

BIOSENSOR ELETROQUÍMICO NANOESTRUTURADO PARA DETECÇÃO DE GLICANOS PELA LECTINA DE *Cratylia mollis*

P.M.S. Silva*, A.C.M.S. Dias**, B.V.M. Silva**, E. K. G. Trindade**, L.C.B.B. Coelho*, R.F. Dutra**, M.T.S. Correia*

*Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica, Recife, Brasil

**Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Engenharia Biomédica, Recife, Brasil
e-mail: priscilamssilva@gmail.com

Resumo: Um biossensor nanoestruturado baseado em nanotubos de carbono (NTCs) e poli-L-lisina (PLL) foi desenvolvido para detecção da interação entre a lectina CramoLL e glicanos via transdução eletroquímica. As etapas de construção da plataforma sensora e detecção da interação da CramoLL com fetuína e Metil- α -D-manopiranosose (MeaMan) foram obtidas através da técnica de voltametria cíclica (VC) e voltametria de onda quadrada (VOQ), respectivamente. Análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram empregadas para caracterização morfológica do filme. NTCs promoveram um aumento de 71,2 % na área eletroativa. Foram detectadas as interações CramoLL-MeaMan com boa correlação linear entre 0,05 para 0,2 mmol L⁻¹ ($r=0,994$) e limite de detecção (LD) de 0,014 mmol L⁻¹, e CramoLL-fetuína, com boa correlação linear entre 0,01 e 0,25 μ mol L⁻¹ ($r=0,996$) e LD de 0,01 μ mol L⁻¹. Futuramente esses biossensores poderão auxiliar em estudos de glicanos em materiais biológicos e diagnóstico de doenças.

Palavras-chave: Nanotubos de carbono, poli-L-lisina, CramoLL, fetuína, Metil- α -D-manopiranosose.

Abstract: A nanostructured biosensor based on carbon nanotubes (CNTs) and poly-L-lysine (PLL) was developed for detection of the interaction between CramoLL lectin and glycans via electrochemical transduction. The steps of construction the sensor platform and detection of the interaction of CramoLL with fetuin and Methyl- α -D-mannopyranose (MeaMan) were obtained using the technique of cyclic voltammetry (CV) and square wave voltammetry (SWV), respectively. Analysis by scanning electron microscopy (SEM) were used for morphological characterization of the film. CNTs promoted an increase of 71.2% in the electroactive area. CramoLL-MeaMan interactions were detected with good linear correlation between 0.05 to 0.2 mmol L⁻¹ ($r = 0.994$) and limit of detection (LOD) of 0.014 mmol L⁻¹, and CramoLL-fetuin with good linear correlation between 0.01 and 0.25 μ mol L⁻¹ ($r = 0.996$) and LOD 0.01 μ mol L⁻¹. These biosensors may assist future studies in glycans on biological materials and diagnosis of disease.

Keywords: carbon nanotubes, poly-L-lysine, CramoLL, fetuin, Methyl- α -D-mannopyranose.

Introdução

Lectinas são proteínas de origem não imune que reconhecem carboidratos com alta especificidade e reversibilidade por pelo menos um sítio de ligação não catalítico [1]. Estão envolvidas em eventos fisiológicos de interações proteína-carboidrato e são valiosas ferramentas para identificação de modificações na expressão de carboidratos associadas a doenças como o câncer. Lectinas são encontradas em plantas, microrganismos e animais [1]. CramoLL é uma lectina isolada de sementes de *Cratylia mollis*, conhecida como feijão camaratu, pertencente a família Leguminosae e subtribo Diocleinae. CramoLL pertence ao grupo de especificidade glicose/ manose [2]. Estudos relatam o uso de interações CramoLL-glicanos na detecção de carcinomas mamário e prostático [3, 4].

Atualmente, métodos eletroquímicos baseados em lectinas tem sido desenvolvidos para o estudo de interações lectina-carboidratos. Os biossensores eletroquímicos detectam e quantificam interações moleculares de modo prático, rápido, sensível e barato. Caracterizam-se pela capacidade de converter o sinal da interação biológica em um sinal elétrico mensurável proporcional à concentração do analito e se baseiam no preparo de eletrodos com componentes biológicos imobilizados [5]. A superfície dos eletrodos pode ser modificada com polímeros e nanomateriais a fim de melhorar as propriedades eletroanalíticas. Polímeros são frequentemente utilizados para modificação e imobilização de biomoléculas através de grupos reativos livres. Poliaminoácidos como poli-L-lisina (PLL) possuem grupos amino ativos abundantes, úteis para eletrocatalise, imobilização de biomoléculas e ancoragem de NTCs.

O uso de polímeros para imobilização limitam a quantidade de moléculas imobilizadas em função de seus grupos reativos livres, o que dificulta a obtenção de sistemas sensíveis. Para contornar essa limitação, tem-se introduzido o uso de nanomateriais, que aumentam a área de imobilização, a condutividade e a sensibilidade. Nanotubos de carbono (NTCs) são descritos como folhas de grafeno enroladas em torno de um cilindro imaginário mantida por interações de Van der Waals. Em geral, são caracterizados pela estrutura ordenada, peso ultraleve, alta resistência mecânica, elevada condutividade e área superficial, importante para o

aumento da área de imobilização de biomoléculas e da sensibilidade, e a funcionalização com grupos químicos [6]. Essas propriedades têm introduzido os NTCs no desenvolvimento de biossensores altamente sensíveis e rápidos. Neste trabalho, foi elaborado um biossensor eletroquímico baseado em PLL e NTCs-COOH para imobilização de CramoLL e avaliar as interações entre CramoLL e os glicanos Me α Man e fetuína .

Materiais e métodos

Materiais – Poli-L-lisina, Metil- α -D-Manopiranosose (Me α Man) e fetuína foram obtidas da Sigma Aldrich (St Louis, USA). Nanotubos de carbono multicamadas funcionalizados com grupos carboxílicos (NTC-COOH) foram adquiridos da DropSens (Oviedo, Spain). A lectina de *Cratylia mollis* (CramoLL) foi obtida no Laboratório de Bioquímica de proteínas (Departamento de Bioquímica, UFPE), de acordo com protocolo preestabelecido [2]. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

Aparelhos e Medições– Os estudos eletroquímicos foram executados em uma célula de vidro fechada, contendo um sistema composto por um eletrodo de carbono vítreo (ECV) como eletrodo de trabalho, um fio de platina helicoidal como eletrodo auxiliar e um eletrodo Ag/AgCl (sat. KCl) como referência, todos conectados a um potenciostato/ galvanostato Ivium CompactStat (Netherlands) acoplado a um microcomputador e controlado pelo software IviumSoft. As análises eletroquímicas utilizando as técnicas de VC, executada em -0,1 a 0,5 V, 50 mV s⁻¹, e VOQ, executada em 0,0 a 0,4 V, 50 mV s⁻¹, foram realizadas em solução de KCl (100 mmol L⁻¹) contendo K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆ (5 mmol L⁻¹) como sonda redox. A caracterização morfológica do filme foi executada pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) usando um microscópio Philips XL-30 FEG, com aceleração na voltagem de 10 kV.

Construção da plataforma sensora nanoestruturada – Previamente as modificações da superfície sensora, o ECV foi mecanicamente polido com Al₂O₃ (0,5 μ m) durante 3 min e lavado com água com o objetivo de remover impurezas da superfície. Um filme de PLL (0,01 μ mol L⁻¹) preparado em tampão fosfato salino (100 mmol L⁻¹, pH 7,4) foi eletrodepositado sobre superfície de carbono vítreo limpa utilizando a técnica de VC, na faixa de potencial de -2,0 a 2,0 V, a 50 mV s⁻¹ durante 15 ciclos. Paralelamente, 1 mg de NTCs-COOH foram dispersos em 1 mL de dimetilformamida em banho ultrassônico durante 2 h para formação de uma suspensão homogênea. 15 μ L da suspensão de NTCs-COOH foi depositada sobre o ECV modificado com PLL e submetida a secagem em estufa a 40 °C para evaporação do solvente. Posteriormente, o ECV com o filme nanoestruturado foi incubado com 10 μ L da solução de CramoLL (50 μ g mL⁻¹) durante 60 min a 25 °C para imobilização da lectina. Os sítios livres reativos e inespecíficos da superfície eletródica foram bloqueados com uma solução de glicina (50 mmol L⁻¹) durante 60

min. Todas as etapas de modificação do ECV foram registradas através da técnica de VC.

Deteção eletroquímica da interação CramoLL-glicano – Após imobilização de CramoLL e bloqueio dos sítios inespecíficos com glicina, o ECV foi incubado durante 20 min com uma solução de NaCl (0,15 mol L⁻¹) contendo Me α Man e fetuína em diferentes concentrações. A deteção da interação lectina-glicano foi monitorada por VOQ na presença da sonda redox K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆.

Resultados

Caracterização morfológica do filme de PLL e NTCs - A técnica de MEV foi utilizada para caracterização morfológica e estrutural do filme de PLL e NTCs sobre a superfície de carbono vítreo. As imagens na Figura 1 (a) demonstram o ECV após o procedimento de limpeza. A superfície do eletrodo sem modificações caracteriza-se pela pouca uniformidade. Após o revestimento com o filme de PLL na Figura 1 (b), foi observado a formação de uma camada levemente rugosa que tornou a superfície mais homogênea e uniforme. A imagem na Figura 1 (c) exibe a superfície do ECV com PLL após a adição dos NTCs. Observa-se a presença de nanoestruturas tridimensionais na forma de filamentos longos e abundantes característicos dos nanotubos fixados na superfície.

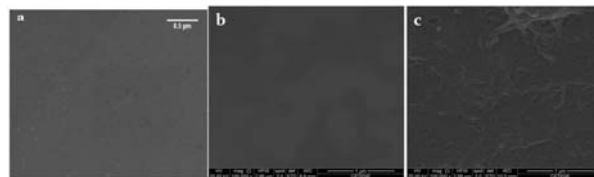


Figura 1. Imagens de MEV da superfície do ECV (a) limpo, (b) após eletrodeposição do filme PLL e (c) modificado com NTCs.

Caracterização eletroquímica da plataforma nanoestruturada – Cada etapa de modificação da superfície de carbono vítreo foi monitorada por VC, obtendo-se os voltamogramas mostrados na Figura 2. A eletrodeposição do filme de PLL reduziu os picos de corrente, caracterizando o comportamento isolante do filme. A adição dos NTCs promoveu um aumento de corrente no par de picos redox, aumentando 71,2 % a área sensora. A imobilização de CramoLL é representada por uma redução na amplitude dos picos redox, devido a natureza isolante da biomolécula. O bloqueio com glicina foi registrado por uma pequena redução nos picos redox.

Otimização da plataforma nanoestruturada - Para determinar a influência da concentração de PLL na construção do filme nanoestruturado, diferentes concentrações do polímero foram avaliadas (0,0001 a 0,05 μ mol L⁻¹). As variações de corrente (ΔI_{pc}), obtida nos ensaios por VC, aumentaram proporcionalmente em função das concentrações de PLL, alcançando um platô em 0,01 μ mol L⁻¹ (Figura 3 (a)). A influência da concentração de NTCs também foi investigada. Após a

deposição de NTCs na superfície, a corrente catódica aumentou até a concentração de $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de NTC-COOH. Depois deste ponto, a corrente diminuiu indicando uma saturação dos grupos reativos livres do polímero na interface sensora (Figura 3 (b)). A estabilidade operacional do filme PLL e NTCs foi avaliada submetendo o ECV a 20 sucessivos ciclos voltamétricos em sonda redox. Como controle, medidas do ECV apenas com o filme de PLL foram realizadas. O coeficiente de variação calculado a partir dos valores de corrente catódica do ECV modificado com PLL e com NTC e PLL foi 1,30 e 0,6%, respectivamente. Estes dados demonstram que o filme nanoestruturado foi 2x mais estável eletroquimicamente, provavelmente relacionada forte interação entre os grupos funcionais do polímero PLL e dos nanotubos.

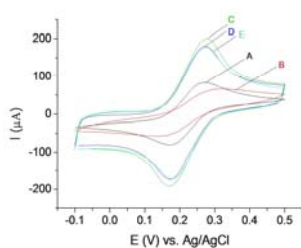


Figura 2. Voltametrias cíclicas de ECV. (A) ECV não modificado; (B) ECV/PLL; (C) ECV/PLL/NTC-COOH; (D) ECV/PLL/NTC-COOH/CramoLL; (E) ECV/PLL/NTC-COOH/CramoLL/Glicina em $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ com solução de $\text{KCl } 100 \text{ mmol L}^{-1}$.

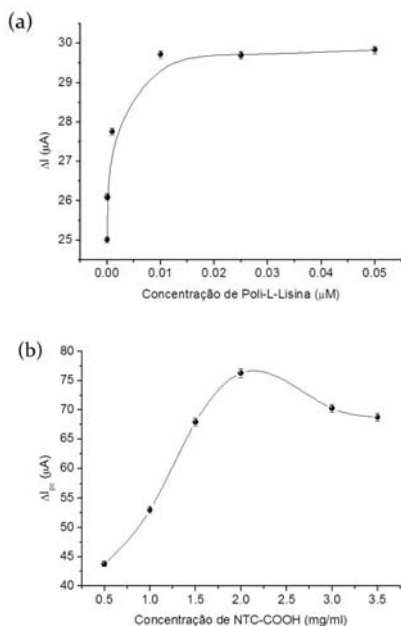


Figura 3. (a) Efeito da concentração de PLL na resposta do biossensor. (b) Efeito da concentração de NTC-COOH na resposta do biossensor. Medições em 5 mmol L^{-1}

$\text{L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ com solução de $\text{KCl } 100 \text{ mmol L}^{-1}$.

Imobilização de CramoLL sobre o filme de PPL e NTCs - ECV/ PLL/ NTC-COOH foram incubados com soluções de CramoLL em diferentes concentrações. Os valores do ΔI_{pc} elevaram-se com o aumento da concentração até 50 µg/mL , a partir da qual a resposta permaneceu quase constante (Figura 4), sendo esta concentração selecionada para os experimentos subsequentes. A reversibilidade eletroquímica do filme nanoestruturado com a lectina imobilizada foi investigada submetendo o ECV à VCs em diferentes velocidades de varredura (10 a 120 mV s^{-1}) (Figura 5 (a)). Aumento linear e proporcional dos picos de corrente anódico ($r=0,997$) e catódico ($r=0,995$) dos voltamogramas em relação à raiz quadrada das velocidades foi observado, indicando processo controlado por difusão (Figura 5 (b)).

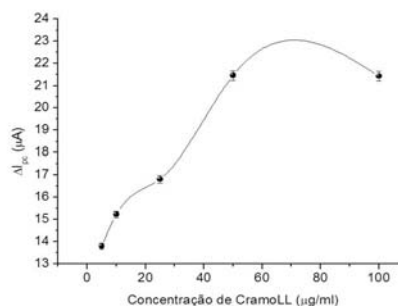


Figura 4. Efeito da concentração de CramoLL na resposta sensora. Medições em $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ com solução de $\text{KCl } 100 \text{ mmol L}^{-1}$.

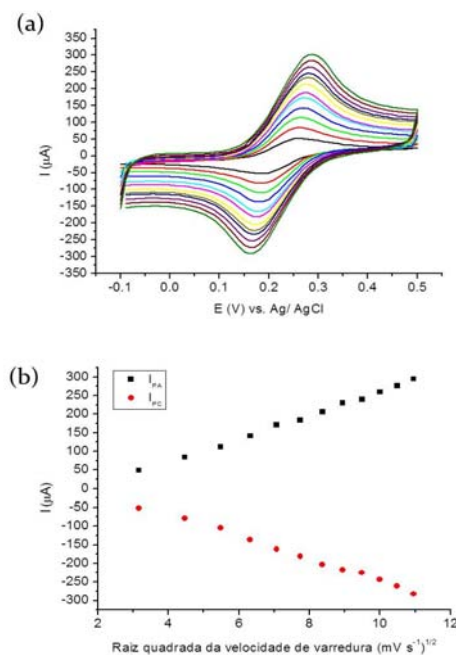


Figura 5. (a) Voltamogramas cíclicos do sensor em $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ com solução de KCl

100 mmol L⁻¹, nas velocidades (de dentro para fora): 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 mV s⁻¹ (b) Plotagem dos picos de corrente em função da raiz quadrada da velocidade.

Curva de calibração – As Figuras 6(a) e 6(b) demonstram as curvas de calibração obtidas por VOQ para detecção da interação da CramoLL com Me α Man e fetuína, respectivamente. Os resultados obtidos evidenciaram uma redução da corrente proporcional em relação às concentrações de Me α Man (0,05 - 0,2 mmol L⁻¹, exibindo uma faixa linear com R de 0,994, p<0,001 e limite de detecção de 0,014 mmol L⁻¹. As respostas para as diferentes concentrações de fetuína (0,01 - 0,25 μ mol L⁻¹) apresentaram uma faixa linear com R=0,996, p<0,001 e limite de detecção de 0,01 μ mol L⁻¹.

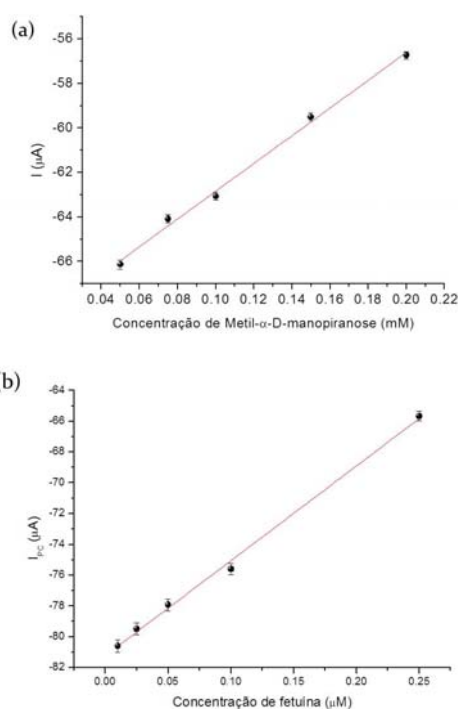


Figura 6. Curva de calibração do biossensor incubado com diferentes concentrações de Me α Man (a) e fetuína (b) em solução de NaCl 0,15 M.

Discussão

A utilização de eletrodos modificados com polímeros poliônicos como base para ancoragem de NTCs tem sido de grande interesse na eletroanálise. Neste trabalho, a superfície de carbono vítreo foi revestida com PLL, um poliaminoácido rico em grupos aminos, o que permitiu uma interação eficaz com os NTCs, especialmente pela presença de grupos carboxílicos nestes nanomateriais, garantindo um aumento da estabilidade do filme na superfície. Os NTCs possibilitaram uma maior transferência de elétrons e condutividade, aumentando a sensibilidade na interface sensora. Entretanto, o excesso de nanotubos na superfície pode favorecer fenômenos de adsorção e acúmulo de cargas que podem prejudicar o processo de

difusão na superfície do eletrodo, bem como causar o desprendimento dos nanotubos [7].

A reação de bioafinidade lectina-carboidrato foi quantificada eletroquimicamente através da correlação das variações de transferência de carga na dupla camada elétrica na interface do eletrodo e as concentrações dos glicanos avaliados. A aplicação do ECV modificado com o filme de PLL e NTCs para detecção da interação entre CramoLL e Me α Man e fetuína possibilitou a obtenção de um baixo limite de detecção, semelhante ao encontrado por Oliveira et al, 2008 [8]. Estes resultados demonstram o potencial uso de lectinas como ferramenta para estudo e detecção do perfil de glicosilação expressado em diferentes eventos fisiológicos e patológicos, permitindo o diagnóstico precoce de doenças como o câncer.

Conclusão

O uso de NTCs promoveu a imobilização de CramoLL com manutenção da sua afinidade biológica demonstrada pela detecção das interações com Metil- α -D-manopirranose e fetuína, obtendo-se um método eletroanalítico altamente sensível para glicanos aplicáveis a estudos de glicosilação e o diagnóstico de doenças relacionadas a partir de células e fluidos biológicos.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

- [1] Sharon N, Lis H. Journal Agricultural and Food Chemistry. 2002; 50: 6586–6591.
- [2] Correia MTS, Coelho LCBB. Applied Biochemistry and Biotechnology; 1995; 55(3): 261-73.
- [3] Beltrão EIC, Correia MTS, Silva JF, Coelho LCBB. Applied Biochemistry and Biotechnology 1998; 74: 125-134.
- [4] Lima ALR, Cavalcanti CCB, Silva MCC, Paiva PMG, Coelho LCBB, Beltrão EIC, Correia MTS. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2010, Article ID 179817, 6 pages.
- [5] Turner APF. Chemical Society Reviews 2013; 42: 3184-3196.
- [6] Khan U, O'Connor I, Gun'ko YK, Coleman JN. Carbon 2010; 48(10): 2825–2830.
- [7] Gomes-Filho SLR, Dias ACMS, Silva MMS, Silva BVM, Dutra RF. Microchemical Journal 2013; 109: 10–15
- [8] Oliveira MDL, Correia MTS, Coelho LCBB, Diniz FB. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2008; 66: 13–19.