Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Imobilização de Galectina-1 e Galectina-1 fusionada com *Maltose Binding Protein* (MBP-Gal-1) sobre superfície Eletropolimerizada com [N-(3-Pirrol-1-il-propil)-4,4'-bipiridina] (PPB) para a Construção de um Biossensor de Lactose.

Pâmela Oliveira Martins Gomes

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo, como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutor em Ciências, Área:
Química

RIBEIRÃO PRETO - SP

2018

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Imobilização de Galectina-1 e Galectina-1 fusionada com *Maltose Binding Protein* (MBP-Gal-1) sobre superfície Eletropolimerizada com [N-(3-Pirrol-1-il-propil)-4,4'-bipiridina] (PPB) para a Construção de um Biossensor de Lactose.

Pâmela Oliveira Martins Gomes

Orientador: Prof. Dr. Zeki Naal

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira Martins Gomes, Pâmela

Imobilização de Galectina-1 e Galectina-1 fusionada com *Maltose Binding Protein* (MBP-Gal-1) sobre superfície Eletropolimerizada com [N-(3-Pirrol-1-il-propil)-4,4'-bipiridina] (PPB) para a Construção de um Biossensor de Lactose.

120 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP - Área de concentração: Química.

Orientador: Naal, Zeki.

1. Galectina-1 recombinante. 2. Eletropolimerização. 3. Biossensor de Lectina. 4. Proteína fusionada. 5. Impedância Eletroquímica. 6. SPR.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese as três pessoas que eu mais amo no mundo: meu marido, minha mãe e meu pai. Meu tripé que incansavelmente tem me sustentado nos percalços da vida; estão sempre ao meu lado para dar apoio, sorrisos e conselhos valiosos. Querida mãe, obrigada pela sua infinita paciência em me ouvir por horas no telefone, por me aconselhar e ser a maior referência de sensatez e perseverança que tenho na vida. Pai, saiba que me orgulho muito quando dizem que somos iguaizinhos! Sou tão sortuda por ter herdado sua integridade, seu caráter, sua proatividade e, principalmente, esse jeito nada delicado de ser! Meu Bem, foram nesses cinco anos de doutorado que conheci o verdadeiro significado de companheirismo... Você foi a minha fonte de força pra não desistir, apesar de tudo. Obrigada por ser o melhor marido que eu poderia ter. Amo tanto vocês!

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus por ter cedido a oportunidade de vivenciar essa etapa tão importante da minha vida, o doutorado. As experiências e lições que aprendi, sem dúvidas, me transformaram em uma pessoa melhor.
- À minha família por ser tudo que eu precisava e além. Meus pais, Luiz e Aparecida, meu marido Miquéias. Tudo que faço é para vocês e por vocês. Obrigada por todo amor, carinho e paciência dedicados a mim neste período da minha vida.
- Ao meu tão amado filho Murilo que, mesmo ainda dentro do meu ventre, foi a minha força inabalável e inspiração, pois esteve comigo desde o primeiro dia que iniciei a escrita da tese. Obrigada filho por ter suportado bravamente tantos dias de cansaço e preocupação.
- Ao meu anjinho de quatro patas, meu amorzinho incondicional. Norah. Quando chegava da USP cansada e desanimada, ela me recebia na porta de casa com seu rabinho eufórico me chamando pra brincar e passear. Ela é minha fonte inesgotável de alegria e boas risadas.
- Ao meu orientador Prof. Dr. Zeki Naal, inicialmente por ter aceitado me orientar e principalmente por acreditar no meu potencial. Foram muitos anos de ensinamentos que levarei por toda a minha jornada, tanto profissional quanto pessoal.
- Aos colegas do BLOSSINE, Profa. Dra. Rose Naal, por nos aceitar de braços abertos, nos tratando tão bem por todos esses anos. David, por tantas conversas e ideias para execução dos experimentos. Ana Cláudia, Bianca, Márcia, Letícia, Bruna, Amanda, Jéssica, Gleicy e Raphaela, obrigada pela agradável convivência e apoio no laboratório.
- As técnicas Maria Perpétua e Laila Deliberto que foram extremamente solícitas em todos os momentos de trabalho tanto dentro quanto fora do nosso laboratório. Em especial, a Laila por toda

paciência, apoio, palavras de carinho e conselhos em momentos difíceis da jornada de trabalho.

- Ao Prof. Dr. Marcelo Baruffi que não hesitou em abrir as portas do seu laboratório para mim. A sua generosidade e alegria em lecionar são verdadeiras inspirações na minha vida. Serei eternamente grata pelas oportunidades, ensinamentos e todo conhecimento (sobre produção de proteínas, lectinas, biologia molecular, glicobiologia e muito mais...) comigo compartilhado durante todos esses anos.
- Aos colegas do LABGIM, que assim como o Prof. Marcelo Baruffi, foram receptivos e amáveis comigo. Thalita, Anna Karoline, Flávia, João Francisco, Thais Plepis, Thaís Leitte, Fábio, Elder, Martin e Talícia, obrigada por me ajudarem pacientemente em todos os experimentos realizados. Aos técnicos Rubens e Lilian Cataldi pela dedicação e auxílio sempre que solicitados, em especial à Lilian que atendeu prontamente aos meus pedidos constantes por doações de galectina-1.
- À Thaís Canassa de Leo. O maior presente que o doutorado me deu. A amiga doce, paciente, gentil, inteligente e dedicada que, por uma coincidência feliz, a pós-graduação (e o Prof. Marcelo Baruffi) colocou no meu caminho. Se hoje eu sei um pouquinho sobre produção de proteínas recombinantes, eu devo a ela.
- Aos colegas do laboratório do Prof. Dr. Roberto Santana, pela agradável convivência e por sempre estarem dispostos a ajudar. Alexia, Jacqueline, Loyanne, Ana Gaspari, Laísa, Tássia, Renata, Cássia, Jorge e Fernando. Aos técnicos Juliana Moraes e Clóvis Júnior por todas as vezes que nos socorreram emprestando reagentes ou qualquer outra coisa que precisássemos.
- Aos colegas do laboratório da Profa. Dra. Sofia Nikolaou pelas conversas sobre química e sobre a vida. Camila, Mariete, Natacha, Felipe, Gabriele, Natália, Ricardo e em especial à querida Bruna que se tornou uma amiga fiel, sincera e companheira em muitos momentos importantes.

- Aos colegas do laboratório do Prof. Dr. Flávio Emery por toda ajuda nos experimentos de síntese orgânica e purificação de produtos. Em especial ao técnico Murilo Hélder e a querida Márcia que também foi uma amiga especial que o doutorado trouxe para minha vida.
- Aos colegas do laboratório do Prof. Dr. Marcelo Mulato por todo suporte oferecido durante os experimentos de Impedância Eletroquímica, em especial a Profa. Dra. Marina Batistuti por todo tempo dedicado em explicar e acompanhar a execução de tais ensaios.
- Ao Prof. Dr. João Marcos Madurro por gentilmente me receber (mais uma vez!) em seu laboratório. Em especial a Profa. Dra. Jussara Vieira pela orientação e ajuda na execução dos experimentos de SPR.
- Ao querido amigo de vida Prof. Dr. Leandro Máximo que além de estar presente em grande parte do meu doutorado é meu colega de trabalho e amigo/irmão do meu marido, portanto, da família. Agradeço muito por todo seu apoio, conselhos, conversas e desabafos, mas, principalmente, pelos inúmeros momentos de risadas com seu senso de humor ímpar!
- Ao INCT de Bioanalítica, CAPES e FAPESP pelo suporte financeiro.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Química e à FFCLRP.
- A Faculdade de Ciências Farmacêuticas - FCFRP.
- Ao Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí pela concessão do afastamento para capacitação, pois, sem ele jamais seria possível concluir o doutorado.

*“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar,
divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais
bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua
misterioso diante de meus olhos.”*

Isaac Newton

RESUMO

Imobilização de Galectina-1 e Galectina-1 fusionada com *Maltose Binding Protein* (MBP-Gal-1) sobre superfície Eletropolimerizada com [N-(3-Pirrol-1-il-propil)-4,4'-bipiridina] (PPB) para a Construção de um Biossensor de Lactose.

As galectinas são proteínas que se ligam a β -galactosídeos por meio do domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD *do inglês*, Carbohydrate Recognition Domain) e que participam de vários processos de reconhecimento celular, sinalização, adesão e destinação intracelular de proteínas recém-sintetizadas. A primeira galectina, Galectina-1 (Gal-1), foi identificada em 1976 e possui um papel importante na progressão e proliferação tumoral, angiogênese, resistência a drogas e processos inflamatórios. Assim, é interessante a construção de dispositivos com Galectinas imobilizadas, preservando o CRD para o estudo de mecanismos e/ou detecção destas doenças. Neste trabalho a produção e caracterização de uma proteína recombinante fusionada, a MBP-Gal-1, foi descrita. A proposta do projeto foi pautada na hipótese de que a fusão da MBP à Gal-1 seria uma excelente estratégia para imobilização orientada da proteína de interesse, (Gal-1), sobre eletrodos modificados com filme polimérico, auxiliando na preservação da atividade da biomolécula imobilizada para posterior desenvolvimento de biossensor. A MBP-Gal-1 foi purificada utilizando 2 colunas com resinas diferentes: sepharose/lactose e amilose onde foi possível comprovar a atividade/preservação dos sítios ativos da Gal-1 e MBP, respectivamente. A proteína fusionada teve seu estado oligomérico estimado e seu raio hidrodinâmico determinado pela técnica Espalhamento Dinâmico da Luz sendo que a mesma se encontrava na forma monomérica com raio hidrodinâmico de $4 \text{ nm} \pm 1,26$. A massa molecular de 57,834 kDa para a MBP-Gal-1 foi obtida através da técnica de Espectrometria de Massas MALDI-TOF/TOF. O PPB, material polimérico empregado na modificação dos eletrodos de carbono vítreo e ouro, foi sintetizado e teve sua estrutura confirmada pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear; este material foi utilizado para a realização dos ensaios de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) e Ressonância de Plásmons de Superfície (SPR) para a construção do biossensor. Os ensaios EIE utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com PPB mostraram a importância da imobilização orientada da sonda (MBP-Gal-1) para garantir a preservação da atividade biológica da mesma, uma vez que os resultados relativos ao aumento da Resistência à Transferência de Carga (R_{tc}), após adição do alvo (lactose), foram da ordem de 80% a mais para a proteína fusionada MBP-Gal-1 quando comparados à proteína nativa Gal-1. Os ensaios de SPR revelaram maior $\Delta\theta_{SPR}$ efetiva para a MBP-Gal-1 imobilizada sobre superfície de eletrodo Au-SPR modificado com PPB o qual apresentou bom desempenho na detecção de lactose.

Palavras-chave: Galectina-1 recombinante, Eletropolimerização, Biossensor de Lectina.

ABSTRACT

Immobilization of Galectin-1 and Galectin-1 fused to Maltose Binding Protein onto a [(1-pyrrol-1-yl-propyl) -4,4'-bipyridine] (PPB) Electropolymerized Surface for the Construction of a Lactose Biosensor.

Galectins are proteins that bind to β -galactosides by the Carbohydrate Recognition Domain (CRD) and participate in various processes of cell recognition, signaling, adhesion and intracellular destination of newly synthesized proteins. The first galectin, Galectin-1 (Gal-1), was identified in 1976 and plays an important role in tumor progression and proliferation, angiogenesis, drug resistance and inflammatory processes. Thus, it is interesting to desing devices with immobilized Galectins, preserving its CRD for the study of mechanisms and /or detection of such diseases. In this work the production and characterization of a fused recombinant protein, MBP-Gal-1, has been described. The project goal was based on the hypothesis that the fusion of the MBP to Gal-1 would be an excellent strategy for oriented immobilization of the protein of interest, (Gal-1), onto PPB- modified electrodes, promoting the preservation of the biomolecule activity immobilized for further development of a biosensor. MBP-Gal-1 was purified using 2 columns with different resins: sepharose/lactose and amylose and it was possible to prove the activity/preservation of both CRD's from Gal-1 and MBP, respectively. Dynamic Light Scattering showed that MBP-Gal-1 was in a monomeric form and with a hydrodynamic radius of $4 \text{ nm} \pm 1,26$. The molecular mass of 57.834 kDa for MBP-Gal-1 was obtained by the technique of MALDI-TOF/TOF Mass Spectrometry. The PPB, a polymeric material used in the modification of glassy carbon and gold electrodes, was synthesized and its structure was confirmed by the Nuclear Magnetic Resonance (NMR); this material was used to carry out the Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) and Surface Plasmon Resonance (SPR) tests for the construction of the biosensor. EIS assays using PPB-modified glassy carbon electrode showed the importance of probe-immobilization (MBP-Gal-1) to ensure the preservation of the biological activity of the protein, since the results related to the increase in Resistance of Charge Transfer (R_{ct}), after addition of the target (lactose), were 80% higher for the fused protein MBP-Gal-1 when compared to the Gal-1 native-form protein. The SPR assays revealed a greater effective $\Delta\theta_{SPR}$ for MBP-Gal-1 immobilized onto PPB-modified Au-SPR electrode surface which showed good performance in the detection of lactose.

Keywords: Recombinant Galectin-1, Electropolymerization, Lectin Biosensor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sensor de oxigênio de Clark.	2
Figura 2: Esquema representativo de um biossensor.....	5
Figura 3: Representação esquemática dos principais métodos de imobilização de biomoléculas. E : enzima, P : proteína inerte.....	8
Figura 4: Aspectos da imobilização de anticorpos sobre superfícies de transdutores.....	9
Figura 5: Estrutura do PPB [N-(3-Pirrol-1-il-propil)-4,4'-bipiridina].	12
Figura 6: Esquema representativo do Diagrama de Nyquist e circuito de Randles.	14
Figura 7: (A) Esquema representativo da configuração de Kretschmann para o uso em SPR. O dielétrico em contato com o metal possibilita a transferência ressonante de energia da onda incidente para a OPS; (B) Curvas de refletância na ausência (θ_{SPR1}) e presença (θ_{SPR2}) de espécies na superfície do filme metálico; (C) Sensorgrama esquemático representativo da relação entre o ângulo SPR (θ_{SPR}) e tempo durante a interação de espécies com a superfície do filme metálico.....	17
Figura 8: Diferentes tipos de galectinas encontradas em humanos.	20
Figura 9: Estrutura da Galectina-1 (Gal-1).....	21
Figura 10: Plasmídeo de expressão pMalc2x-Gal-1.....	30
Figura 11: Esquema representativo do procedimento realizado nos ensaios de <i>Western Blot</i>	33
Figura 12: Etapas do procedimento de hemaglutinação e possíveis padrões de resposta obtidos.	34
Figura 13: Identificação de clones recombinantes por digestão enzimática em gel de agarose 1%. MM corresponder ao marcador molecular de DNA (Sinapse 1Kb <i>ladder</i>); C- corresponde ao controle negativo e C+ corresponde ao controle positivo. As <i>lanes</i>	

indicadas de **1** a **26** correspondem aos clones analisados. Em aproximadamente 409 pb está indicado o inserto Lgals-1 clivado do vetor pMALc2x. 41

Figura 14: Análise da expressão e purificação da MBP-Gal-1 em SDS-PAGE 15%. **M** - padrão de massa molecular (Thermo); *Lane 1* - controle negativo (bactéria *E. coli* Rosetta-DE3 sem pMalc2x); *Lane 2* - *E. coli* Rosetta-DE3 transformada com o mesmo plasmídeo após 4 horas de indução com IPTG; *Lane 3* - fração solúvel do lisado bacteriano; *Lane 4* - *flow through*; *Lane 5, 6 e 7* - frações purificadas de MBP-Gal-1. 42

Figura 15: Análise da expressão e purificação da MBP-Gal-1 em SDS-PAGE 15%, **M** é o padrão de massa molecular (Amersham ECL Rainbow - GE Healthcare); *Lane 1* - controle negativo (bactéria *E. coli* Rosetta-DE3); *Lane 2* - fração insolúvel do lisado bacteriano; *Lane 3* - fração solúvel do lisado bacteriano; *Lane 4* - *flow through*; *Lane 5 e 6* - Frações purificadas de MBP-Gal-1. 43

Figura 16: Membrana de nitrocelulose corada com *Ponceau S*, após etapa de transferência..... 45

Figura 17: Identificação da proteína MBP-Gal-1 através da técnica de *Western Blot*... 46

Figura 18: Ensaio de hemaglutinação da MBP-Gal-1 e Gal-1. **PBS** representa a proteína em contato somente com a suspensão de eritrócitos 3% em PBS; **M** (maltose), **L** (lactose) e **S** (sacarose) representam a mesma solução previamente descrita, sendo que cada linha corresponde à inibição promovida por cada um dos açúcares citados, respectivamente. 47

Figura 19: Resultados de DLS para a distribuição do tamanho de partícula por massa para MBP-Gal-1. 48

Figura 20: Espectro de Massas MALDI-TOF/TOF para MBP-Gal-1..... 49

Figura 21: Voltamograma cíclico em ACN/0,1 mol L⁻¹ TBAH contendo 2 mmol L⁻¹ de PPB, na velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹ para eletrodo de trabalho de carbono vítreo..... 51

Figura 22: (A) Voltamogramas cíclicos consecutivos, velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹, representando a eletropolimerização para um eletrodo de carbono vítreo em solução de ACN/0,1 mol L⁻¹ TBAH contendo 2 mmol L⁻¹ de PPB e (B) Voltamogramas

cíclicos em PBS (pH 7,4) nas velocidades de varredura de 20, 40, 60, 80 e 100 mV s ⁻¹ para um eletrodo de carbono vítreo modificado com filme eletropolimerizado de PPB.	52
Figura 23: Voltamograma cíclico em solução de H ₂ SO _{4(aq)} 0,5 mol L ⁻¹ na velocidade de varredura de 100 mV s ⁻¹ para eletrodo de trabalho de ouro.	54
Figura 24: Voltamogramas cíclicos em PBS (pH 7,4) na velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹ onde (a) corresponde ao eletrodo de ouro não modificado e (b) ao eletrodo de ouro modificado com Gal-1 60 µg mL ⁻¹	55
Figura 25: Redução do enxofre da ligação Au-S na superfície do eletrodo de ouro modificado com Gal-1, 60 µg mL ⁻¹ ; 5 ciclos; Velocidade de varredura: 10 mV s ⁻¹	56
Figura 26: Voltamogramas cíclicos em PBS (pH 7,4) na velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹ onde (a) corresponde ao eletrodo de ouro não modificado e (b) ao eletrodo de ouro modificado com MBP-Gal-1 60 µg mL ⁻¹	57
Figura 27: Redução do enxofre da ligação Au-S na superfície do eletrodo de ouro modificado com MBP-Gal-1 60 µg mL ⁻¹ ; 5 ciclos; Velocidade de varredura: 10 mV s ⁻¹	58
Figura 28: Respostas de variação de frequência vs tempo plotadas para eletrodos de ouro em contato com (a) MBP-Gal-1 50 µg mL ⁻¹ e (b) Gal-1 50 µg mL ⁻¹ em PBS (pH 7,4), 25°C.....	59
Figura 29: Diagramas de Nyquist obtidos para os diferentes tempos de interação da MBP-Gal-1 (10 µmol L ⁻¹) com filme polimérico de PPB. Amplitude de 10 mV na faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz.....	61
Figura 30: Diagramas de Nyquist obtidos para eletrodo de carbono vítreo modificado com PPB interação com (A) MBP-Gal-1 e (B) Gal-1 (10 µmol L ⁻¹) e sucessivas interações com diferentes concentrações de lactose. Amplitude de 10 mV na faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz.	63
Figura 31: Circuito elétrico equivalente obtido através do <i>fitting</i> dos dados de impedância onde, EFC é o Elemento de Fase Constante, Rs é a Resistência da solução, Rtc é a Resistência à transferência de carga, W é a impedância de Warburg.....	65

Figura 32: Relação entre aumento de R_{tc} e concentração de lactose obtidas para interação com MBP-Gal-1 e Gal-1.....	67
Figura 33: Diagramas de Nyquist obtidos para eletrodo modificado com PPB após interação com (A) MBP-Gal-1 e (B) Gal-1 ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e sucessivas interações com diferentes concentrações de maltose. Amplitude de 10 mV na faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz.	68
Figura 34: Relação entre aumento de R_{tc} e concentração de maltose obtidas para interação com MBP-Gal-1 e Gal-1.....	70
Figura 35: Diagramas de Nyquist obtidos para eletrodo de ouro polido após interação com (A) MBP-Gal-1 e (B) Gal-1 ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e sucessivas interações com diferentes concentrações de lactose. Amplitude de 10 mV na faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz.	72
Figura 36: Sensorgramas relacionando as respostas obtidas para a adição de diferentes concentrações da MBP-Gal-1 sobre PPB. A seta preta indica a adição da proteína e a seta cinza a etapa de lavagem com PBS pH 7,4.....	74
Figura 37: Sensorgramas da imobilização das proteínas fusionada e não fusionada ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) sobre eletrodo Au-SPR limpo e modificado com PPB. A seta preta indica a adição da proteína e a seta cinza a etapa de lavagem com PBS pH 7,4.....	76
Figura 38: Curvas de refletância obtidas sobre sonda ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) após lavagem com PBS (curva em preto) e após interação com lactose ($15 \mu\text{mol L}^{-1}$) e lavagem com PBS (curva em vermelho). Em (A) para Gal-1 e (B) para MBP-Gal-1.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais categorias de transdução do sinal físico-químico do biossensor.	4
Tabela 2: Parâmetros de termociclagem para amplificação do gene Lgals-1.	27
Tabela 3: Valores de R_{tc} e % R_{tc} obtidos para a interação com diferentes concentrações de lactose com as proteínas MBP-Gal-1 e Gal-1.....	66
Tabela 4: Valores de R_{tc} e % R_{tc} obtidos para a interação com diferentes concentrações de maltose com as proteínas MBP-Gal-1 e Gal-1.	69
Tabela 5: Dados de cobertura relacionados às diferentes concentrações de MBP-Gal-1 imobilizadas sobre eletrodo Au-SPR modificado com PPB.	75
Tabela 6: Valores de $\Delta\theta_{SPR}$ obtidos para diferentes concentrações de lactose interagindo com MBP-Gal-1 $10 \mu\text{mol L}^{-1}$	77

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C: graus Celsius

µg: micrograma

µL: microlitro

µm: micrometro

µmol: micromol

Å: Angstrom

ACN: Acetonitrila

Ag/AgCl: Prata/cloreto de prata

Au-S: Ligação Ouro-Enxofre

BSA: Albumina de Soro Bovino

CaCl₂: Cloreto de Cálcio

Cdl: Capacitância da dupla camada elétrica

cm: centímetro

CRD: Do inglês, *Carbohydrate Recognition Domain*/Domínio de Reconhecimento de Carboidratos

D.O._{600nm}: Densidade óptica em comprimento de onda de 600 nm

DLS: Do inglês, *Dynamic Light Scattering*/Espalhamento Dinâmico da Luz

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

DNase: Desoxirribonuclease

dNTP: Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DTT: Ditioneitol

E. coli: *Escherichia coli*

E: Potencial

E°: Potencial padrão

EIE: Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

f: Frequência

Gal-1: Galectina-1

GBP: Do inglês, *Glycan Binding Protein*/Proteína de Ligação de Glicanos

GLAD: Do inglês, *Glancing Angle Deposition*

h: hora

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄: Ácido sulfúrico

Hz: Hertz

IPTG: Isopropil-tio-β-D-galactopiranosídeo

ITO: Óxido de índio-estanho

J: Constante de acoplamento

KCl: Cloreto de potássio

K_d: Constante de dissociação

kDa: kilodalton

KH₂PO₄: Dihidrogenofosfato de potássio

kV: kilovolt

L. infantum: Leishmaniose *infantum*

L: Litro

LB: Luria Bertani (meio de cultivo)

Lgals-1: gene codificador da Gal-1 humana

m/z: Razão massa/carga

mA: miliampere

MBP: Do inglês, *Maltose Binding Protein*/Proteína de Ligação da Maltose

MBP-Gal-1: *Maltose Binding Protein* fusionada à Galectina-1

MBP-nir: *Maltose Binding Protein* fusionada à nitroreductase

MECQ: Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo

mg: miligrama

MgCl₂: Cloreto de magnésio

MgSO₄: Sulfato de magnésio

MHz: Megahertz

mL: mililitro

mm: milímetro

mmol: milimol

MUA: Ácido 11-mercaptoundecanóico

N_{2(g)}: Gás nitrogênio

Na₂HPO₄: Hidrogenofosfato dissódico

NaCl: Cloreto de sódio

NaH: Hidreto de sódio

ng: nanograma

NH₄PF₆: Hexafluorofosfato de amônio

nm: nanômetro

O_{2(g)}: Gás oxigênio

OCP: Do inglês, *Open Circuit Potencial*/Potencial de Circuito Aberto

OPS: Ondas de Plásmons de Superfície

PAMPs: Padrões Moleculares Associados a Patógenos

pb: pares de base

PBP: Do inglês, *Periplasmic-Binding Protein*/Proteína de Ligação Periplásmica

PBS: Do Inglês, *Phosphate Buffered Saline*/Tampão Fosfato-Salino

PCR: Do inglês, *Polymerase Chain Reaction*/Reação em Cadeia da Polimerase

pH: potencial Hidrogeniônico

PPB: [N-(3-Pirrol-1-il-propil)-4,4'-bipiridina)]

q.s.p.: quantidade suficiente para

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

RNase: Ribonuclease

rpm: rotações por minuto

Rs: Resistência da solução

Rtc: Resistência à transferência de carga

s: segundos

SDS-PAGE: Do inglês, *Sodium Dodecil Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*/Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio

SPR: Do inglês, *Surface Plasmon Resonance*/Ressonância de Plásmons de Superfície

TBAH: Heaxafluorofosfato de tetrabutilamônio

THF: Tetrahidrofurano

TLRs: Proteínas receptoras do tipo *Toll*

TMS: Tetrametilsilano

TNT: Trinitrotolueno

U: Unidade

v/v: volume/volume

V: volt

VC: Voltametria Cíclica

VPD: Voltametria de Pulso Diferencial

W: Watt

Z': Impedância real

Z'': Impedância imaginária

Z_w : Impedância de Warburg

ϵ_1 : Constante dielétrica do prisma

ϵ_a : Constante dielétrica do ambiente

ϵ_r : Parte real da constante dielétrica do filme de ouro

θ : Ângulo de incidência da luz

θ_{SRP} : Ângulo de ressonância de plásmons de superfície

κ_{OPS} : Constante da propagação da OPS

κ_x : Vetor de onda

λ : Comprimento de onda

Ω : Ohm

Sumário

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 BIOSSENSORES	1
1.1.1 Aspectos gerais e desenvolvimento histórico	1
1.1.2 Classificação dos biossensores	3
1.1.3 Técnicas de imobilização de biomoléculas em biossensores	5
1.1.4 Biossensores eletroquímicos	9
1.1.5 Eletrodos modificados com polímeros utilizados em biossensores	10
1.1.6 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE): Aspectos teóricos e aplicação no desenvolvimento de biossensores	13
1.1.7 Ressonância de Plásmons de Superfície (SPR): Aspectos teóricos e aplicação no desenvolvimento de biossensores	16
1.2 GALECTINAS	20
1.2.1 Definições, características e importância biológica	20
1.2.2 Biossensores utilizando galectinas	22
1.3 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS	24
2. OBJETIVOS	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA FUSIONADA MBP-GAL-1	27
3.1.1 Clonagem do gene Gal-1	27
3.1.2 Construção do vetor de propagação	28
3.1.3 Preparação e transformação de bactérias competentes	28
3.1.4 Análise de clones recombinantes	29
3.1.5 Construção do vetor pMALc2x-Gal-1	29
3.1.6 Expressão da proteína MBP-Gal-1 recombinante	30
3.1.7 Obtenção e purificação da MBP-Gal-1 recombinante	31
3.1.8 Caracterização por <i>Western Blot</i>	32
3.1.9 Ensaio de hemaglutinação	33
3.1.10 Caracterização por Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS)	34
3.1.11 Caracterização por Espectrometria de Massas MALDI-TOF/TOF	35
3.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO PPB	35
3.2.1 Síntese do precursor do PPB: 1,3-Bromo-propil pirrol	35
3.2.2 Síntese do PPB	36
3.3 TESTES ELETROQUÍMICOS, PIEZELÉTRICOS E ÓPTICOS	37
3.3.1 Medidas de Voltametria Cíclica (VC)	37
3.3.2 Medidas na Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo (EQCM)	37

3.3.3 Medidas de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)	38
3.3.4 Medidas de Ressonância de Plásmons de Superfície (SPR)	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA FUSIONADA MBP-GAL-1	40
4.1.1 Obtenção do vetor de expressão pMALc2x-Gal-1 e análise de recombinantes	40
4.1.2 Expressão e purificação da proteína de fusão MBP-Gal-1	41
4.1.3 <i>Western Blot</i>	44
4.1.4 Atividade hemaglutinante da MBP-Gal-1	46
4.1.5 Determinação do tamanho e massa molecular da MBP-Gal-1	48
4.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO PPB	50
4.2.1 Síntese e caracterização do precursor do PPB: 1,3-Bromo-propil pirrol	50
4.2.2 Síntese e caracterização do PPB	50
4.2.3 Perfil voltamétrico e eletropolimerização do PPB	50
4.3 PROPRIEDADES ELETROQUÍMICAS E PIEZELÉTRICAS DAS PROTEÍNAS MBP-GAL-1 E GAL-1	53
4.3.1 Pré-tratamento do eletrodo de trabalho de ouro	53
4.3.2 Comportamento eletroquímico do eletrodo modificado com Gal-1	54
4.3.3 Comportamento eletroquímico do eletrodo modificado com MBP-Gal-1	56
4.3.4 Medidas na Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo (MECQ) utilizando a MBP-Gal-1 e Gal-1	58
4.4 CONSTRUÇÃO DO BIOSENSOR IMPEDIMÉTRICO	60
4.4.1 Medidas utilizando eletrodo de trabalho de carbono vítreo modificado com filme polimérico de PPB	60
4.4.2 Medidas utilizando eletrodo de trabalho de ouro polido	71
4.5 CONSTRUÇÃO DO BIOSENSOR ÓPTICO	73
4.5.1 Imobilização da MBP-Gal-1 em diferentes concentrações sobre eletrodo Au-SPR modificado com PPB	73
4.5.2 Comparação da imobilização da MBP-Gal-1 e Gal-1 em Au-SPR limpo e modificado com PPB	75
4.5.3 Avaliação da interação lectina-carboidrato em diferentes concentrações	77
5. CONCLUSÕES	80
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
7. MATERIAL SUPLEMENTAR	93

1. INTRODUÇÃO

1.1 BIOSSENSORES

1.1.1 Aspectos gerais e desenvolvimento histórico

Sensor químico é um dispositivo capaz de transformar informações químicas, como a variação da concentração de um componente de amostra específico, em um sinal analiticamente viável (Thévenot et al. 2001). Estes dispositivos contêm, principalmente, dois componentes básicos conectados em série: um sistema de reconhecimento e um transdutor. Portanto, os biossensores são sensores químicos nos quais a sonda é um material de origem biológica, tal como proteínas, anticorpos/antígenos, DNA (Ácido Desoxirribonucleico), células, tecidos, organelas, como agente de reconhecimento interligado a um transdutor que converte o sinal biológico num sinal físico e/ou químico mensurável (Zhang et al. 2015).

O termo **biossensor** foi inicialmente descrito por Clark & Lyons (Clark & Lyons 1962). Neste mesmo ano, o Professor Leland C. Clark Jr apresentou seu trabalho histórico em um simpósio da Academia de Ciências de Nova Iorque onde demonstrou como produzir sensores eletroquímicos (pH, polarográfico, potenciométrico ou condutimétrico) mais inteligentes, incorporando transdutores enzimáticos como membrana tipo “sanduíche” fechadas (Setford & Newman 2005).

Este conceito foi ilustrado por um experimento no qual a glicose oxidase era aprisionada em um eletrodo de oxigênio de Clark (Figura 1) usando uma membrana de diálise. A diminuição da concentração medida de oxigênio era proporcional concentração de glicose. O dispositivo, essencialmente desenvolvido por Clark, foi a base de numerosas variações na configuração inicial onde diferentes enzimas puderam ser imobilizadas e outras análises realizadas.

Os pesquisadores Guilbault e Montalvo foram os primeiros a descrever um eletrodo enzimático potenciométrico. Eles propuseram um sensor de ureia utilizando a urease imobilizada em um eletrodo de membrana líquida seletiva de amônio (Guilbault & Montalvo 1969).

Figura 1: Sensor de oxigênio de Clark.

Fonte: Adaptado de (Setford & Newman 2005)

Os biossensores assumiram nova rota evolutiva em 1975, quando Diviès sugeriu que as bactérias poderiam ser aproveitadas como elemento biológico em "eletrodos microbiológicos" para a quantificação do álcool (Setford & Newman 2005).

Um grande avanço com técnicas *in vivo* aplicadas a biossensores de glicose foi relatado por Shichiri (Shichiri et al. 1982) que descreveu o primeiro eletrodo enzimático de tipo agulha para implantação subcutânea no ano de 1982. Este dispositivo desenvolvido foi adequado para uso em um sistema de controle de glicemia. O pâncreas artificial, incorporando o sensor de glicose do tipo agulha, um computador calculando taxas de infusão de insulina, glucagon e bombas de infusão, foi testado em animais: o dispositivo produziu o controle correto da glicemia por até 7 dias.

Mas foi durante a década de 1980, no entanto, que o sucesso comercial em larga escala dos biossensores foi inicialmente alcançado. Algumas indústrias se lançavam no mercado como promessas de um negócio estável e próspero, mas não alcançaram o sucesso que havia sido previsto e esperado. O problema básico relacionado com o custo de produção dos biossensores de forma mais rápida foi o que os tornou pouco

competitivos comparativamente a outras tecnologias amplamente utilizadas no setor de testes rápidos e robustos (Setford & Newman 2005).

Entretanto, no ano de 1984, um artigo muito citado que relata o uso de ferroceno e seus derivados como um mediador imobilizado para uso com oxidoredutases foi publicado (G Cass et al. 1984). Estes foram componentes cruciais na construção de eletrodos enzimáticos de baixo custo e formou a base para os eletrodos impressos enzimáticos pela MediSense (Cambridge, MA, USA) em 1987 com um medidor de glicemia desenvolvido para monitoramento caseiro.

O grande desenvolvimento no campo dos biossensores alcançado nas últimas décadas despertou um crescente interesse tanto da pesquisa quanto da área comercial (Teles & Fonseca 2008). A fabricação de biossensores, seus materiais, dispositivos de transdução e métodos de imobilização requer pesquisa multidisciplinar principalmente nas áreas de química, biologia e engenharia (Mehrotra 2016).

Desde então, o interesse na construção e desenvolvimento de tais dispositivos analíticos aplicados nas mais diversas áreas do conhecimento tais como biologia sintética (Pu et al. 2017), indústria alimentícia (Van Hecke et al. 2017), engenharia química (Park et al. 2016), meio ambiente (Arduini et al. 2017) e saúde (Chuang et al. 2016) vem ganhando destaque.

O grande diferencial dos biossensores, comparados aos métodos analíticos clássicos, é oferecer uma análise rápida, seletiva, eficiente e sensível com o processamento de dados realizado em menor tempo, podendo variar de minutos a horas. A proposta é desenvolver dispositivos simples e mais baratos com possibilidade de integração, realizando análises em tempo real e, alguns casos, no próprio local da medição.

Para viabilizar o entendimento da estrutura e funcionamento dos biossensores, foram propostas classificações que leva em consideração o tipo de material biológico empregado como sonda e o mecanismo de transdução do evento biológico.

1.1.2 Classificação dos biossensores

Levando-se em consideração a natureza do material biológico a ser imobilizado na superfície do transdutor, os biossensores podem ser subdivididos em duas classes, baseado no tipo de biomolécula de biorreconhecimento (Gooding 2006).

Biossensores catalíticos utilizam enzimas e microorganismos como a molécula de biorreconhecimento a qual catalisa uma reação envolvendo o analito gerando o produto. Os analitos comuns para biossensores catalíticos são pequenas moléculas orgânicas como a glicose, por exemplo.

Já os **biossensores de afinidade** utilizam moléculas de biorreconhecimento tais como anticorpos, DNA, peptídeos e lectinas. Essa classe de biossensores é caracterizada por promover um evento de ligação entre a molécula de biorreconhecimento e o analito (a reação de afinidade), muitas vezes sem ocorrência de nenhuma reação adicional. E o grande desafio se torna a identificação e quantificação da reação de afinidade. Como esta classe de biossensor é compatível com a detecção de praticamente todos os agentes biológicos, os pesquisadores que tentam desenvolver dispositivos para detectar toxinas, micróbios e vírus se deparam com essas questões.

Outra maneira de classificar os biossensores se baseia no tipo de transdução de sinal do evento biológico que será empregado (Tabela 1). A natureza da transdução de sinal está diretamente associada à característica física ou química do produto gerado pelo material biológico imobilizado (D’Orazio 2003).

Tabela 1: Principais categorias de transdução do sinal físico-químico do biossensor.

SISTEMA DE TRANSDUÇÃO	TÉCNICA
Eletroquímico	Amperometria
	Potenciometria
Elétrico	Condutividade
Óptico	Luminescência
	Fluorescência
	Índice de refração
Térmico	Calorimetria
Piezelétrico	Massa

Fonte: (Franco 2009)

De maneira geral, os elementos fundamentais que definem um biossensor (Figura 2) são: o biorreceptor (sonda) que consiste no material biológico - enzimas, proteínas, células, tecidos, microorganismos, DNA, aptâmeros (Mehrotra 2016) - imobilizado adequadamente em uma superfície o qual irá interagir de maneira seletiva com o analito

(alvo); o transdutor que por sua vez capta o evento biológico ocorrido entre a sonda e o alvo gerando um sinal físico/químico mensurável; o amplificador que melhora a aquisição do sinal e, por fim, o sistema eletrônico o qual viabilizará o processamento dos dados.

Figura 2: Esquema representativo de um biossensor.

Fonte: Adaptado de (Long et al. 2013)

Para que um biossensor desempenhe seu papel analítico de maneira confiável e satisfatória é imprescindível que o biorreceptor esteja imobilizado de forma adequada na superfície do transdutor. Portanto, existem algumas técnicas de imobilização que visam à preservação da atividade biológica no material imobilizado (Franco 2009).

1.1.3 Técnicas de imobilização de biomoléculas em biossensores

Promover a imobilização dos componentes de reconhecimento biológico sobre a superfície de transdutores apresenta-se como um fator determinante para o bom funcionamento do biossensor. Por isso, existem inúmeras técnicas relatadas na literatura (Sadat et al. 2018; Sassolas et al. 2012) para que a escolha seja mais adequada às características do sistema em estudo. As modalidades mais utilizadas são adsorção, ligação covalente, ligação cruzada, oclusão e afinidade (Figura 3).

- a) **Adsorção:** É considerado um dos métodos mais simples e utilizados para imobilização de biomoléculas e baseia-se na formação de interações fracas como Forças de Van der Waals, além de interações eletrostáticas e/ou

hidrofóbicas entre analito e superfície do transdutor. A adsorção não envolve nenhuma funcionalização do suporte e geralmente não é destrutiva para o material biológico (Sassolas et al. 2012). Embora este método de imobilização provoque poucos danos (ou nenhum) à atividade biológica do biorreceptor, esta técnica apresenta desvantagens como a fraca interação com suporte e possível dessorção resultante de mudanças na temperatura, pH (Potencial hidrogeniônico) e força iônica. Portanto, plataformas baseadas em imobilização por adsorção sofrem de baixa estabilidade operacional e de armazenamento. Outra desvantagem é a adsorção não específica de outras proteínas ou substâncias.

- b) **Ligação Covalente:** Esta técnica consiste em ligar os biorreceptores, através de grupos funcionais do mesmo os quais não são essenciais à atividade biológica (Franco 2009) a um suporte normalmente funcionalizado que pode ser um material inorgânico, um polímero natural ou sintético (Sassolas et al. 2012). Portanto, a imobilização covalente pode ser realizada diretamente na superfície do transdutor ou em uma membrana fina fixada no mesmo. Apresenta uma boa vantagem de o material biológico não se desprender da superfície com facilidade, entretanto, dispõe de uma maior atenção para preservar a atividade biológica do mesmo.
- c) **Ligação Cruzada:** Nesta técnica o biorreceptor se liga a um componente bifuncional (glutaraldeído, glioxal ou hexametenodiamina) através de ligações covalentes intermoleculares (Chaubey et al. 2000). De maneira geral, os reagentes empregados nesta técnica apresentam grupos terminais reativos específicos para aqueles presentes nas biomoléculas (Franco 2009). A ligação cruzada, do inglês *Crosslinking*, é realizada em condições amenas de temperatura e pH (normalmente fisiológico) no intuito de preservar a atividade do material biológico. O ensaio consiste em mergulhar a superfície do suporte na solução que contém o agente bifuncional e o biorreceptor de forma que a mesma fique totalmente coberta. Após a formação de uma fina película são realizadas lavagens e secagem da superfície tratada.
- d) **Oclusão:** É baseada no “aprisionamento” do material biológico em uma matriz tridimensional que pode ser formada a partir de um filme eletropolimerizado, uma rede anfifílica composta de polidimetilsiloxano

(PDMS), um fotopolímero, gel de sílica, polissacarídeo ou pasta de carbono (Sassolas et al. 2012). Considerada de fácil execução, nesta metodologia o biorreceptor é preparado juntamente com o produto de modificação da superfície do transdutor, por exemplo, a preparação de filmes poliméricos a partir de soluções contendo a sonda (biomolécula) a qual permanece “aprisionada” na matriz do polímero durante o processo de eletropolimerização (Ying-Sing et al. 2000; Malhotra et al. 2006). Entretanto, algumas limitações como a lixiviação do biocomponente e possíveis barreiras de difusão podem restringir o desempenho desse tipo de sistema.

- e) **Afinidade:** Técnica que surgiu com o interesse de promover uma imobilização orientada de biomoléculas. Esta estratégia consiste em criar ligações de (bio) afinidade entre um suporte ativado (por exemplo, com lectina, avidina, quelatos metálicos) e um grupamento específico (um marcador) da sequência proteica (por exemplo, resíduo de carboidrato, biotina, histidina) (Sassolas et al. 2012). Este método permite controlar a orientação das biomoléculas para evitar a desativação enzimática e/ou o bloqueio do sítio ativo. Diversos métodos de afinidade têm sido descritos para imobilizar enzimas através de interações avidina-biotina, lectina-carboidrato e cátion metálico-quelante. Uma enzima pode conter *tags* de afinidade em sua sequência, mas, em alguns casos, o *tag* de afinidade precisa ser anexado a sequência proteica utilizando engenharia genética, como, tecnologia de fusão de proteínas e modificação pós-transcricional (Andreescu & Marty 2006; Naal et al. 2002).

Figura 3: Representação esquemática dos principais métodos de imobilização de biomoléculas. **E**: enzima, **P**: proteína inerte.

Fonte: Adaptado de (Sassolas et al. 2012)

A escolha da técnica de imobilização mais adequada para o sistema em estudo permite projetar um biossensor mais sensível e estável; levando-se em consideração a natureza do material biológico, do transdutor, do modo de detecção que será empregado, a simplicidade, o custo, o tempo de processamento e reprodutibilidade do processo de imobilização. Seja qual for a técnica, é fundamental que o biorreceptor retenha sua atividade biológica após a imobilização, não sendo dessorvido durante a utilização do biossensor. A sensibilidade (limite de detecção) e a seletividade dos biossensores estão diretamente relacionadas à acessibilidade e atividade da sonda imobilizada. Portanto, é imprescindível promover uma imobilização orientada (Al-Lolage et al. 2017) da biomolécula no sentido de garantir a eficácia do biossensor (Figura 4).

Figura 4: Aspectos da imobilização de anticorpos sobre superfícies de transdutores.

Fonte: Adaptado de (Mauriz et al. 2016)

A imobilização do componente biológico pode ocorrer de forma randômica ou orientada, no sentido de obter a máxima funcionalidade do biossensor. De maneira geral, o processo de imobilização aleatória consegue atingir maiores coberturas superficiais, enquanto as estratégias baseadas na orientação do material biológico fornecem melhores sensibilidades para a detecção do analito (Mauriz et al. 2016). A orientação randômica de biomoléculas pode ser afetada por impedimento estérico e adsorção não específica, resultando em inativação da sonda e menor capacidade de ligação ao alvo.

1.1.4 Biossensores eletroquímicos

Um biossensor eletroquímico é um dispositivo integrado, capaz de fornecer informações analíticas quantitativas ou semiquantitativas específicas usando um elemento de reconhecimento biológico (biorreceptor) o qual é imobilizado em contato espacial direto com um elemento de transdução eletroquímica (Thévenot et al. 2001).

O modelo de transdução eletroquímica é o mais comum dentro da classe de biossensores devido à sua boa sensibilidade de instrumentação, larga faixa de detecção, capacidade de monitoramento em tempo real, facilidade de fabricação e controle, reprodutibilidade e baixo custo (Zhang et al. 2015; Rubab et al. 2018). As técnicas eletroquímicas mais utilizadas em biossensores são: Amperometria, Potenciometria, Voltametria Cíclica (VC), Voltametria de Pulso Diferencial (VPD), Voltametria de Onda Quadrada e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE).

Existem várias metodologias utilizadas para modificar a superfície do transdutor eletroquímico, visando a maior eficácia do biossensor; o uso de nanomateriais (Izyumskaya et al. 2017), polímeros condutores (Jain et al. 2017), grafeno (Park et al. 2016), aptâmeros (Pfeiffer & Mayer 2016), membranas condutoras (Noah et al. 2012) nanotubos de carbono (Zhu 2017) têm sido frequentemente relatados na literatura. Esses tipos de nanomateriais são relativamente acessíveis e vêm se tornando populares em vários aspectos relacionados ao sistema de detecção em biossensores eletroquímicos, principalmente no que se diz respeito à fabricação e modificação (recobrimento) de eletrodos (Huang et al. 2017).

Atualmente, existe uma grande demanda por sistemas analíticos rápidos, confiáveis e de baixo custo para a detecção e quantificação de biomoléculas de relevância para diferentes análises. Neste contexto, o biossensor eletroquímico é considerado uma estratégia adequada para este propósito, devido à sua alta sensibilidade, simplicidade do procedimento operacional, possibilidade de miniaturização, aquisição de equipamento financeiramente viável (quando comparado aos equipamentos utilizados em métodos analíticos clássicos) além da possibilidade da realização de análises em campo (Yáñez-Sedeño et al. 2017).

1.1.5 Eletrodos modificados com polímeros utilizados em biossensores

O transdutor normalmente utilizado para a construção de biossensores eletroquímicos é um eletrodo. Existe uma infinidade de materiais que podem ser utilizados na fabricação de eletrodos dentre eles metais como ouro, platina e prata (Carvalho et al. 2005), óxidos metálicos (Kotzian et al. 2007), óxido de índio dopado com estanho (ITO) (Liu et al. 2018), carbono vítreo (Rad et al. 2012), pasta de carbono (Oliveira et al. 2013), grafeno (Fartas et al. 2017) entre outros.

De acordo com as características do sistema em estudo, como a natureza do componente biológico e o sistema de transdução, os eletrodos podem ser utilizados com ou sem modificação, sendo que o uso de polímeros para promover tal modificação é frequentemente aplicado no desenvolvimento de biossensores (Inzelt 2017).

Promover a modificação da superfície de um transdutor eletroquímico com polímeros pode ocorrer através da formação monocamadas de espécies ativas (Franco 2009). Em geral, os polímeros utilizados nestas medidas apresentam sítios quimicamente e/ou eletroquimicamente ativos gerando respostas eletroquímicas maiores à medida que mais camadas vão sendo depositadas na superfície do eletrodo. Existem vários métodos empregados na preparação de eletrodos recobertos com filmes poliméricos: cobertura por banho, evaporação, cobertura por rotação, deposição oxidativa e eletropolimerização.

A eletropolimerização consiste em promover a formação de um material polimérico condutor na superfície do eletrodo através da oxidação eletroquímica do monômero (normalmente compostos orgânicos aromáticos) em um potencial adequado para a espécie em questão, dando origem a cátions radicais. Estes cátions radicais são adsorvidos na superfície do eletrodo e subsequentemente sofrem uma grande variedade de reações que conduzem à formação da rede polimérica. É válido salientar que as propriedades dos polímeros formados, tais como morfologia, espessura do filme e proteção contra corrosão, dependem fortemente das condições nas quais foram sintetizados (Tkach et al. 2015).

Neste contexto, a eletropolimerização de compostos monoméricos substituídos é capaz de proporcionar ao eletrodo propriedades elétricas e analíticas muito interessantes; desta forma, promover a modificação polimérica do eletrodo permanece um procedimento conveniente e simples para melhorar o desempenho de eletrodos apresentando uma infinidade de aplicações (Fungaro & Brett 2000).

Muitos compostos modificadores foram relatados durante as últimas décadas para melhorar o desempenho de biossensores eletroquímicos. Dentre eles, dois grupos principais merecem atenção especial: polímeros que agem como portadores de receptores bioquímicos na etapa de imobilização e também protegem mecanicamente a camada bioquímica da deterioração, e mediadores redox que diminuem o potencial de trabalho e amplificam a corrente correspondem à oxidação (raramente redução) de uma espécie alvo (Evtugyn et al. 2015).

O uso de polímeros redox para a construção de eletrodos modificados por enzimas tem sido relatado (Takada et al. 2003) uma vez que estes compostos podem atuar tanto como plataforma de suporte para a enzima quanto como um mediador de transferência de elétrons para transportar elétrons entre a enzima imobilizada e o eletrodo.

Naal e colaboradores (Naal et al. 2002) relataram a construção de um biossensor amperométrico para detecção de TNT (trinitrotolueno) baseado na imobilização orientada da enzima fusionada MBP-Nir (*Maltose Binding Protein* fusionada à nitroredutase) em eletrodo modificado com um filme polimérico de PPB [N-(3-Pirrol-1-il-propil)-4,4'-bipiridina] (Figura 5).

Figura 5: Estrutura do PPB [N-(3-Pirrol-1-il-propil)-4,4'-bipiridina].

Fonte: Autora

Diferentes materiais têm sido empregados para a eletrogeração de polímeros condutores na superfície de eletrodos utilizados na construção de biossensores. Fritea e colaboradores (Fritea et al. 2015) sintetizaram um monômero formado a partir de polipirrol e ciclodextrina usado tanto como um surfactante aquoso para a estabilização de dispersão aquosa de óxido de grafeno reduzido (OGR) quanto como uma unidade eletropolimerizável para gerar um eletrodo composto de OGR-polipirrol. Este nanocompósito foi usado em combinação com o derivado anfifílico de pirrol para a imobilização de tirosinase, uma enzima que catalisa a oxidação de fenóis e difenóis. Em comparação com os eletrodos de carbono vítreo, esses eletrodos nanoestruturados exibem propriedades eletroquímicas aprimoradas e alcançaram excelentes desempenhos para a detecção de catecol e dopamina.

1.1.6 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE): Aspectos teóricos e aplicação no desenvolvimento de biossensores

Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) é uma técnica amplamente utilizada na caracterização do comportamento elétrico de materiais sólidos ou líquidos (iônicos, semicondutores, dielétricos) e dispositivos eletrônicos (Chinaglia & Gozzi 2008). A EIE também é utilizada como ferramenta para estudar mecanismos em eletrodeposição, eletrodissolução, passividade, corrosão, difusão de íons através de membranas, estudos de interface de semicondutores e biossensores, fornecendo informações importantes relativas às características eletroquímicas de um sistema, como capacitância da dupla camada, resistência de transferência de carga, impedância de difusão e resistência da solução (Franco 2009). É uma técnica poderosa, sensível e não destrutiva muito utilizada para investigação das propriedades elétricas da superfície de eletrodos modificados, aplicados na construção de biossensores.

De uma maneira geral, a medida consiste em colocar a amostra do material sob investigação, aplicar um estímulo elétrico e observar a resposta resultante. O estímulo mais comum ou o procedimento padrão é utilizar uma tensão alternada do tipo senoidal, e medir as partes real e imaginária da impedância complexa em função da frequência. Os equipamentos comerciais disponíveis oferecem medições automáticas realizadas na faixa de frequência que vai de 10 μHz até 32 MHz (Chinaglia & Gozzi 2008).

Nestes estudos utilizou-se a impedância eletroquímica em potencial constante, onde a perturbação do sistema é feita mediante a aplicação de um potencial fixo (OCP), do inglês *Open Circuit Potential* ou Potencial de Circuito Aberto, no qual a perturbação do material depositado na superfície do eletrodo de trabalho é mínima e possibilita que o sistema seja perturbado empregando poucos milivolts, de forma a tornar possível a investigação de fenômenos eletroquímicos próximos ao estado de equilíbrio, se $E = E_{\text{ocp}}$.

Os resultados de impedância podem ser apresentados em diversas formas. Neste contexto, o denominado, diagrama de Nyquist (Figura 6) que representa graficamente Z' (componente real da impedância) vs Z'' (componente imaginário da impedância) é comumente utilizado e demonstra grande importância para a interpretação de dados provenientes da EIS (Barsoukov, E; MacDonald 2005). Neste caso, as medidas são realizadas variando-se os valores de altas frequências para baixas frequências. Desta

forma, diferentes processos físicos e químicos podem ser separados por suas constantes de tempo.

Figura 6: Esquema representativo do Diagrama de Nyquist e circuito de Randles.

Fonte: Adaptado de (Hong et al. 2015)

O resultado é obtido através de um espectro de impedância apresentando uma porção de semicírculo registrado em altas frequências, o qual corresponde ao processo limitante de transferência eletrônica e uma porção linear obtida a baixas frequências e que está relacionada à etapa limitante de difusão do processo eletroquímico. O diâmetro do semicírculo refere-se à magnitude da resistência à transferência de carga (R_{tc}) da camada a qual mostra seu comportamento isolante para o par redox. Desta forma, a medida do diâmetro pode ser usada para descrever as propriedades de interface do eletrodo, sendo que seu valor crescente caracteriza a imobilização para cada etapa realizada na superfície do eletrodo (Franco 2009). Representados na Figura 6 R_{tc} é a resistência à transferência de carga, a qual é inversamente proporcional à taxa de transferência eletrônica; C_{dl} é a capacitância da dupla camada elétrica; R_s é a resistência total da solução; e Z_w é impedância de Warburg que descreve a difusão linear semi-infinita.

O circuito mais simples e comumente utilizado para um sistema redox com transporte difusional é conhecido como circuito de Randles (Figura 6). Este circuito é normalmente usado para interpretar sistemas eletroquímicos simples e seu equivalente fornece o diagrama do plano complexo também denominado de diagrama de Nyquist no qual é apresentada uma percepção visual dentro da dinâmica do sistema em estudo (Franco 2009).

Artigos relatados na literatura mostram a EIE como uma ferramenta poderosa para a caracterização de superfícies. Sabe-se que um capacitor é formado entre o eletrodo condutor e o eletrólito (Sun 2008). A impedância absoluta é relatada à frequência pela equação (1):

$$|Z''| = \frac{1}{2\pi fC} \quad (1)$$

onde f é a frequência (em Hz) na qual Z'' é medida.

Existem muitos trabalhos relatados na literatura que mostram o desenvolvimento de biossensores impedimétricos, principalmente no que se diz respeito à utilização de nanomateriais e análises sem o uso de marcadores (Tran et al. 2016).

Yang e colaboradores (Yang et al. 2016) desenvolveram um biossensor impedimétrico altamente sensível baseado em lectina para a determinação de *Escherichia coli* (*E. coli*) com base na afinidade da lectina com o complexo glicosil na superfície celular. O biossensor foi fabricado pela co-montagem do ácido 11-mercaptopundecanóico (MUA) e ditiotretol (DTT) na superfície do eletrodo de ouro, sendo que a lectina foi covalentemente imobilizada através da interação via carbodiimida. A estratégia desenvolvida neste trabalho mostrou-se uma abordagem promissora e tem potencial para ser estendida para o desenvolvimento de biossensores impedimétricos aplicados na detecção altamente sensível e rápida de outras bactérias desejadas.

Lin e colaboradores (Lin et al. 2018) descreveram o desenvolvimento de eletrodos de óxido de índio-estanho (ITO) nanoestruturados, imobilizados com proteínas receptoras do tipo *Toll* (TLRs) para uma detecção livre de marcadores de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Eletrodos de ITO nanoestruturados foram fabricados em substratos de vidro revestidos com ITO usando a técnica de GLAD (*Glancing Angle Deposition*) que consiste em fabricar filmes finos porosos com estruturas projetadas. Ao contrário de outros sensores que exploram elementos específicos de reconhecimento de patógenos, os biossensores EIS baseados em TLR têm o potencial de realizar detecção de amplo espectro e classificação de patógenos em tempo quase real.

1.1.7 Ressonância de Plásmons de Superfície (SPR): Aspectos teóricos e aplicação no desenvolvimento de biossensores

SPR do inglês, *Surface Plasmon Resonance* ou Ressonância de Plásmons de Superfície é uma técnica baseada nas propriedades ópticas de um sistema podendo ser empregada para estudos de fenômenos de superfície, através do monitoramento da medida da mudança do índice de refração devido, por exemplo, a ligação de uma camada orgânica à superfície do metal (De Carvalho et al. 2003).

A compreensão da técnica está relacionada ao efeito de ressonância de plasma de superfície que por sua vez, consiste em uma oscilação da densidade de carga longitudinal, ao longo da interface de dois meios com constantes dielétricas de sinais opostos, onde um é metal e outro, um dielétrico. A escolha do metal a ser usado é crucial, uma vez que o metal deve exibir comportamento de elétrons livres. De forma geral, os metais mais adequados são ouro, prata, cobre e alumínio, destes citados, o ouro têm sido o mais empregado.

Para promover a excitação do plasma de superfície dois diferentes sistemas experimentais foram desenvolvidos, um por Otto e outro por Kretschmann, porém os sistemas SPR que operam mediante o emprego da configuração Kretschmann (Figura 7) são os de maior uso, pois geralmente apresentam maior sensibilidade e resolução em relação aos dispositivos que operam por grades de difração (Damos et al. 2004). Nestes sistemas, durante a reflexão interna total ocorre a propagação de uma fração da onda incidente na interface, de forma a penetrar no meio de menor densidade óptica dando origem a um campo eletromagnético evanescente.

Quando uma fonte de luz monocromática (laser, por exemplo) e plano polarizada alcança uma interface que contém dois meios que apresentam constantes dielétricas diferentes, uma parte dessa luz é refletida e a outra parte é refratada. Portanto, o aumento do ângulo de incidência provoca um aumento no ângulo de refração, e quando este alcança 90°, a refração é tangente à interface. Os ângulos acima deste ângulo de refração tangencial são denominados ângulos de reflexão total. Neste momento, a radiação incidente é refletida quase que totalmente e por esse motivo, reflexão interna total (Souto 2012).

Figura 7: (A) Esquema representativo da configuração de Kretschmann para o uso em SPR. O dielétrico em contato com o metal possibilita a transferência ressonante de energia da onda incidente para a OPS; (B) Curvas de refletância na ausência ($\theta_{\text{SPR}1}$) e presença ($\theta_{\text{SPR}2}$) de espécies na superfície do filme metálico; (C) Sensorgrama esquemático representativo da relação entre o ângulo SPR (θ_{SPR}) e tempo durante a interação de espécies com a superfície do filme metálico.

Fonte: (Damos et al. 2004)

As ondas de plásmons de superfície (OPS), também conhecidas como ondas evanescentes, são formadas quando os elétrons livres do filme metálico de ouro oscilam e absorvem energia da radiação incidente dando origem a um campo eletromagnético evanescente e propagando-se paralelamente à interface do metal com o meio dielétrico (Figura 7A); é valido ressaltar que este fenômeno ocorre somente em determinados ângulos de incidência. O fenômeno da ressonância ocorre quando a radiação incidente transfere energia para a OPS onde é detectada uma expressiva atenuação da intensidade de radiação refletida (Figura 7B). Em condições de máximo acoplamento entre a radiação incidente e a OPS, o ângulo de incidência é denominado ângulo de ressonância de plásmons de superfície (θ_{SPR}) ou ângulo de SPR crítico; condições máximas de ressonância da OPS são acompanhadas por um mínimo da reflexão interna total (Figura 7B) (Souto 2012). Portanto, alterações sofridas nas proximidades da interface

metal/ambiente podem gerar uma alteração nas condições de ressonância do sistema, como resultado, ocorre um deslocamento no θ_{SPR} (Figura 7A e 7B).

A expressão que descreve a componente paralela do fóton de luz incidente, que tem o vetor onda k_x relacionado com o ângulo de incidência da luz, está representada na equação (2):

$$k_x = \sqrt{\epsilon_1} \frac{2\pi}{\lambda} \sin \theta_{\text{SPR}} \quad (2)$$

Nesta equação, θ representa o ângulo de incidência da luz com a superfície do metal, λ é o comprimento de onda da luz incidente, e ϵ_1 é a constante dielétrica do prisma. Adicionalmente, como descrito por Homola e Koudela (Homola et al. 1999) a constante de propagação da OPS numa interface metal/dielétrico é expressa pela equação (3):

$$k_{\text{OPS}} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\frac{\epsilon_r \epsilon_a}{\epsilon_r + \epsilon_a}} \quad (3)$$

onde λ é o comprimento de onda da OPS, ϵ_r é a parte real da constante dielétrica do filme de ouro, e ϵ_a é a constante dielétrica do ambiente (espécies que interagem com a superfície). Desta, é possível monitorar o ângulo de ressonância de plásmons de superfície mediante um monitoramento da curva de refletância vs. ângulo de incidência (Figura 7B). Quando a componente paralela do fóton de luz incidente é equivalente à constante de propagação da OPS, ou seja, $k_x = k_{\text{OPS}}$ (Equações 2 e 3) ocorrerá a transferência ressonante de energia da onda incidente para a OPS, ocorrendo a queda acentuada na refletância, como pode ser verificado através das equações (4) e (5).

$$\sqrt{\epsilon_1} \frac{2\pi}{\lambda} \sin \theta_{\text{SPR}} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\frac{\epsilon_r \epsilon_a}{\epsilon_r + \epsilon_a}} \quad (4)$$

$$\theta_{SPR} = \arcsin \sqrt{\frac{\epsilon_r \epsilon_a}{\epsilon_r + \epsilon_a} + \frac{1}{\epsilon_1}} \quad (5)$$

A equação 4 demonstra que as propriedades ópticas do sistema, como as constantes dielétricas do metal, do prisma e da matriz, provocam mudanças no ângulo de ressonância, tornando possível aplicar o fenômeno de SPR ao monitoramento de alterações na superfície do sensor, mediante um acompanhamento do ângulo de ressonância com o tempo (Figura 7C).

A técnica de SPR é capaz de realizar análises por interação bioespecífica em tempo real, sem o uso de marcadores, fornecendo inúmeras informações a cerca das propriedades de biomoléculas, tais como concentração, modelos de interação, afinidade intermolecular e constantes cinéticas. Através da análise de parâmetros como índice de refração, constante dielétrica e refletância, por exemplo, é possível obter informações acerca de espessura de camadas, distância média entre moléculas, adsorção específica e não específica, constantes de velocidade de associação, dissociação e equilíbrio, entre outros (Damos et al. 2004).

Souto e colaboradores (Souto et al. 2013) desenvolveram um imunossensor de ressonância plasmônica de superfície utilizando um eletrodo de ouro SPR modificado com ácido 11-mercaptoundecanóico (11-MUA) para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania infantum*. Os antígenos solúveis de *L. infantum* foram imobilizados no eletrodo de ouro SPR utilizando uma monocamada automontada 11-MUA. Após a construção do imunossensor, o soro canino positivo para leishmaniose visceral foi adicionado à sua superfície e apresentou variação significativa no ângulo da SPR, indicando excelente sensibilidade da técnica para detecção da interação antígeno-anticorpo.

Inúmeros trabalhos utilizando a técnica de SPR no desenvolvimento de biossensores têm sido relatados na literatura (Naraprawatphong et al. 2018; Vornholt et al. 2007; Mauriz et al. 2016; Campo et al. 2016) devido ao grande interesse em análises rápidas, sensíveis, sem o uso de marcadores e possibilidade de obtenção de dados em tempo real.

1.2 GALECTINAS

1.2.1 Definições, características e importância biológica

Galectinas são conhecidas como GBP, do inglês *Glycan Binding Proteins* ou Proteínas de Ligação de Glicanos, as quais desenvolvem papéis biológicos muito importantes no organismo que vão desde atividades imunoregulatórias até morte microbiana (Sean R. Stowell; Richard D. 2016).

A família das galectinas é filogeneticamente conservada e composta por 15 membros sendo que 11 deles são encontrados em humanos, as massas moleculares variam de 14 a 39 kDa (Leffler et al. 2004). Elas são classificadas em três grupos distintos, de acordo com a sua estrutura quaternária: quimérica, protótipo e *tandem repeat* (Figura 8). As galectinas se ligam a β -galactosídeos por meio de seu CRD, do inglês, *Carbohydrate Recognition Domain* ou Domínio de Reconhecimento de Carboidratos, um elemento comum de aproximadamente 130 aminoácidos altamente conservados (Cooper & Barondes 1999). Essas proteínas participam de vários processos de reconhecimento celular, sinalização, adesão e destinação intracelular de proteínas recém-sintetizadas.

Figura 8: Diferentes tipos de galectinas encontradas em humanos.

Fonte: Adaptado de (Sean R. Stowell & Richard D. Cummings 2015)

A primeira galectina, denominada Galectina-1 (Gal-1), foi identificada em 1976 e isolada do músculo de *Gallus gallus* (Varki et al. 2009). O papel da Gal-1 na progressão e proliferação tumoral, angiogênese, resistência a drogas e mascaramento contra o reconhecimento pelo sistema imune tem sido amplamente estudada (Bojarova & Kren 2016).

O dobramento completo da Gal-1 descreve um β “sanduíche” o qual consiste em duas folhas β anti-paralelas (Figura 9). Esta topologia do CRD é tipicamente encontrada nas galectinas. A Gal-1 humana, em solução, se apresenta na forma de dímero. A integridade deste dímero é mantida principalmente por interações entre os monômeros na interface e através do núcleo hidrofóbico bem conservado, um dos fatores que explica a estabilidade observada desse dímero em termos moleculares. No entanto, uma das principais características da proteína Gal-1 homodimérica é que ela se dissocia espontaneamente em baixas concentrações ($K_d \sim 7 \mu\text{mol L}^{-1}$) em uma forma monomérica que ainda é capaz de se ligar a carboidratos (Camby et al. 2006).

Figura 9: Estrutura da Galectina-1 (Gal-1).

Fonte: Adaptado de (Camby et al. 2006)

As galectinas, de maneira geral, são consideradas proteínas multifuncionais as quais estão envolvidas em muitos processos celulares e atuam tanto intracelular como extracelularmente na maioria dos tecidos. Em uma célula, as galectinas são sintetizadas no citoplasma e transportadas para o núcleo, possivelmente através de transporte ativo e

difusão passiva, ou podem ser segregadas através de uma via não clássica. Estas proteínas têm sido associadas a diferentes eventos celulares na inflamação e câncer, incluindo transformação celular, apoptose, adesão e migração celular (Aggarwal et al. 2015).

As galectinas 1 e 3 são constantemente investigadas devido ao seu papel intrigante no desenvolvimento do câncer (Aggarwal et al. 2015). Portanto, os pesquisadores têm se esforçado para desenvolver dispositivos com potencial terapêutico e com possível aplicação para desvendar ainda mais os papéis biológicos dessas biomoléculas.

1.2.2 Biossensores utilizando galectinas

Atualmente, existe uma grande quantidade de trabalhos científicos que relatam o uso de galectinas nos estudos relacionados ao câncer, por exemplo. Shen e colaboradores (Shen et al. 2016) investigaram em seu trabalho a importância da galectina-1 no câncer de bexiga. Os autores destacaram que a galectina-1 é altamente expressa em vários tumores e participa de vários processos oncogênicos. No entanto, descrições detalhadas da função da galectina-1 no carcinoma urotelial da bexiga ainda não tinham sido relatadas. Os resultados demonstraram que a galectina-1 está associada à invasividade do tumor e é um possível marcador prognóstico independente do carcinoma urotelial da bexiga. Portanto, os pesquisadores tiveram como objetivo esclarecer a relevância do nível de expressão da galectina-1 para a progressão e invasão tumoral, a fim de decifrar um mecanismo para a contribuição da galectina-1 para o comportamento maligno do carcinoma urotelial da bexiga.

A busca por dispositivos eficientes, de fácil manuseio e que geram resultados precisos impulsionou o desenvolvimento de biossensores aplicados na área da saúde.

Tang e colaboradores (Tang et al. 2018) desenvolveram um imunossensor eletroquímico utilizando como suporte nanocompósitos de AuPt-Azul de metileno, relativamente simples, aplicado para a determinação de galectina-3. A literatura relata que níveis elevados de galectina-3 estão significativamente associados a um maior risco de morte, tanto na insuficiência cardíaca aguda descompensada como na população com insuficiência cardíaca crônica, portanto, monitorar as alterações do Gal-3 no soro é notavelmente importante para prever a progressão do risco cardiovascular.

Chuang e colaboradores (Chuang et al. 2016) desenvolveram um imunossensor impedimétrico ultrasensível fabricado para a detecção quantitativa Galectina-1 (Gal-1), considerada um biomarcador para o surgimento de múltiplas condições oncológicas, especialmente câncer de bexiga. O chip era baseado em um arranjo de microeletrodos interdigitados de ouro com a capacidade de endereçar eletricamente cada eletrodo individualmente. Para melhorar a sensibilidade e a eficiência de imobilização, foram utilizadas nanossondas (anticorpos Gal-1 conjugados a nanopartículas de alumina através de modificação de silano) as quais foram aprisionados na superfície do microeletrodo.

Neste contexto, o uso de biossensores se torna necessário como uma ferramenta analítica para identificar e quantificar um sinal detectável após interação com o alvo. Em geral, eles atuam na medição da cinética das interações carboidrato-lectina para determinar a especificidade de ligação (Bojarova & Kren 2016). Os carboidratos estão envolvidos em muitos processos biológicos essenciais na natureza, como sinalização celular, inflamação e comunicação célula-célula. Suas interações onipresentes com lectinas em doenças infecciosas podem representar novas oportunidades na área de biossensores e *design* de medicamentos (Richards et al. 2016). A investigação dos mecanismos de interação da Gal-1 com diferentes alvos é essencial para garantir que o CRD seja preservado, uma vez que a atividade lectínica dessa proteína é altamente dependente dessa região.

Há um grande interesse em novos métodos para imobilização de biomoléculas, como proteínas, permitindo máxima retenção de atividade, bem como a aceleração da cinética interfacial (Naal et al. 2002).

A engenharia genética tem sido amplamente empregada no desenvolvimento de biossensores. Estas tecnologias podem ser utilizadas para introduzir grupos funcionais em moléculas biológicas dando origem aos sensores baseados em proteínas quiméricas para a ligação de alvos. Tais dispositivos podem simplificar de maneira eficiente a detecção de compostos potencialmente importantes com afinidade específica para determinados alvos proteicos e permitir a imobilização orientada de uma proteína em uma superfície modificada quimicamente (Naal et al. 2002; Skretas et al. 2007).

A proteína de ligação a maltose (MBP), do inglês *Maltose Binding Protein*, apresenta massa molecular de 42 kDa e é frequentemente fusionada a outras proteínas para melhorar seu rendimento, facilitando sua purificação e aumentando sua estabilidade e solubilidade. A MBP causa efeitos mínimos na bioatividade das proteínas

fusionadas, por isso tem sido amplamente utilizada para a purificação de proteínas recombinantes (Bellot et al. 2013). A MBP é um membro da superfamília das Proteínas de Ligação Periplásmica, PBP do inglês *Periplasmic-Binding Protein*, que tem sido amplamente utilizada em plataformas de biossensores. Os membros da PBP podem reconhecer uma infinidade de analitos em concentrações muito baixas com alta especificidade (Medintz & Deschamps 2006).

Trabalhos anteriores (Naal et al. 2002; Wu et al. 1997) relataram que o domínio MBP interage com um derivado semi-viologênico, N-(3-pirrol-1-il-propil)-4,4'-bipiridina (PPB). Esse material pode ser eletropolimerizado em superfícies de eletrodos, resultando em um filme polimérico, que atua como suporte para a proteína fusionada de MBP (Takada et al. 2002).

1.3 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS

A **Tecnologia do DNA Recombinante** tem proporcionado aos pesquisadores uma infinidade de possibilidades e avanços na área da genética e bioquímica no sentido de desenvolver ferramentas para transportar informações genéticas de um organismo para outro. Esta técnica permite o estudo de mecanismos de replicação e expressão gênica e o desenvolvimento de culturas microbianas capazes de produzir peptídeos ou proteínas de interesse em grandes quantidades (Alberts 2009).

A técnica de clonagem molecular consiste em promover o isolamento e propagação de moléculas de DNA idênticas através de duas etapas fundamentais: inicialmente, o fragmento do DNA de interesse chamado de inserto é ligado ao vetor (outra molécula de DNA) dando origem ao chamado DNA recombinante. Depois, a molécula do DNA recombinante é introduzida numa célula hospedeira compatível, num processo chamado transformação. Nas condições ideais, a célula hospedeira que incorporou a molécula do DNA recombinante sofre muitos ciclos de divisão celular produzindo, assim, milhares de cópias do DNA recombinante (Lima 2008).

Sabe-se que poucas proteínas são abundantes de maneira suficiente a serem isoladas de seus organismos nativos. Para que seja possível obter uma maior quantidade dessas biomoléculas foram propostos diferentes métodos para expressão de proteínas através de sistemas distintos. Os mais comumente usados para a obtenção de proteínas heterólogas, são: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, leveduras e células de mamíferos

sendo que cada um apresenta suas vantagens e desvantagens dependendo das proteínas a serem estudadas. A produção de proteínas em *Escherichia coli* é o capítulo mais antigo e mais bem sucedido na história da pesquisa de DNA recombinante (Balbás 2001).

Produzir e purificar proteínas recombinantes em maiores quantidades já não é um grande desafio, pois as técnicas já estão bem estabelecidas. Esse material biológico tem importantes aplicações na área das ciências biológicas sendo utilizado em estudos bioquímicos, análises estruturais e tridimensionais, uso biotecnológico e terapêutico. A produção de proteínas recombinantes envolve a clonagem do gene apropriado em um vetor de expressão sob controle de um promotor induzível.

O promotor mais comumente usado sistema de expressão de proteínas heterólogas em *E. coli* é baseado no operon lac. Neste sistema, o DNA de interesse é clonado em um plasmídeo, por exemplo, o qual contém o lacI (repressor), lacP (promotor) e lacZ (gene estrutural transcrito para mRNA da β -galactosidase). A indução da transcrição ocorre pela adição de um análogo de lactose sintético e não degradável (Isopropil-tio- β -D-galactopiranosídeo, IPTG), o qual se associa ao repressor e inibe-o, deixando o promotor livre para a interação com a RNA polimerase e consequente transcrição do gene.

E. coli é a célula hospedeira mais comumente utilizada para expressão de proteínas heterólogas. Isso ocorre devido à facilidade e baixo custo de se cultivar *E. coli*, e pela reprodutibilidade e abundância de proteína que produz. Além disso, modificações nos vetores e linhagens de *E. coli* são frequentemente feitas no sentido de aumentar a eficiência e versatilidade do sistema original. Com isto, e com o advento de novos sistemas de expressão em células de eucariotos (levedura, insetos, mamífero), a expressão de proteínas clonadas tornou-se uma abordagem poderosa que vem revolucionando os estudos de estrutura, função, purificação e identificação de novas proteínas.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral produzir e caracterizar uma proteína recombinante, a Galectina-1 (Gal-1) fusionada à “*Maltose Binding Protein*” (MBP), a qual é largamente utilizada em protocolos de purificação de proteínas por afinidade, dando origem a **MBP-Gal-1** e utilizar essa biomolécula para construção de um biossensor. Para alcançar tais resultados os seguintes objetivos específicos foram executados:

- Produção e caracterização da proteína fusionada MBP-Gal-1 utilizando as técnicas de *Western Blot*, Hemaglutinação, Espalhamento Dinâmico da Luz e Espectrometria de Massas;
- Síntese e caracterização do PPB;
- Comparação do comportamento da Gal-1 e MBP-Gal-1, ambas imobilizadas sobre superfície modificada com PPB eletropolimerizado e superfície não modificada (ouro polido) utilizando técnicas eletroquímicas (Voltametria Cíclica e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica), piezelétricas (Microbalança de Cristal de Quartzo) e ópticas (Ressonância de Plásmons de Superfície).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA FUSIONADA MBP-GAL-1

3.1.1 Clonagem do gene Gal-1

Todas as etapas de produção e caracterização da proteína fusionada MBP-Gal-1 foram realizadas no Laboratório de Glicobiologia - LABGIM - FCFRP-USP.

O gene codificador da Gal-1 humana (Lgals-1) foi amplificado através da técnica de PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction* ou Reação em Cadeia da Polimerase, utilizando como molde o plasmídeo pET29-Gal-1 (previamente construído). Para este fim foram desenhados oligonucleotídeos contendo os sítios de restrição enzimática, *Bam*HI e *Hind*III (Thermo), para inserção orientada no vetor plasmidial pMALc2x. A sequência dos oligonucleotídeos está representada a seguir:

pFBNdgal-1 (CGGATCCCATATGGCCTGTGGTCTG)

pRHXgal-1 (GCTCGAGAAGCTTTCACTCAAAGGCC)

A reação de amplificação do Lgals-1 foi realizada utilizando como molde 10 ng de DNA plasmidial pET29-Gal-1, 0,2 mmol L⁻¹ de dNTP, Desoxirribonucleotídeos fosfatados (Thermo), 10 µmol L⁻¹ de oligonucleotídeos (5' e 3'), 1 unidade da enzima Taq polimerase recombinante (Thermo), tampão (Thermo) e 1 mmol L⁻¹ de MgCl₂ (Thermo). Os parâmetros de termociclagem estão resumidos na Tabela 2:

Tabela 2: Parâmetros de termociclagem para amplificação do gene Lgals-1.

Passo	Temperatura (°C)	Tempo	
1	94	5 minutos	
2	94	45 segundos	<div> </div> Repetir os passos 2, 3 e 4 Trinta e cinco vezes
3	55	30 segundos	
4	72	1 minuto	
5	72	10 minutos	
6	4	Hold	

Por fim, os fragmentos amplificados foram aplicados em gel de agarose 1% e purificados com GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare).

3.1.2 Construção do vetor de propagação

Na construção do vetor pJET/Gal-1 foi utilizado o kit “CloneJET™ PCR Cloning Kit” (Thermo), sendo esta reação realizada em duas etapas: na primeira foram retiradas as adeninas das extremidades do fragmento utilizando 50 ng do produto de PCR amplificado e purificado, tampão de reação (Reaction Buffer), e enzima DNA *blunting*, conforme as orientações do fabricante. A reação foi incubada a 70 °C por 5 minutos e arrefecida em gelo. Em seguida foram adicionados 25 ng do vetor pJET (Thermo) e 2,5 U da enzima T4 ligase (Thermo), seguido de incubação a 22 °C por 5 minutos e a 70 °C por 5 minutos para inativação da enzima de ligação.

3.1.3 Preparação e transformação de bactérias competentes

O preparo das células competentes foi realizado pelo do método de cloreto de cálcio (CaCl₂), descrito por Sambrook e colaboradores (Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis 1989). Uma colônia de *E. coli* da cepa XL-10 Gold foi inoculada em 50 mL de meio LB (*Luria Bertani*) em Erlenmeyer de 250 mL e incubada a 250 rpm/37°C em agitador (Tecnal), durante uma noite. Posteriormente, 4 mL desta suspensão bacteriana foram adicionados em 400 mL de LB (erlenmeyer de 2L), seguido de incubação nas mesmas condições até que a densidade óptica (D.O._{600nm}) atingisse valor aproximado de 0,3. Após, a cultura foi transferida para 8 tubos de polipropileno de 50 mL pré-arrefecidos os quais foram mantidos no gelo durante 5-10 minutos, centrifugados a 1600xg/4°C em centrífuga (Eppendorff) durante 7 minutos e o sobrenadante descartado. O sedimento bacteriano foi ressuspensionado lentamente em 10 mL de solução de cloreto de cálcio 60 mmol L⁻¹/Glicerol 15% gelada, mantendo em suspensão por 30 minutos e após, centrifugado a 1100xg/4°C, por 5 minutos. Por fim, o sedimento foi ressuspensionado em 2 mL de solução de cloreto de cálcio e distribuído em alíquotas de 250 µL em microtubos esterilizados e arrefecidos. As células foram congeladas imediatamente em freezer -80 °C (Thermo).

Para o processo de transformação, as células competentes previamente preparadas foram descongeladas em banho de gelo. Mantendo o microtubo em gelo, foram adicionados, então, 5 µL o do vetor pJET/Gal-1 construído durante 10 minutos. Em seguida, provocou-se um choque térmico nas células, colocando-se o microtubo em

banho a 42 °C durante 2 minutos e transferindo-o para o gelo por 2 a 5 minutos. Foi acrescido 1 mL de meio LB e este sistema de transformação foi incubado por 1 hora a 37 °C em agitador a 200 rpm. Após este procedimento as células foram plaqueadas em meio LB suplementado com Ampicilina (Sigma) e incubadas a 37 °C de 12-16 horas.

3.1.4 Análise de clones recombinantes

Para identificação de clones recombinantes, as colônias crescidas na placa foram inoculadas em meio LB com os antibióticos Ampicilina (100 µg mL⁻¹) e Tetraciclina (25 µg mL⁻¹) e incubadas a 37°C/18 horas. As culturas foram centrifugadas a 5000xg durante 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. A extração plasmidial foi realizada utilizando-se Illustra plasmid Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare) e analisada em gel de agarose 1%. Em seguida, foi realizada a clivagem/digestão sítio específica do plasmídeo recombinante utilizando-se 1 µg do vetor pJET/Gal-1 purificado, tampão Fast Digest, enzimas de restrição *Hind*III Fast Digest e *Bam*HI Fast Digest, conforme as orientações do fabricante (Thermo) e água ultrapura q.s.p 10 µL. A reação foi mantida a 37 °C por trinta minutos e 80 °C por 5 minutos. A análise e confirmação dos clones recombinantes foi possível pela observação do fragmento de 409 pares de base (pb) referente a Gal-1 em gel de agarose 1%.

3.1.5 Construção do vetor pMALc2x-Gal-1

Para a construção do vetor de expressão pMALc2x-Gal-1, foi realizada a clivagem e remoção do gene codificador da Gal-1, contido no plasmídeo pJET/Gal-1, utilizando-se as enzimas de restrição (*Bam*HI e *Hind*III). Simultaneamente, foi realizada a preparação do plasmídeo pMALc2x (Figura 10) através da clivagem com as mesmas enzimas. Ambos os produtos foram aplicados em gel de agarose 1% e purificados com o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). Posteriormente, o gene da Gal-1 foi inserido no plasmídeo pMALc2x através de reação de ligação contendo 10 ng do plasmídeo pMALc2x clivado e purificado, 100 ng do gene codificador da Gal-1 clivado e purificado, tampão e 5 U da enzima T4 DNA Ligase (Thermo), durante 1 hora a 22 °C. A reação foi utilizada para transformar bactérias *E. coli* XL-10 Gold, as quais foram, posteriormente, plaqueadas em meio LB

suplementado com Ampicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) e Tetraciclina ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$). As colônias crescidas foram cultivadas em meio LB com os respectivos antibióticos para posterior extração plasmidial (Ilustra plasmidPrep Mini Spin Kit - GE Helthcare).

Figura 10: Plasmídeo de expressão pMALc2x-Gal-1.

Imagem criada com o Software SnapGene 1.1.3.

3.1.6 Expressão da proteína MBP-Gal-1 recombinante

O plasmídeo recombinante pMALc2x-Gal-1 construído foi utilizado para transformar, pelo método do choque térmico, células *E. coli* da linhagem Rosetta-DE3 competentes.

As bactérias foram cultivadas em 10 mL de meio LB com Ampicilina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) e Cloranfenicol ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) em um agitador (200 rpm) a 37°C , por 16-18 horas. Após este período e, constatado o crescimento bacteriano, foram transferidos 10 mL desta cultura para 1 L de meio LB, previamente autoclavado, contendo os mesmos antibióticos. Em seguida, esta suspensão bacteriana foi incubada em agitador (200 rpm) a 37°C até que a $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$ atingisse um valor de aproximadamente 0,45. Então, foram

adicionados $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de isopropil β -D-tiogalacto-piranozίδeo (IPTG, Promega, WI, EUA), para a indução da expressão da proteína MBP-Gal-1. O cultivo prosseguiu em agitador ($37 \text{ }^{\circ}\text{C}/280 \text{ rpm}$) por 4 horas, sendo coletada uma alíquota de $500 \text{ }\mu\text{L}$ a cada uma hora, as quais foram centrifugadas e reservadas para posterior análise do melhor tempo de indução, através de SDS-PAGE (do inglês, *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* ou Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio) (Laemmli 1970). Após este período de indução, a suspensão bacteriana foi centrifugada a $8000\times g$ por 8 minutos a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. O sedimento bacteriano obtido após centrifugação foi reservado para posterior purificação da proteína recombinante.

3.1.7 Obtenção e purificação da MBP-Gal-1 recombinante

A proteína fusionada MBP-Gal-1 foi purificada a partir da lise mecânica das células. Inicialmente, o sedimento foi ressuspensionado em tampão de lise contendo um comprimido de inibidores de enzimas proteolíticas (Complete Mini, EDTA Free - Roche Diagnostics, Indianápolis, IN, USA), RNase, ribonuclease ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$); DNase, desoxirribonuclease ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), lisozima ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$). Em seguida, em banho de gelo, a suspensão bacteriana foi submetida a 5 pulsos de 40 W com intervalos de 30 segundos entre os pulsos, com o uso de um sonicador (Sonics Vibracell-VCX130-Sonics & Material Inc. New Down, CT - USA). O lisado bacteriano foi centrifugado ($10000\times g/4^{\circ}\text{C}$) separando-se a fração solúvel (sobrenadante) da fração insolúvel (sedimento). O sobrenadante foi submetido à cromatografia de afinidade usando 2 colunas diferentes. Ambas foram empacotadas com $2,5 \text{ mL}$ de resina Sepharose/lactose (Sigma) e resina de amilose (Biolabs), respectivamente. Para as duas etapas de purificação, as colunas foram inicialmente equilibradas com tampão fosfato salino, PBS ($137 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaCl}$; $2,7 \text{ mmol L}^{-1} \text{ KCl}$; $10 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$; $1,8 \text{ mmol L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$; pH: 7,4). Posteriormente, foi aplicada a amostra a ser purificada e a coluna foi lavada com 10 volumes de PBS. A proteína MPB-Gal-1 ligada foi eluída com PBS-lactose 100 mmol L^{-1} na coluna Sepharose/lactose e PBS-maltose 100 mmol L^{-1} na coluna de amilose. As alíquotas obtidas foram congeladas a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ para posteriores ensaios.

Imediatamente antes da utilização, as frações de MBP-Gal-1 foram aplicadas em coluna de cromatografia de exclusão molecular (Colunas de Dessalinização PD-10 - GE

Heathcare) para remover a lactose e a maltose, liberando, então, os sítios ativos das proteínas fusionadas. As concentrações proteicas das alíquotas foram determinadas utilizando o espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Para averiguar a purificação proteica, as amostras foram diluídas em tampão de amostra e analisadas por SDS-PAGE 15%. As amostras preparadas (controle negativo, controle de indução, lisado bacteriano, *flow through* e material purificado) foram fervidas em banho maria por 10 minutos e aplicadas no gel. Durante a corrida eletroforética utilizou-se amperagem de 20 mA por gel e voltagem de 300 V por aproximadamente 75 minutos. Para promover a revelação das bandas de expressão proteica o gel foi corado com solução de *Comassie Blue R*.

3.1.8 Caracterização por *Western Blot*

As amostras da proteína fusionada MBP-Gal-1 foram separadas por SDS-PAGE 15% e depois transferidas para membrana de nitrocelulose (0,22 μm ; Hybondn-Amersham Biosciences) durante 1 h, a 70 V e 200 mA em tampão tris-glicina contendo 10% de metanol, utilizando o sistema Bio-Rad Trans-Blot®, conforme esquema representativo (Figura 11). As proteínas transferidas foram coradas com *Ponceau S* para confirmação da eficiência da transferência. Em seguida, a membrana foi bloqueada com 5% de leite em pó desnatado diluído em tampão Tris (TBS) acrescido de Tween 0,05% (v/v) durante 1 hora, sob agitação à temperatura ambiente. Após esta etapa, a membrana foi lavada e incubada com anticorpo policlonal primário *chicken-anti-Gal-1* (1:1500) durante 1 hora. Vale ressaltar que este anticorpo foi previamente produzido pelo Laboratório de Glicoimunologia a partir da imunização de galinhas com galectina-1 humana recombinante. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes com intervalos de 5 minutos com TBS-Tween 0,05% sob agitação. Por fim, adicionou-se o anticorpo secundário mouse *anti-chicken*-HRP (Jackson Research) (1:15000) por mais 1 hora e a detecção foi realizada utilizando o sistema de detecção ECL (Amersham Biosciences).

Figura 11: Esquema representativo do procedimento realizado nos ensaios de *Western Blot*.

Fonte: Adaptado de Molecular Devices © 2018.

3.1.9 Ensaios de hemaglutinação

A atividade hemaglutinante foi realizada de acordo com os métodos previamente descritos na literatura (Lourenço et al. 2001) e otimizada para estes experimentos. As amostras de sangue humano foram coletadas em tubos heparinizados. Os eritrócitos foram isolados por centrifugação a 1.500 rpm durante 5 minutos, lavados três vezes com PBS (pH 7,4) e dispersos novamente no mesmo tampão até uma concentração final de 3% (v/v). Os ensaios de hemaglutinação foram realizados em placas de 96 poços. As diluições em série da MBP-Gal-1 (variando de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ a 20mmol L^{-1}) em $50 \mu\text{L}$ de PBS (pH 7,4) foram incubadas com $50 \mu\text{L}$ de suspensões de eritrócitos a 3% durante 1 hora à temperatura ambiente e cada poço foi examinado visualmente até completar a aglutinação. Os testes de inibição também foram realizados usando carboidratos de ligação como maltose, lactose e sacarose. O esquema representativo mostrado na Figura 12 ilustra o padrão de resposta observado neste tipo de ensaio.

Figura 12: Etapas do procedimento de hemaglutinação e possíveis padrões de resposta obtidos.

Fonte: Adaptado de Gold Analisa Diagnóstica Ltda.

3.1.10 Caracterização por Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS)

As frações da purificação anteriormente realizada foram reunidas e concentradas até 21 mg mL^{-1} com base nos coeficientes de extinção teórica ϵ 280 nm e filtradas (Filtros Centrifugadores Amicon® Ultra 15 mL). As intensidades DLS foram medidas para MBP-Gal-1 usando um Zeta-Sizer Nano ZS90 (Malvern Instruments). Os dados foram coletados a 16°C em uma cubeta Zen2112.

3.1.11 Caracterização por Espectrometria de Massas MALDI-TOF/TOF

As análises foram realizadas no equipamento MALDI-TOF/TOF Ultrafextreme (Bucker Daltonics). A matriz utilizada foi o ácido sinapínico (Bruker Daltonics), o qual foi preparado uma solução saturada em acetonitrila (grau HPLC, JT Baker) e água deionizada contendo 0,1 % de ácido trifluoroacético (grau HPLC, JT Baker) na proporção de 3:7(v/v). Os parâmetros utilizados para a obtenção dos espectros foram: Faixa de massa 20-80 kDa, 3000 *laser shots* por espectro, PIE (*Pulsed Ion Extraction*) de 500 ns, modo positivo, frequência de laser de 1000 Hz. A análise foi realizada no modo linear, a voltagem de IS1 (ion source 1) e IS2 aplicadas foram de 25.00 kV e 23.20 kV, respectivamente. Para a calibração externa e do equipamento foi utilizado uma mistura de proteínas (*Protein Calibration Standard II*, Bruker). A amostra foi submetida para análise após limpeza no *zip tip*. Posteriormente, 1 uL de amostra foi misturada com 1 µL de matriz e 1 µL foi aplicado na placa de MALDI para análise.

3.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO PPB

3.2.1 Síntese do precursor do PPB: 1,3-Bromo-propil pirrol

O 1,3-Bromo-propil pirrol foi preparado por modificação da síntese de Dehaen e Hassner (Hassner & Dehaen 1991).

Inicialmente, adicionou-se 1,91g de NaH (Sigma Aldrich) sob atmosfera inerte ($N_{2(g)}$) à um balão de fundo redondo o qual continha uma barra de agitação magnética. Em seguida, utilizou-se o solvente hexano (Synth) para remover a graxa que protege o NaH, o qual foi deixado em agitação por aproximadamente 2 minutos. Removeu-se o excesso, repetindo-se o procedimento enquanto necessário. Este sistema foi deixado em contato com $N_{2(g)}$ para a eliminação do hexano remanescente.

Adicionou-se 20 mL do solvente tetrahidrofurano THF (Vetec) ao meio reacional, e, em seguida, adicionou-se lentamente 2,77 mL de pirrol (Sigma Aldrich); a adição do pirrol foi realizada utilizando-se banho de gelo, por se tratar de reação exotérmica. Esta mistura permaneceu em agitação por 40 minutos. Ainda mantendo-se o banho de gelo, adicionou-se 12,2 mL de 1,3-dibromopropano (Sigma Aldrich) e a mistura foi mantida por mais 20 minutos. Após este período o banho de gelo foi retirado e a reação procedeu por 15 horas.

O conteúdo foi vertido em um funil de separação e a fase orgânica extraída com acetato de etila (Synth), por 3 vezes. Na última extração, adicionou-se solução saturada de NaCl (Sigma Aldrich) para forçar a separação das fases. A fase orgânica foi seca com MgSO_4 (Acros Organics) e concentrada em vácuo. O óleo resultante foi purificado por cromatografia em coluna de 6,0 cm de diâmetro (sílica 60 Å, 40-63 µm). A fase móvel era constituída de hexano 95% e acetato de etila 5%. O produto final recolhido apresentava coloração amarelo claro.

3.2.2 Síntese do PPB

O brometo de N-(3-pirrol-1-il-propil)-4,4'-bipiridina, PPB, foi preparado pela modificação da síntese de Carpio (Carpio et al. 1982).

Em 14,0 mL de acetonitrila (Sigma Aldrich) dissolveu-se 1,4 g de 4,4'-bipiridina (Sigma Aldrich) e 1,23 g de 1,3-Bromo-propil pirrol, previamente sintetizado, os quais foram adicionados a um balão de fundo redondo conectado a um condensador. Esta mistura permaneceu em banho de glicerina a 80 °C com agitação por 20 horas. Após o tempo de reação a mistura foi resfriada a temperatura ambiente.

Após o resfriamento da solução reacional, a mesma foi adicionada gota-a-gota e sob agitação a um béquer contendo solução aquosa saturada de NH_4PF_6 (Sigma Aldrich), sendo que aos poucos foi sendo formado um precipitado amarelo. A solução foi mantida por mais de 12 horas em geladeira para auxiliar na precipitação do sal de PPB. Após a obtenção do produto final o perfil voltamétrico do mesmo foi testado. Para a caracterização do material obtido realizou-se análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H -RMN, 400 MHz) foram obtidos em espectrômetros Bruker DRX-400. Os deslocamentos químicos (δ) estão relatados em parte por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS), utilizado como padrão interno, e a multiplicidade indicada como: s = singlete, d = dublete, t = tripleto, q = quadruplete, dd = duplo dublete, m = multiplete. A constante de acoplamento (J) foi calculada em Hertz (Hz) e o número de hidrogênios foi deduzido da integral relativa.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono-13 (^{13}C -RMN, 100 MHz) foram obtidos em espectrômetros Bruker DRX-400 e foram traçados de acordo

com a conveniência, utilizando-se as seguintes técnicas: BB – Broad Band ($^{13}\text{C} \{^1\text{H}\}$ - Carbono Totalmente Desacoplado de Hidrogênio) e DEPT – 135 – Distortionless Enhancement by Polarization Transfer.

3.3 TESTES ELETROQUÍMICOS, PIEZELÉTRICOS E ÓPTICOS

3.3.1 Medidas de Voltametria Cíclica (VC)

Os experimentos de voltametria cíclica foram realizados com um potenciostato BAS CV-27 e os voltamogramas foram obtidos em um registrador Omnigraphic® 100 - Houston Instruments.

A célula eletroquímica utilizada apresentava um compartimento, com volume aproximado de 5 mL. O eletrodo de trabalho utilizado foi de carbono vítreo com 3 mm de diâmetro, o eletrodo de referência foi Ag/AgCl (KCl saturado) e eletrodo auxiliar de fio de platina. Antes do uso, o eletrodo de carbono vítreo foi polido com lixa d'água (P4000), enxaguado completamente com água e seco em $\text{N}_{2(g)}$. Os eletrodos de trabalho foram modificados com filme de PPB por varreduras cíclicas, a 100 mV s^{-1} , entre $-0,8 \text{ V}$ e $+1,6 \text{ V}$ numa solução 2 mmol L^{-1} de PPB em acetonitrila (Sigma Aldrich) e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ TBAH (hexafluorofosfato de tetrabutilamônio, Sigma Aldrich) previamente borbulhada com argônio para a remoção de $\text{O}_{2(g)}$. Após a eletropolimerização o eletrodo modificado foi lavado com água teve seu perfil voltamétrico testado em solução tampão PBS (pH 7,4). As demais medidas utilizando a técnica de voltametria cíclica foram executadas utilizando os mesmos eletrodos de referência, auxiliar e célula eletroquímica.

3.3.2 Medidas na Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo (EQCM)

Para a realização destas medidas foram utilizados eletrodos de trabalho de ouro com 25 mm de diâmetro, depositados sobre cristais de quartzo com corte AT (5 MHz). O eletrodo de referência utilizado foi Ag/AgCl (KCl saturado) e o eletrodo auxiliar foi um fio de platina em espiral com grande área superficial.

No sentido de garantir que a superfície do eletrodo de trabalho de ouro estivesse em condições apropriadas para as análises foi realizado um pré-tratamento do mesmo.

Utilizou-se “solução piranha” na proporção de 3:1 $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{conc.})}/\text{H}_2\text{O}_{2(30\%)}$ para promover a limpeza e remoção de moléculas orgânicas da superfície do eletrodo. Lavou-se em excesso com água destilada. Em seguida, foi realizado um desgaste eletroquímico da superfície do eletrodo utilizando solução de H_2SO_4 (Synth) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Foram realizados consecutivos ciclos de voltametria cíclica, durante aproximadamente 3 minutos, no intervalo de potencial de -0,6 V a +1,8 V na velocidade de varredura de $5,0 \text{ V s}^{-1}$. Após as etapas de limpeza química e eletroquímica o perfil da superfície do eletrodo de trabalho foi testado na mesma solução ácida, no intervalo de -0,2 V a +1,6 V.

As medidas foram realizadas em célula eletroquímica de três compartimentos, aproximadamente 20 mL, separadas por uma placa de vidro sinterizado de porosidade média. Todas as soluções utilizadas nos ensaios eletroquímicos foram previamente borbulhadas com argônio para a remoção de $\text{O}_{2(\text{g})}$. Para estas medidas foram utilizadas as proteínas Gal-1 e MBP-Gal-1 em tampão PBS (pH 7,4). O potenciostato utilizado foi o mesmo utilizado nas medidas de voltametria cíclica. A frequência de oscilação do cristal ressonante de quartzo e a resposta de corrente foram simultaneamente medidas. A microbalança de cristal de quartzo utilizada foi do modelo Stanford 200.

3.3.3 Medidas de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)

Os experimentos de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) foram realizados no laboratório do grupo SENSORMAT - Sensores e Materiais do Departamento de Física da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP) utilizando um potenciostato AUTOLAB PGSTAT 128N (MetrohmAutolab, The Netherlands) com módulo de impedância FRA32N usando a mesma célula e eletrodos, anteriormente descritos nas medidas de voltametria cíclica. O espectro de impedância foi obtido utilizando tampão PBS (pH 7,4) contendo hexacianoferrato(II) e (III) de potássio $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ (1:1) (Sigma Aldrich) na faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz em escala logarítmica com amplitude de 10 mV. O Potencial de Circuito Aberto (OCP) foi determinado pelo programa NOVA (versão 1.11).

Para estas medidas foram utilizados eletrodos de ouro com 2 mm de diâmetro (Metrohm) e eletrodos de carbono vítreo (os mesmo utilizados na Voltametria Cíclica) modificados com filme polimérico de PPB. Os eletrodos de ouro foram previamente

polidos em suspensão de alumina de 1,0 e 0,3 μm (AP Suspensions - Struers) por aproximadamente 5 minutos e posteriormente sonificados em água destilada, por 2 minutos. Em seguida, os eletrodos foram submetidos a consecutivos ciclos de voltametria cíclica em $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{aq})}$ 0,5 mol L^{-1} no intervalo de potencial de -0,5 a +1,1 V a velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} até que a superfície apresentasse o perfil característico do eletrodo limpo. As medidas de resistência de transferência de carga (R_{ct}) foram registradas em cada etapa de modificação promovida na superfície dos eletrodos. As etapas de modificação envolviam o uso das proteínas Gal-1 e MBP-Gal-1 e diferentes açúcares (lactose e maltose) os quais também foram utilizados em diferentes concentrações.

3.3.4 Medidas de Ressonância de Plásmons de Superfície (SPR)

Os experimentos de SPR foram realizados no LAFIP-NANOTEC - Laboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia - situado no Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia - IQ-UFU. Para a realização das medidas ópticas do ângulo de SPR foi utilizado um Autolab Springle (*Eco Chemie*), sendo que a parte óptica do sistema é composta de um prisma e de um disco de vidro recoberto com um fino filme de ouro adquiridos da Xantec Bioanalytics. O equipamento contém uma célula com capacidade de 300 μL . A fonte de radiação utilizada foi um laser de He-Ne (com emissão em 670 nm) e a intensidade da luz refletida foi medida através de um detector de fotodiodo. Para estes experimentos, a configuração utilizada foi baseada na reflexão interna total atenuada (configuração de Kretschmann) que é a mais usada nas análises de SPR.

Para promover a eletropolimerização do PPB sobre o eletrodo de Au SPR foram realizadas medidas voltamétricas em um potenciostato/galvanostato da Autolab modelo PGSTAT 302 N (*Eco Chemie*) com o módulo FRA2, acoplado a um computador contendo o *software* GPES 4.9, utilizando a mesma célula com volume de 300 μL do Autolab Springle. Neste caso, foram realizados estudos para investigar as melhores condições de eletropolimerização, portanto, alguns parâmetros eletroquímicos foram modificados e as condições foram as seguintes: intervalo de potencial de -0,8 V a +1,4 V e velocidade de varredura de 150 mV s^{-1} .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA FUSIONADA MBP-GAL-1

4.1.1 Obtenção do vetor de expressão pMALc2x-Gal-1 e análise de recombinantes

Após as etapas de clonagem do gene da Gal-1 e construção do vetor de propagação foi realizada a análise de clones recombinantes. Para confirmação da presença do gene *Lgals-1* inserido no plasmídeo pMALc2x, foram realizadas reações de digestão enzimática utilizando as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III. O resultado foi analisado em de gel de agarose 1%, conforme ilustrado na Figura 13:

Figura 13: Identificação de clones recombinantes por digestão enzimática em gel de agarose 1%. **MM** corresponder ao marcador molecular de DNA (Sinapse 1Kb *ladder*); **C-** corresponde ao controle negativo e **C+** corresponde ao controle positivo. As *lanes* indicadas de **1** a **26** correspondem aos clones analisados. Em aproximadamente 409 pb está indicado o inserto Lgals-1 clivado do vetor pMALc2x.

Dentre os 26 clones de colônias analisados, apenas os clones 8 e 9 não apresentaram o inserto do gene Lgals-1. Todos os outros clones possuem o inserto deste gene, conforme indicado pela seta em 409 pares de base. Portanto, a clonagem do gene Lgals-1 no plasmídeo pMALc2x foi realizada com êxito.

4.1.2 Expressão e purificação da proteína de fusionada MBP-Gal-1

Uma vez construído, o plasmídeo recombinante pMalc2x-Gal-1 foi utilizado para transformar bactérias competentes da linhagem Rosetta-DE3 e, então, prosseguir na expressão da MBP-Gal-1. A fim de se comparar a eficiência de purificação, duas colunas foram preparadas a partir de diferentes resinas de afinidade. Na primeira coluna

utilizada, a purificação ocorreu por meio da interação do CRD da Gal-1 com a resina sepharose/lactose, ao passo que na segunda coluna, a purificação ocorreu pela interação do CRD da MBP com a resina de amilose. Assim, foi possível demonstrar que ambos os CRD's estavam ativos.

O processo de purificação foi monitorado por espectrofotometria (quantificação das frações proteicas obtidas em Espectrofotômetro Nanodrop 2000) e eletroforese em SDS-PAGE 15%. As Figuras 14 e 15 ilustram os resultados obtidos na purificação da MBP-Gal-1:

Figura 14: Análise da expressão e purificação da MBP-Gal-1 em SDS-PAGE 15%. **M** - padrão de massa molecular (Thermo); **Lane 1** - controle negativo (bactéria *E. coli* Rosetta-DE3 sem pMalc2x); **Lane 2** - *E. coli* Rosetta-DE3 transformada com o mesmo plasmídeo após 4 horas de indução com IPTG; **Lane 3** - fração solúvel do lisado bacteriano; **Lane 4** - *flow through*; **Lane 5, 6 e 7** - frações purificadas de MBP-Gal-1.

A *Lane 2* mostra que ocorreu indução da expressão da proteína fusionada MBP-Gal-1 na presença de IPTG, uma vez que não havia banda na mesma altura no controle negativo na *Lane 1*. A *Lane 3*, correspondente à fração solúvel do lisado bacteriano,

apresentou a maior concentração de proteína, confirmando que a maior parte da mesma se encontrava na forma solúvel. Já a *Lane 4*, demonstrou que no *flow through* ainda existia em pequenas quantidades a proteína MBP-Gal-1. Contudo, a purificação foi bastante satisfatória, pois as *Lanes 5, 6 e 7* apresentaram bandas homogêneas, relacionadas a uma proteína com molecular aparente de 57 kDa. A análise por SDS-PAGE da purificação de MBP-Gal-1 demonstrou que a proteína fusionada foi purificada com sucesso e com alto grau de homogeneidade.

Figura 15: Análise da expressão e purificação da MBP-Gal-1 em SDS-PAGE 15%, **M** é o padrão de massa molecular (Amersham ECL Rainbow - GE Healthcare); *Lane 1* - controle negativo (bactéria *E. coli* Rosetta-DE3); *Lane 2* - fração insolúvel do lisado bacteriano; *Lane 3* - fração solúvel do lisado bacteriano; *Lane 4* - *flow through*; *Lane 5 e 6* - Frações purificadas de MBP-Gal-1.

A purificação da MBP-Gal-1 utilizando resina de amilose apresentou um perfil semelhante quando comparado à coluna com resina de sepharose/lactose. A grande diferença observada foi na *Lane 4*, correspondente ao *flow through*, a qual apresentou uma quantidade significativamente menor de MBP-Gal-1, quando comparada à mesma

Lane obtida pela purificação que utilizou resina de sepharose/lactose. Este fato possivelmente está associado a uma melhor eficiência de ligação da MBP à resina de amilose. Portanto, mais uma vez, a proteína fusionada foi purificada com sucesso e alto grau de homogeneidade.

4.1.3 Western Blot

A técnica *Western Blot*, também conhecida com ensaio imunoenzimático, refere-se à imunodeteção de proteínas em filtros de nitrocelulose e é rotineiramente utilizada para detecção de proteínas em extrato proteico cru, caracterização de polipeptídeos recombinantes, caracterização de soros e anticorpos monoclonais, determinação de massa molecular, entre outros (Kurien & Scofield 2006).

Após a conclusão da etapa de purificação, o gel SDS-PAGE 15% produzido, contendo o marcador de massa molecular (M) e as proteínas purificadas MBP-Gal-1 e Gal-1humana (previamente produzida no Laboratório de Glicoimunologia, a qual foi utilizada como controle positivo), foi empregado no processo de transferência para uma membrana de nitrocelulose. Esta membrana foi corada com *Ponceau S* (Figura 16) para confirmação da transferência homogênea.

Figura 16: Membrana de nitrocelulose corada com *Ponceau S*, após etapa de transferência.

Após as etapas de bloqueio e incubação com anticorpos primários e secundários, respectivamente, a membrana foi revelada utilizando-se o kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent e filme fotográfico (GE Life Sciences), o qual foi colocado contra a membrana, e exposto à luz da reação, conforme ilustrado na Figura 17.

Figura 17: Identificação da proteína MBP-Gal-1 através da técnica de *Western Blot*.

Desta forma, a mancha escura representada na Figura 17 está relacionada à presença das proteínas recombinantes Gal-1 (~ 15 kDa) e MBP-Gal-1 (~ 52 kDa), através da geração desta “imagem” espelhada no filme fotográfico. Isto indica que a proteína expressa e purificada era, de fato, a MBP-Gal-1.

Por essa razão, a técnica de *Western Blot* a qual é muito utilizada em Biologia Molecular aplicada em ensaios de imunodeteção de proteínas, mostrou-se eficiente para esta análise.

4.1.4 Atividade hemaglutinante da MBP-Gal-1

A hemaglutinação é uma técnica muito utilizada para avaliar a atividade lectínica de galectinas sendo uma forma de verificar a preservação de seus sítios ativos.

Trabalhos anteriores (Shu et al. 2014) relataram que uma das características das galectinas é a sua atividade hemaglutinante, a qual é atribuída à sua propriedade bivalente de ligação a carboidratos. Portanto, as amostras de MPB-Gal-1 foram submetidas a um estudo comparativo de hemaglutinação utilizando-se Gal-1 (Figura 18). Os ensaios diretos foram realizados através da interação com eritrócitos e os

ensaios de inibição foram realizados utilizando diferentes açúcares, como lactose, maltose e sacarose.

Figura 18: Ensaio de hemaglutinação da MBP-Gal-1 e Gal-1. **PBS** representa a proteína em contato somente com a suspensão de eritrócitos 3% em PBS; **M** (maltose), **L** (lactose) e **S** (sacarose) representam a mesma solução previamente descrita, sendo que cada linha corresponde à inibição promovida por cada um dos açúcares citados, respectivamente.

Os ensaios de hemaglutinação foram realizados para avaliar o potencial inibitório da ligação de glicanos na agregação mediada por reticulação de eritrócitos da MBP-Gal-1 e Gal-1 através de sua afinidade por diferentes açúcares na superfície desses eritrócitos (St-Pierre et al. 2012).

A aglutinação dos eritrócitos com Gal-1 ocorreu nas concentrações de 20, 10, 5, 2,5 e 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e a inibição ocorreu apenas pela lactose. Já a MBP-Gal-1 não mostrou aglutinação de eritrócitos em nenhum poço. Este resultado, inicialmente, não era esperado uma vez que a proteína fusionada MBP-Gal-1 possui 2 domínios de reconhecimento de carboidratos, os quais ambos apresentaram-se ativos de acordo com a purificação por afinidade, utilizando duas resinas diferentes, anteriormente descrita. Possivelmente, as propriedades aglutinantes observadas na proteína nativa Gal-1 não foram mantidas na proteína fusionada MBP-Gal-1, devido a diversos fatores como tamanho proteico, estrutura quaternária e funções distintas de cada CRD.

A alternativa encontrada para garantir a preservação da atividade biológica da proteína fusionada MBP-Gal-1 estava relacionada ao seu armazenamento: uma vez produzida e purificada, a proteína foi estocada em PBS 100 mmol L⁻¹ de maltose a -80 °C, e imediatamente antes do seu uso nos experimentos, submetidas a coluna de cromatografia de exclusão molecular (Colunas de Dessalinização PD-10 - GE Heathcare) para remover a maltose, liberando, então, os sítios ativos das proteínas fusionadas. Desta forma, o CRD se manteve preservado durante o período de estocagem da biomolécula.

4.1.5 Determinação do tamanho e massa molecular da MBP-Gal-1

As amostras de MBP-Gal-1 foram concentradas e submetidas a medidas de DLS para estimar o estado oligomérico dos domínios proteicos, bem como avaliar a polidispersividade e o raio hidrodinâmico da biomolécula em estudo. A Figura 19 mostra os resultados obtidos.

Figura 19: Resultados de DLS para a distribuição do tamanho de partícula por massa para MBP-Gal-1.

Os resultados de distribuição de tamanho mostraram um único pico monodisperso (99,8%) com raio hidrodinâmico de 4 nm $\pm$ 1,26 para MBP-Gal-1. Além disso, com base no diâmetro médio de um CRD típico, o raio hidrodinâmico sugere a forma

monomérica da proteína fusionada MBP-Gal-1. Essas medidas foram fundamentais para investigar e até mesmo sugerir possíveis aspectos estruturais e características biológicas acerca desta proteína uma vez que ainda não há nada descrito na literatura sobre esta biomolécula fusionada.

Já a espectrometria de massas forneceu o valor de 57,83 kDa para a proteína MBP-Gal-1 o qual apresentou concordância com o valor teórico previamente estimado que levava em consideração as massas das proteínas isoladas, aproximadamente 42 kDa para a MBP e 15 kDa para a Gal-1. A Figura 20 ilustra o espectro obtido para esta análise.

Figura 20: Espectro de Massas MALDI-TOF/TOF para MBP-Gal-1.

O pico de maior intensidade obtido, 57.834,300 (m/z), é referente à massa molecular da proteína fusionada MBP-Gal-1. O sinal de 28.933,896 se refere à proteína com duas cargas. Como o espectrômetro de massas analisa razão massa/carga (m/z) dividindo a massa da MBP-Gal-1 pela metade, obtém-se esse sinal.

4.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO PPB

4.2.1 Síntese e caracterização do precursor do PPB: 1,3-Bromo-propil pirrol

Previamente à obtenção do PPB, foi realizada a síntese de um de seus precursores o 1,3-Bromo-propil pirrol a qual ocorreu através da modificação da síntese de Dehaen e Hassner (Hassner & Dehaen 1991). O material obtido foi analisado e a confirmação de sua estrutura foi feita por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). O espectro obtido para esta análise consta na seção *Material Suplementar*.

4.2.2 Síntese e caracterização do PPB

Uma vez sintetizado e caracterizado o precursor 1,3-Bromo-propil pirrol foi utilizado na síntese do PPB a qual ocorreu via modificação da síntese de Carpio (Carpio et al. 1982). O material obtido foi analisado e a confirmação de sua estrutura foi feita por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). O espectro obtido para esta análise consta na seção *Material Suplementar*.

4.2.3 Perfil voltamétrico e eletropolimerização do PPB

Após a caracterização estrutural do PPB, foram realizados testes eletroquímicos para investigar o perfil voltamétrico do material sintetizado (Figura 21). O eletrodo de trabalho utilizado foi o de carbono vítreo, em acetonitrila (ACN) e hexafluorofosfato de tetrabutilamônio (TBAH) 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte.

Figura 21: Voltamograma cíclico em ACN/0,1 mol L⁻¹ TBAH contendo 2 mmol L⁻¹ de PPB, na velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹ para eletrodo de trabalho de carbono vítreo.

A varredura de potencial entre -1,9 a +0,3 V vs Ag/AgCl mostrou o aparecimento de dois picos reversíveis nos potenciais redox -0,81/-0,9 V e -1,45/-1,58 V, respectivamente. Esses picos são atribuídos aos processos redox dos nitrogênios quaternário e não quaternário, respectivamente, da estrutura da 4,4'-bipiridina. Esses valores condizem com os previamente descritos na literatura (Takada et al. 2003). Em seguida, foi realizada a eletropolimerização do PPB (Figura 22).

Figura 22: (A) Voltamogramas cíclicos consecutivos, velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , representando a eletropolimerização para um eletrodo de carbono vítreo em solução de ACN/ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ TBAH contendo 2 mmol L^{-1} de PPB e (B) Voltamogramas cíclicos em PBS (pH 7,4) nas velocidades de varredura de 20, 40, 60, 80 e 100 mV s^{-1} para um eletrodo de carbono vítreo modificado com filme eletropolimerizado de PPB.

Quando o intervalo de potencial foi estendido para valores positivos observou-se em (A) um pico de oxidação irreversível em +1,5 V que decresce com as sucessivas varreduras e o qual está relacionado com o processo oxidação do grupo pirrol. A eletropolimerização foi confirmada através da observação do surgimento de dois picos reversíveis obtidos em E° -0,18 e -0,55 V os quais apresentaram crescimento da corrente conforme o aumentou-se o número de ciclos, desta forma, dando origem a um filme eletroativo na superfície do eletrodo.

O voltamograma apresentado em (B) mostra que o filme polimérico também foi eletroativo em solução aquosa, entretanto, neste caso, o potencial formal do filme polimérico foi -0,29 V, um valor que é deslocado de forma negativa por aproximadamente 110 mV daquele obtido em acetonitrila. Este deslocamento de potencial provavelmente reflete diferenças na solvatação entre solventes aquosos e não aquosos. De maneira geral, as correntes de pico dos processos redox, registradas nos potenciais -0,3 e -0,6 V, foram diretamente proporcionais à variação da velocidade de varredura, o que indica que o processo redox ocorre na superfície do eletrodo.

Após as etapas de caracterização estrutural e eletroquímica do PPB sintetizado, os eletrodos de trabalho de carbono vítreo modificados com filme polimérico de PPB serão posteriormente utilizados nos experimentos de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) para a obtenção dos dados do biossensor proposto.

4.3 PROPRIEDADES ELETROQUÍMICAS E PIEZELÉTRICAS DAS PROTEÍNAS MBP-GAL-1 E GAL-1

4.3.1 Pré-tratamento do eletrodo de trabalho de ouro

Vários metais nobres como ouro, platina e prata são utilizados como substratos na fabricação de eletrodos para várias aplicações eletroquímicas. Especialmente o ouro tem sido amplamente utilizado em técnicas que envolvem reconhecimento de moléculas ou íons, catálise, transferência eletrônica e fenômenos que requerem superfícies estáveis e altamente reproduzíveis (Yang et al. 1995; Carvalhal et al. 2005).

No sentido de garantir que a superfície do eletrodo de trabalho de ouro estivesse em condições apropriadas para as análises foi realizado um pré-tratamento do mesmo. Utilizou-se solução de $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{conc})}/\text{H}_2\text{O}_{2(\text{aq})}$ 3:1 (solução piranha) para promover a

limpeza e remoção de moléculas orgânicas da superfície do eletrodo. Após as etapas de limpeza química e eletroquímica o perfil da superfície do eletrodo de trabalho foi testado na mesma solução ácida, no intervalo de -0,2 V a +1,6 V (Figura 23).

Figura 23: Voltamograma cíclico em solução de $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{aq})}$ 0,5 mol L^{-1} na velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} para eletrodo de trabalho de ouro.

Observa-se picos de oxidação próximo ao potencial de +1,2 V o qual representa a formação do óxido de ouro e outro pico de redução próximo a +0,9 V representando a redução do óxido metálico. Portanto, o perfil voltamétrico obtido condiz com o relatado na literatura (Science & Co 1974).

4.3.2 Comportamento eletroquímico do eletrodo modificado com Gal-1

Depois de realizada a etapa de pré-tratamento do eletrodo de trabalho, o mesmo foi colocado em contato com uma solução de PBS (pH 7,4) e o voltamograma registrado, no intervalo de potencial de -0,4 à 0,0 V com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , representado na curva (a) da Figura 24. Após esta medida, o eletrodo de trabalho teve sua superfície modificada com uma solução de Gal-1 (60 $\mu\text{g mL}^{-1}$), a qual foi

adicionada à célula eletroquímica. A proteína permaneceu em contato com o eletrodo, um período aproximado de 1,5 horas. Após este período a superfície do eletrodo foi lavada em PBS para remover o excesso de proteína não ligada e, utilizando os mesmos parâmetros eletroquímicos da medida anterior, registrou-se o voltamograma representado pela curva **(b)** da Figura 24.

Figura 24: Voltamogramas cíclicos em PBS (pH 7,4) na velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} onde **(a)** corresponde ao eletrodo de ouro não modificado e **(b)** ao eletrodo de ouro modificado com Gal-1 $60 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Comparando-se a curva **(a)** e **(b)**, observa-se que a superfície do eletrodo foi de fato modificada através da ligação Au-S, a qual é bastante estável. Verificou-se que não ocorre processo faradaico no intervalo de potencial estudado na Figura 24. Entretanto, ocorre uma diminuição significativa da corrente capacitiva após a modificação com Gal-1, indicando, como esperado, uma camada de menor constante dielétrica. O enxofre, presente nos resíduos de cisteína livres na estrutura dessa proteína, ligou-se covalentemente ao ouro provocando assim diminuição da corrente capacitiva. Para comprovar que esta ligação realmente ocorre o eletrodo modificado com Gal-1 foi

submetido a uma variação de potencial entre 0,0 e -1,0 V para promover a redução da ligação Au-S formada em sua superfície (Figura 25).

Figura 25: Redução do enxofre da ligação Au-S na superfície do eletrodo de ouro modificado com Gal-1, $60 \mu\text{g mL}^{-1}$; 5 ciclos; Velocidade de varredura: 10 mV s^{-1} .

Observa-se que a primeira varredura realizada apresentou um pico de redução próximo de -0,6 V. As consecutivas varreduras promovem a diminuição deste mesmo pico devido à redução da ligação Au-S com intervalo de potencial aplicado.

4.3.3 Comportamento eletroquímico do eletrodo modificado com MBP-Gal-1

A fim de se estabelecer um estudo comparativo, foi realizado o mesmo procedimento descrito no item anterior para promover a investigação da interação da proteína fusionada MBP-Gal-1 com a superfície do eletrodo de ouro polido. Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 26.

Figura 26: Voltamogramas cíclicos em PBS (pH 7,4) na velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹ onde (a) corresponde ao eletrodo de ouro não modificado e (b) ao eletrodo de ouro modificado com MBP-Gal-1 60 µg mL⁻¹.

Observa-se que não houve mudanças significativas na corrente capacitiva após a interação da proteína fusionada com o eletrodo de ouro. A *Maltose Binding Protein* (42 kDa) é uma proteína grande e volumosa quando comparada à Gal-1 (15 kDa), por esse motivo, acredita-se que a MBP esteja promovendo um impedimento estérico às ligações das cisteínas das cadeias laterais da Gal-1 com a superfície do eletrodo de ouro (ligação Au-S). Por esta razão, a ligação da proteína fusionada MBP-Gal-1 à superfície do eletrodo de ouro é menos efetiva que a ligação da proteína recombinante Gal-1.

Este resultado foi confirmado com aplicação do intervalo de potencial de 0,0 à -1,0 V, conforme ilustrado na Figura 27.

Figura 27: Redução do enxofre da ligação Au-S na superfície do eletrodo de ouro modificado com MBP-Gal-1 $60 \mu\text{g mL}^{-1}$; 5 ciclos; Velocidade de varredura: 10 mV s^{-1} .

A primeira varredura mostra um pequeno “ombro” próximo ao potencial de $-0,6 \text{ V}$ e os ciclos consecutivos já não apresentam perfil de processos redox. Este fato sugere que a interação da MBP-Gal-1 com a superfície do eletrodo de ouro não ocorreu de maneira semelhante a da Gal-1 com a mesma superfície, possivelmente devido às diferenças estruturais entre as duas biomoléculas.

4.3.4 Medidas na Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo (MECQ) utilizando a MBP-Gal-1 e Gal-1.

Nos sistemas interfaciais estudados em eletroquímica é de fundamental importância o conhecimento dos fluxos de carga e massa através da interface eletrodo/solução no entendimento molecular da relação entre estrutura e natureza físico-química das espécies que participam da reação e o fenômeno eletroquímico em si; ou seja, como estes parâmetros afetam a transferência de carga. Incluída no grupo das técnicas *in situ*, a Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo (MECQ) tem demonstrado ser uma

ferramenta poderosa no estudo de reações eletroquímicas que produzem modificações na interface eletrodo/eletrolito em uma magnitude suficiente para ser detectada pela técnica e se destacou como uma técnica de baixo custo relativo quando comparada a outras utilizadas em eletroquímica (Varela H.; Malta M.; Torresi 2000; Casero et al. 2010).

Para avaliar a interação das biomoléculas proteicas, Gal-1 e MBP-Gal-1 com a superfície do eletrodo de ouro polida foram realizados ensaios utilizando a MECQ para acompanhar as variações de frequência com o tempo, provocadas pela deposição de massa na superfície do eletrodo. A Figura 28 ilustra os resultados obtidos para as espécies estudadas.

Figura 28: Respostas de variação de frequência vs tempo plotadas para eletrodos de ouro em contato com (a) MBP-Gal-1 $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e (b) Gal-1 $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ em PBS (pH 7,4), 25°C .

Para a realização deste experimento a MECQ foi ligada e aguardou-se um tempo de estabilização de frequência de ressonância de aproximadamente 60 minutos (a). Em seguida, adicionou-se ao meio PBS (pH 7,4) que estava sob agitação prévia constante e temperatura ambiente, MBP-Gal-1 na concentração de $60 \mu\text{g mL}^{-1}$. Logo após a adição da proteína fusionada observou-se uma pequena variação de frequência de

aproximadamente 20 Hz que após, aproximadamente 220 minutos é estabilizada, resultando em uma variação final de aproximadamente 10 Hz. As variações de frequência observadas podem ser atribuídas às alterações de massa provocadas na superfície do eletrodo de ouro. Neste caso, a interação da MBP-Gal-1 com o eletrodo não foi intensa, de forma que um distúrbio na frequência ressonante do cristal é provocado no momento da sua adição, sendo este minimizado ao longo do tempo de estabilização até atingir um patamar constante.

O mesmo experimento foi realizado utilizando a proteína recombinante Gal-1, entretanto, em (b), o tempo aguardado de estabilização foi de aproximadamente 80 minutos. Neste caso, foi observada uma variação de frequência de aproximadamente 35 Hz e que após 240 minutos permaneceu constante, não retornando ao seu patamar inicial. Este fato sugere que houve interação entre a Gal-1 e a superfície do eletrodo de ouro. Portanto, entrando em concordância com experimentos de voltametria cíclica, previamente realizados, os quais mostraram que a interação da Gal-1 com a superfície de ouro polida é mais efetiva, devido à formação da ligação Au-S, quando comparada a MBP-Gal-1 e a mesma superfície.

Os ensaios eletroquímicos e piezelétricos realizados com as proteínas Gal-1 e MBP-Gal-1 foram de fundamental importância para avaliar o comportamento dessas biomoléculas e, conseqüentemente, propor a melhor configuração nos estudos do biossensor.

4.4 CONSTRUÇÃO DO BIOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO

4.4.1 Medidas utilizando eletrodo de trabalho de carbono vítreo modificado com filme polimérico de PPB

A Espectroscopia de Impedância Eletroquímica foi uma das técnicas utilizadas para construção do biossensor, pois fornece muitas informações dos diferentes processos eletroquímicos superficiais presentes no sistema em estudo. As medidas foram realizadas para avaliar as diferentes interações que pudessem ocorrer na superfície do eletrodo de trabalho de carbono vítreo modificado com PPB e de ouro, sendo a principal delas a interação entre a MBP-Gal-1 e seu alvo, a lactose. Inicialmente, foram realizados testes preliminares para determinação das melhores condições experimentais,

sendo que o primeiro deles foi a avaliação do tempo de interação da MBP-Gal-1 com o filme de PPB (Figura 29).

Figura 29: Diagramas de Nyquist obtidos para os diferentes tempos de interação da MBP-Gal-1 ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) com filme polimérico de PPB. Amplitude de 10 mV na faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz.

Para todos os tempos de interação estudados, registrados em diferentes cores, pode ser observado um semicírculo na região de alta frequência seguido de um comportamento do tipo Warburg, o que evidencia um sistema cineticamente controlado por difusão.

Os resultados mostraram que ocorre um aumento significativo da resistência à transferência de carga (R_{tc}), provocado pelo depósito sucessivo de MBP-Gal-1, o qual corresponde a um comportamento mais resistivo, devido ao aumento do tempo de interação da proteína MBP-Gal-1 com o filme polimérico de PPB. Este aumento começa a se estabilizar próximo ao tempo de 1h, o qual posteriormente foi utilizado como tempo padrão de interação da proteína com o eletrodo (modificado e não modificado).

A partir de então foram realizados inúmeros estudos de otimização relacionados ao emprego da etapa de bloqueio com Albumina de Soro Bovino (BSA), concentração do

alvo (lactose), interação com outros possíveis alvos (maltose). Alguns dos Diagramas de Nyquist obtidos para estes estudos de otimização constam na seção ***Material Suplementar***.

Os espectros obtidos mostram mudanças significativas na R_{tc} quando a MBP-Gal-1 interagiu com eletrodo modificado com PPB, conforme já descrito anteriormente. Aguardado o tempo de interação da proteína com o filme polimérico, foi incluída a etapa de bloqueio, utilizando-se BSA 1% para evitar interações não específicas. Conforme esperado, não se observou uma mudança significativa das propriedades de resistência da superfície modificada do eletrodo e por esse motivo, adotou-se esse procedimento para as demais medidas.

A Figura 30 ilustra as diferenças observadas quanto à variação da concentração do alvo lactose para a MBP-Gal-1 e a Gal-1.

Figura 30: Diagramas de Nyquist obtidos para eletrodo de carbono vítreo modificado com PPB interação com (A) MBP-Gal-1 e (B) Gal-1 ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e sucessivas interações com diferentes concentrações de lactose. Amplitude de 10 mV na faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz.

As 3 concentrações de alvos investigadas apresentaram consideráveis diferenças nos valores de R_{ct} obtidos em relação à interação com as sondas proteicas estudadas (Gal-1 e MBP-Gal-1).

Para o caso da MBP-Gal-1 o aumento da resistência à transferência de carga se torna mais notável já a partir da concentração de $15 \mu\text{mol L}^{-1}$, o que só acontece de forma mais notável a partir da concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a Gal-1.

Tanto a proteína não fusionada Gal-1 quanto a proteína fusionada MBP-Gal-1 apresentaram um aumento da resistência à transferência de carga quando adicionado o alvo lactose nas diferentes concentrações, entretanto os aumentos de R_{tc} foram mais expressivos para a MBP-Gal-1. Para obtenção dos valores de R_{tc} de cada etapa de modificação obtida nos experimentos, foi realizado um *fitting* dos dados de impedância através do modelo de circuito elétrico equivalente (Figura 31), gerados pelo programa NOVA (versão 1.11).

Figura 31: Circuito elétrico equivalente obtido através do *fitting* dos dados de impedância onde, **EFC** é o Elemento de Fase Constante, **Rs** é a Resistência da solução, **Rtc** é a Resistência à transferência de carga, **W** é a impedância de Warburg.

Todos dados apresentados na seção EIE foram modelados através de um circuito elétrico equivalente do tipo *Randles* modificado, e este forneceu os valores da resistência à transferência de carga (**Rtc**), apresentados na Tabela 3. Este circuito inclui a resistência ôhmica da solução de eletrólito (**Rs**); a impedância de Warburg (**W**); a resistência à transferência de carga (**Rct**); e um elemento de fase constante (**EFC**), o qual foi utilizado ao invés de um capacitor puro para compensar respostas capacitivas não ideais da interface. Os dois componentes do esquema eletrônico, **Rs** e **W**, estão relacionados as propriedades de *bulk* da solução de eletrólito e as características de difusão da sonda redox utilizada, respectivamente. Já os componentes **EFC** e **Rct** estão relacionados com as características dielétricas e isolantes, respectivamente, na interface eletrodo/eletrólito e são alterados pela modificação da superfície do eletrodo.

Tabela 3: Valores de R_{tc} e % R_{tc} obtidos para a interação com diferentes concentrações de lactose com as proteínas MBP-Gal-1 e Gal-1.

SONDA	* R_{tc} (Ω)			**% aumento R_{tc}		
	Lactose 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Lactose 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Lactose 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Lactose 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Lactose 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Lactose 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$
MBP-Gal-1	848,24 %Erro: 2,192	1.651,9 %Erro: 2,476	2.167,9 %Erro: 2,704	12,43%	118,95%	187,23%
Gal-1	958,45 %Erro: 2,786	1081,7 %Erro: 2,790	1552,2 %Erro: 3,165	20,96%	36,52%	95,90%

* R_{tc} é o valor de Z' correspondente ao diâmetro do semicírculo da etapa de bloqueio com BSA.

**% aumento R_{tc} calculados a partir do valor de Z' obtido após a etapa de bloqueio com BSA.

Os dados apresentados na Tabela 3 revelaram maiores valores de resistência à transferência de carga para a MBP-Gal-1 nas concentrações de 15 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de lactose. Conforme já discutido anteriormente, o aumento da R_{tc} observado a cada etapa de interação descrita nos experimentos está relacionado ao depósito (e permanência) das espécies em estudo na superfície do eletrodo. Portanto, quanto maior for o aumento da resistência a cada modificação melhor será a interação entre alvo e sonda. Desta forma, os resultados revelam uma melhor interação da MBP-Gal-1 com o alvo lactose quando comparada à proteína na forma nativa Gal-1. Sugere-se que a melhor retenção da atividade lectínica da proteína fusionada ocorreu devido a imobilização orientada na superfície do eletrodo modificado com filme polimérico de PPB.

Para uma melhor visualização desses resultados foi construído um gráfico comparativo entre os valores de R_{ct} obtidos para cada proteína, conforme ilustrado na Figura 32:

Figura 32: Relação entre aumento de R_{tc} e concentração de lactose obtidas para interação com MBP-Gal-1 e Gal-1.

A Figura 32 apresenta com mais clareza a grande diferença observada entre os valores de R_{tc} obtidos para cada proteína em relação à interação com a lactose em diferentes concentrações, evidenciando mais uma vez o melhor desempenho da sonda MBP-Gal-1.

Outro estudo realizado foi a interação das proteínas MBP-Gal-1 e Gal-1 com outro carboidrato, a maltose, a qual também foi empregada nas mesmas condições experimentais que a lactose. Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 33.

Figura 33: Diagramas de Nyquist obtidos para eletrodo modificado com PPB após interação com (A) MBP-Gal-1 e (B) Gal-1 ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e sucessivas interações com diferentes concentrações de maltose. Amplitude de 10 mV na faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz.

Diferentemente do esperado, as proteínas fusionada MBP-Gal-1 e não fusionada Gal-1 apresentaram um comportamento de interação com a maltose, pois, também foi observado um aumento muito significativo da Rtc (Tabela 4).

Embora as galectinas compartilhem uma boa afinidade para as estruturas de carboidratos ligados a β -galactose, as variações nos domínios de ligação de carboidratos (CRD) dos membros individuais da família das galectinas podem levar a uma ligação diferencial. Estudos sugerem que apesar das galectinas apresentarem fina especificidade para o reconhecimento de glicanos contendo β -galactosídeos terminais essa interação pode se diferente entre os indivíduos dos membros da família (Sean R. Stowell; Richard D. 2016).

Tabela 4: Valores de Rtc e % Rtc obtidos para a interação com diferentes concentrações de maltose com as proteínas MBP-Gal-1 e Gal-1.

SONDA	*Rtc (Ω)			**% aumento Rtc		
	Maltose 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Maltose 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Maltose 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Maltose 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Maltose 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Maltose 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$
MBP-Gal-1	2.371,4 %Erro: 1,156	2.983,6 %Erro: 1,119	4.871,5 %Erro: 1,055	81,87%	128,82%	273,71%
Gal-1	1.080,7 %Erro: 1,556	1.324 %Erro: 1,502	2.086,4 %Erro: 1,433	77,82%	118,54%	243,24%

* Rtc é o valor de Z' correspondente ao diâmetro do semicírculo da etapa de bloqueio com BSA.

**% aumento Rtc calculados a partir do valor de Z' obtido após a etapa de bloqueio com BSA.

Novamente, para uma melhor visualização desses resultados foi construído um gráfico comparativo entre os valores de Rct obtidos para cada proteína, conforme ilustrado na Figura 34:

Figura 34: Relação entre aumento de Rtc e concentração de maltose obtidas para interação com MBP-Gal-1 e Gal-1.

Observando-se a Figura 34 é possível notar um aumento considerável da Rtc para todas as concentrações de maltose, entretanto o perfil de resposta foi muito parecido para ambas as proteínas (MBP-Gal-1 e Gal-1), o que não ocorreu para o caso da lactose.

Inicialmente, acreditava-se que as proteínas fusionada e não fusionada iriam interagir fracamente com maltose quando comparada com a lactose, principalmente pelo fato da maltose não apresentar em sua estrutura resíduos de β -galactosídeos. Além disso, a proteína na forma nativa (Ga-1) não tem sua atividade lectínica inibida por este dissacarídeo, conforme previamente discutido na Figura 18, por este motivo esperava-se que a mesma apresentasse uma fraca interação com a maltose. Diferentemente do esperado, tanto a MBP-Gal-1 quanto a Gal-1 demonstraram interagir de maneira significativa com a maltose. Conforme já descrito na literatura, a Gal-1 não apresenta sua atividade lectínica afetada pela maltose quando se encontra **em solução**, o que não

acontece nestes experimentos EIE uma vez que as proteínas utilizadas são imobilizadas na superfície do eletrodo, antes de interagirem com seu alvo. Por este motivo, acredita-se que o comportamento das proteínas em solução e imobilizadas não ocorram de maneira semelhante.

4.4.2 Medidas utilizando eletrodo de trabalho de ouro polido

Os eletrodos de ouro polido foram utilizados para medidas EIE nas mesmas condições anteriormente descritas para eletrodos de carbono vítreo modificados com PPB. Estes ensaios tiveram como objetivo investigar a importância das cisteínas livres presentes na estrutura da proteína Gal-1 na forma nativa em relação à interação com a superfície polida do eletrodo de ouro, bem como a importância da imobilização orientada de biomoléculas para garantir a preservação da atividade biológica da mesma. Também foi utilizada a proteína fusionada MBP-Gal-1 no sentido de promover a comparação dos comportamentos de cada uma. Os resultados obtidos para os ensaios utilizando ambas as proteínas estão ilustrados na Figura 35.

Figura 35: Diagramas de Nyquist obtidos para eletrodo de ouro polido após interação com (A) MBP-Gal-1 e (B) Gal-1 ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e sucessivas interações com diferentes concentrações de lactose. Amplitude de 10 mV na faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz.

Diferentemente dos resultados obtidos para eletrodo de carbono vítreo modificado com PPB, para os ensaios realizados com eletrodo de ouro polido os valores de R_{tc} diminuíram sucessivamente após adição do alvo lactose, de maneira similar para ambas as proteínas MBP-Gal-1 e Gal-1. Este comportamento possivelmente está relacionado a imobilização não orientada que ocorre na superfície do eletrodo de ouro polido, uma vez que não é possível controlar a posição na qual a proteína interage com o eletrodo e consequentemente, provocando a drástica diminuição da atividade biológica, evidenciada pela diminuição da R_{tc} . Estes resultados reforçam a hipótese constantemente discutida neste trabalho a qual sugere a grande dependência de uma imobilização orientada para garantir a eficiência do biossensor.

Foi observado um comportamento muito parecido quando utilizado o alvo maltose, sendo que os espectros desta análise se encontram na seção *Material Suplementar*.

4.5 CONSTRUÇÃO DO BIOSSENSOR ÓPTICO

4.5.1 Imobilização da MBP-Gal-1 em diferentes concentrações sobre eletrodo Au-SPR modificado com PPB

Os estudos EIS previamente desenvolvidos demonstraram a potencialidade da plataforma para avaliar as possíveis interações da proteína fusionada MBP-Gal-1 sobre eletrodo modificado com PPB.

Após a eletropolimerização do PPB sobre a superfície do eletrodo de ouro, a técnica de SPR foi utilizada para a investigação da influência na imobilização de diferentes concentrações da MBP-Gal-1 sobre filme o previamente eletropolimerizado. Esta etapa teve como finalidade caracterizar a imobilização da proteína sobre a superfície modificada, assim como, otimizar a concentração e o tempo necessário para obter elevada cobertura de superfície após interação da biomolécula com o filme.

As curvas de SPR (sensorgramas) obtidas para a etapa de imobilização de diferentes concentrações da MBP-Gal-1 estão ilustradas na Figura 36. Neste tipo de gráfico, normalmente se observa três regiões típicas: primeiro, uma linha de base obtida a partir da adição da solução tampão PBS, pH 7,4, sobre eletrodo Au modificado com PPB; em seguida uma região de aumento do θ_{SPR} devido à interação da proteína com a

superfície modificada e por último a dissociação que corresponde à lavagem com PBS. O considerável aumento observado na segunda região ocorreu devido à ligação da MBP-Gal-1 sobre o PPB aumentar o índice de refração local nas proximidades da interface metal-dielétrico, o que resultou em $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ como consequência de alterações provocadas na ressonância de plásmons sobre a superfície metálica.

Figura 36: Sensorgramas relacionando as respostas obtidas para a adição de diferentes concentrações da MBP-Gal-1 sobre PPB. A seta **preta** indica a adição da proteína e a seta **cinza** a etapa de lavagem com PBS pH 7,4.

Analisando a Figura 36 é possível observar comportamentos distintos para as diferentes concentrações de MBP-Gal-1 investigadas. Neste ensaio, após a adição da proteína aguardou-se o tempo de estabilização do sinal até que não fossem observadas mudanças significativas no θ_{SPR} . Em seguida foi realizada a etapa de lavagem com PBS e remoção das espécies fracamente adsorvidas. Até a concentração de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ foram observados aumentos sucessivos de θ_{SPR} sendo que nas concentrações de 20 e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ tal aumento não foi observado, pois, provavelmente ocorreu a saturação da superfície. A $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ efetiva corresponde na diferença entre θ_{SPR} após estabilização da imobilização da proteína e θ_{SPR} após a lavagem com PBS.

Utilizando o programa Kinectic Evaluation (Versão 5.3) foi possível calcular a quantidade de moléculas de MBP-Gal-1 ligadas à superfície do eletrodo Au-SPR modificado com PPB em cada uma das concentrações estudadas; os valores estão apresentados na Tabela 5:

Tabela 5: Dados de cobertura relacionados às diferentes concentrações de MBP-Gal-1 imobilizadas sobre eletrodo Au-SPR modificado com PPB.

Concentração MBP-Gal-1 ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Densidade Superficial (nm mm^{-2})	Massa (ng)	Número de moléculas ligadas
0,1	2,1083	16,6556	$1,7353 \times 10^{+11}$
1	4,3831	34,6265	$3,6077 \times 10^{+11}$
10	5,3345	42,1426	$4,3908 \times 10^{+11}$
20	1,7175	13,5683	$1,4137 \times 10^{+11}$
50	2,6306	20,7817	$2,1652 \times 10^{+11}$

Foi possível observar que os valores obtidos para a concentração de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ apresentou os melhores resultados de recobrimento superficial. Ainda utilizando o programa Kinectic Evaluation foi possível calcular a constante de afinidade entre a MBP-Gal-1 e o filme polimérico de PPB. O valor obtido para esta análise foi de $K_D = 8,7769 \times 10^{-7} \pm 6,4610 \times 10^{-9}$.

Portanto, a concentração de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ apresentou a maior $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ efetiva, o que está relacionado a uma melhor cobertura da superfície do eletrodo e por isso, foi escolhida a concentração mais adequada para a realização dos demais experimentos.

4.5.2 Comparação da imobilização da MBP-Gal-1 e Gal-1 em Au-SPR limpo e modificado com PPB

No sentido de investigar a importância da modificação da superfície do eletrodo Au-SPR para promover uma melhor imobilização da sonda, foram realizados testes comparativos mostrando imobilizações realizadas em superfície modificada e não modificada com o filme polimérico de PPB, utilizando as proteínas fusionadas e não fusionadas, conforme ilustrado na Figura 37.

Figura 37: Sensorgramas da imobilização das proteínas fusionada e não fusionada ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) sobre eletrodo Au-SPR limpo e modificado com PPB. A seta **preta** indica a adição da proteína e a seta **cinza** a etapa de lavagem com PBS pH 7,4.

Conforme esperado, a etapa do sensorgrama correspondente à interação da sonda com a superfície do eletrodo apresentou um maior aumento do θ_{SPR} na curva em azul, a qual representa a interação da MBP-Gal-1 com a superfície modificada com PPB, possivelmente devido à imobilização orientada que ocorre com a proteína fusionada. Comparativamente, as proteínas fusionada (MBP-Gal-1) e não fusionada (Gal-1) foram imobilizadas na superfície do eletrodo Au-SPR limpo sendo acompanhadas de um aumento do θ_{SPR} bem menos expressivo, que por sua vez estaria relacionado com uma imobilização randômica e fraca com a superfície do eletrodo de ouro não modificado. Outro comportamento observado para este caso foi um aumento considerável de θ_{SPR} após a lavagem com PBS. Normalmente nesta etapa de dissociação se observa uma diminuição do θ_{SPR} devido à remoção das proteínas fracamente adsorvidas. É importante destacar que este comportamento foi majoritariamente observado nos experimentos realizados sobre a superfície do Au-SPR limpo.

4.5.3 Avaliação da interação lectina-carboidrato em diferentes concentrações

Após a investigação das melhores condições de imobilização da sonda, foram realizados estudos de interação com o β -galactosídeo lactose, para o qual a proteína Gal-1 apresenta boa afinidade de ligação, em diferentes concentrações. Foram utilizadas as mesmas concentrações empregadas nos experimentos de EIE: 5, 15 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de lactose. A MBP-Gal-1 foi imobilizada na concentração de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na superfície do eletrodo Au-SPR modificado com PPB; após a etapa de lavagem com PBS foi adicionado o alvo, aguardado o tempo de estabilização e novamente lavado com PBS sendo que os valores obtidos para cada ensaio estão apresentados na Tabela 6:

Tabela 6: Valores de $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ obtidos para diferentes concentrações de lactose interagindo com MBP-Gal-1 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

$\Delta\theta_{\text{SPR}}$ interação com lactose		
5 $\mu\text{mol L}^{-1}$	15 $\mu\text{mol L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol L}^{-1}$
102,97	190,92	283,49

Foi possível observar que a constante dielétrica do ambiente aumentou proporcionalmente com a concentração do alvo lactose, sendo tal fato acompanhado pelo aumento do ângulo de SPR (θ_{SPR}). Por este motivo, a plataforma se mostrou sensível as diferentes concentrações estudadas e, em experimentos futuros, pode ser aperfeiçoada para que seja possível obter dados importantes como a construção de uma curva analítica e o cálculo do limite de detecção, bem como avaliação da interação com diferentes alvos.

Outro estudo realizado foi a comparação da interação com o alvo utilizando as proteínas fusionada e não fusionada, ambas na mesma concentração e imobilizadas sobre PPB. As curvas de refletância obtidas para estas análises estão apresentadas na Figura 38:

Figura 38: Curvas de refletância obtidas sobre sonda ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) após lavagem com PBS (curva em preto) e após interação com lactose ($15 \mu\text{mol L}^{-1}$) e lavagem com PBS (curva em vermelho). Em (A) para Gal-1 e (B) para MBP-Gal-1.

Comparando-se as curvas obtidas em **(A)** e **(B)** é possível observar um maior deslocamento do ângulo de refração para a interação com alvo obtida em **(B)** a qual corresponde a imobilização da proteína fusionada MBP-Gal-1. Tal fato, novamente comprova a potencialidade da plataforma em avaliar de uma maneira mais eficiente (devido à imobilização orientada) as possíveis interações da proteína Gal-1 com outros alvos, avaliando a seletividade do biossensor.

É válido ressaltar que é de fundamental importância a realização de outros ensaios para calcular as constantes de afinidade das proteínas fusionada (MBP-Gal-1) e não fusionada (Ga-1) em relação ao alvo e, consequentemente, comparar os valores obtidos para que seja possível realizar uma discussão mais aprofundada das propriedades observadas ressaltando as diferenças na estrutura das biomoléculas imobilizadas.

Os experimentos EIE e SPR mostram concordância nos resultados, uma vez que em ambos foi comprovado que a MBP-Gal-1 demonstrou ser uma boa alternativa para promover imobilização orientada garantindo a preservação da atividade lectínica da Gal-1 e, consequentemente, resultados confiáveis para construção do biossensor.

5. CONCLUSÕES

A proteína recombinante fusionada MBP-Gal-1 foi expressa e purificada satisfatoriamente e com alto grau de homogeneidade.

A etapa de purificação utilizando coluna com resina de sepharose/lactose e coluna com resina de amilose foi de fundamental importância para comprovar a atividade/preservação de ambos CRD's da Gal-1 e MBP, respectivamente.

A técnica de Western Blot foi realizada com êxito para caracterizar a imunodeteção da MBP-Gal-1.

A proteína MBP-Gal-1 teve seu estado oligomérico estimado e seu raio hidrodinâmico determinado pela técnica DLS sendo que a mesma se encontrava na forma monomérica com raio hidrodinâmico de $4 \text{ nm} \pm 1,26$.

A massa molecular de 57,834 kDa para a MBP-Gal-1 foi obtida através da técnica de Espectrometria de Massas MALDI-TOF/TOF. Este valor estava em conformidade com o previamente estimado o qual levava em consideração as massas moleculares das proteínas isoladas.

O PPB, material polimérico utilizado para modificar os eletrodos de carbono vítreo e ouro, foi sintetizado e teve sua estrutura confirmada por RMN, sendo que todos os resultados de caracterização realizados estavam em conformidade com a literatura.

Os comportamentos eletroquímicos e piezoelétricos das proteínas MBP-Gal-1 e Gal-1 imobilizadas sob eletrodo de ouro polido mostraram-se distintos devido ao papel das cisteínas livres presentes na estrutura da Gal-1 mas que, devido ao grande volume da MBP não estavam “livres” na estrutura da proteína fusionada (MBP-Gal-1). Por isso, somente a Gal-1 se ligou de maneira efetiva à superfície do eletrodo de ouro polido.

Os ensaios EIE utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com PPB mostraram a importância da imobilização orientada da sonda (MBP-Gal-1) para garantir a preservação da atividade biológica da proteína, uma vez que os resultados relativos ao aumento da R_{ct} , após adição do alvo, foram mais expressivos para a proteína fusionada MBP-Gal-1 quando comparados à proteína não fusionada Gal-1.

Já os ensaios EIE utilizando eletrodos de ouro polidos mostraram que a imobilização randômica das proteínas MBP-Gal-1 e Gal-1 não foi efetiva para promover a interação com o alvo, pois, após adição do mesmo ocorreu a diminuição da R_{ct} .

Para os experimentos de SPR foi possível confirmar a melhor imobilização da sonda MBP-Gal-1 sobre a superfície eletropolimerizada de PPB, quando comparada com a proteína nativa Gal-1, além de obter dados cinéticos como a constante de afinidade para esta interação $K_D = 8,7769 \times 10^{-7} \pm 6,4610 \times 10^{-9}$ e valores de cobertura superficial calculados para diferentes concentrações da proteína fusionada.

Os resultados obtidos para estas análises ópticas mostraram a grande potencialidade da utilização desta plataforma para desenvolvimento de um biossensor para lactose, uma vez que os valores obtidos para a interação entre MBP-Gal-1 e lactose foram mais expressivos quando comparados à mesma interação promovida pela Gal-1.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aggarwal, S., Sharma, S.C. & Das, S.N., 2015. Galectin-1 and galectin-3: Plausible tumour markers for oral squamous cell carcinoma and suitable targets for screening high-risk population. *Clinica Chimica Acta*, 442, pp.13–21. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2014.12.038>.
- Al-Lolage, F.A. et al., 2017. A Flexible Method for the Stable, Covalent Immobilization of Enzymes at Electrode Surfaces. *ChemElectroChem*, 4(6), pp.1528–1534.
- Alberts, B. et al., 2009. *Biologia Molecular da Célula* 5^a ed., Porto Alegre: Artmed.
- Andreescu, S. & Marty, J.L., 2006. Twenty years research in cholinesterase biosensors: From basic research to practical applications. *Biomolecular Engineering*, 23(1), pp.1–15.
- Arduini, F. et al., 2017. How cutting-edge technologies impact the design of electrochemical (bio)sensors for environmental analysis. A review. *Analytica Chimica Acta*, 959, pp.15–42. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2016.12.035>.
- Balbás, P., 2001. Understanding the art of producing protein and nonprotein molecules in *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology*, 19(3), pp.251–267.
- Barsoukov, E; MacDonald, J.R., 2005. *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications* 2nd ed. E. B. J. R. Macdonald, ed., New Jersey: Wiley Interscience.
- Bellot, P. et al., 2013. Maltose-binding protein is a potential carrier for oral immunizations. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 152(1–2), pp.101–108. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.09.013>.

- Blankespoor, R. et al., 2005. Dense monolayers of metal-chelating ligands covalently attached to carbon electrodes electrochemically and their useful application in affinity binding of histidine-tagged proteins. *Langmuir*, 21(8), pp.3362–3375.
- Bojarova, P. & Kren, V., 2016. Sugared biomaterial binding lectins: achievements and perspectives. *Biomaterials Science*, pp.1142–1160. Available at: <http://dx.doi.org/10.1039/C6BM00088F>.
- Camby, I. et al., 2006. Galectin-1: A small protein with major functions. *Glycobiology*, 16(11).
- Campo, V.L. et al., 2016. Synthetic glycoconjugates inhibitors of tumor-related galectin-3: an update. *Glycoconjugate journal*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27526114>.
- Carpio, H. et al., 1982. No Title. *Can. J. Chem.*, 60, p.2295.
- Carvalhal, R.F., Freire, R.S. & Kubota, L.T., 2005. Polycrystalline gold electrodes: A comparative study of pretreatment procedures used for cleaning and thiol self-assembly monolayer formation. *Electroanalysis*, 17(14), pp.1251–1259.
- De Carvalho, R.M., Rath, S. & Kubota, L.T., 2003. SPR - Uma nova ferramenta para biossensores. *Quimica Nova*, 26(1), pp.97–104.
- Casero, E. et al., 2010. AFM, SECM and QCM as useful analytical tools in the characterization of enzyme-based bioanalytical platforms. *The Analyst*, 135(8), pp.1878–1903.
- Chaubey, A. et al., 2000. Immobilization of lactate dehydrogenase on electrochemically prepared polypyrrole – polyvinylsulphonate composite films for application to lactate biosensors. *Electrochimica Acta*, 46, pp.723–729.
- Chinaglia, D.L. & Gozzi, G., 2008. Espectroscopia de impedancia no laboratorio de ensino. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, 30(4), p.4505.

- Chuang, C.H. et al., 2016. Immunosensor for the ultrasensitive and quantitative detection of bladder cancer in point of care testing. *Biosensors and Bioelectronics*, 84, pp.126–132. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2015.12.103>.
- Clark, L.C. & Lyons, C., 1962. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 102(1), pp.29–45. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x/full%5Cnhttp://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>.
- Cooper, D.N.W. & Barondes, S.H., 1999. God must love galectins; he made so many of them. *Glycobiology*, 9(10), pp.979–984.
- D’Orazio, P., 2003. Biosensors in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 334(1–2), pp.41–69.
- Damos, F.S., Mendes, R.K. & Kubota, L.T., 2004. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. *Quimica Nova*, 27(6), pp.970–979.
- Evtugyn, G., Porfi, A. & Hianik, T., 2015. Electropolymerized Materials for Biosensors. In A. T. H. K. P. A. P. F. Turner, ed. *Advanced Bioelectronic Materials*. Scrivener Publishing LLC, pp. 89–185.
- Fartas, F.M. et al., 2017. Biosensor based on tyrosinase immobilized on graphene-decorated gold nanoparticle/chitosan for phenolic detection in aqueous. *Sensors (Switzerland)*, 17(5).
- Franco, L.F., 2009. *DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA FUNCIONALIZADA COM POLI(4-HBA) PARA APLICAÇÃO EM SENSORES BIOLÓGICOS*. Federal University of Uberlândia.
- Fritea, L. et al., 2015. Design of a reduced-graphene-oxide composite electrode from an electropolymerizable graphene aqueous dispersion using a cyclodextrin-pyrrole monomer. Application to dopamine biosensing. *Electrochimica Acta*, 178, pp.108–

112.

- Fungaro, D.A. & Brett, C.M.A., 2000. Eletrodos modificados com polímeros perfluorados e sulfonados: Aplicações em análises ambientais. *Química Nova*, 23(6), pp.805–811.
- G Cass, A.E. et al., 1984. Ferrocene-Mediated Enzyme Electrode for Amperometric Determination of Glucose. *Anal. Chem*, 56(2), pp.667–671.
- Gooding, J.J., 2006. Biosensor technology for detecting biological warfare agents: Recent progress and future trends. *Analytica Chimica Acta*, 559(2), pp.137–151.
- Guilbault, G.G. & Montalvo, J.G., 1969. A Urea-Specific Enzyme Electrode. *Journal of the American Chemical Society*, 91(8), pp.2164–2165.
- Hassner, A. & Dehaen, W., 1991. Annulation of Heterocycles via Intramolecular Nitrile Oxide-Heterocycle Cycloaddition Reaction. *Journal of Organic Chemistry*, 56(2), pp.896–900.
- Van Hecke, T. et al., 2017. The potential of herbs and spices to reduce lipid oxidation during heating and gastrointestinal digestion of a beef product. *Food Research International*, 102(June), pp.785–792.
- Homola, J., Koudela, I. & Yee, S.S., 1999. Surface plasmon resonance sensors based on diffraction gratings and prism couplers: sensitivity comparison. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 54(1), pp.16–24.
- Hong, B. et al., 2015. Integration of Faradaic electrochemical impedance spectroscopy into a scalable surface plasmon biosensor for in tandem detection. *Optics Express*, 23(23), p.30237. Available at: <https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=oe-23-23-30237>.
- Huang, Y. et al., 2017. Disease-related detection with electrochemical biosensors: A review. *Sensors (Switzerland)*, 17(10).

- Inzelt, G., 2017. Recent advances in the field of conducting polymers. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 21(7), pp.1965–1975.
- Izyumskaya, N. et al., 2017. Review—Electrochemical Biosensors Based on ZnO Nanostructures. *ECS Journal of Solid State Science and Technology*, 6(8), pp.Q84–Q100. Available at: <http://jss.ecsdl.org/lookup/doi/10.1149/2.0291708jss>.
- Jain, R., Jadon, N. & Pawaiya, A., 2017. Polypyrrole based next generation electrochemical sensors and biosensors: A review. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 97, pp.363–373. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.009>.
- Kotzian, P. et al., 2007. Oxides of platinum metal group as potential catalysts in carbonaceous amperometric biosensors based on oxidases. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 124(2), pp.297–302.
- Kurien, B.T. & Scofield, R.H., 2006. Western blotting. *Methods*, 38(4), pp.283–293.
- Laemmli, U.K. (1970):, 1970. Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227.
- Leffler, H. et al., 2004. Introduction to galectins. *Glycoconjugate Journal*, 19.
- Lima, L.M. De, 2008. Conceitos Básicos de Técnicas em Biologia Molecular 1. *Embrapa*, pp.1–28.
- Lin, D. et al., 2018. Nanostructured indium tin oxide electrodes immobilized with toll-like receptor proteins for label-free electrochemical detection of pathogen markers. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 257, pp.324–330. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2017.10.140>.
- Liu, S. et al., 2018. Manufacturing of an electrochemical biosensing platform based on hybrid DNA hydrogel: Taking lung cancer-specific miR-21 as an example. *Biosensors and Bioelectronics*, 103(November 2017), pp.1–5. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.12.021>.

- Long, F., Zhu, A. & Shi, H., 2013. Recent Advances in Optical Biosensors for Environmental Monitoring and Early Warning. *Sensors*, 13, pp.13928–13948.
- Lourenço, E. V et al., 2001. Toxoplasma gondii micronemal protein MIC1 is a lactose-binding lectin. *Glycobiology*, 11(7), pp.541–7.
- Malhotra, B.D., Chaubey, A. & Singh, S.P., 2006. Prospects of conducting polymers in biosensors. *Analytica Chimica Acta*, 578(1), pp.59–74.
- Mauriz, E., García-Fernández, M.C. & Lechuga, L.M., 2016. Towards the design of universal immunosurfaces for SPR-based assays: A review. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 79, pp.191–198. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.006>.
- Medintz, I.L. & Deschamps, J.R., 2006. Maltose-binding protein: A versatile platform for prototyping biosensing. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(1), pp.17–27.
- Mehrotra, P., 2016. Biosensors and their applications – A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6(2), pp.153–159. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>.
- Naal, Z. et al., 2002. Amperometric TNT biosensor based on the oriented immobilization of a nitroreductase maltose binding protein fusion. *Analytical Chemistry*, 74(1), pp.140–148.
- Naraprawatphong, R., Kawamura, A. & Miyata, T., 2018. Preparation of molecularly imprinted hydrogel layer SPR sensor chips with lectin-recognition sites via SI-ATRP. *Polymer Journal*, 50(3), pp.261–269. Available at: <http://www.nature.com/articles/s41428-017-0013-7>.
- Noah, N.M. et al., 2012. Conducting polyamic acid membranes for sensing and site-directed immobilization of proteins. *Analytical Biochemistry*, 428(1), pp.54–63. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2012.06.008>.

- Oliveira, T.M.B.F. et al., 2013. Biosensor based on multi-walled carbon nanotubes paste electrode modified with laccase for pirimicarb pesticide quantification. *Talanta*, 106, pp.137–143.
- Park, C.S., Yoon, H. & Kwon, O.S., 2016. Graphene-based nanoelectronic biosensors. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 38, pp.13–22. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2016.04.021>.
- Pfeiffer, F. & Mayer, G., 2016. Selection and Biosensor Application of Aptamers for Small Molecules. *Frontiers in Chemistry*, 4(June), pp.1–21. Available at: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fchem.2016.00025/abstract>.
- Pu, J., Zinkus-Boltz, J. & Dickinson, B.C., 2017. Evolution of a split RNA polymerase as a versatile biosensor platform. *Nature Chemical Biology*, 13(4), pp.432–438. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.2299>.
- Rad, A.S. et al., 2012. A new electrochemical biosensor for hydrogen peroxide using HRP/AgNPs/cysteamine/p-ABSA/GCE self-assembly modified electrode. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 29(12), pp.1766–1770.
- Richards, S.-J., Otten, L. & Gibson, M.I., 2016. Glycosylated gold nanoparticle libraries for label-free multiplexed lectin biosensing. *J. Mater. Chem. B*, 4, pp.3046–3053. Available at: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/tb/c5tb01994j>.
- Rubab, M. et al., 2018. Biosensors for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* in food. *Biosensors and Bioelectronics*, 105(November 2017), pp.49–57.
- Sadat, Z., Mohsennia, M. & Ra, H., 2018. Immobilization of cytochrome c and its application as electrochemical biosensors. *Talanta*, 176(May 2017), pp.195–207.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A laboratory manual* 3rd ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sassolas, A., Blum, L.J. & Leca-bouvier, B.D., 2012. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, 30(3), pp.489–511. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.003>.
- Science, S. & Co, N.P., 1974. Action d'oxydations et de reductions électrochimiques successives sur la structure superficielle d' electrodes d'or polycristallines. *Surface Science*, 46, pp.265–281.
- Sean R. Stowell; Richard D., 2016. *Galectins Methods and Protocols* Sean R. Stowell; Richard D. Cummings, ed., Humana Press.
- Sean R. Stowell & Richard D. Cummings, 2015. *Galectins Methods and Protocols* 1 ed., New York: Humana Press.
- Setford, S.J. & Newman, J.D., 2005. Enzyme Biosensors. *Microbial Enzymes and Biotransformations*, 17, pp.29–60. Available at: <http://link.springer.com/10.1385/1-59259-846-3:029>.
- Shen, K.-H. et al., 2016. Role of galectin-1 in urinary bladder urothelial carcinoma cell invasion through the JNK pathway. *Cancer Science*, (23). Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/cas.13016>.
- Shichiri, M. et al., 1982. Wearable Artificial Endocrine Pancreas With Needle-Type Glucose Sensor. *The Lancet*, 320(8308), pp.1129–1131.
- Shu, Z. et al., 2014. Expression, purification and characterization of galectin-1 in Escherichia coli. *Protein Expression and Purification*, 99, pp.58–63. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2014.03.013>.
- Skretas, G. et al., 2007. Engineered chimeric enzymes as tools for drug discovery: Generating reliable bacterial screens for the detection, discovery, and assessment of estrogen receptor modulators. *Journal of the American Chemical Society*, 129(27), pp.8443–8457.

- Souto, D.E.P., 2012. *DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSENSOR PELA TÉCNICA DE RESSONÂNCIA DE PLÁSMONS DE SUPERFÍCIE PARA DETECÇÃO EM TEMPO REAL DE ANTICORPOS ANTI - LEISHMANIA INFANTUM DIAMANTINA*. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.
- Souto, D.E.P. et al., 2013. Development of a label-free immunosensor based on surface plasmon resonance technique for the detection of anti-Leishmania infantum antibodies in canine serum. *Biosensors and Bioelectronics*, 46, pp.22–29.
- St-Pierre, C. et al., 2012. Galectin-1-specific inhibitors as a new class of compounds to treat HIV-1 infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(1), pp.154–162.
- Suni, I.I., 2008. Impedance methods for electrochemical sensors using nanomaterials. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 27(7), pp.604–611.
- Takada, K. et al., 2002. Study of Specific Binding of Maltose Binding Protein to Pyrrole-Derived Bipyridinium Film by Quartz Crystal Microbalance. *Langmuir*, 18(14), pp.4892–4897.
- Takada, K., Naal, Z. & Abrunã, D., 2003. Detailed Study of N - (3-Pyrrol-1-yl-propyl) - 4 , 4 ' -bipyridinium (PPB) Electropolymerization. *Langmuir*, 19(8), pp.5402–5406.
- Tang, Z. et al., 2018. A sensitive sandwich-type immunosensor for the detection of galectin-3 based on N-GNRs-Fe-MOFs@AuNPs nanocomposites and a novel AuPt-methylene blue nanorod. *Biosensors and Bioelectronics*, 101(September 2017), pp.253–259. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.10.026>.
- Teles, F.R.R. & Fonseca, L.P., 2008. Trends in DNA biosensors. *Talanta*, 77(2), pp.606–623.
- Thévenot, D.R. et al., 2001. Electrochemical Biosensors: Recommended definitions and classification. *Analytical Letters*, 34(5), pp.635–659. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/AL-100103209>.

- Tkach, V., Nechyporuk, V. & Yagodynets, P., 2015. The mathematical description for the electropolymerization of furan , pyrrole and thiophene derivatives in alkaline media. , 3(6), pp.1122–1128.
- Tran, T.B., Son, S.J. & Min, J., 2016. Nanomaterials in label-free impedimetric biosensor: Current process and future perspectives. *Biochip Journal*, 10(4), pp.318–330.
- Varela H.; Malta M.; Torresi, R.M., 2000. Técnicas in situ de baixo custo em eletroquímica: A microbalança de cristal de quartzo. *Química Nova*, 23(5), pp.618–622.
- Varki, A. et al., 2009. *Essentials of Glycobiology* 2nd ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Vornholt, W., Hartmann, M. & Keusgen, M., 2007. SPR studies of carbohydrate-lectin interactions as useful tool for screening on lectin sources. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(12), pp.2983–2988.
- Wu, Q. et al., 1997. A nitrite biosensor based on a maltose binding protein nitrite reductase fusion immobilized on an electropolymerized film of a pyrrole-derived bipyridinium. *Analytical chemistry*, 69(23), pp.4856–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9406533>.
- Yáñez-Sedeño, P., Campuzano, S. & Pingarrón, J., 2017. Carbon Nanostructures for Tagging in Electrochemical Biosensing: A Review. *C*, 3(1), p.3. Available at: <http://www.mdpi.com/2311-5629/3/1/3>.
- Yang, H. et al., 2016. Detection of Escherichia coli with a label-free impedimetric biosensor based on lectin functionalized mixed self-assembled monolayer. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 229, pp.297–304. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2015.08.034>.

- Yang, Z. et al., 1995. Analytical Application of Self-Assembled Monolayers on Gold Electrodes - Critical Importance of Surface Pretreatment. *Biosensors & Bioelectronics*, 10(9–10), pp.789–795.
- Ying-Sing, F., Shi-Hui, S. & De-Rong, Z., 2000. Piezoelectric crystal for sensing bacteria by immobilizing antibodies on divinylsulphone activated poly-m-aminophenol film. *Talanta*, 51(1), pp.151–158.
- Zhang, Y. et al., 2015. ZnO nanostructures in enzyme biosensors. *Science China Materials*, 58(1), pp.60–76. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s40843-015-0017-6>.
- Zhu, Z., 2017. An Overview of Carbon Nanotubes and Graphene for Biosensing Applications. *Nano-Micro Letters*, 9(3), pp.1–24.

7. MATERIAL SUPLEMENTAR

1. Espectros RMN

1.1 Espectro PPB

1.2 Espectro 1,3-Bromo-propil pirrol

2. Análises EIE

Em todas as análises foram mantidas as mesmas condições experimentais previamente descritas: Amplitude de 10 mV na faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz; tampão PBS (pH 7,4) contendo hexacianoferrato(II) e (III) de potássio 2,5 mmol L⁻¹ (1:1).

2.1 Controles utilizando BSA

2.2 Interação do alvo com eletrodo

2.3 Ensaios com eletrodo de ouro

3. Análises SPR

Para a realização dos cálculos de cobertura superficial foi utilizada uma ferramenta do programa Kinetic Evaluation chamada **Conversion Tool**, os dados necessários para este cálculo são mostrados na figura abaixo:

Conversion Tool

Plots
EletroPPB_MBPGal1_50uM
Start Point [m°] 48.7171
End Point [m°] 369.6472

Surface Density

$$\frac{\Delta \text{ Response [m°]} }{\text{Conversion Factor [m°.[mm}^2\text{/ng]]}} = \frac{320.9301}{122} = 2.6306 \text{ ng/mm}^2$$

Amount

$$\text{Surface Density [ng/mm}^2\text{]} \times \text{Surface Area [mm}^2\text{]} = 2.6306 \times 7.9 = 20.7817 \text{ ng}$$

Number Bound Molecules

$$\frac{\text{Amount [ng]} }{\text{Mol. Mass [g/mol]}} \times \frac{10^{-9}[\text{g}]}{[\text{ng}]} \times \text{Avogadro [mol}^{-1}\text{]} = \frac{20.7817}{57800} \times 6.022 \times 10^{14} = 2.1652\text{E+11}$$

Copy to Clipboard
OK