

ADRIANO DOS SANTOS

ESTUDO DA AFINIDADE DAS PROTEÍNAS rTgMIC1 E rTgMIC4 DA *TOXOPLASMA GONDII* COM
FETUÍNA E ASIALOFETUÍNA UTILIZANDO TÉCNICA PIEZELÉTRICA

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno

Araraquara
2012

DADOS CURRICULARES

ADRIANO DOS SANTOS

DADOS PESSOAIS

Nascimento: 29/05/1983

Nacionalidade: Brasileiro

Naturalidade: Araraquara – SP

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2005 - 2009 Graduação em Licenciatura Em Química.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Instituto de Química, Campus de Araraquara.
Relatório de Estágio Supervisionado: Relatório Referente ao Estágio Supervisionado Realizado na Empresa de Revestimentos Antiaderentes Whitford do Brasil Ltda.
Orientador: Prof. Dr. Ossamu Hojo

PRÊMIOS E TÍTULOS

2009 Concurso para Criação de Logotipo e Nome Fantasia da Agência UNESP de Inovação.

2009 Prêmio Lavoisier, Conselho Regional de Química - IV Região.

2008 Menção Honrosa no XX Congresso de Iniciação Científica da UNESP (Área de Exatas).

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

1. WATANABE, A. M.; SANTOS, A.; BUENO, P. R. **Harmonical oscillator and electro-mechanical analogy**: an interdisciplinary experiment to high precision mass variation measurements. *Eclética Química*, v. 34, p. 57-75, 2009.

ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO

1. SANTOS, A.; BUENO, P. R.; SILVA, J. J.; WATANABE, A. M. **Determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos da adsorção de L-cisteína em ouro por meio da técnica de Microbalança a Cristal de Quartzo**. *Química Nova*, 2012.

TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS (RESUMO)

1. SANTOS, F. C.; SANTOS, A.; BUENO, P. R. **Application of the technique of the Quartz Crystal Microbalance for Real-time study of the influence of pH and inhibition of kinetics enzymatic.** In: 7th International Symposium on Advanced Materials and Nanostructures, 2012, Sorocaba-SP.
2. LEGENDRE, A. O.; SANTOS, A.; CUNHA, G. A.; CASTELLANO, E. E.; MAURO, A. E. **Estrutura tridimensional de um polímero de cobre(II) gerada pela coordenação em ponte de um dicarboxilato em forma de V.** In: III Encontro Capixaba de Química, 2011, Vitória-ES.
3. SANTOS, A.; BUENO, P. R.; PINZAN, C. F.; BARREIRA, M. C. R. **Piezoelectric biosensor applied to the study of lectin-carbohydrate interaction.** In: International Conference Nanoscale Materials and Devices for Energy Conversion, Storage and Biosensors, 2011, Natal-RN.
4. LEGENDRE, A. O.; SANTOS, A.; CUNHA, G. A.; NOGUEIRA, V. M.; CASTELLANO, E. E.; MAURO, A. E. **Estrutura tridimensional de um polímero de cobre(II) gerada pela coordenação em ponte de um carboxilato em forma de V.** In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia-SP.
5. LEGENDRE, A. O.; CORRÊA, J. R. A.; SANTOS, A.; CUNHA, G. A.; MATOS, J. R. **Synthesis and Thermal Behavior of Copper(II) Coordination Polymers Containing Bridging Diamine and Pseudohalide Ligands.** In: 14th International Congress on Thermal Analysis and Calorimetry, 2008, São Pedro-SP.
6. SANTOS, A.; LEGENDRE, A. O.; MAURO, A. E. **Estruturas poliméricas heterobimetálicas de cobre(II) contendo grupos cianometalatos e N,N-dietiletilenodiamina.** In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia-SP.
7. LEGENDRE, A. O.; CORRÊA, J. R. A.; SANTOS, A.; MAURO, A. E. **Sensor vapocrômico para detecção de amônia utilizando um polímero de coordenação de cobre(II).** In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia-SP.
8. SANTOS, A.; MAURO, A. E.; LEGENDRE, A. O. **Polímeros de coordenação de cobre(II) contendo grupos cianometalatos e N,N-dietiletilenodiamina.** In: XIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2007, Presidente Prudente-SP.
9. CUNHA, G. A.; MAURO, A. E.; SANTOS, A. **Síntese mecanoquímica de um composto supramolecular de cobre(II) com isonicotinamida.** In: XIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2007, Presidente Prudente-SP.
10. SANTOS, A.; MAURO, A. E.; LEGENDRE, A. O. **Pseudo-haletos complexos de cobre(II) contendo 4-aminopiridina como ligante. Síntese e caracterização.** In: XVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2006, Bauru-SP.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

1. **International Conference Nanoscale Materials and Devices for Energy Conversion, Storage and Biosensors**, 2011. Piezoelectric biosensor applied to the study of lectin-carbohydrate interaction.
2. **XX Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, 2008. Dois novos cianometalatos complexos de cobre(II) e seus comportamentos vapocrômicos frente ao vapor de amônia.
3. **XXXVIII Semana da Química (UNESP-Instituto de Química, Araraquara-SP)**, 2008.
4. **30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2007. Estruturas poliméricas heterobimetálicas de cobre(II) contendo grupos cianometalatos e N,N-dietiletilenodiamina.
5. **XIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, 2007. Polímeros de coordenação de cobre(II) contendo grupos cianometalatos e N,N-dietiletilenodiamina.
6. **V Evento em educação em química (UNESP-Instituto de Química, Araraquara-SP)**, 2007.
7. **XXXVII Semana da Química (UNESP-Instituto de Química, Araraquara-SP)**, 2007.
8. **XVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, 2006. Pseudo-haletos complexos de cobre(II) contendo 4-aminopiridina como ligante. Síntese e caracterização.
9. **IV Evento em educação em química (UNESP-Instituto de Química, Araraquara-SP)**, 2006.
10. **XXXVI Semana da química (UNESP-Instituto de Química, Araraquara-SP)**, 2006.
11. **III Evento em educação em química (UNESP-Instituto de Química, Araraquara-SP)**, 2005.
12. **XXXV Semana da Química (UNESP-Instituto de Química, Araraquara-SP)**, 2005.

ORGANIZAÇÃO DE EVENTO

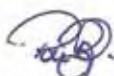
1. **XXXVI Semana da Química (UNESP-Instituto de Química, Araraquara-SP)**, 2006.

ADRIANO DOS SANTOS

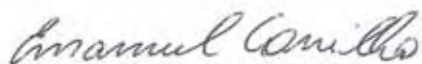
Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em
Química.

Araraquara, 08 de maio de 2012.

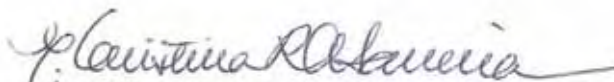
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Emanuel Carrilho
Instituto de Química– USP, São Carlos



Profª Drª Maria Cristina Roque Antunes Barreira
Faculdade de Medicina – USP, Ribeirão Preto

*A Deus, à minha família e
à minha companheira Ticiani,
pelo apoio e carinho
incondicionais.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno pela oportunidade oferecida, bem como pela valiosa orientação, apoio e amizade dedicados durante o período desta pesquisa, que me fortaleceram tanto pessoalmente como profissionalmente.

À Profa. Dra. Maria Cristina Roque Antunes Barreira pela ajuda, conselhos e suporte nas discussões dos resultados durante a realização deste trabalho, bem como pela oportunidade oferecida junto ao Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno, em uma parceria que espero ser duradoura e que renda mais valiosos frutos de trabalho e dedicação.

À Camila Figueiredo Pinzan e à Aline Sardinha por disponibilizarem amostras das proteínas para a execução desse trabalho, bem como à Fernanda Carvalho, juntamente com a Camila, pela preocupação e auxílio nas discussões dos resultados e na elucidação de dúvidas que sempre surgem no transcorrer de qualquer pesquisa. Sem essa preciosa ajuda, não poderia ter prosseguido e aprendido valiosas lições durante minha formação como pesquisador.

À Rose, administradora do LIEC, pela amizade e ágil apoio nas questões técnicas e burocráticas que surgiram no transcorrer do trabalho, essenciais e necessárias para o andamento de qualquer processo.

Aos demais amigos Willian, Anayza, Márcio Góes, Elsa, Fernanda, Ailton, Grazielle, Elaine, Mariele, Naira, Thiago, Carla, Márcio Santos, Flávio, Denise, Juliana, Rafael, Eucarlos e a todos os integrantes do LIEC pela amizade, auxílio e compartilhamento de todos os momentos, bons e ruins, que, sem dúvida, fizeram a diferença em vários momentos.

A todos os amigos do Instituto de Química, Campus de Araraquara, desde o corpo docente e profissionais das diversas áreas dessa instituição até o corpo discente, que ofereceram, de forma implícita, estimado auxílio no transcorrer de toda minha formação.

À FAPESP (processo 2009/11520-0), CNPq e CAPES pelo suporte financeiro.

A todos, meus sinceros agradecimentos.

Imagine que queiramos escalar uma montanha. Primeiramente, tomamos o cuidado de nos preparar devidamente para essa aventura. Compramos mapas da região, examinamos cada ponto perigoso do caminho, as dificuldades que podemos enfrentar e a relação de mantimentos. Conversamos com pessoas que já fizeram essa jornada e tentamos extrair o máximo de informações que possam nos ajudar, além de contratamos um guia experiente. Conferimos os instrumentos de navegação e estudamos um caminho alternativo caso aconteça algo inesperado nessa jornada. Tudo isso realizado com zelo, uma vez que nossas próprias vidas estão em perigo.

Embora essa comparação possa ser simplista, o desenvolvimento da ciência não é algo essencialmente diferente. Pretendemos alcançar um objetivo e, igualmente ao alpinista, devemos nos preparar devidamente para alcançar essa meta. Primeiramente, fazemos uma busca na literatura científica e podemos encontrar procedimentos possíveis de serem adotados em nosso estudo e textos que nos orientem para um caminho determinado. Conversamos com pesquisadores da área que já realizaram estudos similares a fim de solicitar-lhes informações preciosas sobre os problemas enfrentados por eles e como os resolveram. Verificamos as técnicas instrumentais que possam elucidar as características e comportamentos de nosso objeto de estudo, auxiliando-nos na interpretação e na conclusão de um conjunto de dados e fornecendo-nos indícios que nos orientem na melhora de nosso sistema, quando necessário, embora esse possa ser um caminho tortuoso e cheio de enganos.

Embora existam várias dificuldades no caminho, a jornada deve ser cumprida, o cume deve ser alcançado, e nada melhor para nossa consciência do que ter a certeza de que ela o seja de forma honesta e transparente, pois, quando visualizarmos o campo ao longe, sentirmos a brisa suave e o calor da luz do sol, observaremos a paisagem em nossa frente, o vale e as dificuldades vencidas, podendo respirar o ar puro e contemplar verdadeiramente a beleza do lugar que alcançamos.

“Faça o seu melhor hoje, quando for o amanhã você estará habituado.”
(Autor)

RESUMO

As proteínas de micronema TgMIC1 e TgMIC4 (TgMICs) da *Toxoplasma gondii* fazem parte de um complexo proteico localizado na superfície do parasita responsável pelo processo de adesão e invasão celular. Os objetivos desse trabalho foram estudar dispositivos piezelétricos contendo em cada um, uma das MICs recombinantes (rTgMIC1 ou rTgMIC4) e utilizá-los na determinação das constantes de afinidade entre elas com a fetuína e asialofetuína, empregando o modelo da Isoterma de Langmuir. Os dispositivos foram desenvolvidos por meio a abordagem de monocamadas automontadas (SAM) mista de tióis, utilizando solução etanólica contendo 2,5 mM de ácido 11-mercaptoundecanóico (11-MUA) e 7,5 mM de 6-mercaptop-1-hexanol (C6OH). A formação da SAM, realizada em temperatura ambiente por 12 h, foi monitorada pela técnica de Microbalança a Cristal de Quartzo com Fator Dissipativo (QCM-D) e voltametria cíclica utilizando o par redox $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{4-} / \text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$. Os resultados obtidos por ambas as técnicas evidenciaram a formação de SAM rígida e de elevado grau de cobertura superficial após cinética lenta em que processos de adsorção e organização dos tióis ocorreram simultaneamente. Para a imobilização das rTgMICs, solução aquosa contendo 10 mM de EDC (N-etil-N-(dimetilaminopropil) carbodiimida) e 20 mM de NHS (N-hidroxisuccinimida) foi utilizada para a ativação dos grupos carboxílicos presentes na SAM por 2 h, e o processo acompanhado por QCM-D apresentou resultados compatíveis com aqueles encontrados na literatura. Pela mesma técnica, foi possível verificar que ambas as rTgMICs se imobilizam sobre o cristal de quartzo após sua incubação com solução 0,15 mg/mL de cada rTgMIC em tampão Tris-HCl contendo 200 mM de NaCl (pH 8,0), por 2 h. Ao contrário da funcionalização do cristal de quartzo com rTgMIC4, sítios remanescentes de adsorção foram observados no processo utilizando a rTgMIC1, em que a etapa de bloqueio utilizando solução de gelatina 0,1 % por 2 h foi necessária. Por meio da técnica de QCM-D, foi possível obter e verificar a validade do modelo da Isoterma de Langmuir, permitindo calcular as constantes de associação cinética (K_a) para as interações rTgMIC1-Asialofetuína, rTgMIC1-Fetuína, rTgMIC4-Asialofetuína e rTgMIC4-Fetuína, com valores de K_a em $10^4 \times (\text{L/mol}) = 3,6 \pm 0,7$, $3,1 \pm 0,7$, $1,4 \pm 0,6$ e $1,9 \pm 0,5$, respectivamente. Os valores encontrados para a constante de afinidade aparente (K') para as interações rTgMIC1-Asialofetuína, rTgMIC1-Fetuína, rTgMIC4-Asialofetuína e rTgMIC4-Fetuína foram em $10^4 \times (\text{L/mol}) = 25 \pm 4$, 14 ± 1 , 4 ± 1 e 4 ± 2 , respectivamente, evidenciando semelhança nas interações entre cada rTgMIC com a fetuína e asialofetuína. Os valores negativos de ΔG obtidos em temperatura ambiente (25 °C) para os processos de interação, aproximadamente -26 kJ/mol, confirmam processo espontâneo e reforçam as evidências de que as MICs exercem papel importante no processo de invasão celular pelo protozoário.

Palavras-chave: QCM-D. SAM. *Toxoplasma gondii*. MIC.

ABSTRACT

The *Toxoplasma gondii* micronemal proteins TgMIC1 and TgMIC4 (TgMICs) are part of a protein complex located on the surface of the parasite responsible for the process of cellular adhesion and invasion. The goal of the present work was to study a piezoelectric device containing the recombinant MICs (rTgMIC1 or rTgMIC4) and use it in determining the affinity constants between the MICs with fetuin and asialofetuin, employing the Langmuir isotherm model. The devices were developed using the approach of self-assembled monolayer (SAM) in ethanolic solution containing 2.5 mM of 11-mercaptopundecanoic acid (11-MUA) and 7.5 mM of 6-mercaptohexanol (C6OH). The SAM formation, held at room temperature for 12 h, was monitored by the Quartz Crystal Microbalance technique with Dissipative Factor (QCM-D) and cyclic voltammetry using the redox couple $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$. The results obtained from both techniques showed the formation of a rigid and high surface degree coverage SAM after a slow kinetic process in which adsorption and organization of the thiols occur simultaneously. For the immobilization of rTgMICs, aqueous solution containing 10 mM EDC N-ethyl-N-(dimethylaminopropyl) carbodiimide and 20 mM NHS (N-hydroxysuccinimide) was used for 2 h, and the process followed by QCM-D was consistent with those found in the literature. By the same technique it was found that both rTgMICs are immobilized on the quartz crystal after incubation with solution 0.15 mg/mL of each rTgMIC in Tris-HCl containing 200 mM NaCl (pH 8.0) for 2 h. Unlike the functionalization of the quartz crystal rTgMIC4, remaining adsorption sites were observed in the process using the rTgMIC1, wherein the blocking step using 0.1% gelatin solution for 2 h was required. Throughout the QCM-D technique it was possible to verify the validity of the Langmuir isotherm model, allowing to calculate the association kinetic constant (K_a) for the interactions rTgMIC1-asialofetuin, rTgMIC1-fetuin, rTgMIC4-asialofetuin and rTgMIC4-fetuin, with values of K_a in $10^4 \times (\text{L/mol}) = 3.6 \pm 0.7, 3.1 \pm 0.7, 1.4 \pm 0.6$ and 1.9 ± 0.5 . The values obtained to apparent affinity constant (K') for rTgMIC1-asialofetuin, rTgMIC1-fetuin, rTgMIC4-asialofetuin and rTgMIC4-fetuin interactions were, in $10^4 \times (\text{L/mol})$, $25 \pm 4, 14 \pm 1, 4 \pm 1$ and 4 ± 2 , respectively. The affinity values were similar for rTgMIC interaction with fetuin and asialofetuin. The negative values of ΔG interaction process obtained at room temperature (25 °C) was $\Delta G \approx -26 \text{ kJ/mol}$, evidencing a spontaneous process and reinforcing that MICs play a role in cell invasion by the protozoan.

Keywords: QCM-D. SAM. *Toxoplasma gondii*. MIC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Pode-se considerar que o desenvolvimento de biossensores piezelétricos se localiza na junção de três grandes áreas: Física, Química e Biologia	19
Figura 2 -	Classificação dos biossensores...	23
Figura 3 -	SAMs (de tiol) são formadas através da imersão do substrato (filme fino de ouro depositado sobre cristal de quartzo) na solução de tiol, por um tempo t a uma temperatura T ...	29
Figura 4 -	Metodologia de Langmuir-Blodgett...	30
Figura 5 -	Parâmetros α e β que descrevem a orientação da molécula de tiol no substrato (neste caso, um alcanotiol)...	35
Figura 6 -	Ilustração esquemática de alguns dos defeitos intrínsecos ou extrínsecos encontrados em SAMs formadas em substrato de ouro policristalino...	37
Figura 7 -	Cristal de quartzo recoberto por eletrodos de ouro. (a) Devido à assimetria do material, ocorre o aparecimento de dipolos elétricos (b)...	38
Figura 8 -	Desenho ilustrativo de um cristal de quartzo revestido com uma camada de ouro em ambos os lados (a e b)...	42
Figura 9 -	Esquema de montagem do biossensor Au-cistamina-glutaraldeído-lectina utilizado por Pedroso et al. ⁶	42
Figura 10 -	Variação negativa da frequência de oscilação do cristal de quartzo quando o eletrodo de ouro funcionalizado com a lectina...	43
Figura 11 -	Esquema resumido das atividades biológicas que ocorrem na membrana plasmática...	47
Figura 12 -	Desenho esquemático de um taquizoíta de <i>T. gondii</i>	48
Figura 13 -	Estrutura do complexo TgMIC4-1-6, que mostra as posições relativas dos domínios e sítios de ligação na célula hospedeira....	50
Figura 14 -	Estruturas dos oligossacarídeos presentes na asialofetuína e fetuína	52
Figura 15 -	Conjunto utilizado para o estudo da formação do biossensor e da interação das rTgMICs com a fetuína e asialofetuína...	55
Figura 16 -	Conjunto utilizado para o estudo da formação da SAM por voltametria cíclica...	56
Figura 17 -	Detalhes do procedimento experimental utilizado na construção dos biossensores contendo rTgMIC 1 ou rTgMIC4 para os estudos de afinidade	60
Figura 18 -	Processo de formação da SAM acompanhado pela técnica de QCM-D. Para a formação da monocamada...	61

Figura 19 -	Esquema do processo de formação de uma SAM...	62
Figura 20 -	Observação do processo de imobilização da mistura de tióis sobre o eletrodo de ouro no cristal de quartzo por voltametria cíclica antes (curva <i>Au</i>) e após a imobilização (curva <i>SAM</i>)....	64
Figura 21 -	Processo de oxidação e redução dos íons complexos $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{4-}$ e $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$ em solução...	64
Figura 22 -	Etapa de ativação da SAM utilizando solução aquosa contendo EDC (10 mM) e NHS (20 mM)...	65
Figura 23 -	Exemplo de processo de ativação da SAM de 11-MUA. Quando solução de EDC e NHS entra em contato com a SAM de 11-MUA ocorre...	66
Figura 24 -	Processo de adsorção da proteína rTgMIC1 sobre eletrodo de ouro funcionalizado com SAM e ativado com solução de EDC/NHS...	67
Figura 25 -	Injeção de solução de gelatina 0,1% em tampão Tris-HCl (pH 8,0) sobre cristal funcionalizado com rTgMIC1...	69
Figura 26 -	Adição de solução de BSA em tampão Tris-HCl (pH 8,0) sobre cristal funcionalizado com rTgMIC1 (-) e com éster-NHS...	70
Figura 27 -	Processo de adsorção da proteína rTgMIC4 sobre eletrodo de ouro funcionalizado com SAM e ativado com solução de EDC e NHS...	71
Figura 28 -	Injeção de solução de gelatina 0,1% em tampão Tris-HCl (pH 8,0) sobre cristal funcionalizado com rTgMIC4...	72
Figura 29 -	Processo de injeção de solução de BSA sobre cristal de quartzo funcionalizado com rTgMIC4...	72
Figura 30 -	(a) Interação das glicoproteínas asialofetúína ($5,2 \times 10^{-5}$ M) e fetúína ($7,4 \times 10^{-5}$ M) sobre o cristal funcionalizado com rTgMIC1. (b)...	74
Figura 31 -	(a) Exemplo de curva de saturação. Isoterma de Langmuir obtida para o sistema rTgMIC1-Asialofetúína...	75
Figura 32 -	Adição de solução de glicoproteína nas concentrações de saturação sobre cristal de quartzo funcionalizado com BSA...	76
Figura 33 -	Adições de solução de fetúína em diferentes concentrações sobre o cristal de quartzo funcionalizado com rTgMIC1	81
Figura 34 -	Adições de solução de asialofetúína em diferentes concentrações sobre o cristal de quartzo funcionalizado com rTgMIC1	81
Figura 35 -	Adições de solução de fetúína em diferentes concentrações sobre o cristal de quartzo funcionalizado com rTgMIC4	82

Figura 36 -	Adições de solução de asialofetuína em diferentes concentrações sobre o cristal de quartzo funcionalizado com rTgMIC4	82
Figura 37 -	Exemplo de ajuste da curva $\Delta f \times t$ utilizando a Equação 20...	83
Figura 38 -	Constante de relaxação (τ^{-1}) em função da concentração obtido para o processo de interação entre rTgMIC1 com (a) asialofetuína e (b) fetuína...	85
Figura 39 -	Constante de relaxação (τ^{-1}) em função da concentração obtido para o processo de interação entre rTgMIC4 com (a) asialofetuína e (b) fetuína...	86
Figura 40 -	Isoterma de Langmuir linearizada para a interação rTgMIC1-Asialofetuína...	90
Figura 41 -	Isoterma de Langmuir linearizada para a interação rTgMIC1-Fetuína...	90
Figura 42 -	Isoterma de Langmuir linearizada para a interação rTgMIC4-Asialofetuína...	91
Figura 43 -	Isoterma de Langmuir linearizada para a interação rTgMIC4-Fetuína...	91
Figura 44 -	Curvas Dxf do processo de interação rTgMIC1-Asialofetuína nas concentrações de (a) $2,1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e (b) $5,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de glicoproteína...	95
Figura 45 -	Curvas Dxf do processo de interação rTgMIC1-Fetuína nas concentrações de (a) $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e (b) $7,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de glicoproteína...	96
Figura 46 -	Curvas Dxf do processo de interação rTgMIC4-Asialofetuína nas concentrações de (a) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e (b) $4,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de glicoproteína...	97
Figura 47 -	Curvas Dxf do processo de interação rTgMIC4-Fetuína nas concentrações de (a) $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e (b) $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de glicoproteína...	98
Figura 48 -	Curvas de $\Delta f_n \times \text{tempo}$ para a interação da rTgMIC1 com (a) asialofetuína na concentração de $5,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e (b) fetuína $7,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$...	101
Figura 49 -	Curvas de $\Delta f_n \times \text{tempo}$ para a interação da rTgMIC4 com (a) asialofetuína na concentração de $4,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e (b) fetuína $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$...	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Diferentes valores de $ \alpha $ e β encontrados para diferentes tipos de tióis quando constituintes de SAM sobre Au(111)	36
Tabela 2 -	Reagentes utilizados	54
Tabela 3 -	Resultados da constante de relaxação (τ^{-1}) para as interações rTgMIC1-Asialofetuína e rTgMIC1-Fetuína...	83
Tabela 4 -	Resultados da constante de relaxação (τ^{-1}) para as interações rTgMIC4-Asialofetuína e rTgMIC4-Fetuína...	84
Tabela 5 -	Parâmetros cinéticos e termodinâmicos das interações entre rTgMIC1 e rTgMIC4 com as diferentes glicoproteínas...	87
Tabela 6 -	Resultados obtidos por meio dos experimentos realizados na QCM e utilizados na determinação da constante de afinidade aparente das interações rTgMIC1-Asialofetuína e rTgMIC1-Fetuína	89
Tabela 7 -	Resultados obtidos por meio dos experimentos realizados na QCM e utilizados na determinação da constante de afinidade aparente das interações rTgMIC4-Asialofetuína e rTgMIC4-Fetuína	89

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Biossensores	21
2.1.1 <i>O que são Biossensores?</i>	22
2.1.2 <i>Aplicações dos Biossensores</i>	25
2.2 Métodos de Imobilização do Material Biológico	26
2.2.1 <i>Método da Oclusão em Matriz</i>	26
2.2.2 <i>Microencapsulação</i>	26
2.2.3 <i>Adsorção Física</i>	27
2.2.4 <i>Ligação Covalente em Suporte</i>	27
2.2.5 <i>Monocamadas Automontada (SAM, do inglês Self-assembled Monolayers)</i>	28
2.2.5.1 <i>O que é SAM?</i>	28
2.2.5.2 <i>Preparação de SAM de tióis</i>	30
2.2.5.3 <i>Organização das SAMs de tióis</i>	34
2.2.5.4 <i>Defeitos das SAMs de tióis</i>	36
2.3 Princípios da Técnica de QCM-D e Biossensores Piezelétricos	37
2.3.1 <i>Exemplos de Biossensores Piezelétricos utilizando a técnica de SAM</i>	41
2.4 Lectinas	45
2.5 <i>Toxoplasma gondii</i>	47
2.5.1 <i>As proteínas de micronemas TgMIC1 e TgMIC4</i>	49
2.6 A fetuína e a asialofetuína	51
3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	53
4. METODOLOGIA	54
4.1 Materiais	54
4.2 Instrumentação	55
4.3 Limpeza dos Cristais	57
4.4 Estudo da formação da monocamada automontada mista de 11-MUA e 6COH	57
4.5 Estudo dos processos de ativação, imobilização das rTgMICs e bloqueio	58
4.6 Verificação do bloqueio dos cristais de quartzo funcionalizados com as rTgMICs e avaliação da especificidade	58
4.7 Estudo da Interação das rTgMICs com as glicoproteínas fetuína e asialofetuína	59
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1 Formação da SAM mista de 11-MUA e C6OH	61
5.2 Acompanhamento do processo de ativação da SAM por QCM-D	65
5.3 Processo de imobilização das rTgMICs e etapa de bloqueio	67

5.3.1 Imobilização da rTgMIC1	67
5.3.2 Imobilização da rTgMIC4	70
5.4 Estudo da Interação das rTgMICs com fetuína e asialofetuína	73
5.5 Avaliação da especificidade	75
5.6 Determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos da interação entre as rTgMICs com as glicoproteínas fetuína e asialofetuína por meio do modelo da Isoterma de Langmuir	76
5.7 Constante de Afinidade Aparente	88
5.8 Verificação do modelo de interação receptor-ligante por meio da técnica de QCM-D	93
6. CONCLUSÕES	104
REFERÊNCIAS	106
APÊNDICE A	111

1. INTRODUÇÃO

Em dezembro de 1959, no Encontro Anual da Sociedade Americana de Física realizado no Instituto de Tecnologia da Califórnia (Caltech), o físico norte-americano Richard Philips Feynman, em seu discurso *"There's plenty of room at the bottom"*, foi o primeiro a conceituar *nanotecnologia*, referenciando a um conjunto de procedimentos que permitiriam ao homem desenvolver materiais a partir da manipulação individual de átomos. Caso ele ainda estivesse vivo, certamente ficaria muito satisfeito ao observar a variedade de materiais desenvolvidos por esta tecnologia (cosméticos, tecidos, fármacos, *chips* de computadores, etc.) e pela promessa, que ainda ressoa em nosso tempo, da potencialidade que esses materiais possam vir a ser empregados, principalmente no campo da medicina. Embora Feynman tenha sido o primeiro a conceituá-la, a palavra *nanotecnologia* foi criada apenas em 1974 pelo Professor Norio Taniguchi, da Universidade de Ciências de Tóquio. Segundo ele, *nanotecnologia* consiste principalmente em um corpo de técnicas que possibilita ao homem controlar processos na escala nanométrica (átomos ou moléculas).

Atualmente, pode-se utilizar a abordagem da nanotecnologia em etapas do desenvolvimento de dispositivos miniaturizados. Um desses dispositivos, que é abordado nesta pesquisa, é o biossensor piezelétrico, aparelho capaz de identificar, quantificar (com precisão em nanogramas) e até mesmo determinar parâmetros de afinidade entre a molécula biológica imobilizada com determinados analitos. A abordagem nanotecnológica desse dispositivo se encontra no processo de funcionalização inicial do substrato metálico (ouro) do sensor, por meio da adsorção espontânea de moléculas de tiol sobre sua superfície, formando uma monocamada automontada (SAM, do Inglês *Self-Assembled Monolayer*). Após a adsorção química dessas moléculas no ouro, obtêm-se um sistema bidimensional nanoestruturado, que será utilizado em etapas posteriores da construção do dispositivo.

De forma geral, o princípio de funcionamento de um biossensor piezelétrico é simples: um material piezelétrico (como o cristal de quartzo) de dimensões específicas, contendo um fino filme metálico em ambos os lados de sua superfície, é posto a oscilar por meio da aplicação de uma diferença de potencial alternada. A oscilação do cristal de quartzo entra em ressonância quando essa frequência se iguala àquela da diferença de potencial aplicada.

De acordo com a relação de Sauerbrey, ocorre um decréscimo proporcional da frequência dessa oscilação quando uma determinada quantidade de massa é adsorvida. Essa massa adsorvida corresponde ao analito adsorvido na superfície do cristal, funcionalizada com material orgânico de natureza biológica (enzima, lectina, DNA, etc). Essa técnica é conhecida como Microbalança a Cristal de Quartz (QCM, do Inglês *Quartz Crystal Microbalance*), e por meio dela, consegue-se obter grande sensibilidade de detecção, podendo chegar à ordem de nanogramas por hertz (ng/Hz).

Embora os biossensores possam ser utilizados para fins puramente analíticos (detecção e quantificação de analito), atualmente se observam outras aplicações para esses dispositivos. Nosso grupo de trabalho, por exemplo, está desenvolvendo um minirreator enzimático piezelétrico, que possibilitará a obtenção de dados cinéticos de reações enzimáticas (constante de Michaelis-Menten) de forma rápida e *in situ*, sem a necessidade de processos intermediários.

Outra aplicação dos biossensores está na obtenção de dados de afinidade química entre moléculas biológicas, como entre as lectinas e os açúcares. As lectinas são uma espécie de proteína, que interagem de forma seletiva com determinados carboidratos e glicoproteínas. Muitos micro-organismos parasitas tiram proveito dessa habilidade, sintetizando determinadas lectinas e utilizando os açúcares presentes em glicoproteínas nas membranas celulares como âncoras para o início do processo de invasão. Portanto, as aplicações dos biossensores podem se estender desde a busca de novos métodos analíticos cada vez mais sensíveis e seletivos (desejáveis em diagnósticos clínicos), ao desenvolvimento de ferramentas rápidas de investigação das interações entre moléculas biológicas, como entre enzima-substrato e lectina-carboidrato.

Pode-se dizer que a metodologia de desenvolvimento de um biossensor piezelétrico surge graças à junção de três grandes áreas do conhecimento (Figura 1): Física (princípios teóricos do funcionamento da técnica de QCM), Química (conhecimento sobre os materiais piezelétricos, etapas e estratégias de funcionalização do sensor, compreensão das interações entre o analito e o material orgânico imobilizado) e Biologia (características do material biológico a ser imobilizado).

Figura 1 - Pode-se considerar que o desenvolvimento de biossensores piezelétricos se localiza na junção de três grandes áreas: Física, Química e Biologia



Fonte: Autor.

Uma aplicação interessante de biossensores seria no auxílio à compreensão do processo de invasão celular realizado pelo protozoário *Toxoplasma gondii*.

T. gondii é um micro-organismo invasor celular de animais homeotermos, como o homem, sendo responsável pelo defeito congênito em fetos. Estudos relatam que esse protozoário utiliza um complexo de proteínas (estrutura formada por diferentes proteínas, dentre as quais esse estudo se preocupou – TgMIC1 e TgMIC4) que se liga aos carboidratos associados a proteínas (glicoproteínas) presentes na membrana celular. Essas pesquisas sugerem que essa etapa é o início do processo de invasão celular, pois permite ao protozoário se ancorar na célula hospedeira.

Devido a esta evidência, torna-se importante investigar qual o grau de afinidade que essas proteínas possuem com diferentes carboidratos. Uma forma de obter essas informações é por meio da construção de biossensores piezelétricos específicos. O *design* desses dispositivos tenta imitar a membrana celular do protozoário no aspecto estrutural fundamental, de tal forma a permitir que a lectina interaja com o carboidrato. Embora possa ser simples quando comparado a uma membrana celular, utilizar o sensor funcionalizado com a lectina pode ser considerado como uma primeira aproximação desse sistema real.

Nesse contexto, esse trabalho se preocupou em desenvolver dispositivos biossensores piezelétricos capazes de obter informações de afinidade das proteínas recombinantes rTgMIC1 e rTgMIC4 com a glicoproteína fetuína e com a asialofetuína, sua forma destituída de ácido siálico na região terminal de suas N-glicanas, e esclarecer por quais dentre elas essas lectinas possuem maior afinidade. As etapas do desenvolvimento dos biossensores e

avaliação da afinidade foram acompanhadas pela técnica de voltametria cíclica (formação da SAM) e QCM (formação da SAM, processo de ativação, imobilização das rTgMICs, bloqueio e estudo da afinidade).

2. REVISÃO DA LITERATURA

A seguir, são apresentados os principais tópicos que envolvem esse trabalho, bem como um levantamento bibliográfico contendo aspectos fundamentais da técnica empregada (seção 2.3), estratégias de imobilização de proteínas (seção 2.2) e contextualizar o dispositivo que foi desenvolvido mostrando algumas de suas aplicações (seção 2.1). Na seção 2.4, são mostradas as definições de lectina e algumas de suas funções e importância nos organismos. São apresentados também alguns aspectos fundamentais das TgMICs e estudos que relatam suas afinidades por carboidratos (seção 2.5).

2.1 Biossensores

Há uma grande necessidade, na sociedade moderna, de se obter métodos de análise de baixo custo, simples, sensíveis e rápidos, que possam determinar tanto a presença (medida qualitativa) como a quantidade (medida quantitativa) de determinado analito, bem como a possibilidade de atravessar fronteiras tecnológicas que permitam o estudo, em tempo real, da afinidade entre biomoléculas. No campo da análise clínica, por exemplo, o desenvolvimento de dispositivos sensores para diagnóstico da dengue de forma rápida, principalmente no Brasil, é altamente desejável, sobretudo devido à atual metodologia se basear no método ELISA, que leva considerável tempo para ser finalizada.¹ Outro exemplo nesta área se encontra na determinação de baixas concentrações da proteína albumina na urina, que podem representar insuficiência renal ou hepática e evidenciar início de nefropatia diabética.² A detecção de determinados analitos de forma rápida e seletiva também é desejável em outras áreas, como na medicina veterinária, agroalimentar, produtos farmacêuticos, indústrias, meio ambiente, defesa e segurança.^{3,4} Outro campo não menos importante a se destacar é a biotecnologia, principalmente na área de enzimas⁵ e no estudo de interações entre biomoléculas (como por exemplo, lectina-carboidrato).^{6,7}

Uma forma de se obter dispositivos com essas características é por meio do desenvolvimento de biossensores. Um exemplo de biossensor comercialmente disponível e muito utilizado atualmente, especialmente por pacientes com diabetes, é aquele capaz de determinar instantaneamente o nível de glicose no sangue, como o da marca ACCU-CHEK®.

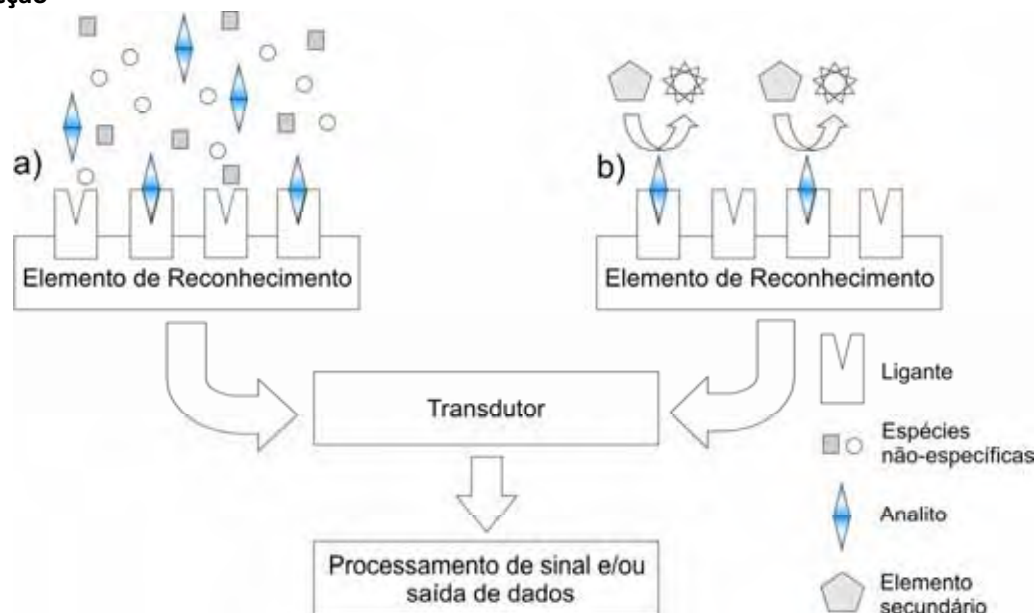
Devido à importância e crescente desenvolvimento destes dispositivos, é conveniente explorar o tema e citar processos de desenvolvimento e utilização dos biossensores.

2.1.1 O que são Biossensores?

Um biossensor é definido, segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), como um dispositivo que utiliza determinadas reações bioquímicas intermediadas por materiais biológicos isolados (enzimas, organelas, células, anticorpos, etc.) para identificar ou quantificar compostos químicos, geralmente por sinais elétricos, térmicos ou ópticos.⁴ Classicamente, um biossensor pode ser definido com um sensor que utiliza um material biológico (comumente conhecido como ligante ou elemento de reconhecimento) acoplado a um transdutor, responsável por converter o sinal de biorreconhecimento do analito pelo ligante em um sinal mensurável.^{3,8} Desta forma, os biossensores são sistemas formados por, basicamente, dois componentes: elemento de reconhecimento ou ligante, responsável pela identificação seletiva do analito, como enzimas e anticorpos; e transdutor, dispositivo capaz de converter o sinal de biorreconhecimento em outro mensurável, como sinal elétrico, por exemplo. Outros elementos que fazem parte de um biossensor são aqueles destinados ao processamento do sinal proveniente do transdutor, como amplificador e conversor do sinal de saída (responsável por converter o sinal do transdutor em uma unidade que é exibida nos *displays* do biossensor, como concentração do analito ou resultado positivo/negativo).⁸

Uma forma de categorizar os biossensores é dividi-los em dois grupos: biossensores de reconhecimento direto, no qual a interação biológica é diretamente medida; e os biossensores de reconhecimento indireto, que depende de um elemento secundário como, por exemplo, um marcador químico, para detecção.^{4,9} É mostrado na Figura 2 uma ilustração representando esses dois tipos de biossensores.

Figura 2 - Classificação dos biossensores. a) Nos biossensores de reconhecimento direto, não há a necessidade de marcadores químicos para detecção e o biorreconhecimento do analito pelo ligante é detectado diretamente pelo transdutor. b) Por outro lado, os biossensores de reconhecimento indireto precisam de um elemento secundário, como um marcador químico, para a detecção



Fonte: Adaptado de Rasooly e Herold (2009, p. vi).⁴

Biossensores de detecção direta são aqueles em que a interação biológica é diretamente medida em tempo real. Esses dispositivos tipicamente medem alterações físicas, isto é, alterações em propriedades ópticas e mecânicas, induzidas pela interação biológica, e não requer o uso de espécies secundárias. Biossensores diretos incluem sistemas baseados em propriedades óticas (Ressonância de Plasma de Superfície – SPR, do inglês *Surface Plasma Resonance*) e mecânicas, como a variação de frequência de oscilação do cristal de quartzo numa QCM (Microbalança a Cristal de Quartzo – QCM, do inglês *Quartz Crystal Microbalance*).⁴ Biossensores de detecção direta são, em alguns casos, menos sensíveis do que os de detecção indireta, especialmente para pequenas moléculas como toxinas.⁹

Um exemplo de biossensor de detecção direta utilizando QCM se encontra no trabalho de Yakovleva et al.¹⁰ Neste trabalho, os pesquisadores montaram um biossensor utilizando, como material biológico (ligante), lectinas como a *Triticum vulgaris* e *Lens cullinaris*, dentre outras, para verificar suas afinidades por determinadas glicoproteínas (analito) como, por exemplo, a fetuína. Na montagem deste biossensor, as lectinas foram imobilizadas sobre a superfície do cristal de quartzo (transdutor). Quando é injetada uma solução de

glicoproteína, ocorre forte interação entre ela e a lectina imobilizada. Esse sinal de biorreconhecimento é transformado em elétrico devido ao transdutor piezelétrico, que gera um sinal proporcional à quantidade de glicoproteína ligada à lectina (para maiores detalhes da técnica de QCM, consulte a seção 2.3).

Biossensores de detecção indireta necessitam de uma espécie secundária para detecção. Neste tipo de dispositivo, ocorre uma reação bioquímica entre o analito e a espécie secundária, detectável por determinada técnica. Um exemplo desse tipo de biossensor envolve o uso de marcadores fluorescentes que podem ser detectados por medidas ópticas.^{4,9}

Outra forma de classificar os biossensores é por meio do transdutor utilizado.¹¹ Desta forma, quando um biossensor é dito piezelétrico, significa que esse dispositivo sensor utiliza um transdutor piezelétrico para detecção e transdução do sinal de biorreconhecimento. Outros tipos de biossensores são os eletroquímicos (potenciométrico, condutimétrico e amperométrico) e óptico (medida de luminescência, fluorescência, elipsometria, etc.). Com relação ao material biológico utilizado, ele pode ser classificado como catalítico (quando utiliza enzimas) ou de afinidade (quando utiliza lectinas e anticorpos, por exemplo).

Não menos importante comentar que, atualmente, os biossensores vêm recebendo atenção não apenas para fins analíticos (detecção e quantificação de analito), mas também para estudos de interações biomoleculares. O trabalho de Pesquero et al.,¹² por exemplo, aborda uma forma de extrair dados cinéticos de interação entre lectina nativa e recombinante por meio da técnica de QCM. Neste trabalho, foi possível demonstrar que a lectina nativa jArtinM extraída de sementes de jaca e rArtinM (forma recombinante) possuem o mesmo grau de afinidade por determinada glicoproteína. Outros exemplos de trabalhos que trazem o estudo de montagem de biossensores para esta finalidade se encontram no de Pedroso,⁶ Yakovleva¹⁰ e Lebed.¹³

Neste aspecto, embora a literatura não relate esse tipo de definição, é correto afirmar que é possível categorizar os biossensores em dois grupos, dependendo de seu uso: biossensores analíticos, referenciando aqueles destinados na detecção e quantificação de alguma espécie química; e biossensores de afinidade, classificando determinados dispositivos voltados exclusivamente para estudos de interação entre a molécula biológica (ligante) e o analito. Importante notar aqui a diferença entre essa classificação daquela comentada anteriormente: biossensor de afinidade, neste caso, se refere a todo dispositivo

que possui um material biológico (enzimas ou não) cuja finalidade é o estudo de afinidade, diferente do caso supracitado, no qual um biossensor contendo como ligante uma enzima, seria classificado como um biossensor catalítico.

2.1.2 Aplicações dos Biossensores

As aplicações de biossensores envolvem diversas áreas, tais como médica, ambiental, segurança pública e alimentar.⁴ Aplicações na área médica incluem a clínica, farmacêutica e também em pesquisa. Biossensores para diagnóstico clínico podem agilizar a detecção de alguma doença em fase precoce, permitindo ao médico adotar medidas de tratamento rápido e mais eficazes. Aplicações na área ambiental incluem dispositivos destinados ao monitoramento de derramamentos, emissão de gases tóxicos e controle de efluente industrial. Um exemplo de biossensor na área de segurança pública é aquele destinado a detectar *Bacillus anthracis*,¹⁴ responsável pelo bioterrorismo em 2001. Em segurança alimentar, esses dispositivos podem ser aplicados no monitoramento de produção industrial e no diagnóstico de intoxicação alimentar.⁴

Os pontos fortes dos biossensores podem ser enumerados a seguir:⁴

- **Análise rápida ou em tempo real:** Análise rápida ou em tempo real permite obter informações imediatas da amostra testada. Essas habilidades dos biossensores os tornam atraentes na área médica, especialmente em casos em que há a necessidade de diagnóstico rápido, como no de intoxicação por remédios.

- **Análise em fluxo contínuo:** Muitos biossensores podem ser projetados para sistemas em fluxo, que permite suas aplicações no monitoramento de suplemento de água, produção de alimentos e qualidade do ar.⁹

- **Miniaturização:** Biossensores podem ser miniaturizados, tornando-os portáteis e de baixo custo.

- **Controle e automação:** Biossensores podem ser integrados nas linhas de produção em diversos estágios de processos industriais e permitir que determinadas informações a respeito de concentração de substâncias podem ser obtidas em tempo real. Essas informações podem ser críticas no controle da qualidade do processo.

2.2 Métodos de Imobilização do Material Biológico

A imobilização do material biológico não deve comprometer sua atividade, tanto catalítica (quando o ligante for uma enzima) ou de afinidade (quando o ligante for um antígeno, anticorpo, lectina, etc.). Imobilização de enzimas por ligação covalente entre um suporte e certos grupos amino de aminoácidos, grupos fenólicos da tirosina, hidroxila da serina, hidrogenossulfato da cisteína e imidazol da histidina não diminuem sua atividade e podem ser utilizados.³ Os métodos de imobilização de material biológico podem ser divididos em algumas categorias, tais como: (a) oclusão em matrizes poliméricas, (b) microencapsulação, (c) adsorção física e (d) ligação covalente em suporte. Esses métodos são discutidos a seguir com base no trabalho de Fatibello Filho.³

2.2.1 Método da Oclusão em Matriz

Neste método, ocorre o aprisionamento da enzima dentro dos espaços intersticiais das ligações covalentes cruzadas de um polímero insolúvel (poliacrilamida, ágar-ágar, amido, dentre outros). No procedimento de imobilização, o monômero, o catalisador de polimerização e a enzima a ser ocluída são misturados em uma solução tampão. A estrutura do polímero formada, por possuir pequenos espaços intersticiais, não permite a difusão de moléculas grandes da enzima, mas as moléculas menores do substrato conseguem difundir-se livremente, possibilitando que o substrato alcance a enzima.

A vantagem desse método é que ele não altera a estrutura do material biológico. Por outro lado, o tempo de vida útil do sensor é menor porque as enzimas podem sair dos interstícios, visto que eles podem aumentar de tamanho.

2.2.2 Microencapsulação

Neste método, ocorre o encapsulamento da enzima em pequenas esferas (microcápsulas) de membranas semipermeáveis com poros variando de 5-300 μm , que permite apenas a movimentação do substrato e produtos da reação enzimática. Essa metodologia é análoga à anteriormente discutida, mas difere no aspecto do número de

moléculas de enzimas aprisionadas: no processo de microencapsulação, há mais moléculas de enzimas do que no método de oclusão em matriz polimérica.

Uma vantagem desse método reside no fato de poder aprisionar grande quantidade de enzima em apenas uma etapa. No entanto, a necessidade de alta concentração de proteína para a microencapsulação, a restrição de passagem de substratos de baixo peso molecular através das membranas e dificuldades em se fixar essas microcápsulas na base dos sensores, tem dificultado o uso dessa técnica.

2.2.3 Adsorção Física

O processo de imobilização, neste caso, ocorre por interações do tipo iônicas, polar, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Os suportes destinados a essa metodologia geralmente possuem superfície ativa e funcionam como bons adsorventes e incluem a alumina, resinas de troca iônica, bentonita, grafite, dentre outras. Sua vantagem reside na simplicidade do método, mas possui a desvantagem de o processo de imobilização depender do pH, solvente, substrato e temperatura. Outra desvantagem desse método reside no fato da possibilidade das moléculas adsorventes se aderirem randomicamente sobre o substrato, prejudicando a sensibilidade do biossensor.¹⁵

2.2.4 Ligação Covalente em Suporte

Esse tipo de imobilização envolve a formação prévia de uma camada molecular aderida a um substrato (sintético, como a celulose, ou metálico, como o ouro). O material biológico é imobilizado por meio da formação de ligações covalentes entre um grupo não ativo do material biológico e a camada previamente preparada. Um exemplo desse método e amplamente utilizado é a formação de monocamadas automontadas de determinados tióis sobre superfície de ouro, visto que moléculas de tiol se ligam fortemente a este substrato metálico. Sobre essa monocamada formada é aderido o material biológico.

Como esse procedimento de imobilização foi utilizado neste trabalho, convém aqui discuti-lo em detalhes, sendo apresentado a seguir.

2.2.5 Monocamadas Automontadas (SAMs, do inglês *Self-assembled monolayers*)

Uma forma eficiente de construir sensores seletivos sobre superfície de ouro é por meio da técnica de monocamadas automontadas. Por meio dessa abordagem, é possível construir estruturas moleculares altamente organizadas e de forma reprodutível, capazes de aderir o material biológico de interesse (enzima, lectina, DNA, anticorpo, etc.). De forma geral, a formação de uma monocamada molecular sobre uma superfície significa alterar quimicamente a superfície do filme de ouro, ou seja, *funcionalizá-la*.

O primeiro artigo a relatar a formação de monocamadas automontadas utilizando moléculas contendo átomo de enxofre disponível para se adsorver na superfície de ouro (como tióis e dissulfetos) foi o de Nuzzo e Allara em 1983.¹⁶ Neste trabalho, os autores relataram a formação de monocamadas de diferentes dissulfetos (R-S-S-R', sendo R e R' agrupamentos químicos) em superfície de ouro a partir de soluções diluídas. Essas camadas foram caracterizadas pelas técnicas de espectroscopia de reflectância na região do infravermelho, elipsometria e ângulo de contato, que evidenciaram que as monocamadas formadas se apresentam organizadas e densamente agrupadas.

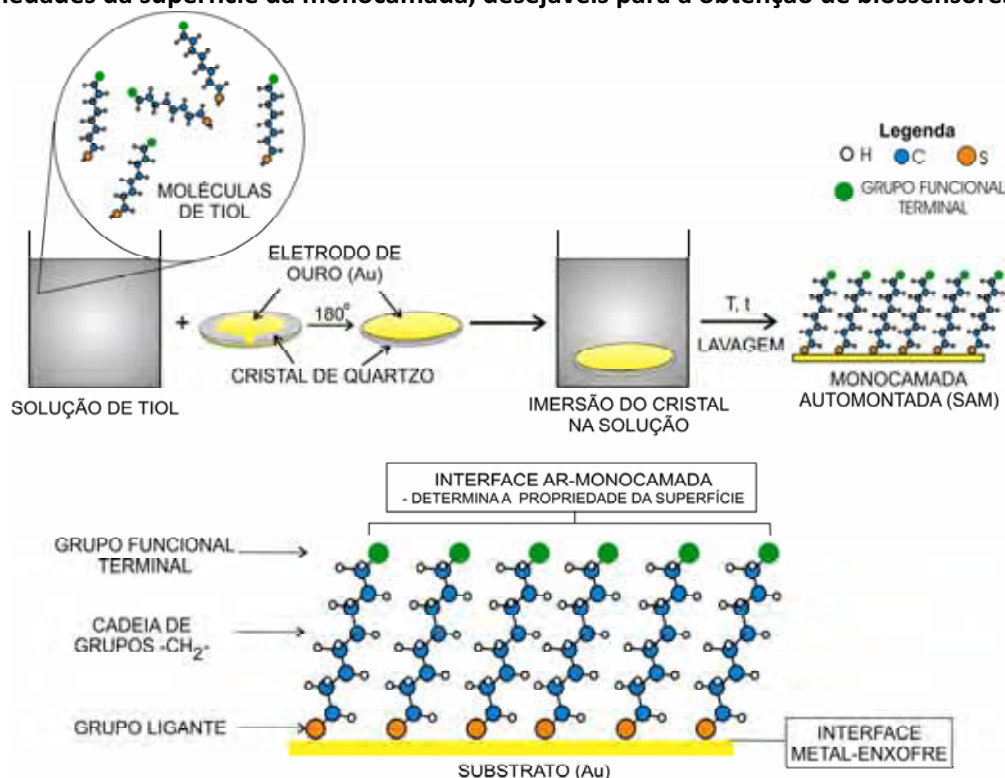
A partir desse ponto, diversos pesquisadores se esforçaram e ainda se empenham em construir e estudar essas monocamadas, sobretudo devido às suas aplicações em sensores químicos.¹⁷ Neste contexto, uma aplicação dessa técnica que vem sendo extensivamente utilizada é na obtenção de biossensores para estudo de afinidade química entre lectinas e carboidratos,^{6,10} assim como na obtenção de dispositivos para diagnóstico clínico.^{11,14,18}

Desta forma, devido a importância dessa técnica e seu emprego nesta pesquisa, é importante realizar um levantamento bibliográfico sobre ela e detalhar algumas de suas aplicações no contexto deste trabalho.

2.2.5.1 O que é SAM?

SAMs são estruturas moleculares bidimensionais de escala nanométrica formadas pela adsorção de um surfactante em uma superfície sólida (substrato),^{17,19} tanto por meio de solução como por fase gasosa. Quando o substrato é mergulhado na solução de tiol, por exemplo, inicia-se a adsorção das moléculas no substrato e a estrutura se forma sem a intervenção de forças externas, ou seja, a estrutura se organiza sozinha (Figura 3).

Figura 3 - SAMs (de tiol) são formadas através da imersão do substrato (filme fino de ouro depositado sobre cristal de quartzo) na solução de tiol, por um tempo t a uma temperatura T . A auto-organização da monocamada ocorre graças a forças intermoleculares. A utilização de moléculas que possuem determinados grupos funcionais terminais em sua estrutura caracterizam as propriedades da superfície da monocamada, desejáveis para a obtenção de biossensores

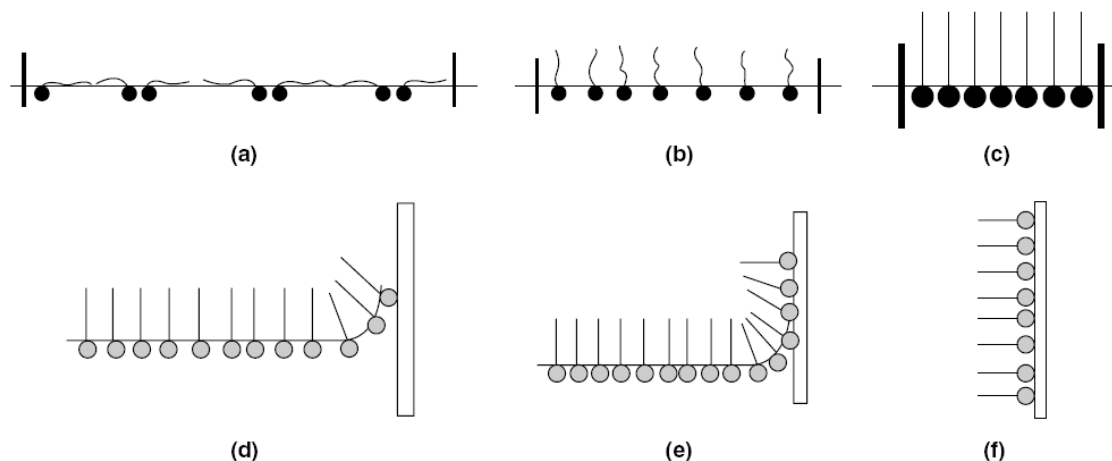


Fonte: Autor.

A informação para a estruturação das monocamadas está contida dentro das próprias moléculas. É por meio de suas estruturas tridimensionais, que contêm grupos químicos específicos, que elas, mesmo quando adsorvidas, interagem entre si. São as ligações de hidrogênio, quando grupos químicos específicos estão presentes (como por exemplo -OH, -NH₂, -COOH) e interações de Van der Waals^{17,19,20} que organizam as moléculas espontaneamente, tornando estas estruturas estáveis.

O conceito de monocamada foi primeiramente introduzido por Langmuir em 1917 durante seu estudo sobre espécies anfifílicas.¹⁷ Ele percebeu que, ao espalhar essas moléculas em água, ele obtinha um filme de espessura molecular. Entretanto, apenas em 1936 Katherine Blodgett foi capaz de transferir a monocamada para um suporte sólido, técnica que ficou conhecida como de Langmuir-Blodgett.^{17,21} Por meio desta técnica, é possível obter monocamadas com alto grau de ordenação por meio de aplicação de uma força externa. O filme é transferido para o substrato por meio de sua imersão e retirada, verticalmente, da subfase (Figura 4).

Figura 4 - Metodologia de Langmuir-Blodgett. (a) Surfactante disperso em água. Os círculos escuros representam a parte hidrofílica enquanto as linhas a parte hidrofóbica da molécula. (b) Filme parcialmente comprimido por meio de aplicação de forças em suas laterais. (c) Monocamada organizada por meio de aplicação de pressão. (d) Imersão do substrato no filme organizado. (e) Transferência da monocamada para o substrato. (f) Monocamada densamente agrupada sobre o substrato



Fonte: Pradeep (2007, p. 130).¹⁷

Importante notar a diferença nestas duas técnicas. Enquanto na técnica de SAM as monocamadas se formam espontaneamente, sem a intervenção de forças externas, na técnica de Langmuir-Blodgett é necessário a aplicação de uma pressão para a organização da camada e de um processo mecânico para a transferência do filme para o substrato. Além do mais, embora ambas as estruturas formadas por essas monocamadas são estabilizadas por ligações intermoleculares, geralmente a adsorção das moléculas pela técnica de Langmuir-Blodgett são realizadas por fracas interações entre a camada e o substrato,²² em contraste com as formadas pela técnica de SAM, das quais as moléculas adsorvidas estão covalentemente ligadas no substrato metálico.^{19,20}

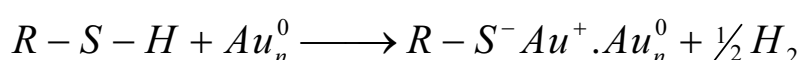
Desta forma, por meio da técnica de SAM, é possível obter filmes de espessura molecular com elevado grau de organização e de forma fácil e reprodutível, sendo que essa monocamada está fortemente ligada no substrato.

2.2.5.2 Preparação de SAM de tióis

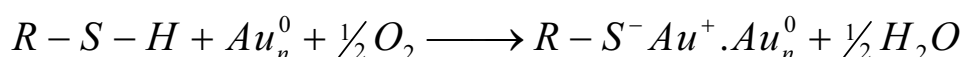
Monocamadas automontadas de tióis podem ser obtidas por meio da imersão do substrato metálico em solução diluída do tiol adequado.^{15,19,23,32} O substrato metálico amplamente utilizado é o ouro, pois ele apresenta propriedades desejáveis quanto à estabilidade (não há formação de óxido em temperatura ambiente, embora Au_2O_3 pode ser

obtido quando o ouro é exposto ao ozônio), a não adsorção de gases comumente encontrados na atmosfera, na facilidade do processo de limpeza (para a remoção de material orgânico, geralmente se emprega solução piranha, que é uma mistura de peróxido de hidrogênio e ácido sulfúrico concentrado, na proporção de 1:3, respectivamente, a 100 °C), no fácil procedimento para preparação de filmes finos (por meio da evaporação térmica do ouro sobre suporte desejado) e, sobretudo, na forte afinidade que o grupo tiol tem por esse elemento. Embora o ouro seja amplamente utilizado, as moléculas de tiol também podem se adsorver sobre outras superfícies, especialmente aquelas formadas por prata, platina¹⁷ e paládio.²⁹

A reação que explica a formação da ligação RS-Au ocorre por meio da oxidação da ligação S-H do tiol na superfície do eletrodo de ouro, acompanhada pela eliminação redutiva do gás hidrogênio:¹⁹



Entretanto, quando a reação se processa em meio onde oxigênio está presente, ela ocorre de forma diferente:²³



Ambas as reações mostram que a espécie adsorvida no ouro é um tiolato (RS⁻), evidenciado por estudos utilizando as técnicas de XPS, espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FT-IR) e Raman, dentre outros.¹⁹ A ligação do grupo tiolato à superfície do ouro é forte (quebra de ligação homolítica é de aproximadamente 40 Kcal/mol).

Tióis e dissulfetos podem ser diretamente adsorvidos de sua solução utilizando solventes de alta pureza. Comumente se utiliza etanol para espécies apolares e água para espécies polares.¹⁵ Hexano também pode ser empregado para tióis de cadeia longa.¹⁷

O protocolo mais comumente utilizado para preparação SAM de tiol sobre superfície metálica é por meio da imersão do substrato previamente limpo em solução etanólica diluída (1-10 mM) do tiol desejado, por tempo de 12-18 h de imersão em temperatura ambiente.^{10,17,20} Outros trabalhos trazem tempos menores (3 h), apresentando bons

resultados.^{12,33} O processo de formação de monocamada de tiol em superfície de ouro ocorre basicamente em duas etapas. A primeira etapa corresponde a formação da ligação do tiol em ouro originando tiolato (RS^-Au^+), que ocorre rapidamente (de milisegundos a minutos) e pode ser representada pela isoterma de adsorção de Langmuir.^{19,34} A segunda etapa corresponde ao processo de organização da monocamada e minimização de defeitos estruturais, podendo levar horas. Entretanto, há um número expressivo de fatores experimentais que podem afetar a estrutura da SAM formada bem como a sua taxa de formação, a saber: (a) solvente, (b) temperatura, (c) concentração do tiol, (d) tempo de imersão, (e) pureza do adsorbato, (f) concentração de oxigênio na solução, (g) grau de limpeza do substrato e (h) estrutura do tiol. A seguir, é apresentado a discussão de cada um desses fatores, baseado no trabalho de Love et al.²⁰

Solvente. O solvente mais empregado para a formação de monocamadas de tióis é o etanol. O grau de cobertura de SAMs formada por etanol não varia significativamente quando comparado a outros solventes (tetrahidrofurano, dimetilformamida, acetonitrila, tolueno). Além disso, o que favorece o uso deste solvente é que ele solvata uma variedade de alcanotióis de cadeias diferentes (em tamanho e polaridade), possui baixo custo de aquisição, é disponível em alta pureza e tem baixa toxicidade. Outro ponto não menos importante a se comentar sobre o uso de etanol está em sua capacidade de estabilizar o estado excitado do tiolato, quando ele migra, sobre a superfície do ouro Au(111), de regiões de menor para maior estabilidade (do ponto de vista energético).¹⁷

O efeito do solvente na cinética de formação de monocamada é complexo e pouco compreendido.²⁰ A presença do solvente fornece parâmetros adicionais no equilíbrio dinâmico no processo de adsorção do tiol: interações solvente-substrato e solvente-adsorbato. Interações entre o solvente e o substrato podem diminuir a taxa de adsorção do tiol, pois ele deve ser removido da superfície para que a molécula de adsorbato pode ser ligada. Fortes interações entre o solvente e o adsorbato também podem impedir que a molécula de tiol se aproxime da superfície metálica, prejudicando a cinética de adsorção.

Com relação aos alcanotióis, sabe-se que a taxa de formação da SAM é maior em certos solventes apolares de cadeia curta (heptano, hexano) do que em etanol. Embora a taxa de adsorção de tióis seja mais rápida utilizando hidrocarbonetos de cadeia curta como solvente, estudos mostram que estas monocamadas são menos organizadas do que aquelas formadas em etanol, principalmente devido às fortes interações entre o solvente-adsorbato.

Temperatura. Geralmente, SAMs são preparadas em temperatura ambiente (20-25 °C). Entretanto, estudos evidenciam que em temperaturas maiores, as monocamadas automontadas formadas apresentam maior cinética de adsorção e número reduzido de defeitos.

A formação de monocamadas nestas temperaturas é favorecida devido ao fato de que a taxa de dessorção do solvente fisicamente adsorvido, bem como a de eventuais substâncias presas na superfície do ouro, são maiores quando comparados em condições de temperatura menor. Além desse fato, permite que o sistema consiga ultrapassar barreiras energéticas de processos de reorganização da cadeia e rearranjo estrutural.

Concentração e tempo de imersão. Estes parâmetros são inversamente relacionados, ou seja, quanto maior a concentração da solução de tiol menor deve ser o tempo de imersão.

Muitos experimentos têm demonstrado que, em *média*, as propriedades das SAMs de alcanotióis formadas, como o grau de cobertura e estrutura, não se alteram significativamente quando o substrato é imerso em solução 1 mM por mais do que 12-18 h, embora a estrutura da SAM continue a evoluir em tempos de imersão de 7-10 dias. Esses resultados implicam que a cobertura da superfície aumenta e que os defeitos diminuem quando se utiliza maiores tempos de imobilização.

Convém relatar que a maioria dos trabalhos encontrados na literatura para a formação de monocamadas utilizadas no desenvolvimento de biossensores não utiliza tempos superiores à 12 horas,^{6,10} pois esse período fornece SAM de forma reprodutível e com grau de organização apropriado.

Pureza dos tióis. Impurezas comuns derivadas de tióis são os dissulfetos, um produto de processo oxidativo do tiol. Experimentos sugerem que pequena quantidade dessas substâncias na amostra (<5%) não impede a formação e não prejudica a estrutura das monocamadas. Já em maiores concentrações, como os dissulfetos são menos solúveis que os tióis, essas moléculas podem se adsorver fisicamente na superfície, comprometendo tanto a cinética como a estrutura durante a formação da monocamada.

Concentração de Oxigênio na solução. Há poucos trabalhos na literatura que abrangem os efeitos, de forma quantitativa, da presença de oxigênio na solução de tiol quanto ao processo de formação da monocamada. Há evidências qualitativas de que, ao degaseificar o solvente com um gás inerte (como argônio) antes de preparar a solução,

assim como manter a solução em contato com o substrato em ambiente inerte, consegue-se obter monocamadas mais reprodutíveis quanto a determinadas propriedades.²⁰ Reduzir o conteúdo de oxigênio na solução possibilita diminuir a oxidação dos tióis em solução a sulfonatos e outras espécies oxidadas.

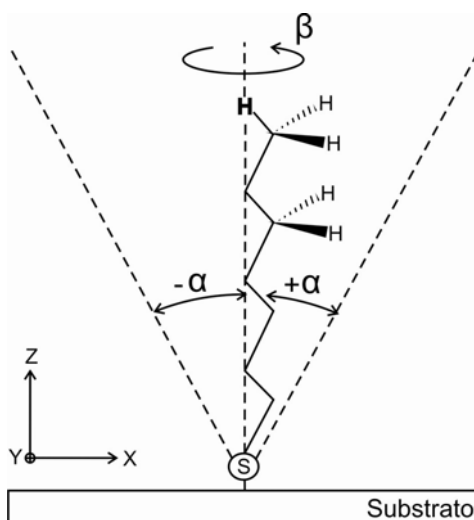
Limpeza do substrato. A presença de qualquer substância aderida na superfície do substrato prejudica a formação da SAM, pois esta espécie precisará, primeiramente, ser removida da superfície para que a molécula de tiol seja adsorvida. Para evitar qualquer tipo de contaminação devido à manipulação do substrato, especialmente devido à atmosfera do laboratório, é recomendável que a formação da SAM seja imediatamente procedida do processo de limpeza, esta geralmente realizada por meio da imersão do substrato em solução piranha.

2.2.5.3 Organização das SAMs de tióis

Após a molécula de tiol se adsorver na superfície do ouro, uma nova etapa se desenvolve na formação da monocamada: a organização das moléculas por meio de interações intermoleculares que estabilizam a estrutura e caracterizam determinadas propriedades da camada.²⁰

O modelo mais simples para a descrição da organização da monocamada é considerar uma cadeia única da molécula de tiol (*Single chain mode*).²⁰ Neste modelo, dois parâmetros descrevem as variações nas orientações destas moléculas: o ângulo de inclinação da cadeia principal em relação à normal à superfície (α) e o ângulo de rotação da molécula em relação ao seu próprio eixo (β). Como mostrado na Figura 5, α pode assumir tanto valores positivos como negativos; já os valores de β são encontrados entre 0° a 90°.

Figura 5 - Parâmetros α e β que descrevem a orientação da molécula de tiol no substrato (neste caso, um alcanotiol). O parâmetro α é o ângulo de inclinação de uma reta imaginária que passa pelas extremidades da molécula em relação à reta normal à superfície do substrato; os valores de α podem ser positivos ou negativos. O parâmetro β está relacionado ao ângulo de rotação que a molécula pode realizar em seu próprio eixo; estes valores podem assumir um valor na faixa de 0° - 90°

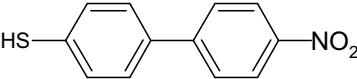
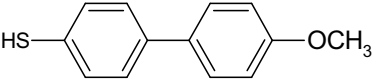
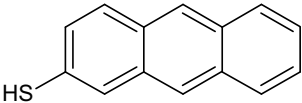
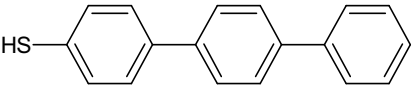
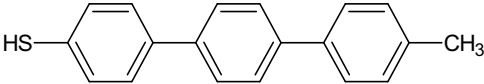


Fonte: Love et al. (2005, p. 1117).²⁰

Para as SAMs de alcanotióis em Au(111), as cadeias destas moléculas se arranjam de forma quase cristalina. O ângulo de inclinação (α) destas moléculas pode variar de metal para metal. Em ouro, por exemplo, este ângulo pode alcançar valores próximos a 30° , enquanto em prata e mercúrio os valores encontrados são de aproximadamente 10° e 0° , respectivamente. Para o parâmetro β , em ouro os alcanotióis possuem um valor próximo a 50° , enquanto para outros metais este valor se encontra em torno de 45° .²⁰

Tióis contendo em sua cadeia grupos volumosos, a estrutura das SAMs assumem valores de α menores daqueles encontrados para os alcanotióis em Au(111) (Tabela 1). Para o 4'-nitrobifenil-4-tiol, por exemplo, α é aproximadamente 14° , enquanto β é em torno de 30° . Esta variação organizacional pode ser explicado pelas interações intermoleculares diferenciadas que esta molécula possui quando comparado à estrutura geral de um *n*-alcanotiol.²⁰

Tabela 1 - Diferentes valores de $|\alpha|$ e β encontrados para diferentes tipos de tióis quando constituintes de SAMs sobre Au(111)

Tiol	$ \alpha $	β
<i>n</i> -alcanotióis	28°	53°
	14±2°	30°
	20±2°	15°
	23±5°	26°
	20±5°	32°
	17±8°	Não disponível

Fonte: Adaptada de Love et al. (2005, p. 1118).²⁰

2.2.5.4 Defeitos das SAMs de tióis

As causas dos defeitos das SAMs podem ser classificadas como intrínsecas e extrínsecas.²⁰ Fatores externos, como a limpeza do substrato, métodos de preparação do substrato e a pureza das soluções do adsorbato são classificados como defeitos extrínsecos. Entretanto, outros defeitos resultam pelo simples motivo de que a SAM é um sistema dinâmico muito complexo, levando a defeitos intrínsecos.²⁰

As superfícies dos substratos onde são formadas as SAMs apresentam defeitos físicos. Substrato de ouro policristalino, muito utilizado atualmente, possui defeitos como desníveis, falhas na lapidação, existência de “vales” ou “buracos” na superfície (rugosidade) e impurezas no filme metálico (Figura 6).²⁰

Figura 6 - Ilustração esquemática de alguns dos defeitos intrínsecos e extrínsecos encontrados em SAMs formadas sobre substrato de ouro policristalino. A linha preta contínua na interface metal-enxofre indica as variações topográficas do substrato



Fonte: Adaptada de Love et al. (2005, p. 1121).²⁰

Um dos tipos de defeitos inerentes à construção da SAM em superfície de ouro é a vacância monoatômica, ou seja, algumas regiões da SAM que possuem um desnível em relação a regiões vizinhas, ocasionado pela falta, em determinados locais, de uma camada de átomos de ouro.²⁰

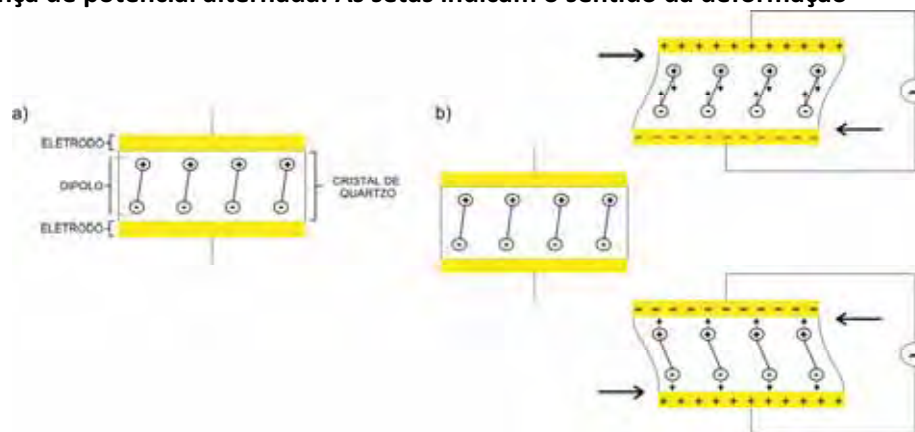
2.3 Princípios da Técnica de QCM-D e Biossensores Piezelétricos

O fenômeno da piezeletricidade foi primeiramente investigado por vários pesquisadores no início do século XIX.³⁵ Entretanto, o mérito de serem os primeiros a observarem e a estudarem esta propriedade ficou para os irmãos Pierre e Jacques Curie, em 1880. Estes pesquisadores observaram que certos materiais, como o quartzo (mineral constituído basicamente de dióxido de silício, SiO_2), quando comprimidos em determinadas direções, observava-se um potencial elétrico entre as superfícies deformadas do material.³⁶ Mais tarde verificaram o efeito oposto, ou seja, que o material sofria deformação mecânica quando ele era submetido a uma diferença de potencial. O termo piezeletricidade originou dessas observações, que significa eletricidade por pressão.

A principal característica de um material que possui propriedade piezelétrica é a ausência de um centro de simetria em sua estrutura cristalina,³⁵ levando o aparecimento de dipolos elétricos (Figura 7a). Quando estes materiais sofrem compressão ocorre uma separação das espécies opostamente carregadas presentes na estrutura cristalina, provocando uma mudança no momento de dipolo líquido em cada molécula. Esta alteração, por sua vez, provoca o aparecimento de cargas elétricas nas faces do cristal, sendo que a intensidade da carga elétrica gerada depende da intensidade da força aplicada no material e

da orientação de seus dipolos em relação às suas faces. Da mesma forma, os dipolos presentes na estrutura cristalina desses materiais são atraídos ou repelidos quando expostos a uma diferença de potencial aplicada, provocando uma reorientação da rede cristalina, isto é, deformando o material. Quando se aplica uma diferença de potencial alternada, o cristal oscila continuamente (Figura 7b).

Figura 7 - Cristal de quartzo recoberto por eletrodos de ouro. (a) Devido à assimetria do material, ocorre o aparecimento de dipolos elétricos. (b) Esses dipolos podem ser reorientados ao aplicar uma diferença de potencial alternada. As setas indicam o sentido da deformação



Fonte: Autor.

As propriedades piezelétricas desses materiais, tais como o modo de vibração preferencial e o coeficiente de temperatura, dependem do tipo de corte utilizado para se obter as lâminas empregadas na construção dos sensores, uma vez que apresentam propriedades físicas anisotrópicas. Cada tipo se refere aos diferentes ângulos de corte com relação aos eixos cristalográficos do material. Para o quartzo existem variados tipos de cortes, como o AB, AT, BT, CT, DT, SC, dentre outros.^{7,37} O tipo de corte mais utilizado no desenvolvimento de biossensores é o AT, que possui como modo de vibração o cisalhamento fundamental, porque apresenta pequeno coeficiente de temperatura em temperatura ambiente, bem como grande sensibilidade de massa.³⁵

A QCM é uma técnica fundamentada na propriedade piezelétrica do cristal de quartzo. Esse material pode ser posto a oscilar aplicando-se uma diferença de potencial alternada, sendo que sua frequência de oscilação é monitorada em função do tempo. Por meio da relação de Sauerbrey (Equação 1) é possível relacionar a variação de frequência de oscilação do cristal com a massa aderida em sua superfície.³⁸

$$\Delta f' = -\frac{f_0^2}{F_q \rho_q A_{el}} \Delta m \quad (1)$$

sendo $\Delta f'$ a variação da frequência devido ao recobrimento do eletrodo, f_0 a frequência fundamental do cristal, Δm a massa do material depositado, ρ_q a densidade do cristal, F_q a constante de frequência ($F_q = f_0 d_q$, sendo d_q a espessura do cristal) e A_{el} a área do eletrodo depositado sobre o cristal. Essa equação pode ser representada de forma simplificada como (Equação 2):

$$\Delta f' = -n \frac{1}{C} \Delta m \quad (2)$$

em que n é o número do harmônico ($n = 1, 3, 5, 7, \dots$) e C o coeficiente de sensibilidade teórica da QCM ($17,7 \text{ ng Hz}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ para cristal de 5 MHz). O sinal negativo da equação evidencia que um aumento de massa sobre o cristal acarreta um decréscimo de sua frequência de oscilação.

Embora essa equação relacione a variação de frequência de oscilação com a variação de massa sobre o eletrodo, ela é válida se a massa adsorvida for pequena quando comparada com a massa do cristal, rigidamente adsorvida, isto é, sem escorregar ou se deformar durante uma oscilação, uniformemente distribuída sobre a área do eletrodo e no vácuo. Quando a substância adsorvida no eletrodo não é rígida e o meio reacional é viscoso a equação de Sauerbrey pode não ser aplicável.^{7,39}

Devido à limitação desse modelo, diversos estudos, publicados na década de 80 e 90,^{39,41} se preocuparam em encontrar uma relação que pudesse expandir a equação de Sauerbrey para meios líquidos, condição na qual é possível estudar processos biológicos. Estes estudos, dentre os quais se pode citar o de Nakasawa,⁴⁰ mostraram que a variação de Δf nestas condições não depende apenas da massa sobre o eletrodo (ocasionadas por adsorção e/ou desorção), mas também das propriedades do líquido que está em contato com o cristal, como a densidade e a viscosidade. Uma relação mais completa e válida para meios líquidos é mostrada abaixo (Equação 3):³⁸

$$\Delta f = \Delta f_m + \Delta f_l = -f_0^2 \left(\frac{\Delta m}{F_q \rho_q A_{el}} + \sqrt{\frac{\eta_l \rho_l}{\pi f_0 \mu_q \rho_q}} \right) \quad (3)$$

Nesta equação, Δf_m corresponde à variação de frequência devido a massa adsorvida (rígida) na superfície do cristal (equação de Sauerbrey) e Δf_l à contribuição do meio líquido para variação da frequência. Os parâmetros η_l , ρ_l , μ_q e ρ_q são, respectivamente, a viscosidade e a densidade do líquido, o módulo de cisalhamento e a densidade do cristal de quartzo.

No caso em que a massa aderida não for rígida, significa que seu movimento não está acoplado totalmente ao movimento oscilatório do cristal, causando perdas energéticas no sistema. Nesses casos, apenas os valores de frequência não são adequados para estimar a massa aderida sobre o substrato e se faz necessário conhecer os valores de dissipação de energia do sistema (*fator D*), fornecendo informações a respeito da viscoelasticidade da camada formada. A dissipação ocorre quando a diferença de potencial aplicada no cristal é desligada e a energia armazenada no sistema oscilatório é dissipada para o ambiente. *D* está relacionado com o amortecimento do potencial aplicado no eletrodo (Equação 4):³⁹

$$U(t) = U_0 e^{(-t/\tau)} \sin(2\pi f t + \phi), t \geq 0 \quad (4)$$

sendo que τ é a constante de decaimento e ϕ a fase. O fator de dissipação é inversamente proporcional ao τ (Equação 5):³⁹

$$D = \frac{1}{\pi f \tau} \quad (5)$$

De forma geral, quanto maior for a viscoelasticidade da camada formada, maior será o amortecimento e, portanto, o valor de *D*. Esse parâmetro é definido como (Equação 6):³⁸

$$D = \frac{E_{dissipada}}{2\pi E_{armazenada}} \quad (6)$$

sendo $E_{dissipada}$ a energia dissipada por ciclo de oscilação do cristal e $E_{armazenada}$ a total armazenada no sistema oscilatório.

Assim como Δf , o parâmetro de dissipação também é afetado pelo meio reacional. Em 1966, Stockbridge (apud RODAHL; KASEMO, 1996, p. 112)³⁹ demonstrou que, quando um

cristal de quartzo de corte AT é exposto a um meio líquido, a variação do parâmetro de dissipação se relaciona com determinadas propriedades do líquido, como viscosidade, η_l , e densidade, ρ_l (Equação 7):

$$\Delta D = \frac{1}{\sqrt{\pi f d_q \rho_q}} \sqrt{\eta_l \rho_l} \quad (7)$$

Importante notar que a interferência do líquido ou de qualquer outro meio viscoso no estudo da afinidade pode ser desprezada quando o sistema idealizado permite utilizar a injeção de amostra em fluxo. Quando se propõe avaliar a interação proteína-proteína, por exemplo, a proteína considerada analito é dissolvida em meio tampão específico, e será essa solução proteica aquela utilizada na investigação da afinidade com outra proteína imobilizada no transdutor piezelétrico. Neste caso, primeiramente são coletados os sinais de Δf e ΔD da solução tampão específica, sem o analito, objetivando analisar a contribuição desse meio na resposta do equipamento. Posteriormente, é injetada a solução contendo o analito na mesma solução tampão. Após o tempo necessário e definido para que ocorra a interação proteína-proteína, novamente é injetada solução tampão sem o analito. Como são conhecidas as respostas de Δf e ΔD do sistema antes de injetar o analito, por meio dos valores finais de frequência e de dissipação é possível estimar Δf e ΔD correspondentes apenas à interação proteína-proteína, sem a interferência do meio viscoso.

A seguir, são apresentados alguns exemplos de biossensores piezelétricos, em especial aqueles construídos utilizando a técnica de SAM para a imobilização do material biológico.

2.3.1 Exemplos de Biossensores Piezelétricos utilizando a técnica de SAM

Biossensores piezelétricos são dispositivos sensores que possuem o material biológico imobilizado na superfície de um transdutor piezelétrico, capaz de converter um sinal de reconhecimento biológico (aumento de massa sobre o transdutor) em um sinal elétrico.³ O material piezelétrico utilizado no desenvolvimento deste tipo de sensor é o cristal de quartzo, de corte AT, que possui em suas superfícies uma fina camada de ouro (eletrodos), sendo uma delas destinada à construção de um filme sensível ao analito (funcionalização) (Figura 8).

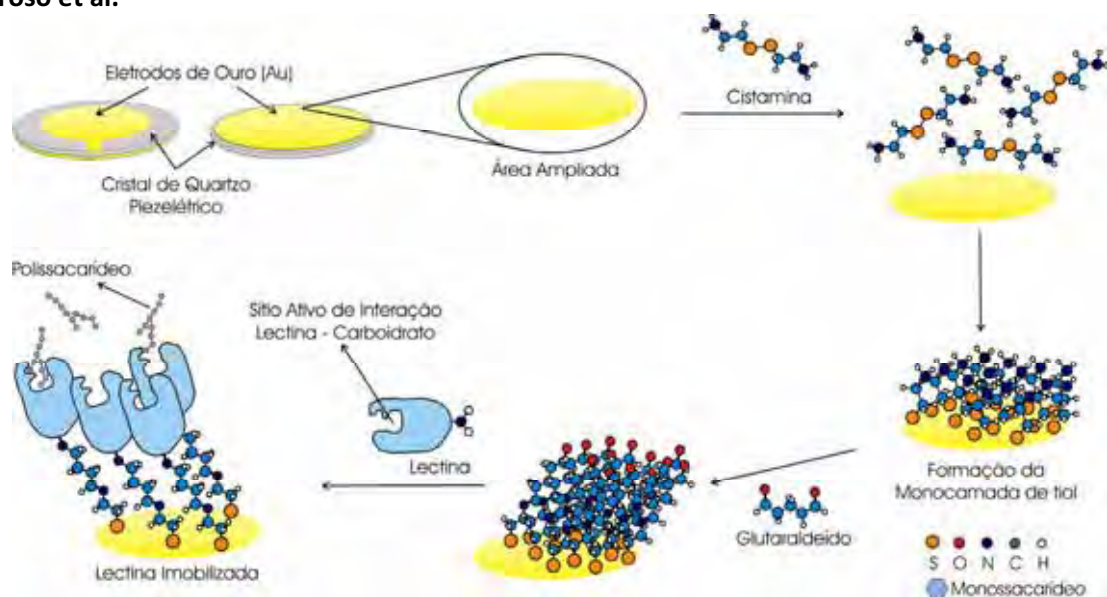
Figura 8 - Desenho ilustrativo de um cristal de quartzo revestido com camada de ouro em ambos os lados (a e b). A parte b do desenho representa o local da funcionalização



Fonte: Autor.

A funcionalizacao da superficie de ouro ocorre em varias etapas. A primeira se resume na construcao de um filme fino de tiol sobre sua superficie, utilizando a abordagem de formacao de SAM. Em outras palavras, e preparada uma solucao de tiol na qual o cristal de quartzo sera imerso por um tempo e temperatura determinados, objetivando a formacao de uma monocamada automontada. Embora em alguns estudos apenas a formacao desta camada seja suficiente, como aquele realizado por Fleming et al.⁴² (investigacao da adsorcao da proteina Azurin em SAM de octanotiol), outros necessitam de uma engenharia superficial mais sofisticada, por meio da construcao de nao apenas uma camada de moléculas, mas de duas a três. Como exemplo, Pedroso et al.⁶ desenvolveram um biossensor contendo Au-cistamina-glutaraldeído-lectina para o estudo da interacao lectina-carboidrato (Figura 9).

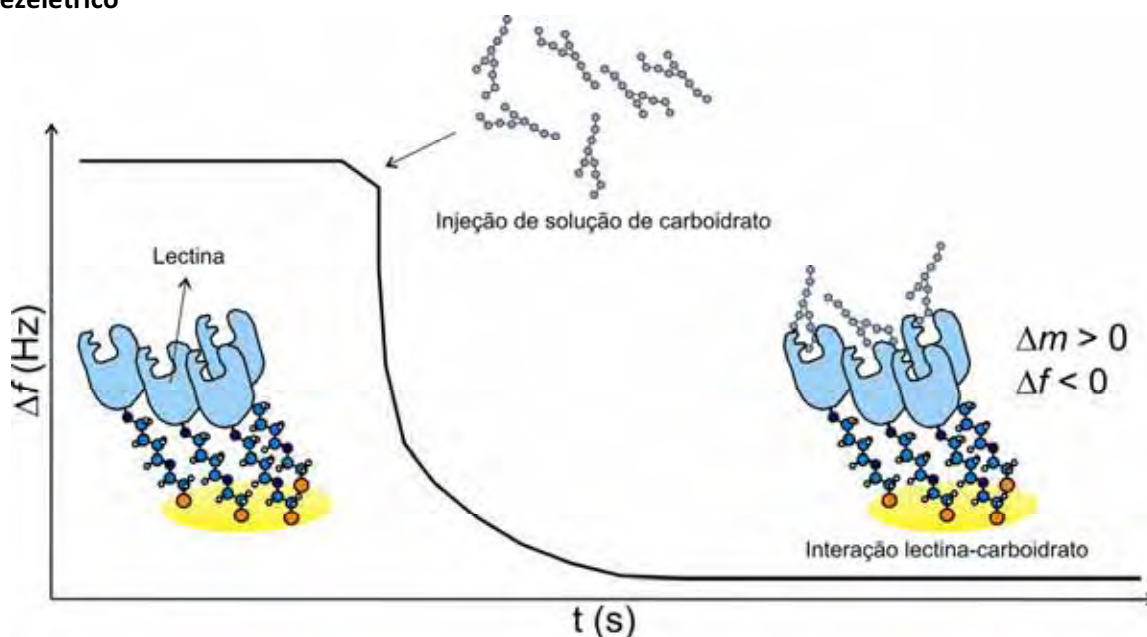
Figura 9 - Esquema de montagem do biossensor Au-cistamina-glutaraldeído-lectina utilizado por Pedroso et al.⁶



Fonte: Autor.

Utilizando como exemplo um biossensor piezelétrico baseado na interação lectina-carboidrato, o reconhecimento biológico é identificado quando ocorre um decréscimo do valor da frequência de oscilação do cristal de quartzo ao injetar, sobre o cristal funcionalizado com a lectina, solução de determinado carboidrato (Figura 10). A variação negativa da frequência de oscilação ocorre por causa do aumento de massa sobre o biossensor, conforme previsto pela Lei de Sauerbrey.³

Figura 10 – Variação negativa da frequência de oscilação do cristal de quartzo quando o eletrodo de ouro funcionalizado com a lectina entra em contato com solução de carboidrato (analito). A variação é negativa devido à interação lectina-carboidrato, que aumenta a massa sobre o material piezelétrico



Fonte: Autor.

A técnica de QCM utilizando SAMs de tióis também tem fornecido grande espaço aos pesquisadores para explorarem o desenvolvimento de biossensores para a identificação de micro-organismos, especialmente indicados ao diagnóstico clínico. Como exemplo, cite-se o trabalho de Hao et al.¹⁴ Neste estudo, os pesquisadores utilizaram uma monocamada automontada na construção de um dispositivo capaz de identificar, de forma rápida, esporos e células vegetativas do *Bacillus anthracis*, micro-organismo utilizado no bioterrorismo ocorrido na América do Norte em 2001. A monocamada automontada foi obtida a partir de uma solução etanólica contendo dois tióis, o ácido 11-mercaptoundecanóico (11-MUA) e o 6-mercapto-1-hexanol (6CHO), na proporção de 1:3, respectivamente. Após a formação da monocamada em temperatura ambiente por 24 h, esta foi ativada com uma solução aquosa contendo N-hidroxissuccinimida (NHS) e N-etil-N-(dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) na

proporção de 1:2, respectivamente, em temperatura ambiente por 2 horas. Após a lavagem do cristal contendo a SAM ativada, esta foi incubada, em temperatura ambiente por 5 horas, em solução contendo Proteína A. Após lavagem, o cristal foi incubado com anticorpo específico para a detecção do *B. anthracis*. Os sítios não específicos da ligação entre *B. anthracis* e o biossensor foram bloqueados com soroalbumina bovina (BSA).

Outro estudo que trata da construção de biossensores utilizando SAMs de tiol é o de Ayela et al.⁴³ Nesta pesquisa, voltada para o desenvolvimento de metodologia rápida para a detecção de diabetes tipo 1, os pesquisadores imobilizaram determinado peptídeo antígeno sintético IA-2 na camada automontada objetivando detectar autoanticorpos anti-IA-2 em soro humano, uma vez que presença desses autoanticorpos está associada ao diabetes tipo 1.

Um biossensor piezelétrico para a detecção do vírus causador da febre efêmera bovina em gado (BEF, do inglês *Bovine Ephemeral Fever*) foi desenvolvido por Lee e Chang.⁴⁴ Na construção deste dispositivo, os pesquisadores imobilizaram o anticorpo do vírus causador da BEF (BEFV) sobre a monocamada automontada constituída por cistamina-glutaraldeído. Neste caso, um cristal de quartzo contendo eletrodos de ouro foi imerso em solução de cistamina (25 mM) durante toda a noite. Após a lavagem do cristal, este foi imerso em solução de glutaraldeído (20 mM) com o intuito de reagir com o grupo amina da cistamina, formando uma dupla camada sobre o eletrodo de ouro. Finalizado este procedimento, o cristal foi incubado com o anticorpo anti-BEFV, responsável pela detecção do vírus. A grande vantagem da construção deste dispositivo se encontra no tempo de realização do ensaio para diagnóstico da doença. Enquanto pelo biossensor o tempo é de apenas alguns minutos, o teste ELISA pode durar até dois dias.

Um estudo interessante da construção de biossensor piezelétrico utilizando SAM de tióis se encontra na trabalho de Fung e Wong,¹⁸ que construíram um dispositivo sensor para detectar especificamente *Salmonella paratyphi* em meio aquoso. Neste trabalho, os pesquisadores utilizaram o ácido 3-mercaptopropanóico em solução etanólica, por tempo de imersão entre 15-24 h. Esta monocamada foi ativada com EDC e NHS, em procedimento semelhante ao já discutido anteriormente. Nesta camada ativada, foi imobilizado o anticorpo específico para a Salmonella.

2.4 Lectinas

Lectinas são proteínas de natureza não imune que se ligam especificamente e reversivelmente a carboidratos.^{6,45} São encontradas em sistemas biológicos de plantas, animais vertebrados, invertebrados e diversos micro-organismos, desempenhando importantes papéis biológicos, como processos intercelulares de reconhecimento, de adesão e sinalização, além de transporte intracelular de proteínas recém-sintetizadas.⁴⁵

Goldstein et al.⁴⁶ definem lectinas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica, que se ligam a carboidratos através de pelos menos dois sítios de ligação, aglutinam células vegetais e/ou animais e precipitam polissacarídeos, glicoproteínas ou glicolipídeos. Peumans e Van Damme⁴⁷ se baseiam na estrutura das proteínas para definir lectina: para esses pesquisadores, lectinas são proteínas ou glicoproteínas que possuem pelo menos um sítio de ligação capaz de interagir com um oligo ou monossacarídeo, sítio do qual não apresenta função catalítica ou característica imunológica. Nesta lógica, classificam as lectinas como merolectinas (lectinas que possuem um sítio de ligação com carboidrato), hololectinas (apresentam dois ou mais sítios de ligação homólogos com carboidrato) e quimerolectinas (lectinas que, além de um ou mais sítios de interação com carboidrato, possuem outro sítio com atividade biológica, como catalítica).

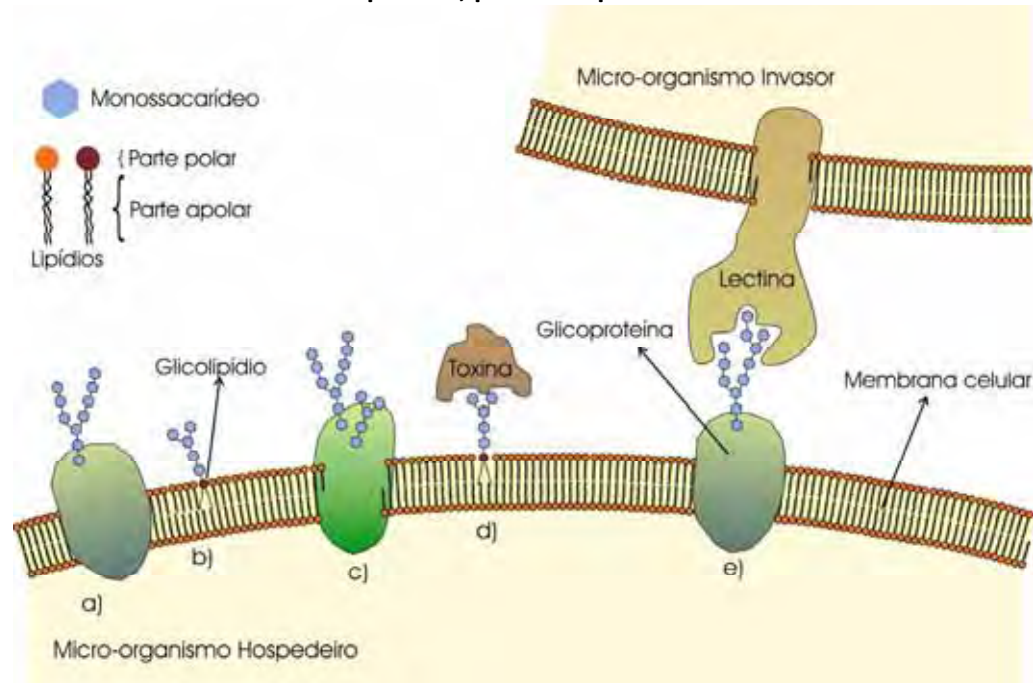
Estas moléculas foram primeiramente descritas no final do século XIX como substâncias capazes de aglutinar eritrócitos. Stilmark (1888 apud SELL; COSTA, 2000, p. 297)⁴⁸ em seu trabalho com extrato de *Ricinus communis*, observou que ele possuía a habilidade de aglutinar hemácias (eritrócitos) de animais de diferentes espécies. Posteriormente, diversas outras pesquisas mostraram que extratos de diferentes plantas possuem distintas habilidades hemaglutinantes, evidenciando a seletividade das aglutininas vegetais por hemácias de determinadas espécies ou de certos grupos sanguíneos. Estes estudos corroboraram para a caracterização dos grupos sanguíneos do sistema ABO. Devido a seletividade da hemaglutinação promovida por extratos de vegetais, Boyd e Shapleigh⁴⁹ sugeriram o termo “lectina” para designar as hemaglutininas, palavra originada do latim *lectus*, que significa “escolher”. Estudos mostram que a interação específica da lectina com um determinado carboidrato ocorre graças à presença de um sítio ou domínio presente na estrutura da proteína, conhecida como Domínio de Reconhecimento a Carboidrato (CRD, do inglês *Carbohydrate Recognition Domain*), que realiza interações intermoleculares

específicas com o oligossacarídeo, como ligação de hidrogênio e van der Waals, entre as hidroxilas dos carboidratos e os resíduos de aminoácidos do sítio ligante da lectina.^{45,50} Além destas interações muito específicas existem interações mais gerais que contribuem para a ligação carboidrato-lectina. Isto pode ocorrer porque diversos açúcares possuem em suas estruturas partes polares e apolares. As partes polares podem interagir com resíduos de aminoácidos polares da lectina, e as partes apolares podem interagir hidrofobicamente com as partes apolares da estrutura da lectina. A soma de todas estas interações produz a ligação específica entre a lectina e o oligossacarídeo.⁴⁵ A importância do estudo das lectinas se deve à habilidade dessas biomoléculas de interagirem seletivamente com determinados carboidratos. Além do mais, essas moléculas estão envolvidas nos processos de reconhecimento e das interações celulares, atividades essenciais na proliferação, diferenciação, inibição por contato e morte celular, assim como na formação de órgãos, migração celular, metástase, iniciação de infecções e simbiose.^{51,52}

Processos biológicos que implicam em contato célula-célula, como os de invasão celular, combate a infecções e inflamações, são intermediados pelas lectinas e pelas glicoproteínas da superfície celular. Por exemplo, os leucócitos, células brancas que participam da defesa do organismo, circulam pela corrente sanguínea antes de se direcionarem a tecidos infectados ou danificados. Para que estas células consigam chegar ao local específico, os leucócitos precisam se ligar às células endoteliais localizadas nas paredes dos vasos sanguíneos antes de migrarem ao local atingido. Para isto, os leucócitos expressam continuamente determinadas glicoproteínas em sua superfície, que interagirão com a selectina P, uma lectina do tipo C, expressa em células endoteliais de vasos próximos a locais de dano tecidual. Esta interação diminui a velocidade dos leucócitos na corrente sanguínea permitindo o seu direcionamento ao local lesionado ou infectado.^{45,53} Outros interessantes exemplos são o início de infecção bucal bacteriana de *E. coli*, das quais se aderem a resíduos de manose (carboidrato) presente na membrana plasmática das células da bochecha;⁵³ e a atividade da bactéria *H. pylori*, possível causadora da maioria das úlceras gástricas, que se liga nas paredes internas do estômago pela interação de sua lectina, presente em sua membrana bacteriana, e oligossacarídeos específicos das glicoproteínas da membrana das células epiteliais gástricas.⁴⁵

Na Figura 11 são mostrados, resumidamente, os processos de atividade celular que envolve as lectinas, glicoproteínas e glicolipídios localizados na membrana celular.

Figura 11 - Esquema resumido das atividades biológicas que ocorrem na membrana plasmática. (a) Glicoproteína, (b) Glicolípido, (c) Glicoproteína, (d) Toxinas bacterianas, como pertússis e colérica, ligam-se a glicolípídios de superfície antes de entrarem na célula,⁴⁵ (e) Lectina presente em um micro-organismo invasor interage com a cadeia de carboidratos presentes na glicoproteína presente na membrana da célula hospedeira, processo que antecede a invasão celular



Fonte: Autor.

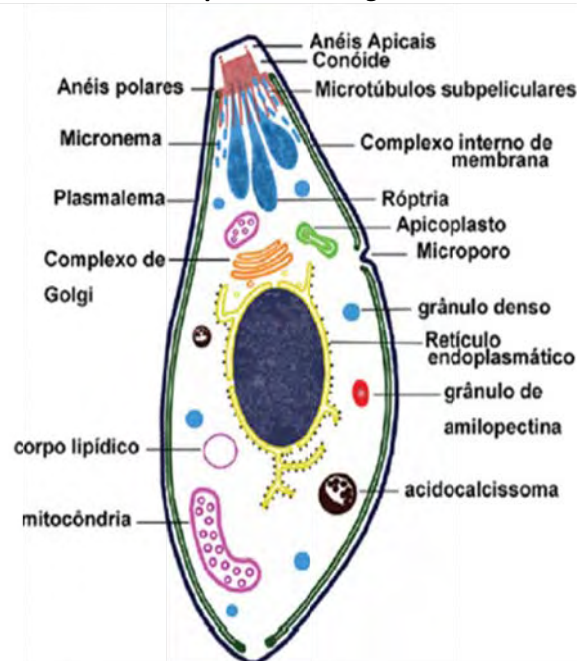
2.5 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um micro-organismo parasita obrigatório intracelular de animais homeotermos,⁵⁴ responsável por infectar cerca de 1/3 da população adulta mundial. A principal rota de transmissão para o humano é através do contato com fezes infectadas de animais domésticos, como gatos, ou através da ingestão de carne contaminada, especialmente de cordeiro. Causador de uma variedade de estados patológicos em seres humanos, incluindo graves doenças em indivíduos imunossuprimidos, assim como defeitos congênitos em bebês quando as gestantes são contaminadas durante a gravidez.⁵⁴

T. gondii foi primeiramente descrito por Nicolle e Manceaux em um roedor encontrado no continente africano e por Splendore, no Brasil, em um coelho.⁵⁵ O nome da espécie é originário do roedor *Ctenodactylus gundi*, do qual foi isolado; e o gênero é derivado do grego *toxon* (arco) e *plasma* (molde) devido ao seu formato encurvado e crescente. Pertence ao filo Apicomplexa, no qual estão incluídos diversos patógenos de importância médica e veterinária, como *Plasmodium spp*, agente causador da malária. O filo Apicomplexa é caracterizado pela presença do complexo apical, composto de organelas

secretórias especializadas, como róptrias e micronemas, e de elementos do citoesqueleto, como os anéis polares e o conóide, este último apenas nos coccídeos, subclasse que inclui *T. gondii* (Figura 12).⁵⁵

Figura 12 - Desenho esquemático de um taquizoíta de *T. gondii*



Fonte: Souza et al. (2010, p. 132).⁵⁵

O ciclo de vida de *T. gondii* apresenta uma fase assexuada, que se passa na maioria dos animais, e uma fase sexuada, que se passa nos felídeos. Ao longo de todo o ciclo possui três formas infectivas: a taquizoíta (forma de multiplicação rápida da fase aguda), bradizoíta (forma de multiplicação lenta, encontrada dentro de cistos tissulares) e a esporozoíta (forma encontrada nos oocistos).⁵⁵

T. gondii possui uma capacidade notória de invadir praticamente quase todo tipo de célula de animais homeotermos, incluindo o homem. A especificidade pelas células hospedeiras sugere que a adesão deve envolver um reconhecimento de moléculas presentes na superfície destas células.⁵⁴

O processo de invasão por *T. gondii* é realizado em muitas etapas. Primeiramente, o parasita desliza sobre a célula hospedeira, investigando-a com o conóide, uma organela apical. Durante este processo, em resposta a um sinal desconhecido, o parasita orienta-se e se liga com sua extremidade apical à superfície da célula hospedeira.⁵⁶ Após o acoplamento, ocorre a liberação de proteínas pelas micronemas⁵⁷ e róptrias.⁵⁸ Enquanto a liberação das proteínas pelas micronemas é o primeiro evento que acompanha a ligação do parasita à

célula hospedeira, aquelas liberadas pelas róprias diminuem a viscosidade da membrana plasmática da célula alvo, iniciando a invasão.⁵⁹ O processo finaliza com a formação de um vacúolo parasitóforo, a partir da membrana plasmática da célula hospedeira, o que propicia a sobrevivência e replicação da *T. gondii*.⁵⁹

Micronemas são organelas secretórias características dos parasitas pertencentes ao filo Apicomplexa. Na espécie *T. gondii*, elas são encontradas exclusivamente em sua extremidade anterior (Figura 12). A primeira descrição de proteínas de micronemas foi feita por Achbarou et al.⁵⁷ Esse grupo isolou e caracterizou três proteínas de micronemas (MICs) e as denominaram TgMIC1, TgMIC2 e TgMIC3. Atualmente, estão descritas pelo menos 11 proteínas isoladas dessas organelas.⁵⁵ Grande parte delas, com exceção de TgMIC5 e TgMIC10, possui um ou mais domínios adesivos,⁶⁰ sendo que duas delas, a TgMIC1 e TgMIC4, apresentam propriedades vacinais contra o *T. gondii*.⁶¹

Muitos micro-organismos patogênicos sintetizam proteínas ligantes de carboidratos, ou seja, com propriedades lectínicas. Através delas, tiram proveito da presença de glicoconjugados na superfície das células do hospedeiro para aderir a essas células, colonizar o tecido e invadir planos profundos. A adesão é, frequentemente, mediada por lectinas da superfície dos micro-organismos e por ligantes glicosilados na superfície da célula do hospedeiro vertebrado. Interações lectina-ligante podem resultar, não apenas em adesão, mas também em eventos de transdução de sinal, críticos para a colonização e infecção.

2.5.1 As proteínas de micronemas TgMIC1 e TgMIC4

Micronemas são pequenas organelas secretórias em forma de bastão, medindo aproximadamente 50 x 250 nm. Elas são encontradas exclusivamente na extremidade anterior de *T. gondii* (Figura 12). Em seu interior há um grande número de proteínas (MICs) sintetizadas no retículo endoplasmático, dentre elas as TgMIC1 e TgMIC4.

A primeira proteína de micronema identificada em *T. gondii* foi a TgMIC1. Essa proteína solúvel possui massa molecular de 49 kDa e é capaz de se ligar a receptores das células do hospedeiro. Essa proteína apresenta-se complexada com outras duas proteínas de micronema, a TgMIC4 e TgMIC6, como ilustrado na Figura 13.⁶²

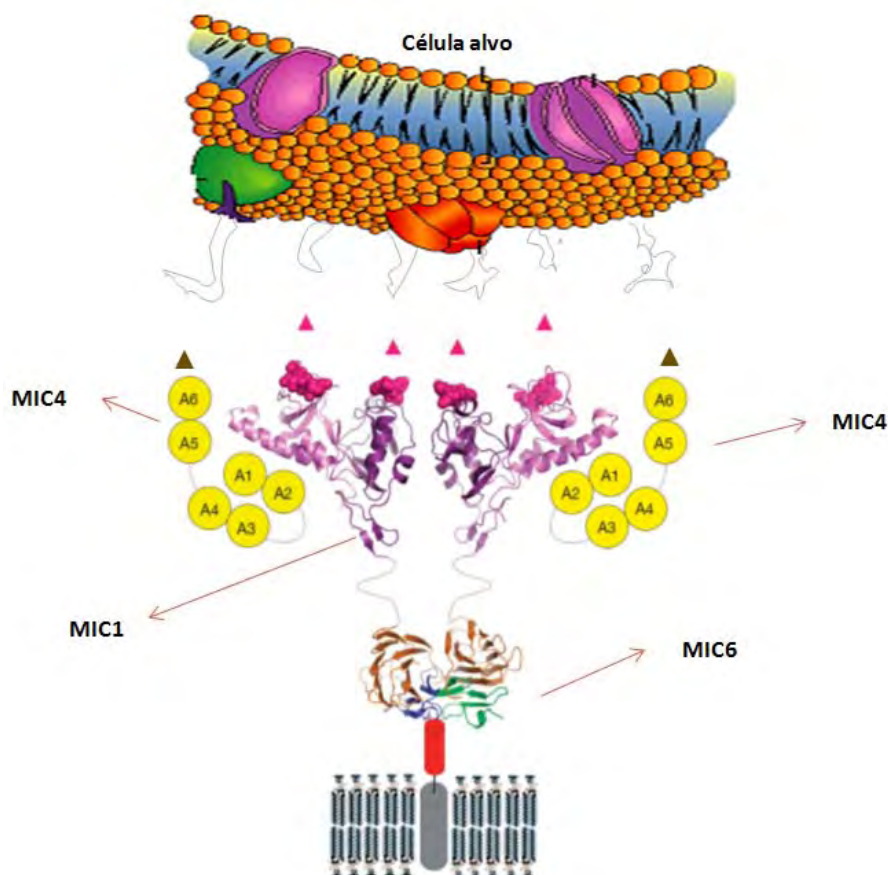
Estudos estruturais da TgMIC1 descrevem que essa proteína possui sítios ligantes de ácido siálico, que foram denominados de domínios repetidos de adesão (MAR) na porção

N-terminal da proteína.⁵⁴ A primeira descrição da capacidade da TgMIC1 reconhecer carboidratos (lactose, D-galactose e fetuína) foi apresentada no trabalho de Lourenço et al.⁶³, reforçando à esta proteína a capacidade de adesão celular.⁶⁴

A TgMIC4 também é capaz de interagir com células hospedeiras. Essa proteína, de 61 kDa, contém seis domínios Apple (A) conservados.⁶⁵ Estruturalmente, esse domínio é estável pela existência de pontes dissulfeto (resíduos de cisteína) presentes na proteína, e estudos têm demonstrado que a propriedade adesiva da TgMIC4 depende, essencialmente, da presença intacta desses resíduos. Os domínios A5 e, especialmente, o A6 dessa proteína exibem afinidade por galactose e N-acetilgalactosamina.⁶⁵

A TgMIC6, por outro lado, não está diretamente envolvida na adesão da célula hospedeira, desempenhando um papel exclusivamente estrutural.⁶²

Figura 13 - Estrutura do complexo TgMIC4-1-6, que mostra as posições relativas dos domínios e sítios de ligação na célula hospedeira. Os círculos amarelos mostram os seis domínios em forma de maçã da TgMIC4. Os domínios repetidos de adesão (MAR) na porção N-terminal da proteína TgMIC1 são representados pelas setas rosas. A TgMIC6 está associada na membrana do parasita, mantendo unido o complexo TgMIC4-1-6



Fonte. Adaptada de Sawmynaden et al. (2008, p. 1154).⁶²

2.6 A fetuína e a asialofetuína

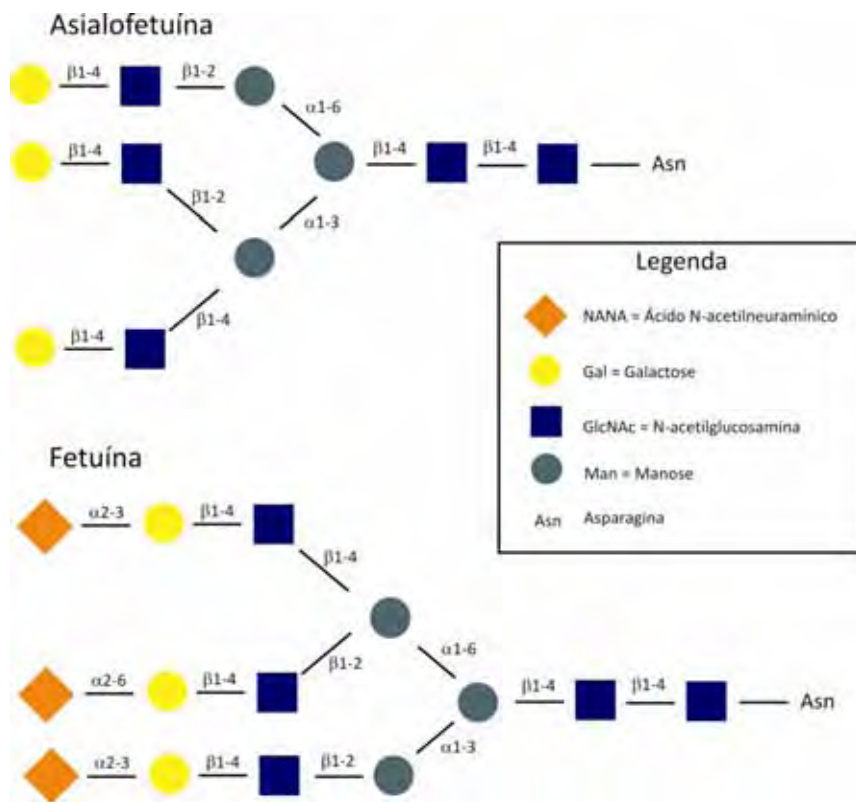
Além de importantes funções de armazenamento energético e estrutural, os oligossacarídeos e os polissacarídeos são portadores de informações, pois possuem a propriedade de atuarem como indicadores de endereçamento para algumas proteínas, bem como exercem papel de mediadores para interações específicas célula-célula. As moléculas que contém carboidratos agem no conhecimento e na adesão célula-célula, na migração celular durante o desenvolvimento, na resposta imune e na cicatrização de lesões, dentre outros.⁴⁵ Esses carboidratos, entretanto, são encontrados em glicoconjugados, como nas glicoproteínas.

Glicoproteínas contêm um ou mais oligossacarídeos de complexidade variada ligados covalentemente à proteína, ou seja, formando conjugados carboidrato-proteína. O-glicanas estão ligados com o grupo hidroxila do resíduo de Ser (Serina) ou Thr (Treonina) por meio do carbono anomérico por ligação glicosídica. As N-glicanas associam-se por meio de ligação N-glicosídica com o nitrogênio da função amida de um resíduo de Asn (Asparagina). Os oligossacarídeos ligados à proteína são muito ricos em informação estrutural, uma vez que é muito grande o número de combinações possíveis de monossacarídeos em uma cadeia de oligossacarídeo de uma glicoproteína.⁴⁵

A fetuína (68 kDa) é um exemplo de glicoproteína. Ela possui o ácido N-acetilneuramínico em sua extremidade, um tipo de ácido siálico.⁶⁶ Os ácidos siálicos estão intimamente envolvidos em processos biológicos que incluem as funções de mediadores na adesão célula-célula, mediadores na comunicação intercelular, renovadores celulares, receptores de bactérias, dentre outros.⁶⁷ As espécies de ácido N-acetilneuramínico estão presentes na fetuína por meio de ligações glicosídicas (α 2-3) na galactose (Figura 14).

Sua forma sem o ácido siálico é a asialofetuína, uma glicoproteína monomérica de massa molecular aproximadamente 48 kDa. Sua estrutura possui galactose ligada terminalmente na N-acetilglucosamina por meio de ligações glicosídicas β 1-4,⁶⁸ (Figura 14).

Figura 14 - Estruturas dos oligossacarídeos presentes na asialofetuína e fetuína



Fonte: Autor.

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Frente às evidências de que o protozoário *Toxoplasma gondii* utiliza determinadas proteínas secretadas por sua organela micronema (MICs) para o processo de invasão celular, especificamente na etapa de adesão na célula hospedeira, faz-se necessário conhecer a constante de afinidade dessas MICs com determinados carboidratos ou glicoproteínas. Uma metodologia simples e eficaz na determinação desse parâmetro é por meio da construção de biossensores piezelétricos de afinidade, utilizando a abordagem de monocamadas automontadas para a imobilização do material biológico. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo geral estudar a construção, passo a passo, de biossensores piezelétricos de afinidade contendo como material biológico as lectinas recombinantes rTgMIC1 e rTgMIC4 e sua aplicação na determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos de interação dessas proteínas com a fetuína e asialofetuína. Assim, esse projeto teve como objetivos específicos:

- 1) Estudar a formação da monocamada automontada mista de tióis por meio das técnicas de microbalança a cristal de quartzo (QCM, *Quartz Crystal Microbalance*) e voltametria cíclica. Os tióis utilizados foram o ácido 11-mercaptoundecanóico e o 6-mercaptop-1-hexanol na proporção de 1:3, respectivamente.
- 2) Verificar o processo de ativação da monocamada formada utilizando a técnica de QCM.
- 3) Verificar, por QCM, o processo de imobilização das rTgMICs sobre os cristais de quartzo funcionalizados com a monocamada automontada, bem como a etapa de bloqueio utilizando gelatina.
- 4) Utilizar o modelo da Isoterma de Langmuir e a técnica de QCM com fator dissipativo para determinar as constantes de afinidade e energia livre de Gibbs (ΔG) do processo de interação das rTgMICs com a fetuína e asialofetuína.

4. METODOLOGIA

4.1 Materiais

Os tióis, solventes e demais materiais foram utilizados sem prévia purificação. É mostrado na Tabela 2 a procedência de cada um deles.

Tabela 2 - Reagentes utilizados

Reagentes	Fórmula Molecular	Procedência
Ácido 11-mercaptoundecanóico (11-MUA) 95%	$C_{11}H_{22}O_2S$	Sigma-Aldrich
6-mercaptop-1-hexanol (C6OH) 97%	$C_6H_{14}O_2S$	Sigma-Aldrich
N-etil-N-(dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)	$C_8H_{17}N_3$	Fluka
N-hidroxisuccinimida (NHS) 97%	$C_4H_5NO_3$	Sigma-Aldrich
Asialofetuína	-	Sigma
Fetuína	-	Sigma
Gelatina	-	Shynth
Soroalbumina de soro bovino (BSA)	-	Sigma-Aldrich
Ácido Clorídrico	HCl	Sigma-Aldrich
Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) 99,8%	$C_4H_{11}NO_3$	Sigma-Aldrich
Cloreto de Sódio 99,5%	NaCl	Sigma-Aldrich
Hexacianoferrato(III) de potássio 99%	$K_3[Fe(CN)_6]$	Sigma-Aldrich
Hexacianoferrato(II) de potássio trihidratado 99%	$K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$	Sigma-Aldrich
Dihidrogenofosfato de potássio	KH_2PO_4	Sigma-Aldrich
Monohidrogenofosfato de sódio dodecahidratado	$Na_2HPO_4.12H_2O$	Sigma-Aldrich
Peróxido de hidrogênio P.A	H_2O_2	Shynth
Ácido sulfúrico concentrado P.A	H_2SO_4	Qhemis
Etanol anidro 99,8%	C_2H_6O	Fluka
Acetona P.A	$(CH_3)_2CO$	Qhemis
Água Milli-Q (18,2 MΩ a 25°C)	H_2O	Millipore

Fonte: Autor.

As proteínas recombinantes rTgMIC1 e rTgMIC4 utilizadas nesse trabalho foram obtidas em parceria com o Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia do Departamento

de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão-Preto (FMRP-USP), coordenado pela Profa. Dra. Maria Cristina Roque Antunes Barreira. As soluções das proteínas ficaram armazenadas em freezer (-18 °C).

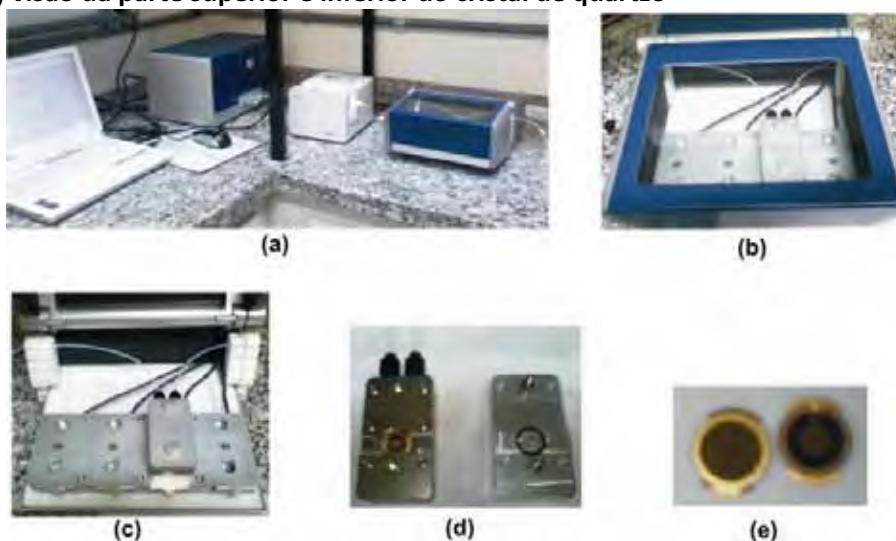
4.2 Instrumentação

O estudo da montagem do biossensor e da interação entre as rTgMIC1 e rTgMIC4 com a fetuína e asialofetuína foram realizados utilizando a técnica de Microbalança a Cristal de Quartzo (Q-Sense - modelo E4). Os cristais de quartzo utilizados (corte AT, frequência fundamental de $4,95\text{MHz} \pm 50\text{ KHz}$, 14 mm de diâmetro e 0,3 mm de espessura) são recobertos com fina camada de ouro em ambos os lados, com rugosidade menor do que 3 nm. Neste trabalho, foram utilizados os valores do terceiro harmônio normalizado ($\Delta f_{n=3}$ e $\Delta D_{n=3}$).

Na montagem da célula, os cristais de quartzo são dispostos de forma que uma de suas faces fica em contato com o ar, enquanto a outra com a solução sendo investigada. A capacidade de volume sobre os cristais de quartzo é de 40 μL .

Para a injeção das soluções de tiol foi utilizada uma bomba peristáltica Ismatec - modelo IPC de quatro canais (Figura 15).

Figura 15. Conjunto utilizado para o estudo da formação do biossensor e da interação das rTgMICs com a fetuína e asialofetuína. (a) Visão geral do equipamento. Da direita para a esquerda: notebook contendo o *software* do equipamento Q-Sense modelo E4 (Q-Soft), circuito oscilador, bomba peristáltica, compartimento das células; (b) Visão do compartimento da célula de injeção; (c) Célula conectada nos tubos de injeção; (d) célula aberta mostrando a disposição do cristal de quartzo e (e) visão da parte superior e inferior do cristal de quartzo

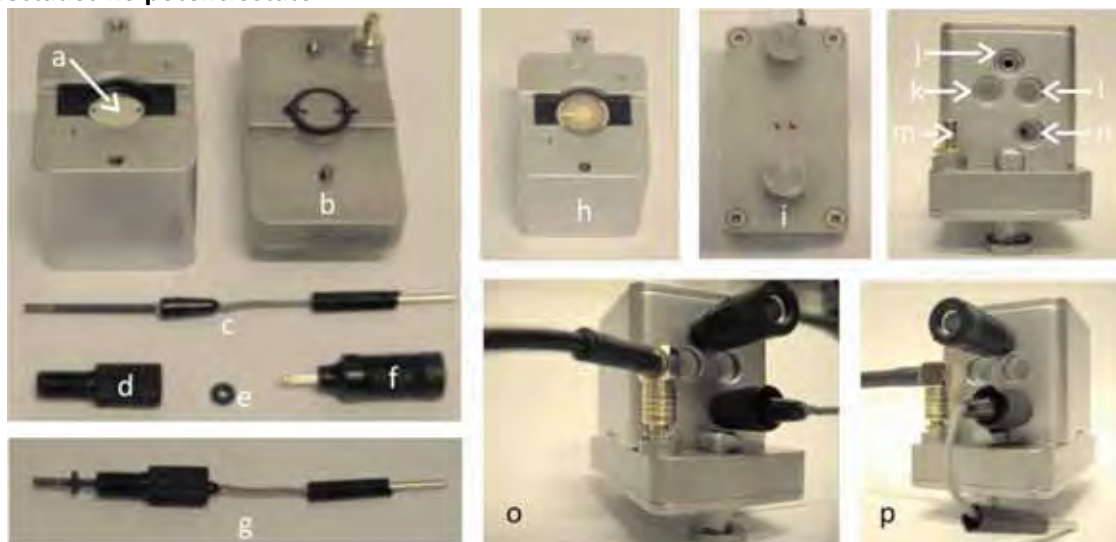


Fonte: Autor.

Para o estudo da formação da SAM, foi utilizado potenciostato/galvanostato da Autolab (AUTOLAB PGSTAT 30) empregando um sistema de três eletrodos em uma célula eletroquímica desenvolvida pela empresa Q-sense (modelo QEM 401, Figura 16). O cristal de quartzo contendo eletrodo de ouro foi usado como eletrodo de trabalho, o contra-eletrodo foi uma placa de platina com área geométrica ligeiramente superior a área do eletrodo de ouro e o eletrodo de referência utilizado foi um eletrodo comercial (World Precision Instruments, Dri-Ref 2SH) de Ag/AgCl sólido. A janela de potencial estudada foi de -0,1V até 0,5V, com potencial inicial de 0,22V e velocidade de varredura de 100mV/s.

Na Figura 16 é mostrado, em detalhes, a célula eletroquímica da Q-SENSE (QEM 401) utilizada durante os ensaios de voltametria cíclica.

Figura 16 - Conjunto utilizado para o estudo da formação da SAM por voltametria cíclica. (a) Contra-eletrodo de platina e visão da parte inferior e (b) superior da célula; (c) Eletrodo de referência de Ag/AgCl sólido; (d) Suporte para o eletrodo de referência; (e) “o-ring” para vedação da conexão do eletrodo de referência na célula; (f) Encaixe elétrico para o contra-eletrodo; (g) Esquema de montagem do eletrodo de referência; (h) Forma correta de encaixe do eletrodo de trabalho na célula; (i) Visão superior da célula fechada. Visão lateral da célula contendo os encaixes para: (j) a conexão elétrica do contra-eletrodo; (k) entrada para o fluxo de solução; (l) saída para o fluxo de solução; (m) conexão elétrica para o eletrodo de trabalho; (n) eletrodo de referência. Visão lateral da célula à (o) esquerda e (p) à direita contendo as conexões elétricas que devem ser conectados no potenciostato



Fonte: Autor.

O pHmetro utilizado para a preparação das soluções tampão foi o da Quimis (Modelo Q400MT), previamente calibrado antes dos ensaios.

4.3 Limpeza dos Cristais

O procedimento de lavagem da superfície de ouro do cristal é de crucial importância para a montagem de um biossensor, pois envolve um tratamento prévio da superfície que receberá a SAM e posterior imobilização do material biológico. Desta forma, deve-se adotar uma metodologia que permita que a superfície do ouro seja limpa.

Um dos procedimentos recomendados encontrado na literatura para a limpeza de superfície de ouro para a formação de SAM é aquele que usa solução piranha, ou seja, mistura de $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{conc})}$ e H_2O_2 .^{20,69} A proporção utilizada neste trabalho foi a de 3:1 (ácido sulfúrico concentrado: peróxido de hidrogênio, v/v). A solução foi preparada no momento do uso e os cristais de quartzo foram mergulhados nela por 60 segundos. Após o tempo transcorrido, os cristais foram retirados dessa solução, lavados exaustivamente com água e secos com gás nitrogênio.

Os cristais foram utilizados imediatamente após a limpeza.

4.4 Estudo da formação da monocamada automontada mista de 11-MUA e 6COH

Para a realização dos ensaios para o estudo da formação da SAM em tempo real, o terceiro harmônico normalizado de oscilação do cristal de quartzo ($\Delta f_{n=3}$) e o respectivo parâmetro D ($\Delta D_{n=3}$) foram estabilizados injetando-se etanol em fluxo contínuo (100 $\mu\text{L}/\text{min}$) por 10 minutos. Após a estabilização, solução etanólica contendo 2,5 mM de 11-MUA e 7,5 mM de 6COH foi injetada ao sistema por tempo suficiente para preencher todo o volume sobre o cristal e o fluxo desligado. Após 12h de formação da monocamada, fluxo de etanol foi novamente utilizado para lavar a superfície da monocamada e retirar as moléculas de tiol não adsorvidas quimicamente na superfície do ouro. As medidas foram realizadas em triplicata e na temperatura ambiente (25° C).

A imobilização da monocamada de tiol também foi analisada por medidas de voltametria cíclica com o intuito de verificar o bloqueio do eletrodo frente a processos eletroquímicos utilizando 1mM do par redox ferri/ferro em uma solução tampão fosfato salino 0,1M e pH 7,0 antes e após a formação da monomacada, utilizando o mesmo cristal de quartzo como eletrodo de trabalho.

4.5 Estudo dos processos de ativação, imobilização das rTgMICs e bloqueio

Após a formação da SAM sobre o cristal de quartzo, este foi montado na célula da Q-SENSE para a investigação do processo de ativação. Para a realização dos ensaios na QCM, $\Delta f_{n=3}$ e $\Delta D_{n=3}$ foram estabilizados injetando-se água em fluxo contínuo (100 $\mu\text{L}/\text{min}$) por 10 min. Após a estabilização, solução aquosa contendo 10 mM de EDC e 20 mM de NHS foi injetada no sistema por tempo suficiente para preencher todo o volume sobre o cristal de quartzo e o fluxo desligado. Após 2h, fluxo de água foi novamente utilizado para lavar a superfície da monocamada e retirar as moléculas não adsorvidas quimicamente. As medidas foram realizadas em triplicata e na temperatura ambiente (25° C).

Após o processo de ativação, procedeu-se à etapa de imobilização da rTgMIC1 ou rTgMIC4 em diferentes cristais.

Para a imobilização da rTgMIC, o procedimento adotado foi análogo ao processo acima descrito. Ao invés da água, foi utilizado solução tampão Tris-HCl contendo 200 mM de NaCl (pH 8,0). As concentrações das rTgMICs utilizadas foram de 0,15 mg/mL no mesmo tampão.

Para a etapa do bloqueio, foi utilizada solução de gelatina 0,1% preparada no mesmo tampão. O procedimento utilizado para a investigação do bloqueio foi semelhante ao da imobilização das rTgMICs.

4.6 Verificação do bloqueio dos cristais de quartzo funcionalizados com as rTgMICs e avaliação da especificidade

Com o intuito de analisar se todos os sítios remanescentes (grupos carboxílicos e/ou ésteres NHS) foram ocupados pela lectina (rTgMIC1 ou rTgMIC4) imobilizada e pela gelatina, solução 0,1 mg/mL de BSA em tampão Tris-HCl contendo 200 mM de NaCl (pH 8,0) foi injetada, a um fluxo de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$, sobre o cristal funcionalizado com a lectina por tempo suficiente para preencher todo o volume sobre o cristal, desligando o fluxo após esse tempo. Após a solução de BSA permanecer em contato com o sensor funcionalizado por 100 min, fluxo de mesmo tampão foi utilizado para a lavagem do cristal. Os ensaios foram realizados em triplicata e na temperatura ambiente (25° C).

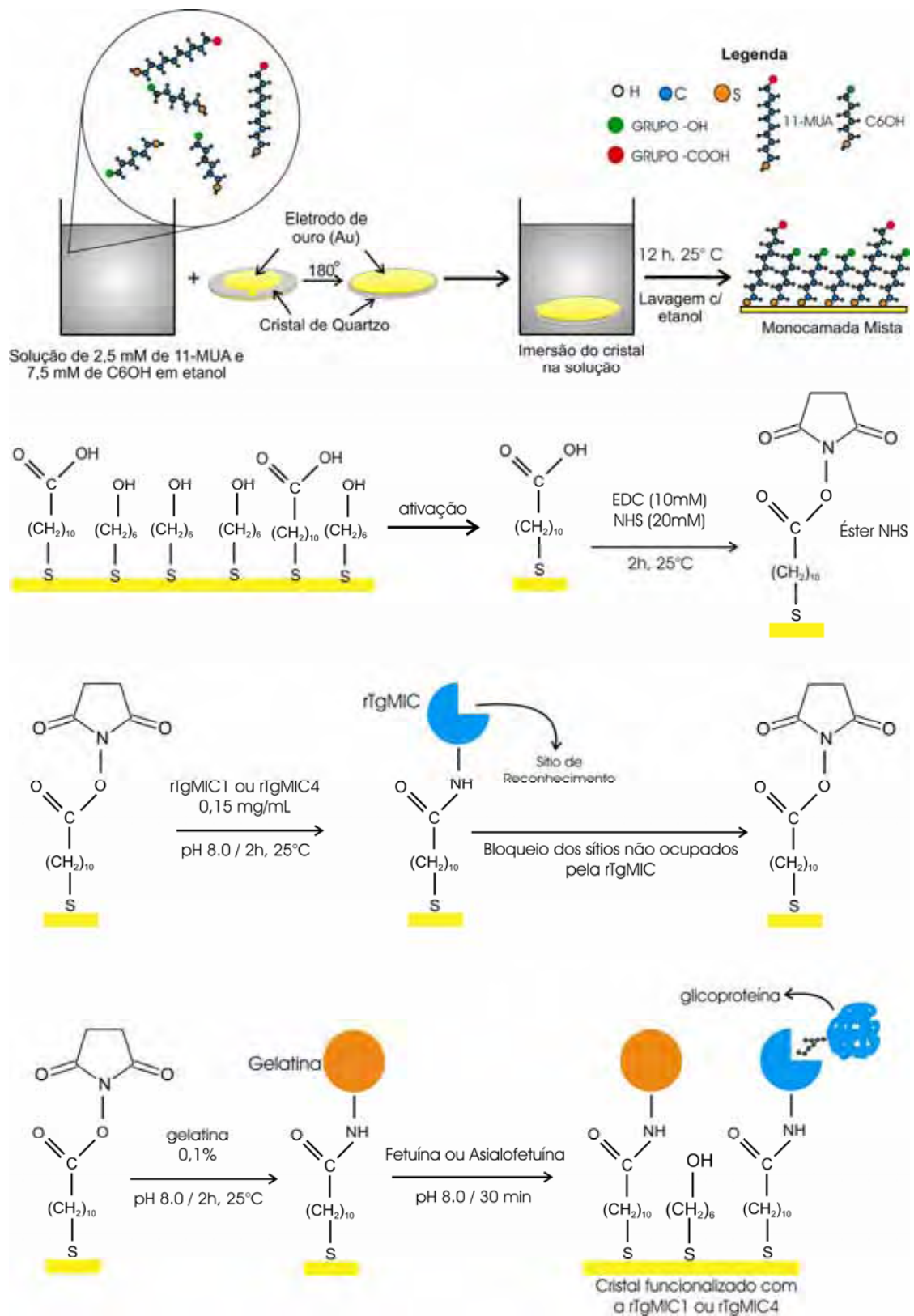
Para verificar a especificidade desses cristais funcionalizados, BSA foi imobilizado sobre o cristal de quartzo ao invés da rTgMIC e injetaram-se soluções de fetuína e asialofetuína nas concentrações de 0,15 mM e 0,41 mM, respectivamente, a um fluxo de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ por tempo suficiente para preencher todo o volume sobre o cristal, desligando o fluxo após esse tempo. Após a solução de glicoproteína permanecer em contato com o sensor funcionalizado com BSA por 30 min, fluxo de tampão foi utilizado para a lavagem dos cristais. Os ensaios foram realizados em triplicata e na temperatura ambiente (25° C).

4.7 Estudo da Interação das rTgMICs com as glicoproteínas fetuína e asialofetuína

Após a estabilização do cristal de quartzo funcionalizado com uma das rTgMICs (rTgMIC1 ou rTgMIC4) em fluxo (100 $\mu\text{L}/\text{min}$) de solução tampão Tris-HCl (pH 8,0), solução de glicoproteína foi injetada sobre o cristal por tempo suficiente para preencher todo o volume sobre o cristal, desligando o fluxo após esse tempo. Após 30 minutos de interação entre a rTgMIC e a glicoproteína, o cristal foi lavado com solução tampão objetivando remover as moléculas não aderidas especificamente sobre o sensor. Os ensaios foram realizados em triplicata e na temperatura ambiente (25° C).

É mostrado na Figura 17 o procedimento, etapa por etapa, da formação dos biossensores contendo as proteínas rTgMIC1 ou rTgMIC4, após a limpeza da superfície de ouro com solução piranha.

Figura 17 - Detalhes do procedimento experimental utilizado na construção dos biossensores contendo rTgMIC1 ou rTgMIC4 para os estudos de afinidade



Fonte: Autor.

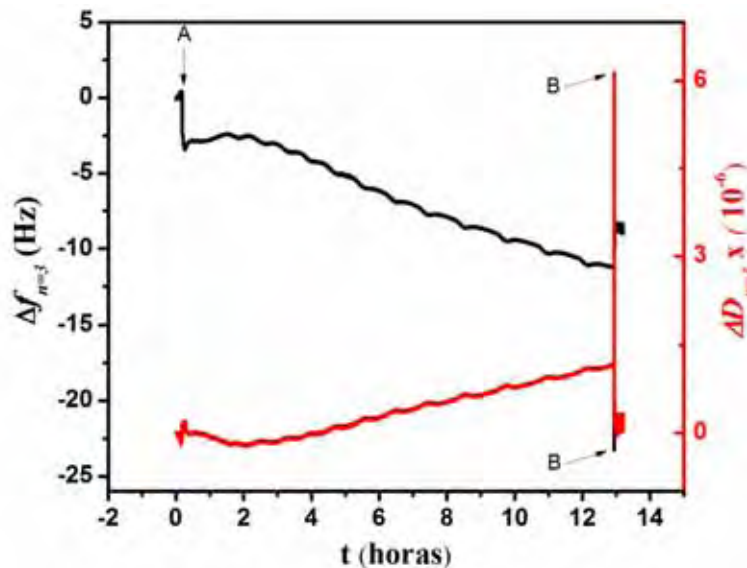
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Formação da SAM mista de 11-MUA e C6OH

Tióis ligam-se no ouro devido à afinidade do enxofre por esse metal. Sabe-se que o processo de formação desses filmes ocorre basicamente em duas etapas: a primeira, rápida, em que a molécula de tiol se liga na superfície metálica, e a segunda, que dura horas, que corresponde ao processo organizacional da monocamada.^{19,20}

Na Figura 18 é mostrado o processo de formação da monocamada mista a partir de solução mista de 11-MUA e 6COH utilizando a técnica de QCM-D.

Figura 18 - Processo de formação da SAM acompanhado pela técnica de QCM-D. Para a formação da monocamada, foi utilizada solução etanólica contendo 2,5 mM de 11-MUA e 7,5 mM de 6COH. A seta em A indica o início do processo de injeção da amostra, enquanto em B indica o início da lavagem do cristal com etanol



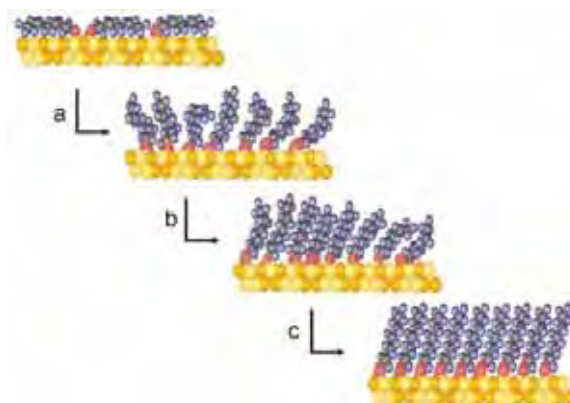
Fonte: Autor.

A seta em A indica o início da injeção de solução de tiol sobre o eletrodo de ouro do cristal de quartzo. A partir desse ponto, ocorre uma rápida queda de Δf , seguindo de decaimento lento, até em B, momento em que é ligado o fluxo de etanol para a lavagem do cristal. Após a lavagem, Δf aumenta até valor final de $-\Delta f_{\text{final}} = 9,5 \pm 3,8$ Hz. O valor final do parâmetro D para a formação da monocamada é $\Delta D_{\text{final}} = (3 \pm 1) \times 10^{-7}$.

Importante notar que o comportamento da curva $\Delta f(t)$ ao longo do processo reflete estágios cinéticos diferenciados. No momento em que é iniciado o fluxo de solução da mistura dos tióis, ocorre uma rápida queda dos valores de Δf , evidenciado rápido processo

de adsorção dessas moléculas no ouro. A queda acentuada é seguida de uma mais suave, até o momento da lavagem do cristal, sugerindo processo adsorativo lento. Torna evidente que, inicialmente, as moléculas de tiol se ligam desorganizadamente sobre a superfície de ouro (Figura 19a) e que, com o tempo, devido às interações intermoleculares entre as espécies adsorvidas adjacentes, ocorre o processo de organização da monocamada, conforme descrito na literatura.¹⁷ Essa etapa envolve a desocupação de espaços anteriormente indisponíveis para adsorção (Figura 19b). Nestes novos espaços livres, moléculas de tiol podem se adsorver, ocasionando aumento de massa sobre o cristal com correspondente decréscimo nos valores de Δf no tempo, como ilustrado na Figura 19.

Figura 19 - Esquema do processo de formação de uma SAM: (a) A etapa inicial é caracterizada pela rápida adsorção e crescimento da espessura do filme, seguido de um processo mais lento (b) de adsorção e organização, até a formação final (c) da monocamada automontada. Perceba que, durante a formação do filme, ocorre a desocupação de sítios anteriormente indisponíveis para adsorção de novas espécies de tiol. Novos sítios se tornam aptos à adsorção devido à organização do filme



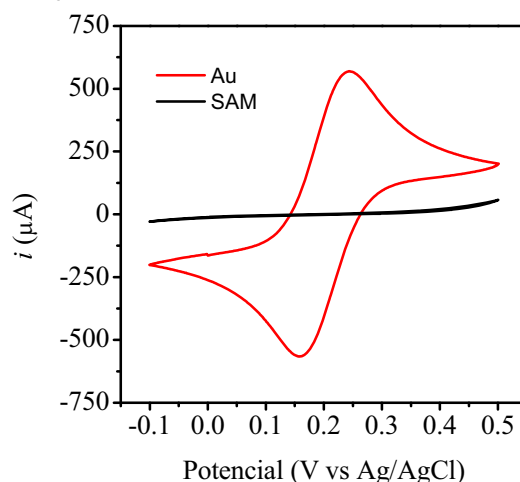
Fonte: Cancino (2008, p. 18).⁶⁹

É conhecido que SAMs obtidas a partir de tióis de cadeia longa são compactas e rígidas.⁷⁰ Uma forma de verificar essa evidência é por meio do parâmetro D : baixos valores de dissipação são característicos de camadas rígidas. Quanto menor for o módulo da relação $-\Delta D/\Delta f$ para a formação do filme, mais rígida é a camada formada. Campiña et al.,⁷⁰ por exemplo, estudaram a formação de SAM a partir do 11-amino-1-undecanotiol sobre superfície de ouro e encontraram valores normalizados do quinto harmônico para $\Delta D_{n=5}$ em $2,5 \times 10^{-6}$ e $\Delta f_{n=5} = -22$ Hz para a formação dessa monocamada, que afirmaram ser rígida. A relação $-\Delta D/\Delta f$ pode ser obtida, encontrando valor de $1,1 \times 10^{-7} \text{ Hz}^{-1}$. Embora não seja regra geral, quocientes entre ΔD_{final} e Δf_{final} com valores até $1,1 \times 10^{-7} \text{ Hz}^{-1}$ podem ser considerados evidência de formação de filmes rígidos. Para a formação da SAM mista de 11-MUA e C6OH,

o valor encontrado para essa relação é $(3\pm 2)\times 10^{-8} \text{ Hz}^{-1}$, ou seja, muito abaixo daquele encontrado por Campiña para filme rígido, sendo possível afirmar que a monocamada formada é rígida, e portanto, a relação de Sauerbrey pode ser utilizada para estimar a massa superficial do filme formado. Utilizando a Equação 2, encontra-se o valor de $168\pm 68 \text{ ng cm}^{-2}$. Levando em consideração que a proporção entre as moléculas de uma espécie de tiol presente na monocamada está relacionada com a estequiometria da solução de mistura de tiol utilizada,¹⁵ 1:3 (11-MUA:C6OH) neste caso, é possível estimar a cobertura superficial, Γ (mol/cm^2), da monocamada formada. O valor encontrado, igual a $(1,1\pm 0,4)\times 10^{-9} \text{ mol/cm}^2$ é consistente com aqueles que representam alto grau de cobertura de monocamada formada a partir de tióis de grande cadeia carbônica sobre superfície de ouro, de $0,76\times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$.⁷¹ Cancino⁶⁹ ao estudar a formação de monocamada mista de 11-MUA e 6COH sobre superfície de ouro utilizando diferentes proporções estequiométricas desses tióis encontrou valores de cobertura superficial em torno de $\approx 1,1\times 10^{-9} \text{ mol/cm}^2$, valor análogo ao encontrado pela técnica de QCM-D, evidenciando que a SAM obtida pela mistura dos dois tióis na proporção e condições apresentadas nesse trabalho possui alto grau de cobertura superficial.

Em estudo de formação de monocamadas automontadas, as medidas de voltametria cíclica auxiliam na verificação da imobilização do tiol na superfície do eletrodo pela observação da variação do perfil voltamétrico.⁶⁹ Em um eletrodo limpo e sem moléculas imobilizadas em sua superfície, um par redox fornece um voltamograma com picos de oxidação e redução. A curva *Au* na Figura 20 apresenta esta situação para o processo redox do par ferri/ferro em ouro. Com a formação de monocamada sem defeitos a partir de tióis de longa cadeia, há o impedimento físico do eletrodo e, desta maneira, as espécies eletroativas têm dificuldade em reduzir ou oxidar.⁶⁹ Como consequência, os picos de oxidação/redução se distanciam um do outro e o sinal de corrente diminui, evidenciando que o sistema está se tornando cada vez mais irreversível. A curva *SAM* da Figura 20 exemplifica esta descrição e mostra que o uso da mistura de 6COH com 11-MUA nas condições aqui descritas forma uma SAM que bloqueia totalmente o processo redox do par ferri/ferro e, portanto, evidencia um elevado grau de recobrimento da superfície de ouro, corroborando os valores encontrados por meio da técnica de QCM-D. Os voltamogramas foram obtidos utilizando o mesmo cristal de quartzo, antes e após a formação da SAM, acompanhado pela técnica de QCM-D.

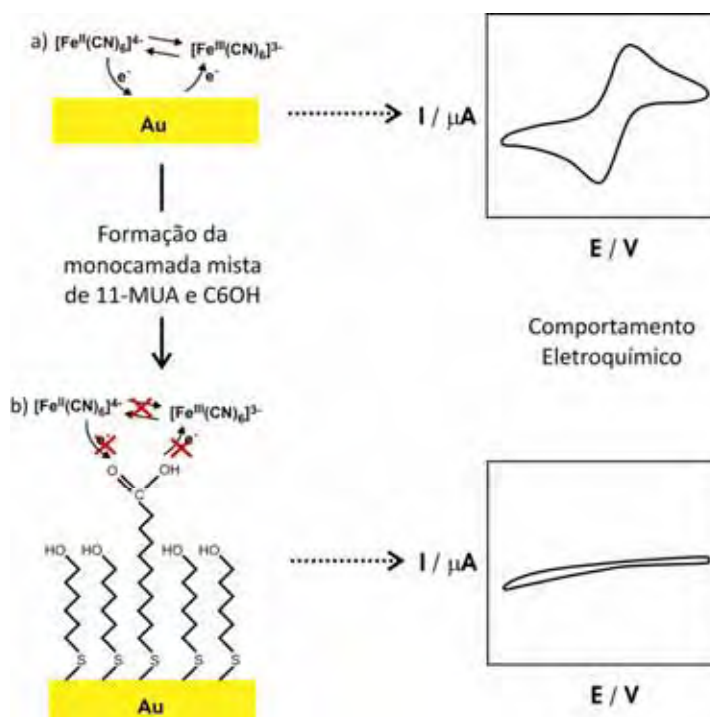
Figura 20 - Observação do processo de imobilização da mistura de tióis sobre o eletrodo de ouro no cristal de quartzo por voltametria cíclica antes (curva Au) e após a imobilização (curva SAM). A inexistência de picos na curva do sistema com a SAM evidencia a imobilização dos tióis na superfície de ouro do cristal de quartzo



Fonte: Autor.

Na Figura 21 é ilustrado, em detalhes, o processo de oxirredução das espécies $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{4-}$ e $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$ sobre a superfície de ouro com e sem a monocamada formada.

Figura 21 - Processo de oxidação e redução dos íons complexos $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{4-}$ e $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$ em solução. (a) Em um eletrodo limpo, quando um determinado potencial é atingido, a espécie $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{4-}$ se oxida a $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$, que se reduz novamente quando outro potencial é alcançado. O voltamograma do processo exibe duas bandas visíveis, que correspondem à oxidação e à redução dessas espécies em solução. (b) Após a formação da monocamada mista de 11-MUA e C6OH, ocorre um significativo bloqueio dos processos de oxidação e redução quando os mesmos potenciais são novamente alcançados, evidenciando que o processo eletroquímico em (a) não está ocorrendo



Fonte: Autor.

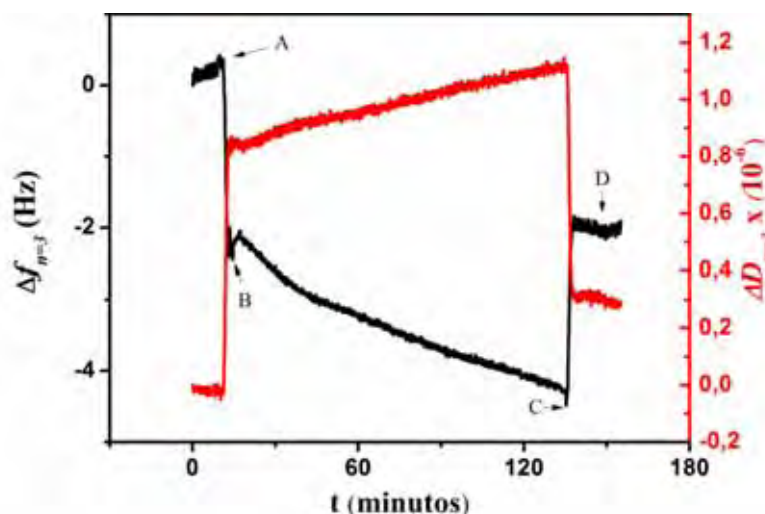
Por meio dos dados de QCM-D e voltametria cíclica do processo de obtenção da SAM aqui descrito, verifica-se a formação de monocamada rígida e com mínimo de defeitos, ideal para a imobilização de material biológico para o desenvolvimento de biossensores.

5.2 Acompanhamento do processo de ativação da SAM por QCM-D

Após a formação da SAM a partir da mistura etanólica de 11-MUA e 6COH por 12 h em temperatura ambiente, foi realizado o estudo *in situ* do processo de ativação da monocamada.

É mostrado, na Figura 22, o processo de ativação da SAM com solução aquosa contendo 10 mM de EDC e 20 mM NHS por 2h, a 25° C. O intervalo de tempo igual a zero até a seta em A corresponde ao período necessário para a estabilização da frequência de oscilação do cristal de quartzo, injetando-se água a um fluxo de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ por 10 min. A partir da seta em A, ocorre a injeção da solução de EDC e NHS (100 $\mu\text{L}/\text{min}$) parando em B, que corresponde ao tempo necessário para que toda a célula esteja preenchida pela solução. O intervalo de B a C corresponde ao período em que a solução está em contato com a SAM. Em C, inicia-se o processo de lavagem do cristal com água, objetivando retirar as moléculas fisicamente adsorvidas na superfície do cristal. A seta em D indica o final do processo.

Figura 22 - Etapa de ativação da SAM utilizando solução aquosa contendo EDC (10 mM) e NHS (20 mM). Seta em A indica o instante de injeção da solução contendo EDC e NHS. De B a C corresponde ao tempo em que o cristal de quartzo contendo a SAM permaneceu em contato com a solução de EDC e NHS (2h). A partir de C, inicia-se a etapa da lavagem do cristal com água em fluxo, finalizando em D

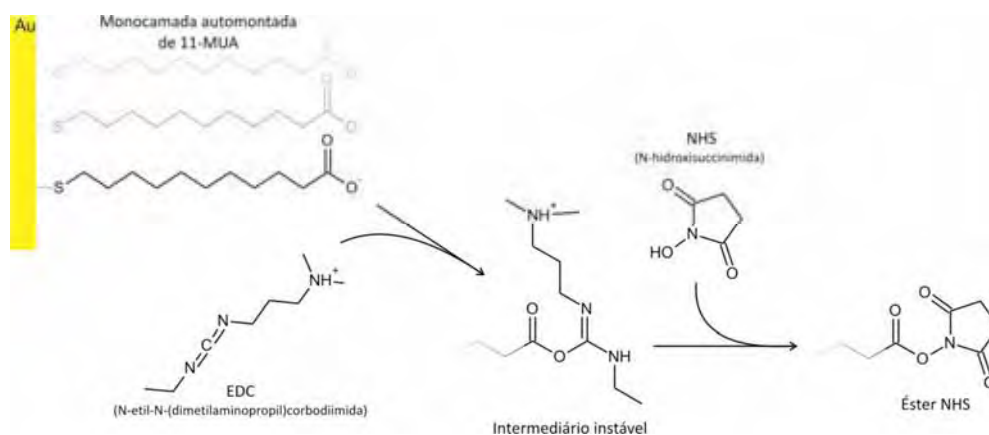


Fonte: Autor.

A partir do ponto A é possível observar que ocorre uma queda na frequência de oscilação do cristal de quartzo. De acordo com a relação de Sauerbrey, essa queda é indício de que a solução contendo as moléculas de EDC e NHS está se adsorvendo ou ligando-se na superfície da SAM, além do efeito de alteração de viscosidade do meio.

Para uma ideia mais clara do processo de ativação é necessário comentar sobre essa etapa. Quando é adicionada a solução de EDC e NHS sobre o cristal de quartzo contendo monocamada automontada de 11-MUA, por exemplo, as moléculas de EDC reagem com os grupos carboxílicos para formar um éster intermediário instável (Figura 23), que quando hidrolisado regenera o grupo carboxílico. Entretanto, na presença de NHS, ocorre a formação de éster-NHS, composto mais estável e difícil de sofrer regeneração quando comparado ao anterior, permitindo maior eficiência na reação de imobilização de material biológico. A variação de Δf_{final} de aproximadamente -3 Hz (seta em D na Figura 22) pode ser interpretada como a formação do grupo éster NHS, funcionalizando a superfície do transdutor.

Figura 23 - Exemplo de processo de ativação da SAM de 11-MUA. Quando solução de EDC e NHS entra em contato com a SAM de 11-MUA ocorre a formação de intermediário instável. O intermediário, ao reagir com NHS presente na solução, forma éster-NHS, composto mais estável, aumentando a eficiência do processo de imobilização de proteína



Fonte: Autor.

Neste caso, a monocamada automontada previamente formada a partir da solução etanólica de 11-MUA e 6COH contem grupos carboxílicos e hidroxilas orientados para a solução. Após injetar a mistura de EDC e NHS, no final do processo, ocorre a formação de éster-NHS, aumentando a massa sobre o cristal de quartzo. A queda de aproximadamente 3 Hz na frequência de oscilação do cristal de quartzo pode ser interpretada como a formação do grupo éster, funcionalizando a superfície do transdutor e tornando-a apta ao processo de

imobilização de proteína. Os ensaios foram realizados em triplicata, obtendo $-\Delta f_{\text{final}} = 2,8 \pm 0,6 \text{ Hz}$ e $\Delta D_{\text{final}} = (2,9 \pm 0,3) \times 10^{-7}$. A relação $-\Delta D/\Delta f$ é consistente para filme rígido ($\approx 1 \times 10^{-7} \text{ Hz}^{-1}$).⁷⁰

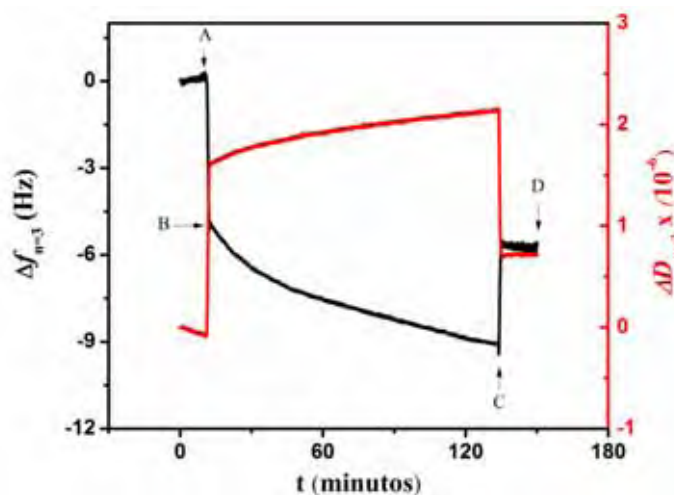
A variação negativa de frequência de oscilação do cristal de quartzo para o processo de ativação de monocamada contendo grupos carboxílicos também foi observado por Yakovleva et al.¹⁰ Neste trabalho, os pesquisadores utilizaram o 11-MUA como tiol destinado na formação de monocamada sobre cristal de quartzo. Sobre a SAM formada, foi injetado solução de EDC e NHS e observou-se queda de frequência na ordem de 10 Hz na etapa final da formação do éster-NHS. Variação mais negativa dos valores de frequência foi observada neste caso, quando comparado com o resultado apresentado neste trabalho, devido ao fato de que os pesquisadores obtiveram a SAM a partir de um único tiol, o 11-MUA, e não a partir de uma mistura de tióis, como descrito na seção 4.4.

5.3 Processo de imobilização das rTgMICs e etapa de bloqueio

5.3.1 Imobilização da rTgMIC1

Com o intuito de estudar o processo de adsorção da rTgMIC1 sobre o cristal de quartzo funcionalizado com SAM e ativado com solução de EDC/NHS, a imobilização dessa proteína foi acompanhada pela técnica de QCM-D (Figura 24).

Figura 24 - Processo de adsorção da proteína rTgMIC1 sobre eletrodo de ouro funcionalizado com SAM e ativado com solução de EDC/NHS. A seta em A indica o início do processo de injeção da solução de rTgMIC1, sendo finalizada em B. A seta em C mostra o início da injeção de tampão Tris-HCl (pH 8.0) para retirar proteínas adsorvidas fisicamente sobre o eletrodo. O fluxo utilizado foi de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$

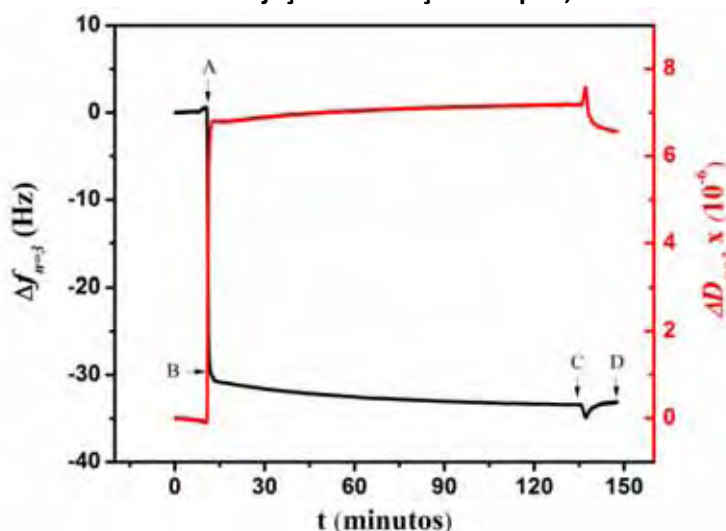


Fonte: Autor.

Do tempo igual a zero à seta em A corresponde ao período de estabilização da frequência de oscilação do cristal e do parâmetro D , por meio da injeção de solução tampão Tris-HCl (pH 8,0) a um fluxo de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. Ao injetar solução de rTgMIC1 sobre o cristal funcionalizado com a SAM (seta em A) ocorre um rápido decréscimo de Δf e aumento em ΔD . O decréscimo nos valores de Δf sugere que ocorre adsorção da proteína sobre o cristal, enquanto o aumento de ΔD está associado ao aumento das perdas energéticas do sistema oscilatório. Após preencher totalmente a célula com solução de rTgMIC1, momento em que é desligado o fluxo (seta em B), Δf continua decaindo, embora com cinética diferenciada (e mais lenta) que da etapa anterior. ΔD segue um comportamento semelhante a $-\Delta f$. Como ocorre decréscimo de Δf nesta etapa, é possível afirmar que o processo de adsorção continua, embora com cinética mais lenta. Após iniciar o fluxo de tampão Tris-HCl (pH 8,0), ocorre um aumento de Δf e decréscimo de ΔD até alcançar os valores finais de $-\Delta f_{\text{final}} = 5,8 \text{ Hz}$ e $\Delta D_{\text{final}} = 7 \times 10^{-7}$. Devido ao aumento de Δf e diminuição de ΔD logo após o início do processo de lavagem (seta em C), é possível inferir que moléculas não adsorvidas de proteína, possivelmente interagindo com a superfície do cristal por meio de interações não específicas, foram removidas da superfície do sensor devido ao arraste do fluxo de tampão. Os ensaios foram realizados em triplicata, tendo como resultados $-\Delta f_{\text{final}} = 5,8 \pm 0,2 \text{ Hz}$ e $\Delta D_{\text{final}} = (6,9 \pm 0,3) \times 10^{-7}$. A relação $-\Delta D/\Delta f$ igual $\approx 1,1 \times 10^{-7} \text{ Hz}$ evidencia a formação de camada rígida.⁷⁰

Para bloquear os possíveis sítios não ocupados pela rTgMIC1, tais como grupos carboxílicos e éster-NHS, foi utilizado solução de gelatina 0,1% em tampão Tris-HCl (pH 8,0). O processo de bloqueio foi acompanhado pela técnica de QCM-D (Figura 25).

Figura 25 - Injeção de solução de gelatina 0,1% em tampão Tris-HCl (pH 8,0) sobre cristal funcionalizado com rTgMIC1. A seta em A mostra a injeção de solução de gelatina, sendo interrompido em B. Em C é reiniciada a injeção de solução tampão, finalizando em D



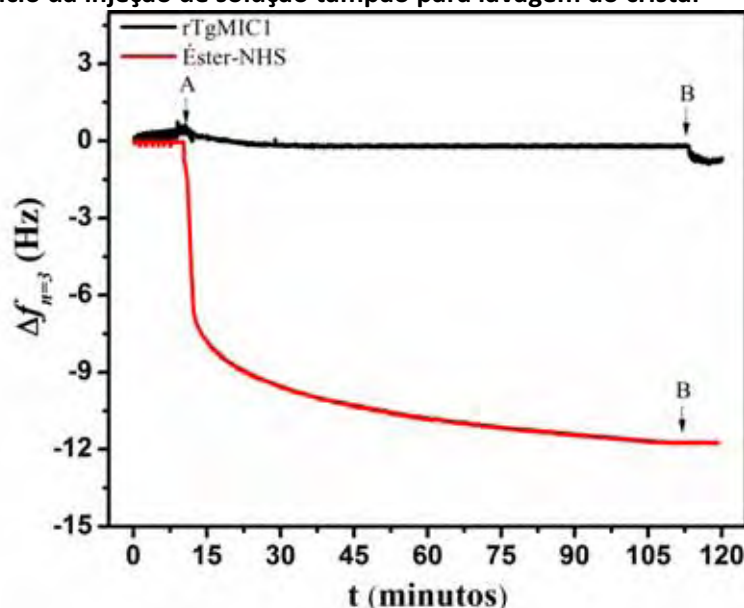
Fonte: Autor.

Ao injetar a solução de gelatina 0,1% sobre o cristal de quartzo funcionalizado com rTgMIC1 (Seta em A da Figura 25), é possível observar rápido decaimento de Δf , evidenciando adsorção de gelatina sobre a superfície do cristal. Após 2h (tempo determinado ao bloqueio), o fluxo de tampão é ligado para a remoção de possíveis moléculas de gelatina não adsorvidas na superfície do sensor. O parâmetro D acompanha uma tendência similar a $-\Delta f$ durante todo o processo. Os ensaios foram realizados em triplicata e os valores experimentais encontrados foram $-\Delta f_{\text{final}} = 33,3 \pm 2,5$ Hz e $\Delta D_{\text{final}} = (6,7 \pm 0,9) \times 10^{-6}$.

Importante notar que, como ocorreu adsorção de gelatina sobre a superfície do cristal funcionalizado com rTgMIC1, pode-se concluir que a lectina não ocupou todos os sítios do sensor no seu processo de imobilização. Esses sítios, entretanto, foram bloqueados pela gelatina.

Após a etapa do bloqueio, foi injetada solução de BSA (0,1 mg/mL) em tampão Tris-HCl (pH 8,0) para verificar a possível existência de sítios ainda não ocupados pela rTgMIC1 e gelatina. Como teste comparativo, BSA foi imobilizado diretamente sobre o cristal ativado com EDC/NHS (Figura 26).

Figura 26 - Adição de solução de BSA em tampão Tris-HCl (pH 8,0) sobre cristal funcionalizado com rTgMIC1 (-) e com éster-NHS (-). A seta em A mostra o início da injeção da solução de BSA, enquanto em B o início da injeção de solução tampão para lavagem do cristal



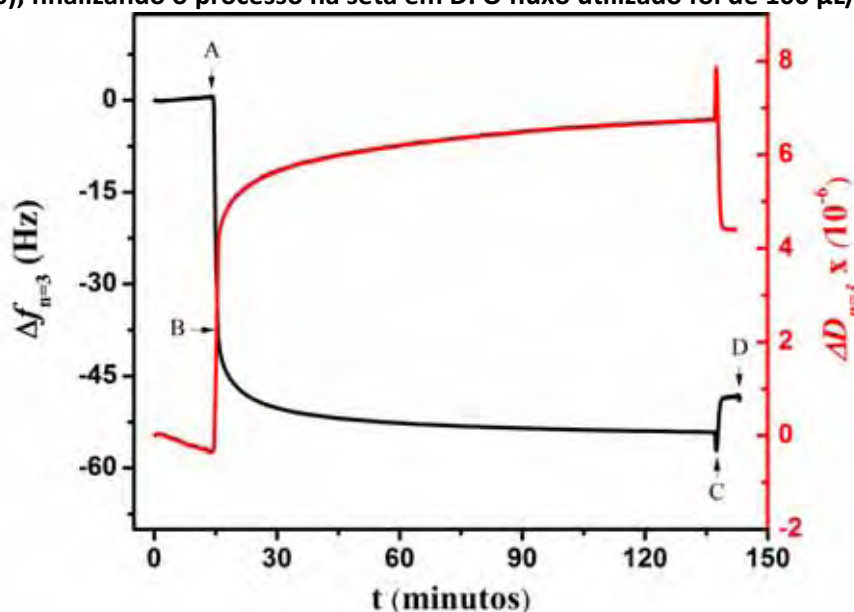
Fonte: Autor.

Se houvessem sítios disponíveis sobre o sensor funcionalizado com rTgMIC1, tais como grupos carboxílicos e ésteres-NHS disponíveis à interação de BSA, seria esperado verificar variação negativa da frequência de oscilação do cristal ao injetar solução de BSA sobre o transdutor. Como pode ser observado na Figura 26, ao injetar solução desta proteína sobre a superfície do cristal contendo grupos ésteres-NHS, ocorre decaimento da frequência mesmo após a lavagem do cristal com tampão, indicada pela seta em B, obtendo valores em triplicata de $-\Delta f_{\text{final}} = 9,0 \pm 2,1$ Hz. Esse decaimento está relacionado com a adsorção de BSA sobre o sensor, e demonstra que BSA se liga nessa superfície funcionalizada. Entretanto, ao injetar solução de BSA sobre cristal funcionalizado com rTgMIC1, não ocorre alteração de Δf durante todo o processo. Desta forma, como não houve alteração da variação de frequência, não houve adsorção e, portanto, não há indícios de sítios de interação no sensor para BSA, bem como para a presença de ésteres-NHS e/ou grupos carboxílicos remanescentes.

5.3.2 Imobilização da rTgMIC4

Para verificar a adsorção da proteína rTgMIC4 sobre o eletrodo de ouro funcionalizado com SAM e ativado com solução de EDC e NHS, a imobilização dessa proteína foi acompanhada pela técnica de QCM-D (Figura 27).

Figura 27 - Processo de adsorção da proteína rTgMIC4 sobre eletrodo de ouro funcionalizado com SAM e ativado com solução de EDC e NHS. A seta em A indica o início do processo de injeção da solução de rTgMIC4, sendo finalizada em B. A seta em C mostra o início da injeção de tampão Tris-HCl (pH 8,0), finalizando o processo na seta em D. O fluxo utilizado foi de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$



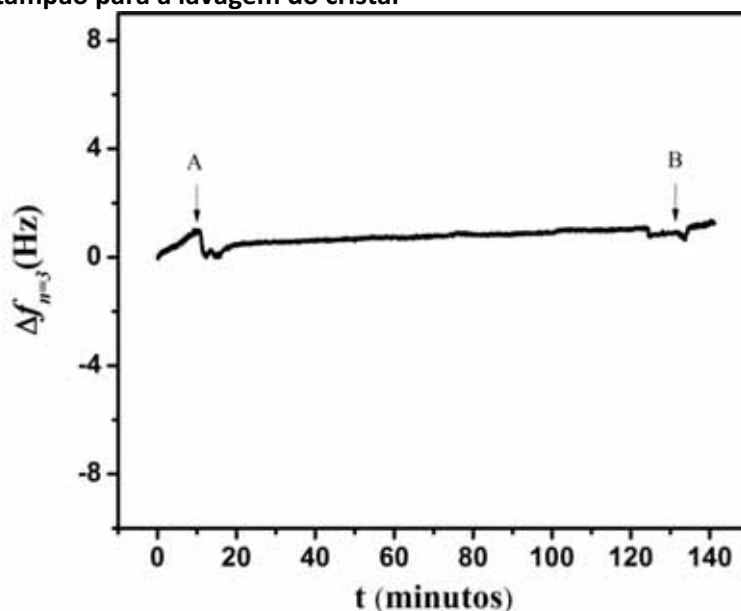
Fonte: Autor.

Do tempo igual a zero até o instante indicado pela seta em A na Figura 27 corresponde ao período de estabilização da frequência de oscilação do cristal de quartzo e do parâmetro D , injetando solução tampão Tris-HCl (pH 8,0) a um fluxo constante de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. Quando é iniciada a injeção de solução de rTgMIC4 (seta em A), ocorre rápido decréscimo de Δf seguido de rápido aumento de ΔD . Após a interrupção do fluxo de solução de proteína (Seta em B), Δf continua decaindo lentamente, e ΔD acompanha com uma cinética parecida à $-\Delta f$. Após o período de imobilização da proteína de duas horas, o fluxo de solução tampão é reiniciado objetivando retirar moléculas de proteína adsorvidas fisicamente sobre o cristal de quartzo, ocorrendo pequena variação positiva de Δf e negativa de ΔD , alcançando os valores finais $-\Delta f_{\text{final}} = 48,5 \text{ Hz}$ e $\Delta D_{\text{final}} = 4,4 \times 10^{-6}$. Os ensaios foram realizados em triplicata, tendo como resultados $-\Delta f_{\text{final}} = 48,5 \pm 3,2 \text{ Hz}$ e $\Delta D_{\text{final}} = (5,2 \pm 0,9) \times 10^{-6}$. A variação negativa de Δf_{final} e a relação $-\Delta D/\Delta f$ de $\approx 1 \times 10^{-7} \text{ Hz}^{-1}$ indica que ocorreu a adsorção da proteína rTgMIC4 sobre o sensor, formando camada rígida.⁷⁰

Após a imobilização da rTgMIC4, foi realizada a etapa de bloqueio utilizando solução de gelatina 0,1% em tampão Tris-HCl (pH 8,0). O processo foi analisado por QCM, sem apresentar alterações nos valores de Δf após a injeção da solução de gelatina e durante todo

o processo em que ela ficou em contato com o cristal (Figura 28), evidenciando que moléculas da rTgMIC4 ocuparam todos os sítios disponíveis sobre o cristal de quartzo.

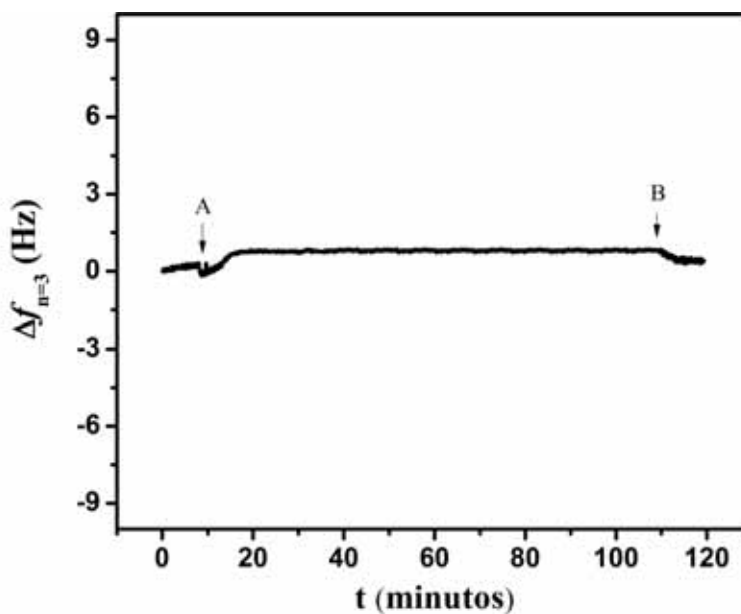
Figura 28 - Injeção de solução de gelatina 0,1% em tampão Tris-HCl (pH 8,0) sobre cristal funcionalizado com rTgMIC4. A seta em A mostra a injeção de solução de gelatina, enquanto a B a injeção de solução tampão para a lavagem do cristal



Fonte: Autor.

Como forma de verificar a inexistência de sítios livres remanescentes, solução de BSA (0,1 mg/mL) foi injetada sobre o cristal funcionalizado com rTgMIC4 (Figura 29).

Figura 29 - Processo de injeção de solução de BSA sobre cristal de quartzo funcionalizado com rTgMIC4. A seta em A indica a injeção de BSA, enquanto a B mostra o início do processo de lavagem do cristal



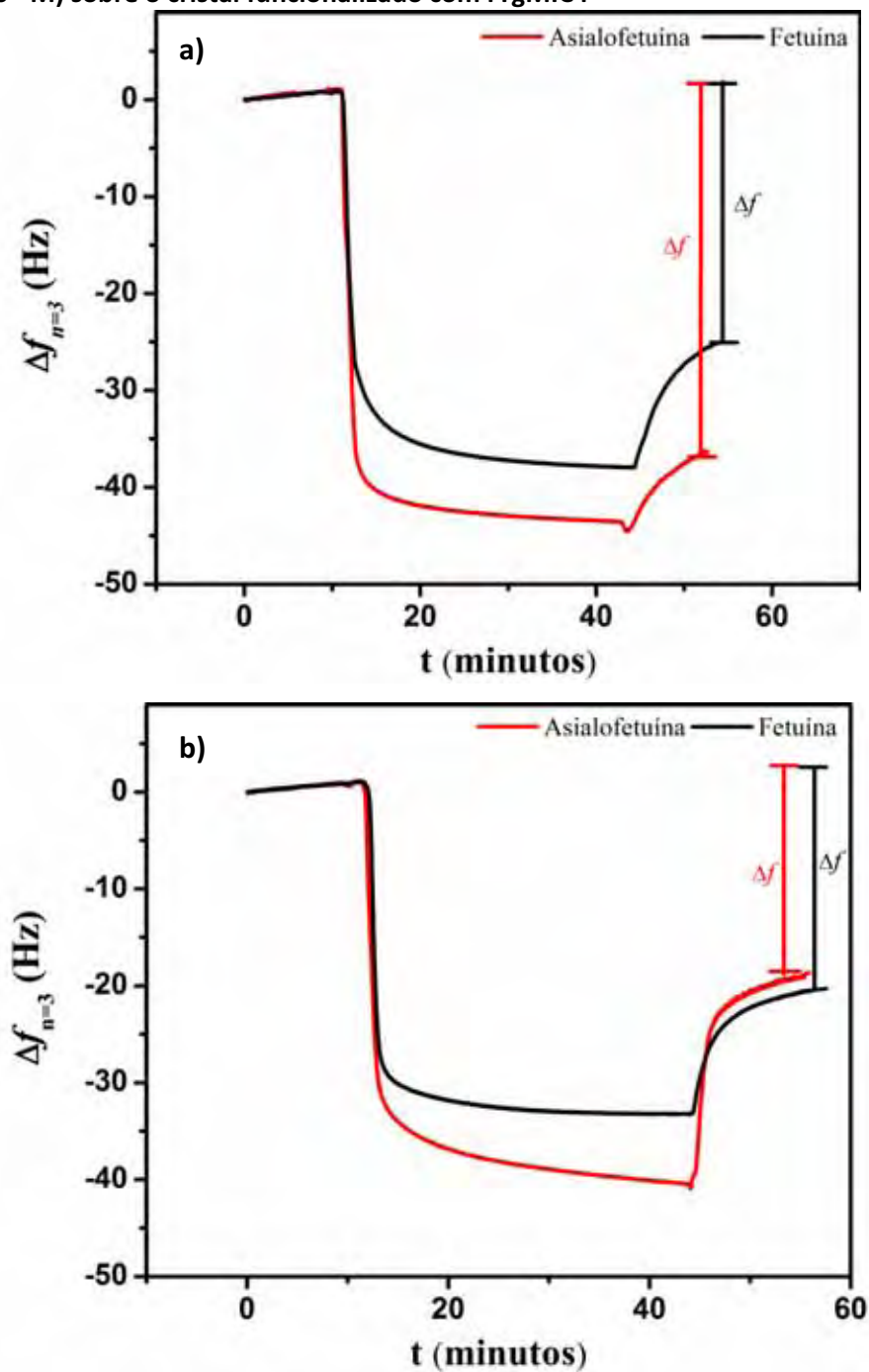
Fonte: Autor.

De forma análoga ao processo estudado para a rTgMIC1, não há evidências por QCM de sítios disponíveis para a imobilização de BSA sobre o cristal, ou seja, a rTgMIC4 ocupou todos os sítios durante o processo de funcionalização.

5.4 Estudo da Interação das rTgMICs com fetuína e asialofetuína

Após a funcionalização dos cristais de quartzo com uma das rTgMICs, eles foram montados na célula da QCM. Para a estabilização da frequência, foi utilizado fluxo contínuo (100 $\mu\text{L}/\text{min}$) de solução tampão Tris-HCl (pH 8,0). O estudo da interação rTgMIC-glicoproteína em tempo real foi realizado utilizando técnica de QCM por meio da adição de concentrações crescentes de glicoproteínas sobre transdutores diferentes previamente funcionalizados com uma das proteínas em estudo. Exemplo de resposta da frequência em função do tempo para a adição das glicoproteínas em diferentes sensores é mostrada na Figura 30. Inicialmente, quando a solução de glicoproteína é injetada sobre o biossensor, ocorre um rápido decaimento da frequência, indicando que a glicoproteína está ligando sobre a rTgMIC imobilizada. Ao injetar solução tampão, a variação de frequência aumenta, e a diferença entre a estabilização e o valor final de frequência corresponde a Δf associado, basicamente, à interação entre as proteínas (massa adsorvida).

Figura 30 – (a) Interação das glicoproteínas asialofetuína ($5,2 \times 10^{-5}$ M) e fetuína ($7,4 \times 10^{-5}$ M) sobre o cristal funcionalizado com rTgMIC1. (b) Interação das glicoproteínas asialofetuína ($4,1 \times 10^{-4}$ M) e fetuína ($1,5 \times 10^{-4}$ M) sobre o cristal funcionalizado com rTgMIC4

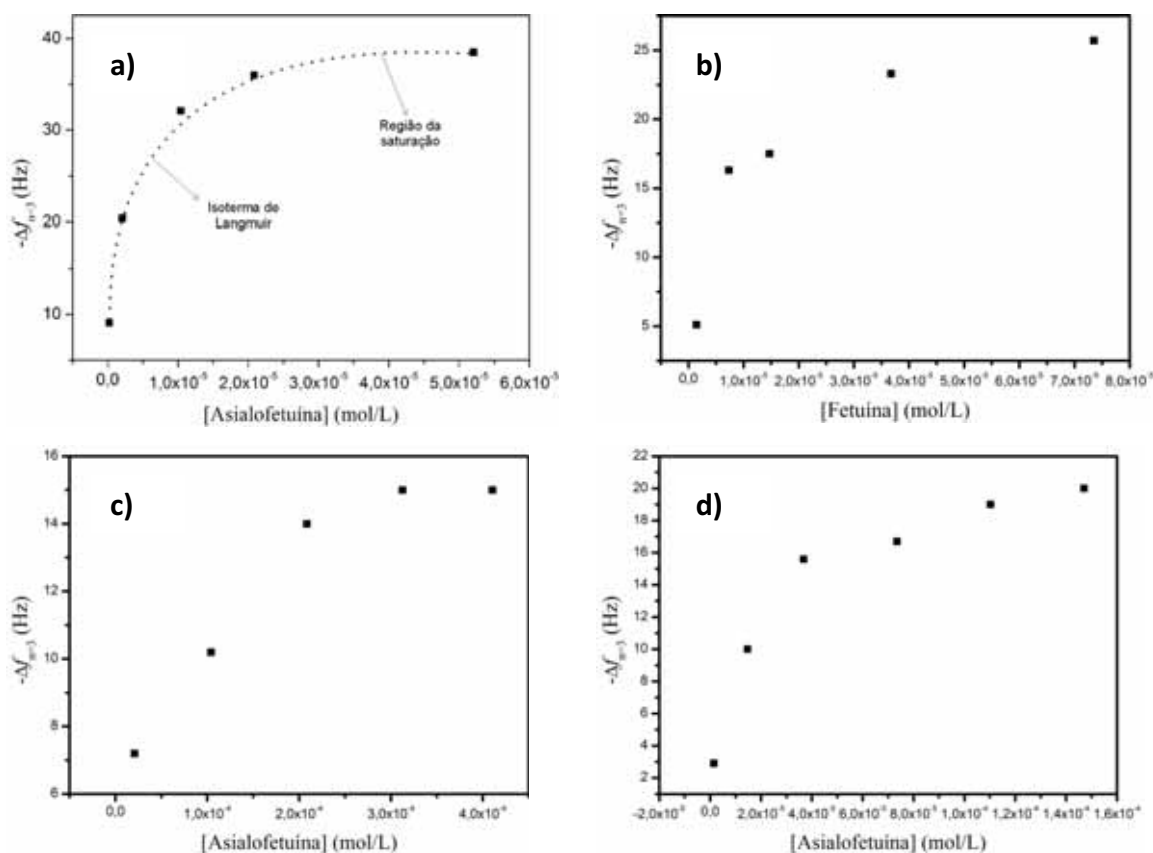


Fonte: Autor.

Por meio da adição de concentrações crescentes de glicoproteína sobre diferentes sensores modificados com uma das rTgMICs, é possível construir a curva de saturação, e por meio dela, aplicar o modelo da Isoterma de Langmuir.¹²

Como exemplo, na Figura 31a é mostrado a curva de saturação obtida para o sistema rTgMIC1-Asialofetuína, sendo que Δf está representado pelo valor médio.

Figura 31 – (a) Exemplo de curva de saturação. Isoterma de Langmuir obtida para o sistema rTgMIC1-Asialofetuína. Curvas de saturação obtidas para as interações (b) rTgMIC1-Fetuína, (c) rTgMIC4-Asialofetuína e (d) rTgMIC4-Fetuína

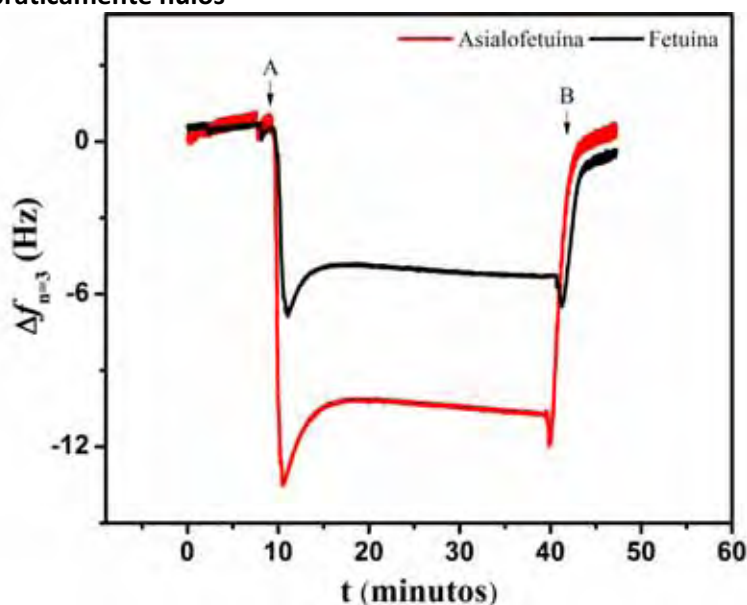


Fonte: Autor.

5.5 Avaliação da especificidade

Com o intuito de verificar a especificidade de interação das rTgMICs com a fetuína e asialofetuína, foi realizado teste negativo utilizando BSA. Primeiramente, BSA foi imobilizada no transdutor ao invés da rTgMIC1 ou rTgMIC4. Soluções de fetuína e asialofetuína foram injetadas sobre esses sensores funcionalizados com BSA nas concentrações de saturação previamente estabelecida, de 0,15 mM de fetuína e 0,41 mM de asialofetuína. Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo que, praticamente, não há ocorrência de interação entre as glicoproteínas e BSA, visto que os valores de variação de frequência encontrados são de $\Delta f_{final} = 1,2 \pm 0,6$ Hz e $\Delta f_{final} = 2,0 \pm 1,0$ Hz para asialofetuína e fetuína, respectivamente. A fraca interação entre BSA com as glicoproteínas estudadas ocorre devido à ausência de um CRD em sua estrutura.⁷² Como exemplo, uma das medidas realizadas para as duas glicoproteínas são mostradas na Figura 32.

Figura 32 - Adição de solução de glicoproteína nas concentrações de saturação sobre cristal de quartzo funcionalizado com BSA. A seta em A indica a injeção de solução de glicoproteína, enquanto em B o início da injeção de solução tampão. Perceba que Δf_{final} para as duas glicoproteínas são praticamente nulos



Fonte: Autor.

5.6 Determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos da interação entre as rTgMICs com as glicoproteínas fetúina e asialofetúina por meio do modelo da Isoterma de Langmuir

Um modelo simples que descreve o processo de adsorção de proteínas considera que (i) a espécie adsorvedora é rígida, (ii) capaz de ligar-se reversivelmente, ou seja, processo dinâmico em que a dessorção e adsorção ocorrem, (iii) os sítios de adsorção apresentam o mesmo valor energético, independentemente do número de sítios ocupados, e, por consequência, (iv) uma espécie adsorvida não interage com a outra, isto é, não há interação entre moléculas adsorvidas em sítios vizinhos. Por meio desse modelo, conhecido como isoterma de Langmuir, atualmente aplicado no estudo de interação lectina-glicoproteína, ^{6,12,13,72,73} é possível estimar a constante de afinidade (K_a) diretamente pela quantidade de moléculas de proteína adsorvida numa dada concentração ou pela taxa de adsorção em função da concentração.^{12,13,34}

É possível desenvolver um biossensor que satisfaça os critérios (i)-(iv) acima descritos por meio da funcionalização do transdutor piezelétrico com monocamada automontada

mista,¹² que consiste, por exemplo, na mistura de 11-MUA e C6OH em proporções diferentes. A molécula de 11-MUA foi utilizada para que ocorra a imobilização da rTgMIC por meio de ligação química.^{12,33} Desta forma, C6OH é utilizado como espaçador entre as moléculas de 11-MUA, garantindo menor impedimento estérico entre as moléculas de lectina imobilizada.^{15,33} O espaçamento entre as moléculas de determinada rTgMIC favorece minimização do impedimento estérico entre moléculas de glicoproteínas adsorvidas sobre a rTgMIC, tornando possível a existência de energias de adsorção similares para os diferentes sítios não ocupados.¹² Importante mencionar que, embora os critérios acima possam ser relevantes na validade do modelo, trabalhos publicados na literatura que não utilizam a mistura de tióis apresentam resultados experimentais em boa concordância com o modelo previamente descrito.^{6,13} Detalhes do modelo e as deduções das equações, bem como o procedimento para a determinação dos parâmetros cinéticos e de afinidade foram baseados nos trabalhos de Pesquero^{12,72} e são mostrados a seguir.

A avaliação das interações de reconhecimento biológico por meio da técnica de microbalança a cristal de quartzo envolve, necessariamente, a imobilização de uma das moléculas biológicas. A imobilização da lectina, neste caso uma das rTgMICs, na superfície de um transdutor simplifica a análise cinética, pois desta forma o efeito do transporte de massa pode ser desprezado e um modelo simples de interação monomolecular pode ser aplicado.⁷² A reação de interação entre receptor imobilizado na superfície do transdutor (lectina) e seu ligante (glicoproteína), sendo um sistema binário de interação pode ser descrita pela Equação 8:^{74,75}



Onde $[R]_i$ corresponde à concentração do receptor imobilizado na superfície do transdutor (lectina) e $[L]_l$ a concentração de ligante em solução (glicoproteína). Os parâmetros k_1 e k_{-1} são, respectivamente, as constantes de velocidade de formação e dissociação do complexo receptor-ligante, $[R-L]$. As velocidades de formação e dissociação do complexo receptor-ligante r_+ e r_- são definidas pelas Equações 9 e 10.

$$r_+ = \frac{d[R-L]}{dt} = k_1 \theta_1 [L] \quad (9)$$

$$r_- = -\frac{d[R-L]}{dt} = k_{-1}\theta_2 \quad (10)$$

Onde θ_1 e θ_2 correspondem à porcentagem de sítios ligantes livres (lectina imobilizada sem a presença de interação específica com a glicoproteína) e de glicoproteína adsorvida sobre o receptor na superfície do sensor em um tempo t , respectivamente. $[L]$ é a concentração de glicoproteína em solução.

No equilíbrio, as velocidades de formação e dissociação do complexo receptor-ligante são iguais, $r_+ = r_- = r_e$, sendo r_e descrito pela Equação 11.

$$r_e = k_1\theta_{1,e}[L]_e = k_{-1}\theta_{2,e} \quad (11)$$

Onde o subscrito e corresponde às quantidades no equilíbrio. As constantes de associação, K_A , e dissociação, K_D , são descritas pelas Equações 12 e 13.^{74,75}

$$K_A = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{\theta_2}{\theta_1[L]} \quad (12)$$

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{\theta_1[L]}{\theta_2} \quad (13)$$

Definindo-se uma variável de relaxação do sistema em equilíbrio como δ , e sendo esta descrita pela Equação 14.

$$\delta = \theta_1 - \theta_{1,e} = [L] - [L]_e = \theta_{2,e} - \theta_2 \quad (14)$$

Um desvio do equilíbrio corresponde à derivada da velocidade da reação, sendo descrito pela Equação 15.

$$-\frac{d\delta}{dt} = k_1(\theta_{1,e} + \delta)([L]_e + \delta) - k_{-1}(\theta_{2,e} - \delta) \quad (15)$$

O termo δ^2 , que surge da Equação 15, pode ser desprezado uma vez que δ corresponde, frequentemente, a um termo muito pequeno. Sendo assim, a Equação 15 pode ser simplificada como demonstrado na Equação 16.⁷⁵

$$-\frac{d\delta}{dt} = \left(\frac{1}{\tau}\right)\delta \quad (16)$$

Onde o termo $(1/\tau)$ corresponde à constante descrita na Equação 17.

$$\frac{1}{\tau} = r_e \left(\frac{1}{\theta_{1,e}} + \frac{1}{[L]_e} + \frac{1}{\theta_{2,e}} \right) \quad (17)$$

Esta constante corresponde à constante de relaxação da velocidade da reação, e o termo τ é conhecido como o tempo de relaxação da reação. Combinando as soluções das Equações 14 e 16 é possível obter a percentagem máxima de sítios ativos ligados à molécula de ligante, $\theta_{2,e}$, que é descrita pela Equação 18.^{13,75}

$$\theta_2 = \theta_{2,e} \left(1 - e^{-(1/\tau)t} \right) \quad (18)$$

Um aumento em θ_2 corresponde a um aumento de massa na superfície do sensor, sendo assim o valor de θ_2 é proporcional a um aumento de massa Δm . Portanto, a variação de massa pode ser descrita pela Equação 19.^{13,75}

$$\Delta m_t = \Delta m_{máx} \left(1 - e^{-(1/\tau)t} \right) \quad (19)$$

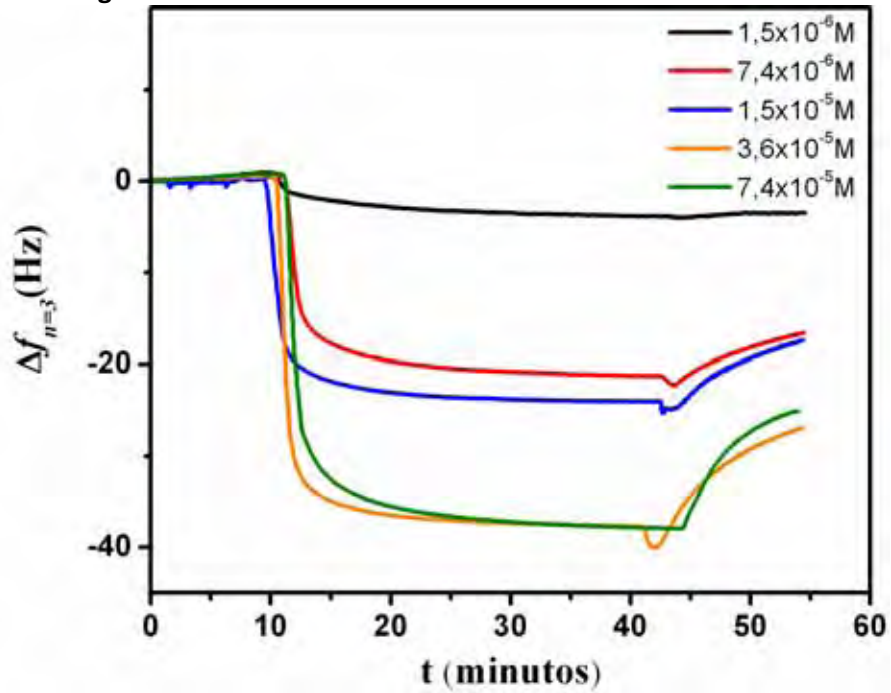
Onde Δm_t e $\Delta m_{máx}$ correspondem à variação de massa em um tempo t e no tempo $t \rightarrow \infty$ (no equilíbrio), respectivamente. Variação negativa da frequência de oscilação do cristal de quartzo pode ser relacionada a um aumento de massa na superfície do sensor, resultante da ligação entre o receptor e o ligante. Portanto, a variação de massa sobre o sensor pode ser relacionada à variação de oscilação do cristal de quartzo devido à adsorção, Equação 20.^{13,75}

$$\Delta f_t = \Delta f_{\max} \left(1 - e^{-(1/\tau)t}\right) \quad (20)$$

A relação expressa pela Equação 20 é utilizada para a determinação, em dois passos, dos parâmetros cinéticos que descrevem o processo de interação lectina-glicoproteína. Primeiramente, é necessário obter os valores da variação da frequência normalizados (Δf) em função do tempo para diferentes concentrações de ligante em contato com diferentes cristais de quartzo funcionalizados com a lectina em estudo. Então, a partir do ajuste realizado nos gráficos $\Delta f(t)$ utilizando a Equação 20 na região da curva situada entre a injeção da solução de glicoproteína até o momento da lavagem do cristal,¹² são obtidos os tempos de relaxação (τ), correspondentes a cada concentração de ligante adicionada. Cada concentração de ligante é adicionada a um cristal de quartzo funcionalizado com a molécula receptora.

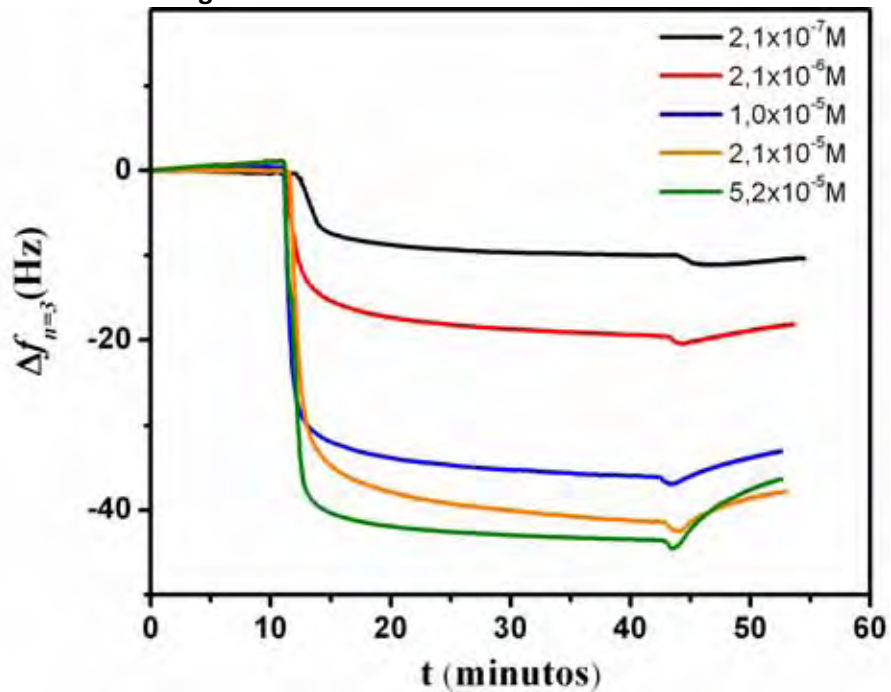
Para a determinação das constantes cinéticas de associação (k_1) e de dissociação (k_{-1}), portanto, foram realizadas adições de solução de diferentes concentrações de glicoproteína sobre distintos sensores funcionalizados com cada rTgMIC. Cada ensaio foi realizado em triplicata e, para cada adição, foi obtido os valores de Δf (Hz) em função do tempo. Desta forma, na Figura 33 é mostrada a variação de Δf em função do tempo obtida no processo de adsorção de solução de diferentes concentrações de fetuína sobre sensor funcionalizado com rTgMIC1, enquanto na Figura 34 o processo de interação rTgMIC1-Asialofetuína. Na Figura 35 é mostrada a variação de Δf em função do tempo obtida no processo de adsorção de solução de diferentes concentrações de fetuína sobre sensor funcionalizado com rTgMIC4, enquanto na Figura 36 o processo rTgMIC4-Asialofetuína.

Figura 33 - Adições de solução de fetuína em diferentes concentrações sobre o cristal de quartzo funcionalizado com rTgMIC1



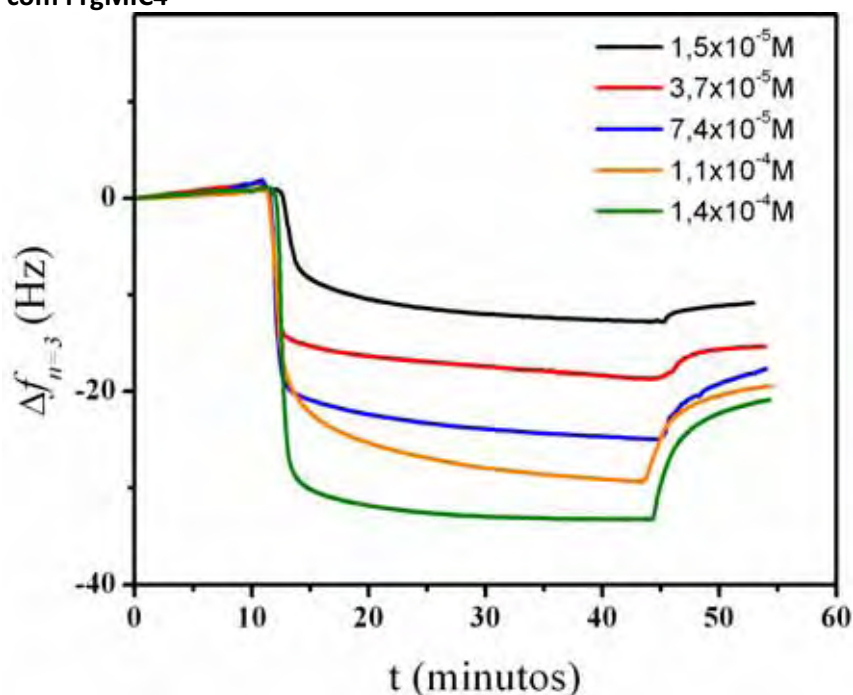
Fonte: Autor.

Figura 34 - Adições de solução de asialofetuína em diferentes concentrações sobre o cristal de quartzo funcionalizado com rTgMIC1



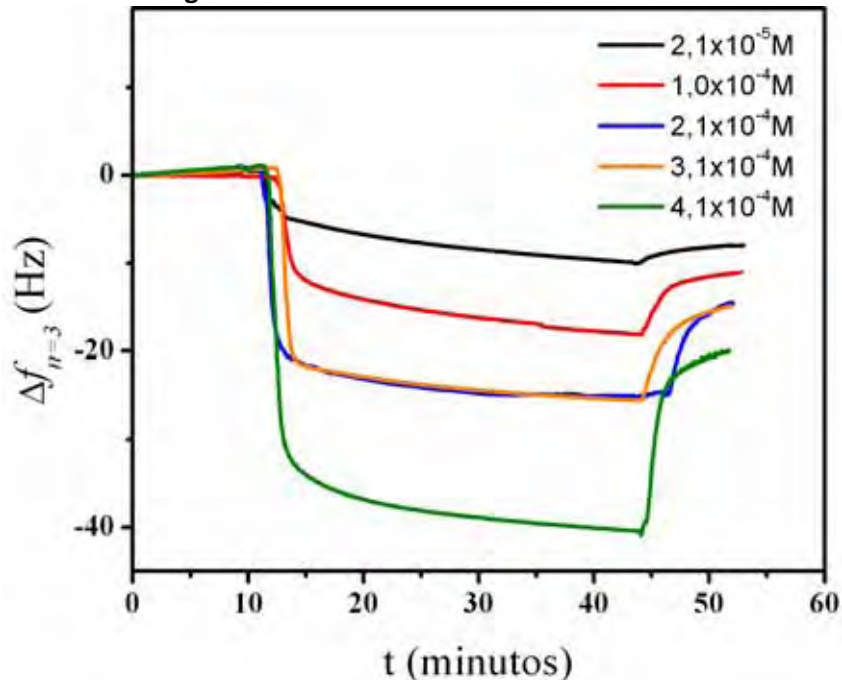
Fonte: Autor.

Figura 35 - Adições de solução de fetuína em diferentes concentrações sobre o cristal de quartzo funcionalizado com rTgMIC4



Fonte: Autor.

Figura 36 - Adições de solução de asialofetuína em diferentes concentrações sobre o cristal de quartzo funcionalizado com rTgMIC4

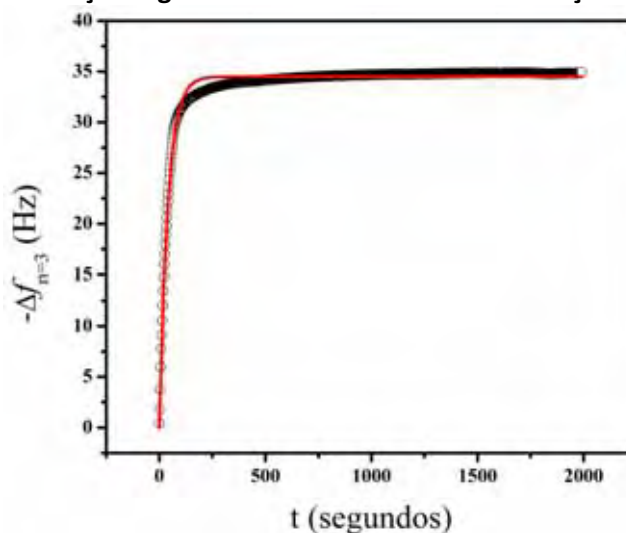


Fonte: Autor.

Conforme discutido anteriormente, para a obtenção dos valores da constante de relaxação (τ^{-1}) em função da concentração de glicoproteína utilizada, a região situada entre a adição de solução de glicoproteína e a injeção de tampão para remoção de moléculas não

adsorvidas especificamente no sensor foi ajustada com a Equação 20. Exemplo de ajuste pode ser visualizado na Figura 37. Na Tabela 3, são mostrados os valores da constante de relaxação em função da concentração de glicoproteína obtidos para o processo de interação com a rTgMIC1, enquanto na Tabela 4 são mostrados os resultados utilizando a rTgMIC4.

Figura 37 - Exemplo de ajuste da curva $\Delta f \times t$ utilizando a Equação 20 (curva em vermelho) sobre os dados experimentais da interação rTgMIC1-Asialofetuína na concentração de 52,1 μM ($R^2 = 98\%$)



Fonte: Autor.

Tabela 3 - Resultados da constante de relaxação (τ^{-1}) para as interações rTgMIC1-Asialofetuína e rTgMIC1-Fetuína obtidos por meio do ajuste das curvas $\Delta f(t)$ utilizando a Equação 20, para diferentes concentrações de glicoproteína

Glicoproteína	[Glicoproteína] / M	$\tau^{-1} (\times 10^{-3}) / \text{s}^{-1}$
Asialofetuína	$2,1 \times 10^{-7}$	8 ± 2
	$2,1 \times 10^{-6}$	9 ± 1
	$1,0 \times 10^{-5}$	13 ± 2
	$2,1 \times 10^{-5}$	17 ± 3
	$5,2 \times 10^{-5}$	23 ± 3
Fetuína	$1,5 \times 10^{-6}$	5 ± 1
	$7,4 \times 10^{-6}$	9 ± 1
	$1,5 \times 10^{-5}$	10 ± 1
	$3,6 \times 10^{-5}$	13 ± 1
	$7,4 \times 10^{-5}$	21 ± 2

Fonte: Autor.

Tabela 4 - Resultados da constante de relaxação (τ^{-1}) para as interações rTgMIC4-Asialofetuína e rTgMIC4-Fetuína obtidos por meio do ajuste das curvas $\Delta f(t)$ utilizando a Equação 20, para diferentes concentrações de glicoproteína

Glicoproteína	[Glicoproteína] /M	$\tau^{-1} (\times 10^{-3}) / s^{-1}$
Asialofetuína	$2,1 \times 10^{-5}$	4 ± 2
	$1,0 \times 10^{-4}$	8 ± 2
	$2,1 \times 10^{-4}$	11 ± 1
	$3,1 \times 10^{-4}$	18 ± 2
	$4,1 \times 10^{-4}$	20 ± 1
Fetuína	$1,5 \times 10^{-5}$	7 ± 1
	$3,7 \times 10^{-5}$	9 ± 2
	$7,4 \times 10^{-5}$	12 ± 1
	$1,1 \times 10^{-4}$	17 ± 1
	$1,5 \times 10^{-4}$	20 ± 1

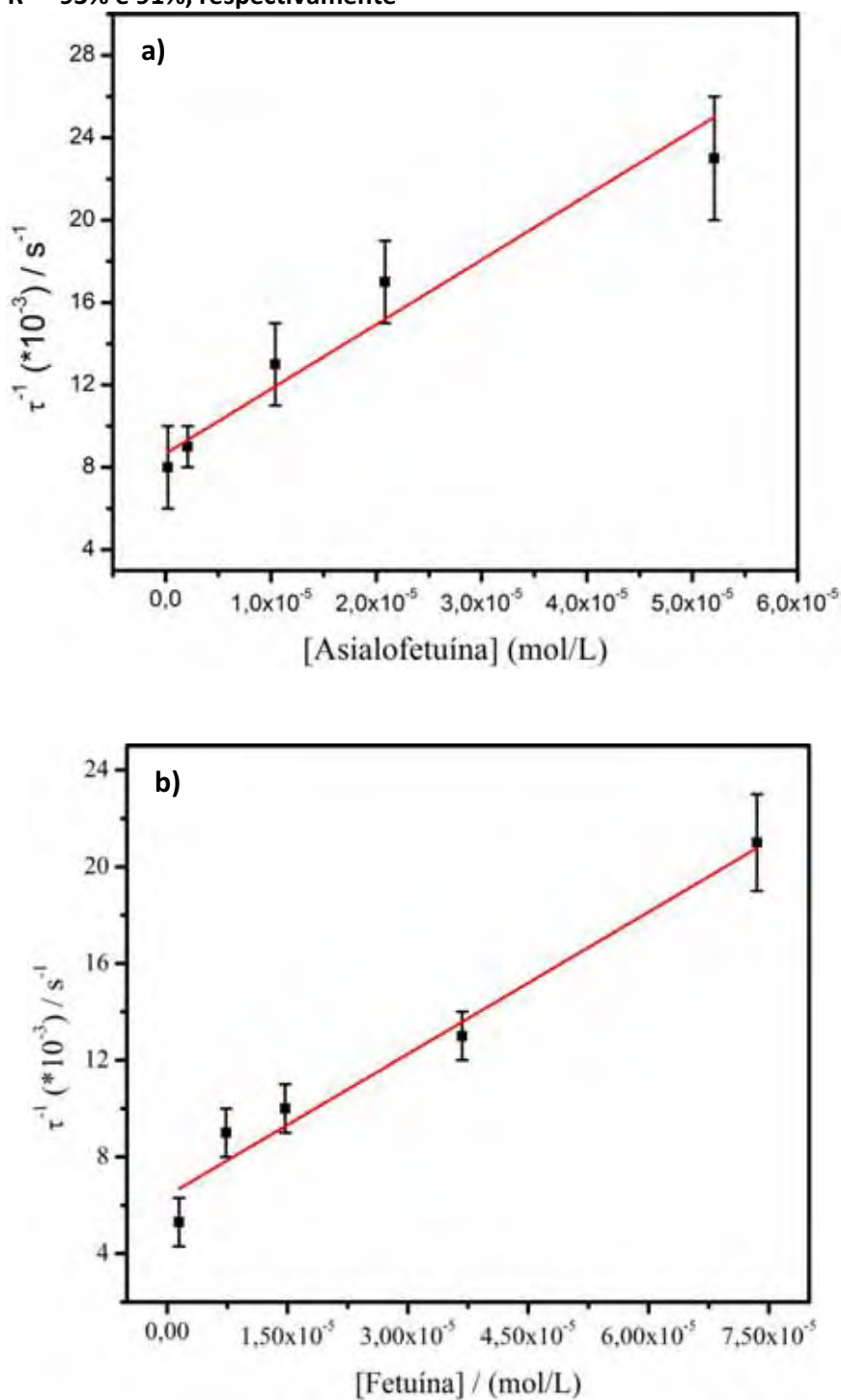
Fonte: Autor.

Em um segundo passo, a constante de relaxação (τ^{-1}) é esboçada em função da concentração de ligante adicionado a cada um dos cristais contendo a lectina imobilizada. Por meio dessa curva é possível determinar a constante de associação cinética da interação, pois o tempo de relaxação está relacionado com a concentração inicial do ligante pela Equação 21.^{13,75}

$$\tau^{-1} = k_1[C] + k_{-1} \quad (21)$$

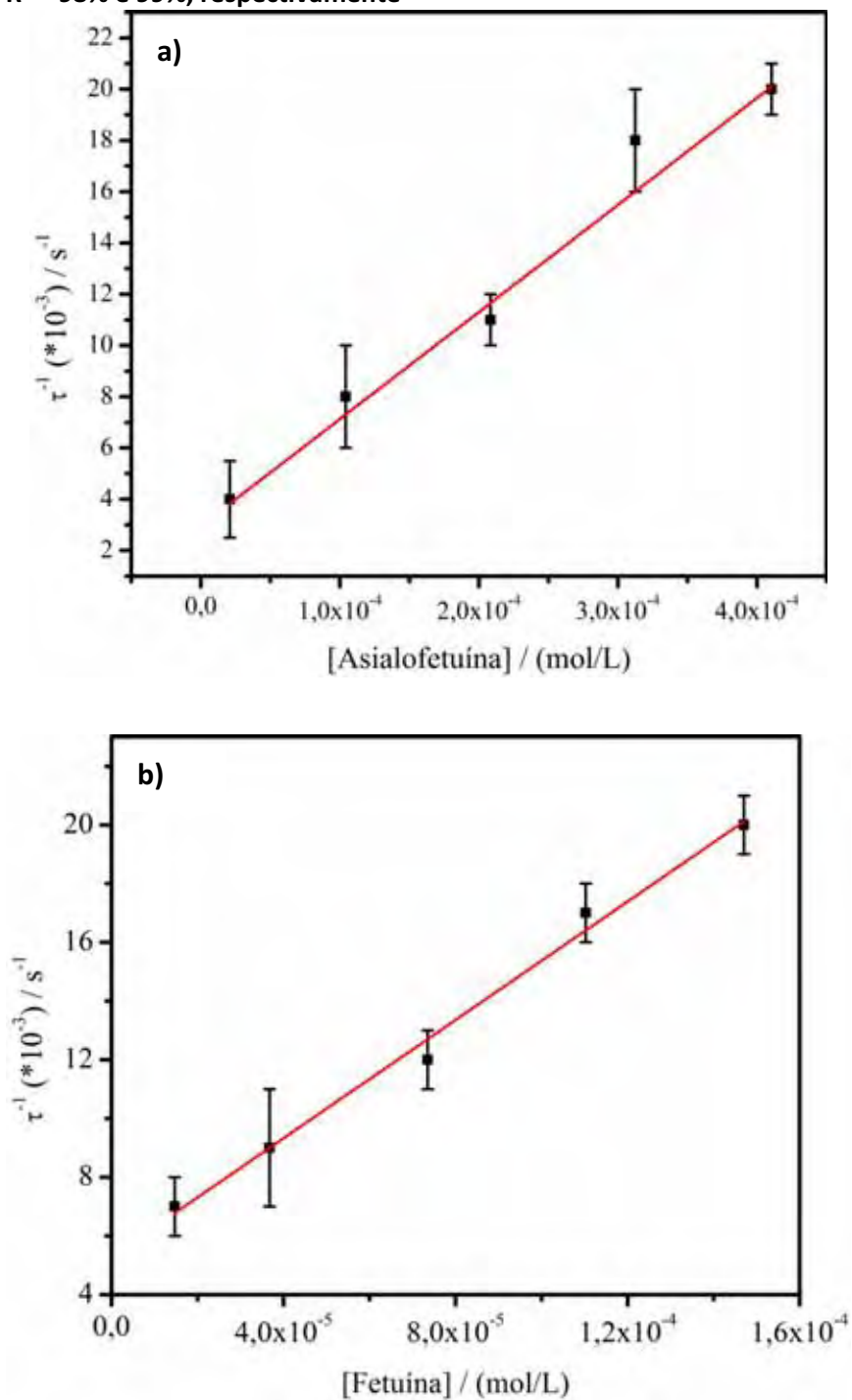
Nas Figuras 38 e 39 são mostradas as curvas de $\tau^{-1} \times [\text{glicoproteína}]$ para as interações rTgMIC1-glicoproteína e rTgMIC4-glicoproteína, respectivamente.

Figura 38 - Constante de relaxação (τ^{-1}) em função da concentração obtido para o processo de interação entre rTgMIC1 com (a) asialofetuína e (b) fetuína. As regressões lineares estão mostradas em vermelho. $R^2 = 93\%$ e 91% , respectivamente



Fonte: Autor.

Figura 39 - Constante de relaxação (τ^{-1}) em função da concentração obtido para o processo de interação entre rTgMIC4 com (a) asialofetuína e (b) fetuína. As regressões lineares estão mostradas em vermelho. $R^2 = 98\%$ e 99% , respectivamente



Fonte: Autor.

A constante de associação cinética da interação receptor-ligante é dada pela Equação 22.^{12,13,75}

$$K_a = \frac{k_1}{k_{-1}} \quad (22)$$

Por meio de K_a , é possível estimar a energia livre do processo (Equação 23).

$$\Delta G_{afinidade} = -RT \ln K_a \quad (23)$$

Os resultados são resumidos na Tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros cinéticos e termodinâmicos das interações entre rTgMIC1 e rTgMIC4 com as diferentes glicoproteínas

Interação		$k_1 / \text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$	k_{-1} / s^{-1}	$K_a / \text{L mol}^{-1}$	$-\Delta G_{afin} / \text{kJ mol}^{-1}$
rTgMIC4	Asialofetuína	42 ± 4	$(3,0 \pm 1,0) \times 10^{-3}$	$(1,4 \pm 0,6) \times 10^4$	23 ± 1
	Fetuína	100 ± 9	$(5,2 \pm 0,9) \times 10^{-3}$	$(1,9 \pm 0,5) \times 10^4$	24 ± 1
rTgMIC1	Asialofetuína	313 ± 43	$(8,6 \pm 0,6) \times 10^{-3}$	$(3,6 \pm 0,7) \times 10^4$	26 ± 1
	Fetuína	195 ± 25	$(6,4 \pm 0,6) \times 10^{-3}$	$(3,1 \pm 0,7) \times 10^4$	26 ± 1

Fonte: Autor.

Por meio dos dados mostrados na Tabela 5, torna-se evidente que a constante de associação cinética (K_a) calculada para as interações entre a rTgMIC1 e rTgMIC4 com as diferentes glicoproteínas são praticamente semelhantes, quando comparadas com a mesma proteína recombinante sendo estudada. As constantes de velocidade de associação (k_1) são maiores para as interações da rTgMIC1 quando comparadas com as interações da rTgMIC4, sugerindo que os sítios de interação da rTgMIC1 podem estar mais disponíveis para ocorrer a ligação. Em contrapartida, as constantes de dissociação (k_{-1}) também são maiores. Todos os valores de K_a podem ser considerados semelhantes, visto que estão praticamente na mesma ordem de grandeza.

A semelhança nos valores de K_a refletem na similaridade das energias livres de afinidade (ΔG_{afin}). Como esperado, a interação das glicoproteínas com as rTgMICs são processos espontâneos, uma vez que ΔG_{afin} são negativos.

5.7 Constante de Afinidade Aparente

Levando em consideração os critérios (i)-(iv) do modelo considerado anteriormente, é possível obter a constante de afinidade aparente, K' , utilizando diretamente a Isoterma de Langmuir (Equação 24).¹³

$$\Delta f = \Delta f_{\text{máx}} \frac{K'[\text{glicoproteína}]}{1 + K'[\text{glicoproteína}]} \quad (24)$$

sendo Δf a variação de frequência, $\Delta f_{\text{máx}}$ a variação de frequência na saturação e $[\text{glicoproteína}]$ a concentração da glicoproteína, em mol/L utilizada. A constante K' é conhecida como constante de associação¹³ ou de constante de afinidade aparente.⁷²

Essa constante pode ser obtida por meio da linearização da Isoterma de Langmuir, ou seja, relacionado em um gráfico as grandezas de $[\text{glicoproteína}]/\Delta f$ em função da concentração de glicoproteína (Equação 25), sendo que K' podem ser obtido diretamente pelos coeficientes angular e linear da curva.⁷²

$$\frac{C}{\Delta f} = \frac{C}{\Delta f_{\text{máx}}} + \frac{1}{\Delta f_{\text{máx}}} \cdot \frac{1}{K'} \quad (25)$$

Os valores da razão entre a concentração de glicoproteína adicionada aos cristais de quartzo funcionalizados com a rTgMIC1 e a variação de Δf causada pela adsorção de glicoproteína no sistema é mostrada na Tabela 6, enquanto na Tabela 7 são mostrados os resultados para a rTgMIC4.

Tabela 6 - Resultados obtidos por meio dos experimentos realizados na QCM e utilizados na determinação da constante de afinidade aparente das interações rTgMIC1-Asialofetuína e rTgMIC1-Fetuína

Glicoproteína	[Glicoproteína] / M	- [Glicoproteína]/$\Delta f_{\text{média}}$
Asialofetuína	$2,1 \times 10^{-6}$	$(1,1 \pm 0,3) \times 10^{-7}$
	$1,0 \times 10^{-5}$	$(3,4 \pm 0,1) \times 10^{-7}$
	$2,1 \times 10^{-5}$	$(5,8 \pm 0,8) \times 10^{-7}$
	$5,2 \times 10^{-5}$	$(13,4 \pm 0,2) \times 10^{-7}$
Fetuína	$1,5 \times 10^{-6}$	$(3,2 \pm 0,2) \times 10^{-7}$
	$7,4 \times 10^{-6}$	$(5,0 \pm 0,5) \times 10^{-7}$
	$1,5 \times 10^{-5}$	$(8,6 \pm 1,0) \times 10^{-7}$
	$3,6 \times 10^{-5}$	$(1,6 \pm 0,1) \times 10^{-6}$
	$7,4 \times 10^{-5}$	$(2,9 \pm 0,2) \times 10^{-6}$

Fonte: Autor.

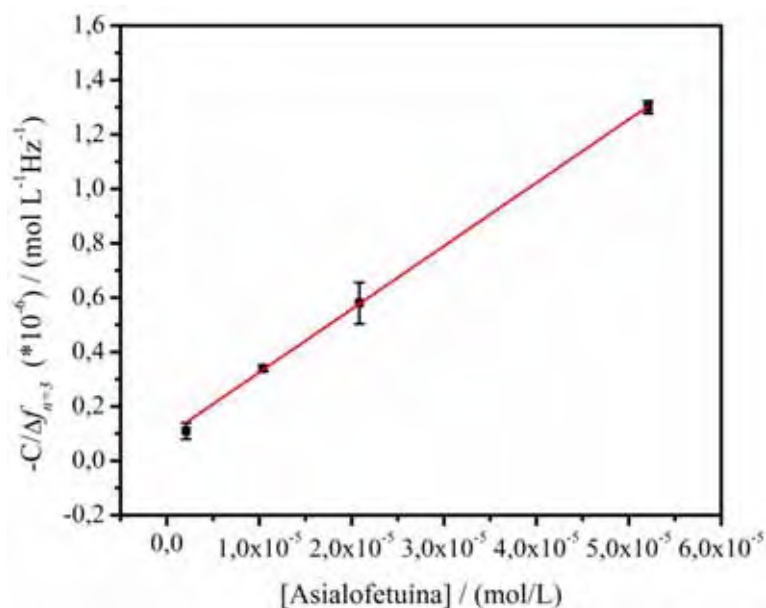
Tabela 7 - Resultados obtidos por meio dos experimentos realizados na QCM e utilizados na determinação da constante de afinidade aparente das interações rTgMIC4-Asialofetuína e rTgMIC4-Fetuína

Glicoproteína	[Glicoproteína] / M	- [Glicoproteína]/$\Delta f_{\text{média}}$
Asialofetuína	$2,1 \times 10^{-5}$	$(2,9 \pm 0,3) \times 10^{-6}$
	$1,0 \times 10^{-4}$	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-5}$
	$2,1 \times 10^{-4}$	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^{-5}$
	$3,1 \times 10^{-4}$	$(2,1 \pm 0,2) \times 10^{-5}$
	$4,1 \times 10^{-4}$	$(3,2 \pm 0,3) \times 10^{-5}$
Fetuína	$1,5 \times 10^{-5}$	$(1,5 \pm 0,4) \times 10^{-6}$
	$3,7 \times 10^{-5}$	$(2,4 \pm 0,6) \times 10^{-6}$
	$7,4 \times 10^{-5}$	$(4,4 \pm 0,2) \times 10^{-6}$
	$1,1 \times 10^{-4}$	$(5,9 \pm 1,1) \times 10^{-6}$
	$1,5 \times 10^{-4}$	$(7,3 \pm 0,5) \times 10^{-6}$

Fonte: Autor.

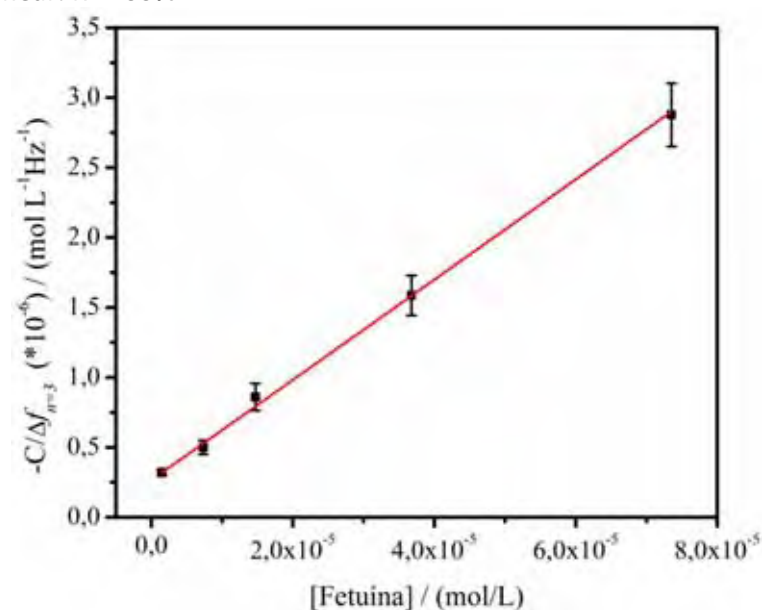
A partir dos resultados mostrado nas Tabelas 6 e 7, foram construídas as isotermas de Langmuir para as interações rTgMIC1-Asialofetuína e rTgMIC1-Fetuína (Figuras 40 e 41) e para as interações rTgMIC4-Asialofetuína e rTgMIC4-Fetuína (Figuras 42 e 43).

Figura 40 - Isoterma de Langmuir linearizada para a interação rTgMIC1-Asialofetuína, obtida para o cálculo da constante de afinidade aparente, K' , utilizando a Equação 25. Coeficiente de correlação para a regressão linear: $R^2 = 99\%$



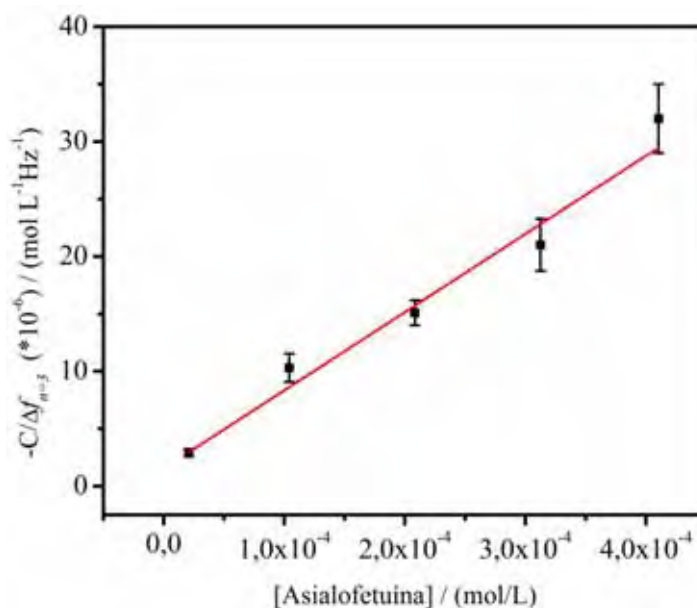
Fonte: Autor.

Figura 41 - Isoterma de Langmuir linearizada para a interação rTgMIC1-Fetuína, obtida para o cálculo da constante de afinidade aparente, K' , utilizando a Equação 25. Coeficiente de correlação para a regressão linear: $R^2 = 99\%$



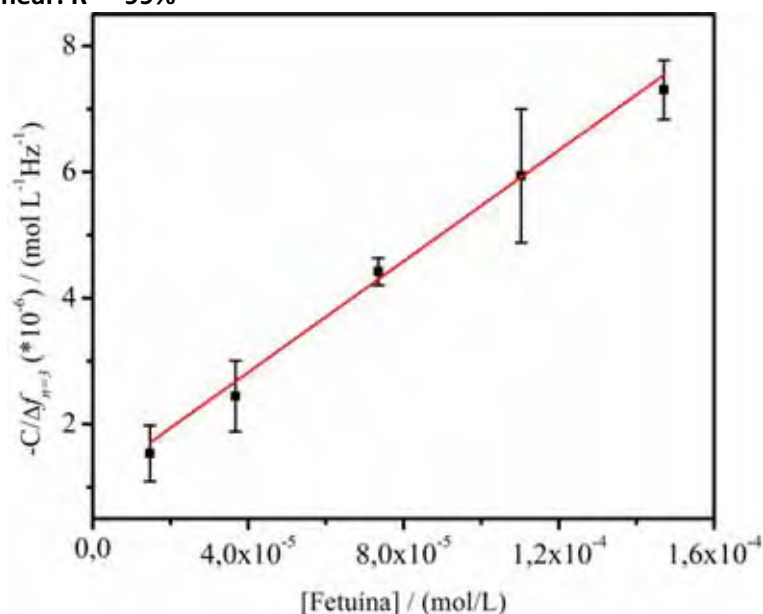
Fonte: Autor.

Figura 42 - Isoterma de Langmuir linearizada para a interação rTgMIC4-Asialofetuína, obtida para o cálculo da constante de afinidade aparente, K' , utilizando a Equação 25. Coeficiente de correlação para a regressão linear: $R^2 = 98\%$



Fonte: Autor.

Figura 43 - Isoterma de Langmuir linearizada para a interação rTgMIC4-Fetuína, obtida para o cálculo da constante de afinidade aparente, K' , utilizando a Equação 25. Coeficiente de correlação para a regressão linear: $R^2 = 99\%$



Fonte: Autor.

Pela razão entre o coeficiente angular e linear das isotermas de Langmuir foram encontrados os valores da constante de afinidade aparente para a interação entre as proteínas com as glicoproteínas estudadas. Os valores de afinidade aparente obtidos para a interação rTgMIC1-Asialofetuína e rTgMIC1-Fetuína foram $K' = (25 \pm 4) \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ e $(14 \pm 1) \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$, respectivamente. A mesma constante determinada para as interações

rTgMIC4-Asialofetuína e rTgMIC4-Fetuína foram $K' = (4 \pm 1) \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ e $(4 \pm 2) \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$, respectivamente.

Comparando os valores das constantes de afinidade aparente com as constantes de associação cinética das interações das rTgMICs com as glicoproteínas mostradas na Tabela 5, nota-se diferença entre elas. Essa diferença pode ser atribuída ao modo como essas constantes são estimadas.

Quando uma solução de glicoproteína é adicionada sobre o cristal funcionalizado com a rTgMIC, além da interação específica que ela possui com a lectina em questão, variação de Δf também está associada à mudança de viscosidade do meio (Equação 3, seção 2.3), bem como a possíveis interações não específicas. Porém, quando o fluxo de tampão é religado e a solução de glicoproteína é retirada da célula, tanto a viscosidade volta aos seus valores iniciais como as moléculas de glicoproteína fracamente adsorvidas são removidas, e Δf_{final} neste caso, está relacionado apenas à massa de glicoproteína ligada especificamente sobre o sensor.

Na determinação da constante de afinidade aparente, os valores utilizados para o cálculo são aqueles obtidos após a etapa de lavagem do cristal, ou seja, são utilizados os valores de Δf relacionados apenas à interação específica da glicoproteína com a rTgMIC. Entretanto, na determinação das constantes de associação cinética, os valores das constantes de relaxação são obtidos pelo ajuste da Equação 20 com os valores experimentais compreendidos entre o início da injeção e momento antes de se religar o fluxo, ou seja, neste caso, tanto o parâmetro viscosidade como interações não específicas não são eliminados.

Importante notar, entretanto, que os valores da constante de associação cinética e da constante de afinidade aparente se diferenciam de, no máximo, por um fator de sete. Pesquisas que utilizam esse modelo para a determinação desses parâmetros encontram fatores de dois¹² e cinco,¹³ por exemplo.

5.8 Verificação do modelo de interação receptor-ligante por meio da técnica de QCM-D

Conforme comentado no texto, o modelo adotado para o estudo da cinética de interação lectina-glicoproteína foi fundamentado nos princípios da isoterma de Langmuir. Esse modelo assume, basicamente, que (i) ocorre a formação de uma monocamada de adsorbato sobre a superfície adsorvedora, que contém um número fixo de sítios de adsorção, (ii) que os sítios de adsorção possuem a mesma energia, independente do grau de cobertura θ da superfície e (iii) cada sítio pode conter apenas uma molécula adsorvida.

Os critérios (ii) e (iii) do modelo podem ser satisfeitos pela estratégia de imobilização da espécie receptora. Neste trabalho, as proteínas rTgMIC1 e rTgMIC4 foram imobilizadas sobre superfície de ouro funcionalizada com SAM mista, contendo 11-MUA e C6OH. Enquanto o 11-MUA foi utilizado como molécula receptora da proteína, C6OH foi utilizado como espécie espaçadora da SAM, ou seja, molécula que oferece espaço na configuração da monocamada. Neste caso, após a imobilização da rTgMIC, é razoável afirmar que a existência do espaçador garante que os sítios de interação presentes na rTgMIC estão distantes o suficiente para que a adsorção de glicoproteína seja desimpedida, satisfazendo os itens (ii) e (iii). Essa estratégia é discutida na literatura¹⁵ e já utilizada em nosso grupo de pesquisa.¹²

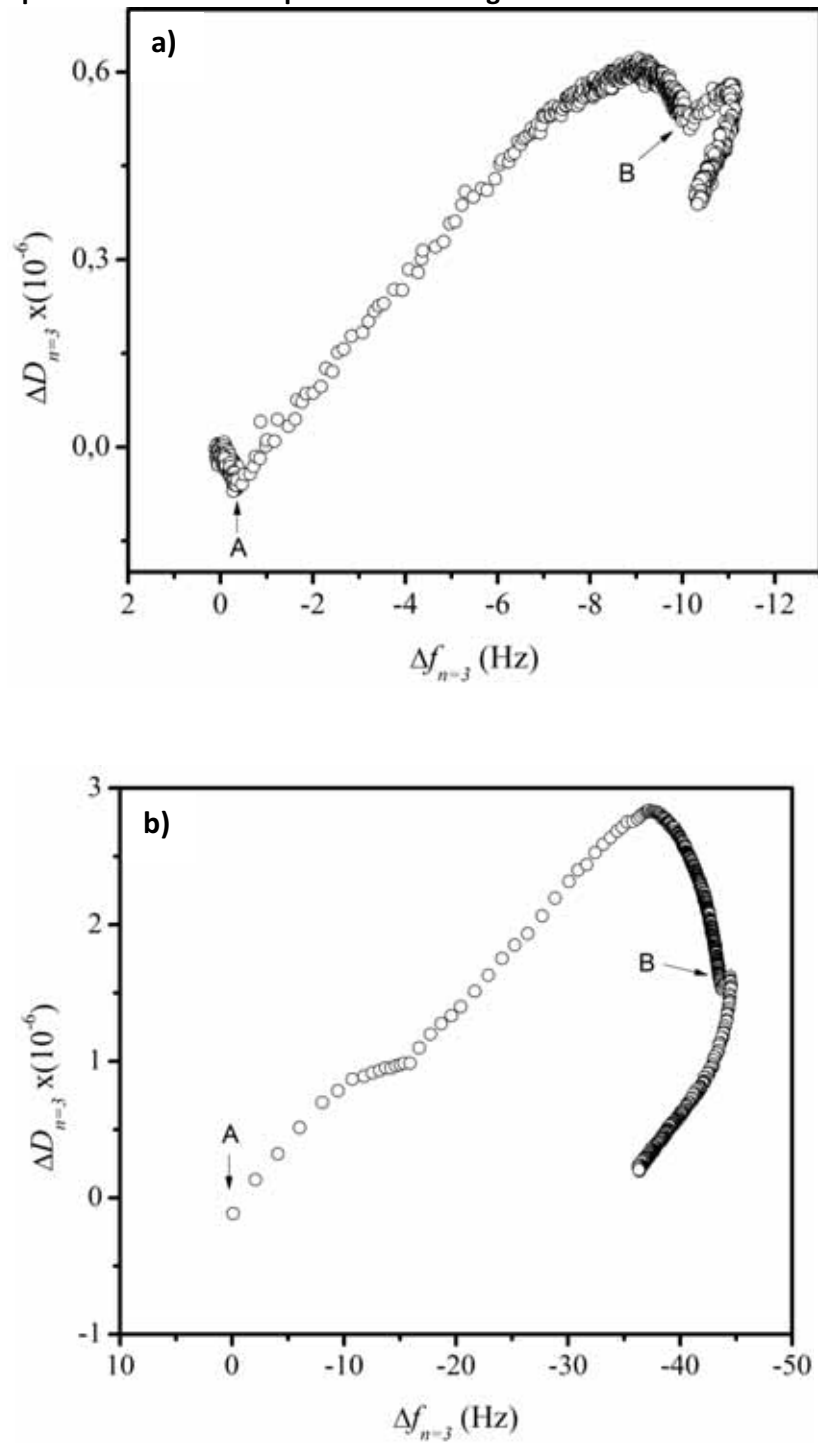
O item (i), entretanto, não é um critério alcançável pela estratégia de imobilização da proteína receptora. Isso ocorre porque, devido a estudos de interação proteína-proteína, especialmente aquele realizado por Höök,⁷⁶ é possível que ocorra a adsorção de duas camadas de proteína sobre a superfície sólida, ao invés de uma como o modelo é adotado. Claramente, caso seja formado duas camadas, o modelo passa a ser inadequado na interpretação dos valores de Δf na construção das curvas da Isoterma de Langmuir, essenciais na estimativa dos parâmetros de afinidade.

Uma provável forma de verificar a formação de apenas uma monocamada de proteína sobre a superfície sólida é por meio da técnica de QCM-D, montando a curva $D-f$ do processo. Neste tipo de gráfico, é possível analisar a taxa de dissipação energética por unidade de frequência (massa adsorvida). Embora não seja regra geral, evidências indicam que, caso a curva $D-f$ se comporte linearmente,^{76,77} é indício de um único processo de

adsorção, o que sugere a formação de uma monocamada de proteína. Entretanto, a observação de inflexão dessa curva, geralmente em um valor de Δf em $\approx 60\%$ do final,⁷⁶ Δf_{final} , pode ser indicativo de formação de uma bicamada proteica ou também de alteração conformacional da proteína, tornando-a mais viscoelástica. Uma deflexão na curva (diminuição nos valores de $-\Delta D/\Delta f$ durante o processo de ligação receptor-ligante) pode estar relacionada a uma compactação da camada de proteína tornando-a mais rígida, dissipando menos energia (fator D). Desta forma, analisar as curvas D - f do processo de ligação receptor-ligante é uma forma qualitativa de verificar a aproximação do sistema em estudo da teórica estabelecida pelo modelo.

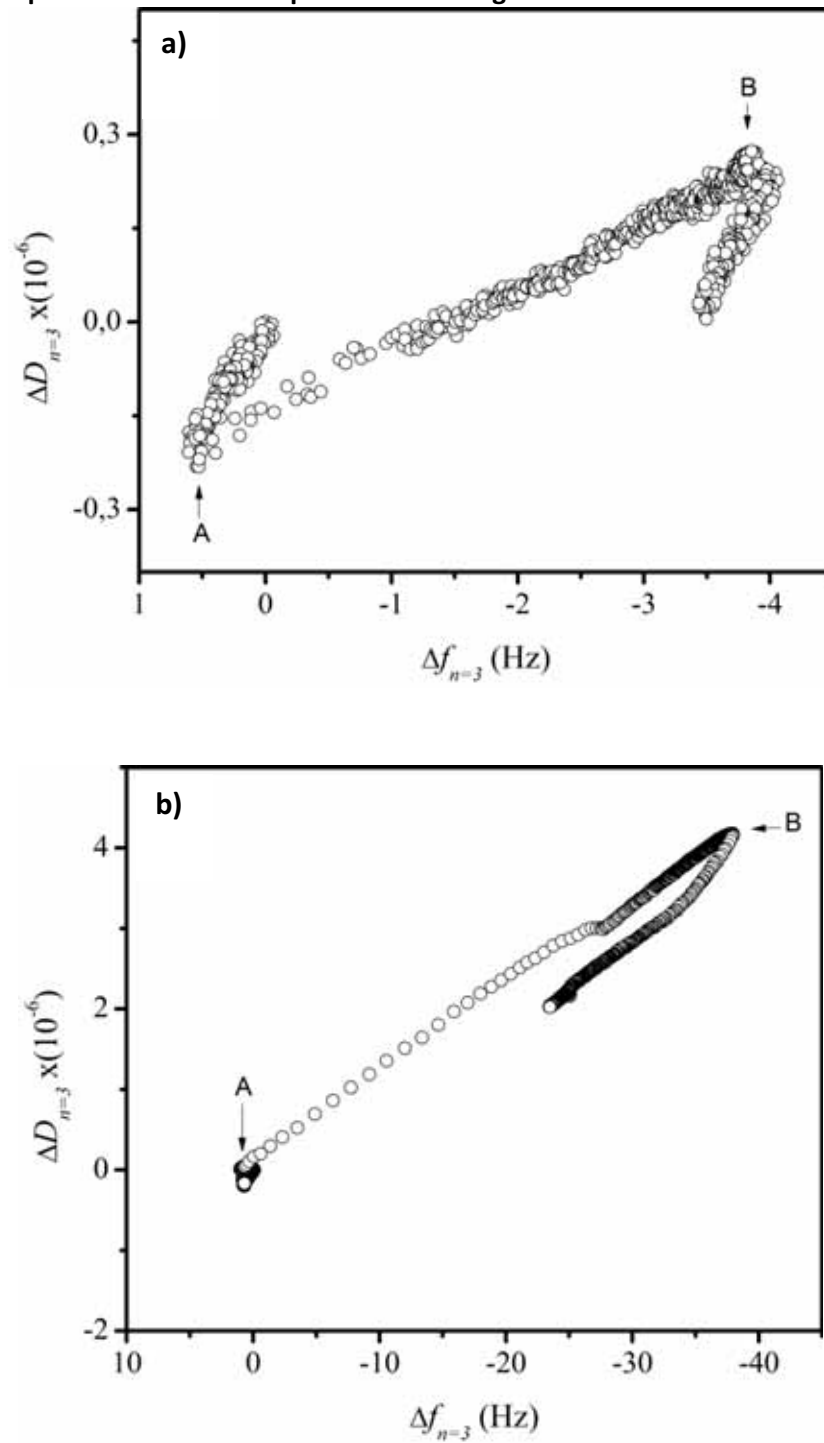
Nas Figuras 44, 45, 46 e 47 são mostrados os gráficos de D - f do processo de ligação da fetuína e asialofetuína sobre a rTgMIC1 e rTgMIC4. Foram coletados os valores de $\Delta f_{n=3}$ e $\Delta D_{n=3}$ para os processos de adsorção ocorridos em baixa concentração e na concentração de saturação da glicoproteína estudada. A seta em A nestes gráficos representa a início da injeção de solução de glicoproteína, enquanto a seta em B o início da injeção de solução tampão Tris-HCl (pH 8,0) que corresponde ao início do processo de lavagem.

Figura 44 - Curvas D_{xf} do processo de interação rTgMIC1-Asialofetuína nas concentrações de (a) $2,1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e (b) $5,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de glicoproteína. Seta em A indica o início da injeção da glicoproteína, enquanto a B o início do processo de lavagem



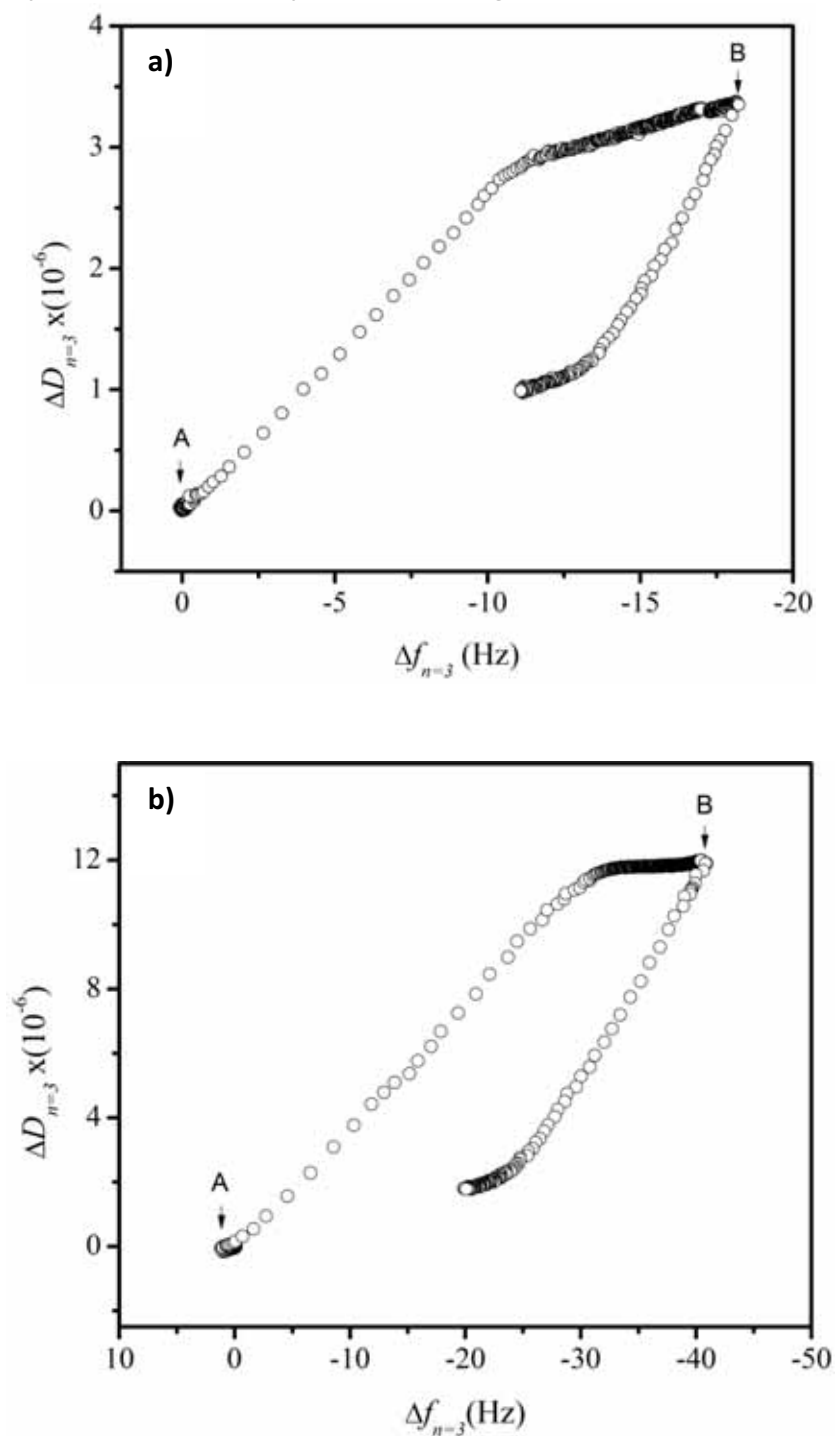
Fonte: Autor.

Figura 45 - Curvas D_{xf} do processo de interação rTgMIC1-Fetúína nas concentrações de (a) $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e (b) $7,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de glicoproteína. Seta em A indica o início da injeção da glicoproteína, enquanto a B o início do processo de lavagem



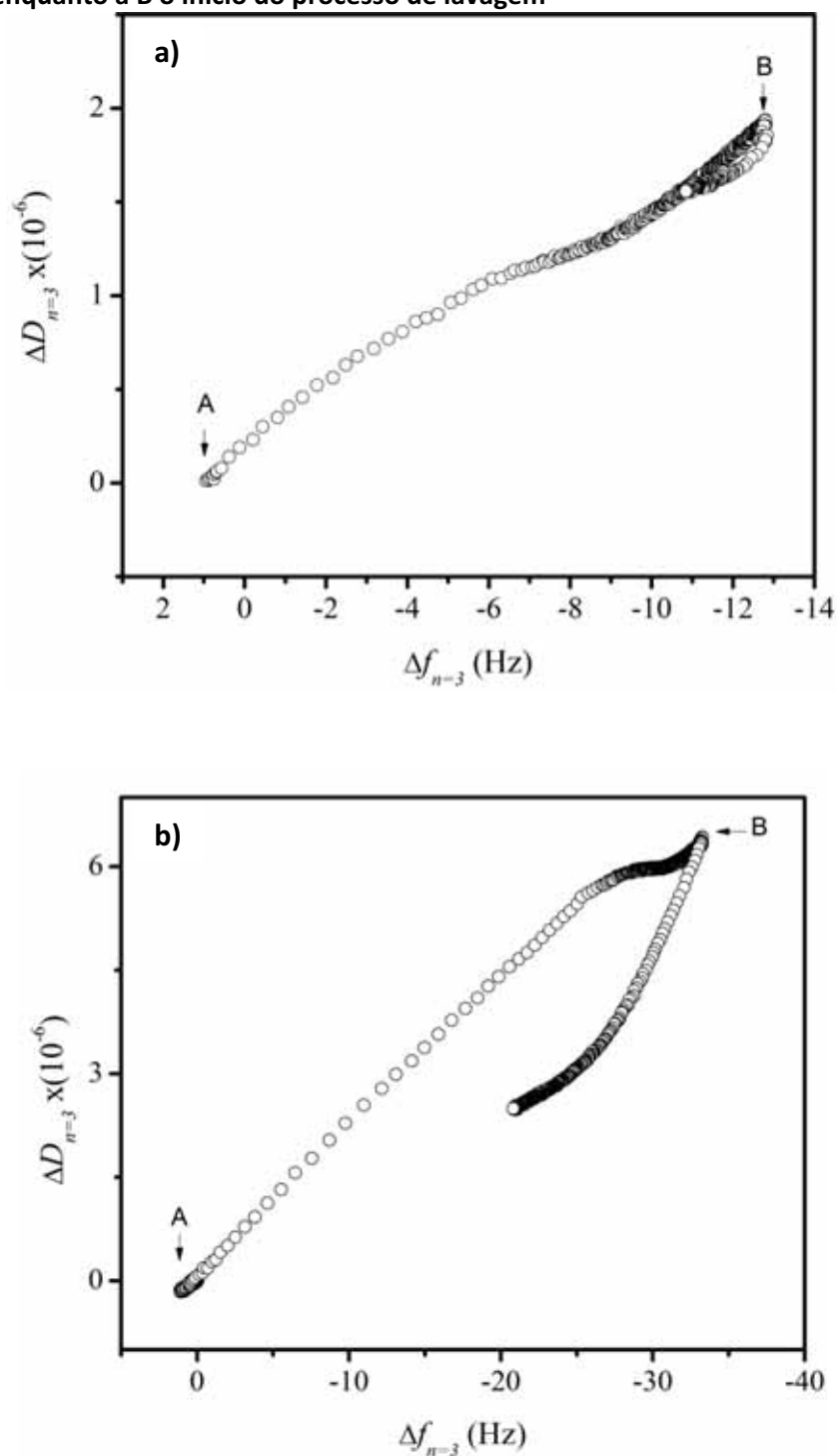
Fonte: Autor.

Figura 46 - Curvas Dxf do processo de interação rTgMIC4-Asialofetuína nas concentrações de (a) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e (b) $4,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de glicoproteína. Seta em A indica o início da injeção da glicoproteína, enquanto a B o início do processo de lavagem



Fonte: Autor.

Figura 47 - Curvas Dxf do processo de interação rTgMIC4-Fetúina nas concentrações de (a) $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e (b) $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de glicoproteína. Seta em A indica o início da injeção da glicoproteína, enquanto a B o início do processo de lavagem



Fonte: Autor.

Como pode ser visualizado nos gráficos mostrados nas Figuras 44-47, após o início da injeção de solução de glicoproteína (seta em A), a curva $D-f$ assume comportamento linear, seguido de uma deflexão próximo da seta em B, que mostra o início da injeção de solução tampão. Sugere-se como possível interpretação para esse comportamento linear das curvas

a formação de uma monocamada de glicoproteína sobre a superfície do sensor funcionalizada com a rTgMIC1 ou rTgMIC4. A deflexão dessas curvas, após o comportamento linear, indica que a monocamada de proteína está se tornando mais rígida, associada a uma menor dissipação energética por unidade de frequência. Essa alteração da propriedade viscoelástica da camada pode estar relacionada a alterações estruturais da glicoproteína adsorvida, tornando-a mais compacta. Uma exceção, entretanto, ao comportamento linear seguido de deflexão pode ser visto no gráfico da Figura 44b, sendo observadas duas deflexões: a primeira, em -10 Hz, e a segunda, em -35 Hz. Embora exista uma inflexão em -15 Hz, o comportamento linear da reta desse ponto até em B é praticamente semelhante ao comportamento do início do processo, isto é, da seta em A até -10 Hz. A semelhança na taxa de dissipação energética dessas etapas é indicativo de que ocorreu uma etapa organizacional, tornando a camada mais rígida, a mais do que quando comparado aos demais processos de adsorção.

Após o início da lavagem do cristal, representado pela seta em B, Δf aumenta e ΔD diminui, evidenciando que certa quantidade de moléculas de glicoproteína estava adsorvida fisicamente sobre a superfície do sensor, sendo lavada pelo fluxo de tampão. Outra interpretação para este comportamento é a alteração da viscosidade do sistema: ao injetar solução de glicoproteína sobre o cristal de quartzo estabilizado com solução tampão, devido à diferença de viscosidade entre as soluções, ocorre variação de Δf , que também está relacionada com a ligação de glicoproteína sobre a superfície funcionalizada com rTgMIC1 ou rTgMIC4. Ao lavar a superfície com solução tampão, ou seja, quando a solução de glicoproteína é retirada da célula, a viscosidade retorna aos seus valores iniciais, e a contribuição para o valor de Δf está relacionado apenas à massa de glicoproteína ligada na superfície do sensor. Como Δf e ΔD após o processo de lavagem são diferentes de zero, é possível afirmar que houve ligação de glicoproteína na superfície do sensor.

Desta forma, é razoável afirmar que ocorre a formação de uma camada de glicoproteína sobre o sensor, e que o critério da isoterma de Langmuir pode ser satisfeita.

Outro ponto também importante e que, de certa forma, está implícito no modelo ao utilizar os dados de QCM se refere à proporcionalidade de Δf com Δm ; em outras palavras, se a camada de glicoproteína pode ser considerada rígida o suficiente para adotar a relação de Sauerbrey e utilizar os resultados de Δf no modelo da isoterma de Langmuir.

Höök e Kasemo⁷⁸ afirmam que, de modo geral, em estudos de interação proteína-proteína, como no caso de antígeno-anticorpo, é possível aproximar que as moléculas são pequenas e rígidas o suficiente para que a relação de Sauerbrey possa ser válida. Entretanto, estender essa aproximação para todas as proteínas é um equívoco, e torna clara a necessidade de uma análise do fator D e da série harmônica da frequência de oscilação do cristal, para verificar se a camada de glicoproteína pode ser considerada rígida o suficiente para este propósito.

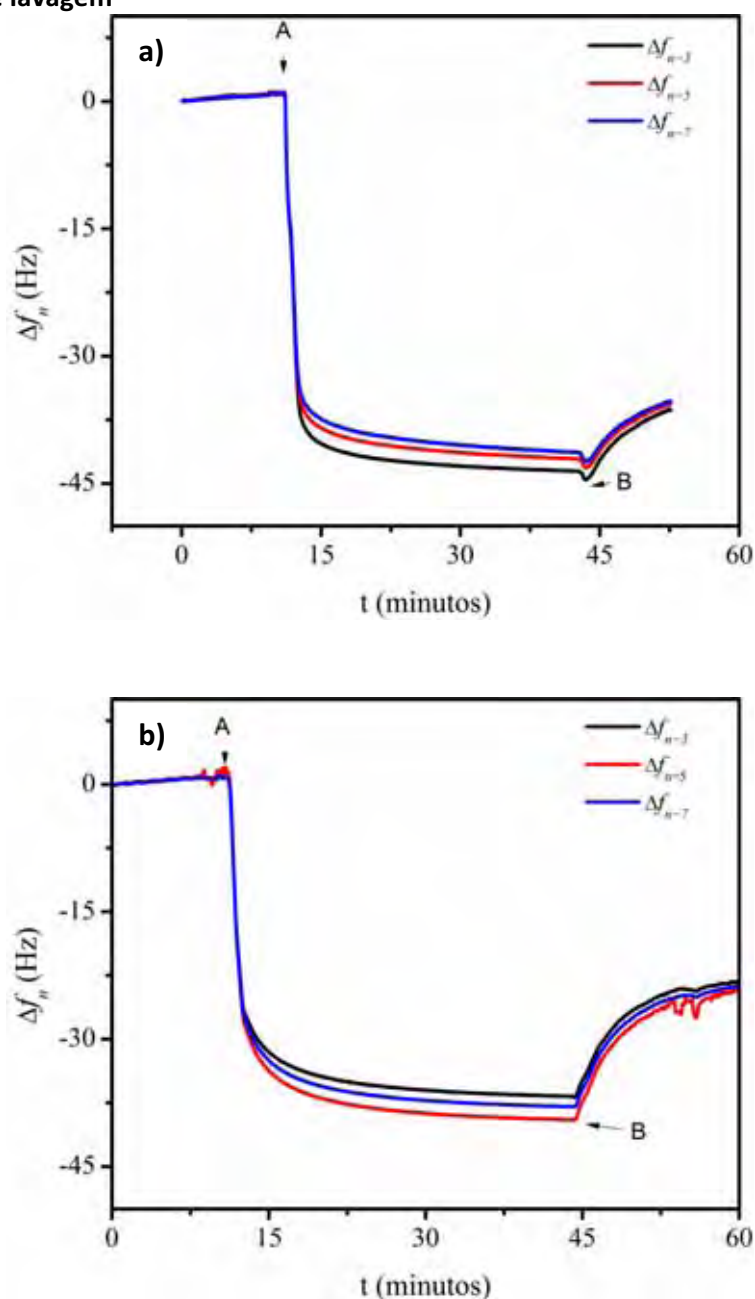
Uma forma conveniente de verificar isso é por meio de ΔD_{final} . Quanto maior esse valor,⁷⁷ menos aplicável é a equação de Sauerbrey. Neste contexto, Campiña et al.⁷⁰ ao estudarem a adsorção de polímero (poli(4-estirenosulfonato de sódio), ≈ 70 Kda), por exemplo, encontrou $\Delta D_{n=5} \approx 5 \times 10^{-7}$ ($\Delta D_n < 1 \times 10^{-6}$) e concluiu que, devido ao baixo valor de dissipação energética, a camada pode ser considerada rígida o suficiente para utilizar a relação de Sauerbrey. A variação da frequência do quinto harmônico normalizada para esse processo, $\Delta f_{n=5}$, foi de ≈ -5 Hz, que resulta numa relação $-\Delta D/\Delta f \approx 1 \times 10^{-7} \text{ Hz}^{-1}$. Nesse mesmo trabalho, foram encontrados valores de dissipação energética maiores para a adsorção de camadas viscoelásticas de citosina, $\Delta D_{n=5} \approx 4 \times 10^{-6}$ ($\Delta f_{n=5} \approx -18$ Hz, $-\Delta D/\Delta f \approx 2 \times 10^{-7}$) e de β -lactoglobulina bovina, $\Delta D_{n=5} \approx 17 \times 10^{-6}$ ($\Delta f_{n=5} \approx -112$ Hz, $-\Delta D/\Delta f \approx 2 \times 10^{-7}$). Além do mais, seus resultados demonstraram que os harmônicos normalizados da frequência de oscilação do cristal de quartzo (Δf_n , $n = 3, 5$ e 7) para a adsorção de citosina e de β -lactoglobulina bovina não se sobrepuseram (diferença entre os harmônicos de ≈ 8 Hz para a citosina e de 40 Hz para a β -lactoglobulina bovina), evidenciando que essas camadas apresentam propriedades viscoelásticas, o que não aconteceu para a adsorção de poli(4-estirenosulfonato de sódio).

Neste trabalho, em média, $\Delta D_{n=3}$ máximo encontrado para as concentrações de glicoproteína estudada é de $\approx 2 \times 10^{-6}$, obtendo relação $-\Delta D/\Delta f$ na ordem de 10^{-8} Hz^{-1} , com exceção da resposta da interação entre rTgMIC4-Fetúina nas concentrações $1,1 \times 10^{-4} \text{ M}$ e $1,5 \times 10^{-4} \text{ M}$, que foram de $1 \times 10^{-7} \text{ Hz}^{-1}$. Essas relações se enquadram dentro da faixa que Campiña et al. encontraram para as camadas rígidas.

Outra evidência da “rigidez” das camadas de glicoproteína pode ser encontrada na análise dos demais harmônicos durante os processos de interação receptor-ligante. Neste caso, a sobreposição dos harmônicos é um indicativo da “rigidez” das monocamadas. Como exemplo para verificar esta hipótese, foram adquiridos o terceiro, quinto e sétimo

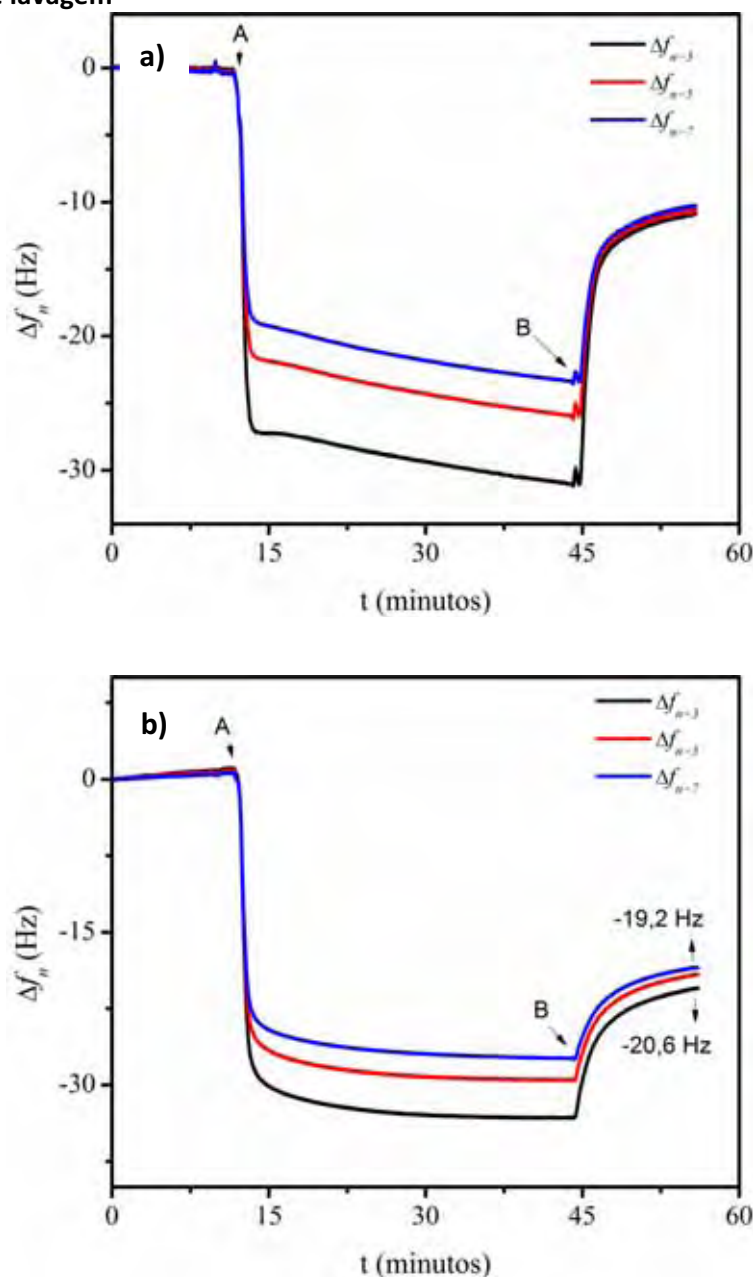
harmônicos normalizados de oscilação do cristal de quartzo para os processos de adsorção rTgMIC-glicoproteína utilizando a concentração de saturação (Figuras 48 e 49).

Figura 48 - Curvas de Δf_n x tempo para a interação da rTgMIC1 com (a) asialofetuína na concentração de $5,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e (b) fetuína $7,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A seta em A mostra o início da injeção de solução de glicoproteína, enquanto em B a injeção de solução tampão Tris-HCl (pH 8,0) para o processo de lavagem



Fonte: Autor.

Figura 49 - Curvas de Δf_n x tempo para a interação da rTgMIC4 com (a) asialofetuína na concentração de $4,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e (b) fetuína $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. A seta em A mostra o início da injeção de solução de glicoproteína, enquanto em B a injeção de solução tampão Tris-HCl (pH 8,0) para o processo de lavagem



Fonte: Autor.

A série de harmônicos mostrados nas Figuras 48 e 49 se sobrepõem, exceto para a interação rTgMIC4-Fetuína. Entretanto, como a diferença entre os harmônicos é pequena, de aproximadamente 1,4 Hz, quando comparada com os resultados de Campiña et al. ($\approx 8 \text{ Hz}$), pode-se afirmar que essa condição não interfere na validade do modelo.

Desta forma, como há evidência de que ocorre formação de uma monocamada de glicoproteína sobre as rTgMICs, bem como elas se apresentam rígidas dentro do parâmetro

encontrado na literatura, torna-se possível aproximar a relação de proporcionalidade entre Δf e Δm , ou seja, não impossibilita o uso da Equação de Sauerbrey de forma a comprometer as condições estabelecidas pelo modelo da Isoterma de Langmuir para o cálculo das constantes de afinidade.

6. CONCLUSÕES

Por meio da construção de biossensor piezelétrico de afinidade utilizando a técnica de monocamada automontada mista foi possível estudar as interações entre as proteínas recombinantes rTgMIC1 e rTgMIC4 com a fetuína e asialofetuína.

O estudo da construção da SAM mista sobre ouro em tempo real utilizando a técnica de QCM-D evidenciou que sua cinética é lenta, em que etapas de adsorção e organização ocorrem concomitantemente, culminando numa SAM rígida. Por ser rígida, a equação de Sauerbrey foi utilizada para estimar a cobertura superficial (Γ), encontrando valor semelhante àquele reportado na literatura. Confirmando os resultados obtidos pela técnica piezelétrica, medidas de voltametria cíclica antes e após a formação da SAM, realizadas no mesmo cristal de quartzo, indicam bloqueio de processo eletroquímico do par redox $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$, evidenciando a formação de SAM compacta e de elevado grau de cobertura, ideal para a construção do dispositivo.

O processo de ativação dos grupos carboxílicos presentes na SAM com solução de EDC/NHS também foi investigado por QCM, obtendo resultado compatível a outro encontrado na literatura.

Utilizando técnica de QCM na investigação da adsorção das rTgMICs sobre a SAM ativada, coletou-se evidências de que o processo de adsorção da rTgMIC1 forma uma camada sobre a superfície do transdutor que não ocupa totalmente os sítios disponíveis para adsorção, sendo necessário o bloqueio daqueles remanescentes com solução de gelatina. Por outro lado, rTgMIC4 ocupa por completo todos os sítios de adsorção.

Por meio da análise da constante de afinidade aparente, K' , verifica-se que a interação rTgMIC1-Fetuína é praticamente semelhante com a interação rTgMIC1-Asialofetuína. Resultado análogo pode ser observado ao analisar a constante de associação cinética entre essas interações (K_a). A mesma análise pode ser realizada com a interação rTgMIC4-Asialofetuína e rTgMIC4-Fetuína, obtendo-se constantes também semelhantes, tanto no que se refere a análise da constante de associação cinética (K_a) quanto da constante de afinidade aparente (K'). Uma possível explicação está na possibilidade do favorecimento das interações das rTgMICs com as glicoproteínas estudadas porque as últimas possuem estrutura complexa devido a existência de várias ramificações de glicanas, que podem facilitar a interação receptor-ligante.

Como esperado, os valores de ΔG para o processo de interação entre as rTgMICs com as glicoproteínas são negativos, revelando a espontaneidade do processo. Esse resultado corrobora a evidência de que essas proteínas atuam no processo de invasão celular, conforme sugerem trabalhos na literatura.

REFERÊNCIAS

- 1 TAI, D-F. et al. Artificial receptors in serologic tests for the early diagnosis of dengue virus infection. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 8, p. 1486-1491, 2006.
- 2 LIN, T-Y. et al. Determination of albumin concentration by MIP-QCM sensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 1, p. 75-81, 2004.
- 3 FATIBELLO FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores. **Química Nova**, v. 15, n. 1, p. 28-39, 1992.
- 4 RASOOLY, A.; HEROLD, K. E. (Ed.). **Electrochemical and mechanical detectors, lateral flow and ligands for biosensors**. New York: Humana Press, 2009. v. 2. 464 p. (Biosensors and Biodetection).
- 5 BUENO, P. R. et al. Electrogravimetric real-time and *in situ* Michaelis-Menten enzymatic kinetics: progress curve of acetylcholinesterase hydrolysis. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 49, p. 16605-16610, 2010.
- 6 PEDROSO, M. M. et al. Quartz crystal microbalance monitoring the real-time binding of lectin with carbohydrate with high and low molecular mass. **Microchemical Journal**, v. 89, n. 2, p. 153-158, 2008.
- 7 WATANABE, A. M. **Admitância/impedância eletroacústica aplicada ao estudo da formação de monocamadas automontadas e da afinidade proteínas/carboidratos**. 2006. 98 f. Dissertação (Mestrado em Física aplicada à Medicina e Biologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.
- 8 MALHOTRA, B. D.; TURNER, A. P. F. (Ed.). **Advances in biosensors: perspectives in biosensors**. Amsterdam: Elsevier Science, 2003. v. 5. 196 p.
- 9 RASOOLY, A.; HEROLD, K. E. Biosensors for the analysis of food and waterborne pathogens and their toxins. **Journal of AOAC International**, v. 89, n. 3, p. 873-883, 2006.
- 10 YAKOVLEVA, M. E. et al. A study of glycoprotein-lectin interactions using quartz crystal microbalance. **Analytica Chimica Acta**, v. 668, p. 80-85, 2010.
- 11 RICCARDI, C. D. S. et al. Imunossensor amperométrico. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 316-320, 2002.
- 12 PESQUERO, N. C. et al. Real-time monitoring and kinetic parameter estimation of the affinity interaction of jArtinM and rArtinM with peroxidaseglycoprotein by the electrogravimetric technique. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 1, p. 26-42, 2010.
- 13 LEBED, K. et al. Lectin-carbohydrate affinity measured using a quartz crystal microbalance. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 299, n. 1, p. 41-48, 2006.
- 14 HAO, R. et al. Rapid detection of *Bacillus anthracis* using monoclonal antibody functionalized QCM sensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 5, p. 1330-1335, 2009.
- 15 WINK, T. et al. Self-assembled monolayers for biosensors. **Analyst**, v. 122, n. 4, p. 43R-50R, 1997.

- 16 NUZZO, R. G.; ALLARA, D. L. Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 105, n. 13, p. 4481-4483, 1983.
- 17 PRADEEP, T. Self-assembled monolayers. In: _____. **Nano: the essentials**. Understanding nanoscience and nanotechnology. New Delhi: Tata McGraw-Hill, 2007. Cap. 5, p. 128-155.
- 18 FUNG, Y. S.; WONG, Y. Y. Self-assembled monolayers as the coating in a quartz piezoelectric crystal immunosensor to detect Salmonella in aqueous solution. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 21, p. 5302-5309, 2001.
- 19 ULMAN, A. Formation and structure of self-assembled monolayers. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 4, p. 1533-1554, 1996.
- 20 LOVE, J. C. et al. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 4, p. 1103-1169, 2005.
- 21 FERREIRA, M. et al. Técnicas de caracterização para investigar interações no nível molecular em filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB). **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 502-510, 2005.
- 22 FREIRE, R. S. et al. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 381-389, 2003.
- 23 BAIN, C. D. et al. Comparison of self-assembled monolayers on gold: coadsorption of thiols and disulfides. **Langmuir**, v. 5, n. 3, p. 723-727, 1989.
- 24 BAIN, C. D. et al. Formation of monolayer by the coadsorption of thiols on gold: variation in the head group, tail group, and solvent. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 111, n. 18, p. 7155-7164, 1989.
- 25 BAIN, C. D. et al. Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, n. 1, p. 321-335, 1989.
- 26 BAIN, C. D.; WHITESIDES, G. M. Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: variation in the length of the alkyl chain. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 111, n. 18, p. 7164-7175, 1989.
- 27 FERRETTI, S. et al. Self-assembled monolayers: a versatile tool for the formulation of bio-surfaces. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 9, p. 530-540, 2000.
- 28 HERNÁNDEZ, P. et al. Self-assembled monolayer of L-cysteine on a gold electrode as a support for fatty acid. Application to the electroanalytical determination of unsaturated fatty acid. **Electroanalysis**, v. 15, n. 20, p. 1625-1631, 2003.
- 29 LOVE, J. C. et al. Formation and structure of self-assembled monolayers of alkanethiolates on palladium. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 125, n. 9, p. 2597-2609, 2003.
- 30 MENDES, R. K. **Investigação dos efeitos dos procedimentos de imobilização em monocamadas auto-organizadas da enzima peroxidase no desenvolvimento de um biossensor**. 2006. 128 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

- 31 PORTER, M. D. et al. Spontaneously organized molecular assemblies. 4. Structural characterization on n-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared spectroscopy, and electrochemistry. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 109, n. 12, p. 3559-3568, 1987.
- 32 TRUONG, K. D.; ROWNTREE, P. A. Kinetics of the formation of butanethiol monolayer on gold substrates, as studied by infrared spectroscopy. **Progress in Surface Science**, v. 50, p. 207-216, 1995.
- 33 BRIAND, E. et al. Immobilization of Protein A on SAMs for the elaboration of immunosensors. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 53, p. 215-224, 2006.
- 34 KARPOVICH, D. S.; BLANCHARD, G. J. Direct measurement of the adsorption kinetics of alkanethiolate self-assembled monolayer on a microcrystalline gold surface. **Langmuir**, v. 10, n. 9, p. 3315-3322, 1994.
- 35 ANDRADE, J. F. D. et al. Aplicações analíticas dos cristais piezoelétricos. **Química Nova**, v. 14, n. 4, p. 272-278, 1991.
- 36 CURIE, P.; CURIE, J. Development by pressure of polar electricity in Hemihedral crystals with inclined faces. **Bulletin de la Société Minéralogie de France**, v. 3, p. 90, 1880.
- 37 HEWLETT PACKARD. **Fundamentals of quartz oscillators**. Palo Alto, 1999. Nota técnica 200-2.
- 38 COOPER, M. A.; SINGLETON, V. T. A survey of the 2001 to 2005 quartz crystal microbalance biosensor literature: applications of acoustic physics to the analysis of biomolecular interactions. **Journal of Molecular Recognition**, v. 20, p. 154-184, 2007.
- 39 RODAHL, M.; KASEMO, B. Frequency and dissipation-factor responses to localized liquid deposits on a QCM electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 37, p. 111-116, 1996.
- 40 KANAZAWA, K. K.; GORDON, J. G. The oscillation frequency of a quartz resonator in contact with a liquid. **Analytica Chimica Acta**, v. 175, p. 99-105, 1985.
- 41 ZHANG, C. et al. Study on behaviour of QCM sensor in loading variation. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 40, p. 111-115, 1997.
- 42 FLEMING, B. D. et al. Electrochemical quartz crystal microbalance study of azurin adsorption onto an alkanethiol self-assembled monolayer on gold. **Langmuir**, v. 24, n. 1, p. 323-327, 2008.
- 43 AYELA, C. et al. Antibody-antigenic peptide interactions monitored by SPR and QCM-D. A model for SPR detection of IA-2 autoantibodies in human serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 12, p. 3113-3119, 2007.
- 44 LEE, Y.-G.; CHANG, K.-S. Application of a flow type quartz crystal microbalance immunosensor for real time determination of cattle bovine ephemeral fever virus in liquid. **Talanta**, v. 65, n. 5, p. 1335-1342, 2005.
- 45 LEHNINGER, A. L. et al. Carboidratos e glicobiologia. In: _____. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. Cap. 7, p. 238-272.
- 46 GOLDSTEIN, I. J. et al. What should be called a lectin? **Nature**, v. 285, p. 66, May 1980.

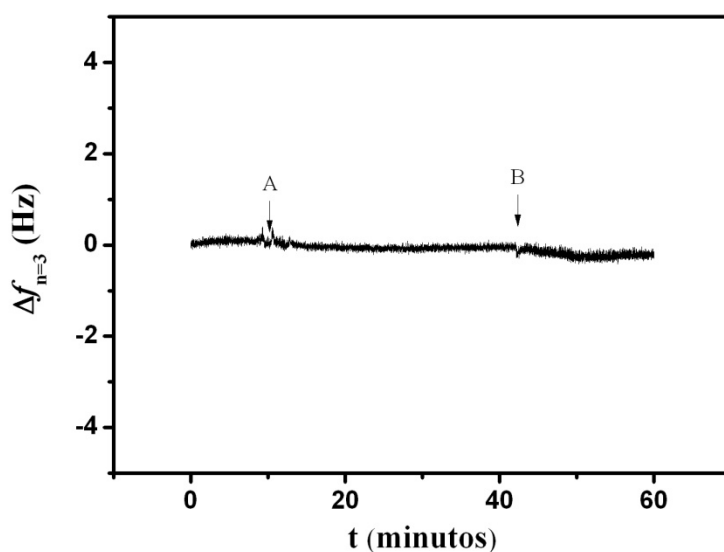
- 47 PEUMANS, W. J.; DAMME, E. J. M. V. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, n. 2, p. 347-352, 1995.
- 48 SELL, A. M.; COSTA, C. P. Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, v. 22, n. 2, p. 297-303, 2000.
- 49 BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (Lectins). **Science**, v. 119, n. 3091, p. 419, 1954.
- 50 WEIS, W. I.; DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annual Review of Biochemistry**, v. 65, p. 441-473, 1996.
- 51 LIS, H.; SHARON, N. Lectin as molecules and as tools. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, p. 35-67, 1986.
- 52 SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**, v. 246, n. 4927, p. 227-234, 1989.
- 53 VOET, D. et al. Carboidratos. In: _____. **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2000. Cap. 8, p. 216-217.
- 54 BLUMENSCHNIG, T. M. et al. Atomic resolution insight into host cell recognition by *Toxoplasma gondii*. **The European Molecular Biology Organization Journal**, v. 26, n. 11, p. 2808-2820, 2007.
- 55 SOUZA, W. D. et al. Organização estrutural do taquizoítio de *Toxoplasma gondii*. **Scientia Medica**, v. 20, n. 1, p. 131-143, 2010.
- 56 DOBROWOLSKI, J. M. et al. Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. **Molecular Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 163-173, 1997.
- 57 ACHBAROU, A. et al. Characterization of microneme proteins of *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 47, n. 2, p. 223-233, 1991.
- 58 SCHWARTZMAN, J. D.; SAFFER, L. D. How *Toxoplasma gondii* gets in and out of host cells. **Subcellular Biochemistry**, v. 18, p. 333-364, 1992.
- 59 BONHOMME, A. et al. Signaling during the invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, n. 5, p. 551-561, 1999.
- 60 HOFF, E. F. et al. *Toxoplasma gondii*: molecular cloning and characterization of a novel 18-kDa secretory antigen, TgMIC10. **Experimental Parasitology**, v. 97, n. 2, p. 77-88, 2001.
- 61 LOURENÇO, E. V. et al. Immunization with MIC1 and MIC4 induces protective immunity against *Toxoplasma gondii*. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 5, p. 1244-1251, 2006.
- 62 SAWMYNADEN, K. et al. Structural insights into microneme protein assembly reveal a new mode of EGF domain recognition. **EMBO Reports**, v. 9, n. 11, p. 1149-1155, 2008.
- 63 LOURENÇO, E. V. et al. *Toxoplasma gondii* micronemal protein MIC1 is a lactose-binding lectin. **Glycobiology**, v. 11, n. 7, p. 541-547, 2001.

- 64 FOURMAUX, M. N. et al. The MIC1 microneme protein of *Toxoplasma gondii* contains a duplicated receptor-like domain and binds to host cell surface. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 83, n. 2, p. 201-210, 1996.
- 65 BRECHT, S. et al. The toxoplasma micronemal protein MIC4 is an adhesin composed of six conserved apple domains. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 9, p. 4119-4127, 2001.
- 66 BAENZIGER, J. U.; FIETE, D. Structure of the complex oligosaccharides of fetuin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 3, p. 789-795, 1978.
- 67 FÁTIMA, Â. D. et al. Ácidos siálicos – da compreensão do seu envolvimento em processos biológicos ao desenvolvimento de fármacos contra o agente etiológico da gripe. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 306-316, 2005.
- 68 GUPTA, D. et al. Differences in the cross-linking activities of native and recombinant *Erythrina corallodendron* lectin with asialofetuin. Evidence for carbohydrate-carbohydrate interactions in lectin-glycoprotein complexes. **Biochemistry**, v. 33, p. 2503-2508, 1994.
- 69 CANCINO, J. C. **Eletrodos modificados com monocamadas auto-organizadas de alcanotióis: uma abordagem sobre transferência eletrônica**. 2008. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- 70 CAMPIÑA, J. M. et al. Studies on the interactions between bovine b-lactoglobulin and chitosan at the solid-liquid interface. **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 8779-8790, 2010.
- 71 WIDRIG, C. A. et al. The electrochemical desorption of n-alkanethiol monolayers from polycrystalline Au and Ag electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 310, n. 1-2, p. 335-359, 1991.
- 72 PESQUERO, N. C. **Estudo da equivalência entre a lectina Artin M obtida a partir da semente da jaca e a sua forma recombinante na afinidade por glicanas**. 2010. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.
- 73 ZHANG, Y. et al. Carbohydrate-protein interactions by “clicked” carbohydrate self-assembled monolayers. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 6, p. 2001-2008, 2006.
- 74 NILSSON, C. L. **Lectins: analytical technologies**. Amsterdam: Elsevier, 2007.
- 75 MAO, Y. et al. Monitoring and kinetic parameter estimation for the binding process of berberine hydrochloride to bovine serum albumin with piezoelectric quartz crystal impedance analysis. **Analytical Biochemistry**, v. 306, n. 23, p. 23-30, 2002.
- 76 HÖÖK, F. et al. Energy dissipation kinetics for protein and antibody-antigen adsorption under shear oscillation on a quartz crystal microbalance. **Langmuir**, v. 14, p. 729-734, 1998.
- 77 RODAHL, M. et al. Simultaneous frequency and dissipation factor QCM measurements of biomolecular adsorption and cell adhesion. **Faraday Discussions**, v. 107, p. 229-246, 1997.
- 78 HÖÖK, F.; KASEMO, B. The QCM-D technique for probing biomacromolecular recognition reactions. In: _____. **Piezoelectric sensors**. Berlin: Springer, 2006. v. 5, p. 425-447.

APÊNDICE A – Injeção de soluções de carboidratos sobre os cristais de quartzo funcionalizados com as rTgMICs.

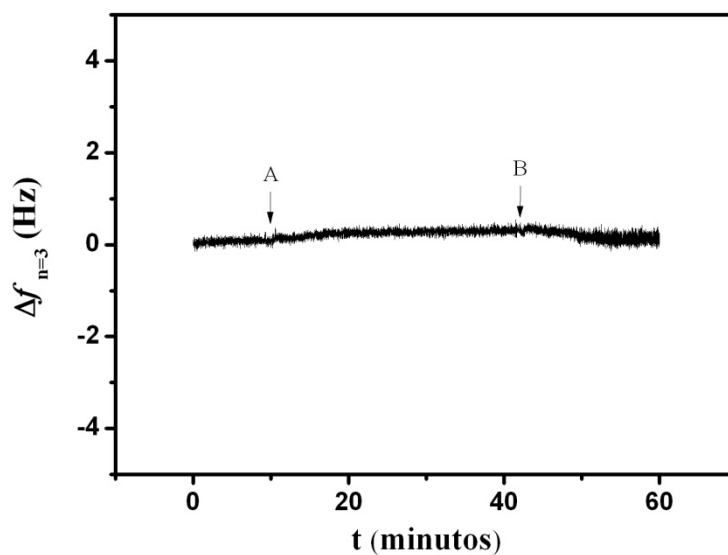
Durante o desenvolvimento da pesquisa, foram realizadas medidas piezelétricas na tentativa de obter as constantes de afinidade das interações entre as rTgMICs com os carboidratos 3'sialillactose, lactose-N-biose, ambos obtidos da Dextra (V'Labs), e com a galactose e o ácido N-acetilneuramínico, obtidos da Sigma. Entretanto, a variação nula do terceiro harmônico normalizado ($\Delta f_{n=3}$) ao injetar soluções desses carboidratos (ver Figuras A1-A6) em tampão Tris-HCl (pH 8,0) impossibilitou a continuidade do estudo. Como a técnica de QCM detecta variação de massa sobre o cristal de quartzo, a ausência de sinal pode ser explicada pela massa molar relativa desses carboidratos frente às glicoproteínas, uma vez que as últimas possuem massas molares na ordem de 60-300 vezes maiores do que as primeiras, ou seja, a pequena massa molar relativa dos carboidratos quando comparada com as das glicoproteínas pode ter sido fator determinante na obtenção de sinal nulo utilizando essa técnica aliada à metodologia empregada de imobilização das rTgMICs.

Figura A1. Curva de $\Delta f(t)$ obtido para o processo de injeção de solução 100 μ M de 3'sialillactose sobre cristal funcionalizado com rTgMIC1. A seta em A mostra o início da injeção de solução de carboidrato, enquanto a B o início do processo de lavagem



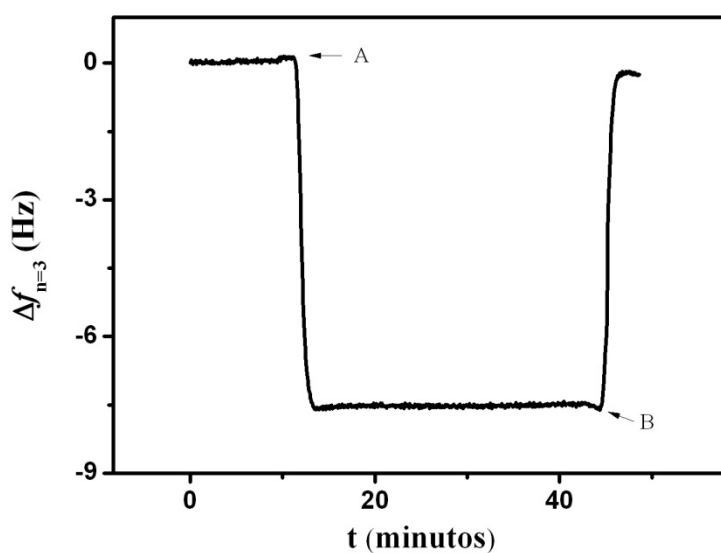
Fonte: Autor.

Figura A2. Curva de $\Delta f(t)$ obtido para o processo de injeção de solução 100 μM de lacto-N-biose sobre cristal funcionalizado com rTgMIC1. A seta em A mostra o início da injeção de solução de carboidrato, enquanto a B o início do processo de lavagem



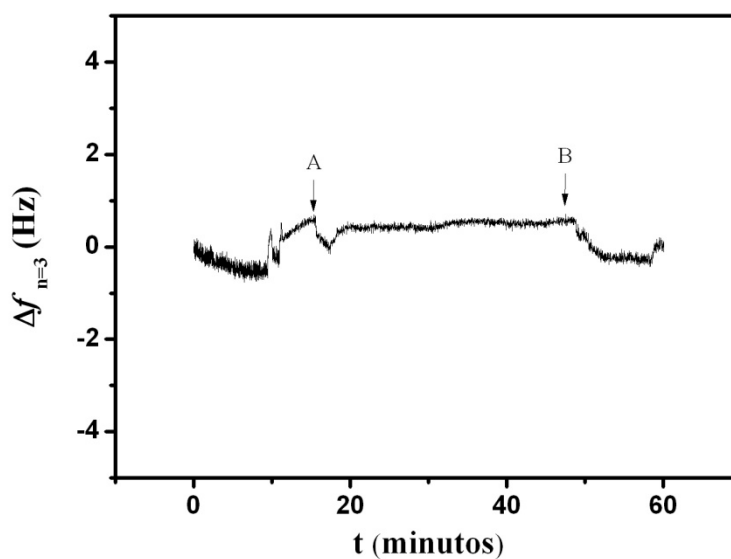
Fonte: Autor.

Figura A3. Curva de $\Delta f(t)$ obtido para o processo de injeção de solução 100 mM de ácido N-acetilneuramínico sobre cristal funcionalizado com rTgMIC1. A seta em A mostra o início da injeção de solução de carboidrato, enquanto a B o início do processo de lavagem



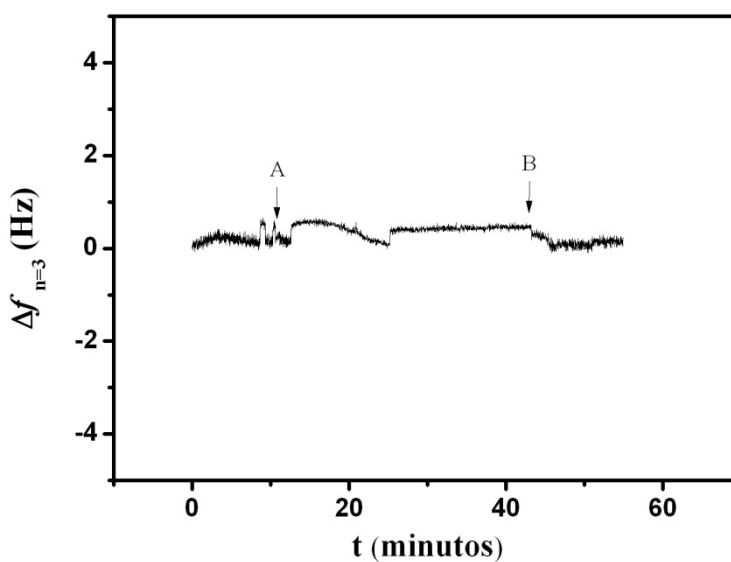
Fonte: Autor.

Figura A4. Curva de $\Delta f(t)$ obtido para o processo de injeção de solução 100 μM de 3'sialillactose sobre cristal funcionalizado com rTgMIC4. A seta em A mostra o início da injeção de solução de carboidrato, enquanto a B o início do processo de lavagem



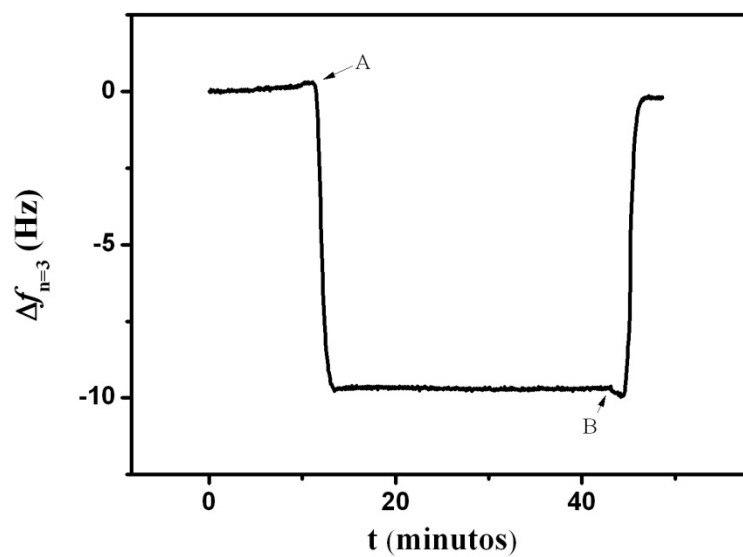
Fonte: Autor.

Figura A5. Curva de $\Delta f(t)$ obtido para o processo de injeção de solução 100 μM de lacto-N-biose sobre cristal funcionalizado com rTgMIC4. A seta em A mostra o início da injeção de solução de carboidrato, enquanto a B o início do processo de lavagem



Fonte: Autor.

Figura A6. Curva de $\Delta f(t)$ obtido para o processo de injeção de solução 100 mM de galactose sobre cristal funcionalizado com rTgMIC4. A seta em A mostra o início da injeção de solução de carboidrato, enquanto a B o início do processo de lavagem



Fonte: Autor.