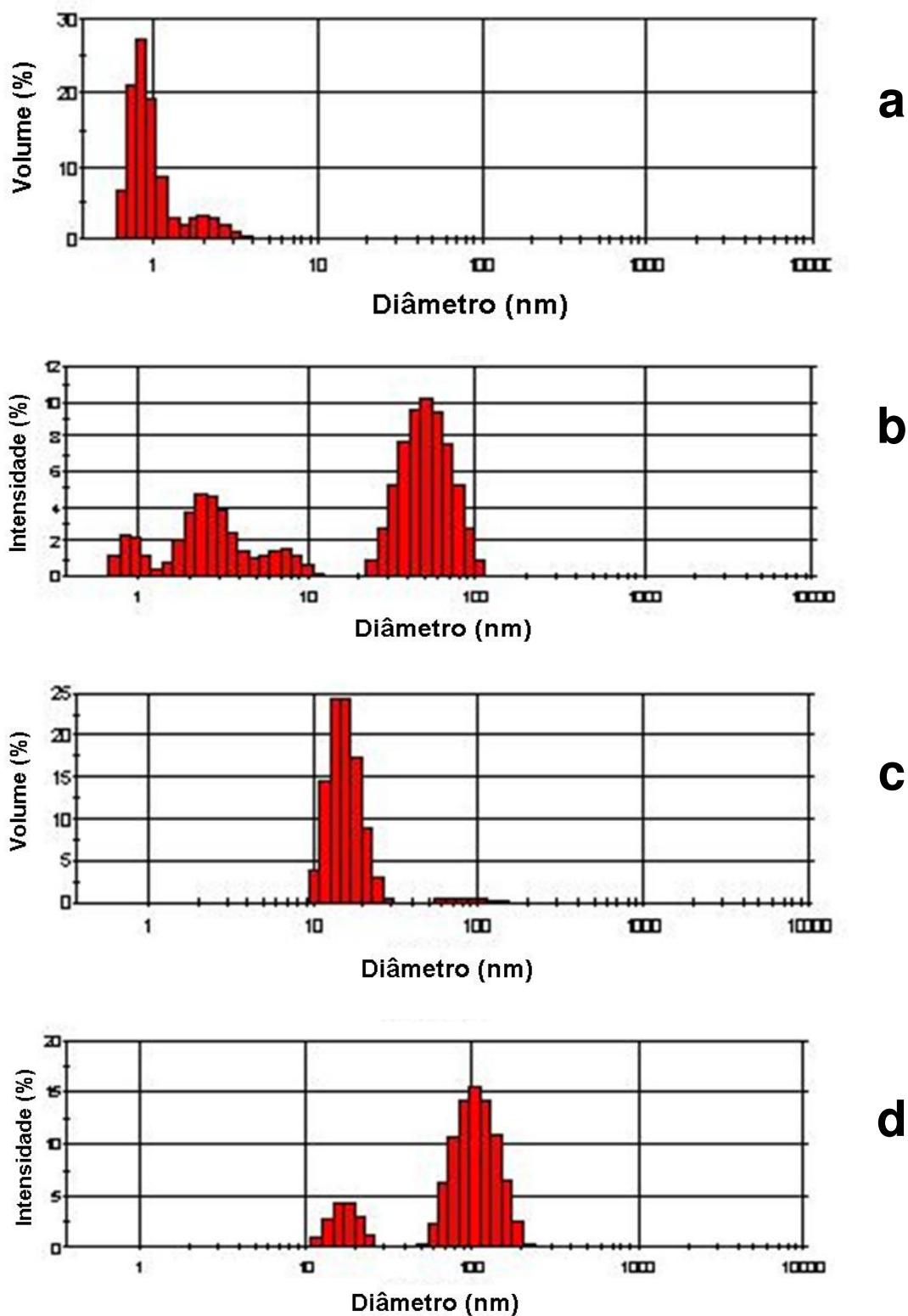


Figura 19 – Distribuição de tamanho de partículas do colóide de ouro em função do volume (a), em função da intensidade (b), distribuição do sistema nanoAu-conA em função do volume (c) e da intensidade (d).



A massa relativa é determinada pela distribuição do volume, mas a visibilidade das partículas será influenciada pelos grandes aglomerados que interagem eficientemente com a luz fazendo com que eles sejam observados facilmente.

Ao analisar o tamanho do sistema ConA-nanopartícula de ouro em função do volume observa-se um aumento no tamanho de partículas devido ao aglomerado formado através da interação da proteína com as nanopartículas (Fig. 19c), cujos tamanhos estão acima de 10 nm e, sendo possível, observar uma pequena população quase que desprezível de partículas na faixa de 100 nm. Com relação à intensidade de luz dispersa foi verificada a presença de partículas com diâmetro variando entre 10-130 nm (Fig. 19d).

As biomoléculas tais como proteínas e DNA possuem uma carga eletrostática intrínseca devido aos resíduos de aminoácidos e as cargas negativas do grupo fosfato, respectivamente. E desta forma as nanopartículas inorgânicas podem ser afetadas pelo ataque destes grupos em sua superfície.

A síntese das nanopartículas de ouro resultou em partículas com carga global negativa como pode ser visualizado na Fig. 20, devido a presença do citrato de tri-sódio e desta forma podem ser utilizadas em estratégias de imobilização por automontagem eletrostática com as cargas opostas das biomoléculas, o que demonstra a viabilidade de interação entre nanoAu e ConA. Outros autores verificaram interações deste tipo entre ácidos graxos e colóide de ouro sobre substrato de ouro mostrando a possibilidade deste método como forma de imobilizar biomoléculas sobre uma superfície (Sastry *et al.*, 2002).

O potencial zeta, medido através da técnica de mobilidade eletroforética, demonstrou que as nanopartículas de ouro apresentam um  $\zeta$  de -40,02 mV, quando a ConA é adsorvida na superfície das nanopartículas é possível obter um  $\zeta$  de -11,22 mV

(Fig. 20). Tal comportamento pode nos indicar uma redução da densidade de carga negativa efetiva na superfície da nanopartícula de Au como resultado da adsorção da lectina sobre a superfície das nanopartículas. As nanopartículas de ouro carregadas negativamente com os ânions citrato reagem com proteínas através de força eletrostática, ponte de hidrogênio e por interações hidrofóbicas para formar um grande volume de agregados caso exista a presença de resíduos de aminoácidos carregados positivamente nesta proteína de estudo.

Como o ponto isoelétrico (PI) da lectina ConA é no pH 5,0, no pH em que estamos analisando (pH 7,4) a densidade de carga da proteína é bem menos negativa que as nanopartículas de ouro, favorecendo a interação entre as nanopartículas e a ConA longe do ponto de máxima precipitação desta proteína

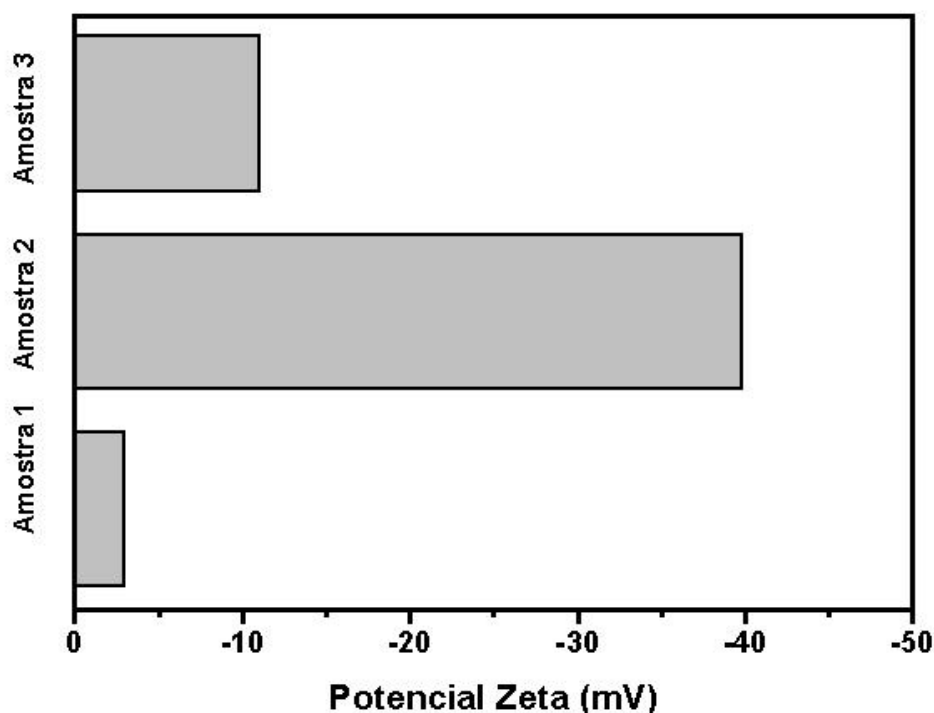


Figura 20 – Medida do potencial zeta de solução da lectina ConA (amostra 1), do colóide de ouro (amostra 2) e do sistema nanoAu-conA (amostra 3).

A Fig. 21 mostra as micrografias de microscopia eletrônica de varredura da adsorção dos sistemas nanoAu-ConA (Fig. 21a), filmes de PVB (Fig. 21b), nanoAu-PVB (Fig. 21c) e nanoAu-PVB-ConA (Fig. 21d) sobre um substrato de ouro (Au). Na Fig. 19a se pode observar apenas a característica da superfície de Au, isto é devido ao fato do limite da resolução da microscopia de varredura utilizado que não permite a visualização das nanopartículas de ouro que apresentam tamanho médio de 10nm (ver Fig. 19).

Na figura 21b fica evidente o revestimento total da superfície do substrato de Au por um filme homogêneo de PVB, resultado este confirmado pela voltametria cíclica que indicou o revestimento da superfície do eletrodo utilizado.

Observa-se na Fig. 21c que ocorreu a formação de um filme sobre a superfície do substrato de Au, além de se evidenciar a presença de micropartículas poliméricas, constituídas de PVB, e que possivelmente atuam englobando as partículas menores de Au, não sendo possível a visualização das nanopartículas de ouro. A análise da Fig. 21d, constituída pelo sistema nanoAu-ConA-PVB, não apresenta diferenças significativas quando comparada com a microfotografia da amostra nanoAu-PVB (Fig.21c).

Contudo, uma maior aproximação das partículas do sistema nanoAu-ConA-PVB denota a presença de pequenos pontos claros presentes na superfície das supracitadas micropartículas denotando a possível formação de agregados entre as nanopartículas de Au e proteínas que podem estar presentes, possivelmente formando uma rede tridimensional destes aglomerados, tanto na superfície quanto no interior das micropartículas poliméricas (Fig. 21e).

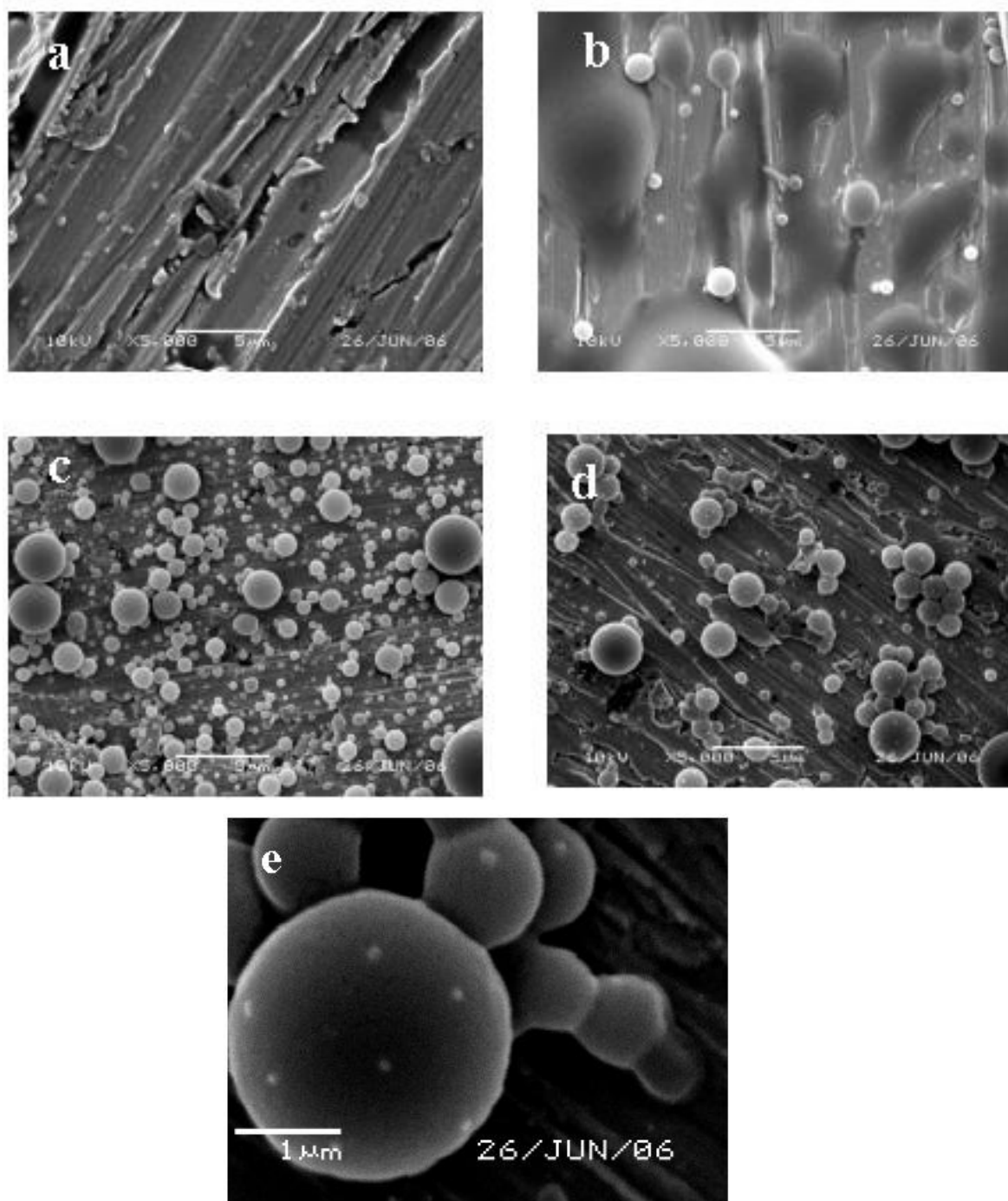


Figura 21 – Micrografias de microscopia de varredura de nanoAu-conA (a), PVB (b), nanoAu-PVB (c), nanoAu-ConA-PVB (d) e maior aumento de nanoAu-ConA-PVB (e).

O possível modo de interação do sistema constituído de nanopartículas de ouro, lectina ConA e o polímero polivinilbutiral pode ser visualizado no Fig. 22.

As nanopartículas de ouro têm sido utilizadas com sucesso na ligação com enzimas tais como a pepsina (Gole *et al.*, 2001a), protease fúngica (Gole *et al.*, 2001b) e endoglucanase (Gole *et al.*, 2002a). Esta ligação é promovida por interações de grupos amino e resíduos de cisteína com as nanopartículas de ouro, além disso, aminoácidos e proteínas podem ser imobilizados sobre as nanopartículas de ouro sem modificações.

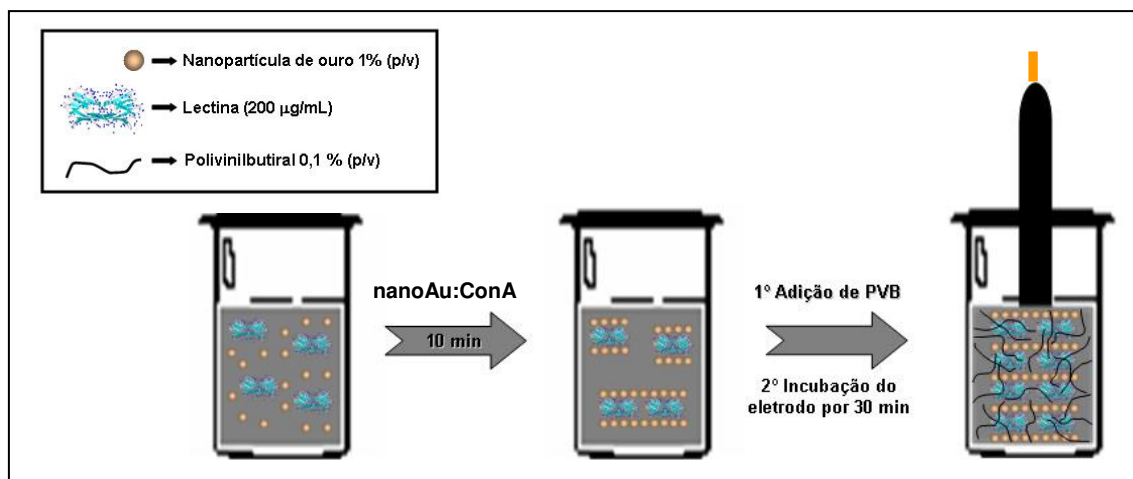


Figura 22 – Representação da formação do compósito polivinilbutiral-nanopartícula de Au-ConA adsorvido na superfície do eletrodo.

Para monitorar a interação das nanopartículas de ouro com a lectina ConA o AFM foi utilizado para fornecer uma imagem após a incubação de uma superfície de vidro com o sistema nanoAu-ConA.

Na Fig. 23 podemos observar a morfologia das nanopartículas de ouro em presença da lectina ConA através da técnica de microscopia de força atômica em modo não-contato. Para a realização das medidas uma solução de nanoAu-ConA foi

depositada sobre uma superfície de lamínula de vidro previamente tratada para se tornar hidrofílica.

A Fig. 23a mostra que as nanopartículas de ouro apresentam formato esférico e aglomerados homogêneos em algumas regiões o qual pode ser atribuído a interação da lectina com as nanopartículas. Tal característica de formação de aglomerados também pode ser confirmada nas medidas de tamanho de partículas (Fig. 19) que indicam que houve a formação de aglomerados.

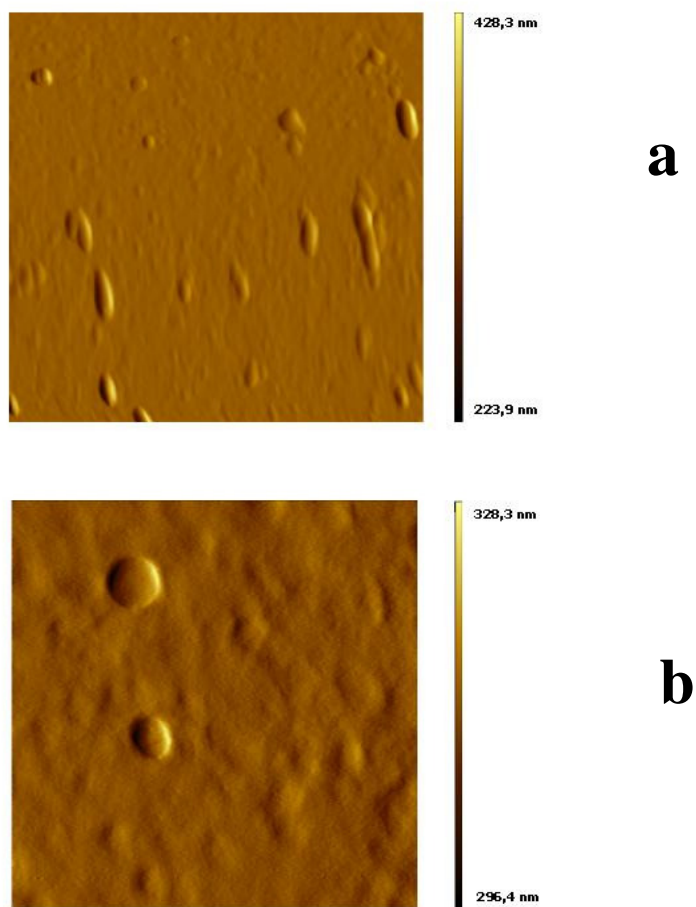


Figura 23 – Imagens de microscopia de força atômica de nanoAu-ConA. a) presença de nanopartículas isoladas e em aglomerados, b) visualização de uma nanopartícula de ouro isolada.

A visualização desta imagem é determinada através da deflexão do cantilever proporcionado pela resposta das forças de interações atômicas entre a ponteira e o

substrato. As forças de interações entre moléculas da superfície da amostra com moléculas imobilizadas na ponteira resultam na deflexão do cantilever, o qual atua como um transdutor de força.

### **3.2 Caracterização eletroquímica**

Uma análise prévia de parâmetros necessários para o desenvolvimento do biossensor nanoAu-lectina-PVB, foi realizada com o objetivo de estabelecer as melhores condições para se trabalhar com a lectina ConA e de acordo com estas informações também aplicar as condições estabelecidas para CramoLL.

Primeiramente foi estabelecido o tempo de incubação do compósito sobre a superfície do eletrodo de platina. Foram testados os tempos de 10, 20 e 30 min, onde podemos observar que houve adsorção do sistema nanoAu-ConA-PVB nos tempos pré-determinados (Fig. 24a). Nos voltamogramas cíclicos houve uma diminuição dos picos anódicos e catódicos, sendo que esta diminuição apresenta um comportamento linear que representa a quantidade de material adsorvido no eletrodo, onde quanto maior o tempo mais material encontra-se sob o eletrodo indicando uma cinética de adsorção. Pode-se observar esta diminuição quando comparamos os voltamogramas obtidos com a resposta do eletrodo de Pt limpo representado no detalhe da Fig. 24a. Neste voltamograma podemos evidenciar os picos anódicos e catódicos do ferri-ferrocianeto de potássio na superfície limpa da Pt. Também foi possível verificar que nos gráficos de Nyquist houve um incremento gradativo do Zre o que denota uma diminuição da propriedade capacitiva da interface eletrodo-solução pelo aumento da resistividade do sistema proporcionado por uma maior exposição do eletrodo de Pt ao sistema nanoAu-ConA-PVB (Fig 24b).

De acordo com os resultados obtidos o tempo selecionado para os estudos subsequentes foi o de 30 min, o que garante a aderência do material em estudo. Na avaliação da cinética de adsorção da lectina, analisamos o efeito da concentração de ConA ( $\mu\text{g/mL}$ ) nas respostas eletroquímicas da voltametria cíclica e da impedância.

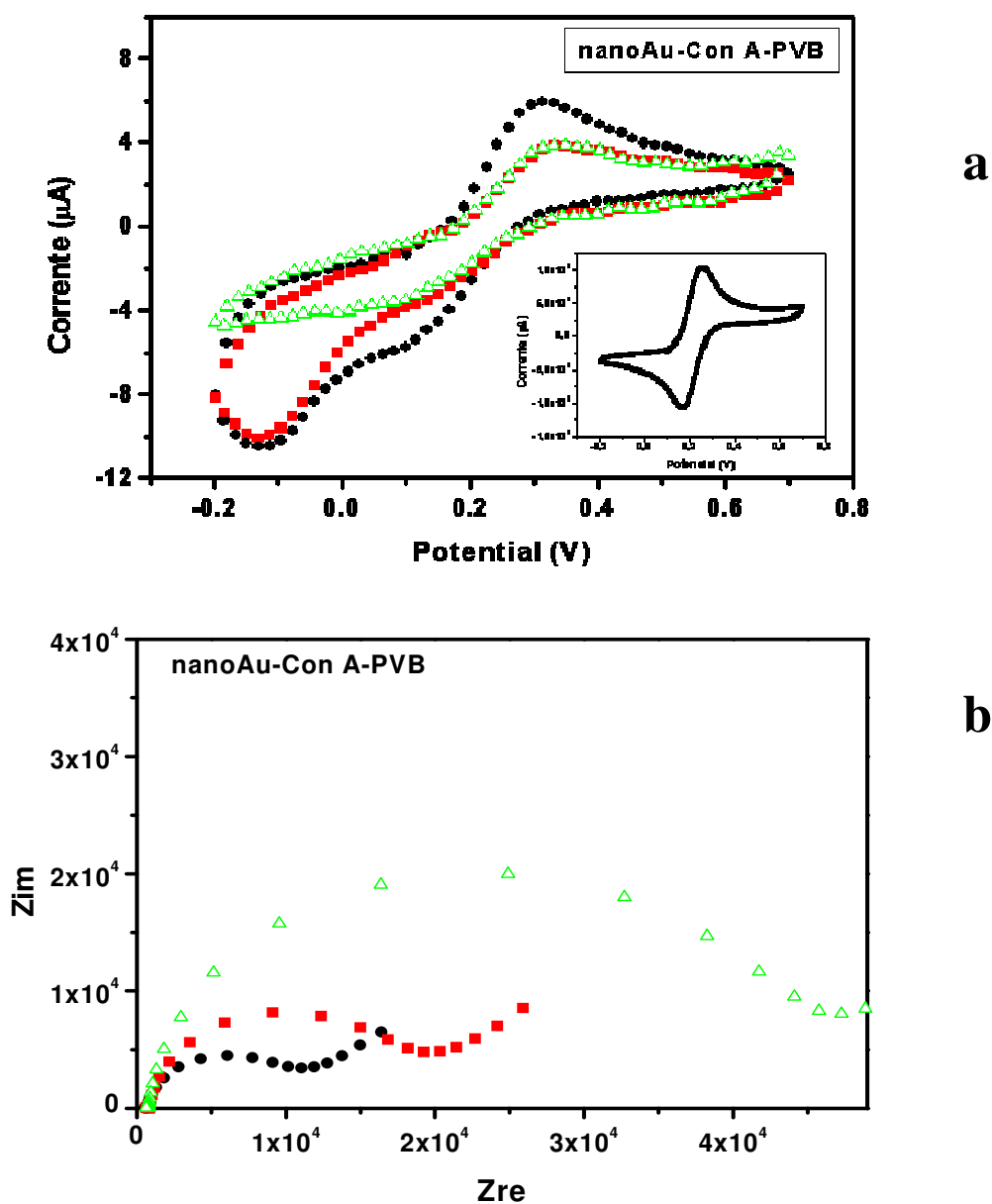


Figura 24- Avaliação do tempo de incubação de nanoAu-ConA-PVB em solução ferro/ferricianeto (em TFS 10mM em  $\text{H}_2\text{O}$  pH 7,4). a) Voltamogramas cíclicos (velocidade de varredura foi de  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  e  $E_0 = 0,1\text{V}$ ,  $E_1 = 0,7 \text{ V}$  e  $E_2 = -0,2\text{V}$ ), b) diagrama de Nyquist. ● Tempo de 10 min; ■ Tempo de 20 min; ▲ Tempo de 30 min.



A lectina foi dissolvida em tampão fosfato de sódio pH 7,4 em água para garantir a neutralidade do meio, bem como as análises foram realizadas com a ConA na forma de um tetrâmero garantindo, desta forma, que as informações obtidas relate apenas o efeito da concentração lectínica sobre a superfície em estudo.

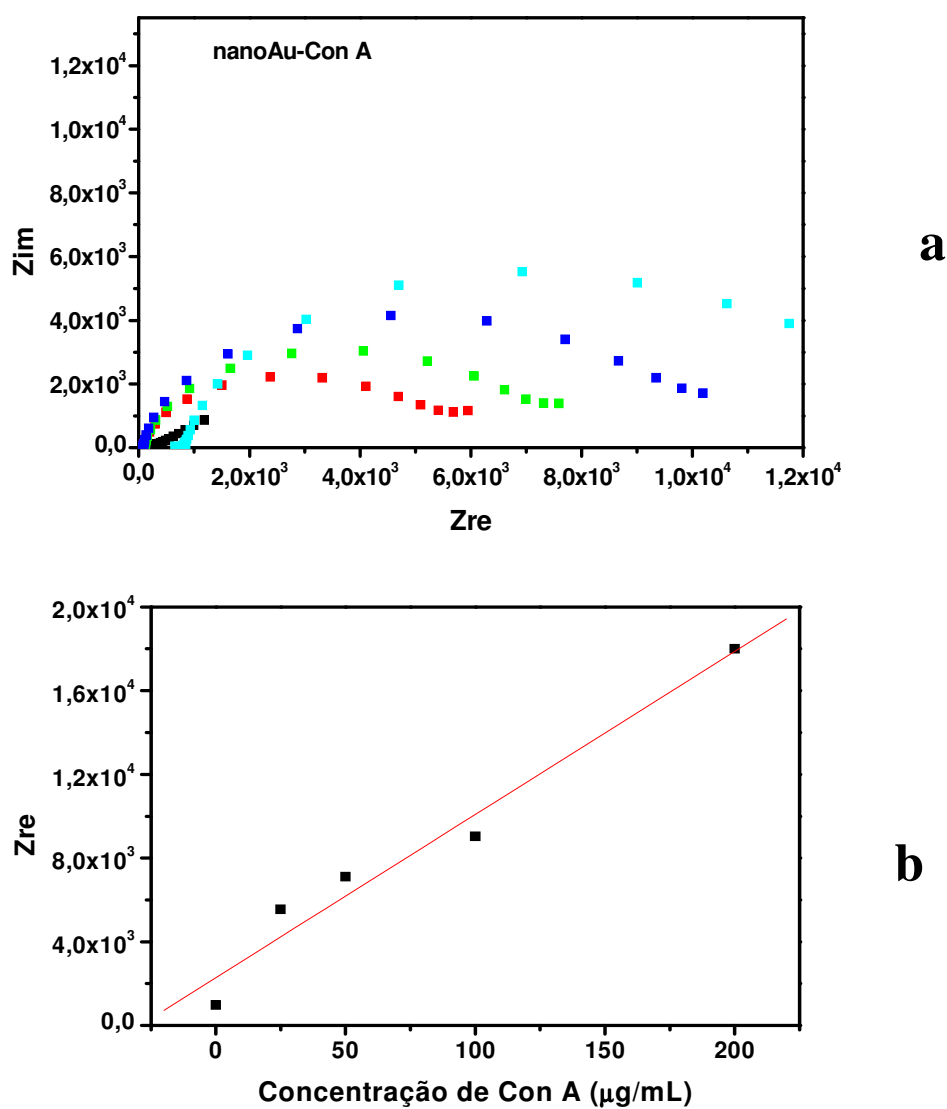


Figura 25 - Diagrama de Nyquist da avaliação do efeito da concentração de ConA, em solução ferro/ferricianeto (em TFS 10mM em  $\text{H}_2\text{O}$  pH 7,4). a) ■ Eletrodo Pt limpo; ■ ConA 25  $\mu\text{g/mL}$ ; ■ ConA 50  $\mu\text{g/mL}$ ; ■ ConA 100  $\mu\text{g/mL}$ ; ■ ConA 200  $\mu\text{g/mL}$ , b) Valor de  $Z_{re}$  em função da concentração.

O efeito da concentração foi analisado para os sistemas nanoAu-ConA e nanoAu-ConA-PVB, onde avaliamos a lectina num sistema coloidal e num sistema sol-gel respectivamente. Pode-se observar nos diagramas de Nyquist que ao aumentarmos a concentração da lectina ocorre um aumento proporcional do diâmetro da impedância ( $Z_{re}$ ), a superfície do eletrodo está sendo bloqueada pela presença da proteína levando ao comportamento linear abaixo (Fig. 25).

Ao analisar o efeito da concentração para o sistema nanoAu-ConA-PVB verificamos que assim como para o sistema nanoAu-ConA, houve um aumento gradativo da componente  $Z_{re}$  da impedância (Fig.26), de modo que este aumento foi maior que quando tínhamos apenas as nanopartículas de ouro presentes no meio, através do qual podemos verificar que há um efeito de bloqueio da superfície devido a lectina ConA como também do polímero PVB.

A membrana de PVB pode agir como um isolante elétrico e como uma camada que bloqueia o transporte de massa, blindando a difusão através da superfície do eletrodo. Mesmo com a adição do PVB não verificamos um bloqueio completo da superfície do eletrodo, pois as nanopartículas de ouro demonstram ter um efeito marcante sobre a propriedade de barreira do PVB. Além disso, as nanopartículas de ouro podem favorecer a transferência de elétrons entre o par redox ferri-ferro e a superfície do eletrodo, já que o sistema contendo PVB forma um arranjo contínuo entre as nanopartículas e o eletrodo.

Estudos com nanopartículas de Ag-Au mostraram que a enzima glicose oxidase não sofreu perda de sua atividade e que esta proteína pôde ser solubilizada dentro das micropartículas do polímero promovendo boa atividade e estabilidade da enzima imobilizada sobre eletrodo de Pt, o que demonstra que os sistemas com PVB são úteis

no processo de imobilização de proteínas sobre uma superfície de eletrodo (Ren *et al.*, 2005).

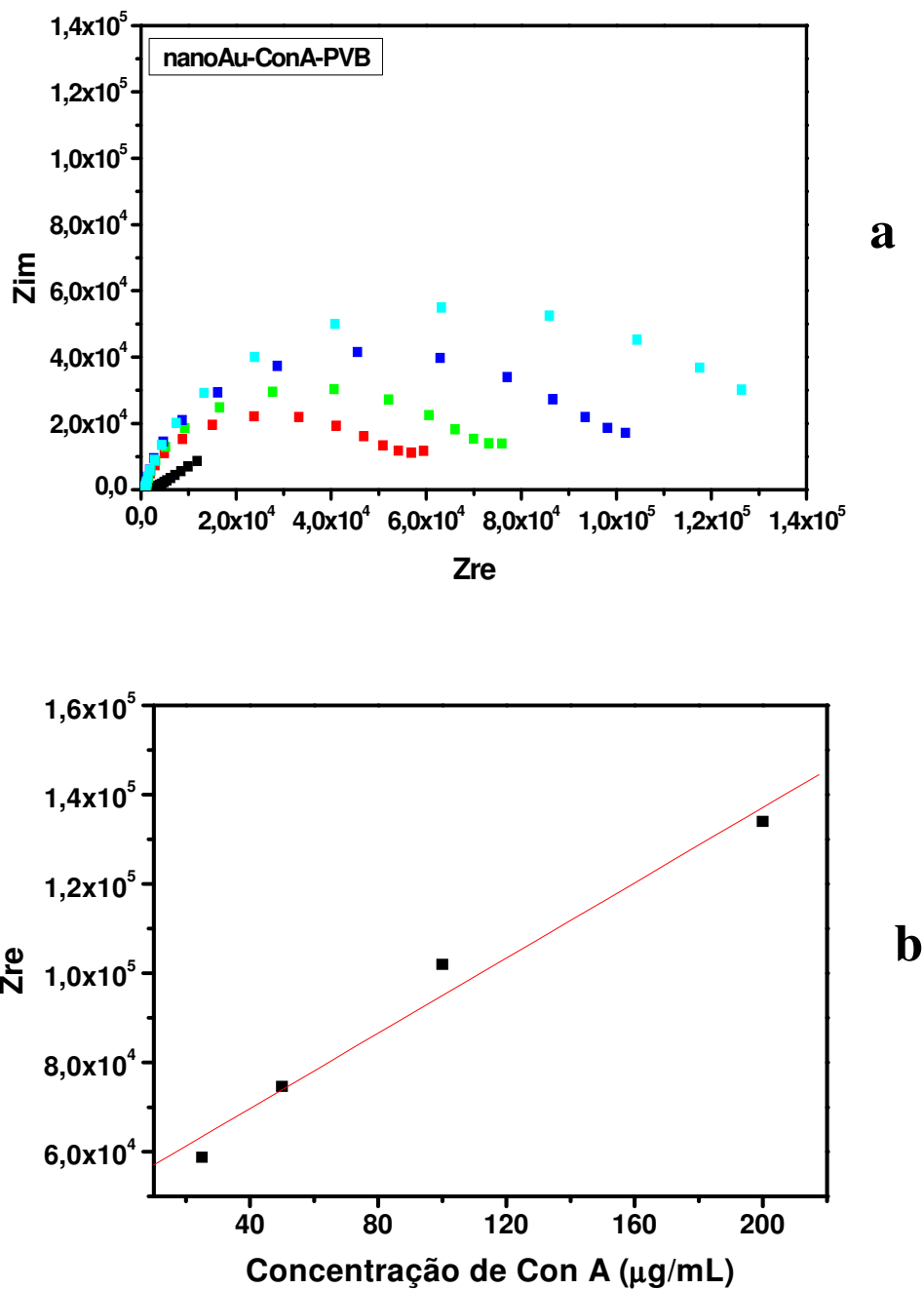


Figura 26 - Diagrama de Nyquist da avaliação do efeito da concentração de ConA no sistema com PVB, em solução ferro/ferricianeto (em TFS 10mM em H<sub>2</sub>O pH 7,4). a) ■ Eletrodo Pt limpo; ■ ConA 25 µg/mL; ■ ConA 50 µg/mL; ■ ConA 100 µg/mL; ■ ConA 200 µg/mL; b) Valor de Zre em função da concentração.

Nos voltamogramas cíclicos foi observado o mesmo comportamento linear das medidas de impedância, podendo ser verificado que o bloqueio da transferência de elétrons afetou tanto a corrente de pico catódica ( $i_{p_{cat}}$ ) quanto a anódica ( $i_{p_{an}}$ ) no sistema nanoAu-ConA (Fig. 27).

Estes resultados mostram que a lectina ConA em sistema contendo apenas o colóide de ouro teve um maior efeito sobre a região anódica de oxi-redução do par Ferri/ferrocianeto de potássio, uma vez que os valores de  $i_{p_{an}}$  decresceram com o aumento da concentração da lectina, também para  $i_{p_{cat}}$  houve um efeito da adsorção da lectina sobre a transferência de elétrons, no entanto o efeito sob esta foi menor que para a  $i_{p_{an}}$ . Podemos evidenciar que o sistema composto apenas por nanoAu-ConA também afeta a atividade do eletrodo e os processos que governam o fluxo de elétrons entre a interface eletrodo-solução.

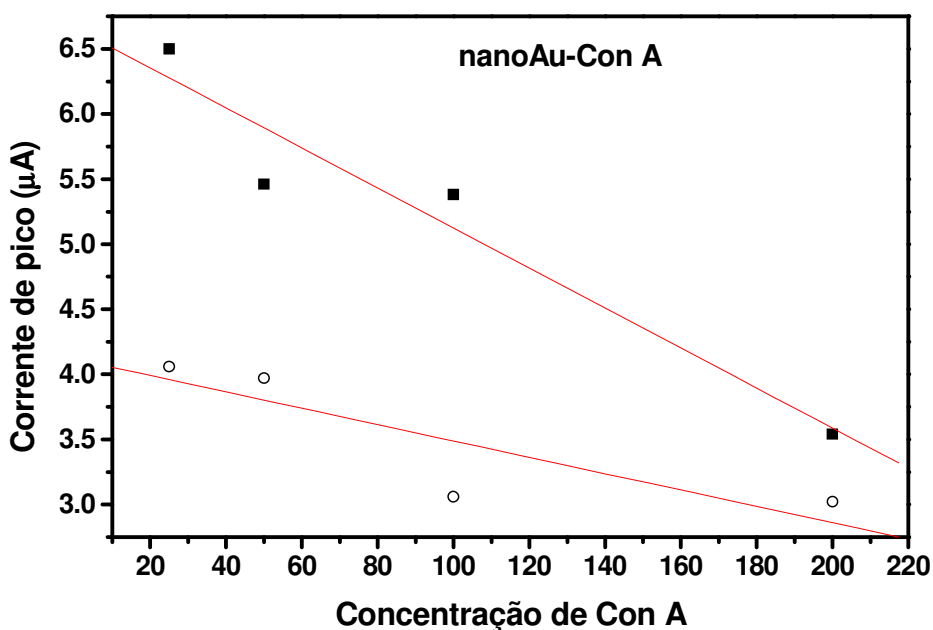


Figura 27 - Correntes de pico dos voltamogramas cíclicos do sistema nanoAu-ConA em solução ferro/ferricianeto (TFS 10mM em H<sub>2</sub>O pH 7,4). ■ Corrente de pico catódico ( $i_{p_{cat}}$ ); ○ Corrente de pico anódico ( $i_{p_{an}}$ ).

Nos voltamogramas cíclicos para nanoAu-ConA-PVB (Fig.28), também foi observado um comportamento linear assim como nas medidas de impedância, podendo ser verificado que o bloqueio da transferência de elétrons afetou tanto a corrente de pico catódica ( $i_{p_{cat}}$ ) quanto a anódica ( $i_{p_{an}}$ ).

Estes resultados mostram que a lectina ConA quando em presença de PVB teve um maior efeito sobre a região anódica de oxi-redução do par ferri/ferrocianeto de potássio, uma vez que os valores de  $i_{p_{an}}$  decresceram com o aumento da concentração da lectina fato semelhante ao do sistema nanoAu-ConA, também para  $i_{p_{cat}}$  houve um efeito da adsorção da lectina sobre a transferência de elétrons, no entanto o efeito sobre esta foi menor que para a  $i_{p_{an}}$ . Diante destes dados passamos a trabalhar com a lectina na concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ , pois nesta concentração observamos uma maior adsorção da proteína sobre a superfície em estudo, garantindo maior acesso de moléculas protéicas ao eletrodo para promover uma posterior interação da lectina com seus ligantes específicos.

A adsorção de ConA sobre superfície de platina foi investigada em função do pH durante a construção do biossensor. Foi analisada a influência do pH na adsorção de ConA nos sistemas nanoAu-ConA e nanoAu-ConA-PVB. Nestes sistemas a concentração da lectina foi mantida constante sendo os testes realizados com a concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$  e a faixa de pH utilizada foi de 2,0-9,0.

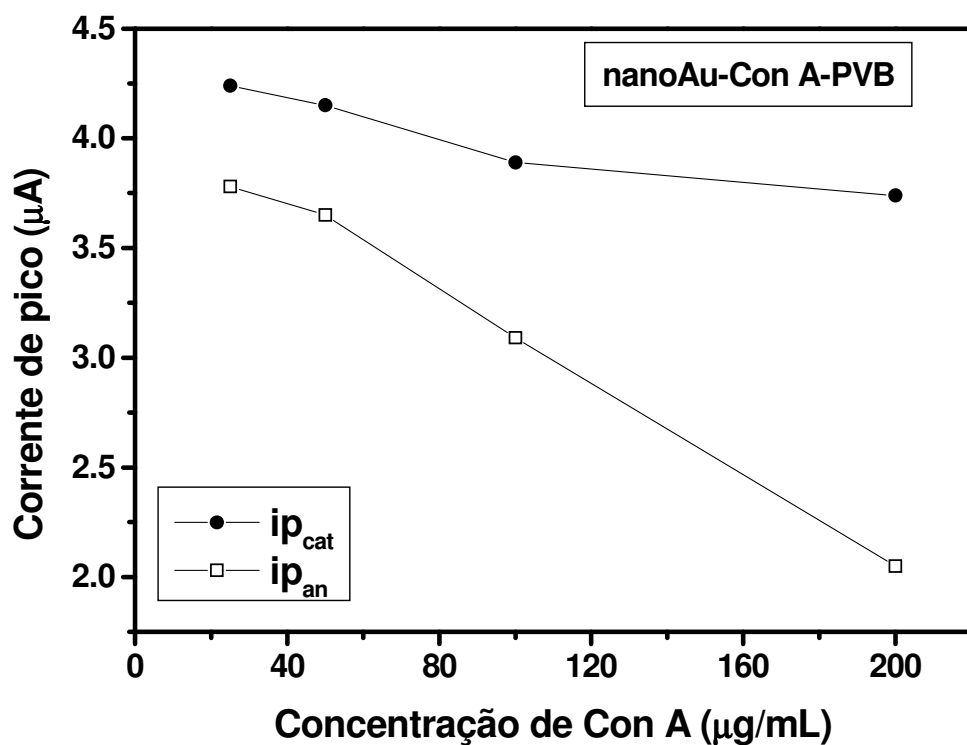


Figura 28 - Correntes de pico dos voltamogramas cíclicos do sistema nanoAu-ConA-PVB, em solução ferro/ferricianeto (em TFS 10mM em  $\text{H}_2\text{O}$  pH 7,4). ● Corrente de pico catódico ( $i_{p_{\text{cat}}}$ ); □ Corrente de pico anódico ( $i_{p_{\text{an}}}$ ).

A Fig. 29 mostra as diferenças na adsorção de ConA em diferentes pHs para sistemas nanoAu-ConA-PVB e nanoAu-ConA. A primeira observação importante para nanoAu-ConA é que a adsorção da lectina é maior quando a mesma se encontra num ambiente ácido, onde podemos visualizar um aumento na resistência a transferência de elétrons ( $Z_{\text{re}}$ ) na interface eletrodo-solução.

O processo de adsorção de proteínas é mais complexo do que o de polieletrólitos. Considerando que proteínas são macromoléculas muito complexas com regiões polares, hidrofóbicas e carregadas, as interações entre proteínas e substratos sólidos podem ser de natureza eletrostática, hidrofóbica ou através de ligações de hidrogênio. Entretanto, foi demonstrado por alguns autores (Ladam *et al.*, 2001) que a

variação de entalpia envolvida no processo de adsorção de proteínas é geralmente positiva, qualquer que seja o substrato. A adesão de proteínas sobre superfícies sólidas é, provavelmente, dirigida por rearranjos estruturais com quebra de estruturas secundárias e terciárias, levando a um ganho entrópico que compensa os valores positivos de variação entálpica e tornando o processo de adsorção espontâneo.

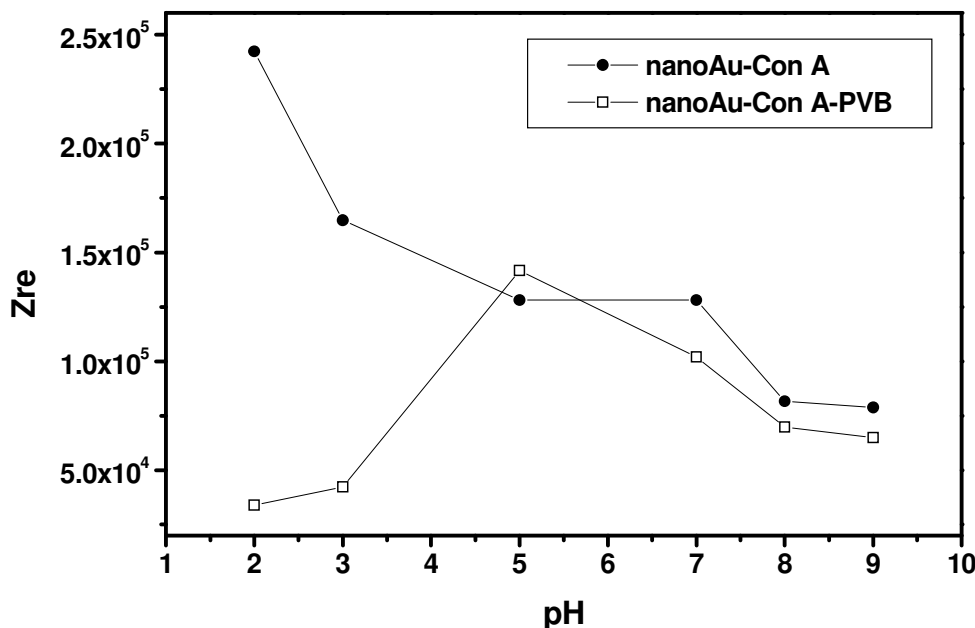


Figura 29 - Influência do pH sobre a adsorção da lectina ConA (200 µg/mL).

Em estudos de adsorção de albumina humana sobre as superfícies de hematita, poliestireno e polioximetileno (Norde e Lyklema, 1989), foi observada que esta proteína em pH 7,0 adsorvia através de ligações de hidrogênio entre a superfície do substrato e os grupos polares das proteína. Desde que as configurações e o estado eletrostático das proteínas comumente dependem do pH do meio, os valores de pH mostram uma importância vital nos processos imobilização das proteínas (Atassi *et al.*, 1984).

A quantidade de ConA adsorvida sobre as superfícies de Pt modificado com nanopartículas de ouro e polivinilbutiral variou significativamente em função do pH, como mostra a Fig. 29. A variação do pH do meio provoca mudança nas cargas da

superfície sobre a qual ConA adsorverá, assim como nas cargas dessa proteína. No sistema nanoAu-ConA em pH próximo a 2 observamos que a densidade de carga na superfície é muito alta e as interações de natureza eletrostática entre o substrato e as aminas terminais da proteína são favorecidas, levando a um aumento na quantidade de ConA adsorvida, onde para este sistema neste pH houve um máximo de adsorção.

No sistema nanoAu-ConA-PVB observa-se um comportamento diferente daquele quando a proteína está em contato apenas com as nanopartículas de ouro. Em pH próximo a 2 é observado que a densidade de carga na superfície não favorece as interações de natureza eletrostática entre o substrato e as aminas terminais da proteína, a ausência de interações específicas leva a uma fraquíssima adsorção, o que provavelmente pode ser proporcionado pelo efeito do PVB que neste pH impede a adsorção do sistema híbrido nanoAu-ConA.

Aumentando o pH até 5, as interações de natureza eletrostática entre os grupos do substrato e as aminas terminais da proteína são favorecidas, levando a um aumento na quantidade de ConA adsorvida (Fig. 29), onde podemos observar um máximo na adsorção. Este pH coincide com o ponto isoelétrico da ConA ( $pI = 5.0$ ). Nesta situação temos um substrato com alta densidade de carga, enquanto a proteína apresenta carga total zero, o que diminui sua solubilidade e favorece a adsorção. Para este sistema também foi verificado que houve uma boa adsorção da ConA em pH 7.0, que pode estar sendo favorecido pela disposição estrutural desta lectina em tetrâmero, indicando que a ConA neste pH tenha uma densidade de carga negativa muito pequena, assim como foi observado para as medidas de potencial zeta desta lectina (Fig. 20), sendo um pH adequado para se trabalhar em sistemas biológicos, bem como no desenvolvimento de biossensores protéicos ou enzimáticos.



Também foram realizadas voltametrias cíclicas para o sistema nanoAu-ConA-PVB e nanoAu-ConA, para verificar uma faixa de pH que permita uma melhor adsorção dos sistemas estudados. Os resultados obtidos nos experimentos de voltametria cíclica foram de acordo aos da impedância, pois houve uma maior adsorção da lectina quando em sistema nanoAu-PVB em pH 5,0 seguido do pH 7,0 por ser um ambiente favorável às interações entre a lectina e o eletrodo (Fig. 30). A densidade de carga da ConA é alterada de acordo com o pH do ambiente em que ela se encontra, e em determinados pontos de pH ocorre uma facilidade da lectina se adsorver alterando desta forma o perfil de oxi-redução das espécies envolvidas no processo de transferência de elétrons. Nestes pHs a adsorção teve um grande efeito sobre a taxa de transferência de elétrons entre os íons da solução e a superfície metálica de platina. Nos voltamogramas o maior efeito foi sobre a corrente de pico anódica assim como foi verificado para as outras etapas de investigação deste biossensor.

Podemos observar que quando a lectina está em contato com as nanopartículas de ouro e o PVB ocorre maior efeito sobre as correntes de pico catódicas e anódicas especialmente no pH 5,0 e 7,0 (Fig 30a). Já para o sistema nanoAu-ConA houve uma maior adsorção da lectina em pH ácido (pH 2,0), indicando que a disposição da lectina em dímero apresenta uma adsorção favorecida, enquanto que em pH mais básico não se verificou este efeito de diminuição das reações do par redox (Fig. 30b).

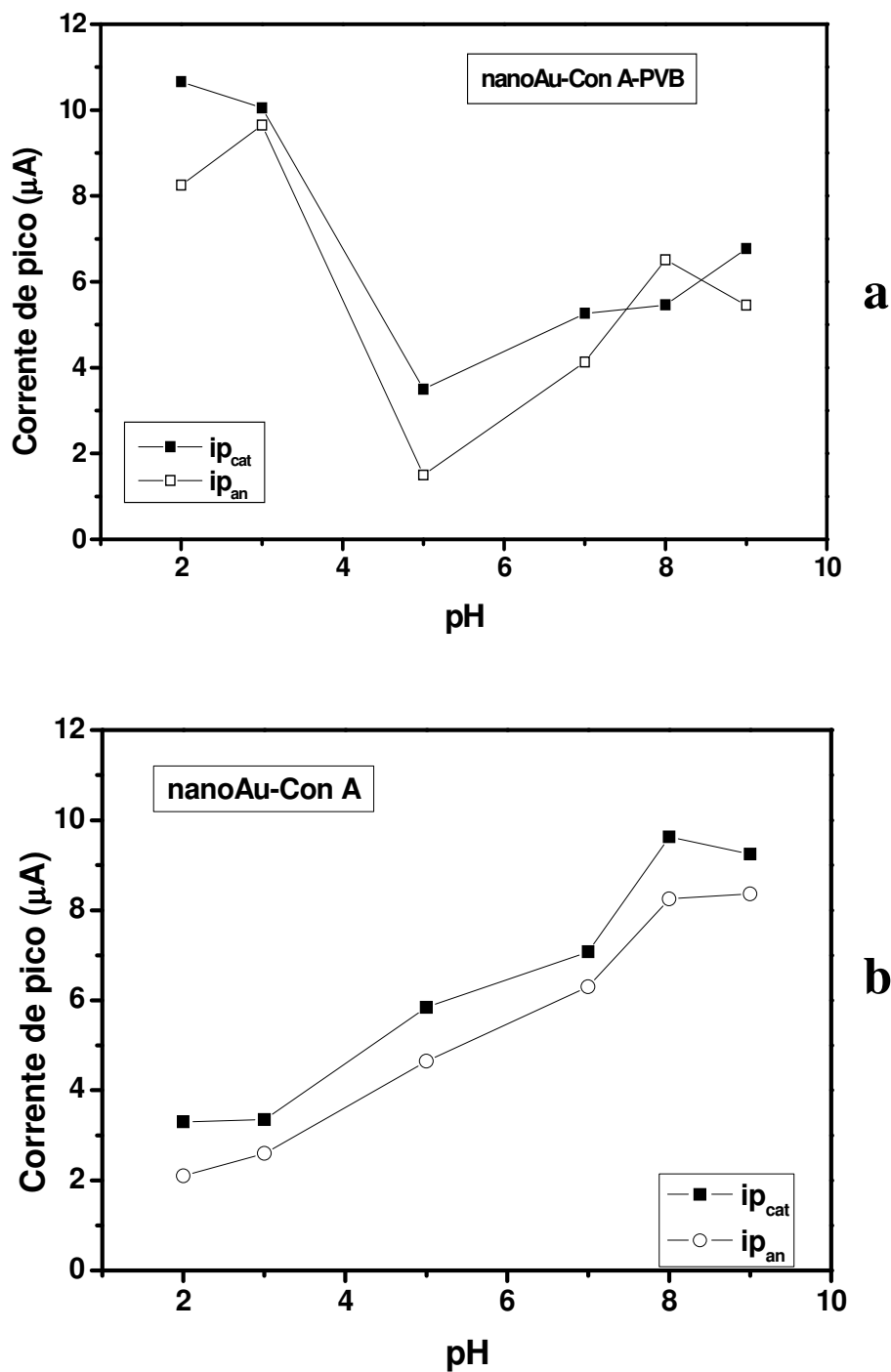


Figura 30 - Comportamento das correntes de pico dos voltamogramas cíclicos obtidos para avaliação da adsorção de ConA em diferentes pHs.

Existe desta forma uma forte dependência das correntes de pico catódico e anódico sobre o pH da solução, fato também observado em sistema constituído pelo hormônio glicoprotéico gonadotrofina coriônica humana, seu anticorpo específico e

titânio, adsorvidos em eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro. Podendo ser observado uma melhor resposta na faixa de pH de 6.0-7.1, demonstrando que a adsorção das proteínas varia de acordo com o pH do meio (Chen *et al.*, 2006).

A partir das informações selecionamos algumas condições experimentais para a realização do trabalho. Com relação ao tempo de incubação para a construção do biossensor foi escolhido o tempo de 30 min por promover uma melhor interação entre o sistema contendo tanto a lectina ConA como a CramoLL e os eletrodos de estudo (platina ou ouro). A concentração de trabalho escolhida para ambas as lectinas foi a de 200 µg/mL, enquanto que o pH de escolha para o estudo do biossensor nanoAu-lectina-PVB foi o pH 7,0 que não corresponde ao ponto isoelétrico da lectina ConA e também por se tratar de um pH neutro em que as lectinas apresentam baixa densidade de cargas elétricas em sua superfície.

### ***3.3 Avaliação da atividade biológica da ConA em eletrodos de platina modificados***

O processo de fabricação do biossensor foi acompanhado pela voltametria cíclica utilizando o par redox ferrocianeto como indicador. A voltametria cíclica do ferrocianeto de potássio é uma forma de acompanhar o eletrodo modificado, bem como o comportamento após cada etapa da montagem. Quando a superfície do eletrodo é modificada por materiais, a cinética de transferência de elétrons de  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  é perturbada. A Fig. 31 mostra um processo redox controlado por difusão no voltamograma cíclico que é característico de Pt limpo. Depois de incubar a Pt numa solução contendo nanopartículas de ouro o processo de transferência de elétrons não foi modificada, sendo observado o mesmo comportamento de um eletrodo limpo (Fig. 31), no entanto, ao estar em contato com nanoAu-ConA houve uma queda

dos picos catódico e anódico indicando uma adsorção direta ao eletrodo apresentando uma fixação momentânea ao eletrodo (Fig. 31). Quando o eletrodo de platina foi modificado com nanoAu-ConA-PVB houve uma separação pico a pico entre as curvas anódicas e catódicas do par redox em estudo (Fig. 31a) devido a imobilização da lectina no eletrodo e perturbação da transferência de elétrons na interface associado a capacidade do PVB de blindar a superfície do eletrodo também.

Com o intuito de avaliar a bioatividade da lectina, o sistema nanoAu-ConA-PVB foi testado com uma glicoproteína isolada de ovo, a ovoalbumina, que sendo uma glicoproteína possui resíduos sacarídicos para que a lectina possa interagir. Ao adicionar a ovoalbumina houve uma interação com o sítio da lectina obtendo-se o desaparecimento do pico catódico e anódico (Fig. 31a).

Após incubar o eletrodo modificado com BSA para bloquear os sítios ativos remanescentes da superfície, houve uma resposta maior quando a ovoalbumina interagiu com a ConA (Fig. 31b), demonstrando maior eficiência para o reconhecimento sítio-específico para carboidrato da lectina em questão.

Outros autores relataram a imobilização de anticorpo utilizando nanopartículas de ouro e uma matriz de PVB, para o reconhecimento específico de antígeno como observado para o anticorpo da difteria e seu antígeno sendo descrito o bloqueio da superfície do eletrodo à medida que o mesmo estava sendo modificado (Tang *et al.*, 2000). Os voltamogramas mostram que quando o anticorpo interage com o antígeno ocorre uma blindagem da difusão do ferrocianeto através da superfície do eletrodo, ocorrendo uma diminuição da resposta amperométrica do eletrodo e um aumento na separação entre os picos anódico e catódico.

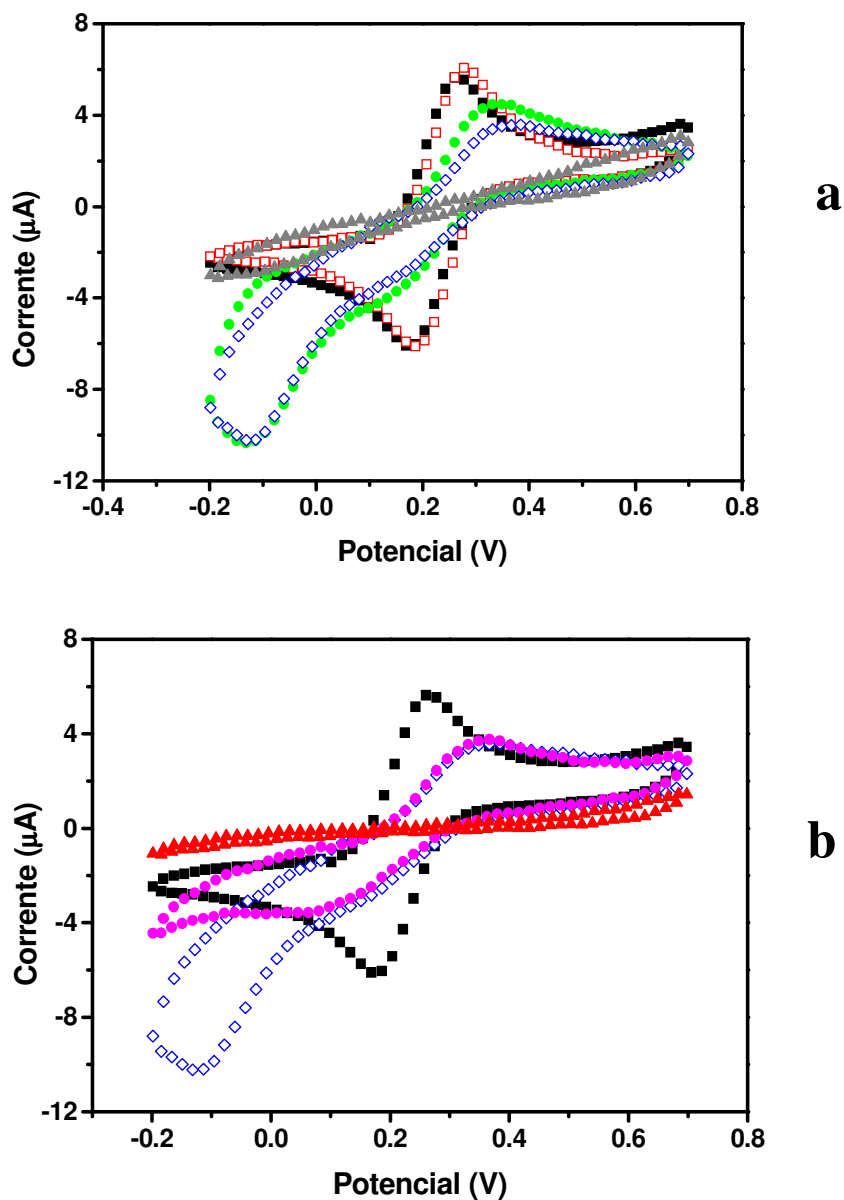


Figura 31 — Voltamogramas dos diferentes eletrodos em solução ferro/ferricianeto (em TFS 10mM em  $H_2O$  pH 7,4), Velocidade de varredura foi de  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  e  $E_0 = 0,1\text{V}$ ,  $E_1 = 0,7 \text{ V}$  e  $E_2 = -0,2\text{V}$ . a) Etapas de montagem do biossensor. a) Sem BSA: ■ Eletrodo de platina; □ Eletrodo Pt+nanoAu; ● Eletrodo Pt+nanoAu+ConA; ◇ Eletrodo Pt+nanoAu+ConA+PVB, ▲ Eletrodo Pt+nanoAu+ConA+PVB+ovoalbumina, b) com BSA: ■ Eletrodo de platina; ◇ Eletrodo Pt+nanoAu+ConA+PVB; ◆ Eletrodo Pt+nanoAu+ConA+PVB+BSA; ▲ Eletrodo Pt+nanoAu+ConA+PVB+BSA+ovoalbumina.

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) nos fornece informações sobre as mudanças na impedância da superfície do eletrodo durante o processo de formação de um biossensor. Na EIE o diâmetro do semicírculo é igual à resistência de transferência de elétrons,  $R_{te}$ . Esta resistência controla a cinética de transferência do par redox na interface do eletrodo.

Na Fig. 32 pode-se verificar um pequeno semicírculo que implica numa resistência a transferência de elétrons ao par redox dissolvido na solução eletrolítica. Depois que o eletrodo de platina foi imerso numa mistura constituída por nanoAu-ConA, a resistência interfacial do eletrodo de platina aumentou (Fig. 32a). O biossensor nanoAu-ConA-PVB foi obtido ao submeter a platina nesta solução homogênea contendo a lectina ConA, colóide de ouro e polivinilbutiral. Depois da imobilização de ConA, a resistência interfacial aumentou novamente e ao entrar em contato com a ovoalbumina o bloqueio da superfície é ainda mais evidenciado (Fig. 32a).

A observação do efeito do bloqueio dos sítios ativos remanescentes sobre a resposta impedanciométrica permite verificar que ocorreu um comportamento semelhante ao observado com a voltametria cíclica, obtendo-se uma maior resistência à transferência de elétrons na interface eletrodo-solução devido à interação específica entre o sítio da lectina para a glicoproteína (Fig. 32b).

Ao realizar o estudo do comportamento da lectina CramoLL no desenvolvimento de um sistema biossensível composto de nanopartículas de ouro e polivinilbutiral adsorvidos sobre o eletrodo de Pt, pode-se verificar que nos voltamogramas cíclicos não houve uma separação pico a pico muito evidente durante o processo de montagem do biossensor.

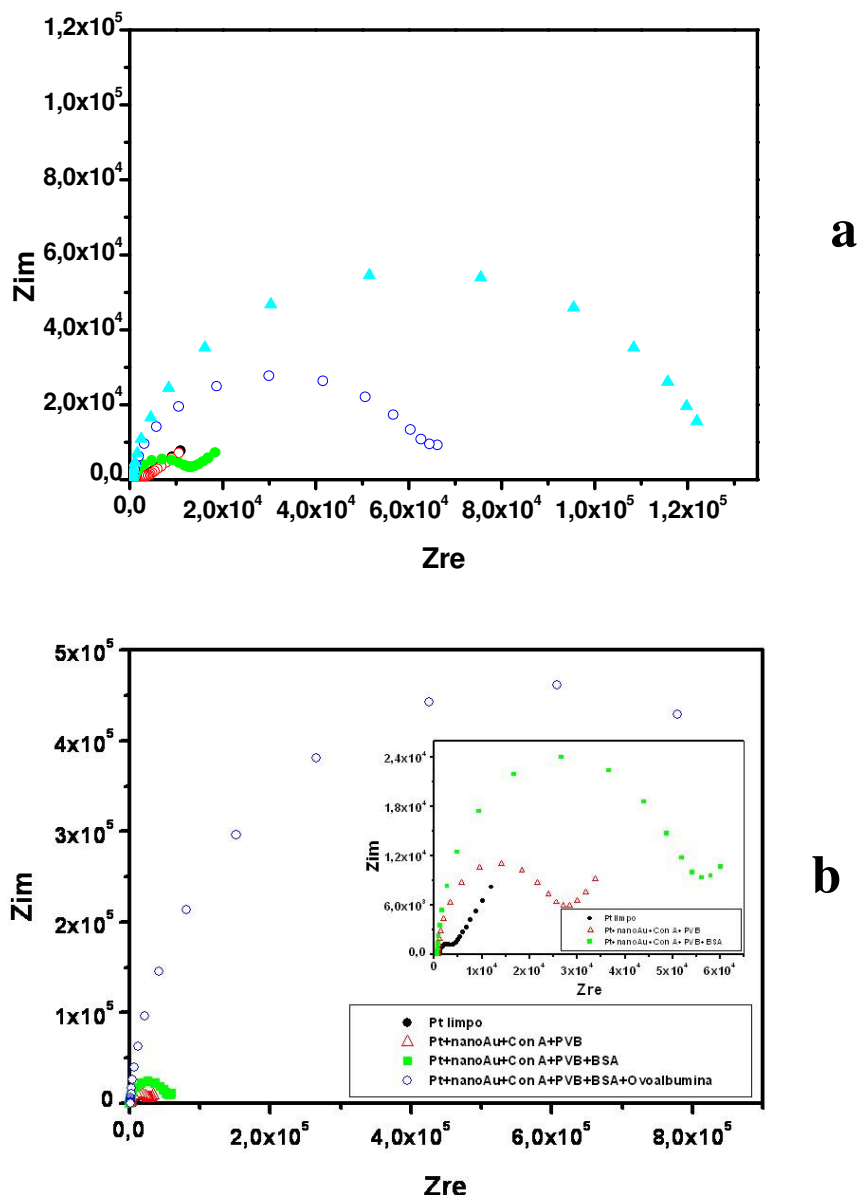


Figura 32 – Diagrama de Nyquist dos diferentes eletrodos em solução ferro/ferricianeto (em TFS 10mM

em  $H_2O$  pH 7,4). a) Sem BSA: ■ Eletrodo de platina; □ Eletrodo Pt+nanoAu; ● Eletrodo

Pt+nanoAu+conA; ◇ Eletrodo Pt+nanoAu+ConA+PVB, ▲ Eletrodo

Pt+nanoAu+ConA+PVB+ovoalbumina, b) com BSA: ● Eletrodo de platina; ▲ Eletrodo

Pt+nanoAu+ConA+PVB; ■ Eletrodo Pt+nanoAu+ConA+PVB+BSA; ○ Eletrodo

Pt+nanoAu+ConA+PVB+BSA+ovoalbumina.

Houve uma separação discreta entre os VCs de Pt-nanoAu-CramoLL e Pt-nanoAu-CramoLL-PVB na região catódica acompanhado de um prolongamento que também foi visualizado com a lectina ConA, no entanto, este prolongamento do

voltamograma na região catódica indica ser um processo característico do eletrodo de Pt, o qual é muito sensível a concentrações mínimas de oxigênio na solução eletrolítica em análise (Fig. 33a).

O contorno dos voltamogramas evidencia que o processo de transferência de elétrons entre eletrodo-solução não está sendo muito afetado, mas ao analisar os gráficos de Nyquist, podemos perceber que há uma alteração na atividade do eletrodo de Pt e com a conseqüente diminuição do fluxo de elétrons, já que a dupla camada elétrica está sendo afetada pela presença das camadas do sistema híbrido em questão (Fig. 33b).

No diagrama de Nyquist (Fig. 33b) é evidenciado que ocorre uma diferença de resposta elétrica à medida que o biossensor está sendo montado ocorrendo um aumento gradativo da  $R_{CT}$  do sistema, indicando um comportamento semelhante ao que foi observado para a ConA. No entanto, os valores do  $R_{CT}$  para a construção do biossensor Pt-nanoAu-CramoLL-PVB, são bem menores que os valores obtidos para a lectina ConA, o que indica que a ConA adsorve/interage mais com o eletrodo de Pt, o que pode estar relacionado com as propriedades estruturais bem como o peso molecular desta lectina.

O que podemos evidenciar é o comportamento interfacial semelhante das lectinas ConA e CramoLL apesar das diferenças em ordem de grandeza das medidas dos voltamogramas cíclicos e impedância eletroquímica (Fig. 34a, b).

As duas lectinas seguem a mesma tendência de adsorver no eletrodo de Pt demonstrando a viabilidade de utilizar ConA e CramoLL no desenvolvimento de sistemas biossensíveis e que o sistema sol-gel composto de nanopartículas de ouro e polivinilbutiral é propício para desenvolver este tipo de biossensor.



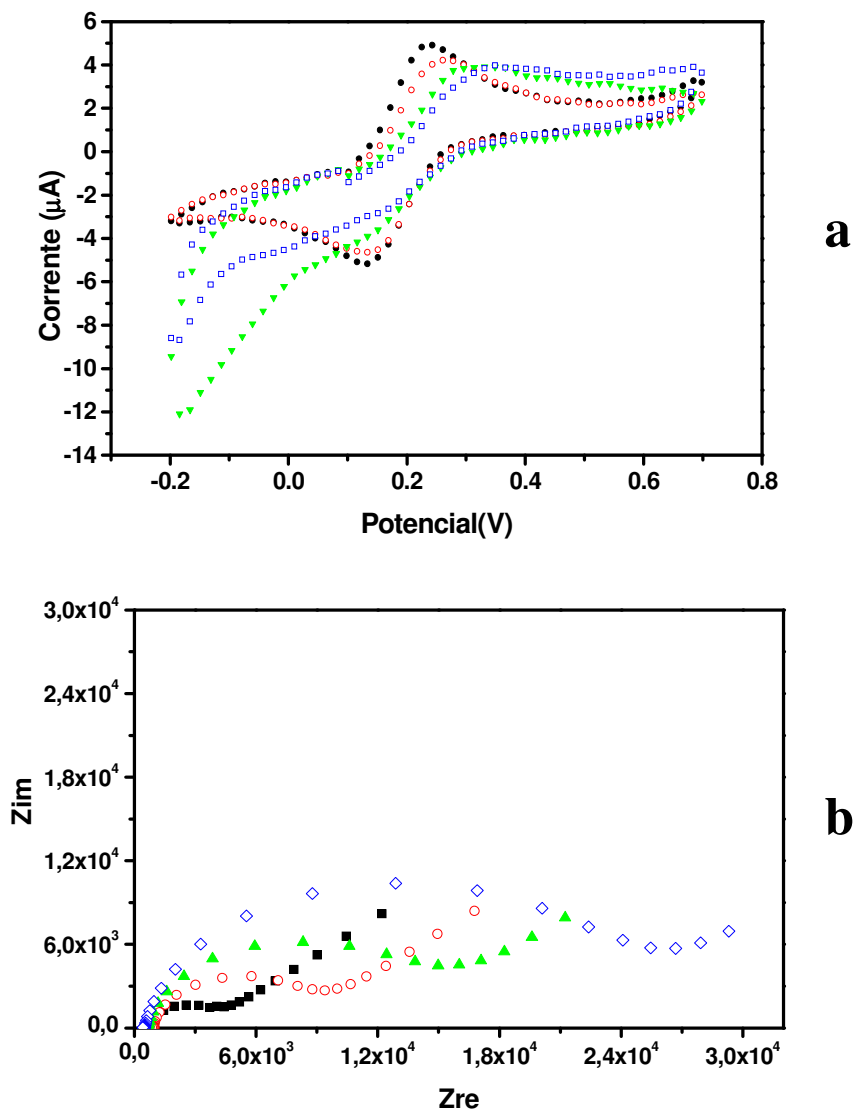


Figura 33 - Montagem do biossensor com CramoLL. a) Voltamogramas cíclicos (VCs): ■ Eletrodo de platina; ○ Eletrodo Pt+nanoAu; ▲ Eletrodo Pt+nanoAu+CramoLL; ◇ Eletrodo Pt+nanoAu+CramoLL+PVB, b) Diagrama de Nyquist: ■ Eletrodo de platina; ○ Eletrodo Pt+nanoAu; ▲ Eletrodo Pt+nanoAu+CramoLL; ◇ Eletrodo Pt+nanoAu+CramoLL+PVB.

Os voltamogramas cíclicos realizados com o eletrodo de Pt apresentaram interferência do oxigênio, apesar da solução ter sido nitrogenada. Diante deste fato passamos a explorar o processo de automontagem do biossensor baseado em nanopartículas de ouro e polivinilbutiral com eletrodos de ouro policristalino, uma vez que esta superfície sofre menos interferências de gases presentes na solução.

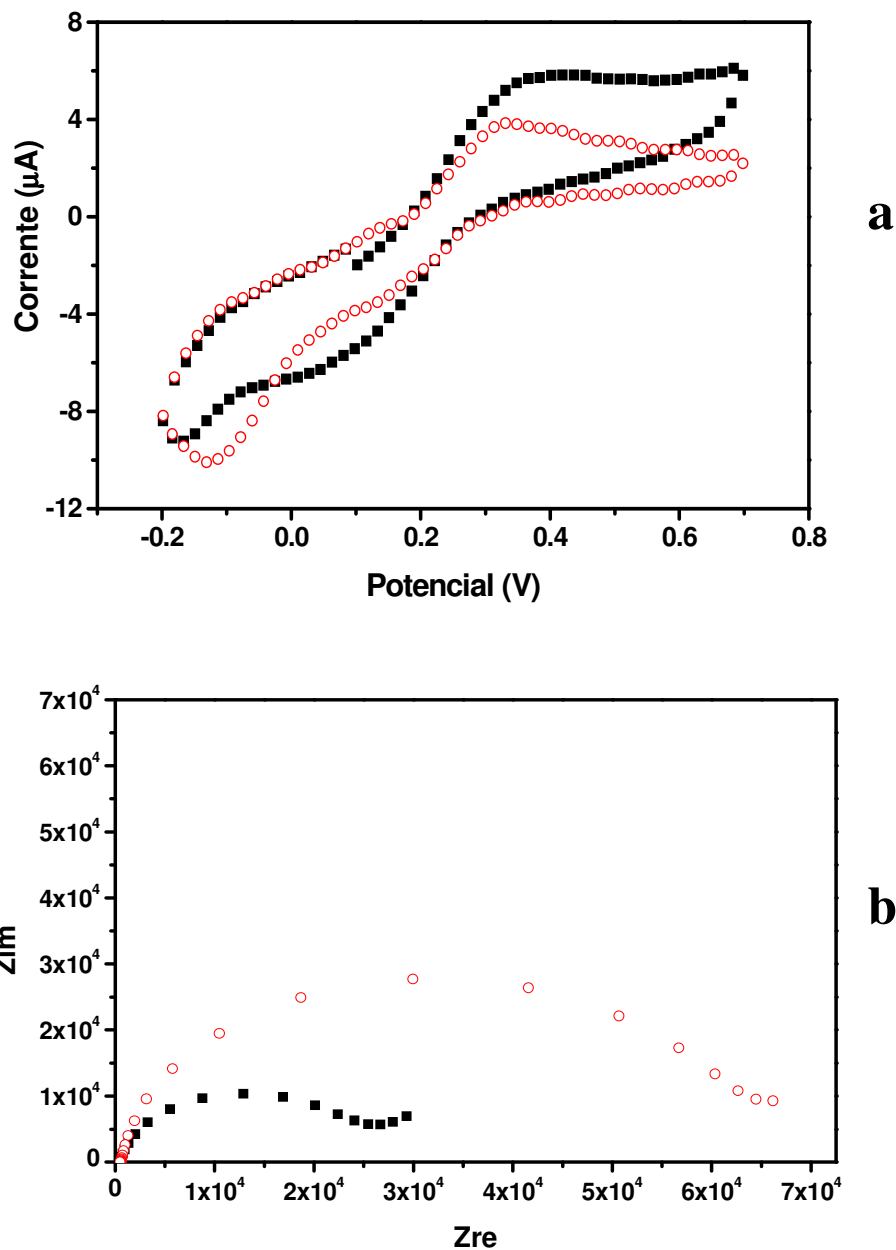


Figura 34 - Comportamento eletroquímico das lectinas CramoLL e ConA sobre eletrodo de Pt. a)

Voltamogramas cíclicos (VCs): ■ Eletrodo Pt+nanoAu+CramoLL+PVB; ○ Eletrodo Pt+nanoAu+ConA+PVB.

A montagem do biossensor com eletrodo de ouro foi realizada da mesma forma que foi utilizado o eletrodo de Pt servindo os dados deste como forma de padronização das condições experimentais.

### ***3.4 Avaliação da atividade biológica da ConA e CramoLL em eletrodos de ouro modificados***

Os voltamogramas medidos em eletrodo de ouro foram comparados, sendo observada uma queda de corrente à medida que o sistema nanoAu-CramoLL-PVB estava sendo montado (Fig. 35a), com corrente menor que o eletrodo de ouro limpo. Além disso, também foi observado que a curva dos voltamogramas cíclicos são menos sigmoidais em relação ao eletrodo de ouro limpo e eletrodo de ouro com nanopartículas de ouro. Ambas as observações indicam que o eletrodo de ouro é bloqueado pelas monocamadas contendo a lectina CramoLL. No entanto, a presença das correntes anódicas e catódicas demonstram que os elétrons ainda são transferidos entre a solução e o eletrodo. Ao submeter o sistema aos ligantes ovoalbumina, glicogênio e glicose houve uma nova diminuição da corrente quando em contato com a ovoalbumina e glicogênio, o mesmo não foi observado com a glicose (Fig 35b).

Na Fig. 35b pode-se observar que em contato com a ovoalbumina e glicogênio houve uma queda da corrente e que a forma dos voltamogramas para ambos os açúcares são idênticos, no entanto diferenças são observadas nas medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica e ao realizar o cálculo das áreas anódicas e catódicas que serão vistas mais adiante.

Em adição, a interação com glicose e glicogênio para o sistema CramoLL (Fig. 36) mostrou um aumento da carga anódica e catódica ( $\mu\text{C}$ ).

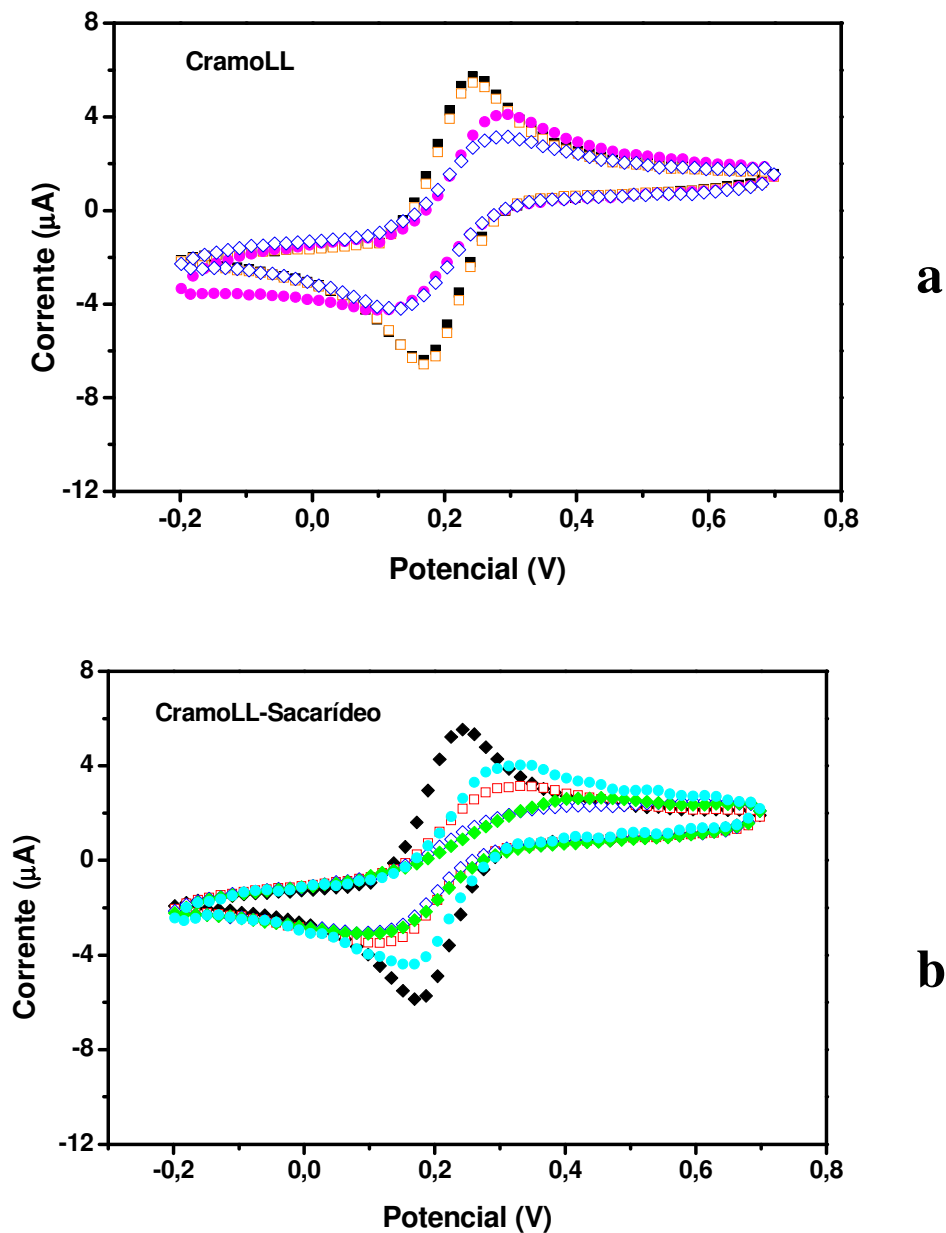


Figura 35 - Voltamogramas cíclicos (VCs) dos diferentes eletrodos. a) Etapas de montagem do biossensor: ■ Eletrodo de ouro; □ Eletrodo Au+nanoAu; ◆ Eletrodo Au+nanoAu+CramoLL; ◇ Eletrodo Au+nanoAu+CramoLL+PVB, b) Interação com açúcares: ◆ Eletrodo de ouro; □ Eletrodo Au+nanoAu+CramoLL+PVB; ◇ Eletrodo Au+nanoAu+CramoLL+PVB+BSA+ovoalbumina; ◆ Eletrodo Au+nanoAu+CramoLL+PVB+BSA+glicogênio; ● Eletrodo Au+nanoAu+CramoLL+PVB+BSA+glicose.

O aumento pode significar que tanto a glicose como o glicogênio podem ter interagido com sucesso com esta lectina, já que a área não sofreu diminuição evidente,

pois há um aumento da resposta amperométrica do sistema assim como é observado em sistemas biossensíveis tais como os enzimáticos e o DNA.

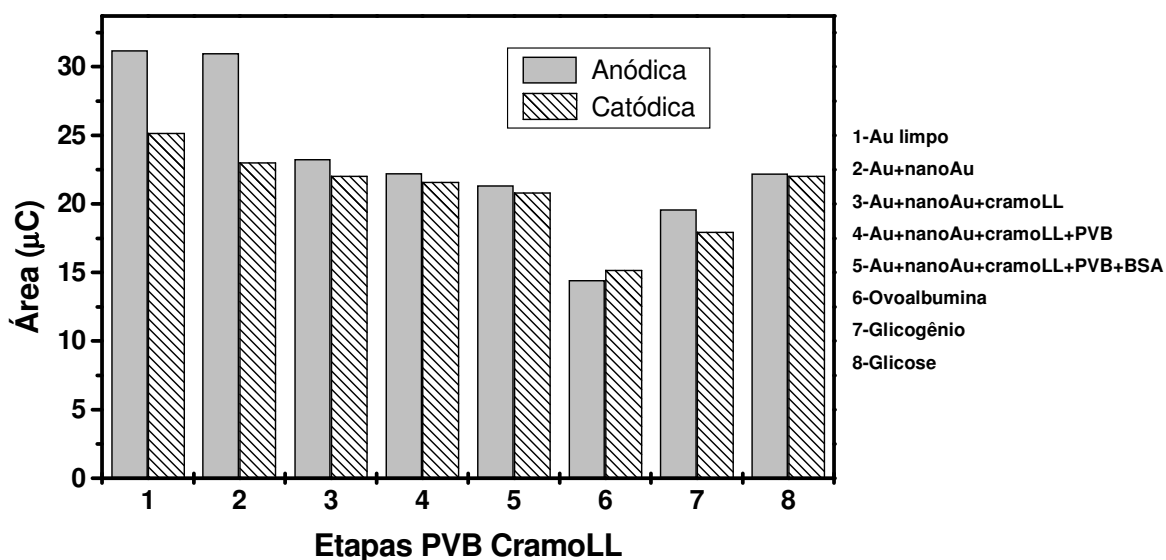


Figura 36 - Área dos voltamogramas cíclicos (VCs) dos diferentes eletrodos em solução ferro/ferricianeto para sistema com CramoLL (em TFS 10mM em H<sub>2</sub>O pH 7,4), Velocidade de varredura foi de 50 mV.s<sup>-1</sup> e  $E_0 = 0,1V$ ,  $E_1 = 0,7 V$  e  $E_2 = - 0,2V$ .

Ao avaliar as respostas impedanciométricas do sistema CramoLL em eletrodos de ouro, verificou-se uma dificuldade no processo de transferência de elétrons à medida que ocorre a modificação do eletrodo o que pode ser observado na Fig. 37a, b. Não obstante há um grande aumento do Zre quando se tem o biossensor em contato com o ligante bioespecífico (ovoalbumina), indicando boa seletividade de CramoLL para a ovoalbumina. Na Fig. 37b observa-se que a resposta impedimétrica do biossensor Au-nanoAu-CramoLL-PVB-BSA foi modificada quando em contato com os ligantes ovoalbumina, glicogênio e glicose, onde para a ovoalbumina houve um aumento do Zre enquanto que para glicogênio e glicose houve uma queda do Zre.

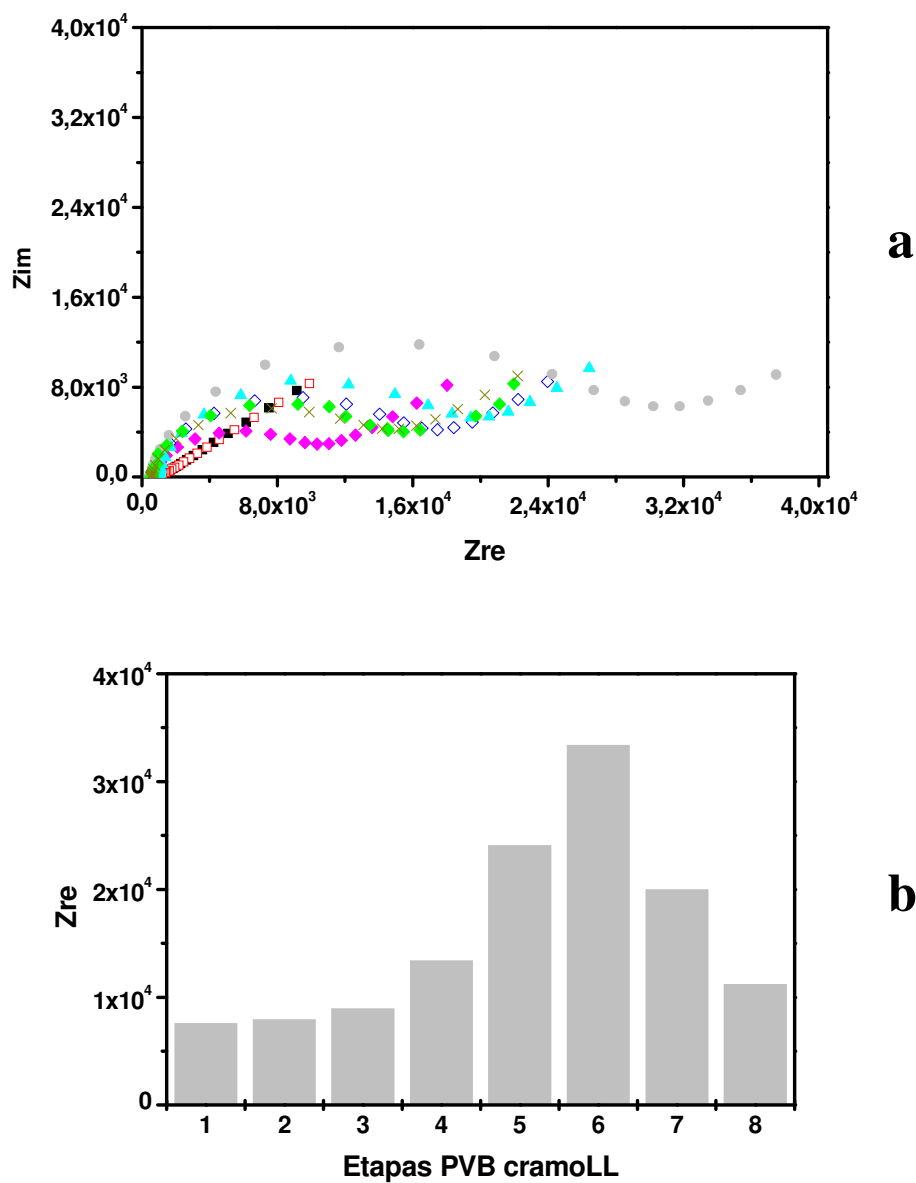


Figura 37 - Espectroscopia de impedância (EI) dos diferentes eletrodos em solução ferro/ferricianeto (em TFS 10mM em H<sub>2</sub>O pH 7,4), Velocidade de varredura foi de 50 mV.s<sup>-1</sup> e E<sub>0</sub> = 0,1V, E<sub>1</sub> = 0,7 V e E<sub>2</sub> = -0,2V. a) Etapas de montagem do biossensor: ■ Eletrodo de ouro; □ Eletrodo Au+nanoAu; ◆ Eletrodo Au+nanoAu+CramoLL; ◇ Eletrodo Au+nanoAu+CramoLL+PVB, ▲ Eletrodo Au+nanoAu+CramoLL+PVB+BSA; ● Eletrodo Au+nanoAu+CramoLL+PVB+BSA+ovoalbumina; ◆ Eletrodo Au+nanoAu+CramoLL+PVB+BSA+glicogênio; × Eletrodo Au+nanoAu+CramoLL+PVB+BSA+glicose, b) Valor de Zre obtido após cada etapa da montagem. As etapas 1-8 correspondem aos diagramas de Nyquist em a).

Durante o processo de montagem do biossensor com a lectina ConA pôde-se observar comportamento semelhante ao da lectina CramoLL, pois à medida que o eletrodo de ouro sofre modificações é observada uma queda gradativa da resposta amperométrica (Fig. 38).

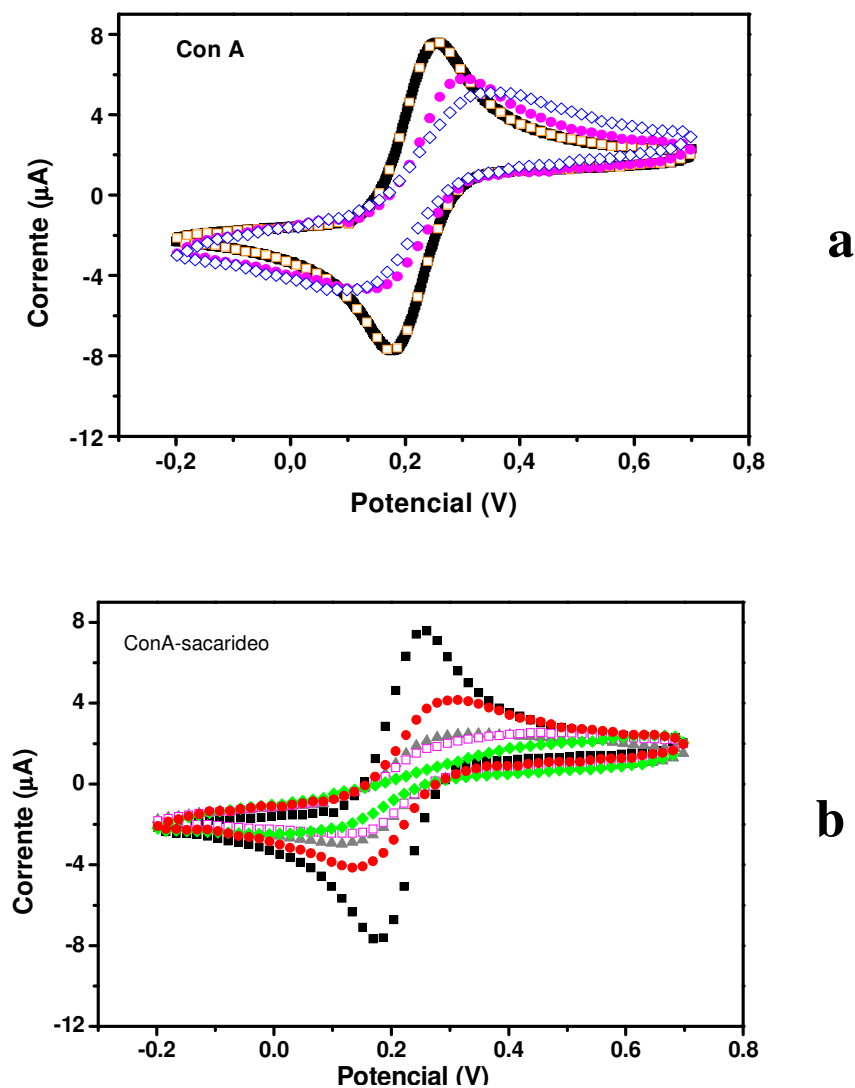


Figura 38 - Voltamogramas dos diferentes eletrodos em solução ferro/ferricianeto (em TFS 10mM em H<sub>2</sub>O pH 7,4), Velocidade de varredura foi de 50 mV.s<sup>-1</sup> e E<sub>0</sub> = 0,1V, E<sub>1</sub> = 0,7 V e E<sub>2</sub> = - 0,2V. a) Etapas de montagem do biossensor: ■ Eletrodo de ouro; □ Eletrodo Au+nanoAu; ◆ Eletrodo Au+nanoAu+ConA; ◇ Eletrodo Au+nanoAu+ConA+PVB, b) Interação com açúcares: ■ Eletrodo de ouro; ▲ Eletrodo Au+nanoAu+ConA+PVB+BSA; □ Eletrodo Au+nanoAu+ConA+PVB+BSA+ovoalbumina; ◆ Eletrodo Au+nanoAu+ConA+PVB+BSA+glicogênio; ● Eletrodo Au+nanoAu+ConA+PVB+BSA+glicose.

As curvas dos VCs ilustram o comportamento do  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  como indicador redox, dissolvido em tampão fosfato de sódio (pH 7,4), sobre o eletrodo de ouro limpo (Au), eletrodo Au modificado com nanoAu, eletrodo Au modificado com nanoAu-ConA e eletrodo Au modificado com nanoAu-ConA-PVB (Fig. 38a). O comportamento eletroquímico deste eletrodo modificado com ConA é semelhante ao modificado com CramoLL, pois o eletrodo Au limpo apresenta uma curva típica de um processo controlado por difusão de um sistema processo redox reversível.

Após a presença de ConA e posteriormente de PVB ocorre uma separação pico a pico e uma clara redução da resposta amperométrica. Podemos observar que a transferência interfacial entre o par redox e a superfície do eletrodo de Au limpo foi bloqueada devido a uma mudança da dupla camada eletroquímica sobre a superfície do eletrodo (Fig. 38a).

Ao submeter o sistema contendo ConA aos ligantes ovoalbumina, glicogênio e glicose da mesma forma como foi realizada para CramoLL, houve uma queda da corrente preponderante quando em contato com o glicogênio, o mesmo não foi observado com os outros açúcares (Fig 38b), sendo observado que o sistema torna-se cada vez mais irreversível.

Na Fig. 38b pode-se observar que em contato com a ovoalbumina e glicogênio houve uma queda da corrente e que a forma do voltamograma com glicogênio representa um comportamento mais irreversível em relação à curva da ovoalbumina, o que difere no reconhecimento em relação à lectina CramoLL em que a maior queda amperométrica foi verificada para a ovoalbumina, podendo-se verificar que as duas lectinas reconhecem os dois tipos de açúcares. No entanto, o processo da interação parece ser diferente para as duas lectinas o que mostra a possibilidade da interação de ConA e CramoLL a estes açúcares ser governada por diferentes forças para a formação



do complexo lectina-carboidrato, revelando que o processo de reconhecimento de uma glicoproteína (ex: ovoalbumina) e um homopolímero (ex: glicogênio) são diferentes para ambas lectinas em estudo (Fig. 38b).

Ao analisar as áreas dos voltamogramas após cada etapa de modificação do eletrodo com ConA, pode-se observar que para a lectina ConA houve um aumento da resposta amperométrica apenas para a glicose, e um decréscimo para ovoalbumina e glicogênio (Fig. 39). Neste estudo foi possível verificar que a diferença entre as duas lectinas reside no fato que o evento envolvido no processo de reconhecimento do glicogênio é diferente para ambas, sendo importante no processo de investigação de características que envolvam o processo de adsorção típico destas lectinas.

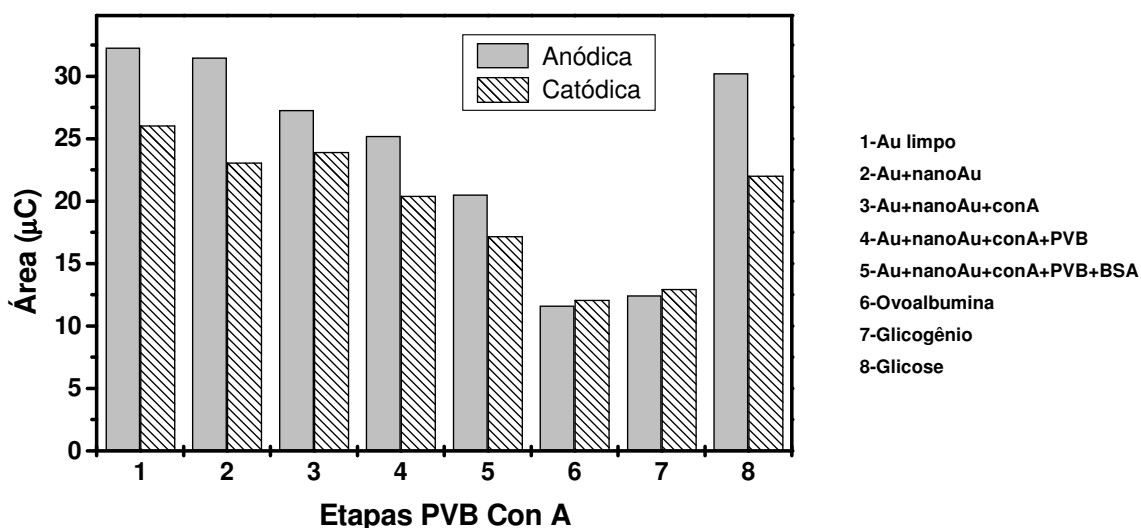


Figura 39 - Área dos voltamogramas cíclicos (VCs) dos diferentes eletrodos em solução ferro/ferricianeto para sistema com ConA (em TFS 10mM em H<sub>2</sub>O pH 7,4), Velocidade de varredura foi de 50 mV.s<sup>-1</sup> e E<sub>0</sub> = 0,1V, E<sub>1</sub> = 0,7 V e E<sub>2</sub> = - 0,2V.

A Fig. 40 mostra os resultados das medidas de impedância feitas sobre o eletrodo de ouro limpo, e eletrodo de ouro com nanoAu, nanoAu-ConA, nanoAu-ConA-PVB, nanoAu-ConA-PVB-BSA, nanoAu-ConA-PVB-BSA-açúcares.

A Fig. 40a mostra as medidas de impedância apresentadas como diagramas de Nyquist ( $-Z_{im} \times Z_{re}$ ) das etapas de modificação do eletrodo. Como pode ser visto o  $Z_{re}$  do eletrodo modificado com o sistema sol-gel é maior que o  $Z_{re}$  do eletrodo de ouro limpo, assim como foi observado para o sistema contendo a lectina CramoLL.

No entanto, há uma dificuldade no processo de transferência de elétrons à medida que ocorre a modificação do eletrodo o que pode ser observado na Fig. 40a, b. Não obstante há um grande aumento do  $Z_{re}$  quando se tem o biossensor em contato com os ligante bioespecíficos (ovoalbumina e glicogênio), indicando boa seletividade de ConA para estes carboidratos, o que não foi observado para CramoLL que conseguiu interagir de forma significativa com a ovoalbumina e não com o glicogênio.

Na Fig. 40b observa-se que a resposta impedanciométrica do biossensor Au-nanoAu-ConA-PVB-BSA foi modificada quando em contato com os ligantes ovoalbumina, glicogênio e glicose, para a ovoalbumina e glicogênio houve um aumento do  $Z_{re}$ , ocorrendo o inverso para a glicose.

Estes resultados estão de acordo com as áreas obtidas dos VCs da ConA. Desta forma a lectina ConA demonstrou uma habilidade de reconhecer a ovoalbumina e o glicogênio como pôde ser observado pelo aumento do diâmetro de  $Z_{re}$  após o contato o biossensor a estes açúcares, enquanto que com a glicose houve uma queda do  $Z_{re}$  que pode estar relacionado ou não a um reconhecimento sítio-específico (Fig. 40b).

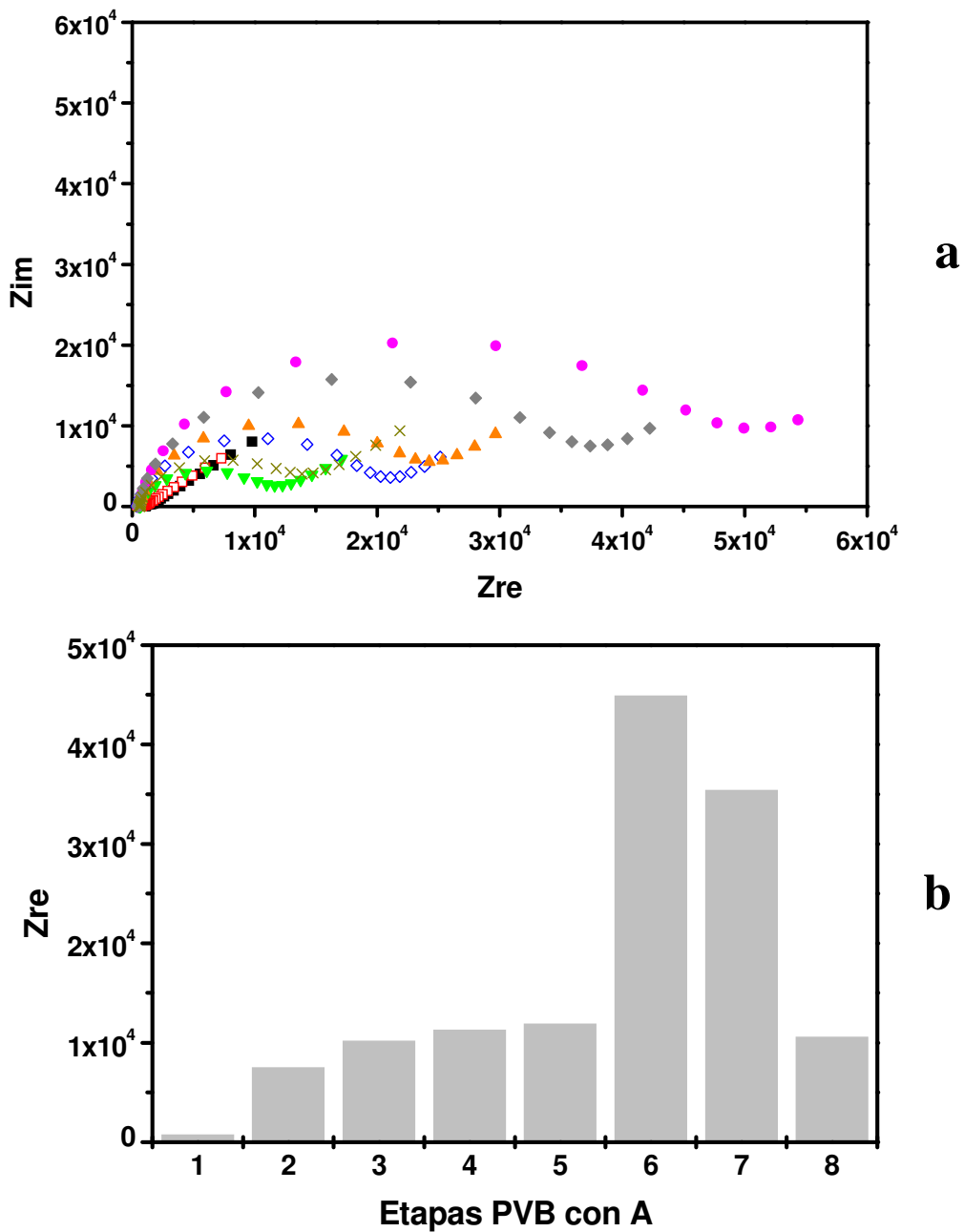


Figura 40 - Espectroscopia de impedância dos diferentes eletrodos em solução ferro/ferricianeto (em TFS

10mM em H<sub>2</sub>O pH 7,4) , Velocidade de varredura foi de 50 mV.s<sup>-1</sup> e E<sub>0</sub> = 0,1V, E<sub>1</sub> = 0,7 V e E<sub>2</sub> = -

0,2V. a) Etapas de montagem do biossensor: ■ Eletrodo de ouro; □ Eletrodo Au+nanoAu; ▼ Eletrodo

Au+nanoAu+ConA; ◇ Eletrodo Au+nanoAu+ConA+PVB, ▲ Eletrodo Au+nanoAu+ConA+PVB+BSA; ●

Eletrodo Au+nanoAu+ConA+PVB+BSA+ovoalbumina; ◆ Eletrodo

Au+nanoAu+ConA+PVB+BSA+glicogênio; × Eletrodo Au+nanoAu+ConA+PVB+BSA+glicose, b)

Valor de Zre obtido após cada etapa da montagem. As etapas 1-8 correspondem aos diagramas de Nyquist

em a).

A espectroscopia de impedância eletroquímica é um método efetivo para examinar as propriedades interfaciais dos eletrodos, especialmente em superfícies modificadas e é utilizada em transformações eletroquímicas e em processos associados com suportes condutores. É esperado que o eletrodo Au modificado com o sistema nanoAu-ConA-PVB se ajuste às características de transferência de elétrons na superfície do eletrodo. A impedância total do sistema pode ser representada como a soma do componente real e imaginária que se originam primariamente da resistência e da capacitância da célula, respectivamente. Estes dados mostram a habilidade das lectinas em reconhecer sacarídeos, interagindo com cada ligante de forma distinta como foi observado nas medidas de EIE.

Através destas informações há a possibilidade de distingui-las em por menores, uma vez que ConA e CramoLL são lectinas que apresentam similaridades estruturais. Em princípio a interação lectina-carboidrato pode ser medida através de medidas de impedância eletroquímica.

Através dos dados observados podemos verificar que provavelmente ConA e CramoLL mantiveram suas atividades biológicas durante o processo de automontagem, o que demonstra a possibilidade de se trabalhar com as nanopartículas de ouro para o desenvolvimento de um biossensor. Outras proteínas bem como a enzima glicose oxidase mantiveram-se ativas quando em contato com as nanopartículas de ouro (Liu *et al.*, 2003), devido a biocompatibilidade destas nanopartículas para as proteínas propiciando a retenção da estrutura nativa. Além disso, a elevada área superficial resulta numa forte interação entre as proteínas e o colóide de ouro, o que faz com que as moléculas protéicas se orientem de forma mais favorável sobre a superfície do ouro e encurtem a distância entre os grupos eletroativos das proteínas e nanopartículas de ouro (Brown *et al.*, 1996).

A técnica de automontagem com nanopartículas de ouro e polivinilbutiral para sistemas biológicos é conhecida por promover uma amplificação da resposta impedimétrica pelo aumento da área de superfície e elevada energia livre das nanopartículas de ouro (Tang *et al.*, 2004). Estes autores obtiveram resultados experimentais similares ao utilizarem o sistema antígeno-anticorpo do vírus HbsAg, demonstrando a possibilidade de desenvolver sistemas de reconhecimento sítio específico através do uso de nanopartículas como elementos de amplificação de sinal e o polivinilbutiral como matriz para o sistema em análise.

O PVB age como uma matriz de oclusão para componentes biológicos na matriz polimérica ou inserindo-os em membranas semipermeáveis. Materiais como enzimas, células complexas e organelas são bastante apropriados para serem imobilizados através desta metodologia. Este método apresenta a vantagem do componente biológico não se ligar à matriz, o que pode ser muito importante para evitar possível diminuição da atividade enzimática devido ao processo de imobilização e uma das desvantagens é devido as propriedades não condutoras do gel (Garcia *et al.*, 1998, Fernandes *et al.*, 1999).

A interação lectina-carboidrato é semelhante ao processo de interação anticorpo-antígeno, em que na maioria das vezes o anticorpo é imobilizado sobre um suporte condutor (ex: ouro), e as propriedades elétricas da interface são modificadas quando o anticorpo reage com o antígeno de interesse, assim como observamos em nosso estudo com as lectinas ConA e CramoLL. A organização da superfície e a montagem das biomoléculas (lectina/anticorpo) é uma etapa crítica na fabricação de biossensores. A caracterização da estabilidade ou atividade das lectinas imobilizadas e a interação com os açúcares é uma etapa importante na otimização de um biossensor.

A formação do complexo lectina-açúcar sobre um suporte condutor altera a impedância característica da interface, e a espectroscopia de impedância pode ser utilizada para estudar os eventos de reconhecimento molecular do complexo lectina-açúcar através da medida das mudanças da resistência e/ou capacitância que acompanha esta reação.

Foram propostos para os dados experimentais vários circuitos equivalentes para auxiliar a interpretação dos gráficos de Nyquist, no entanto, apenas um circuito apresentou boa qualidade de ajuste e um significado físico-químico para os elementos em análise.

Inicialmente foi avaliado o circuito equivalente da Fig. 41 para modelar as curvas experimentais. Este circuito, foi definido como circuito equivalente 1 (CE 1), para verificarmos as alterações da dupla camada elétrica e da resistência de transferência de carga observadas com a presença do polivinilbutiral e das lectinas, ConA ou CramoLL.

Na Fig. 41b-d, podemos observar o resultado teórico da modelagem entre a curva experimental e o CE 1.

O circuito equivalente da Fig. 41, circuito de Randles, foi utilizado para modelar as curvas experimentais obtidas para os ensaios de adsorção do sistema nanoAu-ConA-PVB-BSA-ovoalbumina.

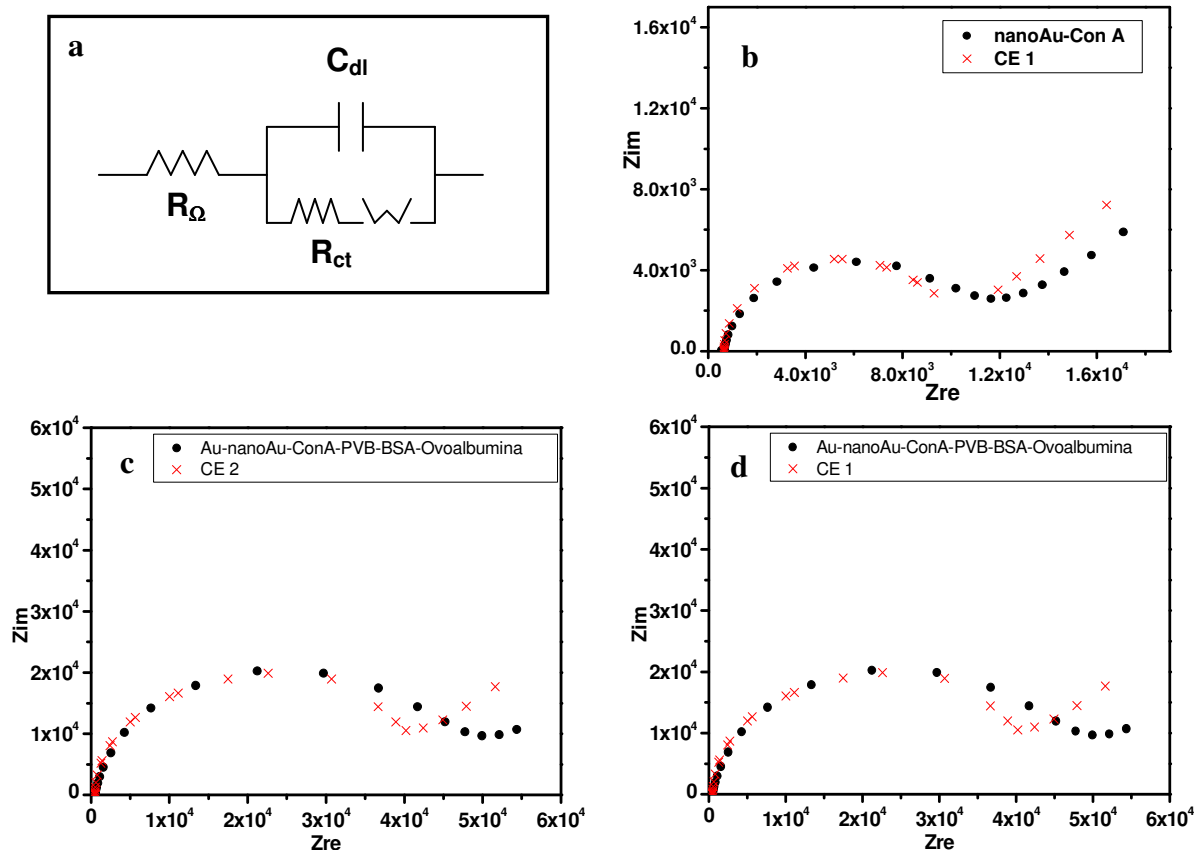


Figura 41 – a) Circuito equivalente 1; b) ajuste entre a curva experimental do sistema nanoAu-ConA; c) ajuste entre a curva experimental do sistema nanoAu-ConA-PVB; d) ajuste entre a curva experimental do sistema nanoAu-ConA-PVB-BSA-ovoalbumina. ●-Corresponde aos dados experimentais e × - corresponde aos dados teóricos.

Observa-se que o circuito foi adequado no ajuste da alta e média frequência para o sistema nanoAu-ConA, no entanto apresentou falhas na região de baixa frequência, já para os sistemas com a lectina nanoAu-ConA-PVB e nanoAu-ConA-PVB-BSA-ovoalbumina o circuito foi adequado apenas para região de alta frequência, de modo que o ajuste em média e baixa frequência não responde adequadamente quando em presença do polivinilbutiral. Mais adiante iremos evidenciar que quando substituímos a componente  $C_{dl}$  por  $Q$ , o circuito se adequou perfeitamente aos dados experimentais.

Ao adicionar uma resistência (R) e uma capacitância (C), ou seja, um circuito RC em série ao circuito de Randles (Fig. 42) verificamos que não houve melhoras significativas nos ajustes. Este circuito foi denominado de circuito equivalente 2 (CE 2). Pode-se verificar que para o sistema com ovoalbumina houve uma descontinuidade dos pontos para a região de frequência intermediária.

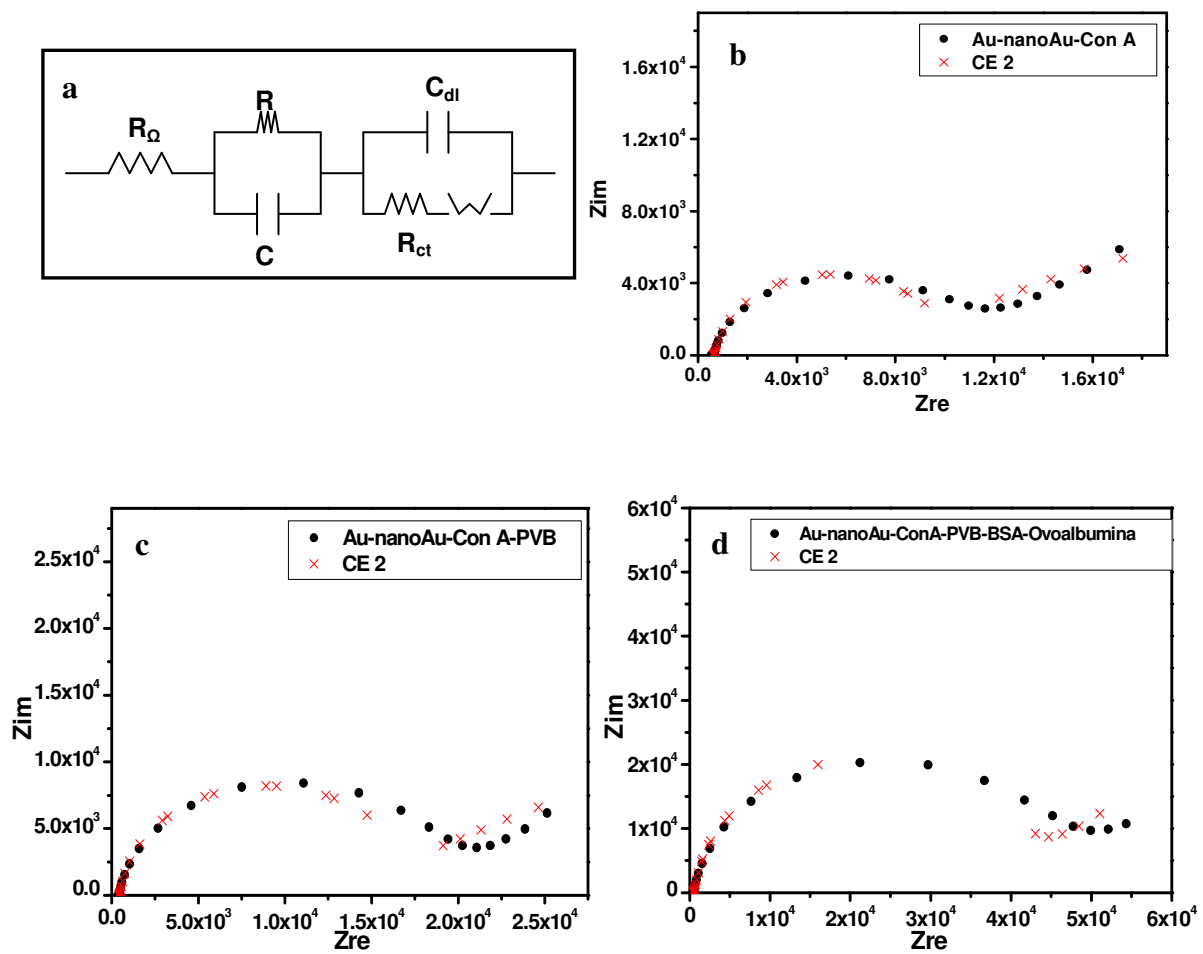


Figura 42 – a) Circuito equivalente 2; b) ajuste entre a curva experimental do sistema nanoAu-ConA; c) ajuste entre a curva experimental do sistema nanoAu-ConA-PVB; d) ajuste entre a curva experimental do sistema nanoAu-ConA-PVB-BSA-ovoalbumina. ● - Corresponde aos dados experimentais e × -

corresponde aos dados teóricos.



Com relação às análises de circuito com os sistemas compostos pela lectina CramoLL, podemos verificar comportamento similar aos dados teóricos de ConA. Para o sistema com CramoLL o circuito CE 1 não foi adequado para a região de Warburg na região de baixa frequência e assim como foi observado para a ConA houve um bom ajuste nas regiões de frequência alta e intermediária (Fig. 43).

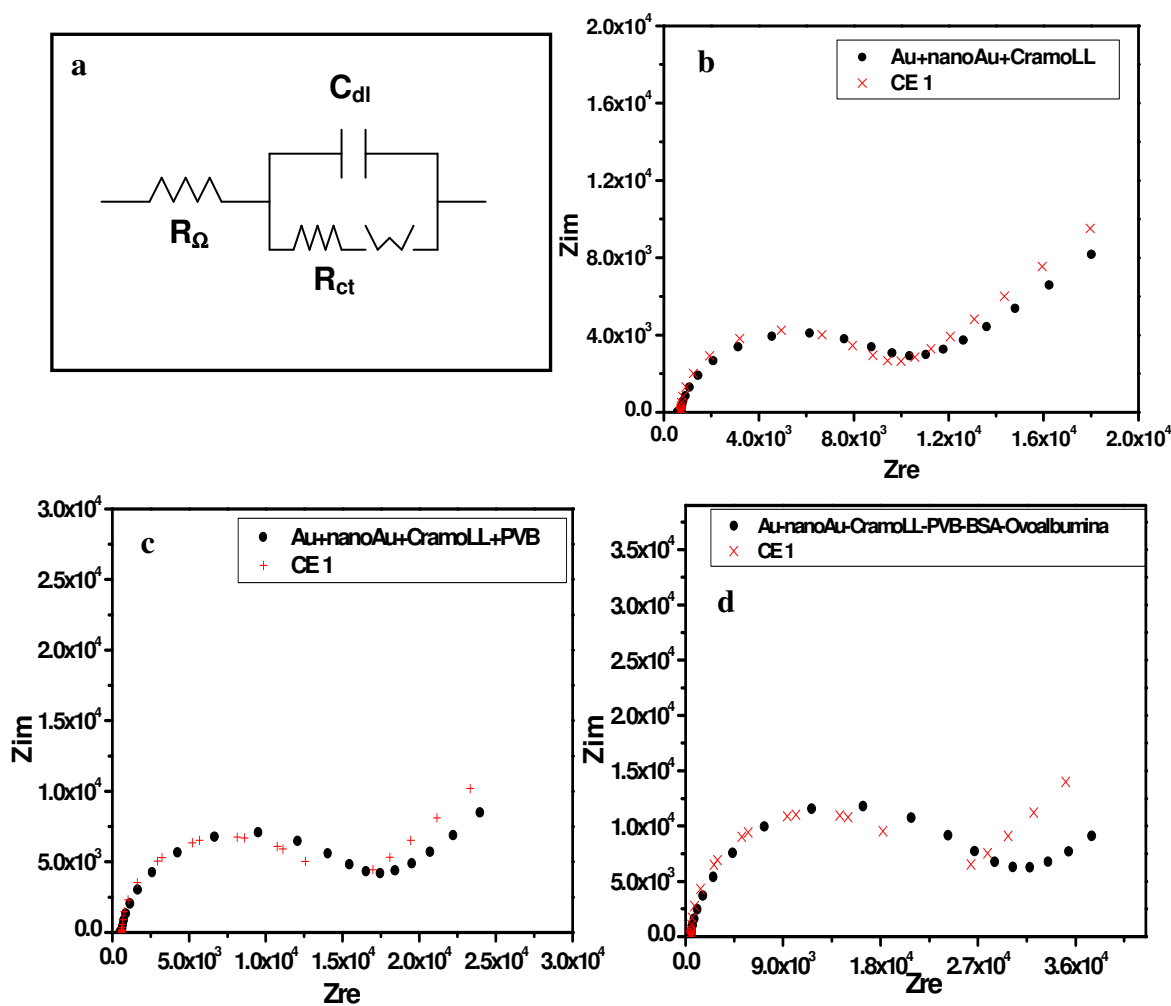


Figura 43 – a) Circuito equivalente 1; b) ajuste entre a curva experimental do sistema nanoAu-CramoLL; c) ajuste entre a curva experimental do sistema nanoAu-CramoLL-PVB; d) ajuste entre a curva experimental do sistema nanoAu-CramoLL-PVB-BSA-ovoalbumina. ● - Corresponde aos dados experimentais e × - corresponde aos dados teóricos.

A análise dos dados experimentais com o circuito de Randles apresentou um bom ajuste para o sistema nanoAu-CramoLL (Fig. 43b). No entanto, para o sistema composto por nanoAu-CramoLL-PVB-BSA-ovoalbumina o ajuste não foi adequado.

Ao adicionar uma resistência (R) e uma capacitância (C), ou seja, um circuito RC em série ao circuito de Randles verificou-se que houve uma melhora nos ajustes (Fig. 44). Este circuito foi denominado de circuito equivalente 2 (CE 2). Apesar disto, há a necessidade de uma investigação com circuitos simples para facilitar a análise e interpretação dos resultados.

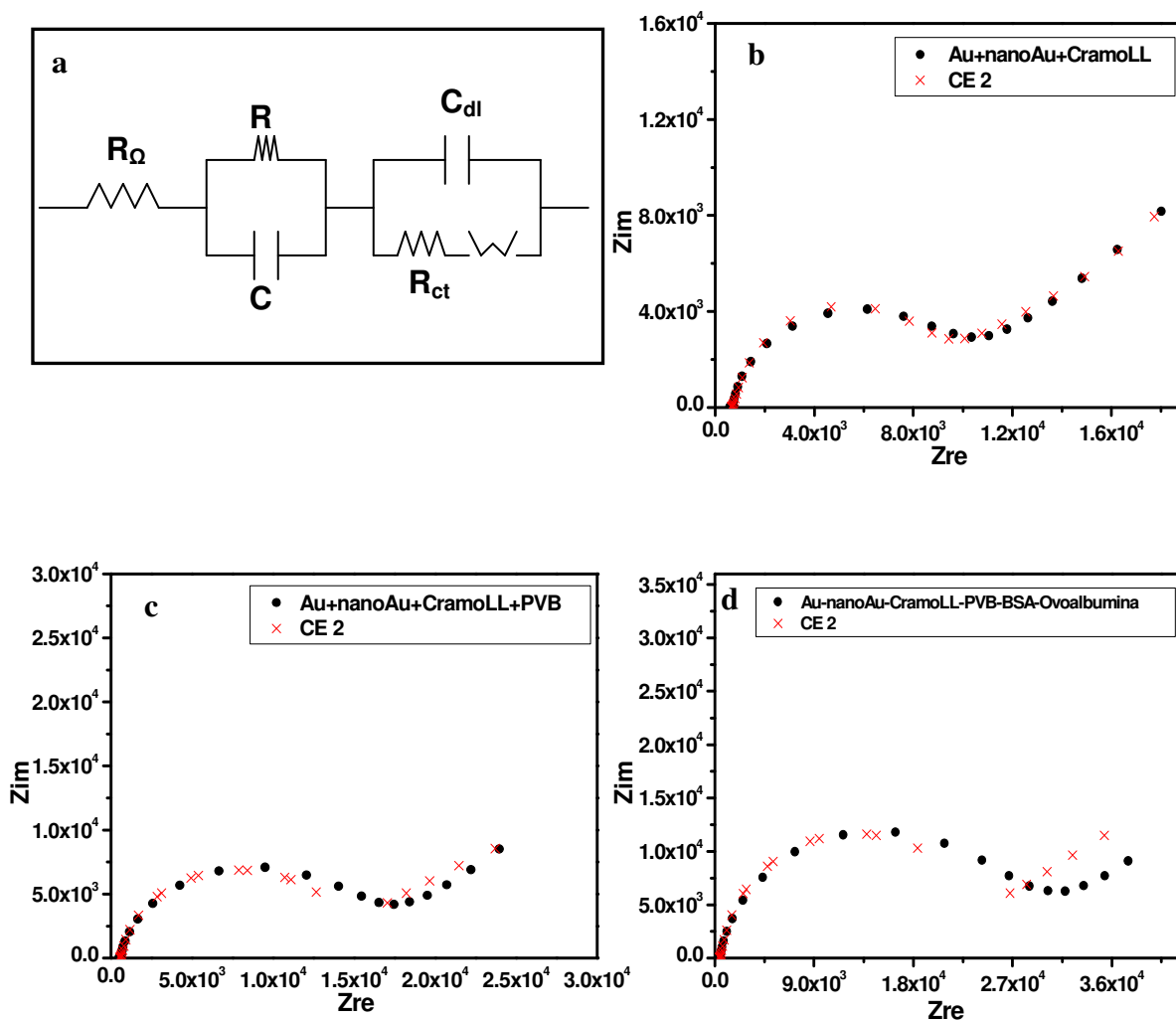


Figura 44 – a) Circuito equivalente 2; b) ajuste entre a curva experimental do sistema nanoAu-CramoLL;

c) ajuste entre a curva experimental do sistema nanoAu-CramoLL-PVB; d) ajuste entre a curva experimental do sistema nanoAu-CramoLL-PVB-BSA-ovoalbumina. ● - Corresponde aos dados

experimentais e × - corresponde aos dados teóricos.

Para o estudo do circuito mais adequado para os gráficos de Nyquist foi realizada a análise dos circuitos adicionando um elemento denominado Q, o qual corresponde a um elemento de fase constante (CPE). Este elemento representa a rugosidade das superfícies, e foi de grande importância para a análise dos dados experimentais obtidos, já que com a presença do sistema nanoAu-ConA/CramoLL-PVB a contribuição deste elemento torna-se preponderante juntamente com a resistência de transferência de carga ( $R_{CT}$ ).

Todas as curvas do diagrama de Nyquist são caracterizadas por uma região com semicírculo (na faixa altas frequências) e uma região linear (em baixas frequências). Este comportamento é bem conhecido (Houa *et al.*, 2006) e pode ser facilmente modelado pelo circuito de Randles modificado (Figura 45), o qual possui o elemento Q substituindo a capacitância da dupla camada ( $C_{dl}$ ).

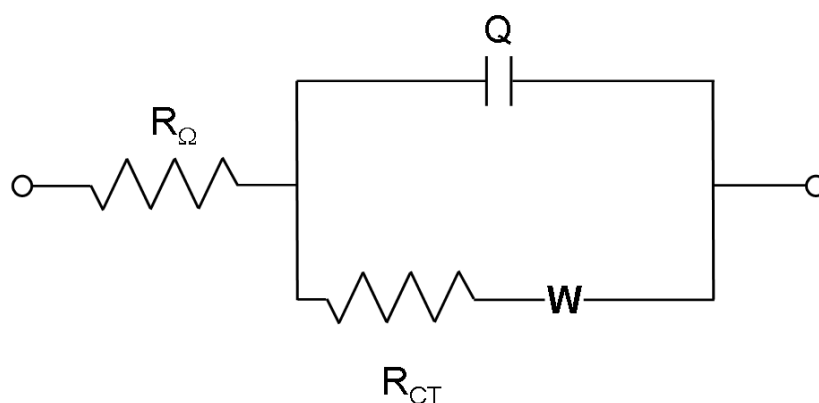


Figura 45 – Circuito equivalente aplicado para o ajuste das medidas de impedância na presença do par redox  $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ .  $R_{\Omega}$  - a resistência ôhmica da solução eletrolítica, Q – associado com a capacitância da dupla camada elétrica,  $Z_W$  – a impedância de Warburg,  $R_{CT}$  – resistência de transferência de elétrons.

O circuito é composto por quatro elementos: a resistência ôhmica da solução eletrolítica,  $R_{\Omega}$ , a impedância de Warburg,  $Z_W$ , um elemento de fase constante, Q, e a

resistência de transferência de elétrons,  $R_{CT}$ . Os componentes,  $R_{\Omega}$  e  $Z_W$ , representam as propriedades da solução eletrolítica e a difusão do par redox utilizado, respectivamente. Estes elementos não são afetados pelas transformações químicas que ocorrem na interface do eletrodo.

Os outros dois elementos do circuito,  $Q$  e  $R_{CT}$  dependem das características dielétricas e isolantes na interface eletrodo/eletrólito. Considerando que a resistência de transferência de carga é diretamente relacionada à cinética da reação redox, o elemento de fase constante tem sido relacionado com a natureza heterogênea da interface eletrodo/solução (pode estar relacionada, por exemplo, com a rugosidade da superfície).

Os dados de impedância foram ajustados com o programa de ajuste linear dos mínimos quadrados (Boukamp, 1996) através do uso do circuito equivalente de Randles. Foi encontrado um ajuste adequado para os dados, rendendo informações detalhadas sobre o comportamento dos sistemas de lectinas.

As curvas ajustadas mostradas na Fig. 46 indicam um excelente acordo entre o modelo de circuito e os resultados experimentais, especialmente na região de alta frequência.

A Tabela 1 lista os parâmetros dos resultados de impedância ajustados. As modificações no  $R_{CT}$  foram mais significantes dentre os outros componentes da impedância. Podemos observar que em geral a resistência de transferência de carga para os sistemas com ConA, são maiores que com a lectina CramoLL. Isto pode ser devido ao elevado peso molecular de ConA (55 kDa) quando comparado a CramoLL (31 kDa).

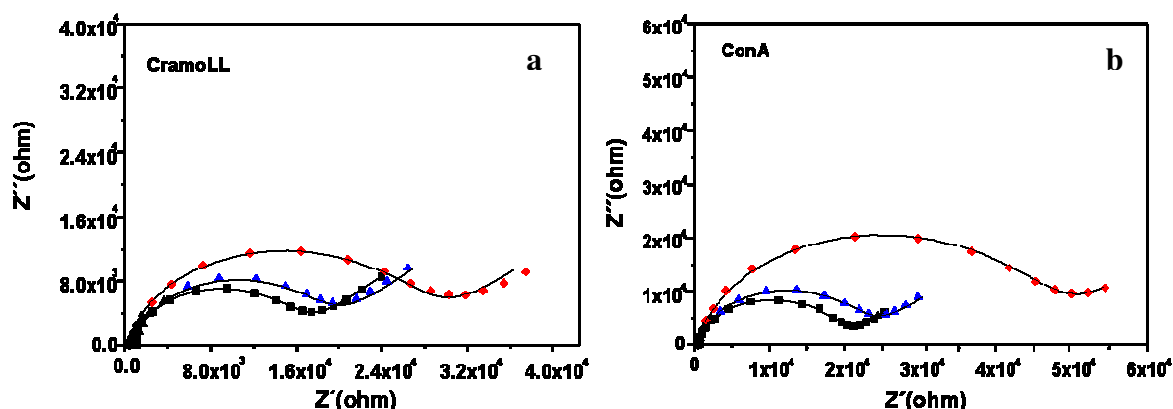


Figura 46 - Diagramas de Nyquist das etapas de imobilização das lectinas: (a) ■ - AuNp-ConA-PVB, ▲ - AuNp-ConA-PVB-BSA, ◆ - AuNp-ConA-PVB-BSA-ovalbumina, (b) ■ - AuNp-CramoLL, + AuNp-CramoLL-PVB-BSA, ◆ - AuNp-CramoLL-PVB-BSA-ovalbumina. As linhas sólidas na figura representam o ajuste.

A seqüência de medidas nanoAu-PVB, nanoAu-Lectina, e nanoAu-Lectina-PVB, mostra aproximadamente o bloqueio aditivo da interface, confirmando que a quantidade de material imobilizado e/ou adsorvido sobre a superfície do eletrodo está relacionado diretamente com a impedância. Adicionalmente, uma atenção deve ser dada para o pequeno aumento na  $R_{CT}$  associado com a presença de glicose (5,4 k $\Omega$ ) e ovoalbumina (6,8 k $\Omega$ ) na ausência de lectinas, em comparação com os valores das próprias lectinas (10,9 e 9,1 k $\Omega$ ).

O sistema com glicose mostra o menor valor de resistência. Ele parece indicar que a glicose está causando um aumento na permeabilidade do par redox na interface. O BSA não parece adsorver fortemente sobre o eletrodo, atuando como um agente de bloqueio para os sítios não específicos sobre a superfície.

Tabela 1 - Resultados da impedância ajustados para os eletrodos modificados da Figura 45.

<b>Eletrodo modificado</b>	<b><math>R_{CT} \times 10^3 (\Omega)</math></b>	<b>Q (<math>\mu F</math>)</b>	<b>n</b>
nanoAu-ConA	$10.26 \pm 0.10$	$1.25 \pm 0.05$	$0.89 \pm 0.01$
nanoAu-ConA-PVB	$18.80 \pm 4.55$	$0.87 \pm 0.18$	$0.92 \pm 0.07$
nanoAu-ConA-PVB-BSA	$21.70 \pm 2.35$	$1.04 \pm 0.22$	$0.92 \pm 0.01$
nanoAu-CramoLL	$9.10 \pm 0.29$	$1.18 \pm 0.37$	$0.89 \pm 0.02$
nanoAu-CramoLL-PVB	$15.30 \pm 2.20$	$1.04 \pm 0.15$	$0.91 \pm 0.05$
nanoAu-CramoLL-PVB-BSA	$17.20 \pm 1.05$	$1.13 \pm 0.01$	$0.92 \pm 0.01$
nanoAu-PVB	$6.77 \pm 0.15$	$0.99 \pm 0.18$	$1.00 \pm 0.03$
nanoAu-PVB-BSA-ovalbumina	$6.83 \pm 0.08$	$0.91 \pm 0.45$	$0.65 \pm 0.01$
nanoAu-PVB-BSA-glicose	$5.43 \pm 0.49$	$0.73 \pm 0.49$	$0.70 \pm 0.06$

A partir destes resultados nós observamos que a interação de ConA com a ovoalbumina foi mais forte que a interação de CramoLL. Estes resultados demonstram que estas lectinas permaneceram com a propriedade de reconhecimento biológico, mesmo após sua adsorção ao eletrodo. As diferenças podem ser explicadas devido ao estudo que foi realizado por alguns pesquisadores para determinar a relevância das extremidades do sítio de reconhecimento para monossacarídeos, obtendo-se informações sobre as diferenças entre ConA e CramoLL (de Souza *et al.*, 2003). Através da sobreposição da estrutura cristalográfica de CramoLL sobre a estrutura cristalográfica de ConA ambas complexadas com vários oligossacarídeos, foram identificadas duas regiões contendo diferenças que podem estar relacionadas com o diferença no reconhecimento para oligossacarídeos e glicoproteínas.

Foram identificadas substituições dos resíduos de aminoácidos Thr226 e Ser168 em ConA para Gly226 e Asn168 em ConA e para CramoLL verificou-se que a baixa afinidade para oligossacarídeos quando comparado com a ConA era devido ao menor contato devido a presença do resíduo Gly226 e ao impedimento estérico proporcionado pelo resíduo Asn168 com os sacarídeos próximos do sítio de interação com açúcar (de Souza, *et al.*, 2003).

Com os resultados obtidos, comentários sobre os parâmetros do elemento de fase constante (Q e n) poderiam ser especulativos. No entanto, algumas observações podem ser feitas sobre as variações de n. Este parâmetro está próximo a 1 em muitos experimentos, e próximo a 0,5 apenas para os nanoAu-PVB-BSA-ovoalbumina e nanoAu-PVB-BSA-glicogênio. Isto é uma indicação de algum aspecto difusional do processo de transferência de carga na interface. Em outras palavras, além das limitações do transporte de massa difusional, há alguma limitação dentro do material imobilizado sobre a superfície do eletrodo. O transporte de massa da solução representa a impedância de Warburg no circuito equivalente, e aparece nas regiões de baixa frequência em parte dos resultados da análise de EIE. O transporte de carga limitado por difusão na interface é indicado pelo valor próximo a 0,5 nestes dois sistemas mencionados acima.

Espera-se que o circuito equivalente geral para estes sistemas eletroquímicos contendo ConA e CramoLL seja representado pelo modelo de Randles (Bard *et al.*, 2000), o qual inclui a resistência ôhmica da solução eletrolítica, a impedância de Warburg, resultante da difusão de íons do volume do eletrólito para a interface do eletrodo, a capacitância da dupla camada, e a resistência a transferência de carga, que existe quando a solução eletrolítica contém um par redox (Eq. 8).

$$Z' = R_{\Omega} + \frac{R_{ct}}{1 + \omega^2 C_d^2 R_{ct}^2} \quad \text{e} \quad Z'' = \frac{\omega C_d R_{ct}^2}{1 + \omega^2 C_d^2 R_{ct}^2} \quad (\text{Eq. 8})$$

Sensores eletroquímicos para hibridização de DNA de organismos infecciosos como o vírus *Herpes simplex II* e *C. perflingens* foram desenvolvidos para reconhecer seqüências de oligonucleotídeos, os quais quando complementares a sua fita molde leva a um aumento na carga adquirida após a hibridização. Quando expostos à seqüência não complementar a carga dos voltamogramas é pequena, demonstrando que alguns biossensores podem ter este comportamento, enquanto que outros pode haver a queda da corrente propiciado pelo bloqueio da dupla camada elétrica (Napier *et al.*, 1997).

ConA e CramoLL apresentam similaridades estruturais além de possuírem especificidade semelhante para carboidratos, no entanto, apesar da homologia há o interesse de identificar características particulares de cada uma que permitam elucidar seus mecanismos de reconhecimento a carboidratos bem como informações acerca de suas disposições estruturais. No estudo com o sistema nanoAu-PVB, foi observado que CramoLL manteve sua habilidade de reconhecimento sacarídico neste ambiente.

As especificidades e afinidades dos sítios associados são alcançadas principalmente por pontes de hidrogênio, com a ajuda de forças de van der Waals e interações hidrofóbicas com resíduos de aminoácidos aromáticos que estão próximos às porções hidrofóbicas de monossacarídeos (Sharon, 1993) contribuindo para a estabilidade e especificidade dos complexos formados.

As lectinas ConA e CramoLL se ligam a diferentes glicoproteínas presentes em plasma humano (Lima *et al.*, 1997), e elas apresentam reconhecimento diferenciado para células normais e transformadas (Beltrão *et al.*, 1998). ConA e CramoLL exibem elevada afinidade para  $\alpha$ -D-glicose,  $\alpha$ -D-manose, glicogênio (Sato *et al.*, 2004) e



ovoalbumina (Correia *et al.*, 1995). Estas lectinas reconhecem monossacarídeos e glicoproteínas, que são os inibidores da aglutinação dos eritrócitos (Correia *et al.*, 1995, Sharon e Lis, 2003).

Desde que a interação proteína-carboidrato é um fenômeno comum em sistemas biológicos, os estudos da interação entre ConA/CramoLL com glicose e ovoalbumina proporcionam uma melhor compreensão desta interação (Zhang *et al.*, 2001). Além disso, estas lectinas podem se ligar a moléculas de carboidrato contidas em glicoconjugados das membranas celulares. A interação entre eles, que representa uma reação do tipo antígeno-anticorpo, pode ser utilizada para mapear as propriedades da superfície celular, e seu estudo possui grande significado para a imunologia.

Estas lectinas reconhecem uma fração da ovoalbumina que contém os resíduos de Man7 e Man8 nas cadeias de oligo-manose, e tem sido verificado que as interações com ConA e CramoLL relativamente não são afetadas pela proteína matriz da ovoalbumina (Mandal *et al.*, 1994).

Os resultados presentes na Figura 47a,b (para ConA e CramoLL, respectivamente), mostram claramente que ambas as lectinas foram capazes de reconhecer a glicoproteína ovoalbumina que pode ser observado pelo aumento da resistência de transferência de carga,  $R_{CT}$ . Por isso, o desempenho do eletrodo modificado para a detecção de açúcares e glicoproteínas foi avaliado através de uma variação relativa deste parâmetro ( $\Delta R_{CT}$ ). Esta variação pode ser calculada de acordo com a equação que segue:

$$\Delta R_{CT} (\%) = \frac{R_{CT(lectina-açúcar)} - R_{CT(lectina)}}{R_{CT(lectina)}} \times 100\% \quad \text{Eq. 9}$$

onde o  $R_{CT(lectina)}$  é o valor da resistência de transferência de elétrons do eletrodo modificado com nanoAu-Lectina-PVB-BSA. O  $R_{CT(lectina-açúcar)}$  é o valor da resistência

de transferência de elétrons do eletrodo modificado com nanoAu-Lectina-PVB-BSA após a exposição a solução contendo glicose ou ovoalbumina.

No caso da ovoalbumina, um estudo foi realizado para diferentes concentrações. Os resultados podem ser visualizados nas Figuras 47a, b. O  $\Delta R_{CT\%}$  aumenta claramente com o aumento da concentração de ovoalbumina, o que indica que as interações entre lectina e açúcar podem ser detectadas pelo eletrodo modificado.

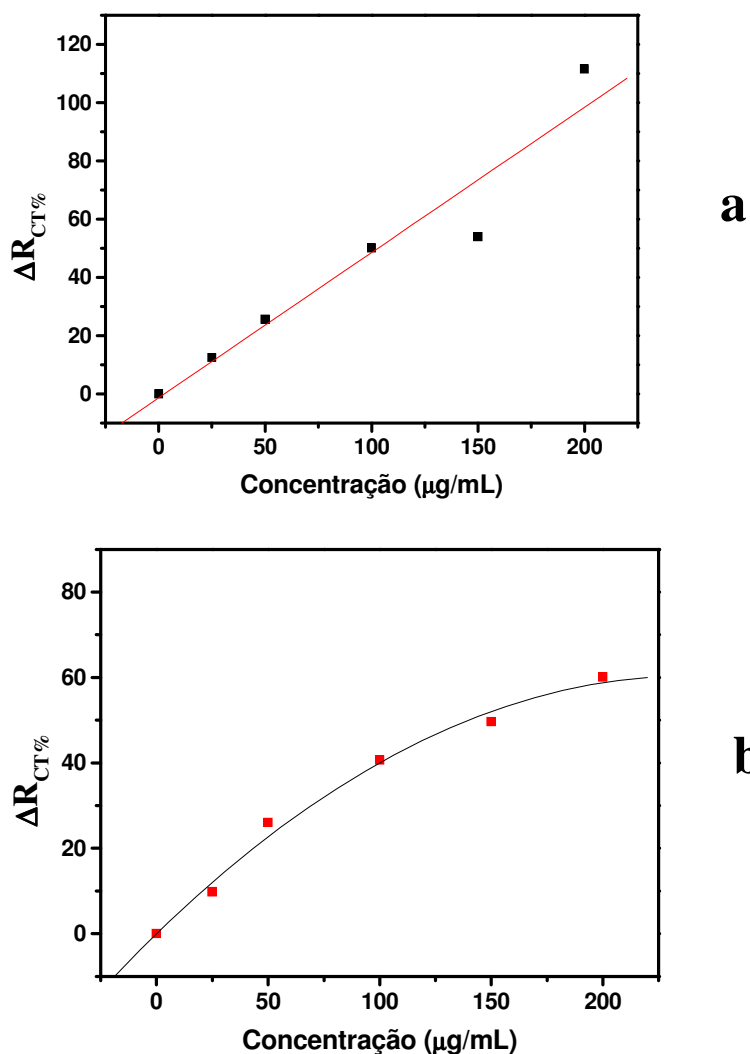


Figura 47 - Os diagramas apresentam o  $\Delta R_{CT\%}$  para os sistemas que correspondem ao nanoAu-ConA-PVB-BSA (a) e nanoAu-CramoLL-PVB-BSA (b) após ser incubado com diferentes concentrações de ovoalbumina em tampão TFS (pH 7.4), representadas por 200 µg/mL, 150 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL e 25 µg/mL.

Este aumento no  $\Delta R_{CT}$  é similar para ambas as lectinas, acima de 50  $\mu\text{g/mL}$  de ovoalbumina. No entanto, para elevadas concentrações de ovoalbumina, ConA apresentou um aumento contínuo no  $\Delta R_{CT}$  (Fig. 47a), enquanto que CramoLL exibiu um platô (Fig. 47b). Neste momento, não é possível explicar este comportamento para CramoLL, mas é claro que isto indica uma espécie de saturação na resposta impedanciométrica.

Nós observamos que nenhuma mudança da resistência de transferência de elétrons foi detectada nos experimentos utilizando lactose. Como já é de conhecimento que ambas as lectinas não exibem nenhuma interação com este carboidrato e seus derivados, isto indica que as modificações da resistência de transferência de elétrons observadas com a ovoalbumina são devido a interação específica lectina-açúcar. Além disso, os diferentes comportamentos vistos para estas duas lectinas, demonstra que a variação na impedância está relacionada a interação lectina-ovoalbumina, evento de maior significância quando comparado com a ovoalbumina adsorvida na ausência de lectina. Um resumo destes resultados é apresentado na Tabela 2, para concentrações fixas de ovoalbumina e glicose (200  $\mu\text{g/mL}$ ).

Estes resultados demonstram que as lectinas estão retendo suas capacidades no reconhecimento a estes carboidratos complexos após a adsorção. No entanto, há um efeito surpreendente observado com a glicose, a resistência de transferência de carga da interface diminui sobre a adição da mesma (indicado pelo valor negativo do  $\Delta R_{CT}$ ). Como mencionado anteriormente, parece que a interação da glicose com o eletrodo aumenta a permeabilidade da interface para o sistema redox. Não obstante, os resultados indicam claramente que este sistema pode ser aplicado para a construção de um biossensor para glicoproteínas presentes no soro humano.

Tabela 2 - Resultados de impedância da interação lectina-açúcar ajustados a partir da Fig. 46.

Eletrodo modificado	Interação Lectina-açúcar				
	Antes <sup>1</sup> ( $R_{CT}$ , $\Omega$ )	Após <sup>2</sup> ( $R_{CT}$ , $\Omega$ )	Após <sup>3</sup> ( $R_{CT}$ , $\Omega$ )	$\Delta R_{CT}$ (%) (Ovoalbumina)	$\Delta R_{CT}$ (%) (Glicose)
nanoAu-ConA-PVB-BSA	21.700	45.900	12.230	112	-43,6
nanoAu-CramoLL-PVB-BSA	17.200	27.530	13.120	60,1	-23,7

<sup>1</sup>Antes do contato com os açúcares, <sup>2</sup>Depois do contato com a ovoalbumina, <sup>3</sup>Depois do contato com a glicose.

Como podemos observar o  $\Delta R_{CT}$  aumenta com a presença do açúcar, indicando o reconhecimento da lectina. As lectinas ConA e CramoLL são específicas para a glicoproteína ovoalbumina e ao monossacarídeo glicose. Desta forma o eletrodo modificado AuNp-ConA/CramoLL-PVB-BSA pode ser utilizado como um dispositivo para o diagnóstico de doenças pela detecção de imunoglobulinas no soro humano.

De forma análoga ao que foi realizado com as medidas de impedância, para a realização das voltametrias foi utilizado o par redox ( $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ ) como marcador para investigar as modificações o comportamento do eletrodo depois de cada etapa de modificação do mesmo, assim como foi dito anteriormente.

A Fig. 48a,b (para ConA e CramoLL, respectivamente) mostra os VCs para o eletrodo limpo, e o eletrodo modificado com nanoAu-Lectina, e nanoAu-Lectina-PVB. Como demonstrado na Fig. 48, o processo de adição de diferentes materiais sobre a superfície do eletrodo é acompanhado de uma diminuição na resposta amperométrica do eletrodo e por um aumento na separação pico-a-pico das correntes de pico catódica e anódica do par redox, e a partir destes dados foram obtidos desvios percentuais relativos a atividade biológica das lectinas.

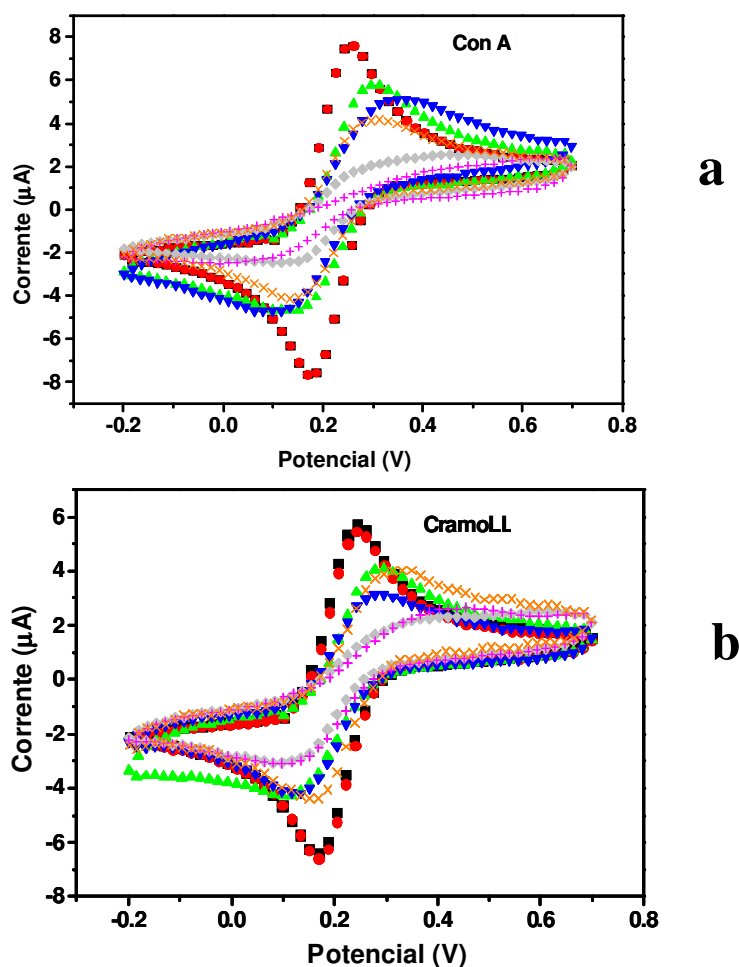


Figura 48 - Voltamogramas cíclicos dos eletrodos nos diferentes estágios: (a) ■ – Eletrodo de ouro limpo, ● - nanoAu-ConA, ▲ - nanoAu-ConA-PVB, ▼ - nanoAu-ConA-PVB-BSA, × - nanoAu-ConA-PVB-BSA-glicose e + - nanoAu-ConA-PVB-BSA-ovoalbumina, ◇ nanoAu-ConA-PVB-BSA-glicogênio, (b) ■ – Eletrodo de ouro limpo, ● - nanoAu-CramoLL, ▲ - nanoAu-CramoLL-PVB, ▼ - nanoAu-CramoLL-PVB-BSA, × - nanoAu-CramoLL-PVB-BSA-glicose e + - nanoAu-CramoLL-PVB-BSA-ovoalbumina, ◇ nanoAu-CramoLL-PVB-BSA-glicogênio. Eletrólito suporte  $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ , 10 mM, 1:1 + 0.15 M NaCl em 10 mM com pH 7,4; velocidade de varredura de  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Análogo ao que foi observada na impedância, na presença de glicose, a corrente é maior que na presença de ovoalbumina. Principalmente, depois que a ovoalbumina é acoplada às moléculas de lectina, a separação de pico é consideravelmente maior ocorrendo um quase que total desaparecimento do pico observado. Isto é devido ao fato

que o complexo lectina-açúcar age como uma camada de bloqueio da passagem dos elétrons e, desta forma, os voltamogramas passam de um processo controlado por difusão para um processo controlado por ativação.

Desde que a adsorção das espécies diminui a corrente, uma análise análoga a da impedância pode ser realizada com o recíproco das correntes de pico. A extensão da adsorção pode ser expressa como um desvio percentual relativo da seguinte forma:

$$\Delta I(\%) = \frac{[(1/I_b) - (1/I_a)]}{(1/I_b)} \times 100\% \quad \text{Eq. 10}$$

onde,  $I_b$  é a corrente de pico anódica antes da lectina interagir com a ovoalbumina e com a glicose e  $I_a$  é a corrente de pico anódica após a interação com o carboidrato.

A Tabela 3 apresenta o resultado destas análises para o eletrodo modificado nnaoAu-ConA/CramoLL-PVB-BSA antes e após a reação até a concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$  de ovoalbumina e glicose. Todas as medidas foram realizadas em triplicatas e os resultados foram aproximadamente semelhantes.

Como pode ser visto na Tabela 3, os desvios percentuais relativos de ambas as lectinas com ovoalbumina foram maiores que com a glicose. Adicionalmente, a glicose causou uma diminuição no desvio percentual.

Tabela 3 - Deslocamento da corrente anódica para o eletrodo modificado nanoAu-ConA/CramoLL-PVB-modificado com 200 µg/mL de açúcar.

Eletrodo modificado	Interação Lectina-açúcar				
	Antes <sup>1</sup> (1/I <sub>1</sub> , µA <sup>-1</sup> )	Após <sup>2</sup> (1/I <sub>2</sub> , µA <sup>-1</sup> )	Após <sup>3</sup> (1/I <sub>2</sub> , µA)	ΔI(%) (Ovoalbumina)	ΔI(%) (Glicose)
nanoAu-ConA-PVB-BSA	0.262	0.781	0.265	198	1,14
nanoAu-CramoLL-PVB-BSA	0.315	0.474	0.272	50,5	-13,65

<sup>1</sup>Antes do contato com os açúcares, <sup>2</sup>Depois do contato com ovoalbumina, <sup>3</sup>Depois do contato com a glicose.

Desta forma, o sistema ConA demonstrou um desvio maior que o sistema composto por CramoLL, para ambos os açúcares. Finalmente, fica claro que a sensibilidade de ConA para a ovoalbumina foi maior que todos os sistemas investigados. Estes resultados estão de acordo com os dados apresentados para a impedância.

Para verificar se as respostas eletroquímicas obtidas tanto nos voltamogramas cíclicos como na espectroscopia de impedância das lectinas CramoLL e ConA para os açúcares era referente às interações sítio-específico, foram realizadas medidas sem a presença das respectivas lectinas e comparados os padrões de respostas obtidos frente as medidas dos biossensores montados com nanopartículas de ouro e polivinilbutiral.

A voltametria cíclica foi realizada após cada etapa de modificação do eletrodo de Au limpo. Através desta medida pôde-se observar que VC do eletrodo de Au limpo corresponde as características já observadas em outras medidas para o sistema CramoLL e ConA, ou seja apresenta processo limitado por difusão.

Após a modificação do eletrodo com nanoAu-PVB foi verificada uma diminuição da resposta amperométrica proveniente de um processo de bloqueio da

transferência de elétrons da interface solução-eletrodo, com curva que ainda apresenta reversibilidade. Esta queda da resposta amperométrica não foi mais observada quando o eletrodo foi submetido ao contato com BSA, nem quando em contato com a ovoalbumina, sendo revelando que não houve formação de um complexo bioespecífico (Fig. 49a). Na Fig. 49b podemos observar a diferença das curvas dos VCs para o sistema nanoAu-PVB-BSA, sem lectinas, e para o sistema com ConA e CramoLL

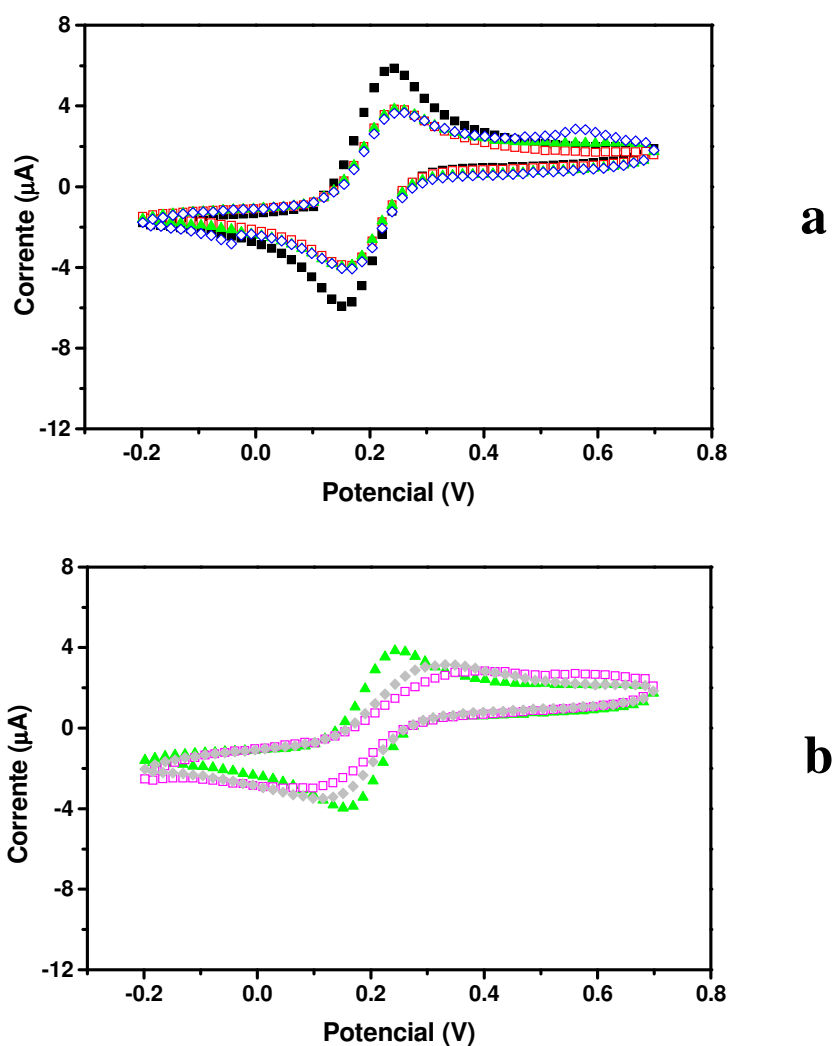


Figura 49 - Voltamogramas cíclicos (VCs) dos diferentes eletrodos em solução ferro/ferricianeto (em TFS

10mM em H<sub>2</sub>O pH 7,4) , Velocidade de varredura foi de 50 mV.s<sup>-1</sup> e E<sub>0</sub> = 0,1V, E<sub>1</sub> = 0,7 V e E<sub>2</sub> = -

0,2V. a) Sistema sem lectinas: ■ Eletrodo de ouro; □ Eletrodo Au+nanoAu+PVB; ▲ Eletrodo Au+nanoAu+PVB+BSA; ◆ Eletrodo Au+nanoAu+PVB+BSA+ovoalbumina, b) Presença das lectinas:

▲ Eletrodo Au+nanoAu+PVB+BSA; □ Eletrodo Au+nanoAu+ConA+PVB+BSA; ◆ Eletrodo Au+nanoAu+CramoLL+PVB+BSA.



A presença das lectinas promove um maior decréscimo das respostas amperométrica do que o sistema que não contém lectinas, o que nos leva a crer que a resposta aos açúcares é dependente da presença das lectinas que reconhecem o seu analito via sítio de interação.

Na Fig. 50 observa-se a comparação de respostas da ConA e CramoLL em relação aos brancos eletrodo Au-nanoAu-PVB-BSA e eletrodo Au-nanoAu-PVB-BSA-ovoalbumina. Através desta avaliação podemos verificar que o processo de reconhecimento da glicoproteína ovoalbumina é governado pelo sítio de interação específico das lectinas em estudo. Portanto, as áreas anódica e catódica não sofreram uma diminuição significativa que evidenciasse a não importância da presença das lectinas para a caracterização do biossensor.

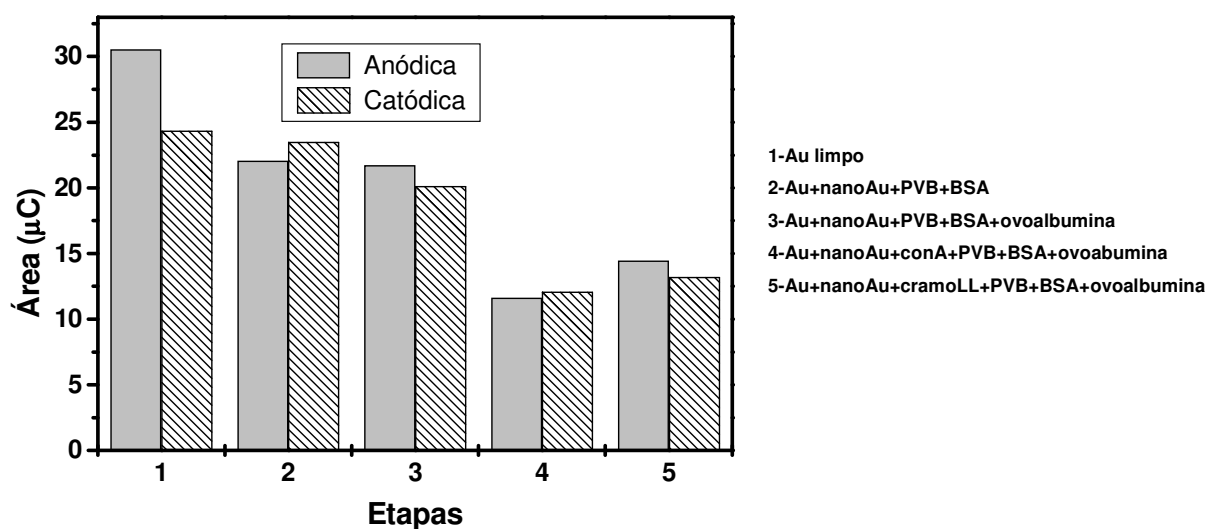


Figura 50 - Área dos voltamogramas cíclicos (VCs) dos diferentes eletrodos em solução ferro/ferricianeto (em TFS 10mM em H<sub>2</sub>O pH 7,4) na ausência de lectinas. Velocidade de varredura foi de 50 mV.s<sup>-1</sup> e E<sub>0</sub> = 0,1V, E<sub>1</sub> = 0,7 V e E<sub>2</sub> = - 0,2V.

Podemos evidenciar a bioatividade dos biossensores com as lectinas em estudo pela análise das áreas acima, as quais revelam a dificuldade de transferência de elétrons

quando o biossensor está interagindo com a glicoproteína (Fig. 50), sendo uma resposta diferente quando as lectinas não estão presentes.

O sistema sol-gel composto de nanopartículas de ouro e polivinilbutiral demonstra ser adequado para o processo de adsorção das lectinas em eletrodos poli cristalinos, desta forma tanto para CramoLL quanto para ConA houve a retenção da bioatividade das mesmas o que indica a viabilidade do biossensor.

Ao analisar as respostas impedanciométricas podemos observar que os valores de impedância na ausência de ConA e CramoLL foram bem menores quando comparados com experimento com as lectinas em estudo (Fig. 51a, b), o que possibilita a visualização do processo de adsorção das lectinas à superfície do eletrodo.

No diagrama Nyquist (Fig. 51a) percebe-se que há uma adsorção do sistema nanoAu-PVB pelo discreto aumento do diâmetro do semicírculo que traduz o valor de  $R_{CT}$ , e uma pequena mudança é observada neste gráfico quando adiciona-se o BSA e a ovoalbumina. Neste eletrodo pode ser verificado que ocorre uma melhor adsorção para a lectina ConA em relação à lectina CramoLL. As principais diferenças que não podem ser observadas na Fig. 51a, podem ser visualizadas pelo gráfico de Bode, através do qual se pode definir o comportamento dos elementos do circuito em função da frequência.

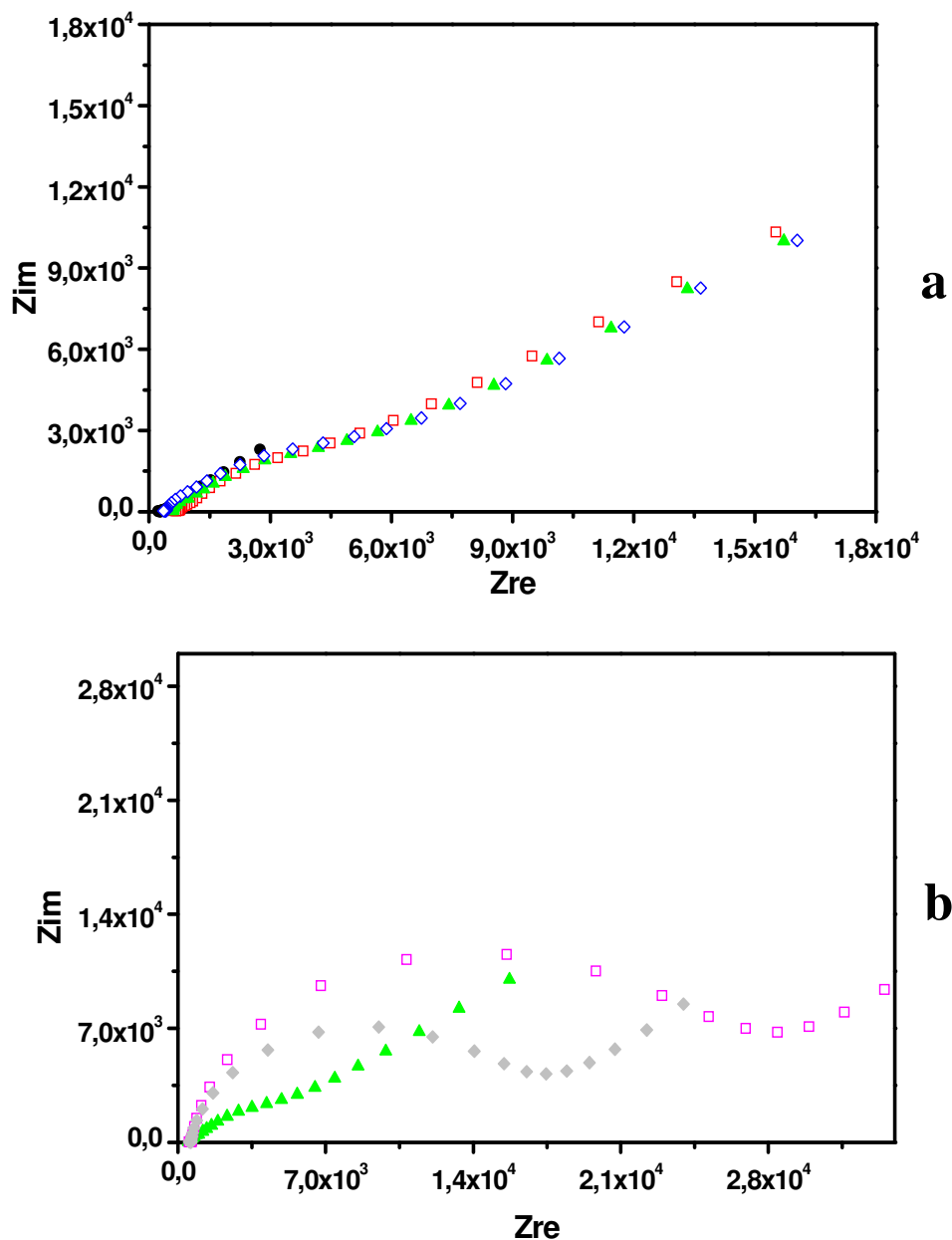


Figura 51 - Diagrama de Nyquist dos diferentes eletrodos em solução ferro/ferricianeto (em TFS 10mM em H<sub>2</sub>O pH 7,4) , Velocidade de varredura foi de 50 mV.s<sup>-1</sup> e E<sub>0</sub> = 0,1V, E<sub>1</sub> = 0,7 V e E<sub>2</sub> = - 0,2V. a)

Sistema sem lectinas: ■ Eletrodo de ouro; □ Eletrodo Au+nanoAu+PVB; ▲ Eletrodo

Au+nanoAu+PVB+BSA; ◇ Eletrodo Au+nanoAu+PVB+BSA+ovoalbumina, b) Presença das lectinas:

▲ Eletrodo Au+nanoAu+PVB+BSA; □ Eletrodo Au+nanoAu+ConA+PVB+BSA; ◆ Eletrodo

Au+nanoAu+CramoLL+PVB+BSA.

No gráfico de Bode este resultado pode ser caracterizado pelo aumento do ângulo de fase no intervalo de 100 mHz a 100 KHz que corresponde ao comportamento capacitivo do sistema, justificando assim, as alterações da capacitância na interface quando na presença de BSA e ovoalbumina (Fig. 52).

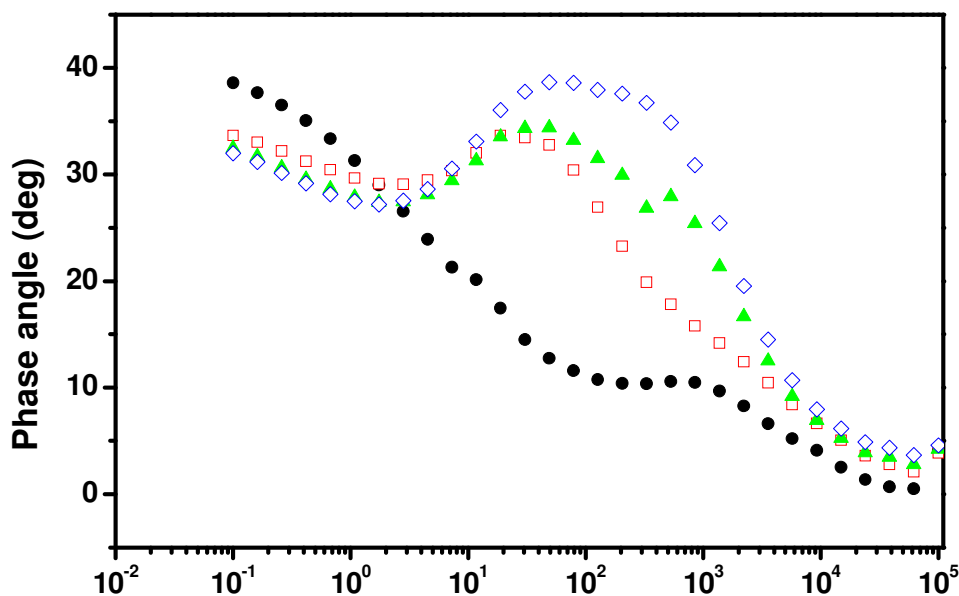


Figura 52 - Gráfico de Bode para o sistema sem lectinas: • Eletrodo de ouro; □ Eletrodo Au+nanoAu+PVB; ▲ Eletrodo Au+nanoAu+PVB+BSA; ◇ Eletrodo Au+nanoAu+PVB+BSA+ovoalbumina.

### 3.5 Avaliação da atividade biológica da ConA frente aos soros humanos contaminados com febre da Dengue e febre hemorrágica da Dengue

A contaminação causada por diversos vírus resulta no aparecimento de glicoproteínas na circulação sanguínea, um desses casos ocorre com a Dengue. Portanto, após a observação de que o sistema biossensível nanoAu-ConA-PVB-BSA exibiu a capacidade de reconhecimento para a glicoproteína ovoalbumina, foi possível realizar uma avaliação da habilidade deste sistema em reconhecer glicoproteínas em amostras biológicas. Desta forma, o soro de pacientes infectados por Dengue tornou-se objeto de estudo para avaliar diferenças de reconhecimento para o soro de pacientes contaminados

com a febre do Dengue, a febre hemorrágica do Dengue e soro não contaminado. Algumas pesquisas revelam diferenças na composição glicoprotéica do soro humano, o qual depende da forma sorológica da Dengue e permite a distinção entre a sintomatologia de Dengue clássica/febre do Dengue e da Dengue hemorrágica/febre hemorrágica do Dengue.

Desta forma, o eletrodo modificado com o sistema nanoAu-ConA-PVB-BSA, foi obtido e posteriormente utilizado como base para detecção da interação da lectina ConA com glicoproteínas presentes no soro de pacientes infectados com a febre do Dengue e febre hemorrágica do Dengue.

A Fig. 53 demonstra o efeito da diluição das amostras de soro sobre os espectros de impedância. As diluições 1:10, 1:30, 1:50 e 1:80 foram utilizadas com o objetivo de avaliar o grau de reconhecimento biológico da lectina ConA. Como podemos observar na Fig. 53 houve interação do sistema nanoAu-ConA-PVB-BSA com glicoproteínas do soro de pacientes infectados com a febre do Dengue e com a febre hemorrágica do Dengue.

Praticamente para todas as diluições testadas houve um reconhecimento da lectina ConA para os soros avaliados. O reconhecimento pode ser evidenciado através do aumento da impedância total do sistema após o contato do sistema nanoAu-ConA-PVB-BSA, este aumento reflete no tamanho do diâmetro do semicírculo do diagrama de Nyquist. Para diluições maiores, a capacidade do eletrodo em distinguir os diferentes tipos de soro diminui, enquanto que para menores diluições a sensibilidade de medida da instrumentação, é diminuída (em função do aumento na impedância). Assim, a diluição de 1:30 foi selecionada para todas as medidas posteriores.

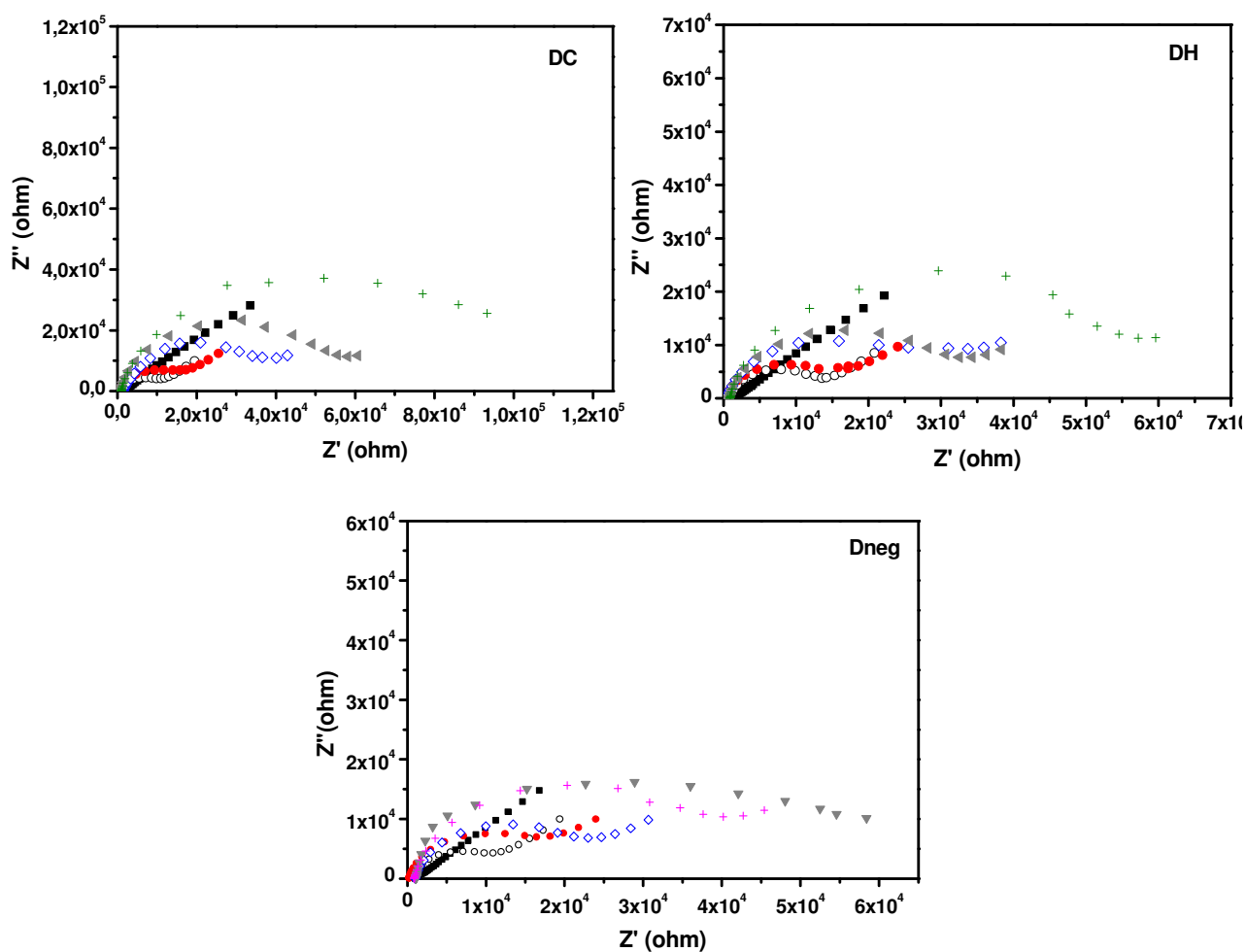


Figura 53 - Diagrama de Nyquist das etapas de imobilização das glicoproteínas do soro de pacientes: eletrodo de ouro limpo (■), eletrodo de ouro-nanoAu-PVB (○), nanoAu-ConA-PVB-BSA (●), nanoAu-ConA-PVB-BSA-GS 1:50 (◇), nanoAu-ConA-PVB-BSA-GS 1:30 (◄), nanoAu-ConA-PVB-BSA-GS1:10 (+).

Também foram realizadas medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica em função do potencial aplicado para verificar diferenças nas respostas para os diferentes tipos de soro. Foram avaliados os potenciais de -0,1 a 0,4 V, e para cada potencial foram obtidas respostas diferentes, conforme apresentado na fig. 54. Esta faixa de potencial foi escolhida para evitar condições extremas ao sistema nanoAu-ConA-PVB-BSA, propiciando a não degradação das biomoléculas. Para todos os soros

analisados com DC, DH e Dneg foram observados que no potencial de 0,2 V houve uma melhor resposta impedanciométrica do sistema se estabelecendo um semicírculo após as análises.

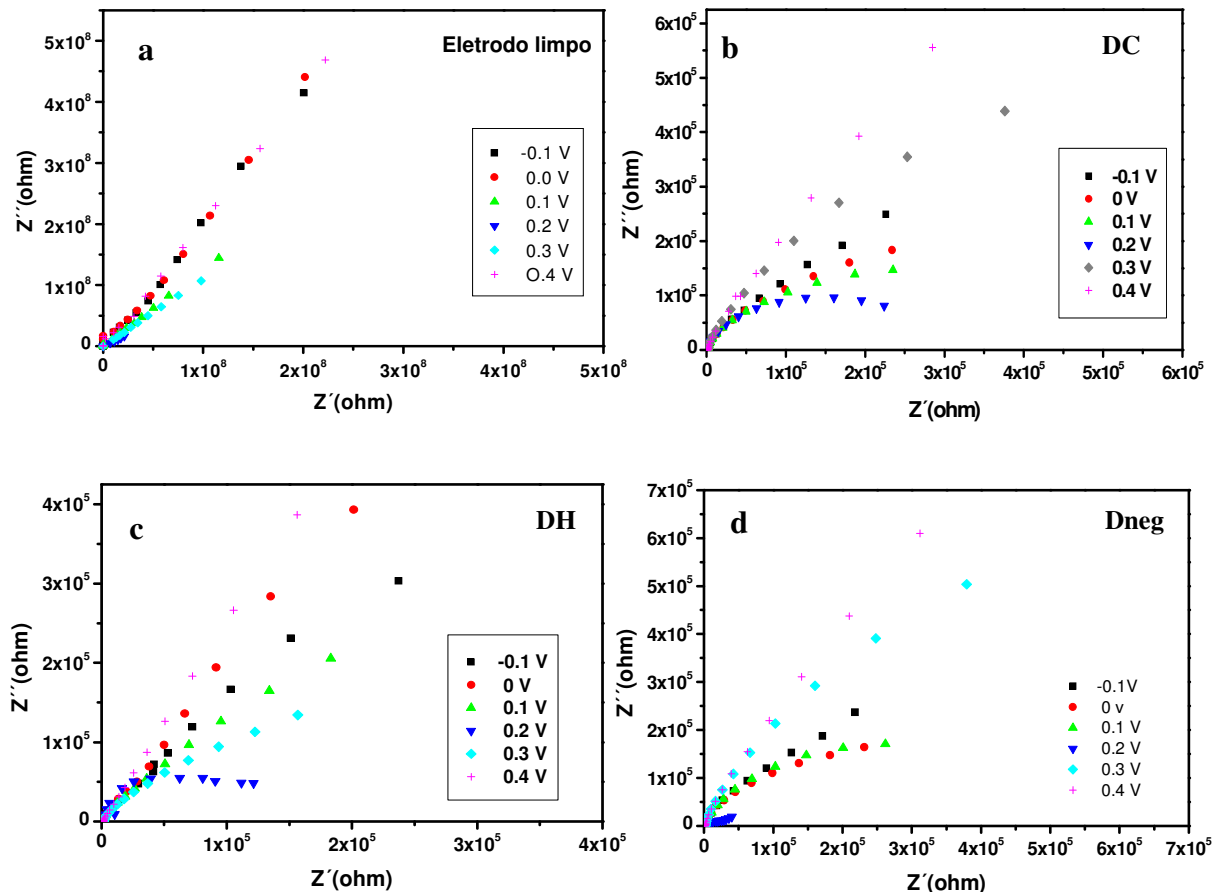


Figura 54 - Medidas de impedância eletroquímica na diluição de 1:30 em solução de ferricianeto de potássio 10mM em tampão fosfato de sódio pH 7,4. a) eletrodo limpo, b) sistema com febre do Dengue e c) sistema com febre hemorrágica.

De acordo com os dados obtidos o potencial de escolha foi o de 0,2 V e as diferenças entre DC, DH e Dneg pode ser observado na Fig. 55. Pode-se observar que a melhor resposta para os sistemas é para o soro com Dengue clássica uma vez que para esta amostra tem-se uma maior impedância total do sistema (Fig. 55).

Uma vez que o potencial de circuito aberto apresenta em média um valor de 0,21 V, todos os demais resultados foram obtidos em potencial de circuito aberto, na diluição de 1:30 em pH 7,4 e tampão fosfato de sódio 10 mM..

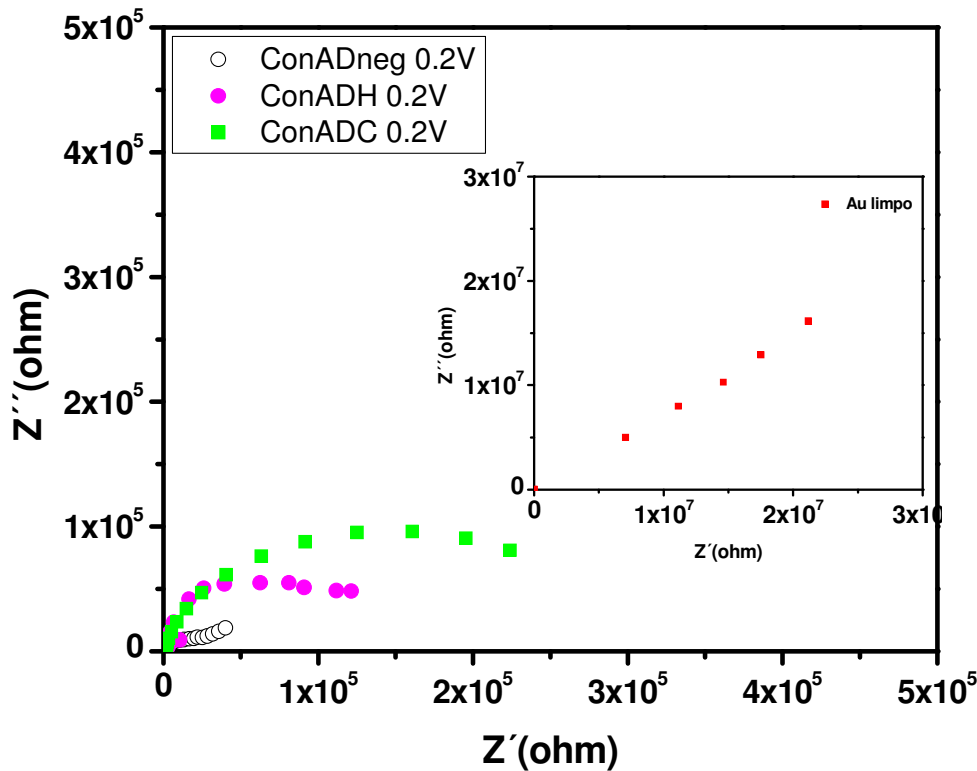
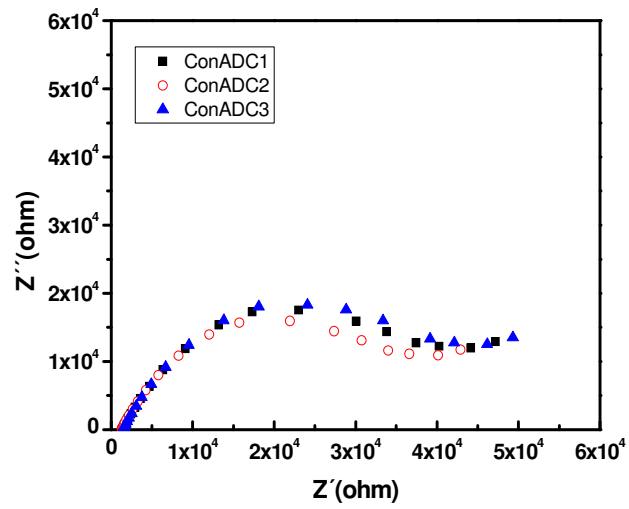


Figura 55 - Medidas de impedância eletroquímica na diluição de 1:30 em solução de ferricianeto de potássio 10mM em tampão fosfato de sódio pH 7,4. Detalhe: Impedância de eletrodo limpo.

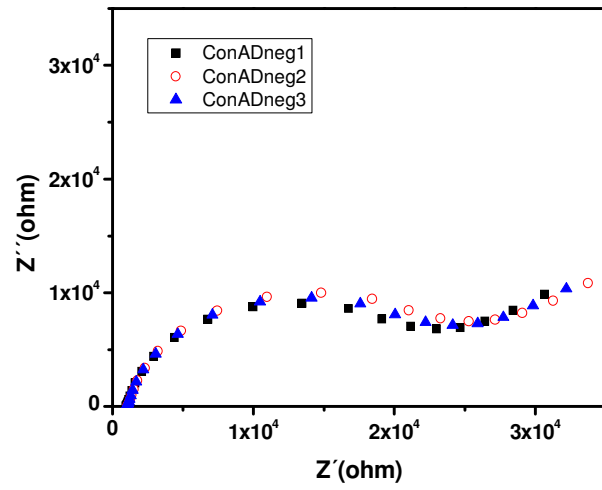
Avaliamos a reprodutibilidade dos experimentos em relação a três pacientes diferentes para febre do Dengue, febre hemorrágica do Dengue e Dengue negativo para a diluição de escolha 1:30.

A Fig. 56 demonstra três medidas dos sistemas ConADC (a), ConADneg (b) e ConADH (c).

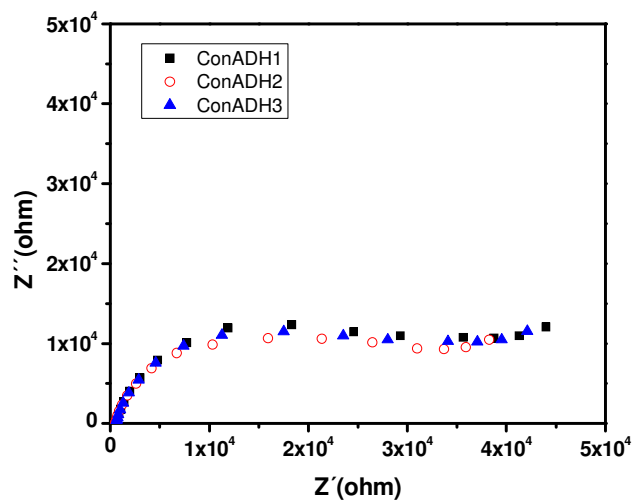




**a**



**b**



**c**

Figura 56 – Diagrama de Nyquist demonstrado a reprodutibilidade das amostras de ConADC (a), ConADneg (b) e ConADH (c).

Percebemos que há apenas pequenas variações das medidas realizadas para uma mesma amostra demonstrando que os experimentos realizados neste estudo são totalmente reprodutíveis independentes do tipo de amostra utilizada. Foram realizadas três medidas para o mesmo soro de pacientes contaminados para observarmos os padrões de respostas impedanciométrica obtidos (Fig. 57).

Como podemos observar os dados referentes ao soro de glicoproteínas de pacientes infectados por Dengue clássica e negativo, apresentaram perfis semelhantes durante a repetições das análises (Fig. 57).

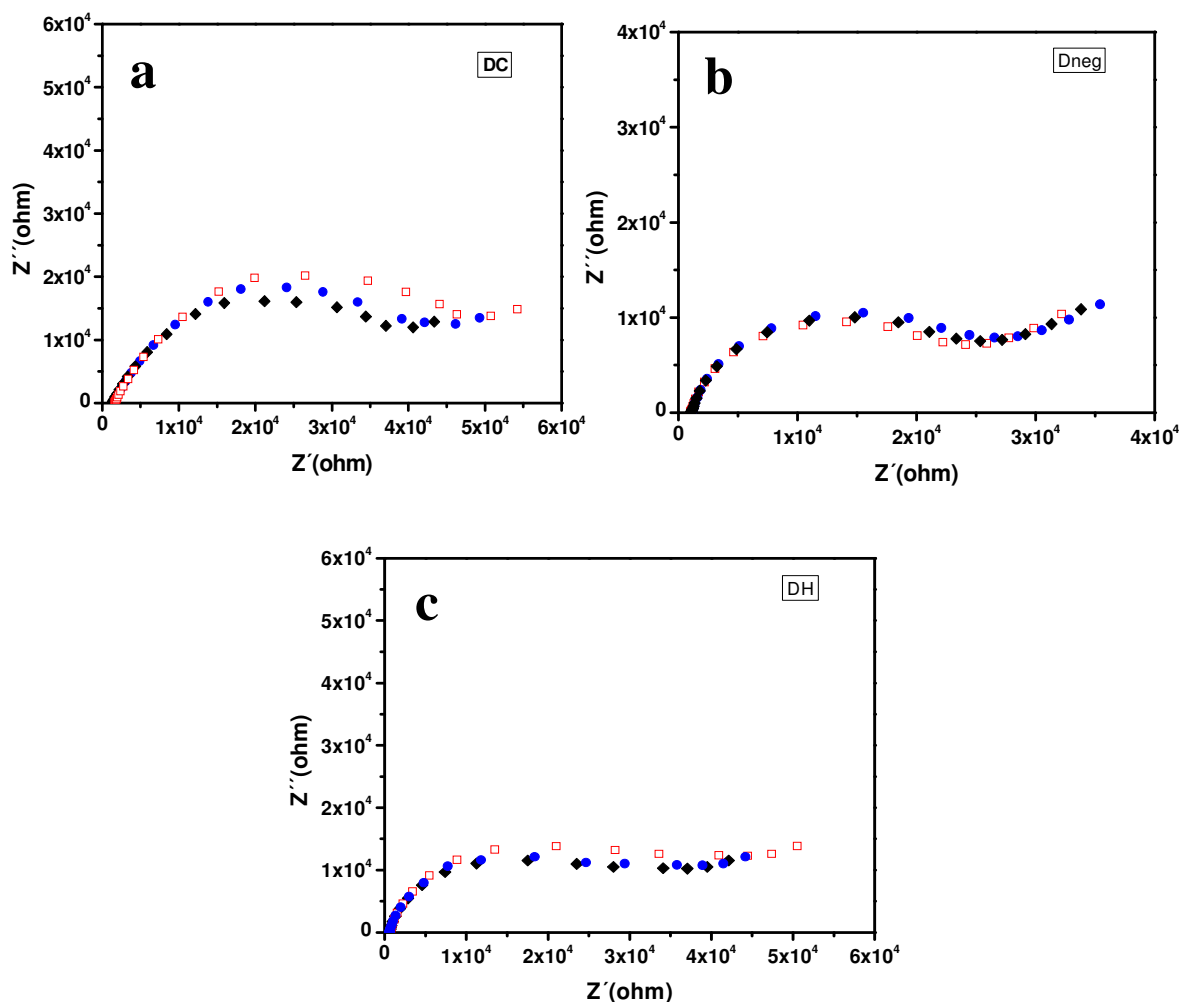


Figura 57 – Diagrama de Nyquist demonstrando a reprodutibilidade das amostras de ConADC (a), ConADneg (b) e ConADH (c) de repetições para os mesmos soros analisados.

O perfil de resposta impedimétrica dos sistemas ConADneg, ConADC e ConADH para a diluição 1:30 pode ser visualizado na Fig. 58. Onde se pode visualizar a maior resposta impedimétrica para o sistema ConADC. Inversamente, para o sistema ConADneg é observada a menor impedância demonstrando que não há reconhecimento específico do sensor para esta amostra, o que demonstra uma maior seletividade para elementos glicoprotéicos que estão presentes no soro de pacientes conatmiados pela Dengue clássica.

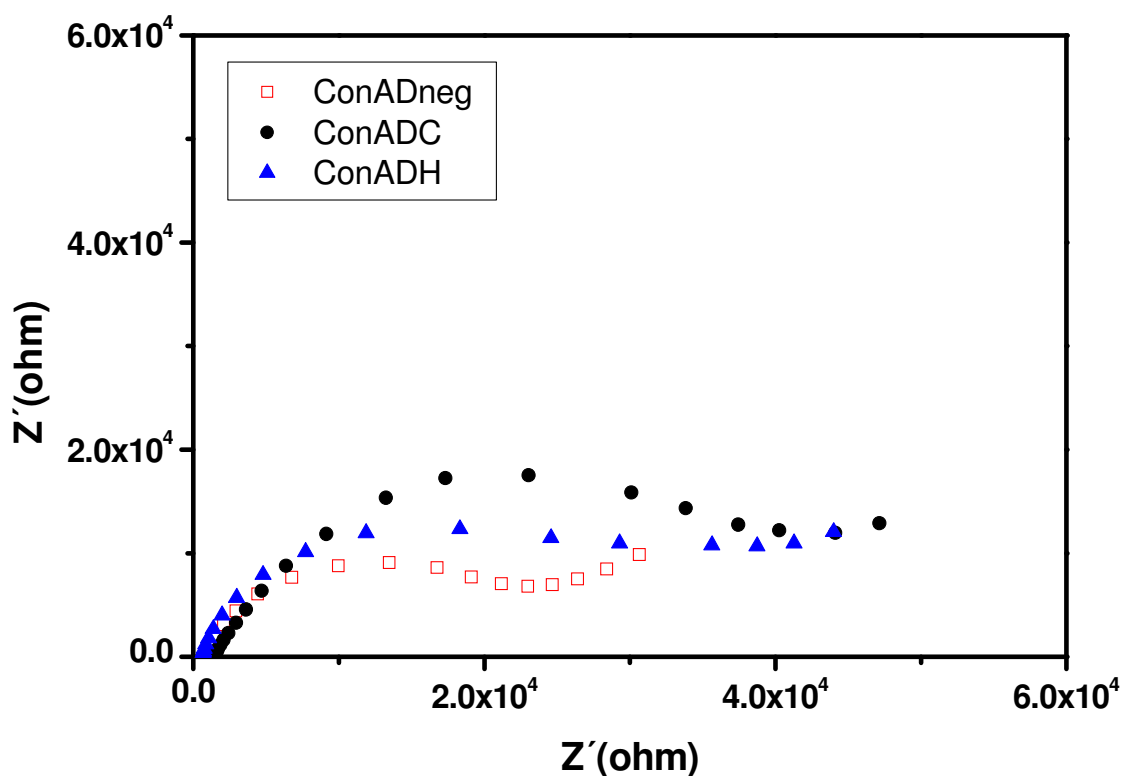


Figura 58 – Diagrama de Nyquist para os sistemas ConADC, ConADneg e ConADH na diluição de 1:30.

A Fig. 59a-d mostra as imagens de TEM dos sistemas nanoAu-ConA e nanoAu-ConA-glicoproteína dos soro infectado com febre do Dengue, da febre hemorrágica do Dengue e soro negativo para Febre do Dengue. A Fig. 59a apresenta uma distribuição

monodispersa das nanopartículas de ouro com morfologia esférica. A inserção de glicoproteínas do soro provoca a aglomeração do sistema nanoAu-ConA (Fig. 59b). Na Fig. 59b grandes aglomerados, obtidos pelo uso de glicoproteínas do soro de pacientes infectados pela Dengue clássica (DC), é a forma prevalente e nanopartículas isoladas são menos abundantes. Finalmente, na Fig. 59c obtida pelo uso de soro negativo para Dengue revela que não há aglutinação entre o sistema lectina-AuNP e glicoproteínas. Será mostrado abaixo, que tais resultados estão em concordância com as medidas de impedância. Portanto, é possível afirmar que a ConA imobilizada sobre a superfície da AuNp é capaz de reconhecer glicoproteínas presentes no soro infectado por Dengue.

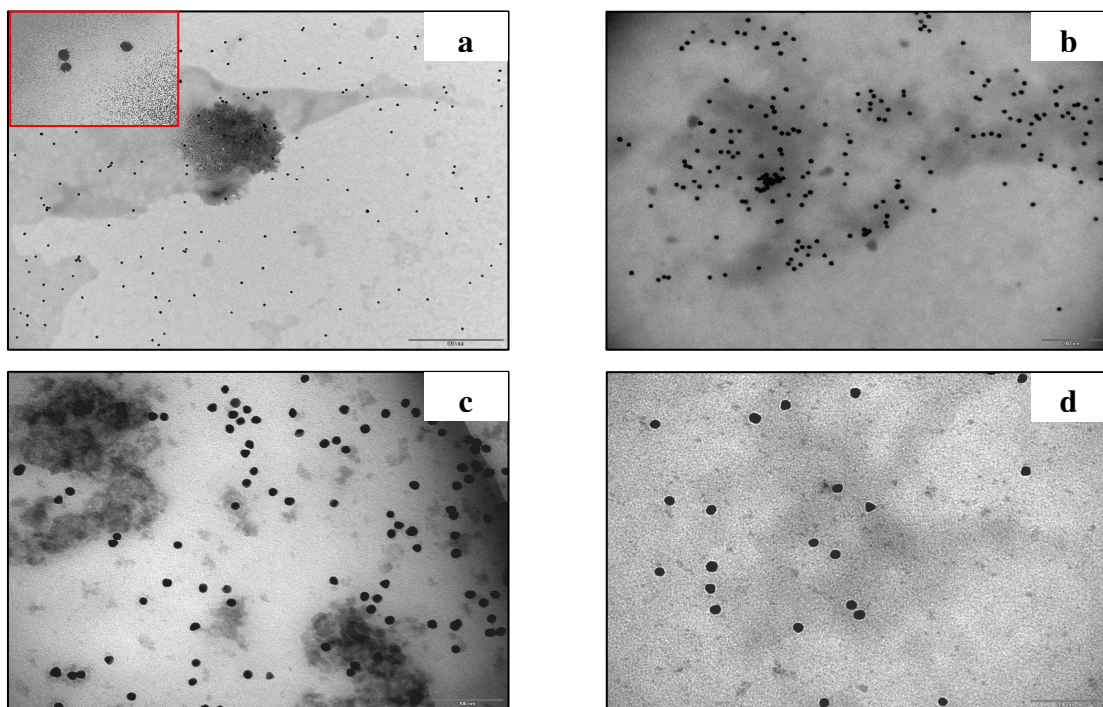


Figura 59 - Imagens representativas de TEM demonstrando os sistemas de AuNP-ConA (a), glicoproteínas do soro de pacientes infectados por febre do Dengue induzindo agregação de AuNP-ConA (b), glicoproteínas de pacientes infectados por febre hemorrágica do Dengue induzindo agregação de AuNP-ConA (c) e glicoproteínas do soro negativo para o Dengue (d).

O gráfico de Bode nos fornece informações relevantes a cerca da capacitância da dupla camada, podemos observar que à medida que ocorre a modificação da superfície do eletrodo há um aumento do caráter capacitivo da interface observado pelo aumento no ângulo de fase (Fig. 60).

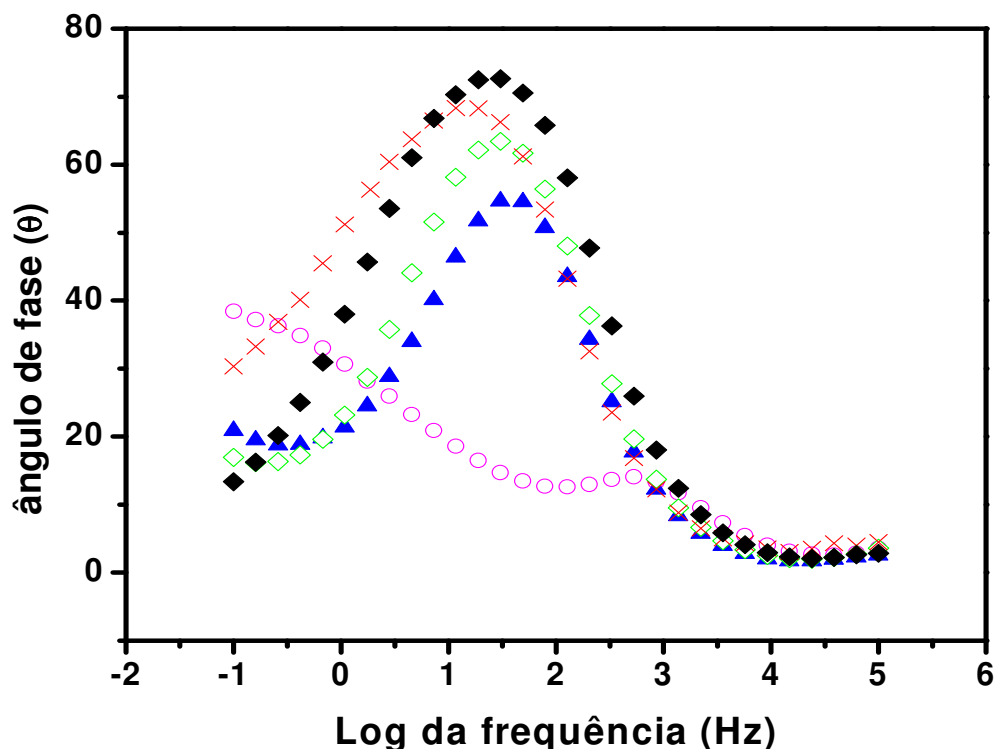


Figura 60 - Gráfico de Bode para o sistema ConA na presença de glicoproteínas do soro: ○ Eletrodo de ouro limpo; ▲ Eletrodo Au+nanoAu+ConA+PVB+BSA; ◇ Eletrodo Au+nanoAu+ConA+PVB+BSA+GS(Dneg 1:30); × Eletrodo Au+nanoAu+ConA+PVB+BSA+GS(DH 1:30) e ◆ Eletrodo Au+nanoAu+ConA+PVB+BSA+GS(DC 1:30).

Os pacientes com FHD/DH possuem menor conteúdo plaquetário e altos níveis de sVCAM-1. O sVCAM é uma sialoglicoproteína expressa pela membrana do endotélio. Este tipo de proteína está envolvido nos processos de adesão celular, e no desenvolvimento da aterosclerose e artrite reumatóide (Perez *et al.*, 2004). Os níveis elevados de NS1 e de sVCAM para pacientes com DH, relacionados com elevado nível

de IL-10 para DH e IFN  $\alpha$  e  $\gamma$  pode estar associado ao reconhecimento diferenciado do sistema nanoAu-ConA-PVB-BSA. Desta forma podemos verificar que a resposta impedanciométrica da lectina ConA foi maior para o soro DC provavelmente devido a uma maior interação biomolecular propiciado pelo sítio de ligação aos carboidratos.

Através do programa EQUIVCRT foi feito uma modelagem dos dados experimentais, utilizando-se o circuito de Randels modificado. Podemos observar as curvas ajustadas (linhas sólidas) na Fig. 61, indicando um bom ajuste entre o modelo do circuito e o sistema medido.

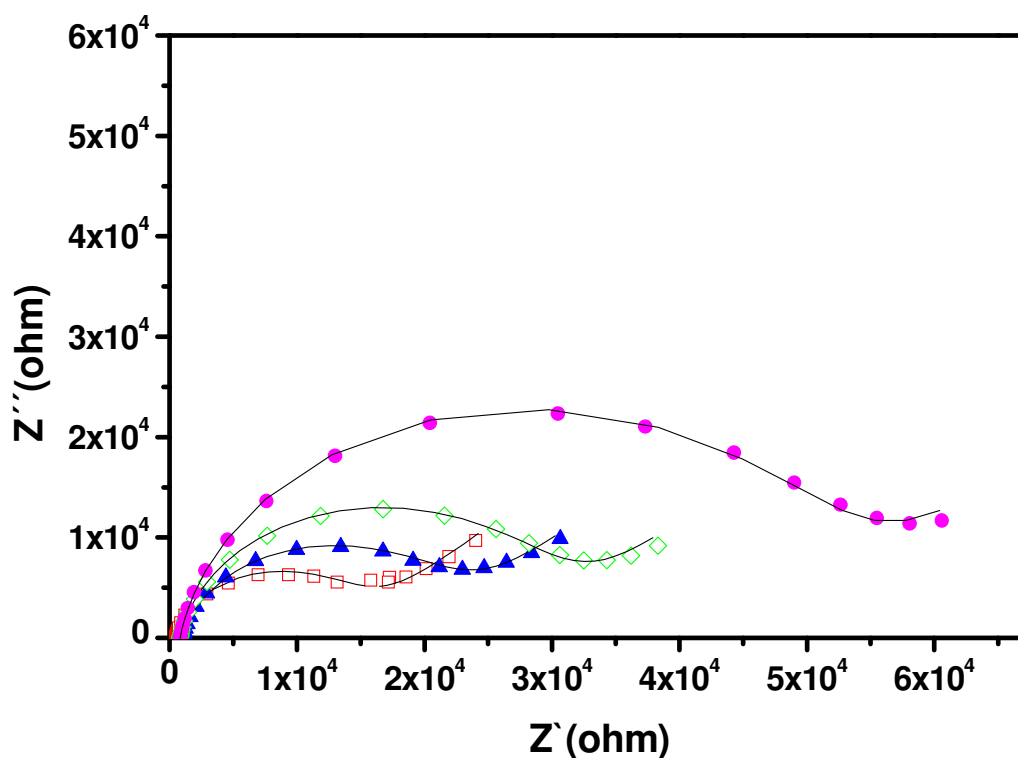


Figura 61 - Diagramas de Nyquist das etapas de reconhecimento das glicoproteínas do plasma (1:30): nanoAu-ConA-PVB-BSA eletrodo modificado ( $\square$ ), nanoAu-ConA-PVB-BSA-Dnegativo ( $\blacktriangle$ ), nanoAu-ConA-PVB-BSA-DH ( $\diamond$ ), nanoAu-ConA-PVB-BSA-DC ( $\bullet$ ).

Este circuito é o mesmo das análises anteriores, circuito de Randles modificado, demonstrando correlação do comportamento da superfície do eletrodo, que segue a tendência de sofrer bloqueio com a eventual adsorção biomolecular.

Através desta modelagem, obtiveram-se os valores de  $R_{CT}$ ,  $Q$  e  $n$  do circuito de Randles modificado (Tabela 4). Além disto, na tabela também são apresentados os valores de Capacitância ( $C$ ) que podem ser extraídos dos valores de  $Q$  e  $n$  utilizando as equações de  $Q$  ( $Q=R^{-n-1}C^n$ ) e da constante de tempo  $\tau$  ( $\tau=RC$ ), de acordo com procedimento apresentado por Roscoe e colaboradores (Roscoe *et al.*, 2005):

$$C=Q\tau^{1-n} \quad \text{Eq. 11}$$

onde  $Q$  representa dispersão de capacitâncias, o  $\tau$  refere-se a constante de tempo, enquanto que  $n$  representa a característica da impedância e apresenta valores no intervalo entre -1 a 0.

Podemos observar que os valores de  $R_{CT}$  são mais elevados para o sistema nanoAu-ConA-PVB-BSA em contato com DC e que os valores de  $Q$  e  $C$  também são elevados para este sistema, demonstrando que  $Q$  e  $C$  aumentam à medida que o  $R_{CT}$  se eleva.

O aumento observado no  $R_{CT}$  (Tabela 4) indica claramente que a interação entre a lectina-glicoproteína pode ser detectada pelo eletrodo modificado. Este aumento foi maior para DC nas diluições testadas que DH, caracterizando um reconhecimento diferencial de ConA para as glicoproteínas do soro de pacientes infectados pela Dengue clássica. Pode-se observar que à medida que ocorre um aumento na resistência de transferência de carga ( $R_{CT}$ ) ocorre um aumento dos valores de  $Q$  (elemento de fase constante), que representa a capacitância do sistema (Tabela 4). Enquanto a resistência de transferência de carga está diretamente relacionada com a cinética da reação redox, o

elemento de fase constante está relacionado com a natureza heterogênea entre o eletrodo/interface da solução (reflete a rugosidade da superfície do eletrodo).

Tabela 4 - Resultado de impedância ajustado para os eletrodos modificados na Fig. 61.

<b>Eletrodo Modificado</b>	<b><math>R_{CT} \times 10^3 (\Omega)</math></b>	<b>Q (<math>\mu F</math>)</b>	<b>n</b>	<b>C (<math>\mu F</math>)</b>
nanoAu-ConA-PVB-BSA	14,35	1,62	0,890	0,85
SistemaConA-DC1	33,80	3,94	0,790	1,17
SistemaConA-DC2	37,20	4,34	0,790	1,29
SistemaConA-DC3	38,90	4,54	0,780	1,27
SistemaConA-DC3,1	33,79	2,99	0,80	0,94
SistemaConA-DC3,2	38,34	3,42	0,80	1,07
SistemaConA-DC3,3	43,73	3,59	0,79	1,067
SistemaConA-DH1	32,00	2,72	0,850	1,22
SistemaConA-DH2	29,10	2,47	0,865	1,20
SistemaConA-DH3	27,86	2,36	0,860	1,12
SistemaConA-DH1,1	42,31	2,67	0,860	1,27
SistemaConA-DH1,2	37,01	2,35	0,864	1,14
SistemaConA-DH1,3	35,20	2,17	0,864	1,05
SistemaConA-Dneg1	19,22	1,63	0,880	1,16
SistemaConA-Dneg2	21,11	1,48	0,884	1,07
SistemaConA-Dneg3	20,19	1,55	0,882	1,11
SistemaConA-Dneg1,1	19,51	1,67	0,884	1,21
SistemaConA-Dneg1,2	21,15	1,68	0,882	1,19
SistemaConA-Dneg1,3	20,34	1,58	0,883	1,14

O aumento da capacitância associada com a elevação da resistência do sistema pode estar associado ao fenômeno de existência de poros na camada protéica (Roscoe *et al.*, 2005), este fato advém da combinação em paralelo entre a capacitância da dupla camada com a capacitância relativa da lectina quando em contato com o sistema nanoAu-PVB-BSA. Evidência esta relatada em trabalhos anteriores do grupo com as lectinas Lentil e ConA (Ribeiro *et al.*, 2005).

De forma análoga ao apresentado anteriormente, o aumento da impedância do sistema foi registrado em função da componente,  $R_{CT}$  a qual pode ser expressa como:

$$\Delta R_{CT} (\%) = \frac{R_{CT(lectina-glicoproteína)} - R_{CT(lectina)}}{R_{CT(lectina)}} \times 100\% \quad \text{Eq. 12}$$



onde o  $R_{CT}(\text{lectina})$  é o valor da resistência de transferência de elétrons do eletrodo modificado com o sistema nanoAu-ConA-PVB-BSA. O  $R_{CT}(\text{lectina-glicoproteína do soro})$  é o valor da resistência de transferência de elétrons do sistema nanoAu-ConA-PVB-BSA após o contato a soluções diluídas contendo glicoproteínas do soro.

Podemos verificar quantitativamente na Tabela 5 que a resistência de transferência de carga aumenta após o contato do sistema com o soro de pacientes contaminados com DC e DH, aumento este indicado pelos valores  $\Delta R_{CT}$  para DC (256,0%),  $\Delta R_{CT}$  para DH (103,17%), enquanto que para o soro negativo foi obtido um valor menor de  $\Delta R_{CT}$  (46,25%), indicando que o processo de interação do sistema nanoAu-ConA-PVB-BSA é governado pelas interações específicas que se estabelecem entre o sítio ativo da lectina e a glicoproteínas presentes no soro dos pacientes.

Tabela 5 – Resultados de impedância ajustados referente à interação lectina-glicoproteína da Fig. 61.

Eletrodo modificado	Interação lectina-glicoproteína do soro						
	Antes <sup>1</sup> ( $R_{CT}$ , $\Omega$ )	Após <sup>2</sup> ( $R_{CT}$ , $\Omega$ )	Após <sup>3</sup> ( $R_{CT}$ , $\Omega$ )	Após <sup>4</sup> ( $R_{CT}$ , $\Omega$ )	$\Delta R_{CT}(\%)$ GS(DC)	$\Delta R_{CT}(\%)$ GS(DH)	$\Delta R_{CT}(\%)$ GS(negativo)
AuNp-ConA-PVB-BSA	14,352	51,090	29,160	20,99	256.0	103.17	46.25

<sup>1</sup>Antes do contato com as glicoproteínas do soro (GS), <sup>2</sup>Após o contato com GS (DC), <sup>3</sup>Após o contato com GS (DH), <sup>4</sup>Após o contato com GS (negativo).

Com relação ao valor do  $R_{CT}$  do sistema nanoAu-ConA-PVB-BSA antes do contato prévio com os soros dos pacientes nota-se que ele é inferior (1,43 k $\Omega$ ) às etapas subsequentes, indicando que o processo que governa estes eventos é o bloqueio da transferência de carga entre a interface eletrodo-solução.

Claramente podemos observar que o valor de  $\Delta R_{CT}\%$  aumenta numa dependência direta com a concentração de glicoproteínas no soro (Fig. 63). Isto indica que as interações entre a lectina e aglicoproteína podem ser detectadas pelo eletrodo modificado. O aumento no  $\Delta R_{CT}\%$  é maior para glicoproteínas do soro de pacientes com DC do que para os pacientes com DH, indicando um reconhecimento diferencial pela ConA para os soros de pacientes com a febre do Dengue e com a febre hemorrágica do Dengue.

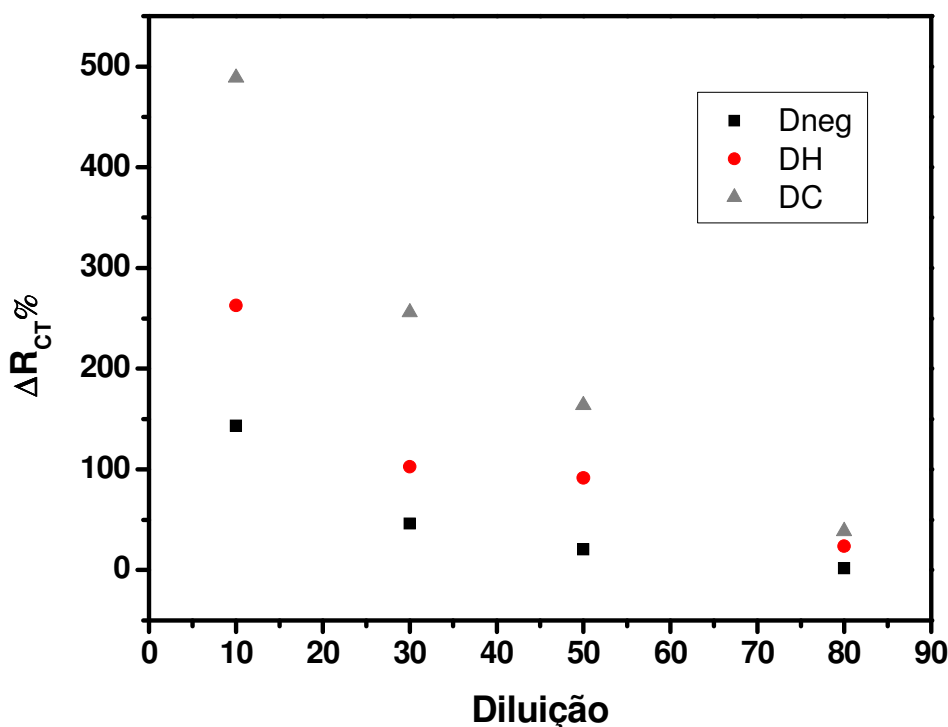


Figura 62 - Variação do  $\Delta R_{CT}\%$  para os sistemas que correspondem a nanoAu-ConA-PVB-BSA-GSDC ( $\blacktriangle$ ), nanoAu-ConA-PVB-BSA-GSDH ( $\bullet$ ) e nanoAu-ConA-PVB-BSA-GSDneg após incubação nos soros em diferentes diluições em TFS (pH 7,4), representadas por 1:10, 1:30, 1:50 e 1:80.

Claramente há uma resposta eletroquímica do sistema em análise para o soro de pacientes negativos para o Dengue, desde que este soro também é composto por glicoproteínas, proteínas do soro, dentre outras moléculas que são capazes de interagir

com o eletrodo. No entanto, a resposta preponderante do sistema é quando o mesmo está em contato com os soros contaminados, indicando uma alteração do perfil glicoprotéico destes pacientes em estudo.

Alguns autores relataram diferenças no padrão de proteínas presentes em soros DC, DH e normal através da utilização da eletroforese bidimensional (Araújo *et al.*, 2007). A partir deste estudo verificaram-se diferenças observadas entre as bandas protéicas, revelando presença de proteínas em DC que não é visualizada em DH. Neste mesmo estudo foi realizado uma análise da interação de uma lectina a CramoLL, correlacionada com a ConA, onde a partir de uma difusão radial pode-se observar o reconhecimento específico da lectina pelas glicoproteínas presentes em diferentes amostras. Este ensaio demonstrou que CramoLL reconheceu as glicoproteínas do soro de DC e DH havendo a formação de um arco de precipitação (Araújo *et al.*, 2007). A lectina CramoLL quando acoplada à Sepharose 4B possuiu a capacidade de isolar proteínas de padrões diferentes para os soros em análise. Estes estudos permitiram o conhecimento de que lectinas do grupo Man/Gli apresentam a habilidade de interagir de forma diferenciada para glicoproteínas presentes em soro de Dengue, podendo indicar alterações anormais no padrão protéico.

Como mencionado acima, os dados da Tabela 4, indicam uma aparente relação entre  $R_{CT}$  e Q. Esta relação fica evidente na Fig. 63 onde se observa que à medida que o  $R_{CT}$  aumenta o Q se eleva e que ao relacionarmos Q versus  $R_{CT}$  conseguimos evidenciar uma separação entre os sorotipos testados com o sistema composto pela lectina ConA. Desta separação verificamos que as respostas dos elementos do circuito para o sorotipo DC (pacientes com Dengue clássica), localizam-se na porção superior, para o sorotipo DH (paciente com Dengue hemorrágica) as respostas tendem para uma

região intermediária, enquanto que, o sorotipo DN (pacientes soro negativo) tende para a região de menores valores.

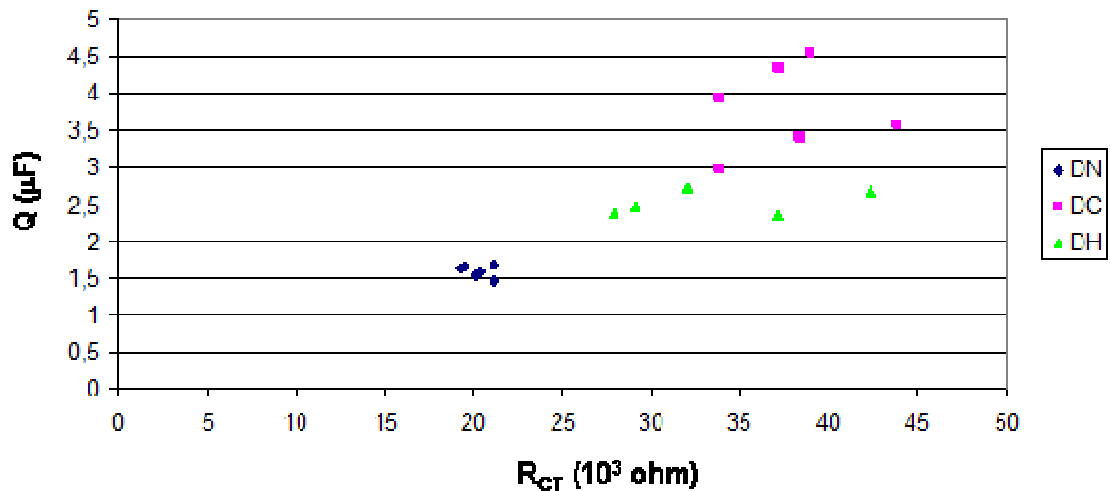


Figura 63 – Relação dos valores de Q versus  $R_{CT}$ . DN- soro negativo, DC- Dengue clássica e DH-Dengue hemorrágica.

Estes agrupamentos revelam a possibilidade do sistema desenvolvido em reconhecer quantitativamente cada sorotipo de pacientes contaminados com Dengue de forma isolada, demonstrando diferenças na especificidade de ConA para cada sorotipo.

É notável a presença de uma dispersão com relação aos valores obtidos com os pacientes DH, no entanto, conseguimos observar uma localização que difere dos outros sorotipos.

Ao analisarmos as três variáveis ( $R_{CT}$ , Q e n) dos elementos do circuito modificado de Randles conseguimos uma separação mais pronunciada dos grupos de cada sorotipo (Fig. 64). Desta forma o elemento n aparenta demonstrar fundamental importância no que diz respeito ao processo de detecção das glicoproteínas plasmáticas

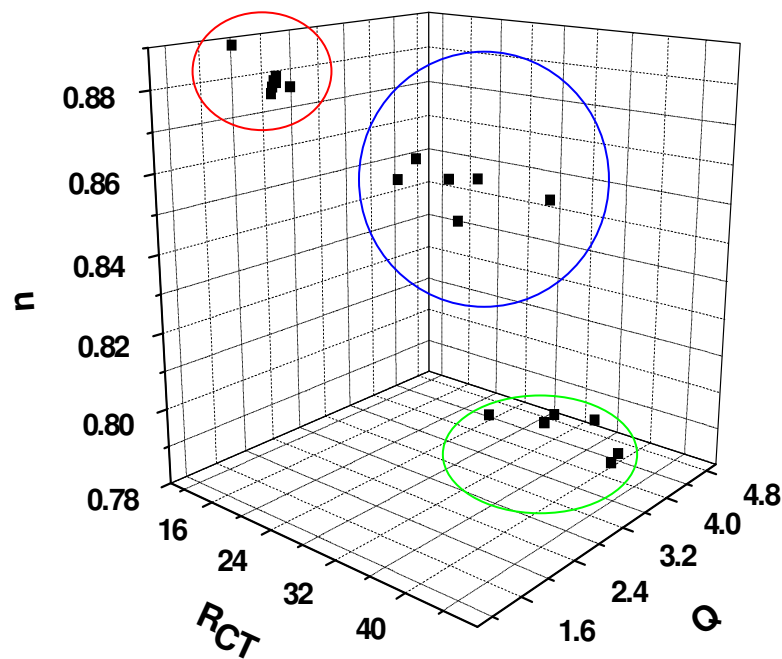


Figura 64 – Diferenciação entre os sorotipos através da relação entre os elementos  $n$ ,  $Q$ , e  $R_{CT}$ . – sororo negativo, - pacientes com Dengue hemorrágica e - pacientes com Dengue clássica.

Os valores elevados da capacitância para DC podem representar a característica de uma interface compacta, o que reflete a composição desta interface (eletrodonanoAu-ConA-PVB-BSA-DC), mais especificamente devido à constituição glicoprotéica deste sororo.

O reconhecimento distinto da lectina ConA para os soros dos pacientes com Dengue clássica e Dengue hemorrágica pode ser atribuído ao fato de durante a Dengue hemorrágica tem-se o estágio de secreção em maior quantidade da glicoproteína NS1, uma vez que, as células exibem a glicoproteína NS1 quando infectadas com o vírus da Dengue, secretam NS1 dentro do sangue (Avirutnan *et al.*, 2006).

No sororo de pacientes contaminados seja na DC ou DH, observa-se a presença da glicoproteína NS1, com maior proporção para pacientes com DH. Os dados de impedância refletem uma menor interação para DH, o que pode estar relacionado com a presença de

vários fatores humorais tais como citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6) que induzem a expressão de glicoproteínas de adesão ICAM-1 e VCAM-1, E- e P-selectina, os quais são essenciais para iniciar o processo de extravasamento plasmático (Hofer *et al.*, 1993).

No processo de reconhecimento de ConA para DH verifica-se menor intensidade, provavelmente pelos níveis elevados de NS1 e de outras glicoproteínas, tal como, o VCAM-1 de peso aproximado de 100 kDa (Carter *et al.*, 2001), uma sialoglicoproteína expressa pela membrana do endotélio envolvida nos processos hemorrágicos da Dengue, os quais competem mutuamente com o sítio de reconhecimento para carboidratos da lectina (Perez *et al.*, 2004). Normalmente a NS1 sintetizada aparece como um monômero no lúmen do retículo endoplasmático e subsequente glicosilação (Winkler *et al.*, 2008). A glicoproteína NS1 (46 kDa) atua na fase precoce da infecção viral e também envolvida com a patogênese da DH, é expressa em três formas: uma forma residente no retículo endoplasmático (RE) que co-localiza com o complexo de replicação viral, uma forma ancorada na membrana e uma secretada.

Realmente dados demonstram a glicoproteína NS1 presente em altas concentrações no soro de pacientes desde os primeiros dias da doença e está associada com o desenvolvimento da DH (Lapphra *et al.*, 2008). A glicoproteína NS1 apresenta resíduos de alta-manose após processo de glicosilação no complexo de golgi, bem como sua complexação ao glicosil-fosfatidilinositol (Jacobs *et al.*, 2000), este fato pode estar relacionado com a resposta do sistema nanoAu-ConA-PVB-BSA maior para DC do que para DH, uma vez que, no soro de pacientes com DH há a presença de VCAM-1 uma sialoglicoproteína que pode interferir no processo de biorechecimento da lectina para a NS1 nesta fase do estágio da infecção (Abe *et al.*, 1999). O reconhecimento da lectina

ConA para a glicoproteína NS1 advém do fato desta lectina apresentar afinidade para o monossacarídeo manose (Goldstein *et al.*, 1977).

As moléculas de VCAM-1 possuem ácido siálico em sua estrutura, estes são monossacarídeos com 9 carbonos que se ligam a galactose, N-acetilgalactosamina, ou a outros ácidos siálicos presentes em cadeias de carboidratos que fazem parte de glicoproteínas ou glicolipídios. Os ácidos siálicos encontram-se em posição terminal numa determinada cadeia e em adição seu primeiro carbono encontra-se ionizado no pH fisiológico, sendo o único açúcar com carga negativa compondo as glicoproteínas. Por causa de sua localização e carga negativa, os ácidos siálicos têm um potencial de inibir interações entre moléculas (Acheson *et al.*, 1991, Ardman *et al.*, 1992, Abe *et al.*, 1999).

Desta forma a presença de ácido siálico na estrutura de VCAM-1 é preponderante na resposta diminuída entre o sítio da lectina ConA e as glicoproteínas presentes no soro de pacientes com DH, haja vista que os mesmos possuem expressão elevada de s-VCAM associado ao processo de extravasamento vascular, fato que não se verifica no soro de pacientes DC.

Desta forma podemos identificar diferenças entre NS1 e VCAM na composição sacarídica e com relação ao peso molecular. Como vimos acima o padrão de reconhecimento do sistema nanoAu-ConA-PVB-BSA está relacionado ao processo de interação entre o sítio da lectina ao carboidrato presente em glicoproteínas.

Em geral poderíamos ter obtido maior bloqueio da interface eletroquímica com a glicoproteína VCAM-1, já que a mesma apresenta peso molecular superior à NS1, no entanto, não observamos este comportamento nos dados de impedância nem de voltametria, o que justifica a resposta do sistema com ConA estar relacionado a sua especificidade biológica.

Análises voltamétricas prestaram-se para analisar o comportamento da lectina ConA com os soros de pacientes contaminados pela Dengue. Através da análise gráfica podemos verificar as alterações do contorno dos voltamogramas à medida que ocorrem modificações na superfície do eletrodo (Fig. 65). Na Fig. 65a podemos observar os resultados referentes aos voltamogramas para o sistema nanoAu-ConA-PVB-BSA quando em contato com o soro contaminado com Dengue clássica para as diferentes diluições. À medida que diminui a diluição (1:10) há alterações nos contornos dos voltamogramas, sendo verificado um estreitamento da área dos voltamogramas, o que demonstra que o sistema está interagindo com glicoproteína(s) do soro em análise. Praticamente não há alteração do perfil voltamétrico quando o sistema entra em contato com o soro diluído a 1:80, o que caracteriza como um material muito diluído para o sistema em análise.

Quando passamos a analisar outras diluições conseguimos observar respostas diferenciadas, indicando variabilidade de resposta voltamétrica. A partir daí avaliamos o soro contaminado com febre hemorrágica do Dengue/Dengue hemorrágica, para observarmos se conseguiríamos obter respostas diferenciadas do sistema quando em contato com o soro diluído. Característica semelhante foi verificada com os dados de voltametria obtidos com o soro de pacientes contaminados com Dengue hemorrágica. Houve um desaparecimento das correntes de pico catódica e anódica quando o soro contaminado com Dengue hemorrágica com diluição de 1:10 (Fig. 65b).

O eletrodo modificado adquiriu a característica de um sistema praticamente irreversível quando em presença do soro na diluição 1:10, processo este governado mais uma vez pelo bloqueio da superfície eletroquímica. A resposta voltamétrica do sistema ConA quando em presença de soro negativo, revelou uma redução suave das correntes de pico anódicas e catódicas nas diferentes diluições (Fig. 65c).





Podemos observar a dependência das correntes de pico em função da diluição (Fig. 66). O comportamento do sistema nanoAu-ConA-PVB-BSA frente às diferentes concentrações para os soros de DC, DH e Dneg reflete uma linearidade das repostas voltamétricas, onde verifica-se uma queda da corrente em concentrações mais baixas.

Fenômeno este associado ao processo de bloqueio dos sítios ativos do eletrodo, obtendo-se resposta via tunelamento dos elétrons sobre a superfície do eletrodo de ouro. Podemos verificar as diferenças entre as respostas do sistema aos soros na diluição de 1:30. Após o contato do sistema nanoAu-ConA-PVB-BSA com o soro de paciente negativo para o Dengue pôde-se observar que houve uma redução da resposta amperométrica total do sistema (Fig. 66).

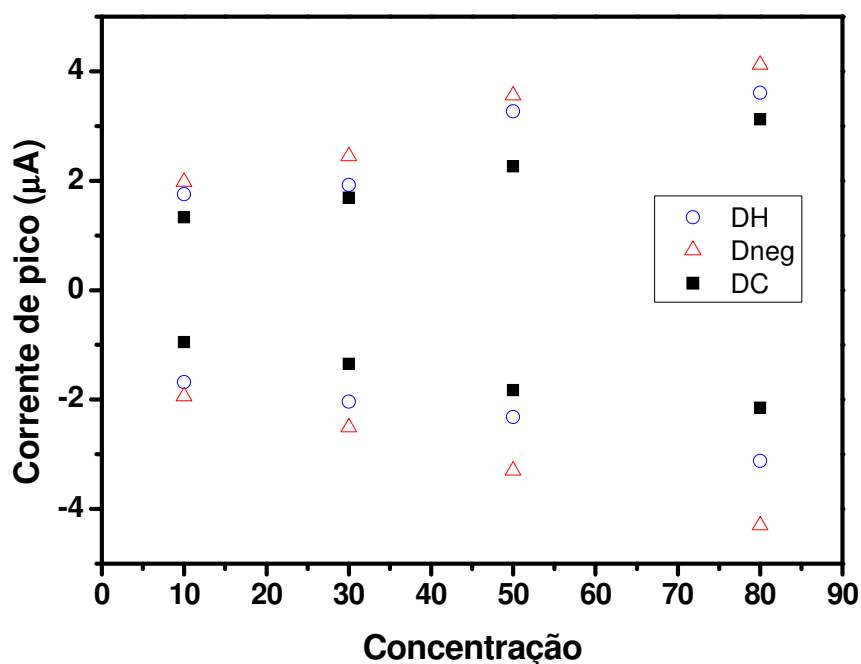


Figura 66 - Dependência das correntes de pico em função da diluição. Eletrólito suporte 10 mM  $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$  1:1 + 0.15 M NaCl em solução de TFS pH 7.4, 10mM; velocidade de varredura de  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . Au-ConA-PVB-BSA-DH ( $\circ$ ), Au-ConA-PVB-BSA-Dneg ( $\Delta$ ) e Au-ConA-PVB-BSA-DC ( $\blacksquare$ ).

Posteriormente, o sistema foi posto em contato com os soros de pacientes com febre do Dengue e febre hemorrágica do Dengue e, desta forma, foi obtida uma redução mais acentuada da resposta amperométrica do sistema, principalmente quando em presença do soro em contato com a febre do Dengue (Fig. 67).

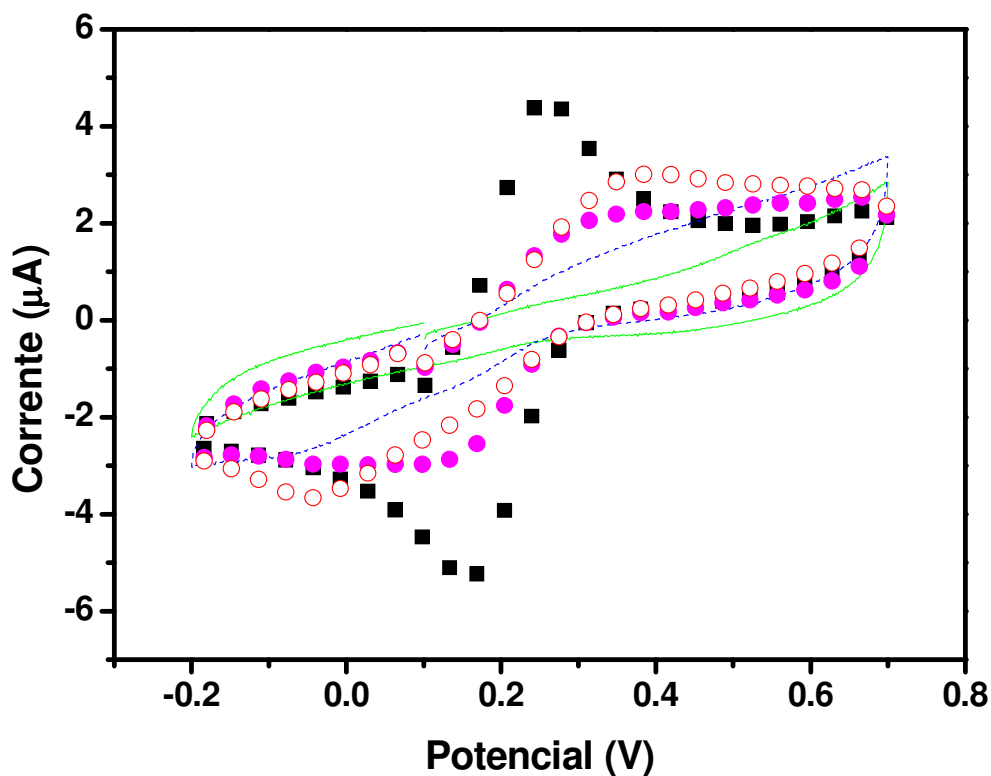


Figura 67 - Voltamogramas cíclicos (VCs) dos eletrodos em diferentes estágios na diluição de 1:30: Eletrodo de ouro limpo (■), nanoAu-ConA-PVB-BSA (○), nanoAu-ConA-PVB-BSA-GSnegativo (●), nanoAu-ConA-PVB-BSA-GSDH (⋯), nanoAu-ConA-PVB-BSA-GSDC (—). Eletrólito suporte 10 mM  $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$  1:1 + 0.15 M NaCl em solução de TFS pH 7.4, 10mM; velocidade de varredura de  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

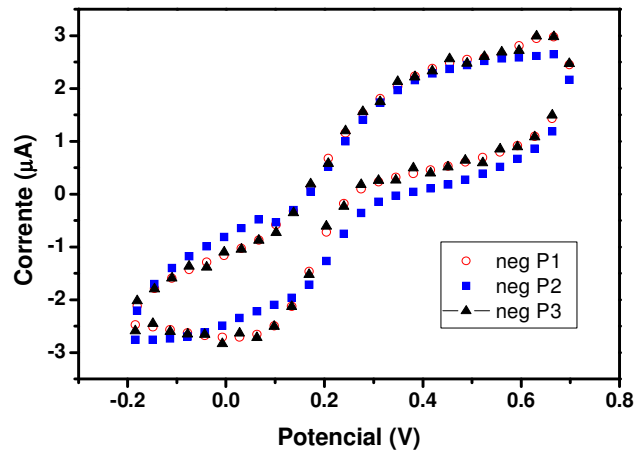
No sistema nanoAu-ConA-PVB-BSA-GSFD/DC houve praticamente um desaparecimento das correntes de pico anódica e catódica, fato este propiciado pelo efeito de bloqueio da transferência de elétrons na superfície do eletrodo.

Podemos observar claramente a dependência das correntes de pico em função da concentração dos soros avaliados (Fig. 67). Tanto para as correntes de pico anódicas quanto para as correntes de pico catódicas há um declínio linear nas correntes de pico, indicando que quando o sistema está em contato com uma maior quantidade de biomoléculas em sua superfície ocorre um maior bloqueio da atividade amperométrica do eletrodo de ouro. Desta forma podemos observar que ocorre redução da reatividade do eletrodo.

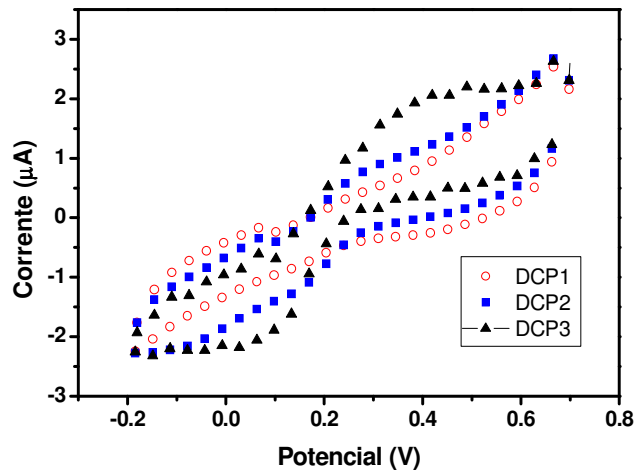
A reprodutibilidade das análises voltamétricas do sistema nanoAu-ConA-PVB-BSA foi avaliada na presença do soro de três amostras de pacientes diferentes para DC, DH e Dneg (Fig. 68). Na Fig. 68a-c podemos verificar que as medidas apresentam um perfil semelhante demonstrando pequenas diferenças entre os três soros de cada caso.

As diferenças entre os voltamogramas para cada caso são devido às próprias diferenças que cada paciente exhibe, indicando que mesmo pacientes com a mesma sintomatologia/infecção possuem respostas voltamétricas diferentes, mas com características próprias que confere a resposta do sistema nanoAu-ConA-PVB-BSA para Dengue clássica maior que para os outros soros.

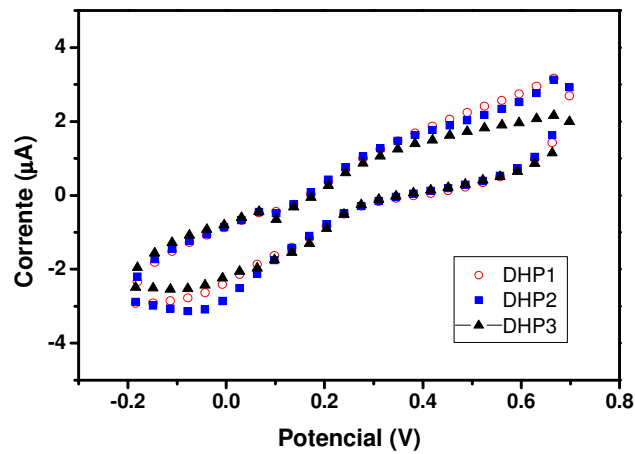
Na tentativa de se obter diferenças mais significativas nas respostas da lectina ConA frente aos soros contaminados, foi realizada a voltametria de varredura linear, numa faixa de varredura de 0,7 a -0,2 V, faixa esta utilizada na voltametria cíclica, justamente com o intuito de diferenciar um soro do outro. Na Fig. 69a-c, podemos verificar diferenças entre os soros analisados, de acordo com estas análises conseguimos prever que quando o sistema nanoAu-ConA-PVB-BSA é posto em contato com os soros contaminados com a febre do Dengue e com a febre hemorrágica do Dengue tem-se uma característica inicial a 0,7 V que ocorre um decaimento da corrente voltamétrica.



**a**



**b**



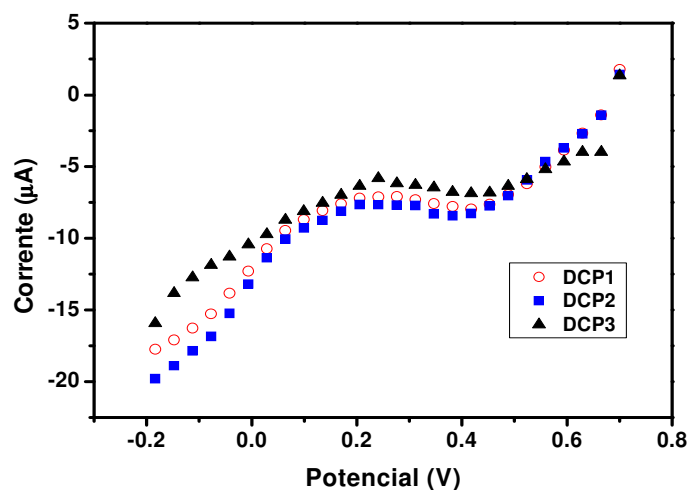
**c**

Figura 68 - Voltamogramas cíclicos em diferentes sorotipos da Dengue para três pacientes na diluição de 1:30 em solução de ferro-ferricianeto de potássio 10mM em tampão fosfato de sódio pH 7,4. a) Soro negativo, b) febre do Dengue e c) febre hemorrágica do Dengue. P1-paciente nº1, P2-paciente nº2 e P3-paciente nº3.

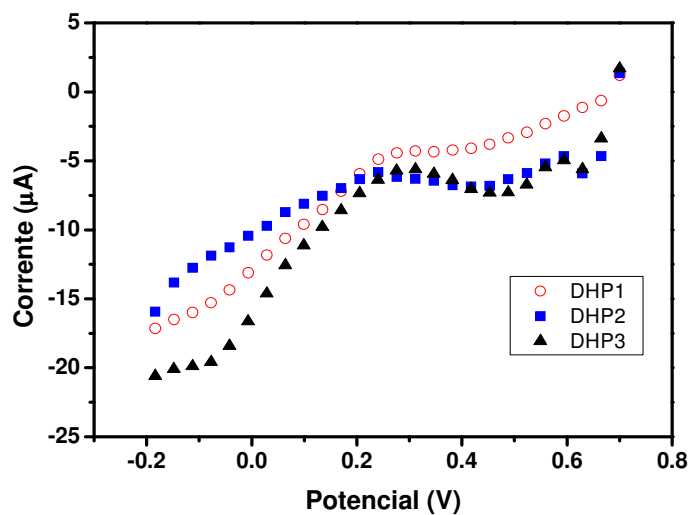
A partir de 0,4 V verifica-se que a corrente atinge um platô, adquirindo valor constante ( $\sim -7,5$  V) até atingir o potencial de 0,2 V, após este ponto observamos um novo decaimento da corrente obtida (Fig. 69a, b). No entanto podemos evidenciar que para as repostas com o soro de febre hemorrágica do Dengue (Fig. 69b), há em 0,7 V um decaimento mais rápido da corrente, ou seja, a corrente decai até 0,6 V e a partir de 0,6 V se estabelece um platô até 0,2 V e após este potencial ocorre um novo decaimento. Assim verificamos que para DC e DH há diferenças na respostas indicando que o sistema nanoAu-ConA-PVB-BSA em estudo presta-se para a detecção de soros contaminados com a Dengue.

As respostas do sistema referentes ao soro para Dengue negativo foram observadas um comportamento diferente para os soros contaminados com Dengue clássica e hemorrágica, pode-se verificar que a partir do potencial de 0,7 V que um patamar se estabelece logo no início da varredura e que o decaimento da corrente se estabelece a partir do potencial de 0,2 V (Fig. 69c). Característica que difere do que foi observado para os outros soros avaliados. Desta forma a varredura linear presta-se para caracterizar diferenças entre os soros de pacientes, variações nas medidas são observadas devido a diferenças entre os soros o que reflete um padrão distinto para cada paciente.

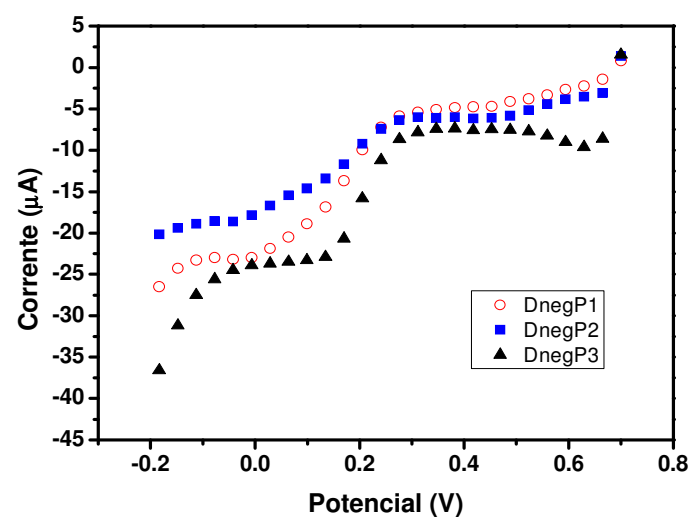
A partir do exposto, observamos que através do estudo do sistema analisado com os dados de  $\Delta R_{CT}\%$ , análise quimiométrica de R, Q e n, bem como as técnicas de voltametria cíclica e de varredura linear, foi possível a avaliação e distinção do perfil glicoprotéico do soro de pacientes com Dengue clássica e hemorrágica. No entanto, a análise de  $\Delta R_{CT}\%$  pode ser útil em análises iniciais para a detecção desta patologia.



**a**



**b**



**c**

Figura 69 - Medidas de voltametria linear na diluição de 1:30 em solução de ferricianeto de potássio 10mM em tampão fosfato de sódio pH 7,4. a) Sistema com febre do Dengue, b) sistema com febre hemorrágica e c) sistema com soro negativo. P1-paciente nº1, P2-paciente nº2 e P3-paciente nº3.

Portanto, a espectroscopia de impedância e a voltametria cíclica são ferramentas usadas rotineiramente para o desenvolvimento de biossensores para análises clínicas, e deste modo podemos avançar com o uso das lectinas para diferenciar células tumorais, bacterianas, glicoproteínas de soro, anticorpos bem como compostos fenólicos baseado no fenômeno de interação lectina-carboidrato. O grande interesse na aplicação dos métodos eletroquímicos como base para os sensores biomédicos e clínicos advêm da elevada sensibilidade, baixo custo, e compatibilidade com a tecnologia de micro-fabricação.

Os métodos de detecção eletroquímica baseada em VC e EIE já têm sido largamente utilizados na clínica como, por exemplo, sistemas voltamétricos para detecção de dopamina com excelente seletividade e sensibilidade (Wightman *et al.*, 1999), dispositivos de detecção diminutos também são usados como sensor para detecção simultânea de analitos diferentes (Johnson *et al.*, 2005). No entanto, alguns problemas dificultam a viabilidade comercial destes dispositivos, tais como o tempo de estabilidade, biocompatibilidade e seletividade em ambientes bioquímicos, o que incentiva o estudo da interação das proteínas com outras moléculas, bem como a interação com diferentes tipos de eletrodos para elucidar e aprimorar os dispositivos biomoleculares (Wu *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 1998).

Em estudos com ConA também foi avaliada a interação desta lectina ao glicogênio sob eletrodo de ouro modificado com cisteína (aminoácido tiolado), onde foi verificado que a resposta eletroquímica desta lectina em presença do glicogênio é similar às observadas em nosso trabalho tendo afetado a atividade e a condutividade do eletrodo de ouro, onde os VCs apresentavam queda da resposta amperométrica e aumento do  $R_{CT}$  nas medidas de impedância (Tan *et al.*, 2006).



A estabilidade de filmes de lectinas, principalmente da ConA tem sido investigada e a mesma é dependente do meio que a lectina se encontra, sendo o pH um fator preponderante na estabilidade dos filmes de lectinas e que para a ConA, a faixa de pH apropriado é entre pH 7-8, o que favorece a interação aos carboidratos, tal como o glicogênio. Em pH abaixo desta faixa verifica-se uma instabilidade do filme devido a disposição da estrutura da ConA na forma dimérica, em contraste a forma tetramérica assumida por esta lectina em pH neutro (Sato *et al.*, 2005).

Estas informações sugerem a estabilidade do biossensor formado por ConA, assim como para CramoLL, uma vez que o tampão utilizado nos testes favorecem que esta lectina esteja numa disposição espacial mais cômoda, o que está de acordo com dados obtidos de espectroscopia de fluorescência bem como de absorção em 280 nm que denotam que não houve perda da estabilidade de ConA.

Outros estudos de caracterização eletroquímica têm proporcionado a obtenção de informações referente ao processo de adsorção de lectinas em superfícies metálicas, para acompanhar os eventos que governam a adsorção e a interação lectina-carboidrato. As técnicas de voltametria cíclica e impedância auxiliam a caracterização de biossensores sacarídicos, tal como foi observado para o biossensor de ConA em filmes rígidos de manose como estratégia versátil para investigar a capacidade das lectinas em reconhecer carboidratos em superfícies metálicas (Zhang *et al.*, 2006).

As medidas de impedância realizadas no processo de montagem do biossensor de CramoLL e ConA e conseqüente aplicação do sistema ConA para a detecção Dengue correspondem às reações de transferência de elétrons entre o eletrodo e os íons presentes na solução. Quando as lectinas interagem com os açúcares ocorre uma maior alteração na interface, tendo como conseqüência um aumento nos valores da resistência e da capacitância.

# *CAPÍTULO IV*

#### 4. CONCLUSÕES

As lectinas CramoLL e ConA adsorvem sobre eletrodos de platina ou de ouro modificados com o sistema constituído por nanopartículas de ouro e polivinilbutiral. O processo de adsorção das lectinas ao eletrodo está associado ao bloqueio que as mesmas provocam alterando a reação de transferência de elétrons da solução de ferro-ferricianeto de potássio.

O contorno dos voltamogramas cíclicos dos eletrodos de platina e de ouro quando limpos são bastante alterados à medida que ocorre a modificação na superfície dos eletrodos nas etapas de montagem do biossensor. O contorno, apresentado nos voltamogramas, adquirem características irreversíveis, as quais podem ser verificadas através da diminuição dos picos anódicos e catódicos da solução ferri-ferrrocianeto de potássio.

As análises de impedância eletroquímica também demonstraram o bloqueio da superfície devido à presença das lectinas CramoLL e ConA adsorvidas na superfície de platina ou ouro. Os dados obtidos em eletrodo de ouro foram os mais satisfatórios, pois demonstraram uma melhor reprodutibilidade, menor efeito do oxigênio nos voltamogramas cíclicos e facilidade no processo de limpeza, no entanto o fator oxigênio foi o que mais favoreceu a continuidade em desenvolver os sistemas com CramoLL e ConA em eletrodos de ouro.

Através da resistência à transferência de elétrons se verificou que a sensibilidade da CramoLL e ConA em sistema nanoAu-PVB frente a diferentes carboidratos tais como, monossacarídeo (glicose), homopolissacarídeo (glicogênio) e a glicoproteína (ovoalbumina). Dentre os sistemas analisados, nanoAu-ConA-PVB se mostrou sensível a ovoalbumina e ao glicogênio pelo aumento observado da  $R_{CT}$ , enquanto que a lectina CramoLL se mostrou mais sensível para a ovoalbumina. Ambas as lectinas responderam

com uma diminuição da  $R_{CT}$  quando em contato com o monossacarídeo indicando a presença de diferentes forças intermoleculares envolvidas no processo de interação lectina-carboidrato.

O sistema nanoAu-ConA-PVB demonstra reconhecer glicoproteínas do soro de pacientes infectados por Dengue clássica e hemorrágica, este reconhecimento foi evidenciado para as diluições do soro em 1:50, 1:30 e 1:10.

Verificou-se que o processo de interação lectina-glicoproteínas do soro pode ser avaliado pelo aumento na resistência de transferência de carga ( $R_{CT}$ ) observado pelo aumento da impedância total do sistema avaliado e que para as diluições avaliadas a resposta do sistema nanoAu-ConA-PVB foi maior para glicoproteínas do soro de pacientes com febre do Dengue/Dengue clássica. Este fato pode estar relacionado com uma maior seletividade da lectina em estudo para as proteínas do soro de pacientes com DC, uma vez que a disposição do sítio ativo da lectina parece favorecer esta interação.

A partir da análise dos soros diluídos em 1:30 pôde-se evidenciar a reprodutibilidade das respostas impedanciométricas e voltamétricas através da análise do soro de três pacientes.

Ao avaliar por varredura linear o comportamento da resposta do sistema nanoAu-ConA-PVB aos diferentes soros em potencial de 0.7 a -0.2V, foi possível verificar que possivelmente o sistema em contato com as glicoproteínas do soro DC e DH quando em 0.7V apresenta um declínio inicial de corrente, o que não ocorre com o soro de Dneg.

Além disso, ao aplicarmos diferentes potenciais para a realização da impedância eletroquímica, verificou-se que os melhores potenciais de observação para diferenciação das glicoproteínas foram os potenciais, 0.4 e 0.2V. Desta forma podemos verificar que o sistema em análise apresenta maior interação com glicoproteínas do soro DC seguido de

DH podendo ser utilizado para avaliação de anormalidades de glicoproteínas presentes no soro de pacientes.

A eletroquímica fornece subsídios fundamentais para um monitoramento interfacial das reações biomoleculares, especificamente do tipo lectina-carboidrato utilizando as técnicas de voltametria, impedância eletroquímica. Devido a grande aplicabilidade e especificidade para as moléculas de carboidratos existem poucos sensores à base de lectinas, isto é atribuído à dificuldade na definição de parâmetros para mensuração com alta sensibilidade. Portanto, propomos a utilização da eletroquímica como uma ferramenta robusta em aplicações biotecnológicas para o estudo da afinidade de lectinas para monossacarídeos, polissacarídeos e glicoproteínas em tempo real.

# *CAPÍTULO V*

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, Y., SMITH, C.W., KATKIN, J.K., THURMON, L.M., XU, X., MENDOZA, L.H., BALLANTYNE, C.M. *J. Immunol.*, 1999, 163, 2867.
- ACHESON, A., SUNSHINE, J. L., RUTISHAUSER, U. *J. Cell Biol.*, 1991, 114, 143.
- ALLEN, N.K., BRILLIANT, L. *J. Immunol.*, 1969, 102, 1295.
- ALVES, V.A., BRETT, C.M.A. *Electrochim. Acta* 2002, 47, 2081.
- ANDREISCU, S., SADIK, O.A *Pure Appl. Chem.* 2004, 76, 861.
- ANTOINE, O., BULTEL, Y., DURAND, R.J. *Eletroanal.Chem.* 2001, 499, 85.
- ARAÚJO, F.F.B, PAES-BARRETO, R.S., CORDEIRO, M.T., COELHO, L.C.B.B., CORREIA, M.T.S., ZINGALI, R.B., LIMA, V.L.M. *Aplicações biotecnológicas de preparações de lectinas de sementes de Cratylia mollis. Tese de doutorado, Recife, PE, 577.1 A663a, 2007.*
- ARDMAN, B., SIKORSKI, M. A., STAUNTON, D. E. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1992, 89, 5001.
- ASHKENAZI, S. AND MIRELMAN, D. *Pediatrics Res.*, 1984, 18, 1366.
- ASHWELL, G., HARFORD, J. *Ann. Rev. Biochem.*, 1982, 51, 531.
- ASKAR, A. *Food Nutrition Bulletin, Tokyo*, 1986, 8, 15.
- ATASSI, M.Z., VAN, O.S.S, C.J ABSOLOM, D.R. *Molecular Immunology*, Marcel Dekker, New York, 1984.
- AVILA-AGUERO, M.L., AVILA-AGUERO, C.R., UM, S.L., SORIANO-FALLAS, A., CANAS-COTO, A., YAN, S.B., 2004. *Cytokine* 2004, 27, 173.
- AVIRUTNAN, P., PUNYADEE, N., NOISAKRAN, S., KOMOLTRI, C., THIEMMECA, S., AUETHAVORNANAN, K., JAIRUNGSRI, A., KANLAYA, R., TANGTHAWORNCHAIKUL, N., PUTTIKHUNT, C., PATTANAKITSAKUL, S., YENCHITSOMANUS, P., MONGKOLSAPAYA, J., KASINRERK, W., SITTISOMBUT, N., HUSMANN, M., BLETNER, M. S. VASANAWATHANA, S., BHAKDI, S., MALASIT, P. *J. Infect. Dis.* 2006, 193, 1078.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L.R.; *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, Wiley: New York, 2001.
- BARD, A.J., FAULKNER, L.R. *Electrochemistry* [12 ed. E-wiley](#), 2000.
- BARONDES, S.H. *Science*, 1984, 223, 1259.
- BARONDES, S.H., COOPER, D.N.W., GITT, M.A., LEFFLER, H. *J. Biol. Chem.* 1994, 269.
- BELTRÃO, E.I.C., CORREIA, M.T.S., SILVA, J.F., COELHO, L.C.C.B. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1998, 74, 125.

- BETHELL, D.B., FLOBBE K., CAO, X.T. *J. Infect. Dis.* 1998, 177, 778.
- BOGGS J.M., WANG, H., GAO, W., ARVANITIS, D.N., GONG, Y., MIN, W. *Glycoconjugate J.* 2004, 21, 97.
- BOUKAMP, B.A. *Sol. St. Ionics* 1996, 18, 136.
- BOYD, W.C., SHAPLEIGH, E. *Science*, 1954, 119, 419.
- BRETT, A.M.O., BRETT, C.M.A. Oxford University Press, 1996, 5, 236.
- BROWN, K.R, FOX A.P.M., NATAN M.J. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 1154.
- CARTER, R.A., DONNELL, K.O., SACHTHEP, S., CICUTTINI, F., BOYD, A.W., IP WICKS, I.P. *Immunol. Cell Biol.*, 2001, 79, 419.
- CHAKRAVARTI, A., GUR, R., BERRY, N., MATHUR, M. D. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2000, 36 (4), 273.
- CHANGANI, S.D., BELMARBEINY, M.T., FRYER, P.J. *Expt. Thermal Fluid Sci.* 1997, 14, 392.
- CHATURVEDI, U., NAGAR, R., SHRIVASTAVA, R. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2006, 47, 155.
- CHATURVEDI, U.C., RAGHUPATHY, R., PACSA, A.S., ELBISHBISHI, E.A., AGARWAL, R., NAGAR, R., MISRA, A., KAPOOR, S., MATHUR, A., KHAN, M.A.Y., AZIZIEH, F. *Curr. Sci.* 1999, 76, 63.
- CHAUBEY, A., MALHOTRA, B. *Biosen. Bioelectron.*, 2002, 17, 441.
- CHEN, J., TANG, J., YAN, F., JU, H. *Biomaterials* 2006, 27, 2313.
- CHEN, R.F., LIU, J.W., YEH, W.T., WANG, L., CHANG, J.C., YU, H.R., CHENG, J.T., YANG, K.D. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2005, 44, 43.
- CHEN, R.F., YEH, W.T., YANG, M.Y., YANG, K.D. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2001, 30, 1.
- CHEN, L.C., LEI, H.Y., LIU, C.C. *Am J Trop Med Hyg* 2006, 74, 142.
- CHENG, T.J., LIN, T.M., CHANG, H.C. *Anal. Chim. Acta* 2002, 462, 261.
- CHIOU, C.Y., CHOU, T.C. *Eletroanalysis* 1996, 8, 1179
- CORREIA, M.T.S., COELHO, L.C.B.B. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1995, 55, 261.
- CUNNINGHAM, J. A. *Introduction to Bioanalytical Sensors*, Ed. John Willey & Sons, New York, 1998.
- D'ORAZIO, P. *Chim. Acta.* 2003, 334, 41.
- D'SOUZA, S.F. *Biosen. Bioelectron.*, 2001, 16, 337.
- DE CARVALHO, L.A., DE ANDRADE, A. R. *Quim. Nova*, 2006, 29, 796.
- DE SOUZA, G.A., OLIVEIRA, P.S.L., TRAPANI, S., SANTOS, A.C.O., ROSA, J.C., LAURE, H.J., FACA, V.M., CORREIA, M.T.S., TAVARES, G.A., OLIVA, G., COELHO, L.C.B.B., GREENE, L.J. *Glycobiol.* 13 (2003) 961.



- DEISINGH, A.K., THOMPSON, M. *Can. J. Microbiol.* 2004, 50, 69.
- DEJONG, P. *Trends Food Sci. Technol.*, 1997, 8, 401.
- DEQUARIE, M., DEGRAND, C., LIMOGE, B. *Anal. Chem.* 2000, 72, 5521.
- DESHPANDE, S.S., DAMODARAN, S. *Advances in Cereal Science and Technology*, 1990, 10, 147.
- DUNCAN, W. R. H., LOUGH, A. K., GARTON, G. A., BROOKS, P. *Lipids* 1974, 9, 669.
- DUPLA CAMADA ELÉTRICA. Disponível em: [www.chemistry.nmsu.edu/.../double\\_layer.html](http://www.chemistry.nmsu.edu/.../double_layer.html). Acesso em 14 de março 2007.
- DUSSART, P., LABEAU, B., LAGATHU, G., LOUIS, P., NUNES, M.R., RODRIGUES, S.G., STORCK- HERRMANN, C., CESAIRE, R., MORVAN, J., FLAMAND, M., BARIL, L. *Clin. Vaccine Immunol.* 2006, 13, 1185.
- EDELMAN, R. *Clin. Infect. Dis.* 2007, 45 (1) S56.
- EGGINS, B.R. *Biosensors: An Introduction*. John Wiley & Sons, England, 1996.
- EISENSCHITZ, E., LONDON, F. *Zs. Phys.* 1930, 60, 491.
- ETZLER, M.E. *Ann. Rev. Plant Phys.* 1985, 36, 209.
- EVANS, S.A.G., ELLOIT, J.M., ANDREWS, L.M., BARLETT, P.N., DOYLE, P.J., DENUAULT. G. *Anal. Chem.* 2002. 74. 1322.
- FALCONAR, A.K. *Arch. Virol.* 1997, 142, 897.
- FERNANDES, J.C.B., KUBOTA, L.T., OLIVEIRA NETO, G. *Anal. Chim. Acta* 1999, 385, 3.
- FEY, G.T.K., WENG, Z.X., CHEN, J.G., KUMAR, T.P. *MATER. Chem. Phys.* 2003, 80, 309.
- FITZGERALD, R.J., SWAISGOOD, H.E., *Arch. Biochem. Biophys.* 1989, 268, 239.
- FREIRE, R.S., PESSOA, C.A., KUBOTA, C.T. *Quim. Nova*, 2003, 26, 381.
- FRENS, G. *Nat. Phys. Sci.* 1973, 241, 20.
- FUKUI, M. BAE/22623, Tese UNICAMP, Apr 1992.
- GABIUS, H.J., ENGELHARDT, R., CRAMER, F., BÄTGE, R., NAGEL, G.A. *Cancerol. Res.*, 1985, 45, 253.
- GAMEZ, A., RICHARD, D., GALLEZOT, P., GLOGUEN, F., FAURE, R., DURAND, R. *Electrochim. Acta* 1996, 41, 307.
- GARCIA, C.A.B., OLIVEIRA NETO, G., KUBOTA, L.T., *Anal. Chim. Acta* 1998, 374, 201.
- GIFFORD, R., KEHOE, J.J., BARNES, S.L., KORNILAYEV, B.A., ALTERMAN, M.A., WILSON, G.S. *Biomater.* 2006, 27, 2587.
- GILARDI, G., FANTUZZI, A. *Trends Biotechnol.* 2001, 19, 468.
- GOLDSTEIN, I.J., MURPHY, L.A., EBISU, S. *Pure & Appl. Chem.*, 1977, 49, 1095.

- GOLE, A., DASH, C., RAMAKRISHNAN, V., SAINKAR, S.R., MANDALE, A.B., RAO, M., SASTRY, M. *Langmuir*, 2001a, 17, 1674.
- GOLE, A., DASH, C., SOMAN, C., SAINKAR, S.R., RAO, M., SASTRY, M. *Bioconjugate Chem.*, 2001b, 12, 684.
- GU, H., CHEN, Z., SA, R., YUAN, S., CHEN, H., DING, Y., YU, A. *Biomaterials* 2004, 25, 3445.
- GUISEPPI-ELIE, A., GHEORGE, M. *Biosen. Bioelectron.*, 2004, 19, 95.
- GUZMAN, M.G., KOURI, G. *Lancet Infect. Dis.* 2002, 2, 33.
- HALSTEAD, S.B. *Science* 1988, 239, 476.
- HALSTEAD, S.B., LAN, N.T., MYINT, T.T. *Emerg Infect Dis* 2002, 12, 1474.
- HEMINGWAY, J., RANSON, H. *Annu. Rev. Entomol.* 2000, 45, 371.
- HOBER, D., POLI, L., ROBLIN, B. *Am. J. Med. Hyg.* 1993, 48, 324.
- HOUA, Y., HELALI, S., ZHANG, A., JAFFREZIC-RENAULT, N., MARTLET, C., MINIC, J., GOROJANKINA, T., PERSUY, M.A., PAJOT-AUGY, E., SALESSE, R., BESSUEILLE, F., SAMITIER, J., ERRACHID, A., AKIMOV, V., REGGIANI, L., PENNETA, C., ALFINITO, E. *Biosen. Bioelectron.* 2006, 21, 1393.
- HOWARD, I., SAGE, H.J., HORTON, C.B. *Arch. Biochem. Biophys.* 1972, 149, 323.
- INBAR, M., SACHS, L. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1969, 63, 1418.
- JACOBS, M.G., ROBINSON, P.J., BLETCHLY, C., MACKENZIE, J.M., YOUNG, P.R. *FASEB J.* 2000, 14, 1603.
- JAMES, B.Y., JING, Y., CHEN, X.D. *J. Food Eng.*, 2003, 60, 431.
- JIA, J., WANG, B., WU, A., CHENG, G., LI, Z., DONG, S. *Anal. Chem.* 2002, 74, 2217.
- JIANG, J., KUCERNAK, A. *J. Electroanal. Chem.* 2002, 520, 64.
- JOHNSON, A.M., SADOWAY, D.R., CIMA, M.J., LANGER, R. *J. Electrochem. Soc.* 2005, 152, 1.
- KANAGARAJA, S., LUNDSTROM, I., NYGREN, H., TENGVALL, P. *Biomaterials* 1996, 17, 2225.
- KARYAKIN, A.A., VULKY, M., LUKACHOVA, L.V., KARYAKINA, E.E., ORLOV, A.V., KARPACHOVA, G.P., WANG, J. *Anal. Chem.*, 1999, 71, 2534.
- KAUFFMANN, J. M. *Ann. Pharm. Fr.* 2002, 60, 28.
- KAWAGISHI, H., WASA, T., MURATA, T., USUI, T., KIMURA, A., CHIBA, S. *Phytochem.*, 1996, 41, 1013.
- KENNEDY, J.F., PAIVA, P.M.G., CORREIA, M.T.S., CAVALCANTI, M.S.M. AND COELHO, L.C.B.B. *Carbohydrate Poly.*, 1995, 26, 219.

- KHAN, M.A., WILLIAMS, R.L., WILLIAMS, D.F. *Biomaterials*, 1996, 17, 2117.
- KOMPELLA, U.B., LEE, V.H.L. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001, 46, 211.
- KOW, C.Y., KOON, L.L., YIN, P.F. *J. Med. Entomol.* 2001, 38 (4), 475.
- KUO, C.H., TAI, D.I., CHANG CHIEN, C.S., LAN, C.K., CHIOU, S.S., LIAW, Y.F. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1992, 47, 265.
- KURANE, I., INNIS, B.L., NIMMANNITYA, S., NISALAK, A., MEAGER, A., ENNIS, F.A. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1993, 48, 222.
- KUROSU, T., CHAICHANA, P., YAMATE, M., ANANTAPREECHA, S., IKUTA, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, 362, 1051.
- LADAM, G., SCHAAF, P., CUISINIER, F.J.G., DECHER, G., VOEGEL, J.C. *Langmuir* 2001, 17, 878.
- LAPPHRA, K., SANGCHARASWICHAI, A., CHOKEPHAIBULKIT, K., TIENGRIM, S., PIRIYAKARNSAKUL, W., CHAKORN, T., YOKSAN, S., WATTANAMONGKOLSIL, L., THAMLIKITKUL, V. *Diag. Infec. Dis.* 2008, 60, 387-391.
- LAUE, T., EMMERICH, P., SCHMITZ, H. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37 (8), 2543.
- LECTINES. Disponível em: <http://webenligne.cermav.cnrs.fr/lectines/>. Acesso em 08 jan. 2007.
- LEE, Y.R., LIU, M.T., LEI, H.Y. *J. Gen. Virol.* 2006, 87, 3623.
- LEI, C.X., HU, S.Q., GAO, N., SHEN, G.L., YU, R.Q. *Bioelectrochem.*, 2004, 65, 33.
- LI, H.L., PERKAS, N., LI, Q.L., GOFER, Y., KOLTYPIN, Y., GEDANKEN, A. *Langmuir*, 2003, 19, 10409.
- LIBRATY, D.H., YOUNG, P.R., PICKERING, D., ENDY, T.P., KALAYANAROOJ, S., GREEN, S., VAUGHN, D.W., NISALAK, A., ENNIS, F.A., ROTHMAN, A.L. *J. Infect. Dis.* 2002, 186, 1165.
- LIENER, I.E. *Annual Review Plant Physiology*, 1976, 27, 291.
- LIENER, I.E. Westport: Food & Nutrition Press, 1981, 143-157.
- LIENER, I.E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I.J. PREFACE IN: I.E.LIENER, N. SHARON AND I.J. GOLDSTEIN (Eds.). Academic Press, Orlando, FL, pp. Xi-vv, 1986.
- LIMA, V.L.M., CORREIA, M.T.S., CECHINEL, Y.M.N., SAMPAIO, C.A.M., OWEN, J.S. AND COELHO, L.C.B.B. *Carbohydrate. Poly.*, 1997, 33, 27.
- LIS, H., SHARON, N. *Ann. Rev. Biochem.* 1973, 42, 541.
- LIS, H., SHARON, N. *Chem. Rev.*, 1998, 98, 637.
- LIU, M., RECHNITZ, G.A., LI, K., LI, Q.X. *Anal. Lett.*, 1998, 31, 2025.
- LIU, S., LEECH, D., JU, H. *Anal. Lett.* 2003, 36,1.
- LOJOU, E., BIANCO, P. *J. Electroceram.* 2006, 16, 79.
- MACDONALD, J.R. *Impedance Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Nova York, 1987.
- MANCINI FILHO, J., LAJOLO, F.M., VIZEU, D.M. *Journal of Food Science*, 1979, 44, 1194.

- MANDAL, D.K., KISHORE, N., BREWER, C.F. *Biochemistry*, 1994, 33, 1149.
- MARSHALL, A.D., MUNRO, P.A., TRAGARDH, G. *J. Memb. Sci.* 2003, 217, 131.
- MARTIN, C.R., MICHER, D.T. *Anal. Chem.*, 1998, 332, 5.
- MARTIN-CABREJAS, M.A., ESTEBAN, R.M., WALDRON, K.W., MAINA, G., GRANT, G., BARDOCZ, S., PUSZTAI, A. *J. Sci. Food Agric.* 1995, 69, 429.
- MOREIRA, R.A., SOUZA-CAVADA, B., OLIVEIRA, J.T.A., AINOUIZ, I.L. *Plants lectins in: Proceeding of the First Brazilian Congress on Proteins. (Oliveira, B. e Sgabieri, S., ed)pp. 71-96 Ed. Unicamp, Campinas, 1991.*
- NAPIER, M.E., LOOMIS, SISTARE, M.F., KIM, J., ECKHARDT, A.E., THORP, H.H. *Bioconjugate chem.* 1997, 8, 906.
- NICOLSON, G.L. *Int. Rev. Cytol.* 1974, 39, 89.
- NORDE, W., LYKLEMA, J. *Colloids Surf.* 1989, 38, 1.
- OKAMOTO, Y., KURANE, I., LEPORATI, A.M., ENNIS, F.A. *J. Gen. Virol.* 1998, 79, 697.
- PATHIRANA, S.T., BARBAREE, J., CHIN, B.A., HARTELL, M.G., NEELY, W.C., VODYANOY, V.
- PEREIRA, A.C., SANTOS, A.S., KUBOTA, L.T. *Quim. Nova*, 2002, 25, 1012.
- PEREZ, A.B., GARCIA, G., SIERRA, B., ALVAREZ, M., VAZQUEZ, S., CABRERA, M.V., RODRIGUEZ, R., ROSARIO, D., MARTINEZ, E., DENNY, T., GUZMAN, M.G. *J. Med. Virol.* 2004, 73, 230.
- PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E.J.M. *Biotechnol. Genetic Engineer. Rev.*, 1998, 15, 199.
- PEUMANS, W. J., VAN DAMME, J.M. *Plant Physiology*, 1995, 109, 347.
- PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J.M. *Trends Food Sci. Technol.* 1996, 7, 132.
- PHADTARE, S., VYAS, S., PALASKAR, D.V., LACHKE, A., SHUKLA, P.G., SIVARAM, S., SASTRY, M. *Biotechnol. Prog.* 2004, 20, 1840.
- PRABU, M.M., SUGUNA K., VIJAYAN, M. *Proteins: Structure. Funct. Genet.*, 1999, 35, 58.
- PRODOMIDIS, M.I., KARAYANNES, M.I. *Electroanalysis*, 2002, 14, 241.
- REN, X., MENG, X., TANG, F. *Sens.Act. B*, 2005, 110, 358.
- RIBEIRO, R.T. *Caracterização impedimétrica da adsorção de Concanalina A sobre eletrodos sólidos. Dissertação de Mestrado, Recife, UFPE, 2005.*
- RICKERT, J., GOPEL, W., BECK, W., JUNG, G., HEIDUSCHKA, P. *Biosen. Bioelectron.* 1996, 11, 757.
- RICO-HESSE, R. *Adv. Virus Res.* 2003, 59, 315.
- ROSCOE, S.G., COSMAN, N.P., FATIH K. J. *Eletroanal. Chem.*, 2005, 574, 261.

- ROY, S., DASGUPTA, A.K. FEBS Letters, 2007, 581, 5533.
- SADIK, O.A., YAN, F. *Analyt. Chim. Acta*, 2007, 588, 292.
- SALGADO, A. M., FOLLY, R. O. M., VALDMAN, B., VALERO, F. *Biotechnol. Tech.*, 1997, 12, 305.
- SALKIND, A.J., SINGH, P., CANNONE, A., ATWATER, T., WANG, X., REISNER, D. J. *Power Sources* 2003, 116, 174.
- SASTRY, M., RAO, M., GANESH, K.N. *Acc. Chem. Res.*, 2002, 35, 847.
- SATO, K. IMOTO, Y. SUGAMA, J. SEKI, S. INOUE, H. ODAGIRI, T. ANZAI. *J. Anal. Sci.* 2004, 20, 1247.
- SATO, K., IMOTO, Y., SUGAMA, J., SEKI, S., INOUE, H., ODAGIRI, T., HOSHI, T., ANZAI, J. *Langmuir* 2005, 21, 797.
- SHARMA, V. AND SUROLIA, A. *J. Molec. Biol.*, 1997, 267, 433.
- SHARON, N. *Trends Biochem. Sci.* 1993, 18, 221.
- SHARON, N., LIS, H. *Science*, 1972, 177, 949.
- SHARON, N., LIS, H. *FASEB J.* 1990, 4, 3198.
- SHARON, N., LIS, H. *Trends Biochem. Sci.* 1987, 12, 448.
- SLUYTERS-REHBECH, M. *Pure Appl. Chem.* 1994, 66, 1931.
- SOTOMAYOR, M.D.P.T., TANAKA, A.A., KUBOTA, T.K. *Anal. Chim. Acta*, 2002, 455,215.
- SOUZA, S.R.; CORREIA, M.T.S.; PESSOA, M.A.M.; KENNEDY, J.F.; LIMA, J.L.; COELHO, L.C.B.B. *Carbohydr. Polym.* 2001, 46, 191.
- SRICHAIKUL, T., NIMMANNITYA, S. *BAILLIERES. Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2000, 13, 261.
- SRINIVAS, V.R., BHANUPRAKASH REDDY, G., CHITTOOR, N.A., SWAMINATHAN, P., MITRA, N. AND SUROLIA, A. *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, 1527, 102.
- STRASAK, L, DVORAK, J., HASON, S., VETTERI, V. *Bioelectrochem.* 2002, 56, 37.
- SU, C.C., WU, T.Z., CHEN, L.K., YANG, H.H., TAI, D.F. *Anal. Chim. Acta* 2003, 479, 117.
- SUGAWARA, K., HIRABAYASHI, G., KAMIYA, N., KURAMITZ, H. *Talanta*, 2006, 68, 1176.
- TAN, L., XIE, Q., YAO, S. *Bioelectroch.*, 2006, 71, 60.
- TANG, D., YUAN, R., CHAI, Y., ZHANG, X., LIU, Y., DAI, J. *Biochem Engineer. J.*, 2004, 22, 43.
- TANG, F.Q., MENG, X.W., CHEN, D., RAN, J.G., DOU, L., ZHENG, C.Q. *Sci. China, Ser. B*, 2000, 43, 268.
- TAVARES, G.A., CARACELLI, I., BURGER, R., CORREIA, M.T.S., COELHO, L.C.B.B., OLIVA, G. *Acta Crystal.*, 1996, 52, 1046.
- TKAC, J., NAVRATIL, M., STURDIK, E., GEMEINER, P. *Enzyme Microb. Technol.* 2001, 28, 383.

- VAN DAME, E.J.M., BARRE, A., ROUGE, P., VAN LEUVEN, F. AND PEUMANS, W.J. Eur. J. Biochem., 1996, 235, 128.
- VE NE, S., MANGIAFICO, J., NICKLASSON, B. Clin. Diagn. Virol. 1995, 4 (1), 43.
- VOLTAMETRIA CÍCLICA. Disponível em: [www.maxwell.lambda.ele.pucRio.br](http://www.maxwell.lambda.ele.pucRio.br). Acesso em 07 de março de 2007.
- WAHID, S.F., SANUSI, S., ZAWAWI, M.M., ALI, R.A. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2000, 31, 259.
- WANG, E. NI, H., XU, R. J. Virol. 2000, 74, 3227.
- WANG, J. Electroanalysis, 2000, 12, 703.
- WANG, J., CAI, X., JANSSEN, M., BALAKRISHMAN, M. Electroanalysis, 1996, 8, 20.
- WANG, Q., LI, N. Talanta 2001, 55, 1219.
- WIGHTMAN, R.M., RUNNELS, P., TROYER, K. Anal. Chim. Acta, 1999, 1, 5.
- WILLNER I., LAPIDOT N., RIKLIN A., KASHER R., ZAHAVY E., KATZ E. J. Am. Chem. Soc. 1994., 116, 1428.
- WINKLER, G., RANDOLPH, V.B., CLEAVES, G.R., RYAN, T.E., STOLLAR, V. Virol. 2008, 162, 187.
- WU, T.Z., SU, C.C., CHEN, L.-K., YANG, H.H., TAIC, D.F., PENG, K.C. Biosens. Bioelectron. 2005, 21, 689.
- WU, Y., JI, X., HU, S. Bioelectroch., 2004, 64, 91.
- XIAO Y., JU H.X., CHEN H.Y. Anal. Biochem. 2000, 278, 22.
- XIAO, Y., JU, H.X., CHEN, H.Y. Anal. Chim. Acta 391, 1999, 73.
- YAMAZAKI, N., KOJIMA, S., BOVIN, N.V., ANDRÉ, S., GABIUS, S. AND GABIUS, H.-J. Adv. Drug Deliv. Rev., 2000, 43, 225.
- YANG, K.D., YEH, W.T., YANG, M.Y., CHEN, R.F., SHAI O, M.F. J. Med. Virol. 2001, 63, 150.
- YEH, W.T., CHEN, R.F., WANG, L., LIU, J.W., SHAI O, M.F., YANG, K.D. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2006, 48, 84.
- YOUNG, P. R., HILDITCH, P. A., BLETCHLY, C., HALLORAN, W. J. Clin. Microbiol. 2000, 38 (3), 1053.
- ZHANG, Y., LUO, S., TANG, Y., YU, L., HOU, K.Y., CHENG, J.P. Anal.Chem. 2006, 78, 2001.
- ZHANG, Y., LUO, S., TANG, Y., YU, L., HOU, K.Y.,CHENG,J.P., ZENG, X., WANG, P.G. Anal. Chem. 2006, 78, 2001.

ZHOU, X., LIU, L., HU, M., WANG, L., HU, J. J. Pharm. Biomed. Anal. 2002, 27, 341.