

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Determinação da constante de afinidade e cinética da interação lectina
ArtinM-célula leucêmica (NB4) por meio de técnicas piezoelétrica e
eletroquímica**

DENISE CRISTINA MARTINS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO 2013

ARARAQUARA

2013

DENISE CRISTINA MARTINS

Determinação da constante de afinidade e cinética da interação lectina ArtinM-célula leucêmica (NB4) por meio de técnicas piezoelétrica e eletroquímica

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno

ARARAQUARA

2013

DADOS CURRICULARES

DENISE CRISTINA MARTINS

DADOS PESSOAIS

Nascimento: 04/11/1986

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Araraquara-SP

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2007-2010 Graduação em Licenciatura e Bacharelado em Ciências
Biológicas.

Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)

INICIAÇÃO CIÊNTÍFICA

2008-2010 Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) - Departamento
de Química Orgânica/ Laboratório de Produtos Naturais.

Bolsista CNPq

Projeto:"Ensaio fungicidas de plantas da ordem Sapindales
frente ao fungo simbiote (Leucoagaricus gongylophorus) e
ações do extrato metanólico de Spiranthera odoratissima no
ninho de formigas cortadeiras". Orientação: Prof. Dr. João
Batista Fernandes

TRABALHOS PUBLICADOS (RESUMOS) E APRESENTADOS EM EVENTOS

FERNANDES,JB ; TEREZAN, A. P. ; **MARTINS, D. C.** ; CARDOSO, S. P ;
SARRIA, A. L. F ; PAGNOCCA, F. C. ; SILVA, M. F. das G. F. da ; VILLARI, M.
F. M. New Methodology to determination of simbiotic fungi (Leucoagaricus
gongylophorus) inhibitors in the control of ants. In: National Convention in
Conjunction with the 12 IUPAC International Congress of Pesticide Chemistry,
Melbourne - Australia, 2010.

BICALHO, K. U. ; **MARTINS, D. C.** ; CAZAL, C. M. ; GARCIA, T. ; CECCATO,
M. ; FERNANDES,JB ; BUENO, O. C. ; TEREZAN, A. P. Avaliação da
toxicidade de extratos e frações de Virola sebifera frente a Atta sexdens
Rubropilosa e seu fungo simbiote. In: XXIII Congresso Brasileiro de
Entomologia, Natal- RN, 2010.

MARTINS, D. C. ; FERNANDES,JB ; TEREZAN, A. P. ; VILLARI, M. F. M. ;
CARDOSO, S. P ; SILVA, M. F. das G. F. da ; PAGNOCCA, F. C. Atividade
fungicida da planta Astronium graveolens frente ao fungo simbiote da formiga

cortadeira (*Leucoagaricus gongylophorus*). In: XVIII Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica da UFSCar, São Carlos, 2010.

MARTINS, D. C.; CARVALHO, F. C.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; BUENO, P. R. Determinação da constante de afinidade da lectina ArtinM-célula leucêmica (NB4) por meio da técnica piezoelétrica de Microbalança a Cristal de Quartzo (QCM). In: III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina -Paraná, 2013.

DENISE CRISTINA MARTINS

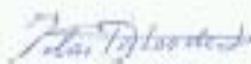
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Araraquara, 22 de novembro de 2013.

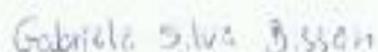
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. PAULO ROBERTO BUENO (Orientador)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



Profª. Drª. MARIA DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



Profª. Drª. GABRIELA SILVA BISSON
Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto / USP / Ribeirão Preto

A Deus, pois me deu a oportunidade da vida. A meus pais, Cida e João, e meu irmão Fernando por terem grande responsabilidade na minha formação, tanto profissional quanto pessoal, pelo incentivo, amizade e amor e ao meu namorado Alexandre pelo carinho, paciência e compreensão

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno pelas orientações, paciência, bom humor nas conversas, amizade e principalmente pela formação profissional passada a mim durante a execução deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Roque-Barreira pela amizade e preocupação durante a minha estada em seu laboratório, pelas discussões e, principalmente pelo apoio na realização da parte biológica deste trabalho.

À Sandra Maria de Oliveira Thomaz pela amizade, por toda a ajuda, mas principalmente pelo acolhimento durante a minha estadia na USP- Ribeirão Preto.

À Fernanda Carvalho pelas discussões, conselhos e pelo total apoio e dedicação durante a realização dos experimentos e escrita deste trabalho.

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

Aos demais amigos Tiago, Fernanda César, Gabriel Mazzi, Juliana, Adriano, Flávio e Welder pela amizade, apoio e carinho, e também por todos os momentos felizes de comemoração e por aqueles não tão felizes, mas que também ajudaram a me tornar uma pessoa melhor.

À CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

A todos, meus sinceros agradecimentos

RESUMO

A lectina vegetal ArtinM, ligante de D-manose, está presente nas sementes da jaca, *Artocarpus heterophyllus* e possui uma estrutura homotetramérica formada pela associação não covalente de subunidades, sendo que cada subunidade representa um CRD (*Carbohydrate Recognition Domain*). Por interagir com N-glicanas presente em células de mamíferos, a ArtinM desencadeia diversos processos biológicos, dentre eles a resposta citotóxica sobre células leucêmicas, em especial células NB4 da leucemia promielocítica aguda. Neste trabalho foi estudada a interação ArtinM-NB4 por técnicas piezoelétricas de Microbalança a Cristal de Quartzo (QCM) e eletroquímicas por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS), para tanto foi desenvolvida uma superfície de reconhecimento capaz de realizar a transdução do evento biológico de interação lectina-carboidrato em elétrico. A superfície de reconhecimento foi formada pela imobilização da lectina ArtinM em superfícies metálicas de Au por meio de uma monocamada auto-organizada, utilizando uma mistura de dois alcanotóis, o ácido 11-mercaptopundecanóico (11-MUA), como ancora, e o 6-mercaptopetanol (6-MetOH), como espaçador. As várias concentrações de células NB4 previamente fixadas foram deixadas em contato com a lectina imobilizada no eletrodo para que ocorressem as interações desejadas. Após as medidas terem sido avaliadas utilizando-se QCM e EIS, e aplicando o modelo da isoterma de Langmuir, foi possível determinar as constantes cinéticas e de afinidade. Nas medidas obtidas utilizando a QCM, para além da constante de afinidade aparente, foi possível extrair os parâmetros cinéticos: K_a (constante de associação cinética) = $(1,8 \pm 1,1) \times 10^{-7}$ mL cel⁻¹, k_{on} (constante de velocidade de associação) = $(3,6 \pm 1,0) \times 10^{-10}$ mL cel⁻¹s⁻¹ e k_{off} (constante de dissociação) = $(20,3 \pm 6,6) \times 10^{-4}$ s⁻¹. O valor da constante de afinidade aparente (K') foi de $(4,4 \pm 0,1) \times 10^{-7}$ mL cel⁻¹ utilizando QCM e $(9,9 \pm 0,2) \times 10^{-5}$ mL cel⁻¹ por EIS, indicando que essa diferença entre os valores pode estar relacionada a diferentes fatores como a utilização de adição sucessiva de NB4 em EIS e análise unitária em QCM, variação na engenharia de superfície e distintas faixa de saturação entre uma técnica e outra. Comparando-se as duas técnicas no estudo da interação ArtinM-NB4 verificou-se que a EIS é mais sensível, pois por meio dela a interação biológica em questão pôde ser detectada utilizando-se uma faixa de concentração de analito menor (10^3 cel mL⁻¹) que a utilizada em QCM (10^6 cel mL⁻¹), evidenciando um grande potencial de aplicação desta técnica para o desenvolvimento de superfícies de reconhecimento e biossensores.

Palavras-chave: ARTINM. LECTINA. QCM. EIS. LEUCEMIA. NB4

ABSTRACT

ArtinM, a D-mannose-binding lectin from *Artocarpus heterophyllus* (jackfruit), interacts with N-glycans on cell surface receptors triggering cell migration, degranulation, and cytokine release. Because malignant transformation is often associated with altered expression of cell surface glycans, this work evaluated the interaction of ArtinM with human myelocytic leukemia cells, such as acute promyelocytic leukemia, NB4, by piezoelectric techniques of the Quartz Crystal Microbalance (QCM) and by electrochemical techniques of Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS). It was developed, for both techniques, a surface recognition capable of performing the biological interaction between lectin-cell and transduce them in electric signal. The surface was formed by immobilization of ArtinM in Au metal surfaces by over a self-organized monolayer constructed by a mixture of two alkanothiols, 11-mercaptoundecanoic acid (11-MUA) as an anchor, and 6-mercaptoethanol (6-MetOH) as a spacer. Concentrations of NB4 cells, previously fixed with paraformaldehyde, were left in contact with the immobilized lectin on electrode. After the interaction measurements evaluated by QCM and EIS, and applying the model of Langmuir isotherm, it was possible to obtain both kinetic and affinity constants. Using QCM, beyond the apparent affinity constant, was possible to extract kinetic parameters K_a (association kinetic constant) = $(1.8 \pm 1.1) 10^{-7} \text{ cel mL}^{-1}$, k_{on} (association constant) = $(3.6 \pm 1.0) \times 10^{-10} \text{ mL cel}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and k_{off} (dissociation constant) = $(20.3 \pm 6.6) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. The value of the apparent affinity constant (K') was $(4.4 \pm 0.1) \times 10^{-7} \text{ cel mL}^{-1}$ by QCM and $(9.9 \pm 0.2) \times 10^{-5} \text{ mL cel}^{-1}$ by EIS, the difference between the values comparing both techniques may be related to different factors such as the use of successive addition of NB4 in EIS comparing the in unitary addition in QCM analysis, variation in surface engineering and distinct saturation range. It means that EIS is more sensitive, once this technique detected biological interaction using a lower range of analyte concentration (10^3 cel mL^{-1}) than QCM (10^6 cel mL^{-1}). In sum this study provide a large potential application of EIS to the development of biosensors and recognition surfaces.

Keywords: ARTINM. LECTIN. QCM. EIS. LEUKEMIA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática da estrutura quaternária da lectina Artin M. Cada monômero possui um CRD.	19
Figura 2 -	Representação esquemática da interação da lectina ArtinM com N-glicanas presentes em glicoproteínas da superfície celular.	20
Figura 3 -	Representação esquemática de uma superfície de reconhecimento conectada a um processador...	23
Figura 4 -	Gráfico comparativo da sensibilidade das técnicas de ELISA, SPR, QCM e EIS para avaliação de interações biológicas.	23
Figura 5 -	Cultivo das células leucêmicas NB4...	30
Figura 6 -	Conjunto utilizado para medidas piezoelétricas, no estudo da formação da superfície de reconhecimento e da interação da ArtinM com as células NB4...	31
Figura 7 -	Esquema da SAM de alcanotóis...	33
Figura 8 -	Processo de ativação dos grupos carboxílicos presentes na cadeia do alcanotiol (11-MUA)...	34
Figura 9 -	Esquema da superfície de reconhecimento...	35
Figura 10 -	Conjunto utilizado para medidas eletroquímicas, no estudo da formação da superfície de reconhecimento e da interação da ArtinM com as células NB4...	36
Figura 11 -	Perfil cromatográfico da purificação de ArtinM. Em A e B a linha azul mostra a absorvância do material em fluxo no sistema <i>AKTA Purifier</i> ...	39
Figura 12 -	Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, mostrando a pureza da ArtinM...	39

Figura 13 - Formação da superfície de reconhecimento...	42
Figura 14 - Curvas da variação de frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para a adição de NB4...	44
Figura 15 - Exemplo de curva de saturação e isoterma de Langmuir...	45
Figura 16 - Isotherma de Langmuir linearizada para a interação ArtinM-NB4...	48
Figura 17 - Curvas da variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo...	52
Figura 18 - Constante de relaxação em função da concentração obtida para o processo de interação ArtinM-NB4...	54
Figura 19 - Atividade citotóxica de ArtinM sobre células NB4...	58
Figura 20 - Gráfico representativo de CV ilustrando o processo de imobilização da mistura de tióis (formação da SAM) sobre o eletrodo de ouro...	60
Figura 21 - Curva representativa da formação da superfície de reconhecimento...	62
Figura 22 - Interação ArtinM-NB4 pela técnica de EIS...	63
Figura 23 - Curva de saturação obtida para a interação ArtinM-NB4...	64
Figura 24 - Gráfico A - Isotherma de Langmuir linearizada para a interação ArtinM-NB4...	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Relação entre a quantidade de NB4 adsorvida ($[NB4]/\Delta f_{média}$) e a concentração da mesma em solução ($[NB4]$).	47
Tabela 2 -	Constante de relaxação para a interação ArtinM-NB4, obtidos do ajuste das curvas ($\Delta f \times t$) ...	53
Tabela 3 -	Valores das constantes de associação, dissociação e de associação cinética da interação Artin M-NB4.	55
Tabela 4 -	Tabela comparativa dos parâmetros cinéticos da interação ArtinM-NB4...	56
Tabela 5 -	Relação entre a quantidade de NB4 adsorvida ($[NB4]/R_{ct}$) e a concentração da mesma em solução ($[NB4]$)...	63
Tabela 6 -	Comparação entre as técnicas de Microbalança a Cristal de Quartzo (QCM) e a de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS...	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bel 7402	Células hepáticas tumorais
CRD	Domínio não catalítico de reconhecimento de carboidrato
ConA	Lectina concavalina A
DBA	Lectina <i>Dolichos biflorus</i>
EIS	Espectroscopia de impedância eletroquímica
HPA	<i>Helix pomatia agglutinin</i>
K_a	Constante de associação cinética da interação
K'	Constante de afinidade aparente da interação
k_{on}	Constante de velocidade de associação
k_{off}	Constante de velocidade de dissociação
L-02	Células hepáticas normais
NB4	Células da leucemia promielocítica aguda
PNA	Lectina <i>Peanut agglutinin</i>
QCM	Microbalança a cristal de quartzo
SBA	Lectina <i>Soybean agglutinin</i>

SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) na presença do detergente SDS
SW480	Células não metastáticas colorretais
SW620	Células metastáticas colorretais
UEA-I	Lectina <i>Ulex europaeus agglutinin I</i>
WGA	Lectina <i>Wheat germ agglutinin</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Interação lectina-carboidrato	18
1.2	A construção da superfície de reconhecimento para estudo de interações biomoleculares	22
1.3	Isoterma de Langmuir e estudo da interação lectina-carboidrato	24
1.4	Microbalança a Cristal de Quartzo (QCM – <i>quartz crystal microbalance</i>)	25
1.5	Espectroscopia de impedância Eletroquímica (EIS- <i>electrochemical impedance spectroscopy</i>)	26
2	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	28
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	28
3.1	Parte Biológica	29
3.1.1	Purificação de ArtinM	29
3.1.2	Dosagem protéica e análise da pureza	29
3.1.3	Cultivos das células NB4	30
3.2	Parte Físico-Química	31
3.2.1	Medidas Piezoelétricas	31
3.2.1.1	Instrumentação	31
3.2.1.2	Limpeza dos cristais	32
3.2.1.3	Funcionalização do transdutor	32
3.2.1.4	Avaliação da interação ArtinM-NB4	34

3.2.2	Medidas Eletroquímicas	35
3.2.2.1	Instrumentação	35
3.2.2.2	Polimento, limpeza e caracterização do eletrodo	36
3.2.2.3	Funcionalização do transdutor	37
3.2.2.4	Avaliação da interação ArtinM-NB4	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	Parte Biológica	38
4.1.1	Obtenção da lectina ArtinM	38
4.2	Parte Físico-Química	40
4.2.1	Medidas Piezoelétricas	40
4.2.1.1	Limpeza dos cristais de quartzo e construção da superfície de reconhecimento para os testes piezoelétricos	41
4.2.1.2	Estudo da interação ArtinM-NB4	42
4.2.1.3	Determinação da constante de afinidade aparente (K') da interação ArtinM-NB4 por meio do modelo da Isoterma de Langmuir	46
4.2.1.4	Determinação dos parâmetros cinéticos da interação ArtinM-NB4 por meio do modelo da Isoterma de Langmuir	48
4.2.2	Medidas Eletroquímicas	58
4.2.2.1	Limpeza dos eletrodos de ouro e formação da monocamada de tióis	59
4.2.2.2	Imobilização da ArtinM e bloqueio com gelatina	61
4.2.2.3	Estudo da interação ArtinM-NB4	62
4.2.2.4	Determinação da constante de afinidade aparente (K') da interação ArtinM-NB4 por meio do modelo da Isoterma de	65

	Langmuir	
4.2.3	Comparação entre as técnicas EIS e QCM, na determinação da constante de afinidade	67
5	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 INTERAÇÃO LECTINA-CARBOIDRATO

Lectinas são proteínas de origem não imune que possuem pelo menos um domínio não catalítico de reconhecimento de carboidrato (CRD - *Carbohydrate Recognition Domain*) e se ligam de maneira específica e reversível a açúcares (VAN-DAMME et al., 1998). É possível encontrar lectinas em vários organismos, incluindo plantas, vírus, bactérias, fungos e animais (LIS; SHARON, 1986; SHARON; LIS, 1989). Essas proteínas são capazes de se ligarem seletivamente à glicanas da superfície de muitas células e medeiam interações célula-célula e célula-microambiente que gera processos fisiológicos como ativação, diferenciação, proliferação e morte celular, metastase de tumores e interação parasita-hospedeiro (LIS; SHARON, 1986).

As lectinas vegetais, produzidas pelo metabolismo secundário de plantas, são utilizadas em estudos biológicos pela sua ação anti-parasítica, anti-viral (PEUMANS; VAN-DAMME, 1995; RÜDIGER, 1998) e anti-tumoral (GORELIK et al., 2001). Além disso, são ferramentas úteis na identificação dos glicocojugados presentes na superfície celular e de glicanas aberrantes próprias de células neoplásicas (GABIUS, 1996; KAPPOR et al., 2008). As lectinas vegetais vêm sendo utilizadas como potenciais ferramentas indutoras de morte de células cancerígenas, atuando sobre alvos que corresponderiam a carboidratos aberrantes da superfície de células transformadas (GORELIK et al., 2001).

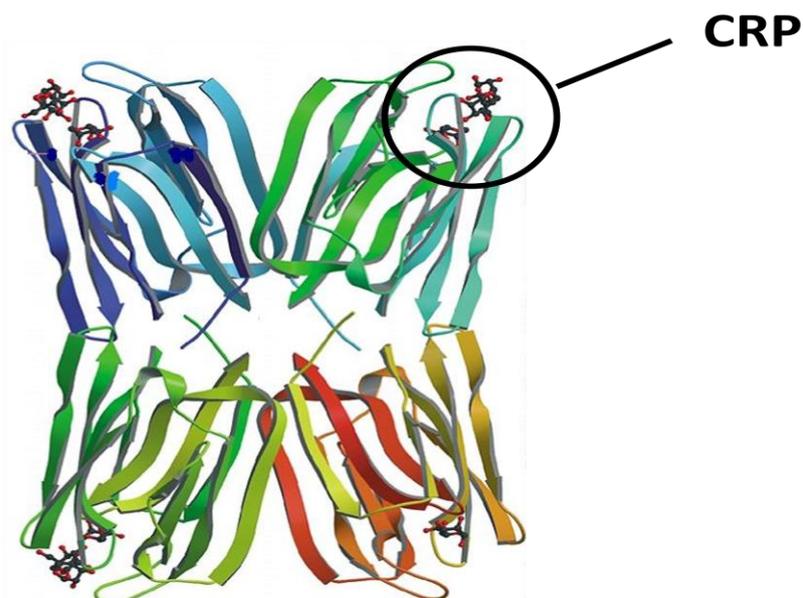
Neste trabalho deu-se destaque a lectina vegetal ArtinM, que juntamente com a lectina Jacalina, ligante de D-galactose, está presente nas sementes da jaca, *Artocarpus heterophyllus*. A ArtinM está presente em pequenas concentrações, representando 0,5% das proteínas totais da semente e a Jacalina corresponde a 50% do total das proteínas da semente (FUNDAÇÃO...,2005). A ArtinM é ligante de D-manose e sua análise eletroforética indica ter uma massa molecular aparente de 54 kDa, correspondente a um homotetrâmero (Fig. 1) formado pela associação não

covalente de subunidades de 16 kDa (ROSA et al., 1999) e migra, em SDS-PAGE, como um peptídeo de 13 kDa (OLIVEIRA et al., 1994). Cada subunidade apresenta um CRD.

À ArtinM são atribuídas diversas atividades biológicas, como ativação de neutrófilos (GANIKO et al., 2005; SILVA et al., 2012; TOLEDO et al., 2009) e desgranulação de mastócitos (MORENO et al., 2003), imunomodulação para o perfil Th1 (SOUZA et al., 2013; COLTRI et al., 2008; PANUNTO-CASTELO et al., 2001, TEXEIRA et al., 2006), regeneração tecidual (CHAHUD et al., 2009; KIM et al., 2013) e atividade citotóxica sobre células leucêmicas (CARVALHO et al., 2011). Estas atividades são mediadas pelo reconhecimento de N-glicanas, contendo manose, presentes na superfície celular (Fig.2).

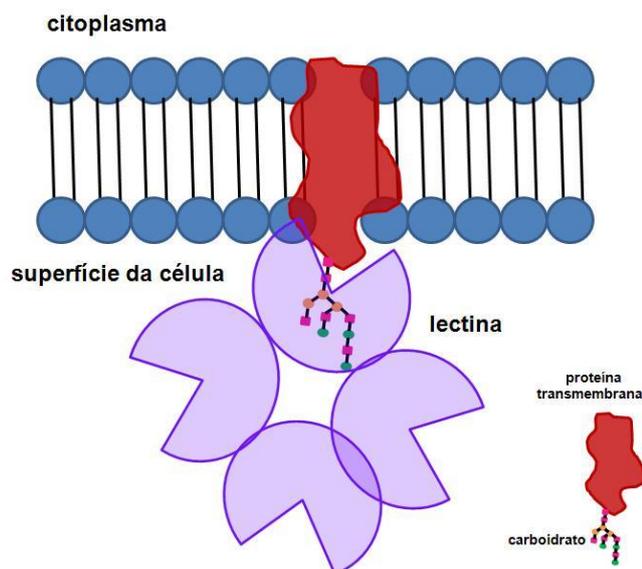
A verificação da especificidade da ArtinM com as N-glicanas na superfície das células NB4 da leucemia promielocítica aguda foi realizada no trabalho de Carvalho e colaboradores (2011). Estes autores demonstraram a importância da expressão de glicanas aberrantes nas células NB4 para que a lectina ArtinM se ligue à superfície dessas células e sobre elas exerçam efeito citotóxico.

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura quaternária da lectina ArtinM. Cada monômero possui um CRD.



Fonte: Jeyaprakash et al., (2012)

Figura 2 – Representação esquemática da interação da lectina ArtinM com N-glicanas presentes em glicoproteínas da superfície celular. Por meio desta interação a ArtinM pode realizar várias atividades biológicas, como ativação de neutrófilos e desgranulação de mastócitos, imunomodulação para o perfil Th1, regeneração tecidual e atividade citotóxica sobre células leucêmicas.



Fonte: Próprio autor

A especificidade das lectinas por carboidratos tem sido intensamente estudada, pois o entendimento desta interação é de grande importância para a compreensão de suas funções biológicas (RUDGER; GABIUS, 2001). Técnicas que captam sinais indiretos das interações (ex. via lectina conjugada a fluorocromos, biotina ou enzimas) são amplamente utilizadas para monitorar a ligação lectina-carboidrato, e juntamente com técnicas cristalográficas foram utilizadas no estudo da interação da lectina ArtinM com D-manose, verificando que essa lectina liga-se especificamente com o trimanosídeo $\text{Man}\alpha 1-3(\text{Man}\alpha 1-6)\text{Man}\beta 1-4$, sendo que o alongamento da N-glicana no braço $\text{Man}\alpha 1-6$ contribui para a interação (JEYAPRAKASH et al., 2004; NAKAMURA-TSURUTA et al., 2008). As constantes cinéticas e de afinidade da interação lectina ArtinM (nativa e recombinante) com a peroxidase, glicoproteína rica em N-glicanas, foi realizada pela técnica piezoelétrica de Microbalança à Cristal de Quartz, fornecendo medidas quantitativas da interação ArtinM-carboidrato (PESQUERO et al., 2010)

Métodos de detecção direta, sem previa conjugação da lectina com marcadores, e que fornecem medidas da cinética da interação e constantes de afinidade como métodos pizoeléticos, ex. Microbalanca a Cristal de Quartzo – QCM, e eletroquímicos, ex. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica – EIS, vem sendo empregados para estudo da interação de lectinas vegetais com carboidratos de glicoproteínas, microrganismos e células de mamíferos (Quad. 1).

Quadro 1 – Estudos da Interação lectina-carboidrato por técnica piezoelétrica e eletroquímica.

TÉCNICA	MODELO	INTERAÇÃO	REFERÊNCIA
QCM	lectina/glicoproteínas	ArtinM/peroxidase	Pesquero et al., 2010
		ConA/Manana; ConA/CarboxipeptidaseY; ConA, WGA, UEA, LCA/fetuína, transferrina e fibrinogênio;	Pei et al., 2005 Lebed et al., 2006 Yakovleva et al., 2010
	lectina/microrganismos	ConA/ <i>Escherichia coli</i> WGA/ <i>Campylobacter jejuni</i>	Shen et al., 2007 Yakovleva et al., 2011
	lectina/células de mamíferos	ConA, WGA/células hepáticas L-02	Tan et al., 2008
EIS	lectina/glicoproteínas	Cramoll/LPS	Oliveira et al., 2011
		ConA/fetoproteína ConA/manose PNA/gangliosídeo	Yang et al., 2013 Loaiza et al., 2011 Steinem et al., 1997
	lectina/microrganismos	ConA/ <i>Desulforibrio caledoiensis</i>	Wan et al., 2009
	lectina/células de mamíferos	ConA/células tumorais hepáticas	Hu et al., 2013

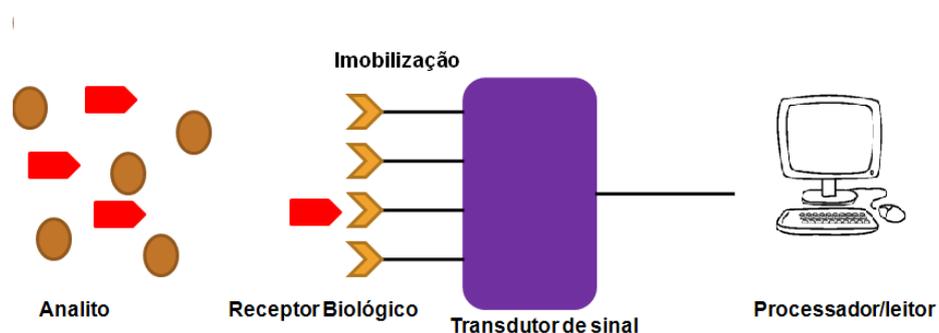
Fonte: Próprio autor

1.2 A CONSTRUÇÃO DE SUPERFÍCIE DE RECONHECIMENTO PARA ESTUDO DE INTERAÇÕES BIOMOLECULARES

O estudo da interação lectina-carboidrato pode ser realizado por meio do desenvolvimento de superfícies de reconhecimento, que são capazes de decodificar os processos de reconhecimento molecular em sinais mensuráveis, auxiliando no estudo e na caracterização de eventos biológicos (FATIBELLO FILHO; CAPELATO, 1992; REUEL et al., 2012; STONES et al., 2009).

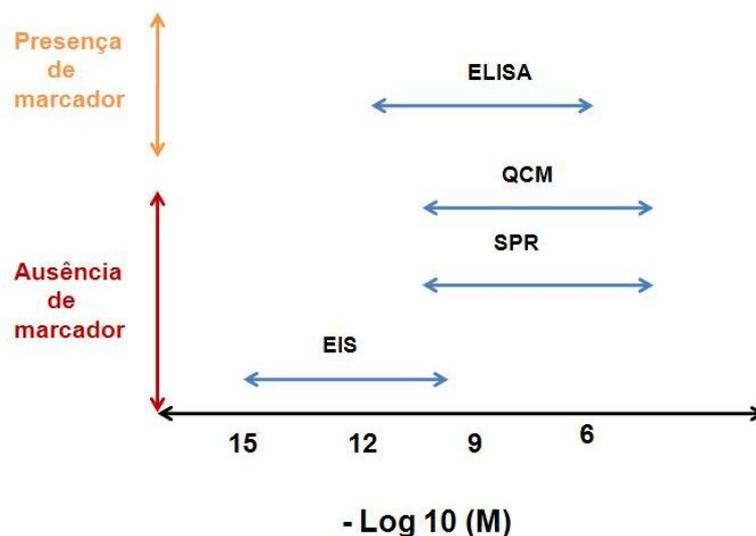
Superfícies de reconhecimento podem ser criadas por meio da utilização de um material biológico (células, proteínas, enzimas, tecido animal e vegetal, entre outros) que é conectado a um transdutor (qualquer dispositivo capaz de transformar um tipo de sinal em outro), que converte um sinal biológico em um sinal elétrico. Para tal fim, o material biológico é imobilizado em uma membrana adequada, que é acoplada junto à superfície do transdutor, o qual monitora as reações e/ou associações que ocorrem entre o material biológico imobilizado e o material de interesse (FATIBELLO FILHO; CAPELATO, 1992; MALHOTRA; TURNER, 2003) (Fig. 3). Dentre as técnicas que utilizam esse princípio, há técnicas colorimétricas como o ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), ópticas como o SPR (*surface plasmon resonance*), piezoelétricas como a QCM (*quartz crystal microbalance*), eletroquímicas como a EIS (*electrochemical impedance spectroscopy*), entre outras, cada uma possuindo uma capacidade distinta de detectar variações nas concentrações no material de interesse, ou seja, possuindo um grau de sensibilidade específico (Fig. 4) (DAMOS et al., 2004; GIL; MELO, 2010; PEDROSO et al., 2012). Neste trabalho utilizaram-se as duas últimas técnicas QCM e EIS, ambas não utilizam marcadores conjugados à biomolécula e são altamente sensíveis.

Figura 3 – Representação esquemática de uma superfície de reconhecimento conectada a um processador. A molécula biológica é imobilizada na superfície do transdutor por meio de uma membrana adequada. Esta permite a decodificação da interação entre a biomolécula imobilizada e seu analito específico em um sinal mensurável, que é lido no processador.



Fonte: Próprio autor

Figura 4 – Gráfico comparativo da sensibilidade das técnicas de ELISA, SPR, QCM e EIS para avaliação de interações biológicas. Dentre as técnicas que não utilizam marcadores a EIS se mostra mais sensível.



Fonte: Próprio autor

Para a construção de superfícies de reconhecimento mais sensíveis e de maior confiabilidade, o processo de imobilização deve permitir que as biomoléculas mantenham-se fixas e estáveis sobre as superfícies condutoras, garantindo a preservação das suas propriedades biológicas de

reconhecimento. Existem várias metodologias para formar camadas funcionais finas sobre as superfícies condutoras, como por exemplo: adsorção, ligação cruzada, ligação covalente e encapsulamento em géis ou membranas (CARVALHAL, 2005; GIL;MELO, 2010).

A metodologia de imobilização por meio das monocamadas auto-organizadas (SAMs *self-assembled monolayer*) é constituída por uma ligação covalente entre moléculas orgânicas, presentes em solução líquida ou em fase gasosa, e as superfícies metálicas. Dentre outros metais, o ouro é o mais comumente utilizado, pois é considerado razoavelmente inerte e possui alta afinidade a grupamentos tióis (CARVALHAL, 2005; FREIRE et al., 2003; SANTOS, 2012). Os grupos funcionais livres da molécula orgânica, correspondentes as extremidades que não está presa ao metal, podem ser grupamentos metila (CH_3), carboxila ($-\text{COOH}$), amina ($-\text{NH}_2$), hidroxila ($-\text{OH}$) ou uma mistura dos mesmos. Por essas extremidades qualquer biomolécula pode ser acoplada (EDVARDSSON et al., 2005).

1.3 ISOTERMA DE LANGMUIR E ESTUDO DA INTERAÇÃO LECTINA-CARBOIDRATO

O modelo das isotermas de Langmuir pode ser utilizado para a determinação dos parâmetros de afinidade de vários sistemas, como por exemplo, no estudo da interação entre lectina e carboidrato das células. Este modelo considera que (1) a superfície é uniforme e a espécie adsorvedora é rígida, (2) capaz de ligar-se reversivelmente, ou seja, processo dinâmico em que a dessorção e adsorção ocorrem (analito liga e desliga da molécula imobilizada), (3) todos os sítios de adsorção são equivalentes uns aos outros, sendo que o calor de adsorção é o mesmo para todos os sítios e não depende da fração coberta e (4) não existe interação entre moléculas situadas em sítios diferentes, sendo que a velocidade de uma molécula ser adsorvida num certo sítio é independente da ocupação dos sítios vizinhos (MOORE, 1976; PESQUERO et al., 2010; SANTOS, 2012).

Por meio da variação de um sinal analítico (alterações de frequência, massa, resistência de transferência de carga, entre outros) que é obtido diretamente pela taxa de adsorção de moléculas de proteína em função da concentração, é possível construir uma curva de saturação, e por meio desta aplica-se o modelo da isoterma de Langmuir permitindo o cálculo da constante de afinidade, conforme será detalhado mais adiante. (PESQUERO et al., 2010; LEBED et al., 2006; KARPOVICH; BLANCHARD, 1994)

1.4 MICROBALANÇA A CRISTAL DE QUARTZO (QCM – QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE)

A QCM é uma técnica baseada no fenômeno da piezoelectricidade que consiste na capacidade que alguns cristais possuem de gerar um campo elétrico quando os mesmos sofrem algum estresse mecânico ou o efeito oposto - a aplicação de uma voltagem sobre o cristal provocando distorções físicas no mesmo (ANDRADE et al., 1991; COOPER; HAUSMAN, 2007)

O material mais comumente utilizado e que possui essa propriedade piezoelétrica é o quartzo α , que consiste de uma forma cristalina específica do dióxido de silício (SiO_2), sendo insolúvel em água e resistente a altas temperaturas. A piezoelectricidade ocorre em cristais que não possuem um centro de simetria em sua estrutura cristalina, levando ao aparecimento de dipolos elétricos. O efeito piezoelétrico surge quando a compressão sobre um material dielétrico deforma o entrelaçamento cristalino, causando uma separação dos centros de gravidade de espécies opostamente carregadas, o que provoca um momento dipolar em cada molécula (ANDRADE et al., 1991; DAMOS et al., 2004). Esta alteração provoca o aparecimento de cargas elétricas nas faces do cristal, sendo que a intensidade da carga elétrica gerada é dependente da intensidade da força aplicada no material e da orientação de seus dipolos em relação as suas faces. 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 (deformação do material). Quando se aplica uma diferença de potencial alternada, o cristal oscila continuamente (ANDRADE et al., 1991; SANTOS, 2012).

Por meio da técnica de QCM é possível relacionar a variação de frequência na oscilação no cristal de quartzo e a variação de massa na superfície do mesmo, pois quando uma interação ocorre a massa sobre a superfície do cristal aumenta e por consequência sua frequência de oscilação diminui de maneira proporcional de acordo com a relação de Sauerbrey (Eq. 1) (DAMOS et al., 2004; PEDROSO et al., 2012; PESQUERO et al., 2010; SANTOS, 2012). Utilizando as variações de frequência é possível a construção de uma curva cinética e de saturação que obedecendo à isoterma de Langmuir permitem os cálculos das constantes cinéticas e de afinidade da interação receptor-ligante.

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

Na equação 1 temos que Δf é a variação da frequência, f_0 é a frequência fundamental do cristal de quartzo, Δm é a variação da massa sobre o eletrodo, ρ_q é a densidade do cristal de quartzo, F_q é a constante de frequência ($F_q = f_0 d_q$, sendo que d_q é a espessura do cristal) e A_{el} é a área do eletrodo depositada sobre o cristal.

De acordo com os trabalhos de Tan e colaboradores (2009) e Huang e colaboradores (2010), a QCM devido a sua alta sensibilidade, operação fácil e monitoramento dinâmico, tem facilitado vários estudos de interação biológica como o monitoramento do efeito citotóxico de algumas drogas sobre células tumorais e a detecção de pequenas concentrações de substâncias que indicam a existência de células cancerígenas no organismo.

1.5 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA (EIS – ELECTROCHEMICAL IMPEDANCE SPECTROSCOPY)

O termo impedância elétrica denota uma oposição ao fluxo de elétrons ou à corrente. Em circuitos de corrente contínua, apenas resistores conseguem

produzir este efeito. Entretanto, em circuitos de corrente alternada (CA), dois outros elementos do circuito podem impedir o fluxo de elétrons, os capacitores e os indutores. A impedância pode ser expressa como um número complexo, no qual a resistência (Z') é o componente real e a capacitância combinada com a indutância é o componente imaginário (Z''). A impedância total em um circuito é a oposição combinada de todos os seus resistores, capacitores e indutores para o fluxo de elétrons. Para a oposição de capacitores e indutores é dado o nome de reatância (BARD, 2001; LISDAT; SCHÄFER, 2008).

Na EIS surge uma corrente de natureza senoidal em resposta a aplicação de um potencial senoidal ao sistema. Este método de aplicação de um potencial senoidal de pequena amplitude possibilita que o sistema seja perturbado empregando poucos milivolts, de forma a tornar possível a investigação de fenômenos eletroquímicos próximos ao estado de equilíbrio. Além disso, é possível perturbar o sistema usando diferentes valores de frequência, pois a onda de potencial é senoidal. Mediante um monitoramento das relações entre o potencial aplicado e a corrente são obtidas a impedância do sistema e o ângulo de fase (defasagem da corrente em relação ao potencial aplicado). Com isso, é possível estudar processos de transporte de carga, condutividade de filmes, capacitância redox e de dupla camada e coeficientes de difusão de portadores de carga (BARD, 2001; CARVALHO et al., 2006).

Os ensaios eletroquímicos com moléculas biológicas são realizados com a imobilização das biomoléculas receptivas (anticorpos, ácidos nucleicos, células, proteínas ou peptídeos) na superfície do eletrodo e convertendo o evento de ligação da biomolécula com seu ligante em um sinal elétrico mensurável. A modificação da superfície do eletrodo gera uma barreira eletrostática ou mecânica para espécies redox contidas na solução, refletindo assim, em uma resistência de transferência de carga. Quando a superfície do eletrodo é cuidadosa e adequadamente modificada com a biomolécula, essa barreira pode estar relacionada à ligação muito sensível entre biomolécula e ligante. Desta maneira, é possível estudar e avaliar interações moleculares em vários sistemas biológicos. As variações eletroquímicas obtidas permitem a construção de uma curva de saturação (curva analítica) que obedecendo a isoterma de Langmuir permite o cálculo da constante de afinidade. Um exemplo

do emprego da EIS é na detecção, no organismo, de níveis muito baixos de substâncias ou biomoléculas que indicam o início de certas patologias, possibilitando assim, um tratamento precoce (JOHNSON et al., 2012; REUEL et al., 2012).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

De acordo com o trabalho de Carvalho e colaboradores (2011), a lectina ArtinM é hábil em gerar um efeito anti-tumoral, promovendo morte de células da leucemia mielóide, mais precisamente das NB4, por um processo de autofagia. Este evento é mediado pela interação da lectina com o braço de glicosilação aberrante b1-6GlcNAc das N-Glicanas na superfície celular. Esses resultados nos incentivaram a aprofundar o entendimento da interação da ArtinM com as células leucêmicas NB4, agora sobre um ponto de vista físico-químico. Tais conhecimentos podem abrir perspectivas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a interação ArtinM-NB4 por meio do desenvolvimento de uma superfície de reconhecimento capaz de realizar a transdução do evento biológico de interação proteína-ligante em sinal elétrico por meio das técnicas de QCM e EIS.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A seção de procedimento experimental deste trabalho foi dividida em duas partes, a primeira corresponde à parte biológica, realizada em parceria com o Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia do Departamento de Biologia Molecular e Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), coordenado pela Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Roque-Barreira: purificação da ArtinM e ao cultivo das células leucêmicas, e a segunda está relacionada às medidas físico-químicas, realizadas no Laboratório de Eletroanálise do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química da Unesp Araraquara: utilização da técnica de QCM e da técnica de EIS.

3.1 Parte biológica

3.1.1 Purificação de ArtinM

Para o preparo do extrato bruto de sementes de jaca (*Artocarpus heterophyllus*), aproximadamente, 100 g do pó obtido por moagem das sementes secas foi adicionado a 1 litro de PBS (solução salina tamponada com fosfato, pH 7,4). A mistura obtida foi incubada por 16 h a 4°C, o sobrenadante foi coletado e ultradiafiltrado contra PBS, utilizando-se sistema Amicon e membrana YM10 (Amicon Division). A lectina ArtinM foi purificada por cromatografia de afinidade de acordo com o procedimento descrito por Santos-de-Oliveira e colaboradores (1994). O extrato bruto de sementes de jaca foi aplicado em coluna Sepharose® D-galactose (Pierce) e o material ligante foi eluído com D-Galactose 0,1 molL⁻¹ (Sigma), constituindo a fração Jacalina. O material não ligante foi passado pela coluna Sepharose® D-manose (Pierce) e eluído com 0,1 molL⁻¹ de D-Manose (Sigma), constituindo a fração ArtinM. Separadamente, essas frações foram ultradiafiltradas contra água deionizada utilizando sistema Amicon e membrana YM10 (Amicon), e armazenada a -20 °C.

3.1.2 Dosagem protéica e análise da pureza

A dosagem protéica foi procedida utilizando-se o kit BCA (Sigma), constituída de solução de ácido bicinrônico e sulfato de cobre. As concentrações protéicas foram calculadas utilizando-se a curva de regressão linear, a partir de curva padrão de BSA (Soroalbumina bovina, Sigma). A leitura foi realizada a 562 nm no leitor de microplacas Power Wave x (bio-tek).

As preparações da lectina ArtinM teve seu grau de pureza avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % (LAEMMLI, 1970), na presença de dodecil sulfato de sódio 0,01% (SDS PAGE), utilizando sistema Versatile Mini-Protean 3 Eletrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories). Foram aplicadas amostras de 2 a 4 µg de cada preparação, fervidas por 3 minutos a 100 °C. As corridas foram feitas sob 200 volts constantes, com corrente variando de 15 a

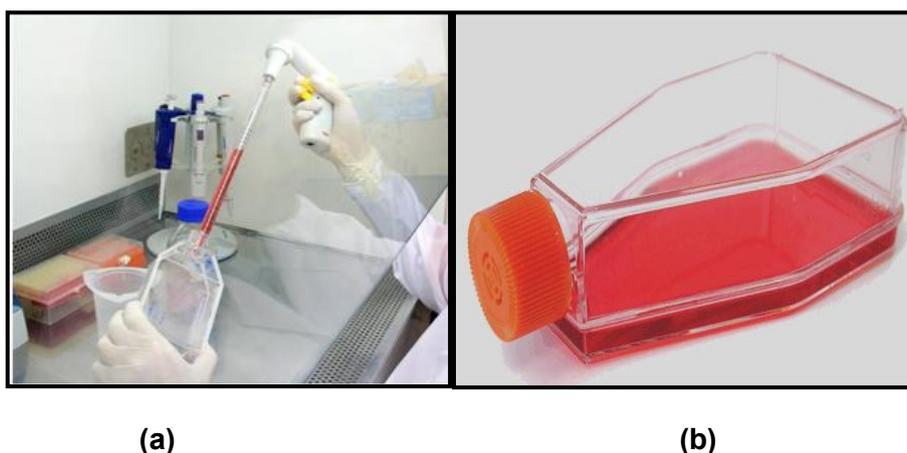
20 mA, durante aproximadamente 50 min. As bandas protéicas foram reveladas pela coloração com prata (BLUM et al., 1987).

3.1.3 Cultivo das células NB4

A linhagem tumoral NB4 (leucemia promielocítica aguda) foi cultivada a 37°C em estufa umidificada contendo 5% de CO₂, em meio RPMI 1640 suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 100 µg mL⁻¹ de penicilina e 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina. As trocas dos meios foram feitas a cada 48 horas (Fig.5).

Parte das células foi coletada, lavada duas vezes com PBS por 5 minutos a 1500 rpm e incubadas com paraformaldeído 2% em PBS por 20 min. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e incubadas com solução de Glicina 1% por 10 min, seguido de nova lavagem com PBS. As células foram ressuspensas e contadas em câmara de Neubauer (Weber Scientific International). Os volumes foram ajustados de acordo com a concentração de células necessárias para realizar as medidas.

Figura 5 – Cultivo das células leucêmicas NB4. (a) Repique das células em garrafas contendo meio RPMI 1640 suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 100 µg mL⁻¹ de penicilina e 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina; (b) Garrafa contendo células e o meio de cultura específico para o crescimento.



Fonte: Próprio autor

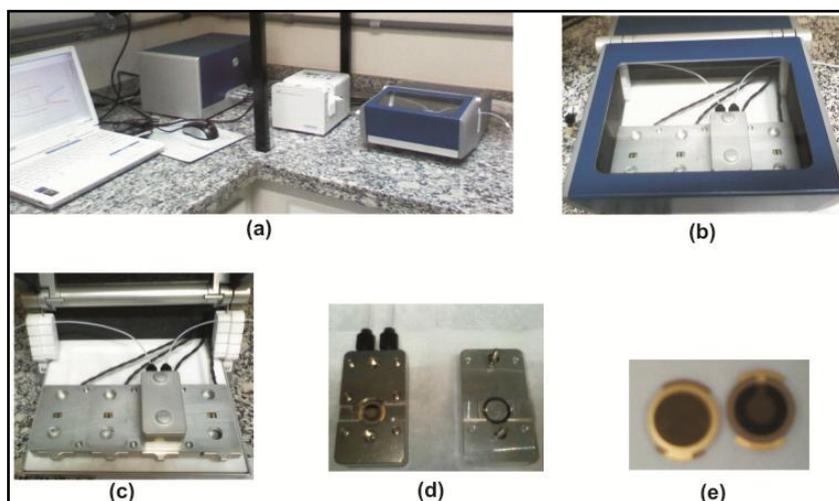
3.2 Parte Físico-Química

3.2.1 Medidas Piezoelétricas

3.2.1.1 Instrumentação (Fig.6)

- Cristais de quartzo piezoelétricos de corte AT com frequência fundamental de 5 MHz e com 16 mm de diâmetro, contendo eletrodos de ouro concêntricos depositados em ambos os lados do cristal.
- Microbalança da Q-sense (QCM-D) modelo E4 com sensibilidade de $1,8 \text{ ng cm}^2$, que em meio líquido são correspondentes a $0,1 \text{ Hz}$;
- Câmara de fluxo paralelo contínuo com compartimento de $40 \text{ }\mu\text{L}$ de volume, onde é fixado o cristal de quartzo. Estas câmaras de medidas possuem controle de temperatura, podendo variar entre 18 e $50 \text{ }^\circ\text{C}$ com estabilidade de $0,02 \text{ }^\circ\text{C}$.

Figura 6 - Conjunto utilizado para medidas piezoelétricas, no estudo da formação da superfície de reconhecimento e da interação da ArtinM com as células NB4. (a) visão geral do equipamento. Da esquerda para a direita: notebook contendo o *software* do equipamento Q-Sense modelo E4 (Q-Soft), circuito oscilador, bomba peristáltica, compartimento das câmaras; (b) visão do compartimento da câmara de injeção; (c) câmara conectada nos tubos de injeção; (d) câmara aberta mostrando a disposição do cristal de quartzo e (e) visão superior e inferior do cristal de quartzo.



Fonte: Próprio autor

3.2.1.2 Limpeza dos cristais

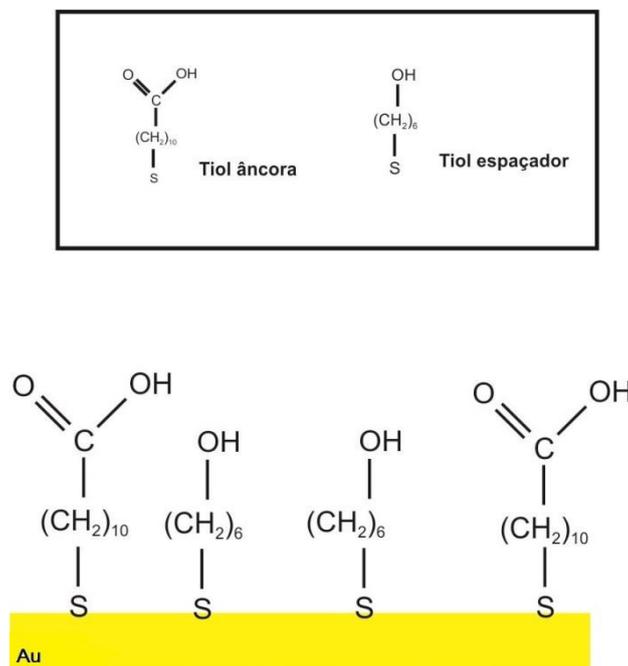
Os cristais foram limpos com uma solução de ácido sulfúrico concentrado, H_2SO_4 (Synth) e peróxido de hidrogênio, H_2O_2 30% (Synth) na proporção 7:3 (v/v), respectivamente. Em seguida, foram enxaguados com água destilada e secos ao ar. Esta solução é extremamente reativa e sua preparação e utilização foram realizadas em capela utilizando equipamentos de proteção individual.

3.2.1.3 Funcionalização do transdutor

A funcionalização do transdutor, o cristal de quartzo piezoelétrico foi realizada por meio da formação de monocamada auto-organizada de alcanotióis. Uma monocamada homogênea foi construída a partir de uma solução contendo dois alcanotióis, o ácido 11-mercaptoundecanóico (11-MUA) e o 6-mercapto-1-hexanol (6-MetOH) nas concentrações de $1,0 \times 10^{-4}$ e $1,0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} (1:100), respectivamente. O 11-MUA foi utilizado para a ligação da lectina, por meio de uma ligação entre um grupamento amina presente na estrutura da proteína e o grupamento carboxílico presente em uma das extremidades da molécula do alcanotiol. O 6-MetOH foi utilizado como espaçador entre as moléculas de ArtinM, para diminuir o impedimento estérico entre as espécies do analito (células NB4) (Fig.7).

O espaçamento, entre as cadeias de 11-MUA na superfície sensora, promovido pelo 6-MetOH é de extrema importância, pois a determinação dos parâmetros de afinidade e cinéticos de interações lectina-carboidrato, estando a molécula de lectina imobilizada em uma superfície rígida, é altamente afetado pelo impedimento estérico. O impedimento estérico durante as interações ArtinM-NB4 é uma consequência da proximidade entre as moléculas de lectina imobilizada na superfície do transdutor e do tamanho das moléculas biológicas utilizadas, pois a lectina e a célula possuem estruturas grandes.

Figura 7 – Esquema da SAM de alcanotióis. O 11-MUA foi utilizado como tiol âncora da lectina e o 6-MetOH foi utilizado com espaçador para diminuir o impedimento estérico entre as biomoléculas.

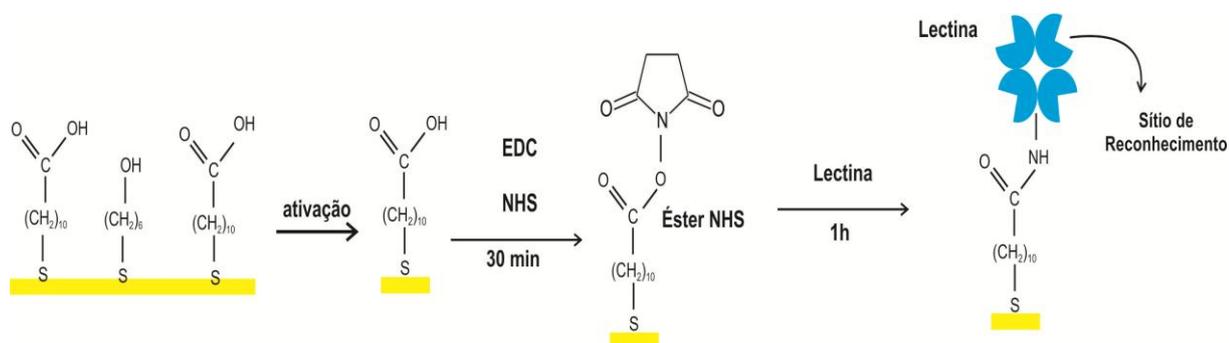


Fonte: Próprio autor

A mistura dos alcanotióis foi preparada em etanol (Chemis), e nesta solução o transdutor foi imerso por um período de 12 h. Em seguida o cristal foi lavado com etanol e solução tampão fosfato salina $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 7,0 (PBS, *phosphate buffer saline*). Subsequentemente, o cristal foi imerso, por 2 h, em uma solução de EDC (N-etil-N-(dimetilaminopropil) carbodiimida) e NHS (N-hidroxisuccinimida) de concentração $1,0 \times 10^{-2}$ e $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, para a ativação dos grupamentos carboxílicos (Fig. 8).

Novamente o cristal foi lavado com PBS e em seguida, mantido por 2 h, em uma solução $0,15 \text{ mg mL}^{-1}$ da lectina ArtinM. Após este período o cristal foi lavado com PBS e exposto a uma solução de gelatina 0,1 % por 2 h, para o bloqueio dos grupamentos carboxílicos remanescentes e novamente lavado com PBS e seco ao ar.

Figura 8 – Processo de ativação dos grupos carboxílicos presentes na cadeia do alcanotiol (11-MUA). Quando a solução de EDC e NHS entra em contato com a SAM de 11-MUA ocorre a formação de éster-NHS, composto estável que aumenta a eficiência do processo de imobilização da lectina.



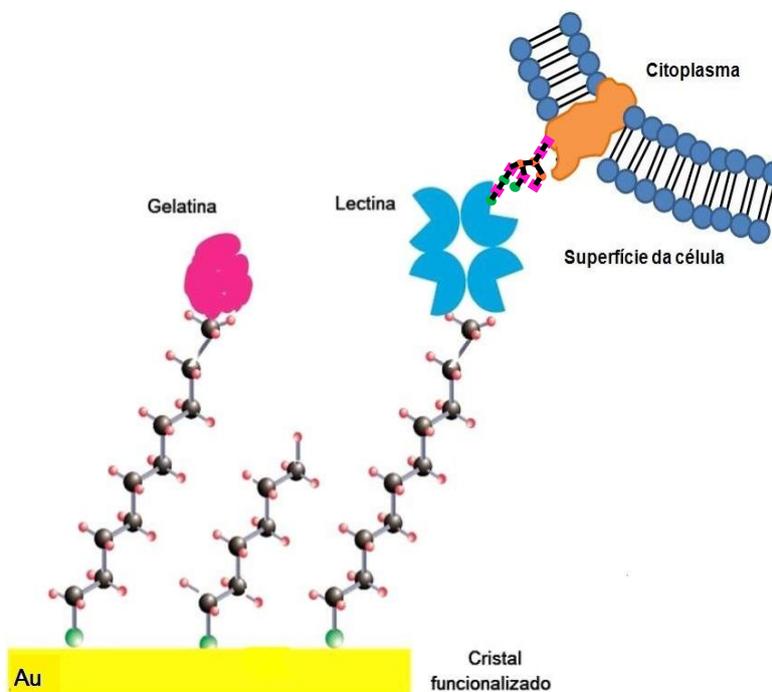
Fonte: Próprio autor

3.2.1.4 Avaliação da interação ArtinM-NB4

Após as etapas de funcionalização, o cristal de quartzo piezoelétrico contendo a lectina imobilizada foi fixado na câmara de fluxo da QCM, dentro da qual somente um dos lados do cristal permaneceu em contato com a solução. Foram utilizados PBS como fluxo carregador e uma bomba peristáltica para manter esse fluxo a uma vazão de $100 \mu\text{L min}^{-1}$, para que ocorresse a estabilização do sinal de variação da frequência fundamental de vibração dos cristais de quartzo.

Realizada essa estabilização, foram adicionadas as células NB4 nas concentrações 0,1; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 e $15,0 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$. Cada concentração de célula foi adicionada a um cristal de quartzo diferente e cada medida foi realizada em triplicata. Após a adição, o fluxo foi desligado e a solução de células foi deixada em contato com a lectina imobilizada por 35 min. Após, o fluxo foi religado e toda a solução de células que não interagiu com a ArtinM foi removida. Desta forma, a variação da frequência fundamental de vibração do cristal de quartzo obtida, depois de religado o fluxo, é referente, somente, às células ligadas à lectina imobilizada na superfície do transdutor (Fig. 9).

Figura 9 – Esquema da superfície de reconhecimento. A superfície de ouro do cristal de quartzo está funcionalizada com a ArtinM e os grupos carboxílicos remanescentes do 11-MUA estão bloqueados com gelatina. A ArtinM immobilizada é capaz de interagir com os carboidratos da superfície das células injetadas na superfície do cristal.



Fonte: Próprio autor

3.2.2 Medidas eletroquímicas

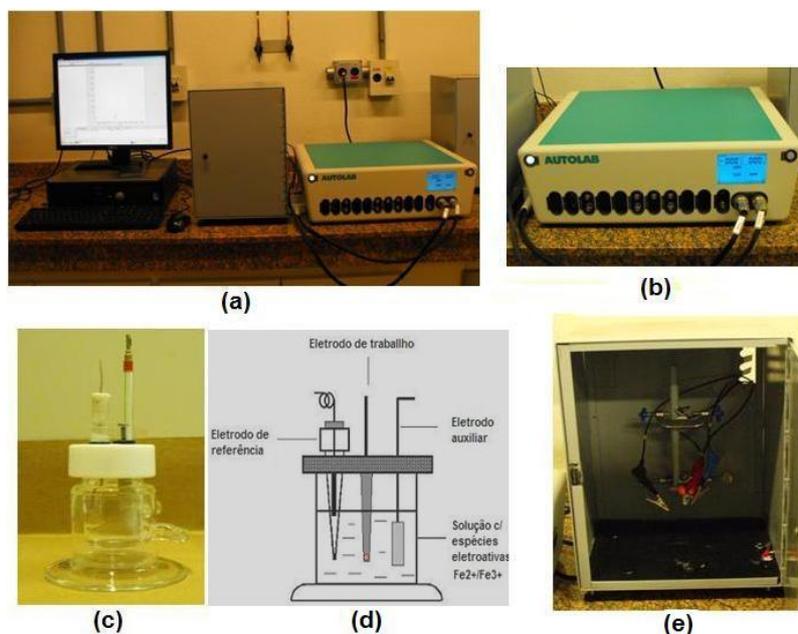
3.2.2.1 Instrumentação (Fig.10)

As medidas eletroquímicas de espectroscopia de impedância (EIS) foram realizadas utilizando:

- Potenciostato modelo PGSTAT 12 da Autolab com um módulo de impedância FRA2, interfaceado a um computador e controlado pelo *software* ANOVA;
- Uma cela convencional de três eletrodos à temperatura ambiente, utilizando um eletrodo de trabalho de ouro 2,0 mm de diâmetro

modificado, um contra eletrodo de platina e um eletrodo de referência de Ag/AgCl (3 mol L⁻¹ KCl).

Figura 10–Conjunto utilizado para medidas eletroquímicas, no estudo da formação da superfície de reconhecimento e da interação da ArtinM com as células NB4. (a) visão geral do equipamento. Da esquerda para a direita: computador contendo o *software* ANOVA, gaiola de Faraday, potenciostato modelo PGSTAT 12 da Autolab; (b) visão do potenciostato; (c) cela eletroquímica com eletrodo de trabalho, contra-eletrodo e eletrodo de referência; (d) esquema de cela eletroquímica com o eletrodo de trabalho com superfície de ouro, onde ocorrem as reações de interesse, eletrodo de referência que estabelece o potencial de referência e o eletrodo auxiliar que mantém o eletrodo de trabalho polarizado e não permite que haja reação no eletrodo de referência. Todos eletrodos submersos em uma solução com espécies eletroativas que trocam elétrons com a superfície do ouro e (e) visão interna da gaiola de Faraday com os fios.



Fonte: Próprio autor

3.2.2.2 Polimento, limpeza e caracterização do eletrodo

Antes de qualquer trabalho experimental, os eletrodos de ouro foram polidos mecanicamente com pasta de óxido de alumínio com tamanhos decrescentes de partículas: 1,0; 0,3 e 0,05 μm . Entre cada polimento realizou-se sonificação para remover possíveis partículas aderidas na superfície do eletrodo. Este, posteriormente, foi tratado eletroquimicamente (dessorção), utilizando NaOH 0,5 mol L⁻¹ entre os potenciais de -1,5 e -0,5 V com uma

velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , para a remoção de possíveis partículas orgânicas aderidas na superfície. Realizou-se, depois, outro tratamento eletroquímico (limpeza eletroquímica), com uma solução de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 entre os potenciais de 0,2 e 1,5 V com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , até que o pico de redução no voltamograma cíclico ficasse estável (aproximadamente 50 ciclos). Por fim, o eletrodo de ouro polido foi caracterizado por voltametria cíclica (CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). Estas medições foram realizadas em uma solução de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ em $\text{KNO}_3 \text{ 1 mol L}^{-1}$. A CV foi realizada a uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} entre os potenciais de 0,0 e 0,7 V em relação ao eletrodo de referência de Ag/AgCl. Este procedimento de caracterização foi realizado após cada etapa de construção do eletrodo funcionalizado.

3.2.2.3 Funcionalização do transdutor

A monocamada auto-organizada foi composta por uma mistura de dois alcanotióis, o ácido 11-mercaptoundecanóico (11-MUA) e o 6-mercaptop-1-hexanol (6-MetOH)(1:25). O primeiro foi utilizado para acoplar o anticorpo, por meio de uma ligação entre o grupamento amina presente na estrutura da proteína e o grupamento carboxílico presente em uma das extremidades da molécula do alcanotiol e o segundo como espaçador (Fig. 7), para diminuir o impedimento estérico entre as espécies do analito (células NB4). O eletrodo de ouro polido foi imerso numa mistura de $8 \mu\text{L}$ de solução etanólica de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de 11-MUA e $192 \mu\text{L}$ de solução etanólica de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de 6-MetOH e foi deixado por 16 h funcionalizando. Após isso, o eletrodo foi lavado com água deionizada, posteriormente com uma solução de $\text{KNO}_3 \text{ 1 mol L}^{-1}$ e seco com gás nitrogênio. Em seguida, a superfície funcionalizada do eletrodo foi caracterizada como descrito na seção 3.2.2.2. Após, para a ativação dos grupamentos carboxílicos, o eletrodo foi imerso por 30 min em uma solução de $200 \mu\text{L}$ de EDC/NHS nas concentrações $0,4$ e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente (Fig. 8). O eletrodo foi, então, mantido em uma solução de $0,15 \text{ mg mL}^{-1}$ da lectina ArtinM em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4 e deixado por 1 h. Após este período, o cristal foi lavado com PBS e exposto a uma solução de gelatina

0,1% por 30 min, para o bloqueio dos grupamentos carboxílicos remanescentes. Finalmente, a superfície do eletrodo foi lavada com PBS e logo em seguida, realizou-se nova caracterização da superfície.

3.2.2.4 Avaliação da interação ArtinM-NB4

Após a etapa de funcionalização do transdutor, foram adicionadas à superfície do eletrodo 30 μL de diferentes concentrações de solução de células, todas em PBS pH 7,4, para que houvesse interação destas células com a lectina imobilizada (Fig. 9). As concentrações adicionadas foram: 10^3 , $0,5 \times 10^4$, 10^5 , 10^6 e 10^7 cel mL^{-1} e cada uma foi deixada em contato com a lectina durante 35 min. Passado este tempo, a superfície foi lavada com PBS, realizando após, medidas de voltametria cíclica, impedância e capacitância. Cada medida foi realizada em triplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

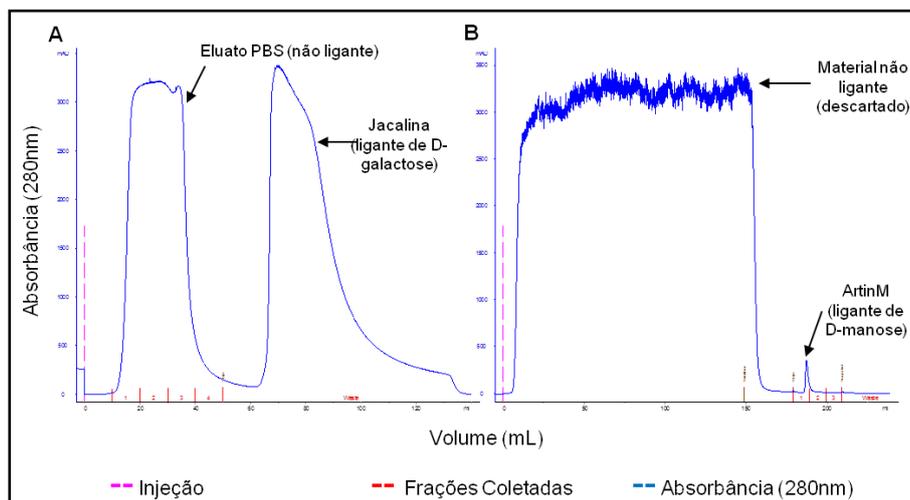
A seção de resultados e discussão deste trabalho também foi dividida em duas partes: biológica e físico-química.

4.1 Parte biológica

4.1.1 Obtenção da lectina ArtinM

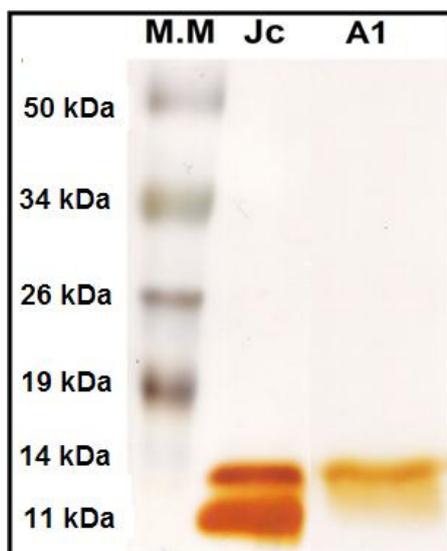
A lectina ArtinM foi purificada do extrato bruto da semente de Jaca por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-D-manose (Fig.11 B). Em um passo anterior, a Jacalina foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-D-galactose (Fig.11A). Observando os gráficos da Figura 11 é possível verificar que a Jacalina está presente em grande quantidade na semente da jaca, enquanto a ArtinM está presente em pequena quantidade.

Figura 11 – Perfil cromatográfico da purificação de ArtinM. Em A e B a linha azul mostra a absorvância do material em fluxo no sistema AKTA Purifier. (A) – Remoção de Jacalina: o extrato bruto foi aplicado em coluna com sepharose D-galactose, proporcionando a adsorção da Jacalina à D-galactose e eluato PBS (material não ligante) depletado de Jacalina. (B) – Purificação de ArtinM: injeção de eluato PBS em coluna com sepharose D-manose para obtenção de ArtinM (material ligante), eluído com solução de D-manose 0,1 mol L⁻¹.



Fonte: Ricci, (2012)

Figura 12 – Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, mostrando a pureza da ArtinM. Para a realização da corrida em gel foram utilizados marcadores moleculares comerciais (MM), preparação de Jacalina (Jc) e uma preparação de ArtinM (A1). As preparações de lectina (Jacalina e ArtinM) foram fervidas.



Fonte: Próprio autor

Para certificar a pureza das preparações realizou-se eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, ArtinM e Jacalina foram analisadas após fervura. Na Figura 12 é possível observar que na pista correspondente à Jacalina há duas bandas de massas moleculares aparentes de 11 e 14 kDa. Na pista correspondente à ArtinM visualiza-se uma banda única de massa molecular aparente de aproximadamente 13 kDa, evidenciando a pureza da preparação de ArtinM, conforme parâmetros estabelecidos por Rosa e colaboradores (1999) e Santos de Oliveira e colaboradores (1994). Uma vez constatada a pureza, a ArtinM pode ser utilizada nos ensaios subsequentes.

4.2 Parte Fisico-química

4.2.1 Medidas piezoelétricas

A técnica piezoelétrica utilizando Microbalança a Cristal de Quartzo tem sido utilizada em estudos de processos biológicos que envolvem a interação receptor-ligante, como por exemplo, na interação antígeno-anticorpo (SVOBODOVÁ et al., 2006) e lectina-carboidrato (PESQUERO et al., 2010; PEDROSO et al., 2012; SANTOS, 2012). O estudo destas interações pode ser realizado por meio do desenvolvimento de biossensores (SVOBODOVÁ et al., 2006; PEDROSO et al., 2012; PEI et al., 2005) e superfícies de reconhecimento para avaliação das constantes cinéticas de medidas de afinidade (PESQUERO et al., 2010; SANTOS, 2012) e a partir desses, há a decodificação de processos de reconhecimento molecular em sinais mensuráveis.

O estudo da interação de lectinas com células também vem sendo realizado utilizando a QCM, que devido a sua sensibilidade pode ser aplicada para caracterizar glicanas da superfície celular e distinguir diferentes padrões de malignidade. Pei e colaboradores (2012) utilizaram a QCM para verificar a interação das lectinas Con A, DBA, PNA, SBA e UEA-I com células de carcinoma epidermoide (A-431) e adenocarcinoma de mama (MDA-MB-468) visando caracterizar o padrão de glicosilação presente nessas células. Tan e colaboradores (2008) usaram QCM para mensurar a aglutinação promovida por

ConA e WGA sobre células hepáticas normais L-02 e tumorais Bel7402, de modo a distinguir estas linhagens. Peiris e colaboradores (2012) mostraram por análise em QCM que a lectina HPA é capaz de se ligar às células metastáticas colorretais SW620 com maior intensidade quando comparada a linhagem não metastática SW480.

4.2.1.1 Limpeza dos cristais de quartzo e construção da superfície de reconhecimento para os testes piezoelétricos

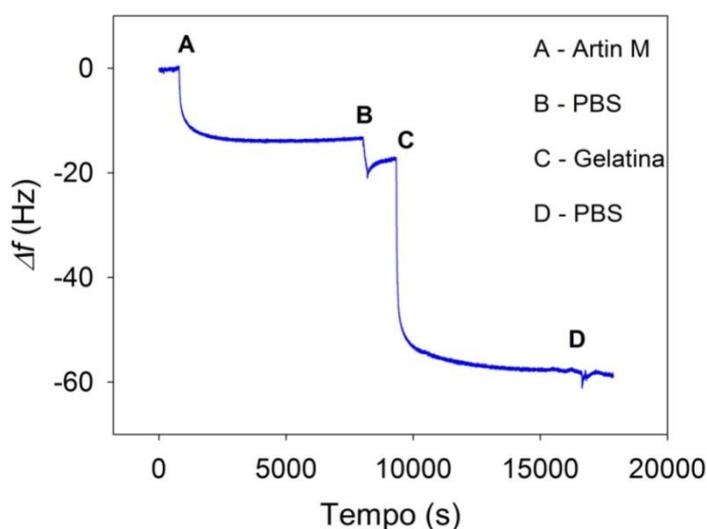
O procedimento de lavagem da superfície de ouro do cristal é crucial para a montagem da superfície de reconhecimento. A solução piranha elimina qualquer material imobilizado anteriormente, permitindo que a superfície do ouro esteja limpa para montagem de novas superfícies de reconhecimento. Experimentos do nosso grupo mostraram que cada cristal pode ser reutilizado até cinco vezes, porque após isso, a solução piranha poderá danificar a uniformidade da superfície de ouro, prejudicando a qualidade da imobilização de tióis.

Para as medidas piezoelétricas, em bancada foi realizada a imobilização dos tióis na superfície de ouro do cristal de quartzo e subsequente ativação dos sítios carboxílicos do tiol âncora (11-MUA) com solução de EDC/NHS. Os cristais foram funcionalizados, em fluxo, com a lectina ArtinM e os grupamentos carboxílicos remanescentes foram bloqueados com gelatina. A confirmação da imobilização da ArtinM na SAM e o bloqueio com gelatina foi realizada em fluxo, com monitoramento da QCM.

A avaliação da funcionalização do eletrodo com a lectina ArtinM foi procedida em fluxo. Na Figura 13, observa-se que após a injeção da solução da lectina (A) houve uma variação de frequência (Δf) de aproximadamente 15 Hz, sugerindo a interação entre a lectina e a monocamada automontada de tióis. De acordo com a equação de Sauerbrey (Eq. 1), a frequência diminuiu devido a adsorção de massa sobre a superfície do cristal de quartzo. Após a injeção de PBS (B), para a lavagem do cristal, foi injetada a solução de gelatina (C) e o fluxo foi parado. Em seguida, foi realizada uma nova lavagem do cristal com PBS (D). Nota-se uma variação da frequência resultante de

aproximadamente 40 Hz após a injeção da solução de gelatina, mostrando o bloqueio dos grupamentos carboxílicos remanescentes do 11-MUA. Esse mesmo protocolo foi adotado por Pedroso e colaboradores (2012), Pesquero e colaboradores (2010) e Santos (2012), mostrando a eficiência da funcionalização das lectinas sobre as monocamadas automontadas de tióis e também a eficiência do bloqueio.

Figura 13– Formação da superfície de reconhecimento. Processo de adsorção da lectina ArtinM sobre o eletrodo de ouro funcionalizado com SAM e ativado com solução EDC/NHS. (A) representa o momento inicial de injeção da ArtinM , (B) a injeção de PBS para a lavagem dos cristais realizada após imobilização da lectina, (C) o início da injeção de gelatina para o bloqueio dos sítios não ocupados pela ArtinM e (D) nova injeção de PBS para lavagem da gelatina não adsorvida.



Fonte: Próprio autor

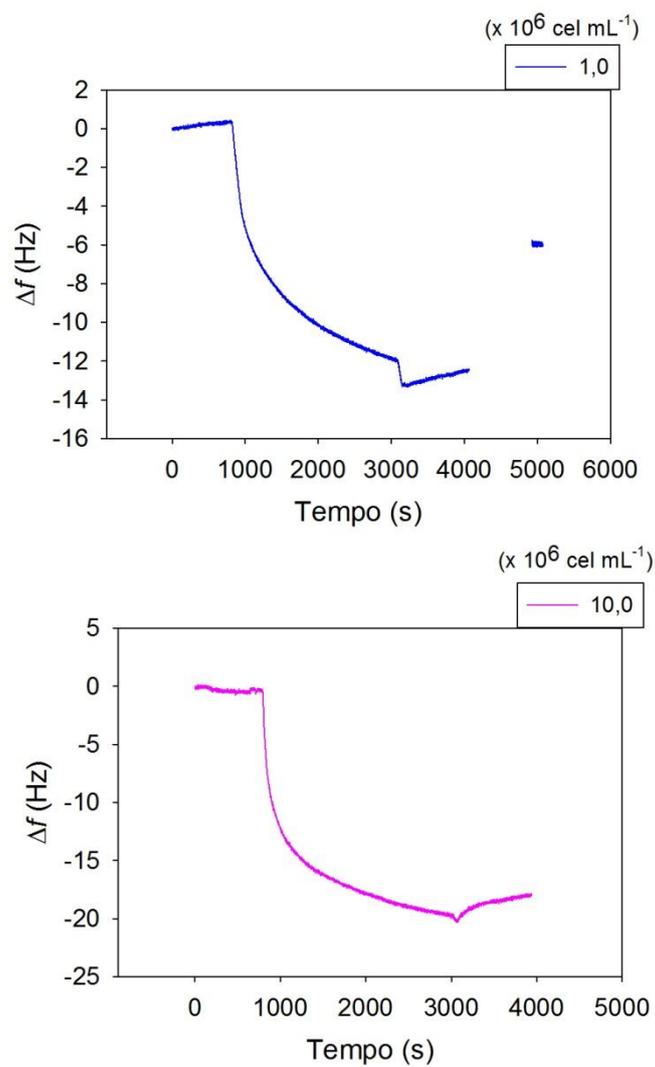
4.2.1.2 Estudo da interação ArtinM-NB4

O estudo da interação ArtinM-NB4, em tempo real, foi realizado utilizando técnica de QCM por meio da adição de concentrações crescentes das células leucêmicas sobre transdutores previamente funcionalizados com a lectina. A Figura 14 mostra um exemplo de resposta da frequência, em função do tempo, para a adição das células sobre os sensores funcionalizados com ArtinM. Quando a solução de células foi injetada sobre a superfície de reconhecimento ocorreu um rápido decaimento da frequência indicando que a

célula ligou-se sobre a ArtinM immobilizada. Após novo fluxo de tampão PBS, verifica-se o valor final de frequência que subtraído da inicial, corresponde ao Δf . Este está relacionado à massa adsorvida, ou seja, células que interagiram com a lectina.

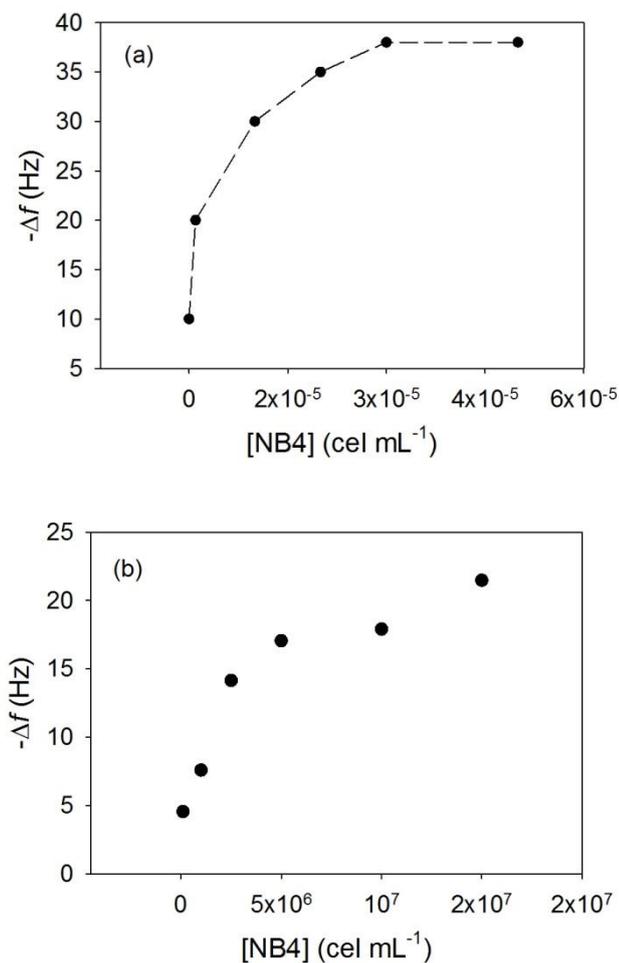
Por meio da adição de concentrações crescentes de célula sobre diferentes sensores funcionalizados com ArtinM, foi possível construir a curva de saturação e, por meio dela, aplicar o modelo da Isoterma de Langmuir para o estudo da interação lectina-carboidrato como realizado por Pesquero e colaboradores (2010), Santos (2012) e Lebed e colaboradores (2006). A curva de saturação obtida para o sistema em estudo (ArtinM-NB4) é mostrada na Figura 15. Δf está representado pela média dos valores.

Figura 14 – Curvas da variação de frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para a adição de NB4. (a) Interação célula NB4 ($1,0 \times 10^6$ cel mL $^{-1}$) sobre o cristal funcionalizado com ArtinM. (b) Interação célula NB4 ($10,0 \times 10^6$ cel mL $^{-1}$) sobre o cristal funcionalizado com ArtinM.



Fonte: Próprio autor

Figura 15 – (a) Exemplo de isoterma de Langmuir. (b) isoterma de Langmuir obtida para a interação ArtinM-NB4.



Fonte: (a) Adaptado de Santos (2012); (b) Próprio autor

Para desenvolver uma superfície de reconhecimento que satisfaça os critérios da Isotherma de Langmuir (seção 1.3) foi necessário minimizar alguns erros. Por exemplo, o modelo se aplica a superfícies sólidas que contém um número fixo de sítios de adsorção (1). Neste trabalho, ao estudar a interação ArtinM-NB4, o sítio de interação é a lectina imobilizada sobre o cristal piezoelétrico. Forçosamente, deve-se esperar que em cada ensaio, o número de lectinas disponíveis para interação seja constante. Uma forma de observar a reprodutibilidade do número de sítios é analisar quantitativamente a

imobilização da lectina. Isto foi realizado por meio da técnica de QCM (Fig. 13) e, fazendo triplicata das medidas, obteve-se reprodutibilidade dos resultados.

Em relação ao calor de adsorção dos sítios de ligação (3) e às interações entre as moléculas ligantes vizinhas (4), pode-se dizer que para um modelo ideal, em que o adsorbato é um gás, pode-se esperar interações nulas entre as espécies livres e entre aquelas em sítios vizinhos a elas (MOORE, 1976). Entretanto, entendemos que esse não é o caso de moléculas grandes e de células, pois existe a possibilidade de interação entre as espécies. Para minimizar esses efeitos de interação foram utilizadas concentrações diluídas de adsorbato e na formação da SAM utilizou-se, além do tiol de cadeia longa (11-MUA), um tiol de cadeia menor (6-MetOH), como espaçador, proporcionando, assim, menor impedimento estérico entre as moléculas de lectina immobilizada. Desta maneira, garantiram-se condições em que as interações não afetassem sensivelmente o modelo.

4.2.1.3 Determinação da constante de afinidade aparente (K') da interação ArtinM-NB4 por meio do modelo da Isoterma de Langmuir.

O procedimento para a determinação da constante de afinidade aparente K' foi aplicado de acordo com os trabalhos de Pesquero e colaboradores (2010) e Santos (2012) e é mostrado a seguir.

Levando em consideração os critérios (1) e (4) do modelo considerado anteriormente, é possível obter a constante de afinidade aparente K' utilizando diretamente a isoterma de Langmuir (Eq. 2) (LEBED et al., 2006):

$$\Delta f = \Delta f_{m\acute{a}x} \frac{K'[c\acute{e}lula]}{1 + K'[c\acute{e}lula]} \quad (2)$$

Na equação 2, Δf é a variação de frequência, Δf_{Max} a variação de frequência na saturação, $[c\acute{e}lula]$ a concentração de célula, em $cel\ mL^{-1}$

utilizada e K' , a constante de afinidade aparente (PESQUERO et al., 2010; SANTOS, 2012) ou constante de associação (LEBED et al., 2006).

Essa constante pode ser obtida por meio da linearização da Isoterma de Langmuir, ou seja, relacionado em um gráfico as grandezas de $[célula]/\Delta f$ em função da concentração de célula (Eq. 3), sendo que K' podem ser obtidos diretamente pelos coeficientes angular e linear da curva.

$$\frac{C}{\Delta f} = \frac{C}{\Delta f_{max}} + \frac{1}{\Delta f_{max}} \cdot \frac{1}{K'} \quad (3)$$

Os valores da razão entre a concentração de células NB4 adicionadas aos cristais de quartzo modificados com ArtinM e a variação de frequência causada pela adsorção das mesmas encontra-se expressos na Tabela 1.

Tabela 1. Relação entre a quantidade de NB4 adsorvida ($[NB4]/\Delta f_{média}$) e a concentração da mesma em solução ($[NB4]$).

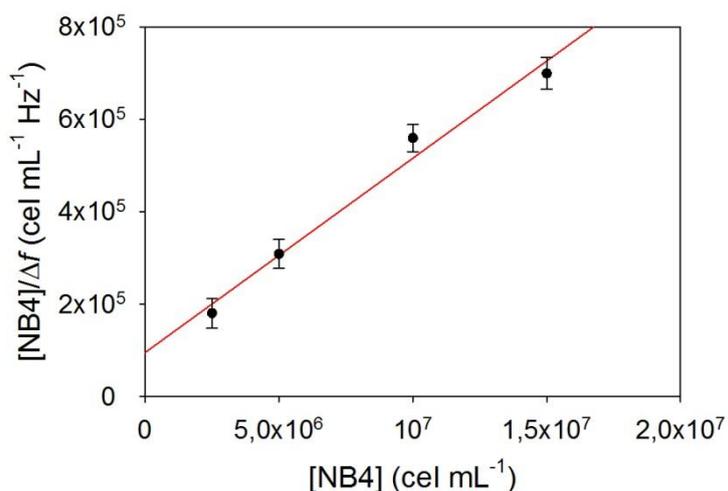
$[NB4]$ cel mL ⁻¹	$[NB4]/\Delta f_{média}$ (x10 ⁵)
0,1x10 ⁶	2,85 ±1,89
1,0x10 ⁶	1,63 ±0,8
2,5x10 ⁶	1,80 ±0,32
5,0x10 ⁶	3,09 ±0,31
10,0x10 ⁶	5,60 ±0,29
15,0x10 ⁶	7,00 ±0,35

Fonte: Próprio autor

Utilizando os resultados expressos na Tabela1 foi construída a isoterma de Langmuir linearizada para a interação ArtinM-NB4, representada na Figura

16. Por meio da razão entre o coeficiente angular e o linear da isoterma de Langmuir foi determinada a constante de afinidade aparente, K' para a interação da ArtinM com NB4. O valor de K' obtido foi de $(4,4 \pm 0,1) \times 10^{-7} \text{ mL cel}^{-1}$.

Figura 16 – Isotherma de Langmuir linearizada para a interação ArtinM-NB4 obtida para o cálculo da constante de afinidade aparente, K' , por meio da Equação (2). A regressão linear está mostrada em vermelho.



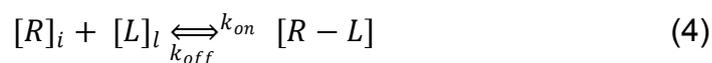
Fonte: Próprio autor

Para que ocorresse um melhor ajuste dos pontos no gráfico, na construção da Isotherma de Langmuir linearizada foram escolhidas apenas quatro últimas concentrações das seis utilizadas (Tab. 1). O coeficiente de correlação para a regressão linear foi de 99,1%.

4.2.1.4 Determinação dos parâmetros cinéticos da interação ArtinM-NB4 por meio do modelo da Isotherma de Langmuir.

As deduções das equações e o procedimento para a determinação dos parâmetros cinéticos e de afinidade foram aplicados de acordo com os trabalhos de Pesquero e colaboradores (2010) e Santos (2012) e são mostrados a seguir.

As interações lectina-carboidrato puderam ser avaliadas por meio de sua cinética de interação utilizando a QCM. A imobilização da lectina ArtinM na superfície do 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 (NILSSON, 2007). A reação de interação entre receptor imobilizado na superfície do transdutor (ArtinM) e seu ligante (NB4), sendo um sistema binário de interação pode ser descrita pela Equação 4 (NILSSON, 2007).



Na Equação 4, $[R]_i$ corresponde à concentração do receptor imobilizado na superfície do transdutor (ArtinM) e $[L]_l$ a concentração de ligante em solução (NB4). Os parâmetros k_{on} e k_{off} 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 5 e 6 respectivamente.

$$r_+ = \frac{d[R-L]}{dt} = k_{on} \theta_1 [L] \quad (5)$$

$$r_- = -\frac{d[R-L]}{dt} = k_{off} \theta_2 \quad (6)$$

Nas equações 5 e 6, θ_1 e θ_2 correspondem à porcentagem de sítios ligantes livres, ArtinM imobilizada sem a presença de interação específica com a NB4, e de NB4 adsorvida sobre o receptor na superfície do sensor em um tempo t , respectivamente. $[L]$ é a concentração de NB4 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 7.

$$r_e = k_{on} \theta_{1,e} [L]_e = k_{off} \theta_{2,e} \quad (7)$$

Na equação 7, o subscrito e corresponde às quantidades no equilíbrio. As constantes de associação, K_a , e dissociação, K_d , são descritas pelas Equações 8 e 9 (NILSSON, 2007).

$$K_a = \frac{k_{on}}{k_{off}} = \frac{\theta_2}{\theta_1 [L]} \quad (8)$$

$$K_d = \frac{k_{off}}{k_{on}} = \frac{\theta_1 [L]}{\theta_2} \quad (9)$$

Definindo-se uma variável de relaxação do sistema em equilíbrio como δ , e sendo esta descrita pela Equação 10.

$$\delta = \theta_1 - \theta_{1,e} = [L] - [L]_e = \theta_{2,e} - \theta_2 \quad (10)$$

Um desvio do equilíbrio corresponde à derivada da velocidade da reação, sendo descrito pela Equação 11.

$$-\frac{d\delta}{dt} = k_{on} (\theta_{1,e} + \delta) ([L]_e + \delta) - k_{off} (\theta_{2,e} - \delta) \quad (11)$$

O termo δ^2 , que surge da Equação 10, pode ser desprezado, pois δ corresponde, frequentemente, a um termo muito pequeno. Sendo assim, a Equação 11 pode ser simplificada como demonstrado na Equação 12.

$$-\frac{d\delta}{dt} = \left(\frac{1}{\tau}\right) \delta \quad (12)$$

Na equação 12, o termo $(1/\tau)$ corresponde à constante descrita na Equação 13

$$\frac{1}{\tau} = r_e \left(\frac{1}{\theta_{1,e}} + \frac{1}{[L]_e} + \frac{1}{\theta_{2,e}} \right) \quad (13)$$

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 10 e 12 é possível obter a percentagem máxima de sítios ativos ligados à molécula de ligante, $\theta_{2,e}$, que é descrita pela Equação 14 (LEBED et. al., 2006).

$$\theta_2 = \theta_{2,e} (1 - e^{-(1/\tau)t}) \quad (14)$$

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 15 (LEBED et. al., 2006).

$$\Delta m_t = \Delta m_{m\acute{a}x} (1 - e^{-(1/\tau)t}) \quad (15)$$

Na equação 15, Δm_t e $\Delta m_{m\acute{a}x}$ correspondem à variação de massa em um tempo t e no tempo $t \rightarrow \infty$ (no equilíbrio), respectivamente. A 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

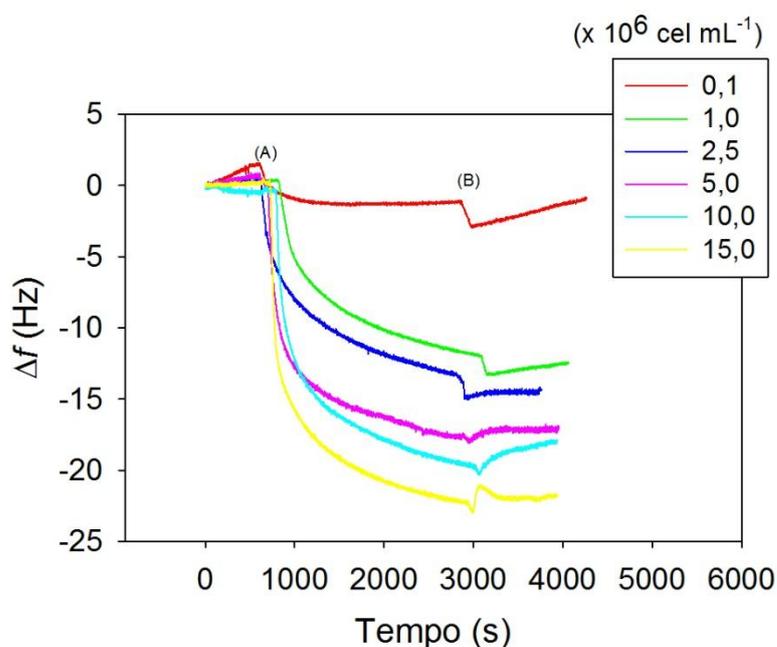
relacionada à variação de oscilação do cristal de quartzo devido à adsorção, Equação 16 (LEBED et. al., 2006).

A relação expressa pela Equação 16 é utilizada para a determinação, em dois passos, dos parâmetros cinéticos que descrevem o processo de interação entre a ArtinM e a NB4.

$$\Delta f_t = \Delta f_{m\acute{a}x} (1 - e^{-(1/\tau)t}) \quad (16)$$

A variação da frequência foi registrada em função do tempo para diferentes concentrações de NB4 adicionada a diferentes cristais de quartzo funcionalizados com a lectina. A média das replicatas obtidas para cada uma das concentrações de NB4 adicionada está apresentada na Figura 17.

Figura 17 – Curvas da variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo funcionalizado em função do tempo para as adições de solução de NB4 em diferentes concentrações. (A) momento de injeção da solução de células, (B) momento de injeção de PBS para realizar a lavagem do cristal.



Fonte: Próprio autor

A partir do ajuste realizado nas curvas da Figura 17 utilizando a Equação 16 na região da curva situada entre a injeção da solução de NB4 (A) até o momento da lavagem do cristal com PBS (B), foram obtidos os tempos de relaxação (τ), correspondentes a cada concentração de NB4 adicionada.

As constantes de relaxação, τ^{-1} , definida pelo inverso do tempo de relaxação, referentes a cada concentração de NB4 adicionada a ArtinM são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Constante de relaxação (τ^{-1}) para a interação ArtinM-NB4, obtidos do ajuste das curvas ($\Delta f \times t$) utilizando a Equação (16), para diferentes concentrações de célula.

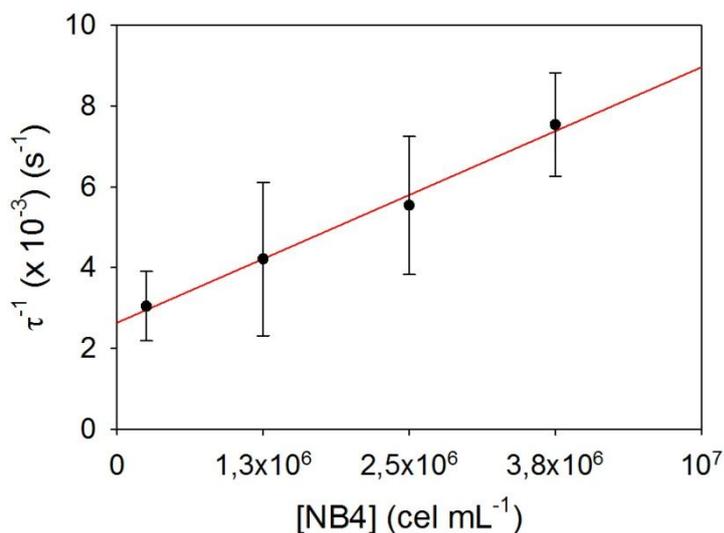
$[NB4] \text{ cel mL}^{-1}$	$\tau^{-1} (x 10^{-3})/s^{-1}$
$1,0 \times 10^6$	$3,03 \pm 1,91$
$5,0 \times 10^6$	$4,21 \pm 1,71$
$1,0 \times 10^7$	$5,54 \pm 1,28$
$1,5 \times 10^7$	$7,54 \pm 0,86$

Fonte: Próprio autor

Em um segundo passo, a constante de relaxação, τ^{-1} , foi esboçada em função da concentração de NB4 adicionada a ArtinM (Fig.18). Por meio desta curva foi possível determinar a constante de associação cinética da interação K_a , pois o tempo de relaxação está relacionado com a concentração inicial do ligante pela Equação 17 (LEBED et al., 2006).

$$\tau^{-1} = k_{on}[C] + k_{off} \quad (17)$$

Figura 18 – Constante de relaxação em função da concentração obtida para o processo de interação ArtinM-NB4. A regressão linear está mostrada em vermelho.



Fonte: Próprio autor

O coeficiente de correlação para a regressão linear foi de 99%. A constante de associação cinética da interação receptor-ligante é dada pela Equação 18 (LEBED et. al., 2006).

$$K_a = \frac{k_{on}}{k_{off}} \quad (18)$$

A partir da razão entre o coeficiente angular e o linear da curva representada na Figura 18, foi determinada a constante de associação cinética K_a para a interação ArtinM-NB4. Os valores de K_a e das constantes de velocidade de associação k_{on} e de dissociação k_{off} estão expostos na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores das constantes de velocidade de associação, de velocidade de dissociação e de associação cinética da interação ArtinM-NB4.

Interação	k_{on} mL cel ⁻¹ s ⁻¹	k_{off} s ⁻¹	K_a mL cel ⁻¹
ArtinM-NB4	$(3,6 \pm 1,0) \times 10^{-10}$	$(20,3 \pm 6,6) \times 10^{-4}$	$(1,8 \pm 1,1) \times 10^{-7}$

Fonte: Próprio autor

Analisando a Tabela 3 é possível verificar que o valor de k_{on} é consideravelmente menor que o valor de k_{off} , indicando que a velocidade de ligação (associação) é lenta em relação a velocidade de desligamento (dissociação). Supomos que os baixos valores de k_{on} estão relacionados ao fato da ArtinM tardar para promover o completo encaixe dos seus quatro CRDs às glicanas celulares. Além disso, segundo Jeyaprakash e colaboradores (2004), os CRDs da ArtinM são formados por dois subsítios, o sítio primário e o sítio secundário, sendo este último o responsável por conferir às lectinas diferentes especificidade a carboidratos, isso também tardaria o encaixe. Em contrapartida o desligamento pode independe deste fato e, portanto, ser mais rápido.

Comparando o valor da constante de afinidade aparente, $K' = (4,4 \pm 0,1) \times 10^{-7}$ mL cel⁻¹ (seção 4.2.1.3) com o da constante de associação cinética da interação ArtinM-NB4, $K_a = (1,8 \pm 1,1) \times 10^{-7}$ mL cel⁻¹, (Tab. 3), nota-se diferença entre eles. Essa diferença pode ser atribuída ao modo como essas constantes são estimadas, pois para determinação da constante de afinidade aparente (K') são utilizados os valores de variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo após religamento do fluxo de PBS, removendo as interações inespecíficas. Assim, os valores utilizados são referentes apenas às interações ArtinM-NB4. Para determinação da constante de associação cinética (K_a), os valores das constantes de relaxação (Tab. 2) são obtidos pelo ajuste da Equação 16 com os valores experimentais compreendidos entre o início da injeção e o momento anterior ao religamento do fluxo de PBS. Neste caso as interações inespecíficas não são eliminadas. Esta diferença entre os valores de

K_a e K' também podem ser observados nos trabalhos de Pesquero (2010) e Santos (2012).

Os valores obtidos do estudo da interação ArtinM-NB4 neste trabalho referem-se ao uso da lectina nativa (jArtinM) e foram comparados com os valores obtidos no trabalho de Pesquero (2010), que utilizou a ArtinM recombinante (rArtinM) produzida em *E. coli*, e são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 – Tabela comparativa dos parâmetros cinéticos da interação ArtinM-NB4, deste trabalho, utilizando a ArtinM nativa (jArtinM) e do trabalho de Pesquero (2010), utilizando a ArtinM recombinante rArtinM produzida em *E.coli*.

Parâmetros	jArtinM	rArtinM (PESQUERO, 2010)
Estrutura Molecular	Tetramérica	Monomérica
Massa Molecular Aparentes	54kDa	13kDa
Interação Artin M-NB4	k_{on} (mL cel ⁻¹ s ⁻¹)	$(3,6 \pm 1,0) \times 10^{-10}$
	k_{off} (s ⁻¹)	$(20,3 \pm 6,6) \times 10^{-4}$
	K_a (mL cel ⁻¹)	$(1,8 \pm 1,1) \times 10^{-7}$
	K_d (mL ⁻¹ cel)	$(0,6 \pm 1,1) \times 10^7$
	t_a (mL ⁻¹ cel s)	$(2,8 \pm 1,0) \times 10^9$

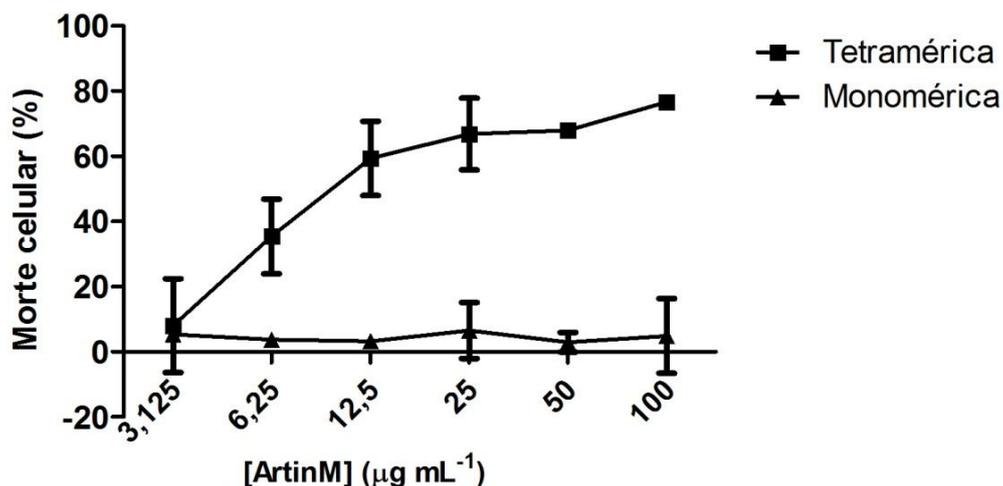
k_{on} : constante de velocidade de associação, k_{off} : constante de velocidade de dissociação, K_a (k_{on}/k_{off}): constante de associação cinética da interação, t_a ($1/k_{on}$): tempo de interação e constante de dissociação: K_d ($1/K_a$).

Fonte: Próprio autor

Analisando a Tabela 4 é possível verificar que o valor de k_{on} para a interação ArtinM-NB4 é maior que o valor obtido na interação rArtinM-NB4. Isto

pode estar relacionado à diferença na oligomerização da cadeia peptídica. Enquanto em ArtinM nativa os monômeros (13 kDa) associam-se de forma não-covalente e originam tetrâmeros de 54 kDa (ROSA et al., 1999), rArtinM apresenta-se na forma monomérica. Possivelmente, a lectina nativa, por ser tetramérica, tem uma maior possibilidade de interagir com maior número de receptores da NB4 simultaneamente, gerando assim, um valor mais alto de k_{on} . Esta diferença entre as afinidades da ArtinM nativa e ArtinM recombinante frente a carboidratos também foi evidenciada no trabalho de Pesquero e colaboradores (2010), que estudou a interação dos dois tipos de ArtinM com a peroxidase. Sendo t_a inversamente proporcional a k_{on} , é possível observar que quanto mais rápida a interação, menor será o tempo necessário para que a mesma ocorra. Em relação aos valores da constante de afinidade de interação, K_a , por serem diretamente proporcionais a k_{on} , também são maiores para a lectina nativa. Esses resultados vão de encontro ao fato de que rArtinM é pouco eficiente em induzir a citotoxicidade em células NB4 (Fig. 19) (Carvalho,2008), sugerindo que haja a necessidade de um “cross-linking” de receptores para promoção do sinal de morte celular. Essa ausência de “cross-linking” na interação rArtinM-NB4 pode refletir nos valores mais baixos de k_{on} .

Figura 19– Atividade citotóxica de ArtinM sobre células NB4. Células NB4, da leucemia promielocítica aguda, foram cultivadas na presença de ArtinM (0-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) nativa ou recombinante por 48 horas. A ocorrência de morte celular foi avaliada pelo ensaio MTT de viabilidade celular, indicada pela conversão do sal tetrazólio em formazam pela mitocôndria. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão.



Fonte: Adaptada de Carvalho (2008)

4.2.2 Medidas eletroquímicas

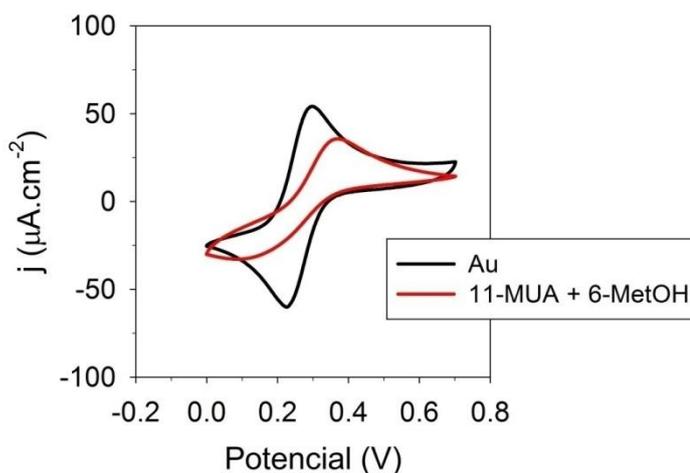
A técnica eletroquímica de EIS possui alta sensibilidade às variações que ocorrem na superfície do eletrodo e permite análises sem utilizar moléculas marcadas (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2011). As medidas de impedância podem ser utilizadas para o monitoramento e estudo das interações biológicas como antígeno-anticorpo (BRYAN et al., 2013; JOHNSON et al., 2012) e lectina-carboidrato (Hu et al., 2013; Loaiza et al., 2011; Yang et al., 2013). Recentemente o estudo da interação lectina-célula começou a ser testado por EIS. No trabalho de Hu e colaboradores (2013) foi desenvolvido um biossensor funcionalizado com ConA que conseguiu distinguir as linhagens hepáticas normais L-02 e tumorais Bel7402, por análise EIS.

4.2.2.1 Limpeza dos eletrodos de ouro e formação da monocamada de tióis

A uniformidade da superfície de ouro é diretamente proporcional a qualidade da imobilização de tióis, por isso se faz necessário que todas as etapas de polimento do eletrodo de ouro sejam bem planejadas e executadas.

Após o polimento mecânico e a dessorção, a limpeza do ouro foi avaliada por voltametria cíclica (limpeza eletroquímica) e determinando o fator de rugosidade e a área real dos eletrodos, estes elementos definem a reprodutibilidade do sistema. O fator rugosidade alcançado em média entre os eletrodos foi de 1,30, sendo esse um valor aceitável, pois experimentos realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que valores a partir de 1,50 não permitem reprodutibilidade nas medidas (BENITES, 2013). Em seguida, foram realizadas as análises (caracterização) por voltametria cíclica (CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) em ouro limpo para servir como amostra padrão (branco). Após a imobilização da mistura de tióis sobre a superfície de ouro, realizou-se, novamente, as medidas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. A Figura 20 ilustra os dados de CV para o eletrodo limpo (Au) e recoberto com a mistura de tióis (11-MUA e o 6-MetOH) em solução de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ em KNO_3 1 mol L⁻¹.

Figura 20 – Gráfico representativo de CV ilustrando o processo de imobilização da mistura de tióis (formação da SAM) sobre o eletrodo de ouro. Na superfície do eletrodo limpa e sem imobilização é observada na curva em preto (Au) e a superfície do eletrodo com a mistura de tióis imobilizada na curva em vermelho (11-MUA + 6-MetOH). A diminuição dos picos de corrente na curva do sistema com a SAM evidencia a imobilização dos tióis na superfície de ouro do eletrodo, pois os tióis fixos na superfície do eletrodo atuam como uma barreira, dificultando a passagem de elétrons entre o ouro e as espécies eletroativas ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$) em solução.



Fonte: Próprio autor

No eletrodo limpo e sem imobilizações (Au puro), o par redox ferri/ferro ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$) gerou um voltamograma com picos de oxidação e redução (curva Au). Com a formação da monocamada de tióis (curva 11-MUA + 6-MetOH), houve o surgimento de uma barreira na passagem de elétrons na interface eletrodo/eletrólito, dificultando as espécies eletroativas de reduzir ou oxidar, e com isso, gerando uma diminuição dos picos de corrente, corroborando com os dados de Cancino (2008). Analisando ainda a Figura 20, pode-se observar que a mistura de tióis utilizada formou uma SAM que não bloqueia totalmente o processo redox do par ferri/ferro, verifica-se a existência de pequenos picos de corrente. A presença dos picos de corrente que correspondem à formação da SAM está relacionada à utilização de uma alta concentração de tiol espaçador (6-MetOH), que é um tiol de cadeia carbônica curta e devido a isso permite uma maior passagem de elétrons quando comparado a tióis de cadeia carbônica mais longa (BENITES, 2013; CUI et al., 1999). A concentração de espaçador utilizada nos experimentos eletroquímicos foi quatro vezes menor que a utilizada nos experimentos piezoelétricos, assim,

as SAM teriam uma maior resistência à transferência de carga e uma maior quantidade de sítios. Nas medidas eletroquímicas com a SAM na proporção 1:100, os sítios ativos saturam-se mesmo utilizando concentrações baixas de NB4 (10^5 cel mL⁻¹), impossibilitando a construção correta da curva de saturação.

4.2.2.2 Imobilização da ArtinM e bloqueio com gelatina

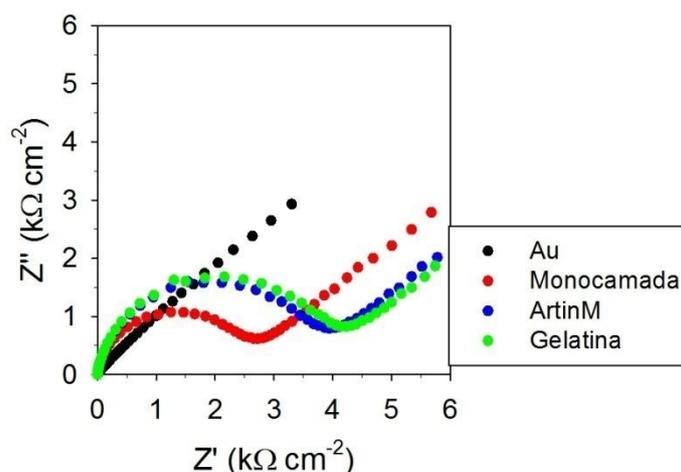
O processo de adsorção da ArtinM sobre a superfície do eletrodo de ouro e a avaliação da eficiência do bloqueio dos grupos carboxílicos do tiol remanescentes com gelatina foram acompanhadas por meio de medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), utilizando solução de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ em KNO_3 1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte (Fig.21).

A formação da SAM pode ser observada na Figura 21. A linha pontilhada em vermelho, correspondente a monocamada, mostra a ocorrência de uma barreira na passagem de elétrons, gerando uma resistência de transferência de carga (R_{ct}) na interface eletrodo/eletrólito. Os valores de R_{ct} são obtidos a partir dos valores de impedância real (Z'). Observando a linha pontilhada em azul, correspondente a imobilização de ArtinM à SAM nota-se que houve um aumento na barreira de passagem de elétrons, gerando um aumento ainda maior no valor de R_{ct} . O valor de R_{ct} continuou aumentando após ser realizado o bloqueio com solução de gelatina (linha pontilhada em verde).

O aumento gradativo dos valores de R_{ct} , sugere de forma consecutiva, a formação da SAM, a imobilização da ArtinM e o bloqueio com gelatina, pois corroborando com os trabalhos de González-Fernández e colaboradores (2011) e Johnson e colaboradores (2012), quanto mais espécies se adsorvem à superfície do eletrodo, maior se torna a barreira que dificulta a passagem de elétrons entre a superfície de ouro do eletrodo e as espécies eletroativas do meio.

Este aumento sucessivo da resistência à transferência de carga verificado com a formação da SAM e funcionalização com lectina é normalmente visualizado no sistema quando a proteína em questão não apresenta grupamento redox.

Figura 21 – Curva representativa da formação da superfície de reconhecimento. Processo de adsorção da lectina ArtinM sobre o eletrodo de ouro com a monocamada de tióis ativada com solução EDC/NHS e bloqueada com gelatina. A curva preta (Au) representa o eletrodo de ouro limpo e polido, a curva vermelha (Monocamada) a formação da SAM composta por uma mistura de tióis(11-MUA e 6-MetOH), a curva azul (ArtinM) a imobilização da ArtinM na SAM e a curva verde (Gelatina), o bloqueio com gelatina dos grupos carboxílicos do 11-MUA que não se ligaram à lectina.



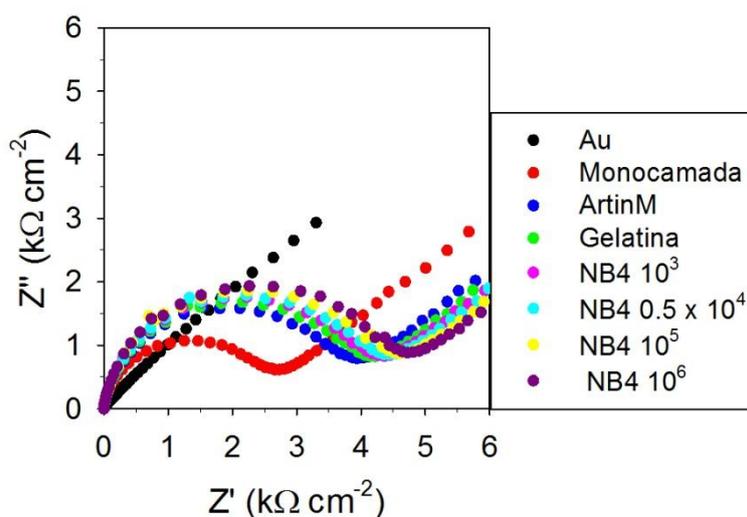
Fonte: Próprio autor

4.2.2.3 Estudo da interação ArtinM-NB4

O estudo da interação ArtinM-NB4 foi realizado utilizando a técnica de EIS por meio da adição sucessiva de diferentes concentrações das células leucêmicas sobre o eletrodo previamente funcionalizado com a lectina. Pela Figura 22 é possível observar que os valores de R_{ct} aumentaram proporcionalmente à adição das concentrações crescentes de NB4, sugerindo a ligação das células à ArtinM.

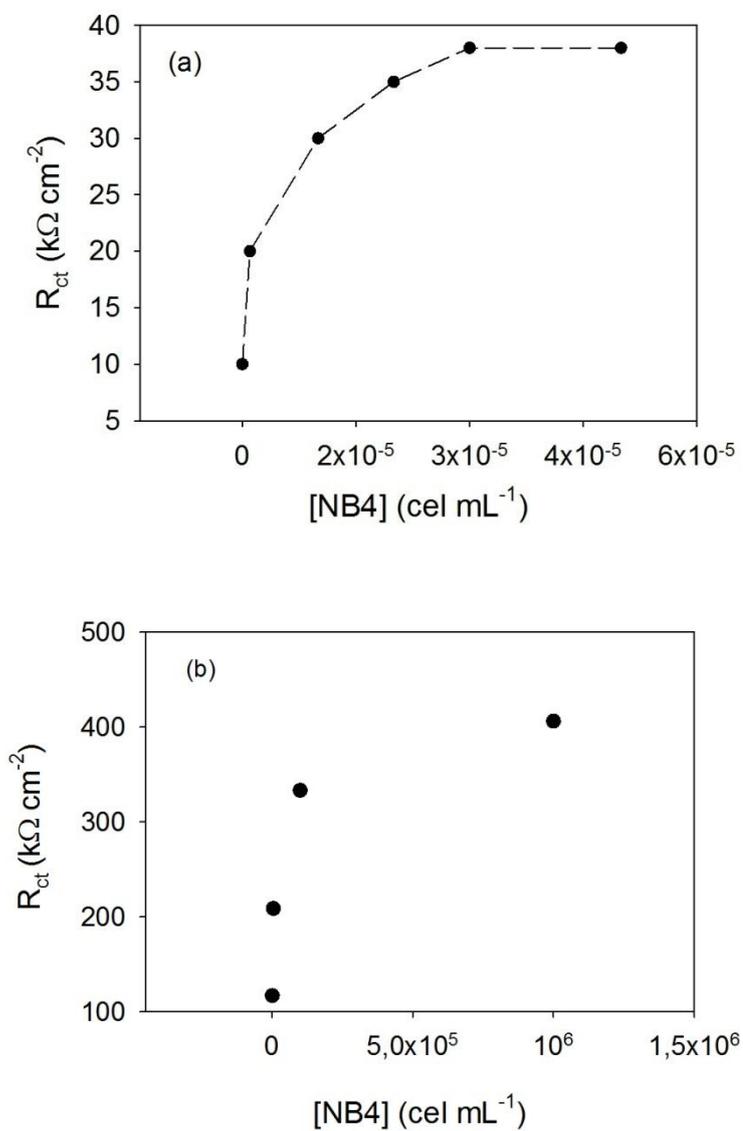
Por meio da adição de concentrações crescentes de célula sobre diferentes sensores modificados com ArtinM, foi possível construir a curva de saturação, e por meio dela, aplicar o modelo da Isoterma de Langmuir (LEBED et al., 2006). A curva de saturação obtida para o sistema em estudo (ArtinM-NB4) é mostrada na Figura 23. R_{ct} está representado pela média dos valores.

Figura 22 – Interação ArtinM-NB4 pela técnica de EIS. Curva padrão, de EIS, construída por meio das adições de solução de NB4 em diferentes concentrações sobre a superfície do eletrodo funcionalizado com ArtinM. O crescimento gradativo da espessura da barreira que impede a transferência de elétrons na interface eletrodo/eletrólito. Após a formação da SAM e a imobilização da lectina, ocorre aumento das concentrações de células leucêmicas adicionadas.



Fonte: Próprio autor

Figura 23 – (a) Exemplo de isoterma de Langmuir. (b) isoterma de Langmuir obtida para a interação ArtinM-NB4, por meio da adição de concentrações crescentes de célula sobre diferentes sensores modificados com ArtinM.



Fonte: (a) Adaptado de Santos (2012); (b) Próprio autor

4.2.2.4 Determinação da constante de afinidade aparente (K') da interação ArtinM-NB4 por meio do modelo da Isoterma de Langmuir.

Baseado nas mesmas equações expostas na seção 4.2.1.3, foi calculada a constante de afinidade aparente, K' , para a interação ArtinM-NB4, com dados eletroquímicos.

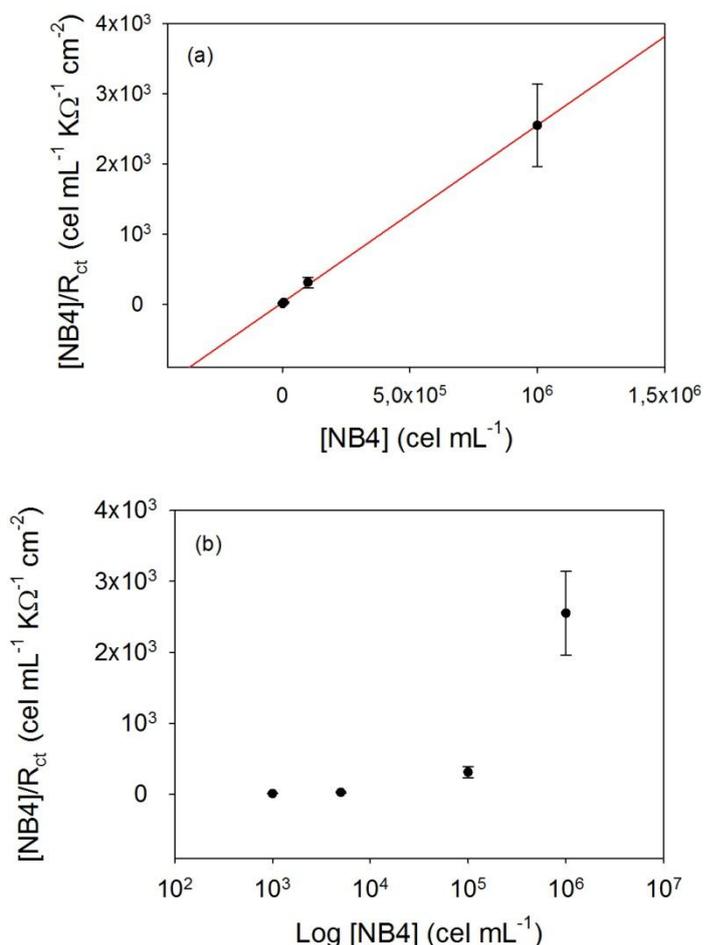
Os valores da relação entre a quantidade de NB4 adsorvida ($[NB4]/R_{ct}$) e a concentração da mesma em solução ($[NB4]$) encontram-se expressos na Tabela 5. Utilizando os resultados expressos nesta tabela foi construída a isoterma de Langmuir linearizada para a interação ArtinM-NB4, representada na Figura 24.

Tabela 5. Relação entre a quantidade de NB4 adsorvida ($[NB4]/R_{ct}$) e a concentração da mesma em solução ($[NB4]$). Estes resultados foram obtidos por meio de experimentos realizados pela técnica eletroquímica EIS e foram utilizados para o cálculo da constante de afinidade aparente, K' para o sistema biológico ArtinM-NB4.

$[NB4]$ cel mL ⁻¹	$[NB4]/R_{ct} / \text{cel mL}^{-1} \text{k}\Omega^{-1} \text{cm}^{-2}$
10^3	$9,72 \times 10^0$
$0,5 \times 10^4$	$2,64 \times 10^1$
10^5	$3,11 \times 10^2$
10^6	$2,55 \times 10^3$

Fonte: Próprio autor

Figura 24 - (a) Isoterma de Langmuir linearizada para a interação ArtinM-NB4 obtida para o cálculo da constante de afinidade aparente, K' . (b) Isoterma de Langmuir linearizada para a interação ArtinM-NB4, concentração de NB4 expressa em log. A regressão linear está mostrada em vermelho.



Fonte: Próprio autor

Os gráficos da Figura 24 foram obtidos por meio da Equação (2) e dos dados eletroquímicos. No gráfico (a), não é possível observar o primeiro ponto da reta (10³ cel mL⁻¹), pois o mesmo está sobreposto ao segundo ponto (0,5x10⁴ cel mL⁻¹). Entretanto, no gráfico (b) é utilizado o log da concentração de NB4, assim os quatro pontos ficam visíveis. O coeficiente de correlação para a regressão linear foi de 99,9% no gráfico (a).

Por meio da razão entre o coeficiente angular e o linear da isoterma de Langmuir linearizada foi determinada a constante de afinidade aparente, K' para a interação da ArtinM com a célula NB4. O valor de K' obtido foi de $(9.9 \pm 0,2) \times 10^{-5}$ mL cel⁻¹.

4.2.3 Comparação entre as técnicas de EIS e QCM, na determinação da constante de afinidade aparente, K'

O valor de K' da interação ArtinM-NB4 obtido por meio da técnica de QCM foi de $(4,4 \pm 0,1) \times 10^{-7} \text{ mL cel}^{-1}$ (seção 4.2.1.3), enquanto o obtido por meio da técnica de EIS foi de $(9,9 \pm 0,2) \times 10^{-5} \text{ mL cel}^{-1}$ (seção 4.2.2.4). Essa diferença entre esses valores pode estar relacionada a diferentes fatores como (i) a utilização de adição sucessiva de NB4 em EIS e análise unitária em QCM, (ii) variação na engenharia de superfície e (iii) as distintas faixa de saturação entre uma técnica e outra.

Para a técnica de EIS, as análises foram realizadas por meio de adição sucessiva, ou seja, em cada eletrodo foram adicionadas concentrações crescentes de NB4 para a construção da curva de saturação. Para a técnica de QCM foram utilizadas análises unitárias, cada cristal recebeu apenas uma única concentração de célula. Esta diferença nas análises pode justificar as menores barras de desvio padrão obtidos pela técnica de EIS (Fig. 24) quando comparados com os da técnica de QCM (Fig. 18). Além disso, a presença de desvios em ambas as técnicas pode ser explicada pelo uso de um sistema biológico lectina-célula que sugere algumas variáveis que podem influenciar nos valores entre uma medida e outra, por exemplo, variações nas glicoproteínas de superfície celular podem ocorrer se as células estiverem em diferentes fases dos ciclos celular ou por mudanças no microambiente.

Outro ponto relevante refere-se à modificação na quantidade de ArtinM imobilizada, variando o número de sítios ativos na superfície transdutora. A SAM na QCM foi formada com uma mistura de tióis na proporção de 1:100 de tiol âncora e tiol espaçador, respectivamente, enquanto que a SAM na EIS foi formada na proporção 1:25. Por possuir uma quantidade maior de tiol âncora, a SAM em EIS passou a ter um número maior de sítios de interação imobilizados.

Distintas faixas de concentração das soluções de NB4 foram utilizadas em cada técnica. As concentrações utilizadas para a técnica de EIS estão na faixa exponencial do gráfico de saturação (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 cel mL^{-1}), enquanto as concentrações utilizadas para a técnica de QCM estão na faixa de

saturação (10^6 e 10^7 cel mL⁻¹), mostrando que a técnica EIS é mais sensível, pois por meio dela a interação ArtinM-NB4 pôde ser detectada utilizando-se uma faixa de concentração de células menor. A quantidade de material utilizado nas medidas eletroquímicas também é menor do que a quantidade utilizada nas medidas piezoelétricas, pois pela técnica de EIS as interações biológicas ocorrem em repouso e pela técnica de QCM ocorrem em fluxo.

Além disso, também em relação a utilização de baixas concentrações de analito na técnica de EIS pode-se inferir que esta técnica se adequa melhor a condição (4) da isoterma de Langmuir, que diz que não existe interação entre moléculas situadas em sítios diferentes, pois para minimizar os possíveis efeitos de interação entre as células que possuem estruturas grandes, geralmente são utilizadas concentrações diluídas de analito.

Por meio da técnica de QCM é mais fácil realizar medidas em tempo real e com isso obter parâmetros cinéticos, porém a técnica de EIS se mostrou muito mais eficiente na realização de *screening* rápido e na obtenção de parâmetros de afinidade.

Com isso, pode-se dizer que para a realização de medidas que possuem dificuldade de obtenção de analito e exige-se rapidez nas análises, que é o caso do diagnóstico de doenças e da identificação de produtos naturais, a técnica de EIS é mais vantajosa.

Tabela 6 – Comparação entre as técnicas de Microbalança a Cristal de Quartzo (QCM) e a de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS), no estudo da interação ArtinM-NB4.

FATORES DE COMPARAÇÃO	TÉCNICA DE QCM	TÉCNICA DE EIS
Quantidade de material utilizado nas análises	100 µL por cristal	30 µL por eletrodo
Tempo de análise (construção da curva padrão)	10 dias	2 dias
Sensibilidade	na ordem de 10^6 cel mL ⁻¹	na ordem de 10^3 cel mL ⁻¹
Engenharia de superfície (proporção de tiol âncora e tiol espaçador, respectivamente)	1:100	1:25
Utilização de marcadores	livre	Livre
Medidas realizadas em tempo real e determinação de parâmetros cinéticos	fácil realização	complexa realização

Fonte: Próprio autor

5. CONCLUSÃO

As técnicas de microbalança a cristal de quartzo e espectroscopia de impedância eletroquímica mostraram-se adequadas para a avaliação e estudo da interação ArtinM-NB4 por meio do desenvolvimento de uma superfície de reconhecimento.

Para as duas técnicas, QCM e EIS, foi possível aplicar o modelo da Isoterma de Langmuir, possibilitando a determinação das constantes de afinidade, K' , para a interação ArtinM-NB4.

Quando comparada com a técnica QCM, a EIS mostrou-se mais sensível, pois por meio dela a interação ArtinM-NB4 pôde ser detectada utilizando-se uma faixa de concentração de células menor. As concentrações utilizadas para a técnica de EIS estão na faixa exponencial do gráfico de saturação, enquanto as concentrações utilizadas para a técnica de QCM estão na faixa de saturação.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, J. F. D. et al. Aplicações analíticas dos cristais piezoelétricos. **Química Nova**, v. 14, n. 4, p. 272-278, 1991.
- BARD, A. J. Techniques based on concepts of impedance. In: _____. **Electrochemical methods**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 2001. p. 368-414.
- BENITES, T. A. **Estudo das propriedades dielétricas e de bloqueio das monocamadas automontadas**. 2013. 107 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.
- BRYAN, T. et al. An optimised electrochemical biosensor for the label-free detection of C-reactive protein in blood. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 39, p. 94-98, 2013.
- CANCINO, J. C. **Eletrodos modificados com monocamadas auto-organizadas dealconotióis**: uma aborgagem 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.
- CARVALHAL, R. F. **Desenvolvimento de sensor biomimético empregando monocamadas auto-organizadas de tióis sobre eletrodos de ouro**. 2005. 98 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- CARVALHO, F. C. **Morte de linhagem celular de leucemia mielóide humana induzida pela lectina ArtinM de *Artocarpus integrifolia***. 2008. 68 f. Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.
- CARVALHO, F. C. et al. The recognition of N-Glycans by the lectin ArtinM mediates cell death of a human myeloid leukemia cell line. **Plos One**, v. 6, p. 1-10, 2011.
- CARVALHO, L. A.; ANDRADE, A. R.; BUENO, P. R. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. **Química Nova**, v. 29, n. 4 p. 796-804, 2006.
- CHAHUD, F. et al. The lectin KM+ induces corneal epithelial wound healing in rabbits. **International Journal Experimental Pathology**, v. 90, p.166-173, 2009.
- COLTRI, K. C. et al. Therapeutic administration of KM+ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via interleukin-12 production in a toll-like receptor 2-dependent mechanism. **American Journal of Pathology**, v. 173, n. 2, p. 423-432, 2008.

COOPER, G. M.; HAUSMAN, R. E. Câncer. In: _____. **A célula: uma abordagem molecular**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. p. 623-631.

CUI, X. L. et al. Assessing the apparent effective thickness of alkanethiol self-assembled monolayers in different concentrations of Fe(CN)₆³⁻/Fe(CN)₆⁴⁻ by ac impedance spectroscopy. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 470, n. 1, p. 9-13, July 1999. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000081735200002 >. Acesso em: 10 jan. 2013.

DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L. T. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 970-979, 2004.

EDVARDSSON, M. et al. A dual-frequency QCM-D setup operating at elevated oscillation amplitudes. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 15, p. 4918-4926, Aug. 2005.

FATIBELLO FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores. **Química Nova**, v. 15, n. 1, p. 28-39, 1992.

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.

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (Brasil). L. L. P. da Silva et al. **Composição farmacêutica para prevenir e cicatrizar lesões epiteliais, composição farmacêutica imunomoduladora, composição farmacêutica para tratar toxoplasmose, composição farmacêutica, composição inseticida, inseticida, uso de lectina km+ para tratar cicatrizações, uso de lectina km+ para tratar toxoplasmose, uso de lectina km+ para preparar medicamento para tratar toxoplasmose, uso de lectina km+ para preparar medicamento imunomodulador, uso da lectina km+ para preparar medicamento anti-bacteriano, uso de lectina km+ para preparar medicamento anti-viral, método de expressão, vetor de dna, organismo recombinante, seqüência de nucleotídeos, proteínas, anticorpo e plasmídeo**. BR2003011547-A, 19 maio 2003, 22 mar. 2005.

GABIUS, H. J. Animal lectins. **Europe Journal Biochemistry**, v. 243, p. 543-576, 1996.

GANIKO, L. et al. Lectin KM+ - induced neutrophil haptotaxis involves binding to laminin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1721, p.152-163, 2005.

GIL, E. S.; MELO, G. R. Electrochemical biosensors in pharmaceutical analysis. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 3, p. 375-391, jul. 2010.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, E. et al. Impedimetric aptasensor for tobramycin detection in human serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, p. 2354-2360, 2011.

GORELIK, E. et al. On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. **Cancer Metastasis Review**, v. 20, n. 3/4, p. 245-277, 2001.

HU, Y.; PENG, Z.; BANG-CE, Y. Label-free electrochemical impedance spectroscopy biosensor for direct detection of cancer cells based on the interaction between carbohydrate and lectin. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 43, p. 79-83, 2013.

HUANG, I. ; LIN, C. ; WU, E. Effects of a glutaraldehyde cross-linking layer on a quartz crystal microbalance-based α -fetoprotein biosensor with cystamine self-assembly monolayer. **Journal of Micro/Nanolithography**, v. 9, n. 7, p. 023008/1-023008/7, 2010.

JEYAPRAKASH, A. A. et al. Structural basis for the carbohydrate specificities of artocarpin: variation in the length of a loop as a strategy for generating ligand specificity. **Journal of Molecular Biology**, v. 338, n. 4, p. 757-770, 2004.

JOHNSON, A. et al. Sensitive affimer and antibody based impedimetric label-free assays for c-reactive protein. **Analytical Chemistry**, v. 40, n. 8, p. 1-8, 2012.

KAPOOR, S. et al. Apoptosis induction by *Maackia amurensis* agglutinin in childhood acute lymphoblastic leukemic cells. **Leukemia Research**, v. 32, n. 4, p. 559-567, 2008.

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.

KIM, Y.J. et al. Topical application of the lectin Artin M accelerates wound healing in rat oral mucosa by enhancing TGF- β and VEGF production. **Wound Repair and Regeneration**, v. 21, n. 3, p. 456-463, 2013.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 259, p. 680-685, 1970.

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.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins as molecules and as tools. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, p. 35-67, 1986.

LISDAT, F.; SCHÄFER, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 5, p. 1555-1567, 2008.

LOAIZA, O. A. et al. Nanostructured disposable impedimetric sensors as tools for specific biomolecular interactions: sensitive recognition of concanavalin A. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 8, p. 2987-2995, 2011.

- MALHOTRA, B. D.; TURNER, A. P. F. (Ed.). **Advances in biosensors: perspectives in biosensors**. Amsterdam: Elsevier Science, 2003. v. 5, p. 196 .
- MOORE, W. J. **Físico-química**. 4. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1976. p. 452-453.
- MORENO, A. N. et al. Mast cell degranulation induced by lectins: effect on neutrophil recruitment. **International Archives Allergy Immunology**, v. 132, n. 3, p. 221-230, 2003.
- NAKAMURA-TSURUTA, S. et al. Analysis of the sugar-binding specificity of mannose-binding-type Jacalin-related lectins by frontal affinity chromatography-an approach to functional classification. **FEBS Journal**, v. 275, n. 6, p. 1227-1239, 2008.
- NILSSON, C. L. **Lectins: analytical technologies**. Amsterdam: Elsevier, 2007. p. 1-14; 111-117.
- OLIVEIRA, M. D. et al. Impedimetric biosensor based on self-assembled hybrid cystein-gold nanoparticles and CramoLL lectin for bacterial lipopolysaccharide recognition. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 362, n.1, p.194-201, 2011.
- OLIVEIRA, R. S. de. et al. A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. **Journal Immunology**, v. 153, n. 4, p. 1798-1807, 1994.
- PANUNTO-CASTELO, A. et al. KM(+), a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. **Glycobiology**, v. 12, p. 1035-1042, 2001.
- PEDROSO, M. M. et al. Jacalin interaction with human immunoglobulin A1 and bovine immunoglobulin G1: affinity constant determined by piezoelectric biosensing. **Glycobiology**, v. 22, n. 3, p. 326-331, 2012.
- PEI, Z. et al. Study of real-time lectin carbohydrate interactions on the surface of a quartz crystal microbalance. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, p. 60-66, Jan. 2005.
- PEI, Z. et al. Real-time analysis of the carbohydrates on cell surfaces using a QCM biosensor: a lectin-based approach. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 35, p. 200-205, 2012.
- PEIRIS, D. et al. A novel approach to determining the affinity of protein-carbohydrate interactions employing adherent cancer cells grown on a biosensor surface. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 35, p. 160-166, 2012.
- PESQUERO, N. C. **Estudo da equivalência entre a lectina ArtinM obtida a partir da semente da jaca e a sua forma recombinante na afinidade por glicanas**. 2010. 90 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

PESQUERO, N. C. et al. Real time monitoring and kinetic parameter estimation of the affinity interaction of jArtinM and rArtinM with peroxidase glycoprotein by the electrogravimetric technique. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 1, p. 36-42, 2010.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v.109, p. 347-352, 1995.

REUEL, N. F. et al. Nanoengineered glycan sensors enabling native glycoprofiling for medicinal applications: towards profiling glycoproteins without labeling or liberation steps. **Chemical Society Reviews**, v. 4, p. 5744-5779, 2012.

RICCI, A. R. **Novos aspectos da biologia de neutrófilos estimulados por ArtinM**. 2012. 82 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

ROSA, J. C. et al. KM+, a mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*: amino acid sequence, predict tertiary structure, carbohydrate recognition, and analysis of the beta-prism fold. **Protein Science**, v. 8, p.13-24, 1999.

RÜDIGER, H. Plant lectins - more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. **Acta Anatomica**, v. 161, p.130-152,1998.

RÜDIGER, H.; GABIUS, H. J. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. **Journal Glycoconjugate**, v. 589, p. 589-613, 2001.

SANTOS, A. **Estudo da afinidade das proteínas Rtgmic1 e Rtgmic4 da *Toxoplasma gondii* com glicoproteínas utilizando técnica piezelétrica**. 2012. 113 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**, v. 246, p. 227-234, 1989.

SHEN, Z. et al. Nonlabeled quartz crystal microbalance biosensor for bacterial detection using carbohydrate and lectin recognitions. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 6, p. 2312-2313, 2007.

SILVA, G. P. da; CARVALHO, F. C.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Neutrophil activation induced by plant lectins: modulation of inflammatory processes. **Inflammation and Allergy-Drug Targets**, v. 11, n. 6, p. 1871-5281, 2012.

SOUZA, M. A. et al. The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. **Glycoconjugate Journal**, v. 30, n. 7, p. 641-657, 2013.

STEINEM, C. et al. Impedance and shear wave resonance analysis of ligand-receptor interactions at functionalized surfaces and of cell monolayers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 12, n. 8, p. 787-808, 1997.

- STONES, J. D.; CHERVIN, A. S.; KRANZ, D. M. T-cell receptor binding affinities and kinetics: impact on T-cell activity and specificity. **Immunology**, v. 126, p. 165-176, 2009.
- SVOBODOVÁ, L. et al. QCM immunosensor based on polyamidoamine dendrimers. **Electroanalysis**, v. 18, p. 1943-1949, 2006.
- TAN, L. et al. Real-time monitoring of the cell agglutination process with a quartz crystal microbalance. **Analytical Biochemistry**, v. 383, n. 1, p. 130-136, 2008.
- TAN, L. et al. *In vitro* study on the individual and synergistic cytotoxicity of adriamycin and selenium nanoparticles against Bel7402 cells with a quartz crystal microbalance. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 5, p. 2268-2272, 2009.
- TEIXEIRA, C. R. et al. Potential of KM+ lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection. **Vaccine**, v. 24, n. 15, p. 3001-3008, 2006.
- TOLEDO, K. A. et al. Neutrophil activation induced by ArtinM: release of inflammatory mediators and enhancement of effector functions. **Immunology Letters**, v. 123, p. 14-20, 2009.
- VAN-DAMME, E. J. M. et al. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Review in Plant Science**, v. 17, p. 575-692, 1998.
- WAN, Y. et al. Monitoring microbial populations of sulfate-reducing bacteria using an impedimetric immunosensor based on agglutination assay. **Talanta**, v. 80, n. 1, p. 218-223, 2009.
- YAKOVLEVA, M. E. et al. A study of glycoprotein-lectin interactions using quartz crystal microbalance. **Analytica Chimica Acta**, v. 668, n. 1, p. 80-85, 2010.
- YAKOVLEVA, M. E. et al. Lectin typing of *Campylobacter jejuni* using a novel quartz crystal microbalance technique. **Analytica Chimica Acta**, v. 694, n. 1/2, p. 1-5, 2011.
- YANG, H. et al. Detection and discrimination of alpha-fetoprotein with a label-free electrochemical impedance spectroscopy biosensor array based on lectin functionalized carbon nanotubes. **Talanta**, v. 111C, p. 62-68, 2013.