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

Funcionalização de eletrodos via redução eletroquímica de derivado de arildiazônio-4,4-bipiridina e sua aplicação na construção de um biossensor de lactose baseado na imobilização da Galectina-1 fusionada à *Maltose Binding Protein* (MBPGal-1).

Miquéias Ferreira 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

2019

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

Funcionalização de eletrodos via redução eletroquímica de derivado de arildiazônio-4,4-bipiridina e sua aplicação na construção de um biossensor de lactose baseado na imobilização da Galectina-1 fusionada à *Maltose Binding Protein* (MBPGal-1).

Miquéias Ferreira 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

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Ferreira Gomes, Miquéias

Funcionalização de eletrodos via redução eletroquímica de derivado de arildiazônio-4,4-bipiridina e sua aplicação na construção de um biossensor de lactose baseado na imobilização da Galectina-1 fusionada à *Maltose Binding Protein* (MBPGal-1).

103 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. Eletrodo modificado. 2. Redução eletroquímica de arildiazônio. 3. Reação *click*. 4. Proteína fusionada. 5. Galectina-1. 6. Biossensor. 7. Espectroscopia de capacitância eletroquímica.

*Aos meus pais, Jânio e Eurípia;
meus irmãos, Letícia e Kléber (em memória);
e a minha esposa, Pâmela Gomes.*

Vocês são os motores que me impulsionam a ser uma pessoa melhor a cada dia!

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

- ✚ *Agradeço a Deus pelo dom da vida, pela minha saúde física e mental, pela família que tenho, e por me iluminar minha durante o doutorado.*
- ✚ *Agradeço a minha amada esposa, Pâmela Oliveira Martins Gomes. Esposa carinhosa; leal companheira; nobre amiga; mulher forte e dedicada; e agora és também uma mãezona que eu admiro e me apaixono mais a cada dia. Sua companhia enriquece minha vida de alegria e motivação.*
- ✚ *Ao meu filho querido, Murilo Martins Gomes... nosso anjo que veio lá do céu... nossa estrelinha que veio abrilhantar nossas vidas... que chegou na reta final desse trabalho trazendo a inspiração que eu precisava para finalizá-lo. A você, todo o meu amor e dedicação!*
- ✚ *Agradeço ao meu pai, Jânio Donizete Ferreira Gomes. Pai dedicado; filósofo de formação e natureza; historiador aplicado; escritor talentoso; cantor ilustre; (...); nobre amigo e leal companheiro. Sua imensa sabedoria, caráter e honestidade sempre me guiaram, e continuarão guiando, com coragem e determinação por todos os caminhos da vida.*
- ✚ *A minha mãe, Eurípia Cândida Gomes. Mãe carinhosa e dedicada; companheira leal e amiga ilustre; um verdadeiro exemplo de dedicação aos filhos. Seus ensinamentos me acompanharão pela vida toda.*
- ✚ *A minha irmã, Letícia Perpétua Gomes de Moraes. Irmã não apenas por laços sanguíneos, mas por atitude. Mulher forte e aguerrida. Seu apoio, sua amizade e sua proteção são exemplos que levarei comigo onde quer que eu esteja.*
- ✚ *Ao meu irmão, Kléber Ferreira Gomes (em memória). Nobre irmão; companheiro leal; amigo para toda hora. Sua presença física a muito foi perdida, mas sua companhia jamais será. Com você aprendi a ser forte e a enfrentar os desafios da vida com inteligência e bravura.*
- ✚ *As minhas sobrinhas, Carolinna Élide Gomes de Moraes e Laura Gomes de Moraes, pelas quais busco ser um bom exemplo e uma pessoa melhor a cada dia.*

- ✚ Agradeço a minha filha de quatro patas, Norah Gomes, que nos trouxe muita alegria e arrancou muitos sorrisos mesmos nos dias mais difíceis que passamos ao longo dessa caminhada rumo ao doutorado.
- ✚ Ao nobre amigo e irmão por escolha, Leandro Nériton Cândido Máximo. Que realizou seu doutorado no mesmo período, e que, durante esses tempo, foi também um companheiro de viagem, de aflições, de estudo e de longos desabafos.
- ✚ Aos amigos, compadres e irmãos por escolha, Weberson e lezza, e ao nosso afilhado, Humberto, cuja amizade e convivência sempre nos lembrou que não há nada mais importante na vida do que a família.
- ✚ Aos meus amigos de infância, Rodrigo Batista (em memória), Marcos Denílson e Júlio César, cuja amizade superou o tempo e a distância. Os longos churrascos em Goiás aliviaram significativamente a pressão durante a longa jornada em busca do doutorado.
- ✚ Agradeço meu orientador, Prof. Dr. Zeki Naal, que possibilitou a realização deste trabalho. Serei sempre grato pela confiança, pela paciência, pelos ensinamentos e pela amizade.
- ✚ A Profa. Dra. Rose Mary Zumstein Georgetto Naal e demais colegas do BiosSiNE, David Tatsuo, Ana Cláudia Bordonal, Bianca, Márcia Andréia, Letícia, Bruna Massarioli, Amanda, Jéssica, Gleicy, Raphaela e Sara. A convivência com vocês tornou os dias menos pesado e trouxe um pouco de diversão a essa dura caminhada.
- ✚ Um agradecimento especial às amigas e técnicas do BiosSiNe, Laila Deliberto e Maria Perpétua, que, além de todo o suporte técnico, foram também um ombro amigo importante que me ajudou a ficar de pé diante dos desafios inerentes ao dia a dia da pesquisa.
- ✚ Agradeço aos professores do LSO, Prof. Dr. Paulo Marcos Donate, Prof. Dr. Antônio Eduardo Miller Crotti e Prof. Dr. Gil Valdo José da Silva, por me receberem de braços abertos no famoso Laboratório de Síntese Orgânica. Um agradecimento especial ao Prof. Donate pela parceria nessa pesquisa.
- ✚ A todos os colegas do LSO, especialmente aos amigos Daniel Previdi e Wesley Romário, que participaram diretamente dessa pesquisa, Herbert, Tati, Matheus e Kimie, cuja convivência somou, em muito, para minha formação profissional e pessoal.

- ✚ Ao Prof. Dr. Marcelo Mulato por me receber de braços abertos no SENSORMAT, e a nobre colega Profa. Dra. Marina Batistuti, por todo o suporte oferecido durante os experimentos de Impedância e Capacitância Eletroquímica.
- ✚ A Profa. Dra. Ivone Carvalho, por me receber em seu laboratório. E ao técnico Marcelo por me acompanhar na síntese da azida-maltose.
- ✚ 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: Camila, Mariete, Natacha, Felipe, Gabriele, Natália, Ricardo e Bruna, cujo convívio ajudou para que eu nunca me sentisse sozinho nessa empreitada.
- ✚ Aos colegas do laboratório do Prof. Dr. Flávio Emery por toda ajuda na purificação de produtos e no empréstimo de materiais e reagentes.
- ✚ Ao Prof. Dr. Marcelo Baruffi pela parceria nessa pesquisa, e aos seus alunos do LABIGIM pelo suporte na produção do material biológico utilizado nesse trabalho.
- ✚ Agradeço ao amigo e treinador, Itamar (o Ultraita), por me apresentar ao mundo das corridas de rua. Correr foi determinante para manter meu corpo e minha mente saudáveis durante essa jornada.
- ✚ A todos os colegas da corrida da equipe Ultraita e da Pacer Academia, pelos valiosos momentos de descontração nos treinos e nas corridas.

A todos vocês, meu muito obrigado!

Tirem as máscaras que os condicionam no mundo da representação. Procurem olhar a realidade além do véu que a encobre (a linguagem). Deixem de ser vaidosas, pretensiosas, convenientes, enfim.

Jânio Donizete Ferreira Gomes

RESUMO

Funcionalização de eletrodos via redução eletroquímica de derivado de arildiazônio-4,4-bipiridina e sua aplicação na construção de um biossensor de lactose baseado na imobilização da Galectina-1 fusionada à *Maltose Binding Protein* (MBPGal-1).

A proteína de ligação a maltose (MBP) é amplamente conhecida na literatura como um marcador para métodos de purificação de afinidade e é frequentemente fusionada a proteínas relevantes para melhorar seu rendimento, facilitando sua purificação e aumentando sua estabilidade e solubilidade. Por outro lado, foi relatado que o nitrogênio piridínico não quaternizado do filme eletropolimerizado com N-(3-pirrol-1-ilpropil)-4,4'-bipiridínio (PPB) desempenhou um papel importante na imobilização da proteína de ligação da maltose (MBP). Neste trabalho relatamos a modificação do eletrodo de carbono vítreo (CV) pela redução eletroquímica do derivado de arildiazônio piridínico gerado *in situ* e seu uso na imobilização da proteína MBP fusionada à galectina-1 (MBP-Gal-1). Resultados de voltametria cíclica mostraram formação de monocamadas com carga positiva sobre CV e que o nitrogênio não quaternizado da piridina estava disponível após a modificação. Os resultados da Espectroscopia de Capacitância Eletroquímica (ECC) indicaram que o domínio do MBP foi importante para a interação do eletrodo modificado. O tempo de imobilização e a concentração de proteína fusionada também foram relevantes para a cinética e os resultados sugeriram uma saturação em 40 minutos de interação, utilizando $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MBP-Gal-1. Experimentos de detecção de lactose indicaram que a atividade da galectina-1 foi preservada após a imobilização. A reação *click* realizada para promover a inclusão da maltose na superfície desse eletrodo modificado gerou resultados significativamente melhores quando comparados aos do eletrodo sem a maltose ligada em sua superfície: a proteína fusionada MBP-Gal-1 demonstrou um aumento de 62% na imobilização. Também foram observados aumentos na sensibilidade para detecção de lactose (72%) e na especificidade de interação com este mesmo carboidrato (77%).

Palavras-chave: derivado de diazônio piridínico; eletrodo eletroquimicamente modificado; reação *click*; proteína de ligação da maltose; galectina-1.

ABSTRACT

Functionalization of electrodes by electrochemical reduction of aryldiazonium-4,4'-bipyridine derivative and its application for the construction of a lactose biosensor based on the immobilization of Galectin-1 fused to Maltose Binding Protein (MBP-Gal-1).

Maltose Binding Protein (MBP) is widely known in the literature as a tag for affinity purification methods and it is often fused to relevant proteins to improve its yield, facilitating its purification and enhance its stability and solubility. On the other hand, it was reported that the nonquaternized pyridine nitrogen from N-(3-pyrrol-1-ylpropyl)-4,4'-bipyridinium electropolymerized film (PPB) played an important role for the immobilization of maltose binding protein (MBP). In this work we reported the glassy carbon electrode (GCE) modification by electrochemical reduction of pyridinium diazonium salt derivative generated in situ and its use on MBP fused to Galectin-1 protein (MBP-Gal-1) immobilization. Cyclic voltammetry results showed a positively charged monolayer formation onto GCE and that nonquaternized pyridine nitrogen was available after modification. Electrochemical Capacitance Spectroscopy (ECS) results indicated that the MBP domain was important for the modified electrode interaction. Immobilization time and the fused protein concentration were also relevant to the kinetics and the results suggested a monolayer saturation in 40 minutes of interaction, using 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ MBP-Gal-1. The click reaction performed to promote the inclusion of maltose on the surface of this modified electrode generated better results when compared to those of the electrode without maltose bounded to its surface: the MBP-Gal-1 fused protein demonstrated a 62% increase in immobilization. Increases in sensitivity for lactose detection (72%) and specificity of interaction with this same carbohydrate (77%) were also observed.

Keywords: pyridinium diazonium derivative; electrochemically modified electrode; Click chemistry; maltose binding protein; galectin-1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do funcionamento de um biossensor. 20

Figura 2: Representação esquemática da funcionalização da superfície do eletrodo via redução eletroquímica de um grupo araldiazônio.	24
Figura 3: Exemplo da síntese de um triazol catalisada por cobre.	24
Figura 4: Esquema representativo dos quatro principais métodos de imobilização de biomoléculas. (a) adsorção, (b) ligação covalente, (c) Oclusão (d) ligação cruzada.	26
Figura 5: Representação esquemática da modificação do eletrodo via redução eletroquímica do grupo arildiazônio e sua utilização na construção do biossensor I.	35
Figura 6: Representação esquemática da modificação do eletrodo via reação click e sua utilização na construção do biossensor I.	37
Figura 7: Mecanismo de acetilação da maltose utilizando ácido perclórico como catalizador.	44
Figura 8: Espectros de FT-IR obtidos em pastilha de KBr para (A) maltose e (B) octa-O-acetil-maltose.	45
Figura 9: Mecanismo para a reação de obtenção da 2,2',3,3',4',6,6'-hepta-O-acetil- α -maltosil-brometo considerando o efeito anomérico.	46
Figura 10: Mecanismo para a reação de obtenção da 2,2',3,3',4',6,6'-hepta-O-acetil- α -maltosil-brometo considerando o efeito anomérico. Formação do i) íon oxazolina e ii) sua estrutura de ressonância.	47
Figura 11: Espectros de FT-IR obtidos em pastilha de KBr para (A) octa-O-acetil-maltose e (B) 2,2',3,3',4',6,6'-hepta-O-acetil- α -maltosil-brometo.	48
Figura 12: Mecanismo para a reação entre 2,2',3,3',4',6,6'-hepta-O-acetil- α -maltosil-brometo e NaN_3	49
Figura 13: Espectros de FT-IR obtidos em pastilhas de KBr para (A) 2,2',3,3',4',6,6'-hepta-O-acetil- α -maltosil-brometo e (B) 2,2',3,3',4',6,6'-hepta-O-acetil- β -maltosil-azida.	50

Figura 14: A) Obtenção do 1-(4-nitrofenil)metil)-4,4'-bipiridina como um precipitado amarelo. B) Redução do grupo nitro em reator de hidrogênio. C) Representação da clivagem observada após obtenção do grupo amina.	52
Figura 15: Representação da síntese do brometo de 1-[2-(4-aminofenil)etil]-4,4'-bipiridina.....	53
Figura 16: Espectro de FTIR obtido em pastilha de KBr a partir do composto 4, com destaque para as principais bandas observadas.	54
Figura 17: Representação esquemática da obtenção de +N ₂ -β-bipy (Etapa I) e sua redução eletroquímica na superfície do eletrodo (Etapa II).	55
Figura 18: Voltamogramas cíclicos obtidos em HCl 0,5 mol L ⁻¹ contendo 1,0 mmol L ⁻¹ de +N ₂ -β-bipy durante a modificação do eletrodo de (A) CV e (B) ITO, a 100 mV s ⁻¹ , 20 ciclos.....	56
Figura 19: Representação esquemática da formação de ligações Ar-N=N-Ar (Esquema A) e de C-C (Esquema B) durante a modificação dos eletrodos de CV e ITO.	57
Figura 20: Voltamogramas obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,4, a 100 mV s ⁻¹ , contendo 1 mmol L ⁻¹ de K ₃ [Fe(CN) ₆] e K ₄ [Fe(CN) ₆] em (A) e (C), e 1 mmol L ⁻¹ de [Ru(NH ₃)]Cl ₃ em (B) e (D). Sendo (a) antes e (b) após a modificação.....	58
Figura 21: Voltamogramas cíclicos obtidos em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,4, a 100 mV s ⁻¹ , para eletrodo de CV em A e ITO em B, sendo (a) antes e (b) após a modificação.	59
Figura 22: Voltamogramas obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,4, a 100 mV s ⁻¹ , para (A) CV/β-bipy e (B) ITO/ β-bipy. Total de 12 ciclos.	60
Figura 23: Voltamogramas obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,4 para eletrodo de CV, sendo (A) contendo 1 mmol L ⁻¹ de K ₃ [Fe(CN) ₆] e K ₄ [Fe(CN) ₆], e (B) contendo 1 mmol L ⁻¹ de [Ru(NH ₃)]Cl ₃ ; e para eletrodo de ITO, sendo (C) contendo 1 mmol L ⁻¹ de K ₃ [Fe(CN) ₆] e K ₄ [Fe(CN) ₆], e (D) contendo 1 mmol L ⁻¹ de [Ru(NH ₃)]Cl ₃ . Os voltamogramas (a) representam os eletrodos antes de serem estabilizados em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,4, e (b) após serem estabilizados.....	61

Figura 24: Diagramas de Nyquist registrados em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4) contendo 2,5 mmol L⁻¹ de [Fe(CN)₆]³⁻ e [Fe(CN)₆]⁴⁻ para (▪) eletrodo CV limpo, (●) CV/β-Bipy antes e (Δ) após estabilizar em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4). 62

Figura 25: Voltamogramas cíclicos registrados em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4) para (A) eletrodo CV/β-Bipy após ficar submerso por 1 hora em solução 50 mmol L⁻¹ [RuCl₅(H₂O)]²⁻, e (B) registrado após (A). Velocidade de varredura 20 mV s⁻¹, 10 ciclos. 64

Figura 26: (A) Processo de redução e oxidação do [RuCl₅(H₂O)]²⁻ na superfície do eletrodo CV/β-Bipy. (B) Reação entre o nitrogênio não-quaternizado da piridina e o [RuCl₅(H₂O)]²⁻ gerado eletroquimicamente na superfície do eletrodo CV/β-Bipy. (C) Processos de redução e oxidação obtidos após (B). 65

Figura 27: (A) Diagrama de Nyquist para Impedância e (B) correspondente capacitância para (▪) CV/β-Bipy, (●) CV/β-Bipy/RuCl₅ após varredura potencial até 1,0 V, e (Δ) CV/β-Bipy/RuCl₅ após varredura potencial até 1,0 V em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4). 67

Figura 28: (A) Gráfico de Nyquist para impedância e (B) correspondente capacitância do (▪) CV/β-Bipy, (●) CV/β-Bipy após a imobilização do MBP-Gal-1 e (Δ) CV/β-Bipy após maltose/MBP-Gal-1 a 7 μmol L⁻¹ em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4). (C) Diagramas de Bode da parte imaginária da função capacitiva complexa. Tempo de imobilização de 4 horas. 69

Figura 29: (A) Diagramas de Bode da parte imaginária da função capacitiva complexa registrada em solução tampão de fosfato de 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4) para CV/β-Bipy após 7 μmol L⁻¹ de MBP-Gal-1 com imobilização em diferentes períodos. (B) Porcentagem da C'' observada a 1000 Hz para diferentes períodos de imobilização. 71

Figura 30: Diagramas de Bode da parte imaginária da função capacitiva complexa registrada em solução tampão de fosfato de 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4) para CV/β-Bipy após 30 minutos de imobilização de MBP-Gal-1 em diferentes concentrações. A capacitância imaginária máxima (A) diminui para concentrações menores que 7 μmol L⁻¹ e (B) aumenta para valores superiores a 7 μmol L⁻¹ de MBP-Gal-1. 73

Figura 31: Porcentagem da variação de $\Delta C''$ após $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de lactose imobilizados durante 30 minutos na superfície de eletrodos de CV/ β -Bipy/MBP-Gal-1. Os eletrodos CV/ β -Bipy foram submersos em PBS contendo $7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MBP-Gal-1 durante 30 minutos. 74

Figura 32: (A) Diagrama de Bode da parte imaginária da função capacitiva complexa obtido em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) para o eletrodo CV/ β -Bipy/MBP-Gal-1 após diferentes tempos de imobilização de lactose a $5 \mu\text{mol L}^{-1}$. (B) decréscimo da $\%C''$ observado em 1000 Hz. 75

Figura 33: Diagrama de Bode da parte imaginária da função capacitiva complexa registrado em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) para o eletrodo CV/ β -Bipy/MBP-Gal-1 após imobilização de lactose durante 60 minutos em diferentes concentrações. 76

Figura 34: Decréscimo da $\%C''$, observado em 1000 Hz, para diferentes carboidratos imobilizados durante 60 minutos a $7 \mu\text{mol L}^{-1}$. A cor cinza representa o eletrodo CV/ β -Bipy/MBP-Gal-1, e a verde a detecção de cada alvo. 77

Figura 35: Representação esquemática da obtenção do eletrodo CV/ β -bipy/Mal via reação click. 77

Figura 36: Voltamogramas cíclicos registrados em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) para diferentes etapas de modificação do eletrodo de CV. Velocidade de varredura 100 mV s^{-1} 78

Figura 37: (A) Correspondente gráfico de Nyquist para capacitância obtido em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) para diferentes etapas de modificação do eletrodo. (B) Diagramas de Bode da parte imaginária da função capacitiva complexa. 79

Figura 38: Voltamogramas cíclicos registrados em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7.4) para o eletrodo CV/ β -bipy/Mal antes (em preto) e após (em vermelho) ficar submerso durante 1,5 horas em solução $50 \text{ mmol L}^{-1} [\text{RuCl}_5(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$. Velocidade de varredura 20 mV s^{-1} 80

Figura 39: (A) Diagrama de Nyquist da parte imaginária da função complexa da capacitância registrado em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7.4), e (B) correspondente diagramas de

Bode. (C) Valores de C'' observados na frequência de 1000 Hz para diferentes tempos de imobilização da lactose a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$. A MBP-Gal-1 foi imobilizada durante 1 hora. 83

Figura 40: (A) Diagrama de Nyquist da parte imaginária da função complexa da capacitância registrado em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4), e (B) correspondente diagramas de Bode da parte imaginária da função capacitiva complexa. (C) Valores de C'' observados na frequência de 1000 Hz para diferentes concentrações de lactose. A MBP-Gal-1 foi imobilizada durante 1 hora, e a lactose durante 30 minutos..... 84

Figura 41: (A) Decréscimo da $\%C''$ observado em 1000 Hz para diferentes alvos imobilizados durante 30 minutos a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4). 85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Porcentagem do decaimento da corrente de pico (I_p) de oxidação e de redução para as sondas redox aniônica e catiônica após a modificação 58

Tabela 2: Comparação entre as respostas observadas para a imobilização da MBP-Gal-1 e da MBP-Gal-1 ligada a maltose (maltose-MBP-Gal-1) 81

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C: graus Celsius

µg: micrograma

μL: microlitro

μm: micrometro

μmol: micromol

cm: centímetro

CRD: Do inglês, *Carbohydrate Recognition Domain*, cuja tradução é Domínio de Reconhecimento de Carboidratos

C': Capacitância real

C'': Capacitância imaginária

E: Potencial elétrico

EIE: Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

ECE: Espectroscopia de Capacitância Eletroquímica

Gal-1: Galectina-1

h: hora

Hz: Hertz

ITO: Óxido de índio-estanho

J: Constante de acoplamento

kDa: kilodalton

L: Litro

m/z: Razão massa/carga

mA: miliampere

MBP: Do inglês, *Maltose Binding Protein*, cuja tradução é Proteína de Ligação da Maltose

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

mg: miligrama

mL: mililitro

mmol: milimol

nm: nanômetro

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

pH: potencial Hidrogeniônico

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

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

V: volt

VC: Voltametria Cíclica

Z': Impedância real

Z'' : Impedância imaginária

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Biossensores	20
1.2. Eletrodos modificados	23
1.3. Imobilização de biomoléculas	25
1.4. Galectinas	30
1.5. Biossensor para lactose	31
2. OBJETIVOS	33
2.1. Objetivo Geral	33
2.2. Objetivos Específicos	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1. Síntese da Azida-Maltose	38
3.2. Síntese do brometo de 1-[2-(4-aminofenil)etil]-4,4'-bipiridina	39
3.3. Modificação dos eletrodos de CV e ITO por redução eletroquímica do brometo de 1-[2-(4-diazofenil)etil]-4,4'-bipiridina	40
3.4. Reação <i>click</i> na superfície do eletrodo	41
3.5. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) e Espectroscopia de Capacitância Eletroquímica (ECE)	41
3.6. Imobilização da MBP-Gal-1	42
3.7. Imobilização da lactose e outros açúcares	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1. Modificação dos eletrodos	43
4.1.1. Síntese da Azida-Maltose	43
4.1.2. Síntese do brometo de 1-[2-(4-aminofenil)etil]-4,4'-bipiridina	51
4.1.3. Modificação dos eletrodos de CV e ITO por redução eletroquímica do brometo de 1-[2-(4-diazofenil)etil]-4,4'-bipiridina	54

4.1.4. Comportamento eletroquímico do eletrodo CV/ β -Bipy após interação com o complexo $[\text{RuCl}_5(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$	63
4.2. Biossensor para lactose usando o eletrodo CV/ β -Bipy	68
4.2.1. Imobilização de MBP-Gal-1 na superfície do eletrodo CV/ β -Bipy	68
4.2.1. Detecção de lactose usando o eletrodo CV/ β -Bipy/MBP-Gal-1	73
4.3. Adição de maltose na superfície do eletrodo CV/ β -bipy via reação <i>click</i>	77
4.4. Biossensor para lactose usando o eletrodo CV/ β -Bipy/Mal	80
4.4.1. Imobilização de MBP-Gal-1 na superfície do eletrodo CV/ β -Bipy/Mal	81
4.4.2. Detecção de lactose usando o eletrodo CV/ β -Bipy/Mal/MBP-Gal-1	82
5. CONCLUSÕES	85
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
7. MATERIAL SUPLEMENTAR	97
ANEXO I	97
Espectro MS-TOF para acetil-maltose	97
Espectro MS-TOF para acetil-bromo-maltose	98
Espectro MS-TOF para acetil-azida-maltose	99
ANEXO II	100
RMN ^1H em D_2O (400 MHz) para 1-(4-aminophenethyl)-[4,4'-bipyridin]-1-ium bromide	100
RMN ^{13}C em D_2O (400 MHz) para 1-(4-aminophenethyl)-[4,4'-bipyridin]-1-ium bromide	101
Espectro de RMN ^1H obtido para a 2,2',3,3',4',6,6'-hepta- <i>O</i> -acetil- β -maltosil-azida.	102

1. INTRODUÇÃO

1.1. Biossensores

Um sensor químico é um dispositivo que transforma uma informação química recebida por uma molécula (receptor químico) em um sinal analiticamente útil em um transdutor físico-químico. Quando a informação química provém de um sistema bioquímico (receptor biológico ou biorreceptor) estes dispositivos são chamados de **biossensores** (Turner, Karube and Wilson, 1987). O uso de um material de origem biológica imobilizado na superfície do transdutor, tal como proteínas, anticorpos, antígenos, DNA, células, tecidos, organelas, confere aos biossensores uma elevada seletividade pelo seu analito, pois, o sinal a ser mensurado é baseado na alta especificidade entre biomoléculas como, por exemplo, na formação do complexo antígeno-anticorpo e na interação entre uma enzima e seu substrato. Nesse sistema, o transdutor é responsável por converter o evento bioquímico em um sinal físico ou químico mensurável (Zhang *et al.*, 2015), logo, sua escolha dependerá do tipo de sinal que se deseja detectar (Figura 1).

Figura 1: Representação esquemática do funcionamento de um biossensor.

O termo biossensor foi utilizado pela primeira vez em 1962 quando os pesquisadores Clark e Lyons explicaram como produzir sensores eletroquímicos mais inteligentes incorporando enzimas ao transdutor eletroquímico (ou eletrodo) utilizando membranas (Clark and Lyons, 1962). O conceito foi ilustrado por um experimento no qual a glicose oxidase foi aprisionada em um eletrodo usando uma membrana de diálise. A diminuição da concentração medida de oxigênio era proporcional à concentração de

glicose. Desde então, o desenvolvimento de tais dispositivos tem ganhado mais espaço em diversas áreas como, por exemplo, indústria alimentícia (Van Hecke *et al.*, 2017), engenharia química (Park, Yoon and Kwon, 2016), meio ambiente (Arduini *et al.*, 2017) e saúde (Chuang *et al.*, 2016), dentre outras.

Os biossensores podem ser classificados como catalíticos ou de afinidade. Os biossensores catalíticos são capazes de detectar o produto de uma reação catalisada por enzimas ou microorganismos. Já os biossensores de afinidade utilizam biomoléculas que realizam uma reação de afinidade com o analito como, por exemplo, anticorpos, DNA, peptídeos e lectinas (Gooding, 2006).

Outra maneira de classificar esses dispositivos é de acordo com o tipo de biomolécula imobilizada sobre o transdutor (biorreceptor). Quando o biorreceptor é o fragmento de uma simples fita de DNA ou oligonucleotídeos o biossensor é classificado como Genossensor e, neste caso, é detectada a interação com o fragmento complementar que regenera a dupla fita de DNA num processo denominado de hibridização (Swaile and Chambers, 1991; Liu *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 2004, 2006; Teles and Fonseca, 2008). Quando o biorreceptor é uma enzima o biossensor é classificado como Biossensor Enzimático e, neste caso, seu princípio de funcionamento é baseado na reação específica da enzima sobre um determinado substrato (Davis, J., Huw Vaughan, D. and Cardosi, 1995; D’Orazio, 2003). Já os biossensores classificados como Microbiológicos consistem na imobilização de células microbiológicas sobre o transdutor, e sua operação é baseada no uso das funções metabólicas e respiratórias do microorganismo para detectar um analito que seja o substrato ou um inibidor destes processos. Por fim, um biossensor é classificado como Imunossensor quando este é capaz de detectar a interação específica entre um antígeno e um anticorpo, e, neste caso, o biorreceptor pode ser o antígeno ou o anticorpo (D’Orazio, 2003).

A capacidade do biorreceptor em reconhecer seu alvo complementar em uma mistura complexa como o sangue, por exemplo, aliada a capacidade do transdutor de quantificar concentrações extremamente baixas, na ordem de micromols e até picomols por litro, por exemplo, que os dispositivos biossensores possuem já seriam características suficientemente vantajosas se os compararmos com os métodos analíticos clássicos. Porém, os biossensores apresentam mais uma característica que os favorece, que é a possibilidade de miniaturização. Tais características conferem a esses dispositivos o uso do termo “*lab on a chip*”, pois, oferecem uma análise rápida, eficiente, sensível e que pode ser realizada fora de um laboratório por pessoas não necessariamente especializadas,

e, além disso, o processamento de dados é realizado em menor tempo (minutos ou até segundos), além de não requererem um pré-tratamento da amostra e nem uma mão de obra especializada para realização das análises.

Outro fator importante são os diferentes tipos de transdutores que podem ser empregados nestes dispositivos, conforme supracitado na Figura 1. Neste contexto, um biossensor é considerado eletroquímico quando o elemento de reconhecimento biológico é imobilizado em contato direto com um elemento de transdução eletroquímica, ou seja, um eletrodo (Thévenot *et al.*, 2001). De acordo com (Zhang *et al.*, 2015; Rubab *et al.*, 2018)), o modelo de transdução eletroquímica é o mais comum dentro da classe de biossensores devido, principalmente, ao baixo custo, à sua boa sensibilidade de instrumentação, a capacidade de monitoramento em tempo real e a reprodutibilidade.

O primeiro biossensor, conhecido como “Eletrodo Enzimático”, foi demonstrado por Clark e Lyons em 1962, no qual a enzima glicose oxidase foi aprisionada entre duas membranas na superfície de um eletrodo (Clark and Lyons, 1962). Neste dispositivo, os elétrons provenientes da redução da glicose pela enzima são detectados pelo eletrodo e, como sua quantidade é proporcional a concentração de glicose na amostra, o sinal elétrico é convertido em concentração de glicose. A partir de então uma gama de biossensores vem sendo publicados na literatura, inclusive novos biossensores que usam a glicose oxidase, por exemplo, Habtamu e Ugo (Henok B. Habtamu; Paolo Ugo, 2015) imobilizaram a glicose oxidase em micro-eletrodos de ouro funcionalizados com membranas impressas de policarbonato usando o cátion (ferrocenilmetil)trimetilamônio como mediador da oxirredução, e o biossensor apresentou limite de detecção de 36 μM e foi miniaturizado a 400 μm de raio sem qualquer alteração no desempenho analítico.

Rodrigues e colaboradores (Rodrigues *et al.*, 2015) imobilizaram uma ssDNA específica para *Neisseria meningitidis* em eletrodos de grafite modificados com filmes eletropolimerizados derivados do ácido hidroxifenilacético, os resultados indicaram alta sensibilidade para a formação da dsDNA e foram monitorados por espectroscopia de impedância eletroquímica e por voltametria de pulso diferencial. Ensafi e colaboradores (Ensafi *et al.*, 2015) usaram eletrodos de pasta de carbono modificados com óxido de grafeno-TO₂ reduzido para imobilizar uma dsDNA para detecção de furazolidona por meio do monitoramento dos sinais de oxidação da guanina e da adenina por voltametria de pulso diferencial, estes genossensores apresentaram limite de detecção de 0,55 e 0,43 pM para adenina e guanina, respectivamente, além de uma boa seletividade e desempenho quando aplicado em amostras reais.

Jamil e colaboradores (2015) utilizaram eletrodos de óxido de índio e estanho (ITO) modificados com óxido de grafeno reduzido e nanopartículas de prata para detectar eletroquimicamente o peróxido de hidrogênio, para isso anticorpos marcados foram usados como agente de biorreconhecimento do antígeno carcinoembrionário.

Quek, Cheng e Cord-Ruwisch (Queek, Cheng and Cord-Ruwisch, 2015) desenvolveram um biossensor baseado em microorganismos de sedimentos marinhos para detectar carbono orgânico assimilável em ambiente marinho, e obtiveram boa sensibilidade e um tempo de vida de até 36 dias. Lei e colaboradores (Lei, Chen and Mulchandani, 2006), reuniram, em um artigo de revisão, algumas das recentes aplicações dos biossensores microbiológicos no monitoramento ambiental e para o uso em alimentos, fermentação e campos similares.

Contudo, a construção de um dispositivo biossensor apresenta um vasta gama de possibilidades tanto na sua configuração quanto na sua aplicação. Porém, todos apresentam dois pontos cruciais em comum, são eles a preparação da superfície do eletrodo para imobilização do biorreceptor, e a imobilização do biorreceptor. No caso de um biossensor eletroquímica, estes pontos são a obtenção do eletrodo modificado e a imobilização da biomolécula na sua superfície.

1.2. Eletrodos modificados

Existem inúmeras metodologias utilizadas para modificar a superfície do eletrodo visando uma maior eficácia do biossensor como, por exemplo, o uso de nanomateriais (Izyumskaya *et al.*, 2017), grafeno (Park, Yoon and Kwon, 2016), aptâmeros (Pfeiffer and Mayer, 2016), membranas condutoras (Noah *et al.*, 2012), nanotubos de carbono (Zhu, 2017), e a formação de polímeros condutores (Jain, Jadon and Pawaiya, 2017). Neste contexto, a redução eletroquímica de um sal de arildiazônio (Doumèche and Blum, 2010; Salimia and Noorbakhsh, 2011; Nasri and Shams, 2013; Nasri, Shams and Ahmadi, 2013; Tasca *et al.*, 2013; C. Gómez-Anquela *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014) e a reação “click” (Garner and Janda, 2010; Ripert, Farre and Chaix, 2013; Ryu, Sibdas Singha Mahapatra and Cho., 2013; Ipek, Dincçer and Koca, 2014; Shen *et al.*, 2014) também têm sido muito utilizadas para funcionalizar a superfície de eletrodos.

A modificação da superfície de eletrodos por meio da redução eletroquímica de sais de arildiazônio tem sido apresentada como uma técnica eficaz devido a: i) permite a modificação *in situ*, ou seja, o eletrodo é modificado na mesma solução na qual o grupo

diazônio é gerado; ii) formação de uma ligação covalente entre a superfície e a molécula modificadora; iii) possibilidade de ser empregada a diferentes tipos de eletrodos; e, iv) por possibilitar a modificação por vários grupos funcionais (Chung *et al.*, 2012). Em geral, a redução eletroquímica de um sal de arildiazônio envolve a geração de radicais a base de arilo através da eliminação de diazoto, posteriormente estes radicais formam uma ligação covalente com a superfície do eletrodo e o resultado é um eletrodo modificado cuja superfície apresenta alta estabilidade (Chung *et al.*, 2012). A Figura 2 apresenta esquematicamente essa modificação, e nela é possível observar que o grupo R representa diferentes grupos funcionais que podem ser utilizados de acordo com a finalidade da modificação.

Figura 2: Representação esquemática da funcionalização da superfície do eletrodo via redução eletroquímica de um grupo arildiazônio.

O fato deste mecanismo ser bem conhecido possibilitou sua aplicação no desenvolvimento de eletrodos modificados contendo grupos azidas e alcinos livres para a posterior realização de uma reação *click* que, neste caso, permite incluir novas moléculas modificadoras na superfície do eletrodo.

“*Click chemistry*”, ou reação “*click*”, é o termo empregado para reações químicas que ocorrem de forma rápida e com grande facilidade como, por exemplo, as reações de cicloadições 1,3-dipolar de Huisen (Huisen, 1984). Em geral, são processos de fusão exergônica que unem dois reagentes insaturados e permitem o acesso rápido a uma enorme variedade de heterociclos de cinco membros. A cicloadição de azidas e alcinos para dar triazóis é, sem dúvida, o membro mais útil desta família (Vsevolod V. Rostovtsev, Fokin and Sharpless, 2002). A Figura 3 apresenta um exemplo de reação utilizando a referida técnica.

Figura 3: Exemplo da síntese de um triazol catalisada por cobre.

Fonte: (Vsevolod V. Rostovtsev, Fokin and Sharpless, 2002)

Na construção de um biossensor é importante que a biomolécula se ligue o mais forte e o mais especificamente possível com a superfície do transdutor para evitar que se desprenda e, também, que ocorra interferência de moléculas inespecíficas durante a construção e/ou durante a análise. É importante ainda que, depois de imobilizada, a biomolécula apresente orientação adequada contribuindo, assim, para a preservação de sua atividade biológica. Neste sentido, a técnica de *click* é muito vantajosa e promissora, pois, biomolécula e superfície são ligadas por ligação covalente e a biomolécula pode ser preparada para apresentar várias orientações possíveis após o procedimento de imobilização. O emprego desta técnica no estudo e no desenvolvimento de biossensores enzimáticos (Liu *et al.*, 2014), genossensores (Salimia and Noorbakhsh, 2011), imunossensores (Qi *et al.*, 2012, 2013) e até mesmo na imobilização de outras moléculas, como carboidratos (Fukuda, Onogi and Yoshiko, 2009; Leone *et al.*, 2010), tem sido notório nos últimos anos.

Contudo, as técnicas supracitadas tem se mostrado como alternativas úteis e viáveis no estudo e no desenvolvimento de biossensores, haja vista que estas permitem a construção de plataformas estáveis, robustas e em diferentes tipos de superfície como, por exemplo, em eletrodos de carbono vítreo (CV), ouro (Au) e de óxido de índio e estanho (ITO) (Chung *et al.*, 2012), o que, conseqüentemente, possibilita seu estudo em diferentes transdutores, tais como, eletroquímicos (voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial, espectroscopia de impedância eletroquímica e etc.), piezoelétricos (microbalança eletroquímica de cristal de quartzo) e ópticos (ressonância plasmônica de superfície, SPR).

1.3. Imobilização de biomoléculas

Para que o sistema de reconhecimento bioquímico funcione adequadamente o biorreceptor (ou biomolécula) deve manter sua atividade biológica preservada após a

imobilização na superfície do transdutor, e, ainda, deve apresentar uma orientação que permita sua interação com seu alvo complementar. Estas características tornam a imobilização da biomolécula na superfície do transdutor a etapa mais importante na construção de um biossensor.

Uma grande variedade de métodos de imobilização de biomoléculas vem surgindo desde a publicação do sensor de glicose por Clark em 1962. Estes métodos têm sido extensamente revisados por vários autores (Guilbault and Montalvo, 1969; Turner, Karube and Wilson, 1987; Thévenot *et al.*, 2001; Sassolas, Blum and Leca-bouvier, 2012), e aqueles que se destacam são a adsorção, a oclusão ou aprisionamento, a ligação cruzada e a ligação covalente (Figura 4).

Figura 4: Esquema representativo dos quatro principais métodos de imobilização de biomoléculas. (a) adsorção, (b) ligação covalente, (c) Oclusão (d) ligação cruzada.

Fonte: (Franco, 2009)

Por usar um procedimento simples e condições brandas, normalmente um simples gotejamento seguido da secagem da solução contendo a biomolécula na superfície do transdutor, a imobilização por adsorção é comumente usada na construção de biossensores. Jang e colaboradores (Jang *et al.*, 2015) imobilizaram um antígeno específico da próstata na superfície de eletrodos de carbono vítreo modificados com um composto de grafeno e ouro. Para isso, 5 μL de uma solução $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ contendo o antígeno foi gotejada sobre a superfície do eletrodo e seca a temperatura ambiente. O imunossensor construído apresentou $0,59 \text{ ng mL}^{-1}$ de limite de detecção e satisfatória

seletividade, estabilidade e reprodutibilidade. (Rodrigues *et al.*, 2014) imobilizaram, via adsorção, o anticorpo da troponina T (anti-troponina T) em eletrodos de flúor dopados com óxido de estanho (FTO) modificado com poli(3-aminofenol) por eletrodeposição. O imunossensor foi capaz de detectar, de maneira eficaz e seletiva, a troponina T cardíaca por espectroscopia de impedância eletroquímica e por fotoluminescência. No entanto, na imobilização por adsorção as interações que mantêm a biomolécula fixada na superfície no transdutor são dependentes do pH, do solvente e da temperatura (Turner, Karube and Wilson, 1987) o que, muitas vezes, ocasiona uma baixa estabilidade ao biossensor. Além disso, não há garantia de que a biomolécula apresentará orientação adequada após uma imobilização por adsorção.

A imobilização por oclusão ou aprisionamento também usa um procedimento simples, porém, pode apresentar uma resistência difusional elevada causando desnaturação da biomolécula, baixa sensibilidade e um limite de detecção pouco expressivo ao biossensor (Turner, Karube and Wilson, 1987). (Soares *et al.*, 2012) aprisionaram a urease em filme de polipirrol eletropolimerizado sobre a superfície de eletrodos de Pt, Au e FTO. A eletropolimerização do pirrol foi realizada por voltametria cíclica de -1,0 V a 1,0 V vs. SCE até atingir os 10 ciclos completos em um meio aquoso contendo 0,2 mol L⁻¹ de LiClO₄ e 0,1 mol L⁻¹ de pirrol. A atividade enzimática da uréase aprisionada na matriz de polipirrol foi confirmada pela conversão catalítica de uréia em dióxido de carbono e amoníaco. O biossensor enzimático exibiu seletividade, eficiência para concentrações de uréia abaixo de 3,0 mmol L⁻¹, e uma sensibilidade de 2,41 μA cm⁻² mmol L⁻¹. (Wan-zhi *et al.*, 2007) usaram uma mistura de quitosana e nanotubos de carbono para aprisionar a glicose oxidase na superfície de eletrodos de carbono vítreo. Para isso, 6 mL de uma solução contendo quitosana, nanotubos de carbono e glicose oxidase foi adicionada sobre a superfície do eletrodo e seca a 4 °C. O tempo de resposta e o limite de detecção do biossensor foram de 6 segundos e 3,5 nmol L⁻¹, respectivamente. Enfim, a imobilização por aprisionamento foi pioneira no estudo dos biossensores e continua a ser utilizada no desenvolvimento destes dispositivos (Nien, Tun and Ho, 2006; Ameer and Adeloju, 2009).

A imobilização por ligação cruzada possui a grande vantagem de formar ligações químicas fortes entre a superfície de transdutor e a biomolécula (Turner, Karube and Wilson, 1987). Glutaraldeído foi utilizado por Palod e Singh (Palod and Singh, 2015) para imobilização de glicose oxidase na superfície de eletrodos de platina modificados com polipirrol. Usando esta técnica de imobilização os autores conseguiram obter

biossensores com uma operação linear de 0,2 a 13 mmol L⁻¹, um limite de detecção de glicose de 50 µmol L⁻¹, uma excelente seletividade, uma fiabilidade notável para a detecção da amostra real e uma substancial melhora no tempo de estocagem. A principal questão acerca da imobilização por ligação cruzada é a dificuldade de controlar as reações e as inúmeras possibilidades de ocorrerem reações em diferentes pontos da biomolécula (Turner, Karube and Wilson, 1987).

Promover uma ligação química entre biomolécula e transdutor é uma estratégia de imobilização de biomoléculas complexa e exige elevado tempo na elaboração. Porém, permite a obtenção de plataformas consideravelmente estáveis para a construção de biossensores, o que é ideal para a construção em massa e comercialização destes dispositivos (Turner, Karube and Wilson, 1987). Para que a ligação ocorra a superfície do transdutor é previamente funcionalizada por moléculas espaçadoras, tais como, carbodiimida, mono ou multicamadas automontadas (Thévenot *et al.*, 2001). A técnica de funcionalização com sal de arildiazônio (Nasri and Shams, 2013; C. Gómez-Anquela *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014) também têm sido muito utilizada para modificar covalentemente a superfície do transdutor. (Chauhan *et al.*, 2015), por exemplo, imobilizaram covalentemente anticorpos monoclonais de aflatoxina B1 em eletrodos de ouro (próprios para utilização em microbalança eletroquímica de cristal de quartzo) modificados por monocamada automontada de 4-aminotiofenol. Para isso, 10 µL de 40 µg mL⁻¹ de anti aflatoxina B1 foi espalhada sobre o eletrodo que, em seguida, foi incubado durante a noite a 4 °C para a formação da ligação amida entre o anticorpo e o 4-aminotiofenol previamente ligado ao eletrodo. O biossensor desenvolvido apresentou boa sensibilidade, seletividade, reprodutibilidade ao ser aplicado em amostras reais, e bom tempo de armazenamento (aproximadamente 30 dias).

É notável que a imobilização de uma biomolécula está intimamente relacionada à funcionalização da superfície do transdutor quando se trata da construção de biossensores. Assim, dois pontos são determinantes nesse processo: a estabilidade da funcionalização do transdutor e a força da ligação/interação que este apresentará pela biomolécula a ser imobilizada. Há de se considerar ainda o interesse que a biomolécula tenha sua atividade biológica preservada e manter uma orientação adequada após a imobilização. Neste caso, o uso de biomoléculas fusionadas a *maltose binding protein* (MBP) ou marcadas com grupos histidina (*His-tag*) tem despertado o interesse de pesquisadores ao longo dos anos (Naal *et al.*, 2002; Gizeli and Glad, 2004; Blankespoor *et al.*, 2005; Medintz and

Deschamps, 2006; Park *et al.*, 2009; Ley *et al.*, 2011; Vikholm-Lundin *et al.*, 2012; Dacres *et al.*, 2013).

De acordo com esses estudos, a imobilização direta da biomolécula à superfície funcionalizada pode interferir em seu arranjo espacial e, conseqüentemente, na sua atividade biológica. Assim, uma imobilização através da MBP, por exemplo, fusionados à biomolécula de interesse impedem que isso aconteça, mantém a biomolécula devidamente orientada após a imobilização e ainda contribui para uma melhor detecção do sinal biológico esperado. A soma destes fatores tem como resultado uma contribuição extremamente significativa para a preservação da atividade biológica da biomolécula após sua imobilização.

A MBP possui massa molecular de 42 kDa que é frequentemente utilizada como proteína de fusão de uma biomolécula de interesse. A expressão de uma biomolécula fusionada a MBP proporciona um melhorar o rendimento, facilita 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).

Tais características despertou o interesse no uso da MBP, fusionada a uma biomolécula de interesse, na construção de biossensores. Naal e colaboradores (Naal *et al.*, 2002), por exemplo, estudaram a nitroredutase (NR) fusionada à MBP (MBP-NR), e a imobilizaram na superfície de um eletrodo quimicamente modificado com um filme polimerizado de N-(3-Pirrol-1-il-propil)-4,4'-bipiridina (PPB) (Takada, Naal and Abrunã, 2003). O biossensor amperométrico foi utilizado para detecção de trinitrotolueno (TNT) e dinitrotolueno (DNT). Os autores constataram que o domínio da MPB-NR exibe uma afinidade específica elevada com filmes polimerizados de PPB e, ainda, que a atividade enzimática da NR é totalmente preservada após imobilização nestes filmes. Os trabalhos referentes a este sistema indicam que o nitrogênio não quaternizado do grupo 4,4'-bipiridina possui um papel importante na interação com a proteína.

Assim, o uso da MBP na construção de biossensores pode ser estendido a outras biomoléculas de interesse como, por exemplo, as Galectinas. Existe um interesse na determinação de quantidades de galectina em células que possuem processos inflamatórios ou tumorais. Por exemplo, Galectina-1 foi detectada em células tumorais lisadas, abrindo a possibilidade de um novo método para análise clínicas (Van Hattum *et al.*, 2013).

1.4. Galectinas

A família das galectinas é filogeneticamente conservada e composta por 15 membros sendo que 11 deles são encontrados em humanos (Leffler *et al.*, 2004). São conhecidas como Proteínas de Ligação de Glicanos e desenvolvem papéis biológicos importantes que vão desde atividades imunoregulatórias até morte microbiana (Sean R. Stowell; Richard D., 2016). Essas proteínas se ligam a β -galactosídeos por meio de seu CRD, do inglês, *Carbohydrate Recognition Domain* ou Domínio de Reconhecimento de Carboidratos (Cooper and Barondes, 1999).

A primeira galectina, denominada Galectina-1 (Gal-1), foi identificada em 1976 (Varki *et al.*, 2009). Trata-se de uma lectina que reconhece β -galactosídeos, é expressa em vários tecidos e por diferentes tipos de células tronco, como as embrionárias, mesenquimais e neuronais. A Gal-1 é descrita como uma proteína ácida multifuncional que possui N-terminal acetilado, não possui peptídeo sinal, apresenta resíduos de cisteínas livres e participa de vários processos biológicos incluindo a modulação da resposta imunológica inata e adaptativa. Possui efeito imunoregulatório e ação antiinflamatória (Cho and Cummings, 1995; Cooper and Barondes, 1999; Camby *et al.*, 2006).

A Gal-1 humana, em solução, se apresenta na forma de dímero, cuja integridade é mantida principalmente por interações entre os monômeros na interface e através do núcleo hidrofóbico bem conservado. 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).

Carboidratos estão envolvidos em muitos processos biológicos essenciais na natureza, e suas interações com lectinas em doenças infecciosas representam novas possibilidades para o desenvolvimento de biossensores (Richards, Otten and Gibson, 2016). O interesse no uso de biossensores como ferramenta analítica para identificar e quantificar um sinal detectável após interação de uma galectina com seu alvo tem crescido nos últimos anos (Bojarova and Kren, 2016). Por exemplo, Shen e colaboradores (Shen *et al.*, 2016) investigaram a importância da galectina-1 no câncer de bexiga. Tang e colaboradores (Tang *et al.*, 2018) desenvolveram um imunossensor eletroquímico utilizando como suporte nanocompósitos de AuPt-Azul de metileno, relativamente simples e ultrasensível, aplicado para a determinação de galectina-3, um importante

marcador 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.

Por outro lado, a função lectínica de uma galectina, ou seja, sua ligação específica a β -galactosídeos por meio de seu CRD, pode ser explorada no desenvolvimento de biossensores capazes de detectar esse tipo de carboidrato em uma amostra. Sabendo que os principais açúcares que se ligam ao CRD da Gal-1 são a galactose e a lactose, essa proteína pode ser usada para detectar lactose, por exemplo, em produtos alimentícios derivados do leite que são classificados como livre de lactose ou zero lactose.

1.5. Biossensor para lactose

O interesse na elaboração de produtos livres de lactose, o principal carboidrato presente em produtos lácteos, tem crescido devido ao recente aumento no número de pessoas com intolerância à lactase e ou com redução do metabolismo da lactose (Bosshart *et al.*, 2018). A quantificação da lactose em produtos sem a mesma requer um método sensível devido aos altos níveis de glicose e galactose que estão presentes após o tratamento com lactase (Bosshart *et al.*, 2018). Neste contexto, muitos formatos de biossensores têm sido explorados pelos pesquisadores.

Lopez e colaboradores (Lopez *et al.*, 2017) desenvolveram um biossensor amperométrico para determinação de lactose na presença de altas concentrações de glicose. Neste trabalho, os autores modificaram a superfície de eletrodos de grafite com duas camadas, a primeira camada contendo a celobiose desidrogenase ligada por interações eletrostáticas, e a segunda camada contendo um polímero hidrofílico especificamente projetado que co-aprisiona a glicose oxidase e catalase. Este sistema bi-enzimático foi capaz de remover a glicose em concentrações até 140 mmol L^{-1} impedindo sua interferência na análise. O intervalo linear para a detecção de lactose foi de 10 a 100 mmol L^{-1} , e o sensor foi capaz de detectar lactose em baixas concentrações em amostras de leite sem lactose. A quantificação do teor de lactose em produtos lácteos sem lactose mostrou que a quantidade de lactose está abaixo do limite dado pelo fabricante.

Çakiroglu e colaboradores (Çakiroglu *et al.*, 2019) desenvolveram um biossensor fotoeletroquímico para detecção de glicose e lactose. Os autores utilizaram nanopartículas de ouro modificadas com TiO_2 mesoporoso e revestidas com um substrato de óxido de

índio e estanho contendo uma camada de $\text{MnO}_2/\text{g-C}_3\text{N}_4$. Glicose oxidase e β -galactosidase foram co-imobilizadas na superfície deste fotoânodo via ligação química usando silano/glutaraldeído. O fotoeletrodo apresentou sensibilidade de $1,54 \mu\text{AmM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ para glicose, e $1,66 \mu\text{AmM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ para lactose. O estudo foi pioneiro para a detecção multianalítica de usando um biossensor fotoeletroquímico.

Nguyen e colaboradores (Nguyen *et al.*, 2016) desenvolveram um biossensor de lactose por co-imobilização de β -galactosidase e glicose oxidase em microeletrodos de platina modificados com grafeno e filme de 1,5-polidiaminonaftaleno. O grafeno foi sintetizado por deposição química de vapor na fita de cobre e transferido manualmente para a superfície do eletrodo. O filme polimérico foi enxertado sobre o filme de grafeno por eletropolimerização. O sensor desenvolvido foi usado com sucesso para determinar a lactose em amostras de modelos com sensibilidade, coeficiente de correlação e limite de detecção estimados em $1,33 \mu\text{A} / (\mu\text{g mL}^{-1})$, 0,995 e $1,3 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Bollella e colaboradores (Bollella *et al.*, 2017) imobilizaram celobiose desidrogenase de *Trametes villosa* na superfície de eletrodos de hastes de grafite modificados com nanopartículas de ouro e prata, contendo quercetina como agente redutor, para desenvolver um biossensor para lactose. O biossensor apresentou um limite de detecção de $3,5 \text{ mmol L}^{-1}$, uma grande faixa linear de 10 a 300 mmol L^{-1} , uma alta sensibilidade ($5,4 \text{ mAmM}^{-1} \text{cm}^{-2}$) e estabilidade a longo prazo.

Han e colaboradores (Han *et al.*, 2019) desenvolveram um sensor de metamaterial para detecção aprimorada de impressões digitais de lactose com base no acoplamento ressonante de modos plasmônicos de ressonadores de anéis divididos (SRRs). O grande aprimoramento do campo elétrico (cerca de 120 vezes) no intervalo de SRRs permitiu a detecção altamente sensível. O sensor foi seletivo para lactose e concentrações de lactose 20 mg mL^{-1} foi detectada. O estudo pôde também abrir caminho para se explorar novos materiais ou dispositivos para detecção de moléculas com alta sensibilidade e seletividade sem o uso de biomoléculas.

Contudo, fica evidente o crescente interesse pelo desenvolvimento de dispositivos capazes de detectar traços de lactose em produtos alimentícios, especialmente os derivados de laticínios. A grande quantidade de interferentes numa detecção de lactose em amostras reais, principalmente por carboidratos com grande semelhança estrutural como a glicose, faz com que o uso de enzimas como a celobiose desidrogenase, a β -galactosidase e a glicose oxidase, por exemplo, sejam comumente utilizadas na construção desses dispositivos biossensores. Porém, outras biomoléculas apresentam boa

especificidade pela lactose e podem ser exploradas no desenvolvimentos de novas plataformas para estes dispositivos.

Partindo deste princípio, o presente trabalho teve como objetivo o estudo da imobilização da proteína recombinante Galectina-1 fusionada à MBP para o desenvolvimento de um sensor de lactose. Para isso, a 1-[2-(4-diazofenil)etil]-4,4'-bipiridina foi utilizada para funcionalizar a superfície de eletrodos de grafite e ITO. Tal funcionalização foi realizada via redução eletrodquímica do grupo diazônio para, assim, garantir um modificação covalente e orientada cujo nitrogênio piridínico não quaternizado permanecesse disponível para interagir com o domínio da MBP. Considerando que a maltose é a molécula que apresenta maior afinidade pelo domínio da MBP, a mesma foi adicionada, via reação *click*, à superfície dos eletrodos funcionalizados com 1-[2-(4-diazofenil)etil]-4,4'-bipiridina na tentativa de construir uma plataforma altamente específica para a imobilização via MBP. Contudo, a Galectina-1 pôde ser imobilizada de maneira orientada e sua atividade biológica manteve-se preservada na superfície do eletrodo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Imobilizar a proteína recombinante Galectina-1 fusionada à “*Maltose Binding Protein*” (MBP-Gal-1) na superfície modificada de eletrodo de grafite por: i) redução eletroquímica da 1-[2-(4-diazofenil)etil]-4,4'-bipiridina, e ii) reação *click* para inserção de uma maltose nessa superfície; e investigar seus respectivos potenciais para construção de um biossensor para detecção de lactose.

2.2. Objetivos Específicos

Com intuito de organizar e facilitar a avaliação da evolução do trabalho, o objetivo geral foi dividido em duas fases, conforme apresentado a seguir.

- **Fase I** – Nesta fase as moléculas usadas para modificar a superfície do eletrodo foram sintetizadas, os eletrodos foram modificados via redução eletroquímica do

grupo arildiazônio, e estes eletrodos foram usados para construção da proposta de biossensor I (Figura 5). As etapas realizadas nessa fase foram:

- Síntese e caracterização espectroscópica do brometo de 1-[2-(4-aminofenil)etil]-4,4'-bipiridina;
- Modificação dos eletrodos de carbono vítreo por redução eletroquímica do brometo de 1-[2-(4-diazofenil)etil]-4,4'-bipiridina gerado *in situ* a partir do brometo de 1-[2-(4-aminofenil)etil]-4,4'-bipiridina. Os eletrodos modificados obtidos foram chamados de CV/ β -bipy;
- Investigação do comportamento eletroquímico da superfície dos eletrodos CV/ β -bipy. A voltametria cíclica foi a principal técnica utilizada nesta etapa;
- Estudo da imobilização da MBP-Gal-1 na superfície dos eletrodos CV/ β -bipy. Os eletrodos obtidos nessa etapa foram chamados de CV/ β -bipy/MBP-Gal-1. Nesta etapa a espectroscopia de capacitância eletroquímica (ECE) foi a técnica utilizada;
- Estudo do uso do eletrodo CV/ β -bipy/MBP-Gal-1 como biossensor para detecção de lactose e outros açúcares;

Figura 5: Representação esquemática da modificação do eletrodo via redução eletroquímica do grupo arildiazônio e sua utilização na construção do biossensor I.

➤ **Fase II** – Nesta fase a maltose foi adicionada, via reação *click*, na superfície dos eletrodos modificados obtidos na etapa anterior e, em seguida, foram usados para construção da proposta de biossensor II (Figura 6).

- Síntese e caracterização espectroscópica da azida-maltose;
- Reação *click* entre a azida-maltose e a superfície dos eletrodos CV/ β -bipy contendo um grupo propargil previamente adicionado. Os eletrodos obtidos nessa etapa foram chamados de CV/ β -bipy/Mal. A modificação foi estudada por ECE;
- Estudos de ECE da imobilização da MBP-Gal-1 na superfície dos eletrodos CV/ β -bipy/Mal. Os eletrodos obtidos nessa etapa foram chamados de CV/ β -bipy/Mal/MBP-Gal-1;
- Estudo do uso do eletrodo CV/ β -bipy/Mal/MBP-Gal-1 como biossensor para detecção de lactose e outros açúcares.

Figura 6: Representação esquemática da modificação do eletrodo via reação *click* e sua utilização na construção do biossensor I.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Síntese da Azida-Maltose

Parte da síntese da azida-maltose foi realizada com o auxílio do Dr. Daniel Previdi no Laboratório de Síntese Orgânica (LSO) do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP), coordenado pelo Prof. Dr. Paulo Marcos Donate, Prof. Dr. Antônio Eduardo Miller Crotti e Prof. Dr. Gil Valdo José da Silva. E outra parte no Laboratório de Química Medicinal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), coordenado pela Profa. Dra. Ivone Carvalho. Reiteramos aqui nossos sinceros agradecimentos.

A modificação da Maltose com grupo azida foi realizada com base nos trabalhos de Powell e colaboradores (Powell, Ruzunguzwa and Li, 2012) e Ying e colaboradores (Ying and Gervay-Hague, 2003).

A uma suspensão com 2,0 g (5,55 mmol) de maltose em 8,0 mL (84,86 mmol) de anidrido acético foram adicionadas 1,2 μ L de HClO_4 (70 %). A mistura foi preparada em banho de gelo para evitar aquecimento e, em seguida, agitada à temperatura ambiente durante 6 horas e concentrada sob vácuo. A octa-O-acetil-maltose resultante foi dissolvida em, aproximadamente, 10 mL de CH_2Cl_2 e, posteriormente, foram adicionadas 4,5 mL de ácido bromídrico 33 % em ácido acético. Esta solução ficou sob agitação à temperatura ambiente durante 3 horas e depois 20 mL de água gelada foram adicionadas e a mistura de reação foi extraída com CH_2Cl_2 (2×10 mL). As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com água (2×10 mL), NaHCO_3 saturado (10 mL), salmoura (10 mL) e seca com sulfato de sódio anidro. O solvente foi removido e o resíduo purificado por cromatografia em gel de sílica ($1 \rightarrow 40$ % acetato de etila/hexano) para se obter 2,2',3,3',4',6,6'-hepta-O-acetil- α -maltosil-brometo como um óleo viscoso de cor amarela clara.

A uma solução contendo 0,4092 g (0,58 mmol) de 2,2',3,3',4',6,6'-hepta-O-acetil- α -maltosil-brometo em 1,5 mL de DMF foram adicionada 0,0571 g (0,87 mmol) de azida de sódio (NaN_3). Esta solução foi agitada a 60 °C durante 4 horas. A mistura de reação foi, então, arrefecida até 25 °C e vertida em 20 mL de água. A mistura foi extraída com acetato de etila (2×10 mL) e as camadas orgânicas combinadas foram lavadas com água (2×10 mL), salmoura (10 mL) e seca com sulfato de sódio anidro. O solvente foi

removido e o resíduo purificado por cromatografia em gel de sílica (1 → 40 % acetato de etila/hexano) para se obter 2,2',3,3',4',6,6'-hepta-*O*-acetil- β -maltosil-azida como um óleo viscoso incolor.

Na etapa de desacetilação a 2,2',3,3',4',6,6'-hepta-*O*-acetil- β -maltosil-azida foi diluída em metanol e, em seguida, uma solução 1,0 mol L⁻¹ de metóxido de sódio foi adicionada gota a gota até atingir pH 9,0. Completada a desacetilação a resina Dowex-50W-hydrogen foi adicionada ao meio reacional até atingir pH neutro que, em seguida, foi filtrada com celite e seca sob vácuo. O material obtido foi chamado de azida-maltose.

Os principais equipamentos utilizados para purificação e caracterização foram: Ressonância Magnética Nuclear de ¹H (RMN ¹H) Bruker Advance DPX 300 MHz; Espectrômetro de Massas de Alta Resolução Bruker Daltonics micrO-Q-TOF; Cromatógrafo Flash Biotage.

3.2. Síntese do brometo de 1-[2-(4-aminofenil)etil]-4,4'-bipiridina

A síntese do brometo de 1-[2-(4-aminofenil)etil]-4,4'-bipiridina foi realizada com o auxílio do Ms. Wesley Romário da Silva no Laboratório de Síntese Orgânica (LSO) do Departamento de Química da FFCLRP, coordenado pelo Prof. Dr. Paulo Marcos Donate, Prof. Dr. Antônio Miller Cotri e Prof. Dr. Gil. Reiteramos aqui nossos sinceros agradecimentos.

Para síntese do 1-[2-(4-nitrofenil)etil]-4,4'-bipiridina pesou-se 0,3024 g (1,4 mmol) de 1-(bromoetil)-4-nitrobenzeno e 0,4100 g (2,8 mmol) de 4,4'-bipiridina. Ambos os reagentes foram dissolvidos em 20 mL de acetonitrila recém destilada, e a mistura ficou sob refluxo, em atmosfera inerte, durante a noite. O brometo de 1-[2-(4-nitrofenil)etil]-4,4'-bipiridina foi obtido como um precipitado amarelo que foi filtrado, lavado duas vezes com 10 mL de acetonitrila recém destilada e secado sob vácuo por duas horas.

A redução do grupo nitro foi realizada sob agitação, à temperatura ambiente e a uma atmosfera de H_{2(g)} a 10 kgf cm⁻² num reator. Para isso pesou-se 0,5000 g (1,3 mmol) do brometo de 1-[2-(4-nitrofenil)etil]-4,4'-bipiridina, 0,05 g do catalisador (Pd/C 5%) e misturou-se em 10 mL de metanol recém destilado. A reação foi acompanhada a cada 30 minutos em placas de sílica usando uma mistura 9:1 metanol/água, com duas gotas de ácido fórmico, como fase móvel e iodo como revelador. Após cerca de quatro horas de reação, a mistura foi filtrada em filtro com poros de 0,22 μ m, e o solvente foi retirado sob

baixa pressão. O brometo de 1-[2-(4-aminofenil)etil]-4,4'-bipiridina obtido foi seco sob vácuo.

Espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono-13 foram obtidos em espectrômetros Bruker DRX-400. No ^1H -RMN (400 MHz) 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* = singleto, *d* = dubleto, *t* = tripleto, *q* = quadrupeto, *dd* = duplo dubleto, *m* = multipeto. A constante de acoplamento (*J*) foi calculada em Hertz (Hz) e o número de hidrogênios foi deduzido da integral relativa. No ^{13}C -RMN (100 MHz) foram traçados de acordo com a conveniência, utilizando-se as seguintes técnicas: BB – Broad Band (^{13}C { ^1H } - Carbono Totalmente Desacoplado de Hidrogênio) e DEPT – 135 – *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*. Os espectros de *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR) foram obtidos em espectrofotômetro Prestigio-21 Shimadzu utilizando pastilhas de KBr.

3.3. Modificação dos eletrodos de CV e ITO por redução eletroquímica do brometo de 1-[2-(4-diazofenil)etil]-4,4'-bipiridina

O estudo da modificação do eletrodo foi conduzido em um potenciostato BAS CV-27. Os dados foram obtidos em registrador Omnigraphic® 100 - Houston Instruments. Um disco de CV ($0,07065\text{ cm}^2$) e uma placa de vidro ($1,0\text{ cm}^2$) contendo ITO foram usados separadamente como eletrodos de trabalho. Eletrodos de Ag/AgCl/KCl e Pt foram usados como eletrodos de referência e auxiliar, respectivamente.

Antes de utilizado, o eletrodo de CV foi polido em lixa P4000, sonificado e lavado com água destilada. O eletrodo de ITO foi sonificado em acetona por um minuto e lavado com acetona e água. Para verificar se a superfície dos eletrodos estava adequada para uso, obteve-se o perfil voltamétrico dos eletrodos em solução tampão fosfato $0,1\text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4, após a limpeza. As varreduras foram conduzidas entre os potenciais -1,2 e 0,2 V para o eletrodo de CV, e -1,0 a 1,0 V para o eletrodo de ITO, com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

A modificação dos eletrodos foi precedida da conversão do grupo amina do brometo de 1-[2-(4-aminofenil)etil]-4,4'-bipiridina a um grupo diazônio, e esse procedimento foi conduzido em banho de gelo. Para isso, 0,060 g (0,217 mmol) do brometo de 1-[2-(4-aminofenil)etil]-4,4'-bipiridina foram diluídos em 3,0 mL de uma

solução HCl 0,5 mol L⁻¹, e a mistura foi resfriada em banho de gelo. A esta mistura foram adicionadas 2,0 mL de solução HCl 0,5 mol L⁻¹ contendo, aproximadamente, 0,010 g (0,11 mmol) de NaNO₂. Após 20 minutos desoxigenando com argônio, os eletrodos foram adicionados diretamente na solução para a realização da modificação eletroquímica.

Para modificação dos eletrodos foram realizados 20 ciclos, a 100 mV s⁻¹, entre os potenciais -0,6 e 0,0 V para CV e -0,7 e 0,0 V para ITO. Para garantir a remoção de moléculas fracamente adsorvidas na superfície dos eletrodos, os mesmos foram lavados excessivamente com água destilada e sonicados durante um minuto após a modificação.

3.4. Reação *click* na superfície do eletrodo

Primeiramente o grupo propargil foi adicionado ao nitrogênio não quaternizado disponível na superfície dos eletrodos CV/ β -bipy. Para isso os eletrodos foram mantidos submersos numa solução contendo 0,10 mmol de bromopropargil em 10 mL de DMF durante a noite. Após esse período os eletrodos foram lavados excessivamente com água destilada gelada.

Para promover a reação *click* entre o grupo propargil e a azida-maltose, os eletrodos obtidos da etapa anterior foram mantidos submersos durante cinco horas na solução reacional aqui chamada de solução *click*. A solução *click* foi preparada da seguinte forma: i) a 12 mL de uma solução 1:1 de água/álcool terc-butílico foram adicionados 100 μ L de solução aquosa recém preparada contendo 0,00594 g de ascorbato de sódio; e ii) à solução obtida anteriormente foram adicionadas 100 μ L de solução aquosa recém preparada contendo 0,00075 g de sulfato de cobre II pentaidratado. Após o período supracitado os eletrodos foram excessivamente lavados com água gelada e mantidos submersos em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4, entre as análises. Os eletrodos obtidos nessa etapa foram chamados de CV/ β -bipy/Mal. Cada etapa dessa modificação foi confirmada por espectroscopia de capacitância eletroquímica.

3.5. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) e Espectroscopia de Capacitância Eletroquímica (ECE)

Os estudo de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e espectroscopia de capacitância eletroquímica (ECE) foram realizados com o auxílio da Profa. Dra.

Marina Batistuti no laboratório de Sensores e Materiais (SensorMat) do Departamento de Física da FFCLRP, coordenado pelo Prof. Dr. Marcelo Mulato. Reiteramos aqui nossos sinceros agradecimentos.

As medidas de EIE e ECE foram realizadas utilizando um potenciostato AUTOLAB PGSTAT 128N/FRA32N (MetrohmAutolab, The Netherlands) usando a mesma célula eletroquímica e eletrodos, anteriormente descritos. Os espectros de impedância foram medidos usando solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4) na faixa de frequência de 10 kHz a 100 mHz. Uma tensão de corrente alternada de 10 mV foi sobreposta em uma tensão de corrente contínua medida usando potencial de circuito aberto (OCP). Para melhor interpretação dos resultados os espectros de impedância eletroquímica foram convertidos a espectros de capacitância eletroquímica (ECE) quando necessário, e, para avaliar a capacitância do sistema, uma capacitância complexa foi definida como:

$$C^* = -\frac{Z''}{\omega |Z|^2} - j \frac{Z'}{\omega |Z|^2} = C' + jC''$$

onde C' corresponde à parte real da capacitância e C'' corresponde à parte imaginária da capacitância. Z' e Z'' são os componentes reais e imaginários da impedância medida, respectivamente, e $\omega = 2\pi f$ é a frequência angular da medida (Jolly *et al.*, 2016).

3.6. Imobilização da MBP-Gal-1

As proteínas recombinantes Galectina-1 (Gal-1) e Galectina-1 fusionada à MBP (MBP-Gal-1) foram produzidas pela Profa. Dra. Pâmela Oliveira Martins Gomes (também doutoranda do nosso grupo na ocasião) no Laboratório de Glicoimunologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, coordenado pelo Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi. Reiteramos aqui nossos sinceros agradecimentos.

Para promover a imobilização da proteína MBP-Gal-1, 15 µL de tampão fosfato salino (*Phosphate Buffer Saline*, PBS) 0,1 mol L⁻¹ (pH 7.4), contendo a concentração desejada da proteína, foram cuidadosamente adicionados à superfície dos eletrodos modificados (CV/β-Bipy ou CV/β-Bipy/Mal) de maneira a garantir que toda a área do eletrodo fosse totalmente recoberta pela solução. Para evitar que a solução secasse totalmente, os eletrodos foram deixados em repouso em ambiente fechado e úmido por

todo o tempo de imobilização. O tempo de imobilização foi ajustado de acordo com cada experimento. Após isso, os eletrodos foram exaustivamente lavados em PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7.4) antes da aquisição dos espectros de impedância e capacitância eletroquímica.

3.7. Imobilização da lactose e outros açúcares

A imobilização dos alvos (lactose, maltose e sacarose) foi realizada adicionando cuidadosamente 15 µL de PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7.4), contendo a concentração desejada do açúcar, na superfície dos biossensores (CV/β-Bipy/MBP-Gal-1 ou CV/β-Bipy/Mal/MBP-Gal-1) de maneira a garantir seu recobrimento total. Para evitar que a solução secasse totalmente, os eletrodos foram deixados em repouso em ambiente fechado e úmido por todo o tempo de imobilização. O tempo de imobilização foi ajustado de acordo com cada experimento. Após isso, os eletrodos foram exaustivamente lavados em PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7.4) antes da aquisição dos espectros de impedância e capacitância eletroquímica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Modificação dos eletrodos

4.1.1. Síntese da Azida-Maltose

As reações de acetilação de carboidratos são bem conhecidas e podem ser conduzidas com o uso de diferentes catalisadores na presença de anidrido acético, tais como, piridina, cloreto de zinco e iodo molecular (Wolfrom and Thompson, 1964; Kartha and Field, 1997). O uso do ácido perclórico também é uma alternativa que, apesar de ser de manipulação trabalhosa e da possibilidade de gerar aquecimento indesejável à mistura reacional, tem apresentado bons rendimentos (Kartha and Field, 1997). A reação de acetilação da maltose é apresentada na Figura 7.

Figura 7: Mecanismo de acetilação da maltose utilizando ácido perclórico como catalizador.

A acetilação da maltose pôde ser comprovada pelos espectros de FT-IR (Figura 8). As principais diferenças observadas no espectro de FT-IR da octa-O-acetil-maltose em comparação com o da maltose são:

- o desaparecimento da banda de deformação axial da ligação O-H em ligação de hidrogênio intermolecular em 3345 cm^{-1} ;
- surgimento da banda de deformação axial da ligação C=O em 1750 cm^{-1} que é característica de carbonila de éster;
- alterações das bandas de deformação axial da ligação C-O para uma banda mais larga e intensa em 1230 cm^{-1} e outra menos intensa em 1035 cm^{-1} , atribuídas para a formação do grupo éster após a acetilação (SILVERSTEIN, R. M. WEBSTER and KIEMLE, 2007; PAVIA *et al.*, 2011).

Os espectros de FT-IR comprovam que a acetilação da maltose aconteceu com sucesso, porém, não mostra se houve ou não quebra da ligação glicosídica. Para responder

a esta questão foi obtido o espectro de massas para a octa-O-acetil-maltose (Anexo I), o qual apresentou um pico base em 701, 1898 m/z atribuído ao somatório da massa molar da octa-O-acetil-maltose ($679,2080 \text{ g mol}^{-1}$), da massa do Na^+ ($23,9970 \text{ g mol}^{-1}$) e do H^+ ($1,0072 \text{ g mol}^{-1}$), sendo estes últimos presentes na água usada como matriz para dispersar e promover a ionização da amostra. Tal resultado confirmou o sucesso da síntese.

Figura 8: Espectros de FT-IR obtidos em pastilha de KBr para (A) maltose e (B) octa-O-acetil-maltose.

O efeito anomérico é um fator estereoelétrônico que descreve a tendência do substituinte em C-1, adjacente ao heteroátomo do anel de pirano, em preferir orientação axial em detrimento da equatorial. A existência de dipolos alinhados envolvendo os átomos de oxigênio endocíclico e anomérico causa repulsão entre os mesmos quando o substituinte está na posição equatorial. Logo, um sistema energeticamente mais estável ocorre quando este substituinte está em posição axial resultando em dipolos antiparalelos com conseqüente supressão da repulsão e o surgimento da hiperconjugação entre um dos pares de elétrons não ligantes do átomo de oxigênio pirânico e o orbital antiligante σ^* da ligação C-O no carbono anomérico (Juaristi and Cuevas, 1992; Mydock and Demchenko, 2010). O efeito anomérico contribui significativamente na reação de obtenção da

2,2',3,3',4',6,6'-hepta-*O*-acetil- α -maltosil-brometo a partir da reação entre a octa-*O*-acetil-maltose e o ácido bromídrico (Figura 9).

Além do efeito anomérico o efeito de assistência anquimérica também era esperado para a reação supracitada. A assistência anquimérica ocorre quando um dos pares de elétrons não ligantes do oxigênio carbonílico do grupo acetil ligado ao carbono anquimérico (C-2) do anel de pirano interage com o orbital antiligante da ligação C-O, esta interação gera um intermediário com melhor estabilidade chamado íon oxazolina (Bongat and Demchenko, 2007) (Figura 10). Como resultado do efeito anomérico e da assistência anquimérica obtém-se o bromo apenas na posição alfa (ou axial) no carbono anomérico do anel de pirano.

Figura 9: Mecanismo para a reação de obtenção da 2,2',3,3',4',6,6'-hepta-*O*-acetil- α -maltosil-brometo considerando o efeito anomérico.

Figura 10: Mecanismo para a reação de obtenção da 2,2',3,3',4',6,6'-hepta-O-acetil- α -maltosil-brometo considerando o efeito anomérico. Formação do i) íon oxazolina e ii) sua estrutura de ressonância.

Os espectros de FT-IR obtidos para o produto da reação supracitada comprovaram que o bromo foi adicionado ao reagente com sucesso. Brometos de alquila são, normalmente, identificados por uma banda forte entre $650\text{-}510\text{ cm}^{-1}$ que é atribuída ao estiramento da ligação C-Br (SILVERSTEIN, R. M. WEBSTER and KIEMLE, 2007; PAVIA *et al.*, 2011), porém, era esperado que esta banda aparecesse com intensidade média ou fraca devido aos muitos grupamentos ésteres presentes no produto que, por sua vez, possuem bandas muito fortes devido às ligações C=O e C(=O)-O-C. Assim, a presença do bromo ficou evidente ao observarmos o surgimento de uma banda fraca em 560 cm^{-1} (Figura 11).

Figura 11: Espectros de FT-IR obtidos em pastilha de KBr para (A) octa-O-acetil-maltose e (B) 2,2',3,3',4',6,6'-hepta-O-acetil- α -maltosil-brometo.

O espectro de massas obtido para o 2,2',3,3',4',6,6'-hepta-*O*-acetil- α -maltosil-brometo (Anexo II) apresentou pares de picos com, praticamente, mesma intensidade com diferença na razão m/z de duas unidades. Este perfil é característico de compostos que contém um átomo de bromo e é resultado da abundância isotópica natural deste elemento (^{79}Br com 100% e ^{81}Br com 98% de abundância) (SILVERSTEIN, R. M. WEBSTER and KIEMLE, 2007; PAVIA *et al.*, 2011). Dois picos intensos são marcantes no espectro, um com 721,0943 m/z e outro com 723,0927 m/z . O primeiro é atribuído ao isótopo ^{79}Br e o segundo ao isótopo ^{81}Br sendo que em ambas as massas molares está somada a massa do Na^+ (23,9970 g mol⁻¹) presente na água usada como matriz para dispersar e promover a ionização da amostra. Desta forma, o espectro de massas reafirma a presença do bromo no produto já observada no espectro de FT-IR e, ainda, prova que também não houve clivagem da ligação glicosídica nesta etapa da síntese.

Para obtenção da 2,2',3,3',4',6,6'-hepta-*O*-acetil- β -maltosil-azida a partir da reação entre 2,2',3,3',4',6,6'-hepta-*O*-acetil- α -maltosil-brometo e NaN_3 usou-se o DMF como um solvente polar aprótico e 60 °C de temperatura. Solventes polares apróticos solvatam bem cátions e não solvatam ânions e isso favorece um mecanismo de substituição nucleofílica

bimolecular (S_N2) (ALLINGER *et al.*, 1976), conforme representado na Figura 12. O mecanismo S_N2 para a reação garante que o grupo azida seja adicionado apenas na posição beta (ou equatorial) no carbono anomérico do anel de pirano.

Figura 12: Mecanismo para a reação entre 2,2',3,3',4',6,6'-hepta-O-acetil- α -maltosil-brometo e NaN_3 .

O grupo azida pode ser facilmente identificado em espectros de FT-IR por possuírem uma banda de deformação axial assimétrica entre 2114 - 2183 cm^{-1} que é, normalmente, estreita e apresenta intensidade de média para forte (Lieber *et al.*, 1957). Esta banda é marcante no espectro, pois, não há muito grupos que apresentam bandas nesta faixa de comprimento de onda. Desta forma, a presença do grupo azida no produto da reação pôde ser comprovada pela banda estreita de intensidade média observada em 2128 cm^{-1} , que foi atribuída à deformação axial assimétrica da ligação $\text{N}=\text{N}=\text{N}$ (Figura 13). Além do surgimento desta banda pôde ser observado também que a banda em 560 cm^{-1} , atribuída ao estiramento da ligação $\text{C}-\text{Br}$ e observada para a 2,2',3,3',4',6,6'-hepta-O-acetil- α -maltosil-brometo, não aparece no espectro de FT-IR da 2,2',3,3',4',6,6'-hepta-O-acetil- β -maltosil-azida. Este conjunto de informações comprova que o grupo azida foi adicionado com sucesso nesta etapa da síntese.

Figura 13: Espectros de FT-IR obtidos em pastilhas de KBr para (A) 2,2',3,3',4',6,6'-hepta-O-acetil- α -maltosil-brometo e (B) 2,2',3,3',4',6,6'-hepta-O-acetil- β -maltosil-azida.

O espectro de massas obtido para a 2,2',3,3',4',6,6'-hepta-O-acetil- β -maltosil-azida (Anexo I) apresentou um pico base em 684,1957 m/z. Este pico é atribuído ao somatório da massa molar da amostra (660,1882 g mol⁻¹) com da massa do Na⁺ (23,9970 g mol⁻¹), sendo este último presente na água usada como matriz para dispersar e promover a ionização da amostra. Este resultado reafirma o sucesso da reação e mostra que não houve clivagem da ligação glicosídica nesta etapa da síntese.

Além dos espectros de FT-IR e de massas, também foram obtidos espectros de RMN ¹H para a 2,2',3,3',4',6,6'-hepta-O-acetil- β -maltosil-azida (Anexo II). O resultado foi muito próximo do descrito por Powell e colaboradores (Powell, Ruzunguzwa and Li, 2012) complementando a conclusão de que a síntese foi realizada com sucesso. Contudo, foi possível obter a 2,2',3,3',4',6,6'-hepta-O-acetil- β -maltosil-azida utilizando a metodologia proposta sem que houvesse a quebra da ligação glicosídica. Partindo de 0,4092 g de 2,2',3,3',4',6,6'-hepta-O-acetil- β -maltosil-azida obteve-se 0,1200 g de 2,2',3,3',4',6,6'-hepta-O-acetil- β -maltosil-azida, representando um rendimento de 32%.

Por fim, todo o 2,2',3,3',4',6,6'-hepta-*O*-acetil- β -maltosil-azida obtido foi desacetilado para obtenção da azida-maltose com praticamente 100% de rendimento. O sucesso da reação foi confirmada pelos espectros de RMN (Anexo II), onde foi confirmada a ausência do grupo acetila.

4.1.2. Síntese do brometo de 1-[2-(4-aminofenil)etil]-4,4'-bipiridina

Na ideia inicial desse trabalho foi proposto que a molécula de partida para modificação dos eletrodos seria o 1-(bromometil)-4-nitrobenzeno. Porém, após várias tentativas mal sucedidas de reduzir o grupo nitro dessa molécula a um grupo amina, optou-se pela sua substituição seu homólogo, o 1-(bromoetil)-4-nitrobenzeno. Acontece que, após a obtenção do 1-(4-nitrobenzil)-4,4'-bipiridina a partir do 1-(bromometil)-4-nitrobenzeno, o grupo nitro precisa ser reduzido à amina que, por sua vez, seria reduzida a um grupo diazônio ($^+N_2-R$) para posterior modificação dos eletrodos. Porém, quando o grupo amina é obtido um grupo retirador de elétrons (O_2N-R) é substituído por um grupo doador de elétrons (H_2N-R) (Carey and Sundberg, 2000), isso resulta em uma nova distribuição da densidade eletrônica na molécula que, por sua vez, permite uma extensão de conjugação que culmina na clivagem da molécula (Figura 14). Reações desta natureza foram exploradas por Körner e colaboradores (Cazares-Körner *et al.*, 2013) no estudo de pró-fármacos para o tratamento de câncer. Após várias tentativas de evitar a clivagem da molécula durante sua síntese como, por exemplo, conduzir a reação em meio ácido e formar primeiramente a amina a partir do 1-(bromometil)-4-nitrobenzeno, foi proposto o uso do 1-(bromoetil)-4-nitrobenzeno como material de partida para evitar tal situação.

Figura 14: A) Obtenção do 1-(4-nitrofenil)metil)-4,4'-bipiridina como um precipitado amarelo. B) Redução do grupo nitro em reator de hidrogênio. C) Representação da clivagem observada após obtenção do grupo amina.

A síntese do brometo de 1-[2-(4-aminofenil)etil]-4,4'-bipiridina foi realizada em duas etapas (Figura 15). Na primeira etapa ocorreu o acoplamento, via Substituição Nucleofílica Bimolecular ($\text{S}_{\text{N}}2$) entre as moléculas **1** e **2** gerando a molécula **3**, como um sólido amarelo claro, com 91% de rendimento. A análise do ^1H -RMN e de ^{13}C -RMN confirmaram a obtenção do produto (Anexo II). Os sinais não atribuídos à estrutura da molécula **3** indicaram que o produto obtido pode ser lavado mais vezes durante a filtragem e deixado mais tempo secando em vácuo para garantir total remoção de solvente e de possíveis traços dos materiais de partida, uma vez que não se julgou necessária a purificação por métodos cromatográficos. Na segunda etapa, o grupo nitro da molécula **3** foi reduzido a amina, via hidrogenação catalítica, gerando o composto **4** com 92,5% de rendimento e coloração amarelo-alaranjada. Como dito anteriormente, ao contrário do grupo nitro, a amina é um grupo doador de elétrons. Sua presença na molécula, em substituição ao grupo nitro, modifica a ressonância e altera a distribuição de cargas no anel aromático. Assim, diferenças significativas no deslocamento químico nos sinais de

^1H -RMN e de ^{13}C -RMN do composto **4** (Anexo II), em relação ao composto **3**, foram observadas e permitiram confirmar o sucesso da reação. As principais diferenças observadas no espectro de ^1H -RMN do brometo de 1-[2-(4-aminofenil)etil]-4,4'-bipiridina foram nos dubleto em δ 8,62 ppm ($J_{18,20} = 6,9$ Hz), δ 6,99 ppm ($J_{4,6} = 8,6$ Hz) e δ 6,92 ppm ($J_{1,3} = 8,6$). Já no ^{13}C -RMN o pico em δ 115,65 ppm, atribuído a C_3 e C_5 , foi a principal diferença observada.

Figura 15: Representação da síntese do brometo de 1-[2-(4-aminofenil)etil]-4,4'-bipiridina.

Etapa I

Etapa II

Os resultados de FT-IR do composto **4** (Figura 16) reforçaram os resultados de RMN, e, ainda, indicaram que parte do grupo amina estaria na forma protonada (Ar-NH_3^+). As principais bandas observadas foram em 3410 cm^{-1} (estiramento N-H de R-NH_3^+), 3175 e 3036 cm^{-1} (estiramento N-H de R-NH_3^+), 1640 cm^{-1} (dobramento assimétrico N-H de R-NH_2), 1511 cm^{-1} (dobramento simétrico N-H de R-NH_2), 1170 cm^{-1} (estiramento C-N), e 809 cm^{-1} (dobramento fora do plano N-H de R-NH_2).

Figura 16: Espectro de FTIR obtido em pastilha de KBr a partir do composto 4, com destaque para as principais bandas observadas.

Portanto, foi possível obter o brometo de 1-[2-(4-aminofenil)etil]-4,4'-bipiridina utilizando a rota sintética proposta. O rendimento e pureza dos produtos obtidos em cada etapa da síntese foram satisfatórios e, no caso da segunda etapa, suficientes para a condução dos estudos de modificação dos eletrodos.

4.1.3. Modificação dos eletrodos de CV e ITO por redução eletroquímica do brometo de 1-[2-(4-diazofenil)etil]-4,4'-bipiridina

A modificação dos eletrodos foi precedida pela obtenção de um grupo diazônio a partir do grupo amina (Figura 17, Etapa I) que, em seguida, foi reduzido eletroquimicamente na superfície do eletrodo (Figura 17, Etapa II). Quando o grupo diazônio é reduzido na superfície do eletrodo um radical aromático é gerado, esse radical interage com os sítios ativos do eletrodo para formar ligação covalente. Nos eletrodos de CV essas ligações são do tipo C-C, e nos de ITO são do tipo In-O-C e Sn-O-C (Chung *et al.*, 2012).

Figura 17: Representação esquemática da obtenção de $^+N_2$ - β -bipy (Etapa I) e sua redução eletroquímica na superfície do eletrodo (Etapa II).

A redução do grupo diazônio foi observada no potencial -0,47 V para o eletrodo de CV, e em -0,57 V para o eletrodo de ITO (Figura 18). Entre o primeiro e o último ciclo no eletrodo de CV esse potencial variou -0,05 V indicando que, a cada ciclo, mais energia é requerida para que a redução ocorra. Essa característica não foi observada no eletrodo de ITO, e isso pode estar associado aos diferentes tipos de ligações formadas no CV (C-C) e no ITO (In-O-C e Sn-O-C). Tanto no eletrodo de CV quanto no de ITO, a corrente de pico diminui consideravelmente nas primeiras varreduras e tende à estabilidade nas últimas. Esse comportamento indica que uma grande quantidade de moléculas se liga ao eletrodo nos primeiros ciclos bloqueando o acesso de novos radicais e de $^+N_2$ - β -bipy a sua superfície. Após o 20^a ciclo essas variações tornam-se praticamente imperceptíveis, logo, esse foi o número máximo de ciclos voltamétricos estabelecido para modificação dos eletrodos. É válido destacar que, apesar da área do eletrodo de ITO ser cerca de 14 vezes maior que a do CV, sua transferência eletrônica foi de, aproximadamente, 750 $\mu A\ cm^{-2}$, que é menor que a observada para CV, aproximadamente 991 $\mu A\ cm^{-2}$. As características de semicondutor do ITO justificam tal observação.

Figura 18: Voltamogramas cíclicos obtidos em HCl 0,5 mol L⁻¹ contendo 1,0 mmol L⁻¹ de +N₂-β-bipy durante a modificação do eletrodo de (A) CV e (B) ITO, a 100 mV s⁻¹, 20 ciclos.

Além da formação da ligação covalente entre o eletrodo e o radical arila, outras ligações do tipo Ar-N=N-Ar e C-C podem ser formadas a partir da reação entre a molécula já ligada ao eletrodo (eletrodo/β-bipy) e o próprio radical arila ou entre o grupo diazônio presentes na solução (Allongue *et al.*, 2003), conforme representado na Figura 19. Assim, é possível que um filme cresça, mesmo que discretamente, na superfície do eletrodo e, neste caso, os eletrodos não estão modificados com a formação de uma única camada de moléculas ligadas em sua superfície.

Figura 19: Representação esquemática da formação de ligações Ar-N=N-Ar (Esquema A) e de C-C (Esquema B) durante a modificação dos eletrodos de CV e ITO.

É esperado que a β -Bipy mantenha sua carga positiva no nitrogênio quaternizado após a modificação, e o estudo conduzido em solução contendo sondas redox aniônicas (ferri/ferrocianeto de potássio, $K_3[Fe(CN)_6]$ e $K_4[Fe(CN)_6]$, 1:1) e catiônicas (cloreto de hexaminrutênio (III), $[Ru(NH_3)]Cl_3$) permitiram comprovar essa característica (Figura 20). Os resultados mostraram que as correntes de pico diminuem drasticamente para ambos os eletrodos independentemente da sonda redox utilizada, e isso indica que suas superfícies foram modificadas. Porém, a porcentagem dessa diminuição foi consideravelmente menor para a sonda redox aniônica em ambos os eletrodos (Tabela 1). Esse resultado sugere que, conforme esperado, a superfície modificada dos eletrodos possui carga positiva.

Figura 20: Voltamogramas obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4, a 100 mV s⁻¹, contendo 1 mmol L⁻¹ de K₃[Fe(CN)₆] e K₄[Fe(CN)₆] em (A) e (C), e 1 mmol L⁻¹ de [Ru(NH₃)]Cl₃ em (B) e (D). Sendo (a) antes e (b) após a modificação.

Tabela 1: Porcentagem do decaimento da corrente de pico (I_p) de oxidação e de redução para as sondas redox aniônica e catiônica após a modificação

ELETRODO	CV		ITO	
	oxidação	redução	oxidação	redução
Sonda Aniônica	76%	54%	78%	63%
Sonda Catiônica	95%	84%	93%	93%

O perfil voltamétrico da corrente capacitiva antes e após a modificação dos eletrodos foi outro parâmetro utilizado para comprovar a modificação (Figura 21). Para isso, foram escolhidas as regiões de -0,5 a 0,0 V para o CV, e de 0,0 a 0,5 V para o ITO, pois, não são observados processos faradaicos nessas regiões para os eletrodos limpos. Foi possível observar que a corrente capacitiva do eletrodo CV/ β -bipy não é tão diferente que a do eletrodo CV limpo, indicando que a modificação não alterou significativamente a resposta do eletrodo. Já o eletrodo ITO/ β -bipy apresentou um comportamento capacitivo diferente do eletrodo limpo, que foi atribuído à modificação. O fato de o ITO ser um semicondutor pode justificar sua maior sensibilidade a modificação quando comparado ao CV. Estes resultados são compatíveis com a proposta de que uma ou mais camadas de moléculas β -bipy recobrem a superfície dos eletrodos resultando no aumento da resistividade do sistema. É possível supor também que as cargas positivas presentes na superfície dos eletrodos modificados interagem com os íons fosfato da solução contribuindo para a comunicação elétrica entre eletrodo e solução, e isso justifica o aumento não muito expressivo da corrente capacitiva.

Figura 21: Voltamogramas cíclicos obtidos em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4, a 100 mV s⁻¹, para eletrodo de CV em A e ITO em B, sendo (a) antes e (b) após a modificação.

Um fenômeno intrigante foi observado quando os eletrodos CV/ β -bipy e ITO/ β -bipy foram submetidos a varreduras potenciais em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4. Os eletrodos limpos foram submetidos a varreduras potenciais nesta solução para

verificar se suas superfícies estavam adequadas para uso, e esse procedimento foi repetido após a modificação com intuito de comparar o perfil voltamétrico do eletrodo limpo com o do eletrodo modificado. Curiosamente os eletrodos CV/ β -bipy e ITO/ β -bipy apresentaram um processo redox entre -1,0 e -0,8 V e -1,1 e -0,77, respectivamente. Ainda mais interessante foi o fato de suas respectivas correntes de picos diminuírem consideravelmente nos primeiros ciclos e chegam a, praticamente, zero após o 12^a ciclo (Figura 22).

Figura 22: Voltamogramas obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4, a 100 mV s⁻¹, para (A) CV/ β -bipy e (B) ITO/ β -bipy. Total de 12 ciclos.

Para verificar se os eletrodos continuavam modificados foram obtidos voltamogramas cíclicos em solução tampão fosfato contendo a sonda redox aniônica, K₃[Fe(CN)₆] e K₄[Fe(CN)₆], e, separadamente, a catiônica, [Ru(NH₃)]Cl₃, antes e após o procedimento de estabilização. Os resultados comprovaram que os eletrodos continuam modificados, porém, suas respectivas superfícies sofreram alterações após o procedimento (Figura 23). É provável que o aparecimento desse processo redox seja uma consequência da existência de ligações Ar-N=N-Ar e C-C, sobretudo desta primeira, formadas durante o processo de modificação dos eletrodos, conforme discutido anteriormente. Assim, é razoável supor que estas ligações sejam rompidas a medida que os eletrodos são submetidos a varreduras potenciais mantendo, assim, apenas a camada de moléculas ligadas diretamente a sua superfície. Um estudo em microbalança

eletroquímica de cristal de quartzo poderia comprovar essa hipótese, pois, seria possível verificar se há perda de massa durante a estabilização dos eletrodos modificados em solução tampão fosfato. Porém, não foi possível realizar este estudo neste trabalho.

Figura 23: Voltamogramas obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4 para eletrodo de CV, sendo (A) contendo 1 mmol L⁻¹ de K₃[Fe(CN)₆] e K₄[Fe(CN)₆], e (B) contendo 1 mmol L⁻¹ de [Ru(NH₃)]Cl₃; e para eletrodo de ITO, sendo (C) contendo 1 mmol L⁻¹ de K₃[Fe(CN)₆] e K₄[Fe(CN)₆], e (D) contendo 1 mmol L⁻¹ de [Ru(NH₃)]Cl₃. Os voltamogramas (a) representam os eletrodos antes de serem estabilizados em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4, e (b) após serem estabilizados.

Espectros de impedância eletroquímica foram obtidos para o eletrodo de CV limpo, para CV/ β -Bipy imediatamente após a modificação, e para CV/ β -Bipy após a

estabilização em solução tampão fosfato (Figura 24). Os resultados mostraram um aumento expressivo na R_{ct} para CV/ β -Bipy comparado ao eletrodo limpo, e, após a estabilização não foi possível verificar a R_{ct} . Esse comportamento pode estar associado a perda do processo redox observado para CV/ β -Bipy que se perde após estabilização. Porém, os resultados confirmam que o eletrodo continua modificado mesmo após ser estabilizado em solução tampão fosfato, e sugere que CV/ β -Bipy pode ser usado tanto sem ser estabilizado, e neste caso o processo redox que ele apresenta pode ser útil conforme mostrado nos espectros de EIE, quando após ser estabilizado.

Os estudos com eletrodo de ITO foram realizados na intenção de serem utilizados em estudos com Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo, uma vez que eletrodos de ouro não são viáveis para a modificação com $+N_2$ - β -bipy em solução contendo HCl necessária para uma modificação *in situ*. Devido a indisponibilidade de eletrodos de ITO para esse estudo, a partir deste ponto foram utilizados apenas eletrodo de CV, e todos foram estabilizados em solução tampão fosfato após modificação para obtenção de CV/ β -Bipy.

Figura 24: Diagramas de Nyquist registrados em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7.4) contendo 2,5 mmol L⁻¹ de $[Fe(CN)_6]^{3-}$ e $[Fe(CN)_6]^{4-}$ para (▪) eletrodo CV limpo, (●) CV/ β -Bipy antes e (Δ) após estabilizar em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7.4).

4.1.4. Comportamento eletroquímico do eletrodo CV/ β -Bipy após interação com o complexo $[\text{RuCl}_5(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$

Para verificar se o nitrogênio não-quaternizado da β -Bipy está disponível no eletrodo CV/ β -Bipy, a interação deste com o complexo $[\text{RuCl}_5(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$ foi investigada. Para isso, o eletrodo GC/ β -Bipy ficou submerso em uma solução de 50 mmol L⁻¹ de $[\text{RuCl}_5(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$ durante 1 hora. Em seguida, o eletrodo foi lavado com água destilada e voltammogramas cíclicos consecutivos foram registrados em solução tampão fosfato de 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4) (Figura 25).

Figura 25: Voltamogramas cíclicos registrados em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4) para (A) eletrodo CV/ β -Bipy após ficar submerso por 1 hora em solução 50 mmol L⁻¹ [RuCl₅(H₂O)]²⁻, e (B) registrado após (A). Velocidade de varredura 20 mV s⁻¹, 10 ciclos.

A primeira verificação de potencial mostrou um processo de redução e oxidação próximo de -0.18 V e 0.00 V, respectivamente (Figura 25-A). Estes processos foram atribuídos a Ru (III)/Ru (II) e Ru (II)/Ru (III) no complexo (Figura 26-A). Quando o Ru (III) é reduzido a Ru (II) o complexo torna-se mais lábil e permite que o nitrogênio não-quaternizado da piridina se ligue ao complexo para formar o eletrodo CV/ β -

Bipy/[RuCl₅]³⁻ (Figura 26-B), justificando o fato desse processo redox (-0,18 V e 0,00 V) ser irreversível (Figura 25-A). A partir da segunda varredura potencial outro processo redox foi observado em torno de +0,12 V e +0,25 V seguido de um aumento nas correntes de pico com as varreduras consecutivas (Figura 25-A). Esse comportamento foi atribuído ao processo redox reversível do rutênio no CV/β-Bipy/[RuCl₅]^{2-/3-} (Figura 26-C).

Figura 26: (A) Processo de redução e oxidação do [RuCl₅(H₂O)]²⁻ na superfície do eletrodo CV/β-Bipy. (B) Reação entre o nitrogênio não-quaternizado da piridina e o [RuCl₅(H₂O)]²⁻ gerado eletroquimicamente na superfície do eletrodo CV/β-Bipy. (C) Processos de redução e oxidação obtidos após (B).

Estudos realizados anteriormente pelo grupo mostraram que um filme polimérico pode ser formado na superfície do CV a partir de [RuCl₅(H₂O)]²⁻ em solução tampão fosfato e, também, que quando o rutênio é oxidado para Ru (IV) este filme é desfeito. Para evitar qualquer formação de película de polímero de rutênio na superfície não modificada de CV, varreduras de potencial foram registradas para o eletrodo CV/β-Bipy/[RuCl₅]^{2-/3-} até +1,0 V (Figura 25-B). O processo irreversível de oxidação Ru (III)/Ru (IV) foi observado em +0,8 V para a primeira varredura potencial e desapareceu com varreduras consecutivas, seguido de uma diminuição das correntes de pico do

processo redox reversível do eletrodo CV/ β -Bipy/[RuCl₅]^{2-/3-} que mudou para +0,08 V e +0,40 V. Tais comportamentos foram atribuídos ao "desmanche" do filme polimérico de rutênio e provaram que o nitrogênio não-quaternizado da piridina permaneceu ligado ao complexo, uma vez que o processo redox atribuído ao CV/ β -Bipy/[RuCl₅]^{2-/3-} permaneceu após esse procedimento.

Estudos EIE e ECE apoiaram esta hipótese (Figura 27). Neste estudo o processo difusional torna-se bem definido após o potencial de varredura a +1,0 V, sugerindo uma melhor comunicação eletroquímica entre a superfície do eletrodo CV/ β -Bipy/[RuCl₅]^{2-/3-} e a solução, pois, as regiões não modificadas do CV não estariam mais ocupadas pelo polímero formado pelo complexo de rutênio.

Figura 27: (A) Diagrama de Nyquist para Impedância e (B) correspondente capacitância para (▪) CV/ β -Bipy, (•) CV/ β -Bipy/ RuCl_5 após varredura potencial até 1,0 V, e (Δ) CV/ β -Bipy/ RuCl_5 após varredura potencial até 1,0 V em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4).

Considerando a proporção de 1:1 para a ligação entre nitrogênio não-quaternizado da piridina na superfície de CV/ β -Bipy e o complexo $[\text{RuCl}_5(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ para a formação do eletrodo CV/ β -Bipy/ $[\text{RuCl}_5]^{2-/3-}$, o pico de oxidação do processo redox irreversível observado para este eletrodo foi utilizado para calcular sua cobertura. Os resultados sugeriram uma monocamada com cobertura de 0,558 nmol cm⁻² de β -Bipy na superfície

CV. É válido ressaltar que esta quantidade de moléculas que modificam o eletrodo não estão distribuídas uniformemente pela sua superfície, conforme mencionado anteriormente. Porém, é razoável afirmar que as regiões do eletrodo que estão modificação contém uma monocamada da molécula que o modificou, no caso a β -Bipy.

Contudo, foi possível obter o eletrodo CV/ β -Bipy e provar que o nitrogênio não quaternizado da bipyridina está disponível para interagir com a biomolécula e, também, para ser utilizado na modificação via reação *click*, conforme será apresentado e discutido na sequência do trabalho. Outros estudos podem contribuir para a caracterização do eletrodo modificado como, por exemplo, a microscopia eletrônica de varredura e a microscopia de força atômica, porém, estes não foram abordados neste trabalho.

4.2. Biossensor para lactose usando o eletrodo CV/ β -Bipy

4.2.1. Imobilização de MBP-Gal-1 na superfície do eletrodo CV/ β -Bipy

A proteína fusionada MBP-Gal-1 foi utilizada nos experimentos para interagir com o eletrodo CV/ β -Bipy através do domínio MBP, permitindo que o domínio de reconhecimento de carboidratos da galectina-1 permanecesse disponível após a imobilização. Para este estudo, MBP-Gal-1 e MBP-Gal-1 ligada a maltose (maltose/MBP-Gal-1) foram imobilizadas na superfície do eletrodo CV/ β -Bipy durante 4 horas. Para obtenção da maltose/MBP-Gal-1, a maltose foi adicionada ao frasco contendo a MBP-Gal-1 em quantidade equimolar, pois, o CRD da Gal-1 também pode interagir de forma menos específica com a maltose. Após isso, espectros de impedância e de capacitância eletroquímica foram obtidos. Conforme mostrado anteriormente, a EIE do eletrodo CV/ β -Bipy usando o par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ como sonda redox não apresentou perfil que permitisse o cálculo da R_{ct} (Figura 28-A). Assim, os resultados de EIE foram convertidos para ECE, conforme descrito no tópico 3.5 (Figura 28-B). A partir dos dados de ECE foi obtido o Diagrama de Bode, e a discussão dos resultados foi feita considerando a imaginária da função capacitiva complexa (C'') em função da frequência (Figura 28-C).

Os resultados mostraram que a C'' aumenta em torno de 15% e diminui em torno de 3% quando MBP-Gal-1 e maltose/MBP-Gal-1 foram imobilizados, respectivamente. O resultado indica que a interação entre o eletrodo CV/ β -Bipy e a MBP-Gal-1 ocorreu preferencialmente pelo domínio MBP, pois, quando este estava ocupado pela maltose a

resposta de capacitância foi menor, sugerindo uma imobilização menos efetiva. Portanto, os resultados sugerem que o domínio de reconhecimento de carboidratos da Gal-1 fica disponível após a imobilização.

Figura 28: (A) Gráfico de Nyquist para impedância e (B) correspondente capacitância do (■) CV/ β -Bipy, (●) CV/ β -Bipy após a imobilização do MBP-Gal-1 e (Δ) CV/ β -Bipy após maltose/MBP-Gal-1 a $7 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4). (C) Diagramas de Bode da parte imaginária da função capacitiva complexa. Tempo de imobilização de 4 horas.

A influência do tempo de imobilização foi investigada para a concentração fixa de $7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MBP-Gal⁻¹ (Figura 29-A). Com intuito de auxiliar a interpretação e discussão dos resultados, o termo C'' foi convertido para $\%C''$ a partir da resposta obtida

para o eletrodo CV/ β -bipy, considerando apenas a resposta obtida na frequência de 1000 Hz (Figura 29-B). Os resultados mostraram que a %C'' decresce em 3% a cada 10 minutos de imobilização da MBP-Gal-1 até chegar em 50 minutos. De 50 para 60 minutos o decréscimo foi de 5%, sugerindo que a interação da proteína recombinante com o eletrodo pode ocorrer por um processo de cinética diferente após este período. A interação do CV/ β -bipy com o sítio de ligação da MBP seria o processo de cinética rápida que ocorre até 50 minutos de imobilização, pois, é esperado que esta interação seja mais específica, e a formação de interações menos específicas entre grupos funcionais da proteína e a superfície do eletrodo, por exemplo, seria o processo de cinética lenta que começa a aparecer a partir de 60 minutos de imobilização. A partir deste resultado o tempo de imobilização da MBP-Gal-1 foi fixado em 30 minutos, o que corresponde a uma redução de 10% na C'' em 1000 Hz.

Figura 29: (A) Diagramas de Bode da parte imaginária da função capacitiva complexa registrada em solução tampão de fosfato de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) para CV/ β -Bipy após $7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de MBP-Gal-1 com imobilização em diferentes períodos. (B) Porcentagem da C'' observada a 1000 Hz para diferentes períodos de imobilização.

A influência da concentração de MBP-Gal-1 nos valores de C'' foi investigada para um tempo fixo de imobilização em 30 minutos. Os resultados mostraram que o termo C'' apresentou diminuição pouco expressiva para valores de concentração entre 100 pmol L^{-1} e 100 nmol L^{-1} . Já para a concentração de $7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de MBP-Gal-1 a diminuição foi

a mais expressiva para as concentrações estudadas, e seu valor chegou a 22% (Figura 30-A). Surpreendentemente, as concentrações de 10 e 78 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MBP-Gal-1 promoveram um aumento no termo C'' (Figura 30-B). Esse comportamento sugeriu uma saturação de MBP-Gal-1 na superfície do eletrodo CV/ β -Bipy após 7 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Além disso, é possível que os sítios de ligação da proteína recombinante não fiquem disponíveis em altas concentrações, o que poderia ser resultado de uma interação entre as próprias proteínas para formação de pequenos oligômeros. Tal comportamento é observado para a Gal-1 em concentrações maiores que 7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Camby *et al.*, 2006).

Portanto, os resultados indicaram que o tempo de imobilização em 30 minutos e a concentração de MBP-Gal-1 de 7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ são os melhores valores de referência para a construção do eletrodo CV/ β -Bipy/MBP-Gal-1.

Figura 30: Diagramas de Bode da parte imaginária da função capacitiva complexa registrada em solução tampão de fosfato de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) para CV/ β -Bipy após 30 minutos de imobilização de MBP-Gal-1 em diferentes concentrações. A capacitância imaginária máxima (A) diminui para concentrações menores que $7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e (B) aumenta para valores superiores a $7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de MBP-Gal-1.

4.2.1. Detecção de lactose usando o eletrodo CV/ β -Bipy/MBP-Gal-1

Diferentes eletrodos CV/ β -Bipy/MBP-Gal-1 foram preparados com $7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de MBP-Gal-1 imobilizados durante 30 minutos sobre a superfície do eletrodo CV/ β -Bipy.

Estes eletrodos foram utilizados para detecção de lactose a $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ imobilizados durante 30 minutos (Figura 31). Os resultados mostraram que $\Delta C''$ diminui em, aproximadamente, 5% após a interação com a lactose nessas condições. Para otimizar o resultado, o tempo de imobilização e a concentração da lactose foram investigados.

Figura 31: Porcentagem da variação de $\Delta C''$ após $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de lactose imobilizados durante 30 minutos na superfície de eletrodos de CV/ β -Bipy/MBP-Gal-1. Os eletrodos CV/ β -Bipy foram submersos em PBS contendo $7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MBP-Gal-1 durante 30 minutos.

O estudo do tempo de imobilização foi conduzido a uma concentração fixa de lactose a $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 32). Os resultados mostraram um decréscimo da $\%C''$ em, aproximadamente, 1% a cada 10 minutos, e que a saturação da superfície do eletrodo ocorre após 70 minutos de imobilização da lactose. Assim, o tempo de imobilização para detecção da lactose foi fixado em 60 minutos, e a variação máxima da $\%C''$ a ser obtida seria de apenas 7%.

Figura 32: (A) Diagrama de Bode da parte imaginária da função capacitiva complexa obtido em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4) para o eletrodo CV/ β -Bipy/MBP-Gal-1 após diferentes tempos de imobilização de lactose a 5 μ mol L⁻¹. (B) decréscimo da %C'' observado em 1000 Hz.

O estudo da variação da concentração da lactose foi conduzido com o tempo de imobilização fixo em 60 minutos (Figura 33). Os resultados mostraram que não há variação significativa na %C'' para concentrações maiores que 5 μ mol L⁻¹ de lactose e que, assim como no estudo do tempo de imobilização, a variação máxima observada vai muito além de 7%. Tais resultados sugerem que o eletrodo CV/ β -Bipy/MBP-Gal-1 não apresentou boa sensibilidade para a detecção de lactose.

Figura 33: Diagrama de Bode da parte imaginária da função capacitiva complexa registrado em PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4) para o eletrodo CV/ β -Bipy/MBP-Gal-1 após imobilização de lactose durante 60 minutos em diferentes concentrações.

Mesmo apresentando baixa sensibilidade o eletrodo pode ter boa especificidade pelo seu alvo complementar. Para verificar isso, o eletrodo CV/ β -Bipy/MBP-Gal-1 foi testado para a detecção de maltose e sacarose, considerados alvos não complementares da proteína e são possíveis interferentes no caso de uma amostra real como, por exemplo, numa análise de leite e seus derivados. Neste estudo a lactose e a sacarose apresentaram o mesmo resultado, um decréscimo de 6% na %C'' observado a 1000 Hz. Para a maltose esse decréscimo foi de 16% (Figura 34). Considerando que a ligação da MBP-Gal-1 com o eletrodo CV/ β -Bipy ocorre preferencialmente pelo domínio da MBP, é possível afirmar, então, que esse resultado indica que o domínio da Gal-1 no eletrodo CV/ β -Bipy/MBP-Gal-1 é mais específico para maltose que para lactose. A semelhança estrutural entre esses isômeros pode justificar esse comportamento, porém, ele é diferente do observado para a Gal-1 em solução, no qual seu CRD apresenta mais afinidade pela lactose (Cooper and Barondes, 1999; Camby *et al.*, 2006).

Figura 34: Decréscimo da %C'', observado em 1000 Hz, para diferentes carboidratos imobilizados durante 60 minutos a 7 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A cor cinza representa o eletrodo CV/ β -Bipy/MBP-Gal-1, e a verde a detecção de cada alvo.

4.3. Adição de maltose na superfície do eletrodo CV/ β -bipy via reação *click*

A maltose foi adicionada ao eletrodo CV/ β -bipy em duas etapas: i) adição do grupo propargil via S_N2 ; e ii) reação *click* com a azida-maltose previamente sintetizada (Figura 35). O mecanismo destas reação estão bem relatados na literatura. Cada etapa da modificação foi acompanhada por voltametria cíclica e espectroscopia de capacitância eletroquímica.

Figura 35: Representação esquemática da obtenção do eletrodo CV/ β -bipy/Mal via reação *click*.

Na voltametria cíclica foi possível observar que a resistividade do eletrodo CV/ β -bipy aumenta tanto após a inclusão do propargil quanto na reação *click* (Figura 36). Tal comportamento pode ser atribuído ao aumento do bloqueio da superfície do eletrodo que ocorre em cada etapa, e que dificulta a comunicação eletroquímica com a solução.

Neste estudo, também foi observado que os eletrodos CV/ β -bipy/Propil e CV/ β -bipy/Mal possuem um processo de redução em torno de -0,4 V. Esse processo pode ser atribuído ao nitrogênio não quaternizado da β -bipy que, após as reações, passa a ser quaternizado e carregado positivamente. Comportamento semelhante foram observados na eletropolimerização do N-(3-pirrol-1-il-propil)-4,4'-bipiridina (Takada, Naal and Abrunã, 2003).

Figura 36: Voltamogramas cíclicos registrados em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4) para diferentes etapas de modificação do eletrodo de CV. Velocidade de varredura 100 mV s⁻¹.

Na ECE foi possível observar que a inclusão do propil e da maltose no eletrodo CV/ β -bipy provoca uma diminuição da capacitância (Figura 37-A). Considerando a frequência fixa em 500 Hz, notou-se que essa diminuição é de, aproximadamente, 6% no termo da C'' para ambas as etapas (Figura 37-B). A formação de uma segunda carga positiva no filme que recobre o eletrodo pode favorecer o acúmulo de cargas na dupla camada elétrica. Além disso, as características hidrofílicas da maltose também podem

contribuir para esse fenômeno. Desta forma, podemos justificar a diminuição da capacitância observada neste estudo.

Figura 37: (A) Correspondente gráfico de Nyquist para capacitância obtido em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4) para diferentes etapas de modificação do eletrodo. (B) Diagramas de Bode da parte imaginária da função capacitiva complexa.

Para confirmar que o propargil se ligou ao nitrogênio não quaternizado da β -bipy conforme esperado, a reação entre o eletrodo CV/ β -bipy/Mal e o complexo

$[\text{RuCl}_5(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$ foi investigada. Este estudo foi conduzido nas mesmas condições do apresentado na sessão 4.1.4. Os resultados mostraram que o $[\text{RuCl}_5(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$ não se ligou ao eletrodo CV/ β -bipy/Mal, pois, não houve alteração no comportamento voltamétrico do eletrodo após a interação com o complexo (Figura 38).

Portanto, os resultados mostraram que o grupo propargil e a maltose se ligaram ao eletrodo CV/ β -bipy dando origem ao novo eletrodo CV/ β -bipy/Mal, e que o grupo propargil e, conseqüentemente, a maltose estão ligados ao eletrodo pelo nitrogênio disponível da β -bipy, confirmando que a modificação ocorreu conforme esperado e apresentado na Figura 31.

Figura 38: Voltamogramas cíclicos registrados em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7.4) para o eletrodo CV/ β -bipy/Mal antes (em preto) e após (em vermelho) ficar submerso durante 1,5 horas em solução 50 mmol L⁻¹ $[\text{RuCl}_5(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$. Velocidade de varredura 20 mV s⁻¹.

4.4. Biossensor para lactose usando o eletrodo CV/ β -Bipy/Mal

4.4.1. Imobilização de MBP-Gal-1 na superfície do eletrodo CV/ β -Bipy/Mal

Para verificar se a proteína fusionada MBP-Gal-1 interage com o eletrodo CV/ β -Bipy/Mal preferencialmente pelo domínio da MBP permitindo, assim, que o CRD da Gal-1 permanecesse disponível após a imobilização, a MBP-Gal-1 e MBP-Gal-1 ligada a maltose (maltose-MBP-Gal-1) foram imobilizadas na superfície do eletrodo CV/ β -Bipy/Mal, e os resultados foram comparados na Tabela 2.

Os resultados mostraram que a C'' diminui em torno de 16% quando MBP-Gal-1 é imobilizada no eletrodo. Para a maltose-MBP-Gal-1 essa resposta foi de 10%, sugerindo que a indisponibilidade do domínio da MBP leva a uma menor afinidade da proteína pelo eletrodo. Ao utilizarmos ambos os eletrodos para a detecção de lactose, a resposta do eletrodo CV/ β -Bipy/Mal/MBP-Gal-1 foi cerca de três vezes maior que a do eletrodo CV/ β -Bipy/Mal/maltose-MBP-Gal-1. Tal resultado sugere que o CRD da Gal-1 ficou mais disponível e mais ativo no eletrodo CV/ β -Bipy/Mal/MBP-Gal-1 e que, provavelmente, uma quantidade considerável de proteína pode se ligar ao eletrodo pelo sítio de ligação da Gal-1, justificando os valores encontrados para o eletrodo CV/ β -Bipy/Mal/maltose-MBP-Gal-1.

Tabela 2: Comparação entre as respostas observadas para a imobilização da MBP-Gal-1 e da MBP-Gal-1 ligada a maltose (maltose-MBP-Gal-1)

Eletrodo	Proteína 7 $\mu\text{mol L}^{-1}$; 1 h	% de queda da C'' em 1000 Hz	Deteção de Lactose 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$; 30 min
CV/β-Bipy/Mal	MBP-Gal-1	16%	26%
	maltose-MBP-Gal-1	10%	7%

Portanto, diferentes condições para a detecção de lactose foram estudadas para os eletrodos CV/ β -Bipy/Mal/MBP-Gal-1. Nestes estudos, as condições de imobilização da proteína foram as mesmas determinadas anteriormente para o eletrodo CV/ β -Bipy/MBP-Gal-1, ou seja, uma concentração de 7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS 0,1 mol L^{-1} (pH 7,4), e um tempo de imobilização de 1 hora.

4.4.2. Detecção de lactose usando o eletrodo CV/ β -Bipy/Mal/MBP-Gal-1

Diferentes eletrodos CV/ β -Bipy/Mal/MBP-Gal-1 foram preparados com 7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MBP-Gal-1 imobilizados durante 1 hora sobre a superfície do eletrodo CV/ β -Bipy/Mal. Estes eletrodos foram utilizados para detecção de lactose a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS imobilizados durante 30 minutos. Os resultados mostraram que termo C'' , observado na frequência fixa de 1000 Hz, para o eletrodo CV/ β -Bipy/Mal/MBP-Gal-1 diminui em torno de 13% após a interação com a lactose nessas condições. Para otimizar o resultado, o tempo de imobilização e a concentração da lactose foram investigados.

O estudo do tempo de imobilização foi conduzido a uma concentração fixa de lactose a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 39). Os resultados mostraram um decréscimo da $\%C''$ em, aproximadamente, de 12% já nos primeiros 15 minutos de imobilização, e ao final dos 60 minutos este valor sobe para 17%, ou seja, um ganho de 5% na resposta para mais 45 minutos de imobilização do alvo. Isso indica que essa imobilização pode ser realizada em 15 minutos e, assim, o experimento ganha em agilidade. Esse estudo também mostrou que não ocorre a saturação da superfície do eletrodo após 60 minutos de imobilização da lactose. Assim, o tempo de imobilização para detecção da lactose foi fixado em 30 minutos, tempo este que favoreceu o planejamento dos experimentos e que garantiu uma variação máxima da $\%C''$ entorno de 13%.

Figura 39: (A) Diagrama de Nyquist da parte imaginária da função complexa da capacitância registrado em PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7.4), e (B) correspondente diagramas de Bode. (C) Valores de C'' observados na frequência de 1000 Hz para diferentes tempos de imobilização da lactose a 10 μmol L⁻¹. A MBP-Gal-1 foi imobilizada durante 1 hora.

O estudo da variação da concentração da lactose foi conduzido com o tempo de imobilização fixo em 30 minutos (Figura 40). Os resultados mostraram que o termo C'' , observado em 1000 Hz, sofre um decréscimo de 11% para a concentração de 0,1 μmol L⁻¹ de lactose. Este valor sobe para 21% para a concentração de 5 μmol L⁻¹ e, após isso, aumenta entorn de 5% cada concentração estudada até chegar a 50 μmol L⁻¹. De 50 para 100 μmol L⁻¹ o ganho de resposta foi de apenas 1%, indicando que o eletrodo encontrava-

se perto da saturação. Tais resultados sugerem que o eletrodo CV/ β -Bipy/Mal/MBP-Gal-1 apresentou boa sensibilidade para a detecção de lactose.

Figura 40: (A) Diagrama de Nyquist da parte imaginária da função complexa da capacitância registrado em PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4), e (B) correspondente diagramas de Bode da parte imaginária da função capacitiva complexa. (C) Valores de C'' observados na frequência de 1000 Hz para diferentes concentrações de lactose. A MBP-Gal-1 foi imobilizada durante 1 hora, e a lactose durante 30 minutos.

Para verificar a especificidade do eletrodo CV/ β -Bipy/Mal/MBP-Gal-1 pelo seu alvo complementar, o mesmo foi utilizada para detecção de maltose, sacarose e glicose, todos carboidratos considerados não específicos para Gal-1 (Figura 41). Os resultados

mostrarm uma diminuição no valor da C'' de 3, 5 e 8% na detecção de maltose, sacarose e glicose, respectivamente. Já na detecção da lactose a resposta do eletrodo foi de 35%.

Estes resultados sugerem que quando a imobilização da MBP-Gal-1 ocorre pela interação específica da maltose, que está presente na superfície do eletrodo, com o domínio da MBP, a atividade biológica da Gal-1 é melhor preservada, pois, o eletrodo CV/ β -Bipy/Mal/MBP-Gal-1 foi capaz de considerar a maltose um alvo não específico mesmo este apresentando semelhança estrutural com a lactose, algo que o eletrodo CV/ β -Bipy/MBP-Gal-1 não foi capaz de fazer. Neste caso, a Gal-1 imobilizada no eletrodo CV/ β -Bipy/Mal apresentou o mesmo comportamento observado em solução, no qual seu CRD apresenta mais afinidade pela lactose.

Figura 41: (A) Decréscimo da $\%C''$ observado em 1000 Hz para diferentes alvos imobilizados durante 30 minutos a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4).

5. CONCLUSÕES

Os eletrodos de CV e de ITO foram covalentemente modificados pela redução eletroquímica do grupo arildiazônio gerado *in situ* a partir do brometo de 1-[2-(4-aminofenil)etil]-4,4'-bipiridina previamente sintetizado. Estudos utilizando sondas aniônicas e catiônicas confirmaram o sucesso do método de modificação e indicaram um filme carregado positivamente formado na superfície do eletrodo. O par redox

permanente formado após a reação entre os eletrodo modificados e o complexo $[\text{RuCl}_5(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ sugeriu que o nitrogênio da piridina não-quaternizado estava disponível no neste eletrodos. O referido processo redox foi usado para calcular a cobertura dos eletrodos CV/ β -Bipy e ITO/ β -Bipy, e os resultados indicaram uma formação em monocamada.

Estudos de imobilização da MBP-Gal-1 indicaram uma maior afinidade pelo eletrodo CV/ β -Bipy quando o domínio da MBP estava disponível. Os resultados da ECE para o tempo de imobilização e a concentração de MBP-Gal-1 sugeriram dois processos cinéticos diferentes para a interação eletrodo CV/ β -Bipy. O processo mais rápido foi relacionado à interação do domínio MBP e o mais lento às interações não específicas. Assim, as melhores condições encontradas para a imobilização da proteína foram de 30 minutos e $7 \mu\text{mol L}^{-1}$.

O eletrodo CV/ β -Bipy/MBP-Gal-1 foi utilizado para detecção de lactose. Os estudo sobre a influência do tempo de imobilização e da concentração da lactose indicaram uma saturação da superfície do eletrodo com 70 minutos de imobilização, e uma resposta máxima de 7% na redução da C'' para concentrações acima de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$. Quando utilizado para detectar carboidratos não complementares da Gal-1, o eletrodo mostrou mais afinidade pela maltose. Portanto, a atividade da Gal-1 foi mantida após a imobilização, porém, o eletrodo CV/ β -Bipy/MBP-Gal-1 apresentou baixa sensibilidade e uma maior afinidade pela maltose.

Foi possível inserir a maltose no eletrodo CV/ β -Bipy via reação *click* e, assim, obter o eletrodo CV/ β -Bipy/Mal. E o ensaio com o complexo de $[\text{RuCl}_5(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$ provou que a reação aconteceu no nitrogênio não quaternizado da piridina da β -Bipy. Portanto, a maltose do eletrodo CV/ β -Bipy/Mal está orientada e disponível para interagir com a MBP-Gal-1.

O estudo de imobilização da MBP-Gal-1 na superfície do eletrodo CV/ β -Bipy/Mal indicaram que a resposta de C'' é 62,5% maior quando o domínio da MBP está disponível para interagir com o eletrodo, e, neste caso, a capacidade de detecção da lactose foi cerca de 73% maior. Portanto, a maltose ligada a superfície do eletrodo contribui significativamente tanto para a imobilização da proteína fusionada quanto para a detecção do seu alvo complementar.

O estudo da influência do tempo de imobilização da lactose na superfície do eletrodo CV/ β -Bipy/Mal/MBP-Gal-1 indicou que 30 minutos foi o tempo que melhor conciliou a resposta do eletrodo com o planejamento dos experimentos. A influência da concentração da lactose também foi investigada. E os resultados indicaram que o eletrodo

possui boa sensibilidade para detecção do seu alvo complementar, conseguindo até 10% de resposta da C'' para valores de até $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Além de uma boa sensibilidade, o eletrodo CV/ β -Bipy/Mal/MBP-Gal-1 apresentou uma boa especificidade pela lactose, na qual a resposta foi de 35% de diminuição da C'' , contra uma variação de 3 a 8% observados para os carboidratos maltose, sacarose e glicose, que não são alvos específicos para Gal-1.

Por fim, a utilização da proteína fusionada MBP-Gal-1 mostrou-se uma boa estratégia para a construção de um biossensor de lactose, e que o potencial de desenvolvimento desse dispositivo é maior quando a imobilização da proteína na superfície do eletrodo ocorre pela interação com o alvo complementar do domínio da MBP, ou seja, a maltose.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLINGER, N. L. *et al.* (1976) *Química Orgânica*. Rio de Janeiro: LTC.

Allongue, P. *et al.* (2003) 'No Title', *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 550.

Ameer, Q. and Adeloju, S. B. (2009) 'Development of a potentiometric catechol biosensor by entrapment of tyrosinase within polypyrrole film', *Sensors and Actuators B*, 140, pp. 5–11.

Arduini, F. *et al.* (2017) 'How cutting-edge technologies impact the design of electrochemical (bio)sensors for environmental analysis. A review', *Analytica Chimica Acta*. Elsevier Ltd, 959, pp. 15–42. doi: 10.1016/j.aca.2016.12.035.

Bellot, P. *et al.* (2013) 'Maltose-binding protein is a potential carrier for oral immunizations', *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Elsevier B.V., 152(1–2), pp. 101–108. doi: 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. doi: 10.1021/la047139y.

Bojarova, P. and Kren, V. (2016) 'Sugared biomaterial binding lectins: achievements and

perspectives', *Biomaterials Science*, pp. 1142–1160. doi: 10.1039/C6BM00088F.

Bollella, P. *et al.* (2017) 'Green Synthesis and Characterization of Gold and Silver Nanoparticles and their Application for Development of a Third Generation Lactose Biosensor', *Electroanalysis*, 29, pp. 77–86. doi: 10.1002/elan.201600476.

Bongat, A. F. G. and Demchenko, A. V. (2007) 'Recent trends in the synthesis of O-glycosides of 2-amino-2-deoxysugars', *Carbohydrate Research*, 342, pp. 374–406.

Bosshart, A. *et al.* (2018) 'Detection of lactose in products with low lactose content', *International Dairy Journal*, 83, pp. 19–21.

C. Gómez-Anquela *et al.* (2014) 'Electrografting of N',N'-dimethylphenothiazin-5-ium-3,7-diamine(Azure A) diazonium salt forming electrocatalytic organic films on gold or graphene oxide gold hybrid electrodes', *Electrochimica Acta*, 116, pp. 59– 68.

Çakiroglu, B. *et al.* (2019) 'A photoelectrochemical glucose and lactose biosensor consisting of gold nanoparticles, MnO₂ and g-C₃N₄ decorated TiO₂', *Sensors and Actuators B*, 282, pp. 282–289.

Camby, I. *et al.* (2006) 'Galectin-1: A small protein with major functions', *Glycobiology*, 16(11). doi: 10.1093/glycob/cwl025.

Carey, F. A. and Sundberg, R. J. (2000) *Advanced Organic Chemistry*. 4°.

Cazares-Körner, C. *et al.* (2013) 'CH-01 is a Hypoxia-Activated Prodrug That Sensitizes Cells to Hypoxia/Reoxygenation Through Inhibition of Chk1 and Aurora A', *ACS Chem. Biol*, 8, p. 1451–1459.

Chauhan, R. *et al.* (2015) 'Electrochemical piezoelectric reusable immunosensor for aflatoxin B1 detection', *Biochemical Engineering Journal*, 103, pp. 103–113.

Cho, M. and Cummings, R. D. (1995) 'Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. I. Physical and chemical characterization.', *The Journal of biological chemistry*, pp. 5198–5206. Available at: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=7890630&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers2://publication/uuid/91FF4901-DC19-424B-ACF8-BBEAC0F6A829>.

Chuang, C. H. *et al.* (2016) ‘Immunosensor for the ultrasensitive and quantitative detection of bladder cancer in point of care testing’, *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier, 84, pp. 126–132. doi: 10.1016/j.bios.2015.12.103.

Chung, D.-J. *et al.* (2012) ‘One-step modification of various electrode surfaces using diazonium salt compounds and the application of this technology to electrochemical DNA (E-DNA) sensors’, *Electrochimica Acta*, 76, pp. 394–403.

Clark, L. C. and Lyons, C. (1962) ‘Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery’, *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 102(1), pp. 29–45. doi: 10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x.

Cooper, D. N. W. and Barondes, S. H. (1999) ‘God must love galectins; he made so many of them’, *Glycobiology*, 9(10), pp. 979–984. doi: 10.1093/glycob/9.10.979.

D’Orazio, P. (2003) ‘Biosensors in clinical chemistry’, *Clinica Chimica Acta*, 334(1–2), pp. 41–69. doi: 10.1016/S0009-8981(03)00241-9.

Dacres, H. *et al.* (2013) ‘Advantages of substituting bioluminescence for fluorescence in a resonance energy transfer-based periplasmic binding protein biosensor’, *Biosensors and Bioelectronics*, 41, pp. 459–464.

Davis, J., Huw Vaughan, D. and Cardosi, M. F. (1995) ‘Elements of biosensor construction’, *Enzyme and Microbial Technology*, 12(17), pp. 1030–1035.

Doumèche, B. and Blum, L. J. (2010) ‘NADH oxidation on screen-printed electrode modified with a new phenothiazine diazonium salt’, *Electrochemistry Communications*, 12, pp. 1398–1402.

Ensafi, A. A. *et al.* (2015) ‘Selective and sensitive furazolidone biosensor based on DNA-modified TiO₂-reduced graphene oxide’, *Applied Surface Science*, 356, pp. 301–307.

Fukuda, T., Onogi, S. and Yoshiko, M. (2009) ‘“Dendritic sugar-microarrays by click chemistry”’, *Thin Solid Films*, 518, pp. 880–888.

Garner, A. L. and Janda, K. D. (2010) ‘“cat-ELCCA: A Robust Method To Monitor the Fatty Acid Acyltransferase Activity of Ghrelin O-Acyltransferase (GOAT)”’, *Angew. Chem. Int.*, 49, pp. 9630–9634.

Gizeli, E. and Glad, J. (2004) ‘Single-Step Formation of a Biorecognition Layer for Assaying Histidine-Tagged Proteins’, *Anal. Chem.*, 76, pp. 3995–4001.

Gooding, J. J. (2006) ‘Biosensor technology for detecting biological warfare agents: Recent progress and future trends’, *Analytica Chimica Acta*, 559(2), pp. 137–151. doi: 10.1016/j.aca.2005.12.020.

Guilbault, G. G. and Montalvo, J. G. (1969) ‘A Urea-Specific Enzyme Electrode’, *Journal of the American Chemical Society*, 91(8), pp. 2164–2165. doi: 10.1021/ja01036a083.

Han, B. *et al.* (2019) ‘A sensitive and selective terahertz sensor for the fingerprint detection of lactose’, *Talan*, 192, pp. 1–5.

Van Hattum, H. *et al.* (2013) ‘Development of a microarray detection method for galectin cancer proteins based on ligand binding’, *Analytical Biochemistry*. Elsevier Inc., 434(1), pp. 99–104. doi: 10.1016/j.ab.2012.11.003.

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. doi: 10.1016/j.foodres.2017.09.090.

Henok B. Habtamu; Paolo Ugo (2015) ‘Miniaturized Enzymatic Biosensor via Biofunctionalization of the Insulator of Nanoelectrode Ensembles’, *Electroanalysis*, 27, pp. 2187 – 2193.

Huisgen, R. (1984) *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*. Edited by A. Padwa. New York: Wiley.

Ipek, Y., Dincçer, H. and Koca, A. (2014) ““Electrode modification based on “click electrochemistry” between terminal-alkynyl substituted cobalt phthalocyanine and 4-azidoaniline”, *Sensors and Actuators B*, 193, pp. 830– 837.

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. doi: 10.1149/2.0291708jss.

Jain, R., Jadon, N. and Pawaiya, A. (2017) ‘Polypyrrole based next generation

electrochemical sensors and biosensors: A review', *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier Ltd, 97, pp. 363–373. doi: 10.1016/j.trac.2017.10.009.

Jamil, A. *et al.* (2015) 'Preparation and characterization of silver nanoparticles-reduced graphene oxide on ITO for immunosensing platform', *Sensors and Actuators B*, 221, pp. 1423–1432.

Jang, H. D. *et al.* (2015) '3D label-free prostate specific antigen (PSA) immunosensor based on graphene–gold composites', *Biosensors and Bioelectronics*, 63, pp. 546–551.

Jolly, P. *et al.* (2016) *Highly sensitive dual mode electrochemical platform for microRNA detection, Scientific Reports*.

Juaristi, E. and Cuevas, G. (1992) 'Recent studies on the anomeric effect', *Tetrahedron*, 48, pp. 5019–5087.

Kartha, K. P. and Field, R. A. (1997) 'Iodine: a versatile reagent in carbohydrate chemistry. IV. Per-O-acetylation, regioselective acylation and acetolysis', *Tetrahedron*, 53, pp. 11753–11766.

Leffler, H. *et al.* (2004) 'Introduction to galectins', *Glycoconjugate Journal*, 19.

Lei, Y., Chen, W. and Mulchandani, A. (2006) 'Microbial biosensors', *Analytica Chimica Acta*, 568:(1–2), pp. 200–210.

Leone, G. *et al.* (2010) "'Realisation and chemical characterisation of a model system for saccharide-based biosensor'", *Thin Solid Films*, 519, pp. 462–470.

Ley, C. *et al.* (2011) 'Immobilization of histidine-tagged proteins on electrodes', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 88, pp. 539– 551.

Lieber, E. *et al.* (1957) 'Infrared Spectra of Organic Azides', *Analytical Chemistry*, 29.

Liu, M. *et al.* (2014) 'Diazonium functionalization of graphene nanosheets and impact response of aniline modified graphene/bismaleimide nanocomposites', *Materials and Design*, 53, pp. 466–474.

Liu, S. *et al.* (1996) 'Voltammetric determination of sequence-specific DNA by electroactive intercalator on graphite electrode', *Analytica Chimica Acta*, 335:(3), pp.

239–243.

Lopez, F. *et al.* (2017) ‘A Polymer Multilayer Based Amperometric Biosensor for the Detection of Lactose in the Presence of High Concentrations of Glucose’, *Electroanalysis*, 29, pp. 154–161. doi: 10.1002/elan.201600575.

Medintz, I. L. and Deschamps, J. R. (2006) ‘Maltose-binding protein: A versatile platform for prototyping biosensing’, *Current Opinion in Biotechnology*, 17(1), pp. 17–27. doi: 10.1016/j.copbio.2006.01.002.

Mydock, L. K. and Demchenko, A. V. (2010) ‘Mechanism of chemical O-glycosylation: from early studies to recent discoveries’, *Organic and Biomolecular Chemistry*, 8, pp. 497–510.

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. doi: 10.1021/ac010596o.

Nasri, Z. and Shams, E. (2013) ‘A glucose biosensor based on direct electron transfer of glucoseoxidase immobilized onto glassy carbon electrode modified withnitrophenyl diazonium salt’, *Electrochimica Acta*, 112, pp. 640– 647.

Nasri, Z., Shams, E. and Ahmadi, M. (2013) ‘A glucose biosensor based on direct attachment of in situ generated nile blue diazonium cations to the electrode surface’, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 703, pp. 146–152.

Nguyen, B. H. *et al.* (2016) ‘Development of label-free electrochemical lastose biosensor based on graphene/poly(1,5-diaminophthalene) film’, *Current Applied Physics*, 16, pp. 135–140.

Nien, P.-C., Tun, T.-S. and Ho, K.-C. (2006) ‘Amperometric Glucose Biosensor Based on Entrapment of Glucose Oxidase in a Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) Film’, *Electroanalysis*, 18, pp. 1408 – 1415.

Noah, N. M. *et al.* (2012) ‘Conducting polyamic acid membranes for sensing and site-directed immobilization of proteins’, *Analytical Biochemistry*. Elsevier Inc., 428(1), pp. 54–63. doi: 10.1016/j.ab.2012.06.008.

- Palod, P. A. and Singh, V. (2015) ‘Improvement in glucose biosensing response of electrochemically grown polypyrrole nanotubes by incorporating crosslinked glucose oxidase’, *Materials Science and Engineering C*, 55, pp. 420–430.
- Park, C. S., Yoon, H. and Kwon, O. S. (2016) ‘Graphene-based nanoelectronic biosensors’, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry, 38, pp. 13–22. doi: 10.1016/j.jiec.2016.04.021.
- Park, H.-J. *et al.* (2009) ‘An ISFET biosensor for the monitoring of maltose-induced conformational changes in MBP’, *FEBS Letters*, 583, pp. 157–162.
- PAVIA, D. L. *et al.* (2011) *Introdução à Espectroscopia*. 4th edn. Cengage Learning.
- Pfeiffer, F. and Mayer, G. (2016) ‘Selection and Biosensor Application of Aptamers for Small Molecules’, *Frontiers in Chemistry*, 4(June), pp. 1–21. doi: 10.3389/fchem.2016.00025.
- Powell, M. J., Ruzunguzwa, T. T. and Li, M. (2012) ‘Non-Ionic Acid-Labile Surfactants and Methods of Use’. United States.
- Qi, H. *et al.* (2012) “‘Functionalization of single-walled carbon nanotubes with protein by click chemistry as sensing platform for sensitized electrochemical immunoassay’”, *Electrochimica Acta*, 63, pp. 76–82.
- Qi, H. *et al.* (2013) “‘Double electrochemical covalent coupling method based on click chemistry and diazonium chemistry for the fabrication of sensitive amperometric immunosensor’”, *Analytica Chimica Acta*, 792, pp. 28–34.
- Queek, S. B., Cheng, L. and Cord-Ruwisch, R. (2015) ‘Microbial fuel cell biosensor for rapid assessment of assimilable organic carbon under marine conditions’, *Water Research*, 77(64–71).
- Richards, S.-J., Otten, L. and Gibson, M. I. (2016) ‘Glycosylated gold nanoparticle libraries for label-free multiplexed lectin biosensing’, *J. Mater. Chem. B*. Royal Society of Chemistry, 4, pp. 3046–3053. doi: 10.1039/C5TB01994J.
- Ripert, M., Farre, C. and Chaix, C. (2013) ‘Selective functionalization of Au electrodes by electrochemical activation of the “click” reaction catalyst’”, *Electrochimica Acta*, 91,

pp. 82–89.

Rodrigues, L. P. *et al.* (2014) ‘Bioelectrode Applied to Diagnosis of Cardiac Disease.’, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14 (9), pp. 6528–6538.

Rodrigues, L. P. *et al.* (2015) ‘Electropolymerization of hydroxyphenylacetic acid isomers and the development of a bioelectrode for the diagnosis of bacterial meningitis’, *J Appl Electrochem*, 45(12), pp. 1277–1287. doi: 10.1007/s10800-015-0892-2.

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. doi: 10.1016/j.bios.2018.01.023.

Ryu, H. J., Sibdas Singha Mahapatra, S. K. Y. and Cho., J. W. (2013) ‘Synthesis of click-coupled graphene sheet with chitosan: Effective exfoliation and enhanced properties of their nanocomposites’’, *European Polymer Journal*, 49, pp. 2627–2634.

Salimia, A. and Noorbakhsh, A. (2011) ‘Layer by layer assembly of glucose oxidase and thiourea onto glassy carbon electrode: Fabrication of glucose biosensor’, *Electrochimica Acta*, 56, pp. 6097– 6105.

Sassolas, A., Blum, L. J. and Leca-bouvier, B. D. (2012) ‘Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors’, *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc., 30(3), pp. 489–511. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.09.003.

Sean R. Stowell; Richard D. (2016) *Galectins Methods and Protocols*. Edited by Sean R. Stowell; Richard D. Cummings. Humana Press.

Setford, S. J. and Newman, J. D. (2005) ‘Enzyme Biosensors’, *Microbial Enzymes and Biotransformations*, 17, pp. 29–60. doi: 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). doi: 10.1111/cas.13016.

Shen, Q. *et al.* (2014) “‘Intra-molecular G-quadruplex structure generated by DNA templated clickchemistry: “Turn-on” fluorescent probe for copperions’, *Biosensors and Bioelectronics*, 55, pp. 187–194.

SILVERSTEIN, R. M. WEBSTER, F. X. and KIEMLE, D. J. (2007) *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. 7th edn. Edited by LTC. Rio de Janeiro.

Soares, J. C. *et al.* (2012) ‘Amperometric urea biosensors based on the entrapment of urease in polypyrrole films’, *Reactive & Functional Polymers*, 72, pp. 148–152.

Swaile, B. A. H. and Chambers, J. Q. (1991) ‘Electrochemical release of ethidium into and fluorescence detection of DNA-ethidium complexes in the diffusion layer at a carbon paste electrode’, *Analytical Biochemistry*, 196:(2), pp. 415–420.

Takada, K., Naal, Z. and 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*. Elsevier B.V., 101(September 2017), pp. 253–259. doi: 10.1016/j.bios.2017.10.026.

Tasca, F. *et al.* (2013) ‘“Determination of lactose by a novel third generation biosensor based on a cellobiose dehydrogenase and aryl diazonium modified single wall carbon nanotubes electrode’, *Sensors and Actuators B*, 177, pp. 64–69.

Teles, F. R. R. and Fonseca, L. P. (2008) ‘Trends in DNA biosensors’, *Talanta*, 77(2), pp. 606–623. doi: 10.1016/j.talanta.2008.07.024.

Thévenot, D. R. *et al.* (2001) ‘Electrochemical Biosensors: Recommended definitions and classification’, *Analytical Letters*, 34(5), pp. 635–659. doi: 10.1081/AL-100103209.

Turner, A. P. F., Karube, I. and Wilson, G. S. (1987) *Biosensors, Fundamentals and Applications*. Oxford University Press.

Varki, A. *et al.* (2009) *Essentials of Glycobiology*. 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Vikholm-Lundin, I. *et al.* (2012) ‘Cysteine-tagged chimeric avidin forms high binding capacity layers directly on gold’, *Sensors and Actuators B*, pp. 440– 448.

Vsevolod V. Rostovtsev, L. G. G., Fokin, V. V. and Sharpless, K. B. (2002) ‘A Stepwise

Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes.’, *Angew. Chem. Int.*, 114.

Wan-zhi, W. *et al.* (2007) ‘New amperometric glucose biosensor by entrapping glucose oxidase into chitosan/nanoporous ZrO₂/multiwalled carbon nanotubes nanocomposite film’, *J. Cent. South Univ. Technol.*, 14(1).

Wolfson, M. L. and Thompson, A. (1964) *Methods in Carbohydrate Chemistry*.

Ying, L. and Gervay-Hague, J. (2003) ‘General methods for the synthesis of glycopyranosyluronic acid azides’, *Carbohydrate Research*, 338.

Zhang, Y. *et al.* (2015) ‘ZnO nanostructures in enzyme biosensors’, *Science China Materials*, 58(1), pp. 60–76. doi: 10.1007/s40843-015-0017-6.

Zhu, N. *et al.* (2006) ‘Electrochemically fabricated polyaniline nanowire-modified electrode for voltammetric detection of DNA hybridization’, *Electrochimica Acta*, 51:(18), pp. 3758–3762.

Zhu, N. N. *et al.* (2004) ‘Electrochemical detection of DNA hybridization using methylene blue and electro-deposited zirconia thin films on gold electrodes’, *Analytica Chimica Acta*, 510:(2), pp. 163–168.

Zhu, Z. (2017) ‘An Overview of Carbon Nanotubes and Graphene for Biosensing Applications’, *Nano-Micro Letters*. Springer Berlin Heidelberg, 9(3), pp. 1–24. doi: 10.1007/s40820-017-0128-6.

7. MATERIAL SUPLEMENTAR

ANEXO I

Espectro MS-TOF para acetil-maltose

Espectro MS-TOF para acetil-bromo-maltose

Espectro MS-TOF para acetil-azida-maltose

ANEXO II

RMN ^1H em D_2O (400 MHz) para 1-(4-aminophenethyl)-[4,4'-bipyridin]-1-ium bromide

δ (ppm)	atribuição	integral	multiplicidade	J (Hz)
8.70	H ₁₁ e H ₁₅	2	<i>dd</i>	$J_{11,12} = J_{15,14} = 4.6$; $J_{11,15} = J_{15,11} = 1.7$
8.62	H ₂ e H ₆	2	<i>d</i>	$J_{18,17} = J_{20,21} = 6.9$
8.23	H ₈ e H ₁₂	2	<i>d</i>	$J_{17,18} = J_{21,20} = 6.9$
7.81	H ₁₇ e H ₁₉	2	<i>d</i>	$J_{12,11} = J_{14,15} = 4.6$; $J_{12,14} = J_{14,12} = 1.7$
6.99	H ₃ e H ₅	2	<i>dd</i>	$J_{4,6} = J_{6,4} = 8.6$
6.92	H ₂₀ e H ₁₆	2	<i>d</i>	$J_{1,3} = J_{3,1} = 8.6$
4.85	H ₁₃	2	<i>t</i>	$J_9 = J_8 = 6.4$
3.26	H ₁₄	2	<i>t</i>	$J_8 = J_9 = 6.4$

RMN ¹³C em D₂O (400 MHz) para 1-(4-aminophenethyl)-[4,4'-bipyridin]-1-ium
bromide

δ (ppm)	atribuição	δ (ppm)	atribuição	δ (ppm)	atribuição	δ (ppm)	atribuição
153,79	C ₇	144,66	C ₁₅	129,48	C ₂₀ ,C ₁₆	115,65	C ₃ , C ₅
149,98	C ₂ , C ₆	142,44	C ₁₈	125,68	C ₁₉ , C ₁₇	62,79	C ₁₃
148,83	C ₄	129,62	C ₉ , C ₁₁	122,41	C ₈ , C ₁₂	35,98	C ₁₄

Espectro de RMN ^1H obtido para a 2,2',3,3',4',6,6'-hepta-*O*-acetil- β -maltosil-azida.