

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Estudo da interação lectina-carboidrato por
meio da técnica de microbalança de cristal de quartzo**

MARIELE MUCIO PEDROSO *

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do título
de MESTRE EM CIÊNCIAS (área de
concentração: QUÍMICA ANALÍTICA)

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria

* Bolsista CAPES

**São Carlos
2006**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

P372ei

Pedroso, Mariele Mucio.

Estudo de interação lectina-carboidrato por meio da técnica de microbalança de cristal de quartzo / Mariele Mucio Pedroso. -- São Carlos : UFSCar, 2007.
91 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Química analítica. 2. Microbalança de cristal de quartzo. 3. Lectina. 4. Monocamadas auto-organizadas. I. Título.

CDD: 543 (20^a)

**Aos meus pais Carlos e Jussara,
e ao meu irmão Diego pelo amor,
pelo apoio e por acreditarem
em mim, sempre!**

**Ao meu namorado Dower pelo amor,
pela paciência e por me apoiar sempre,
acreditando na conclusão deste trabalho.**

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho contou com a colaboração, consciente ou inconsciente, de um conjunto amplo de colegas, alunos e instituições e por esta razão, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

Ao meu orientador Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria, pelo constante incentivo, sempre indicando o melhor caminho nos momentos de dificuldade, participando das minhas inquietações. Pela disponibilidade ao longo destes dois anos, pelas críticas e sugestões relevantes durante a orientação e pela amizade.

A Prof. Dra. Maria Cristina Roque-Barreira, do Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), pela sua generosidade desde o nosso primeiro contato, pelas sugestões sempre oportunas no enriquecimento deste trabalho, assim como pela disponibilidade e amizade demonstradas.

A Sandra Maria de Oliveira Tomaz, técnica do Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), pela disposição em me ensinar o procedimento de extração e purificação da jacalina, pelas amostras de proteína fornecidas e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno, do Instituto de Química da Unesp de Araraquara, por sua contribuição com os dados de admitância eletroacústica, por estar sempre disposto em colaborar com este trabalho e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Ernesto C. Pereira de Souza, do Departamento de Química da UFSCar, por gentilmente disponibilizar um espaço em seu laboratório para que fossem realizados experimentos com a QCM.

A todo pessoal do Laboratório de Eletroquímica do LIEC no Departamento de Química da UFSCar, pela contribuição com o empréstimo dos equipamentos e materiais para realização deste trabalho.

Ao doutorando Presley do LIEC, no Departamento de Química da UFSCar, pela colaboração na aquisição dos dados de infravermelho.

A Prof. Dra. Dulce Helena de Souza que gentilmente aceitou participar e colaborar com este trabalho fazendo parte da Banca Examinadora.

Ao Aílton, físico e amigo, pelas discussões ao longo do mestrado e pela ajuda com os dados de admitância eletroacústica.

Aos amigos do LABiE que me “aturaram” e me ajudaram muito ao longo deste mestrado: Andrea, Elen, Paulo, Grazielle, Luiza, Estela, Jovino e em especial a Juliana pela colaboração na aquisição dos dados do sistema em fluxo, e pela ajuda no trabalho como um todo. A todos vocês, obrigada pela amizade!

Aos amigos do GAIA e do LABBES pela amizade e por direta ou indiretamente terem contribuído para a realização deste trabalho.

A todos os professores, funcionários, alunos da Pós-Graduação em Química da UFSCar, e todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta dissertação, dando-me força, apoio e incentivo.

A CAPES pelo apoio financeiro.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Algumas aplicações de lectinas de plantas nas áreas médica e biológica.....	4
TABELA 4.1. Parâmetros do circuito equivalente extraídos da curva de admitância para o cristal inserido na célula contendo água e após a formação da monocamada de cistamina.....	39
TABELA 4.2. Parâmetros do circuito equivalente para as curvas de admitância eletroacústica no estudo da imobilização da jacalina sobre a monocamada de cistamina e glutaraldeído.....	49
TABELA 4.3. Constantes de afinidade aparente para a interação entre D-maltose e a ConA imobilizada.....	73

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.1. Diagrama esquemático da estrutura tetramérica da jacalina no qual observam-se os quatro sítios de ligação para carboidratos.....8
- FIGURA 1.2. Diagrama esquemático da estrutura tetramérica da concanavalina A no qual observam-se os quatro sítios de ligação para carboidratos.....9
- FIGURA 1.3. Representação esquemática de um corte transversal de um cristal piezolétrico mostrando a deformação mecânica quando uma diferença de potencial é aplicada às superfícies do cristal.....13
- FIGURA 3.1. Cristal de quartzo de frequência fundamental 10 MHz inserido no suporte metálico responsável pelo contato elétrico.....23
- FIGURA 3.2. A) Cristal de quartzo e a célula de TEFLON[®], B) Cristal inserido na célula.....23
- FIGURA 3.3. Microbalança de cristal de quartzo.....24
- FIGURA 3.4. Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo em linha única. C – transportador, P – bomba peristáltica, I – injetor, L – alça de amostragem, D – detector, W – descarte e S – soluções de amostra ou padrões.....25
- FIGURA 3.5. Analisador de impedância de precisão da Agilent modelo 4294 A.....26

- FIGURA 4.1. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para a adição de uma solução de cistamina. Concentração 1 mmol L^{-1} 32
- FIGURA 4.2. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para a adição de uma solução de cistamina. Concentração 5 mmol L^{-1} 33
- FIGURA 4.3. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para a adição de uma solução de cistamina. Concentração $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$ 33
- FIGURA 4.4. Variação de frequência de oscilação do cristal de quartzo em função da concentração de cistamina adicionada ao cristal limpo.....34
- FIGURA 4.5. Variação da frequência de oscilação em função da concentração para adições sucessivas de uma solução de cistamina ao cristal de quartzo.....35
- FIGURA 4.6. (A) Circuito equivalente representando o cristal de quartzo, dividido em ramo dinâmico e ramo estático na frequência de ressonância fundamental; (B) Representação esquemática comparando cada componente do ramo dinâmico do circuito equivalente com suas propriedades mecânicas, constituído de mola, massa e um amortecedor.....37
- FIGURA 4.7. – Variação dos parâmetros do ramo dinâmico do circuito equivalente do cristal de quartzo em função da concentração de cistamina utilizando a técnica de admitância eletroacústica. (A) frequência, (B) resistência R , (C) indutância L e (D) capacitância C . Onde Δ é a diferença entre o valor obtido para a célula contendo água e o valor obtido para os parâmetros após 25 minutos da adição da cistamina.....38

- FIGURA 4.8. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para a injeção de 250 μL de solução de cistamina a uma vazão de 235 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Concentração 15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 42
- FIGURA 4.9. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para injeções consecutivas de 375 μL de solução de cistamina a uma vazão de 235 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Concentração 15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 44
- FIGURA 4.10. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para adição de uma solução de glutaraldeído ao eletrodo contendo a monocamada de cistamina. Concentração 2,5% v/v.....45
- FIGURA 4.11. Diagrama esquemático da formação da monocamada de cistamina e glutaraldeído sobre o eletrodo de ouro.....45
- FIGURA 4.12. Diagrama esquemático da interação entre o glutaraldeído e a lectina por meio da formação de uma imina.....46
- FIGURA 4.13. Variação de frequência em função do tempo para adição de uma solução de jacalina (1 mg mL^{-1}) ao eletrodo de ouro contendo a monocamada de cistamina e glutaraldeído. Solução tampão fosfato 0,01 mol L^{-1} contendo 0,15 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl; pH 7,4.....47
- FIGURA 4.14. Variação de frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para adição de uma solução de ConA (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) ao eletrodo de ouro contendo a monocamada de cistamina e glutaraldeído. Solução tampão fosfato 0,01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ contendo 0,15 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl e 0,015 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de íons Ca^{2+} e Mn^{2+} ; pH 7,4.....47

FIGURA 4.15. Curvas de admitância eletroacústica para o estudo imobilização da jacalina sobre o cristal de quartzo contendo a monocamada de cistamina e glutaraldeído. (-) Após adição de tampão ao cristal contendo cistamina e glutaraldeído; (•) Após adição de jacalina ao cristal contendo cistamina e glutaraldeído; (□) Após lavagem do cristal contendo jacalina imobilizada.....48

FIGURA 4.16. Espectro de infravermelho do cristal de quartzo contendo (A) filme de cistamina, (B) filme de cistamina+glutaraldeído e (C) filme de cistamina+glutaraldeído+ConA.....50

FIGURA 4.17. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para adição de uma solução D-galactose ($0,013 \text{ mol. L}^{-1}$) ao cristal de quartzo contendo jacalina (1 mg. mL^{-1}) imobilizada em monocamada. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl; pH 7,4.....52

FIGURA 4.18. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para adição uma solução D-galactose ($0,013 \text{ mol. L}^{-1}$) ao cristal de quartzo contendo jacalina (1 mg. mL^{-1}) imobilizada em monocamada. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl; pH 7,4.....54

FIGURA 4.19. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para adição uma solução D-galactose ($0,013 \text{ mol. L}^{-1}$) ao cristal de quartzo contendo jacalina (1 mg. mL^{-1}) imobilizada em monocamada. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl; pH 7,4.....55

FIGURA 4.20. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para adição uma solução D-galactose ($0,013 \text{ mol. L}^{-1}$) ao cristal de quartzo contendo jacalina (1 mg. mL^{-1}) imobilizada em monocamada. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl; pH 7,4.....55

FIGURA 4.21. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para adição uma solução N-acetilgalactosamina ($0,013 \text{ mol. L}^{-1}$) ao cristal de quartzo contendo jacalina (1 mg. mL^{-1}) imobilizada em monocamada. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl; pH 7,4.....56

FIGURA 4.22. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para adição uma solução α -lactose ($0,013 \text{ mol. L}^{-1}$) ao cristal de quartzo contendo jacalina (1 mg. mL^{-1}) imobilizada em monocamada. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl; pH 7,4.....57

FIGURA 4.23. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para adição uma solução de fetuína ($0,13 \text{ mg. mL}^{-1}$) ao cristal de quartzo contendo jacalina (1 mg. mL^{-1}) imobilizada em monocamada. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl; pH 7,4.....58

FIGURA 4.24. Curva de calibração para as adições de uma solução de fetuína (10 mg. mL^{-1}) ao cristal de quartzo contendo jacalina (1 mg. mL^{-1}) imobilizada em monocamada. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl; pH 7,4.....59

FIGURA 4.25. Curva de calibração para as adições de (■) fetuína (10 mg. mL^{-1}) e (▲) BSA (10 mg. mL^{-1}) ao cristal de quartzo contendo jacalina (1 mg mL^{-1}) imobilizada em monocamada. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl; pH 7,4.....60

FIGURA 4.26. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para adição uma solução de IgA ($0,20 \text{ mg. mL}^{-1}$) ao cristal de quartzo contendo jacalina (1 mg. mL^{-1}) imobilizada em monocamada. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl; pH 7,4.....61

FIGURA 4.27. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para adição uma solução de D-manose ($0,013 \text{ mol. L}^{-1}$) ao cristal de quartzo contendo ConA (1 mg. mL^{-1}) imobilizada em monocamada. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl e $0,015 \text{ mol. L}^{-1}$ de íons Ca^{2+} e Mn^{2+} ; pH 7,4.....62

FIGURA 4.28. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para adição uma solução de D-glicose ($0,013 \text{ mol. L}^{-1}$) ao cristal de quartzo contendo ConA (1 mg. mL^{-1}) imobilizada em monocamada. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl e $0,015 \text{ mol. L}^{-1}$ de íons Ca^{2+} e Mn^{2+} ; pH 7,4.....63

FIGURA 4.29. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para adição uma solução de D-maltose ($0,013 \text{ mol. L}^{-1}$) ao cristal de quartzo contendo ConA (1 mg. mL^{-1}) imobilizada em monocamada. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl e $0,015 \text{ mol. L}^{-1}$ de íons Ca^{2+} e Mn^{2+} ; pH 7,4.....64

FIGURA 4.30. Curva de calibração para as adições de uma solução de D-maltose ($0,013 \text{ mol. L}^{-1}$) ao cristal de quartzo contendo a ConA (1 mg. mL^{-1}) imobilizada em monocamada. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl e $0,015 \text{ mol. L}^{-1}$ de íons Ca^{2+} e Mn^{2+} ; pH 7,4.....65

FIGURA 4.31. Curva de calibração para as adições de uma solução de maltose (10 mg. mL^{-1}) ao cristal de quartzo contendo a ConA (1 mg mL^{-1}) imobilizada. (A) curva construída sem lavagem com HCl/glicina; (B) curva construída após lavagem com HCl/glicina; (C) curva construída após 2ª lavagem com HCl/glicina. Solução 1 mmol. L^{-1} de HCl/glicina (pH 2,8). Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl e $0,015 \text{ mol. L}^{-1}$ de íons Ca^{2+} e Mn^{2+} ; pH 7,4.....66

FIGURA 4.32. Isoterma de Langmuir obtida para a adição de fetuína à jacalina imobilizada sobre o cristal de quartzo calculada a partir dos dados da Figura 4.24.....69

FIGURA 4.33. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função da concentração para as adições de galactose ao cristal contendo jacalina imobilizada em monocamada.....70

FIGURA 4.34. Isoterma de Langmuir obtida para a adição de D-galactose à jacalina imobilizada sobre o cristal de quartzo calculada a partir dos dados da Figura 4.33.....71

FIGURA 4.35. Isoterma de Langmuir obtida para a adição de D-maltose à Con A imobilizada sobre o cristal de quartzo calculada a partir dos dados da Figura 4.30.....72

FIGURA 4.36. Etapas de imobilização da lectina utilizando-se o método de multicamadas.....74

FIGURA 4.37. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para adição uma solução de D-galactose ($0,013 \text{ mol. L}^{-1}$) ao cristal de quartzo contendo jacalina (1 mg. mL^{-1}) imobilizada em multicamadas. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl; pH 7,4.....75

FIGURA 4.38. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para adição uma solução de D-maltose ($0,013 \text{ mol. L}^{-1}$) ao cristal de quartzo contendo ConA (1 mg. mL^{-1}) imobilizada em multicamadas. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl e $0,015 \text{ mol. L}^{-1}$ de íons Ca^{2+} e Mn^{2+} ; pH 7,4.....76

FIGURA 4.39. Diagrama esquemático das etapas de imobilização dos tióis sobre a superfície do cristal de quartzo e posterior ativação com os reagentes EDC/NHS. Adaptado de GOODING e HIBBERT¹77

FIGURA 4.40. Variação de frequência em função do tempo para adição de uma solução de jacalina (1 mg mL^{-1}) ao cristal de quartzo contendo a mistura de tióis imobilizada. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl; pH 7,4.....78

FIGURA 4.41. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para adição uma solução de fetuína ($0,13 \text{ mg. mL}^{-1}$) ao cristal contendo jacalina (1 mg. mL^{-1}) imobilizada sobre o ácido 11-mercaptopundecanóico. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$, contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl; pH 7,4.....79

RESUMO

ESTUDO DA INTERAÇÃO LECTINA-CARBOIDRATO POR MEIO DA TÉCNICA DE MICROBALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO. Neste trabalho realizou-se o estudo das proteínas jacalina e concanavalina A, pertencentes à classe das lectinas, e suas interações com diferentes carboidratos, por meio da técnica de microbalança de cristal de quartzo (QCM). As lectinas foram imobilizadas por meio da técnica de monocamadas auto-organizadas utilizando-se três métodos. Dois deles foram realizados com cistamina e glutaraldeído, sendo a proteína imobilizada em uma única camada ou em multicamadas. No terceiro método, uma solução contendo dois tióis, ácido 11-mercaptopundecanoico e 2-mercaptoetanol, na proporção de 1:10, e os reagentes N-etil-N-(dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidoxisuccinimida (NHS) foram utilizados para formar um intermediário reativo susceptível ao acoplamento com a proteína de interesse. Não foram observadas diferenças significativas entre os métodos, optando-se pela imobilização das lectinas em uma única camada de cistamina e glutaraldeído, pela facilidade no preparo e baixo consumo de reagentes. A formação da monocamada de cistamina foi estudada utilizando-se as técnicas de admitância eletroacústica, QCM e um sistema de injeção em fluxo acoplado à QCM. Em todos os estudos uma concentração de cistamina de $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ apresentou melhor recobrimento da superfície do cristal de quartzo com melhor repetibilidade. Entretanto, foi observado uma forte interação da cistamina livre com àquela que estava ligada à superfície do ouro formando a monocamada, mas esta interação não foi específica. O sistema de injeção em fluxo acoplado à microbalança de cristal de quartzo também foi utilizado para estudar a interação lectina-carboidrato e lectina-glicoconjugado. Este estudo permitiu determinar que a variação na frequência de oscilação do cristal de quartzo foi da mesma magnitude que a observada para o sistema sem injeção em fluxo. O modelo de adsorção da isoterma de Langmuir foi empregado para calcular os valores das constantes de afinidade aparente para as lectinas com diferentes ligantes. As constantes de afinidade calculadas foram $1,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e $9,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ e $5,6 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ para interações jacalina-fetúina, jacalina-galactose e ConA-maltose. As determinações das constantes de afinidade aparente utilizando-se a técnica de QCM demonstram a viabilidade da técnica no estudo de interações moleculares, como a das lectinas com carboidratos.

ABSTRACT

THE STUDY OF THE LECTIN-CARBOHYDRATE INTERACTION USING THE QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE TECHNIQUE. In this work a study of proteins Jacalin and Concanavalin A, belonging to the class of lectins, and the interaction with different carbohydrates was accomplished through Quartz Crystal Microbalance (QCM). The lectins were immobilized by self-assembly monolayer by means three methods. In two of them were used the cystamine and glutaraldehyde and the protein immobilized in a single layer or multilayer. In the third method, a solution of thiols, 11-mercaptoundecanoic acid and 2-mercaptoethanol, in a proportion of 1:10, and the reagents reagents N-ethyl-N-(dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) were used to formed a intermediated reactive to binding a protein of interest. Significant differences were not observed among the methods, being opted for the lectins immobilization in a single layer using cystamine and glutaraldehyde due to the simple preparation and low consumption of reagents. The formation of self-assembly monolayer formation was studied using the Electroacoustic Admittance, QCM and a flow injection system coupled to QCM. In all studies a cystamine concentration of 15 mmol. L^{-1} produced the highest frequency variation and therefore the largest observed mass deposition on the gold surface with good repetitivity. However, it was observed a strong interaction between the free cystamine and to that was binding to the gold surface forming a monolayer, but this interaction was not specific. The flow injection system coupled to the QCM technique was also used to study the interaction between the lectin-carbohydrate and lectin-glycoconjugate. This study allows determining that the variation of the quartz crystal frequency was the same magnitude that observed for a system when using a QCM technique. The Langmuir adsorption isotherm was used to calculate the values of the apparent affinity constant for the lectins with different ligands. The apparent affinity constant was $1.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $9.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ and $5.6 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ for Jacalin-Fetuin, Jacalin-Galactose and ConA-Maltose interactions respectively. The determinations of the apparent affinity constants using QCM, demonstrated the viability of the technique in the study of molecular interactions.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1. Lectinas.....	2
1.1.1. Definição e Classificação.....	4
1.1.2. Jacalina.....	6
1.1.3. Concanavalina A.....	8
1.2. Estudo de interações moleculares.....	10
1.3. Microbalança de cristal de quartzo.....	11
1.4. Imobilização da proteína sobre a superfície do cristal de quartzo.....	14
1.5. Constante de afinidade aparente da interação lectina-carboidrato.....	16
2. Objetivos.....	19
3. Material e Métodos.....	21
3.1. Reagentes e Soluções.....	21
3.1.1. Monocamadas auto-organizadas.....	21
3.1.2. Analitos estudados.....	21
3.1.3. Limpeza dos cristais de quartzo.....	22
3.2. Instrumentação.....	22
3.2.1. Cristais piezelétricos.....	22
3.2.2. Microbalança de cristal de quartzo.....	23
3.2.3. Sistema com injeção em fluxo (FIA).....	24
3.2.4. Espectrometria de infravermelho.....	25
3.2.5. Impedância eletroacústica.....	25
3.3. Formação das monocamadas auto-organizadas.....	26
3.3.1. Cistamina, Glutaraldeído e lectina.....	26
3.3.1.1. Estudo da formação da monocamada de cistamina.....	27
3.3.2. Imobilização da proteína em multicamadas.....	28

3.3.3. Monocamadas auto-organizadas pelo método de ativação com EDC/NHS.....	28
3.3.4. Espectrometria na região do infravermelho da superfície do cristal de quartzo.....	29
3.4. Extração e purificação da lectina jacalina.....	30
4. Resultados e Discussão.....	32
4.1. Formação das monocamadas auto-organizadas.....	32
4.1.1. Estudo da formação da monocamada de cistamina utilizando QCM.....	32
4.1.2. Estudo da formação da monocamada de cistamina utilizando a técnica de admitância eletroacústica.....	36
4.1.3. QCM com sistema de injeção em fluxo no estudo da formação da monocamada de cistamina.....	41
4.2. Estudo da imobilização das lectinas utilizando cistamina e glutaraldeído.....	44
4.2.1. Estudo da imobilização das lectinas utilizando a técnica de admitância eletroacústica.....	48
4.3. Caracterização das monocamadas auto-organizadas.....	50
4.4. Estudos de interações moleculares utilizando a QCM com injeção em fluxo.....	51
4.5. Estudos de interações moleculares utilizando a QCM.....	53
4.5.1. Jacalina.....	53
4.5.2. Concanavalina A.....	61
4.6. Cálculos das constantes de afinidade aparente.....	67
4.6.1. Jacalina.....	69
4.6.2. Concanavalina A.....	71
4.7. Multicamadas utilizando cistamina e glutaraldeído.....	73
4.7.1. Jacalina.....	74

4.7.2. Concanavalina A.....	76
4.8. Estudo da formação das monocamadas auto-organizadas pelo método de ativação com EDC/NHS.....	77
5. Conclusões.....	82
6. Referências Bibliográficas.....	85

INTRODUÇÃO

1. Introdução

As proteínas são compostos orgânicos de alta massa molecular formadas pelo encadeamento de aminoácidos. Representam cerca de 50 a 80% do peso seco da célula sendo, portanto, o composto orgânico mais abundante da matéria viva exercendo papéis importantes em quase todos os processos biológicos². De maneira geral, as proteínas desempenham nos seres vivos as seguintes funções: estrutural, enzimática, hormonal, de defesa, nutritiva, coagulação sangüínea e transporte. Como exemplos de proteínas, podemos citar os anticorpos que são altamente específicos além de reconhecerem e se combinarem com substâncias estranhas e as enzimas que possuem alta especificidade pelo substrato e funcionam como catalisadores de reações biológicas. Proteínas são constituídas de um mesmo conjunto de 20 aminoácidos. O que as diferencia é a seqüência de aminoácidos na cadeia polipeptídica.

O reconhecimento molecular é muito importante em pesquisas bioquímicas e biomédicas e pode se dar de diversas maneiras; por complexação, absorção, adsorção, cinético³ ou por afinidade. O estudo envolvendo reconhecimento molecular é essencial para o entendimento das funções biológicas das proteínas e de seus mecanismos de interação. Nesse sentido algumas metodologias analíticas têm sido desenvolvidas para estudar interações do tipo receptor-ligante⁴. A técnica de microbalança de cristal de quartzo (QCM-“quartz crystal microbalance”) tem sido muito utilizada em estudos de interações moleculares, capaz de medir variações de massa da ordem de nanogramas, fácil de ser operada e os resultados são obtidos em tempo real^{5,6}. Um exemplo bastante estudado utilizando a técnica de microbalança de cristal de quartzo é o estudo das interações entre antígeno e anticorpo^{7,8}.

Dentre as diversas classes de proteínas, com diferentes propriedades e funções, destaca-se nesse trabalho a classe das lectinas, que têm sido alvo de muitos estudos devido à sua capacidade de reconhecer e ligar-se reversivelmente

a carboidratos⁹⁻¹¹. Essa escolha se deve à vasta gama de aplicações e usos dessas proteínas principalmente nas áreas médicas, clínicas e biológicas, como será descrito nos itens seguintes dessa introdução.

1.1. Lectinas

O estudo das lectinas começou com STILLMARK¹² citado por SHARON e LIS¹³ que, enquanto estudava a toxicidade de sementes de mamona (*Ricinus communis*), observou que o extrato obtido destas sementes promovia hemaglutinação de eritrócitos de diferentes espécies. A partir desta observação, a substância responsável pela atividade observada foi designada “hemaglutinina”, denominação que seria estendida para o conjunto de proteínas capazes de aglutinar células. A posterior constatação de que hemaglutininas atuavam a partir da ligação seletiva a glicoconjugados fez com que a denominação fosse substituída por “lectina”. Os glicoconjugados são proteínas constituídas por aminoácidos mais outro componente não-protéico, chamado grupo prostético, que pode ser um carboidrato (glicoproteínas), um lipídio (glicolipídios) ou mesmo um ácido nucléico (nucleoproteínas)².

Uma definição atual e mais abrangente para lectina é que são proteínas de origem não imune com pelo menos um domínio não catalítico que se liga reversível e especificamente a um mono ou oligossacarídeo¹⁴. Em geral uma molécula de lectina apresenta pelo menos dois sítios de ligação para carboidratos que permitem ligações cruzadas entre as células (por meio de combinações com açúcares em sua superfície) ou entre açúcares contidos em macromoléculas¹⁵, justificando suas propriedades de aglutinar partículas e de precipitar glicoconjugados. A atividade lectínica de uma proteína é atribuída a um domínio dessa proteína, denominado CRD (carbohydrate recognition domain).

As lectinas foram primeiramente encontradas em plantas e vegetais. No reino vegetal, as lectinas estão universalmente distribuídas, podendo constituir 6-11% do conteúdo protéico de plantas¹⁶. As funções das lectinas podem ser as mais variadas e parecem ter relação com os estágios de maturação e germinação das sementes. As lectinas também são encontradas em outros organismos incluindo vírus, bactérias, fungos, invertebrados e vertebrados, o que ampliou o campo de estudos e de aplicações destas proteínas¹⁷⁻¹⁹.

Lectinas estabelecem interações com glicanas (oligo, mono e polissacarídeos) por meio de seu CRD. Estas interações são semelhantes às estabelecidas por anticorpos com antígenos. As lectinas correspondem a proteínas de origens e estruturas distintas²⁰. Algumas são metaloproteínas, ou seja, necessitam da presença de cátions metálicos em seus sítios de ligação específicos para carboidratos para que ocorra a ligação com os mesmos, assemelhando-se as metaloproteases. Entretanto, as lectinas não apresentam atividade catalítica.

As lectinas de plantas são extraídas e purificadas por meio da técnica de cromatografia de afinidade em resinas contendo o açúcar, pelo qual a lectina possui afinidade, imobilizado. Obviamente elas podem também ser obtidas por meio da técnica de DNA recombinante²¹.

As lectinas são amplamente utilizadas no estudo de eventos biológicos, tais como o reconhecimento de moléculas presentes em membranas e matrizes extracelulares. As lectinas possuem muitas aplicações nas áreas médicas e biológicas. A Tabela 1.1 apresenta algumas aplicações das lectinas de plantas²².

TABELA 1.1. Algumas aplicações de lectinas de plantas nas áreas médica, biológica e de análises clínicas. Extraído e adaptado de RUDIGER²².

Áreas	Aplicações
Medicina	<ul style="list-style-type: none"> - Identificação de grupos sanguíneos (ABO humano) - Marcador celular para diagnóstico de agentes infecciosos - Indutores de regeneração celular (agentes mitogênicos)
Bioquímica	<ul style="list-style-type: none"> - Purificação de glicoconjugados por cromatografia de afinidade - Quantificação e análise de glicoconjugados
Biologia Celular	<ul style="list-style-type: none"> - Investigação da superfície celular durante sua divisão e diferenciação, auxiliando o estudo de alguns tumores - Análise de mecanismos envolvidos na glicosilação das proteínas

1.1.1. Definição e Classificação

As lectinas são agrupadas de diversas maneiras, de acordo com suas propriedades em comum. Algumas lectinas exibem dupla especificidade, combinando-se simultaneamente com diferentes açúcares. Por essa razão estas proteínas são classificadas dentro de um mesmo grupo. Um pequeno número de lectinas são promíscuas, ou seja, elas interagem com monossacarídeos de diferentes grupos de especificidade por meio do mesmo sítio ligante²³.

Segundo LIS e SHARON¹⁵ as lectinas são classificadas em cinco grupos, de acordo com o monossacarídeo pelo qual possuem maior afinidade: manose, galactose/N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, frutose e ácido N-acetilneuramínico. Lectinas que apresentam afinidade pelo carboidrato

galactose, freqüentemente interagem com N-acetilgalactosamina, e por esta razão elas são classificadas dentro de um mesmo grupo de especificidade.

De acordo com PEWMANS e VAN DAMME^{14,24} as lectinas podem ser classificadas em quatro tipos: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas. As merolectinas são proteínas monovalentes, de cadeia única que apresentam um único sítio responsável pela ligação com carboidratos. São proteínas pequenas e por serem monovalentes, são incapazes de aglutinar células (propriedade hemaglutinante). As hololectinas apresentam dois ou mais sítios de ligação para carboidratos idênticos ou similares e compreendem a maioria das lectinas, sendo por definição di ou multivalentes. Possuem a capacidade de aglutinar células e precipitar glicoconjugados. As quimerolectinas além de possuírem sítios ligantes a carboidratos possuem um outro sítio com atividade catalítica ou biológica diferente que reagem independentemente do domínio ligante a açúcares.

Certas lectinas possuem especificidade anomérica, como é o caso da concanavalina A (ConA) obtida de um tipo de feijão-de-porco da espécie *Canavalia ensiformes*. Isso permite as estas lectinas distinguirem a configuração das subunidades C-1 entre α ou β , freqüentemente com preferência por uma das unidades anoméricas. As formas isoméricas dos monossacarídeos, que diferem uma da outra apenas em sua configuração ao redor do átomo de carbono hemiacetal, são chamadas anômeros. Duas soluções contendo os anômeros α e β de um carboidrato, se interconvertem livremente em solução aquosa e ao atingirem o equilíbrio formam, misturas de α e β com propriedades ópticas idênticas².

As lectinas apresentam em geral, maior afinidade por polissacarídeos (di, tri, tetrassacarídeos), ou monossacarídeos terminais presentes em glicoconjugados², com constantes de afinidade, para polissacarídeos e glicoconjugados, cerca de mil vezes maiores do que a observada para monossacarídeos¹⁵.

Dentre as lectinas isoladas de plantas, destacamos nesse trabalho a jacalina e a concanavalina A que serão discutidas nos itens seguintes desta introdução.

1.1.2. Jacalina

Existem duas lectinas extraídas das sementes de jaca da espécie *Artocarpus integrifolia*²⁵, descritas na literatura até o presente momento. Neste trabalho utilizou-se a jacalina extraída das sementes desta espécie de jaca que foi identificada, primeiramente, por volta de 1970 quando alguns pesquisadores verificaram que o extrato salino das sementes de *A. integrifolia* possui ação aglutinante sobre eritrócitos humanos. A lectina contida no extrato salino da semente de *A. integrifolia* denominada de jacalina²⁶ é a proteína majoritária, representando cerca de 50% do extrato bruto das sementes. É uma glicoproteína que contém entre 7 e 10% de carboidratos em sua estrutura e sua atividade não depende da presença de cátions metálicos, como ocorre com algumas lectinas.

A jacalina possui capacidade de aglutinar eritrócitos humanos, de camundongos, búfalos, patos, pombos²⁷. Esta lectina tornou-se uma importante ferramenta biotecnológica devido à sua peculiaridade em ligar-se especificamente a anticorpos da classe IgA humana²⁸. KONDOH e colaboradores²⁹ descreveram que dentre essa classe de anticorpos, a jacalina precipitava somente aqueles da subclasse IgA1.

A jacalina apresenta uma alta afinidade para os resíduos galactose e N-acetilgalactosamina (GalNac) interligados nas posições β 1-3 (Gal β 1-3GalNac); dissacarídeo conhecido como antígeno de Thomsen-Friedenreich, associado a tumores de origem oncofetal²⁷.

A jacalina possui habilidade de induzir a mitose celular de linfócitos (células sanguíneas do sistema imune) ou de promover a ativação policlonal de linfócitos B²⁶. Recentemente, descobriu-se que esta lectina também possui

capacidade de induzir a proliferação das células TCD4⁺, que além de exercerem a função de orquestrar a imunidade celular, correspondem a receptores do tipo 1 do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV). A jacalina mostrou-se capaz de inibir *in vitro* a infecção de células T pelo HIV³⁰.

A afinidade peculiar de reconhecimento de carboidratos terminais tipo galactose e GalNac da jacalina faz com que seja amplamente utilizado em cromatografia de afinidade com a finalidade de purificação e caracterização de glicoproteínas que contém o dissacarídeo pelo qual a lectina apresenta afinidade³¹.

A jacalina é formada por quatro subunidades, associadas entre si por meio de interações não-covalentes. Possui massa molecular em torno de 66 kDa. Os estudos da seqüência de aminoácidos da jacalina demonstram que cada subunidade consiste de 2 cadeias: uma cadeia α com 133 resíduos de aminoácidos, ligada não covalentemente a uma cadeia β com 20 ou 21 resíduos de aminoácidos²⁰, como mostrado na Figura 1.1. A análise estrutural da jacalina demonstrou que o CRD da proteína proporciona um sítio primário e dois sítios secundários de interação com o ligante. O sítio de ligação para carboidrato é relativamente grande, acomodando monossacarídeos que possuam grupamento hidroxila em diferentes conformações.

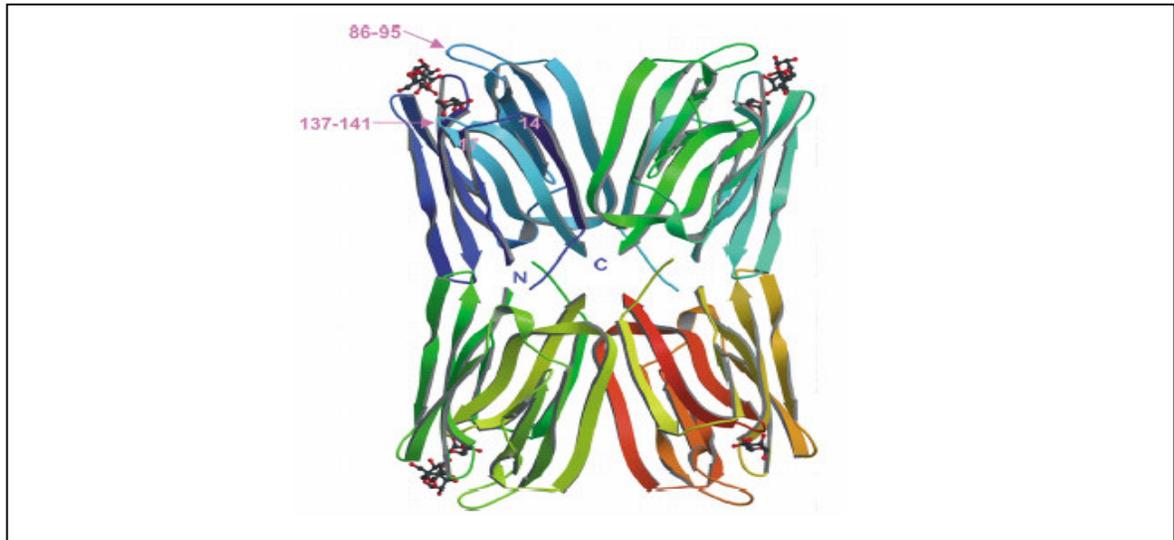


FIGURA 1.1. Diagrama esquemático da estrutura tetramérica da jacalina no qual se observam os quatro sítios de ligação para carboidratos.

1.1.3. Concanavalina A

A ConA é uma das lectinas mais conhecidas e utilizadas em biomedicina. Ela foi descoberta por SUMMER e HOWELL³² citado por VAN DAMME e PEUMANS³³, ao verificarem que uma proteína extraída do feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), era capaz de precipitar células sanguíneas (eritrócitos). É uma metaloproteína e sua atividade depende da presença dos cátions metálicos cálcio e manganês. Ambos os metais estabilizam a conformação da proteína e favorecem a interação com o carboidrato. É preciso que haja íons cálcio e manganês em cada uma das quatro unidades monoméricas para que a ligação com o carboidrato ocorra.

A ConA é uma proteína tetramérica e possui especificidade anomérica. É capaz de distinguir entre configurações α ou β , com maior afinidade por carboidratos α -glicosídeos (manose e glicose) do que por β -glicosídeos¹³. Ela é bastante usada em ensaios de proliferação celular, purificação de glicoproteínas,

isolamento de antígenos virais, estudos de aglutinação de células, agregação de bactérias, caracterização de células normais e malignas¹¹.

Cada monômero da ConA possui massa molar de aproximadamente 26 KDa e consiste de 237 resíduos de aminoácidos, como mostra a Figura 1.2. Em meio alcalino, acima de 6,9, a lectina apresenta-se como tetrâmero, e em valores de pH abaixo de 5,9 a ConA dissocia-se em um dímero de massa molar 52 KDa³⁴.

Existem muitas pesquisas sobre o uso de lectinas como ferramentas para o estudo de proliferação de células normais e neoplásicas. Estudos mostraram que algumas lectinas, incluindo a ConA, possuem propriedades específicas de se ligarem a moléculas de carboidratos que são expressas em células tumorais, facilitando a detecção precoce de câncer. Estas lectinas aglutinam mais facilmente as células malignas do que as correspondentes células normais. Essa foi uma importante descoberta que atraiu a atenção de muitos pesquisadores para o estudo das lectinas, acreditando que estas proteínas podem fornecer informações sobre a superfície das células carcinogênicas^{11,18}.

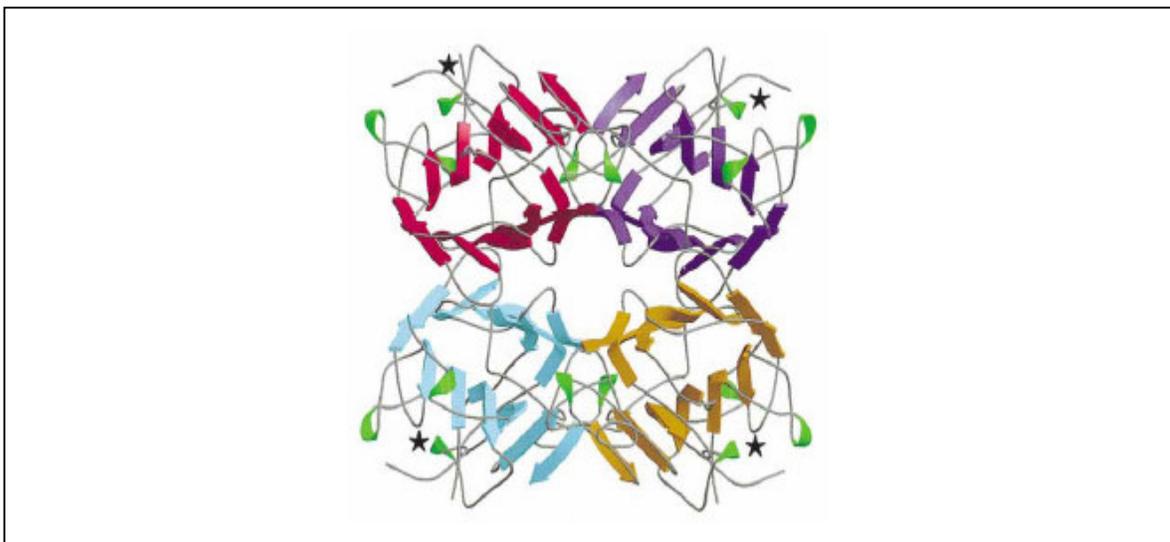


FIGURA 1.2. Diagrama esquemático da estrutura tetramérica da concanavalina A no qual se observam os quatro sítios de ligação para carboidratos.

1.2. Estudo de interações moleculares

A especificidade das lectinas por carboidratos tem sido intensamente estudada e embora as lectinas sejam encontradas em grandes quantidades na natureza, os processos biológicos nos quais estão envolvidas não são completamente compreendidos. Nesse sentido, o estudo da interação lectina-carboidrato é de grande importância para o entendimento de suas funções biológicas bem como o papel dessas interações em sistemas biológicos diversos. Diferentes técnicas têm sido utilizadas na investigação da interação lectina-carboidrato, tais como cromatografia de afinidade, eletroforese, espectroscopia na região do ultravioleta-visível, calorimetria, entre outras, nas quais podemos incluir o desenvolvimento de sensores e biossensores para o estudo de interações moleculares.

As pesquisas na área de sensores objetivam o desenvolvimento de dispositivos simples e de baixo custo, capazes de superar os sistemas mais complexos e de alto custo. Nesta linha o desenvolvimento de biossensores é altamente desejável, pois poderá levar ao desenvolvimento de dispositivos altamente seletivos e a um custo muito baixo³⁵.

Algumas interações geram produtos intermediários que podem ser facilmente monitorados por diversas técnicas. É o que ocorre com as enzimas, proteínas que tem como característica catalisar uma reação química. Desta forma é possível construir um biossensor a um determinado analito e medir a sua concentração indiretamente, utilizando um reagente ou produto que participa do processo da reação. Como exemplo, temos os biossensores sensíveis a glicose que utilizam a enzima glicose oxidase como material ativo. A enzima converte glicose em ácido glucâmico consumindo oxigênio e produzindo peróxido de hidrogênio e a formação destes dois intermediários, O_2 e H_2O_2 , pode ser facilmente monitorada³⁶.

Já uma interação molecular como antígeno-anticorpo, lectina-carboidrato ou lectina-glicoconjugado ocorre sem que haja uma reação química. Estas proteínas ligam-se reversivelmente aos carboidratos por meio de interações fracas como as de van der Waals. Os ensaios imunoenzimáticos (ELISA- “enzyme-linked immunosorbant assay”)² são métodos amplamente utilizados para monitorar essa interação. Entretanto, trata-se de um ensaio demorado. Além disso, é necessária a utilização de intermediários marcados (marcadores luminescentes ou enzimáticos) e mede-se indiretamente a interação receptor-ligante. Nestes casos, medir diretamente o processo de interação é possível somente por um limitado número de técnicas entre elas a ressonância de plasma de superfície, (SPR- “surface plasmon resonance”), e a técnica de microbalança de cristal de quartzo³⁷. A técnica de SPR baseia-se nas propriedades ópticas, medindo-se a variação no índice de refração na superfície do sensor, devido por exemplo, a ligação de um grupo tiol com a superfície do ouro³⁸. Entretanto apesar de bastante utilizada, a técnica de SPR é limitada para o estudo de analitos com massa molecular baixa³⁹, além de apresentar custo operacional elevado em comparação à técnica de QCM.

1.3. Microbalança de cristal de quartzo

O princípio de funcionamento da técnica de microbalança de cristal de quartzo consiste em monitorar a frequência de oscilação do cristal de quartzo quando uma massa é depositada sobre o mesmo, ou quando se varia o meio no qual o cristal se encontra. É possível, por meio desta técnica, estabelecer uma relação entre a variação na frequência de oscilação do cristal e a quantidade de massa depositada na superfície do mesmo, de acordo com a equação de SAUERBREY⁴⁰ citado por FARIA⁴¹. Há uma relação entre a variação de massa dos filmes depositado sobre o cristal e a variação de frequência de ressonância

dos mesmos⁴². A aproximação feita por SAUERBREY é válida para filmes finos e rígidos. A Equação 1 apresenta a relação estabelecida por SAUERBREY:

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2}{\sqrt{\rho_Q\mu_Q}} \frac{\Delta m}{A} \quad (1)$$

Onde:

Δf – variação de frequência

f_0 – frequência fundamental do cristal de quartzo

Δm – variação de massa sobre o eletrodo

ρ_0 – densidade do cristal de quartzo

μ_0 – modo de cisalhamento do quartzo

A – área ativa do cristal

A técnica de microbalança de cristal de quartzo permite medir variações extremamente sensíveis de massa, da ordem de nanogramas e tem aplicações nos mais diversos tipos de sistemas, tanto em meio gasoso⁴³ como em meio líquido⁴⁴ e pode ser acoplada a diferentes técnicas como eletroquímicas, eletroanalíticas e ópticas.

A técnica de QCM é bastante utilizada no desenvolvimento de sensores e na caracterização de processos de transferência de massa, e sua utilização é possível devido às propriedades piezelétricas de alguns materiais como o quartzo. Em 1880 os irmãos Jacques e Pierre Currie verificaram que ao aplicar uma pressão mecânica à superfície de alguns cristais, incluindo o quartzo, gerava-se um potencial elétrico nas faces opostas à deformação, proporcional à intensidade da força aplicada⁴¹. Daí surgiu o termo piezeletricidade, que é um derivado do grego (piezo) e significa pressão. Entende-se piezeletricidade como eletricidade por pressão. Na técnica de microbalança de cristal de quartzo,

aplica-se uma diferença de potencial nas faces do cristal de quartzo o que provoca uma deformação mecânica na superfície do mesmo.

A condição necessária para que um cristal de quartzo seja piezelétrico é que ele não possua um centro de simetria na sua estrutura cristalina (anisotrópico), pois isto leva a formação de dipolos elétricos no interior do cristal devido à orientação dos átomos na rede cristalina. O cristal de quartzo, ao ser deformado em um sentido apropriado, leva a um deslocamento dos átomos que resulta em uma mudança no momento de dipolo líquido. Esta variação no momento de dipolo líquido gera uma carga elétrica nas faces do cristal e a intensidade dessa carga vai depender da intensidade da força aplicada ao cristal e da orientação dos dipolos com relação às faces do cristal. Da mesma maneira, ao aplicar-se uma diferença de potencial entre as faces do cristal há uma reorientação dos dipolos, promovendo uma alteração na rede cristalina, ocasionado uma deformação mecânica no cristal. A Figura 1.3 demonstra esse efeito.

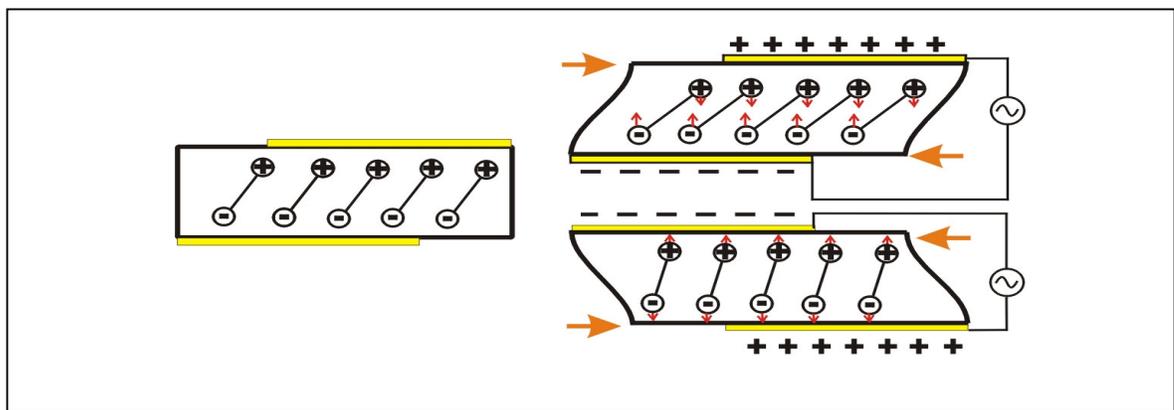


FIGURA 1.3. Representação esquemática de um corte transversal de um cristal piezelétrico mostrando a deformação mecânica quando uma diferença de potencial é aplicada às superfícies do cristal.

A frequência ressonante do cristal de quartzo é determinada por dois fatores: tipo de corte do cristal com relação à orientação cristalográfica e a

espessura da lâmina de quartzo. O tipo de corte determina também o coeficiente de temperatura. Há diferentes tipos de cortes do cristal de quartzo e estes são designados pelos nomes AT, BT, SC, DT, dentre outros, sendo os principais AT, BT e SC. O corte AT é o mais utilizado atualmente para frequências fundamentais maiores que 1 MHz por possui a menor variação de frequência com a variação de temperatura, na região próxima à ambiente.

Na construção de uma microbalança de cristal de quartzo, é preciso escolher cuidadosamente o sistema que irá promover a oscilação do cristal, assim como devem ser analisadas as características do material a ser depositado. Existem três sistemas que podem ser utilizados para promover a oscilação do cristal de quartzo. São eles: excitação por pulso, analisador de impedância e circuito oscilador. Neste trabalho, utilizou-se um circuito oscilador para promover a oscilação do cristal de quartzo, por ser um sistema de baixo custo operacional, ele é largamente utilizado na construção de microbalanças de cristal de quartzo.

Para o estudo de interações moleculares por meio da técnica de QCM foi necessário utilizar um método para imobilização das lectinas sobre a superfície do cristal, que será descrito no próximo item.

1.4. Imobilização da proteína sobre a superfície do cristal de quartzo

As áreas que envolvem desenvolvimento de filmes ou camadas auto-organizadas com propriedades específicas (funcionalizadas) têm um amplo campo de aplicação nas áreas química, física e biológica. Dentro da química as monocamadas auto-organizadas (SAM- “self-assembled monolayers”) podem ser utilizadas para monitorar a transferência de elétrons em processos, de catálise, corrosão e no desenvolvimento de sensores óticos, eletroquímicos e piezelétricos⁴⁵ e dispositivos similares⁴⁶.

As monocamadas auto-organizadas proporcionam grande flexibilidade nas diversas áreas de aplicações de acordo com a funcionalidade do grupo terminal utilizado, podendo-se obter controle hidrofóbico ou hidrofílico da superfície ou ainda controle da distância de imobilização variando-se o comprimento da cadeia de moléculas utilizadas. Além disso, a imobilização via técnica de filmes automontados permite a formação de uma monocamada de moléculas, altamente ordenadas sobre a superfície de um metal⁴⁷.

A imobilização por meio de monocamadas consiste na adsorção ou na ligação covalente de alguns grupos funcionais específicos que interagem com a superfície do metal depositado sobre a superfície do cristal de quartzo. O modelo permite o estudo de interações específicas entre as moléculas biológicas, como proteínas, enzimas, anticorpos com as superfícies dos metais¹.

A afinidade de grupos tióis com algumas superfícies de metais, especialmente ouro, torna os alcanotióis ideais para funcionalizar a superfície de diferentes metais. Os alcanotióis são adsorvidos espontaneamente na superfície de diferentes metais como ouro, prata, platina e cobre. O ouro é o metal mais utilizado porque não apresenta um óxido estável em condições ambiente¹⁴. Os átomos de enxofre coordenam-se na superfície do ouro, formando espontaneamente uma monocamada ordenada e com espessura da ordem de nanômetros⁴⁶. A utilização do grupo tiol é extremamente interessante, pois variando-se o grupo funcional ligado a molécula de tiol, é possível a obtenção de monocamadas com diferentes propriedades químicas⁴⁸.

Os sistemas de filmes automontados são extremamente interessantes, pois o seu uso permite a transferência direta de elétrons entre a espécie imobilizada e o substrato metálico. Além disso, os filmes automontados são de fácil preparo e o consumo de reagentes é baixo. Por se tratar de um filme em monocamada sua aplicação na técnica de microbalança de cristal de quartzo é de grande interesse, pois minimiza os efeitos viscoelásticos observados quando se utilizam métodos de imobilização com filmes espessos.

1.5. Constantes de afinidade aparente de interações lectina-carboidrato

As lectinas estão envolvidas em diversos processos biológicos, como interações célula-célula, célula-vírus, célula-bactéria, e em inflamações³⁹. O entendimento das propriedades e funções das lectinas, assim como o uso destas proteínas como ferramentas nas diversas áreas de estudo, dependem do conhecimento da sua especificidade em relação aos carboidratos²³.

Estudos da especificidade das lectinas por carboidratos são, em grande parte, realizados por ensaios competitivos (ELISA), nos quais se utilizam diferentes carboidratos, mono, oligossacarídeos ou glicoconjugados, com o objetivo de avaliar qual deles apresenta maior afinidade pela lectina. Entretanto, o uso de técnicas capazes de monitorar diretamente a interação lectina-carboidrato, como a microbalança de cristal de quartzo, têm sido amplamente divulgadas como modelo nos estudos de interações moleculares^{49,50}.

Os cálculos das constantes de afinidade aparente (K') das lectinas por diferentes açúcares apresentados neste trabalho foram realizados de acordo com o modelo de adsorção de Langmuir⁵¹⁻⁵⁴. A adsorção é um processo de acumulação de uma substância em uma interface. Ocorre com todos os tipos de interface, tais como gás-sólido, solução-sólido, solução-gás. Existem dois tipos principais de adsorção: física e química. A adsorção química é específica e envolve a formação de um composto químico de superfície ou complexo de adsorção. A quantidade de substância adsorvida na superfície decresce com o aumento da temperatura, já que todos os processos de adsorção são exotérmicos. A uma temperatura constante a quantidade adsorvida aumenta com a concentração do adsorbato (em solução ou na fase gasosa), e a relação entre a quantidade adsorvida (x) e a concentração (c) é conhecida como a isoterma de adsorção. Somente em concentrações muito baixas é que (x) é proporcional a (c).

A adsorção pode ser avaliada quantitativamente por meio de isotermas. Um dos modelos teóricos mais simples de adsorção é o de Langmuir, que foi proposto para descrever a adsorção de gases em sólidos. Esse modelo supõe que a superfície do sólido é constituída de um grande número de sítios, podendo cada sítio ser ocupado por apenas uma molécula adsorvida. Os sítios são todos equivalentes e considera-se que as moléculas adsorvidas não interagem umas com as outras nem saltam de um sítio para outro. A adsorção completa-se quando todos os sítios forem ocupados, correspondendo a uma monocamada de adsorbato.

OBJETIVOS

2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de metodologias analíticas para o estudo de interações moleculares, como as estabelecidas por lectinas com glicanas e o cálculo das constantes de afinidade destas interações por meio da técnica de microbalança de cristal de quartzo, visando aplicação em biotecnologia.

MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e Métodos

3.1. Reagentes e Soluções

3.1.1. Monocamadas auto-organizadas

Os reagentes utilizados para a formação da monocamada foram Cistamina (Sigma Chemical CO, USA), Glutaraldeído em solução 25% v.v (Merck, Alemanha), 2-mercaptoetanol e ácido 11-mercaptoundecanóico (Sigma Chemical CO, USA), N-etil N-dimetilpropil carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma Chemical CO, USA). As soluções de cistamina e glutaraldeído foram preparadas utilizando-se água purificada por um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). As soluções de 2-mercaptoetanol e ácido 11-mercaptoundecanóico foram preparadas em metanol (Labsynth, Brasil).

As proteínas utilizadas na imobilização em monocamada foram as lectinas jacalina extraída da semente de jaca (*Artocarpus integrifolia*) e a concanavalina A (Sigma Chemical CO, USA) obtida de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformes*). A jacalina foi obtida em parceria com o grupo de pesquisa do Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia do Departamento Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), coordenado pela Prof. Dra. Maria Cristina Roque-Barreira.

3.1.2. Analitos estudados

Os analitos utilizados nos estudos das interações lectina-carboidrato foram galactose, frutose, maltose, manose, sacarose, lactose (todos da marca Sigma Chemical CO, USA). Além destes foram utilizados glicoproteínas como a fetuína (Sigma Chemical CO, USA) e imunoglobulina A (fornecida pela FMRP-

USP). A imobilização das proteínas e posterior adição dos analitos foram realizadas em solução tampão fosfato (pH 7,4) em concentração $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, com NaCl em concentração de $0,15 \text{ mol L}^{-1}$.

3.1.3. Limpeza dos cristais de quartzo

Para a limpeza dos cristais de quartzo utilizou-se solução “piranha”⁵⁵ que consiste na mistura de ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio na proporção de 7: 3 (H_2SO_4 (conc): H_2O_2 30%), ambos da Labsynth, Brasil. A solução “piranha” utilizada era recém-preparada. A solução piranha é extremamente reativa e a sua preparação e utilização foram realizadas em capela utilizando-se equipamento de proteção individual.

3.2. Instrumentação

3.2.1. Cristais piezelétricos

Os cristais de quartzo utilizados neste trabalho possuíam 16 mm de diâmetro e cerca de 290 μm de espessura, contendo um filme fino de ouro concêntrico em ambos os lados (5mm de diâmetro), corte AT e frequência característica de 10 MHz (Elchema). A Figura 3.1 mostra o cristal de quartzo utilizado para realização das medidas gravimétricas.

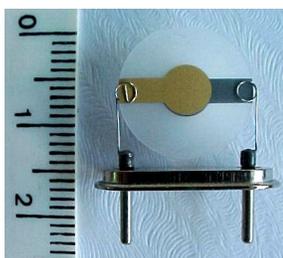


FIGURA 3.1. Cristal de quartzo de frequência fundamental 10 MHz inserido no suporte metálico responsável pelo contato elétrico.

Os cristais piezelétricos eram conectados à célula de medida confeccionada em politetrafluoretileno (PTFE), sendo utilizados o-rings de silicone em ambos os lados para a vedação, conforme mostra a Figura 3.2.

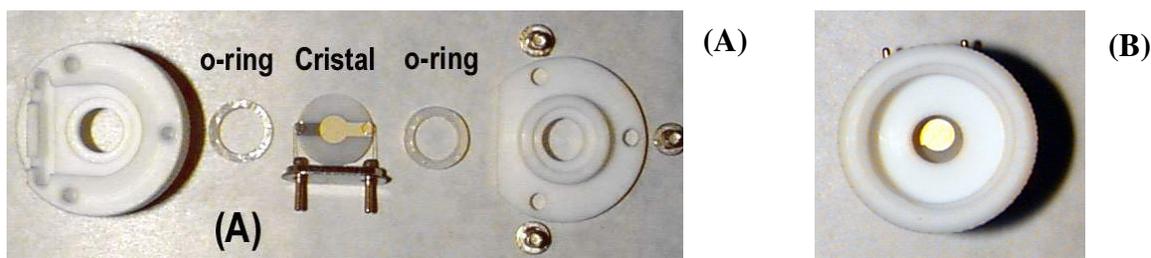


FIGURA 3.2. A) Cristal de quartzo e a célula de politetrafluoretileno, B) Cristal inserido na célula.

3.2.2. Microbalança de cristal de quartzo

As medidas gravimétricas foram realizadas em uma microbalança de cristal de quartzo, cujo circuito responsável pela oscilação do cristal de quartzo foi desenvolvido pelo Prof. Dr. Ronaldo C. Faria durante seu trabalho de Doutorado⁴¹. Algumas medidas foram realizadas em uma microbalança de cristal de quartzo modelo EQCN-601 (Elchema). Para monitorar as variações

de frequência utilizou-se um freqüencímetro Hewlett-Packard modelo HP 53131 A. A aquisição dos dados foi feita por meio de um computador pessoal. A Figura 3.3 mostra o esquema de instrumentação utilizado para realização das medidas gravimétricas.

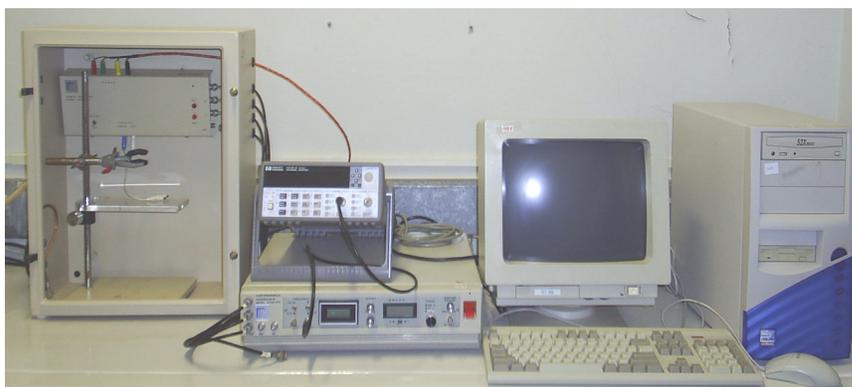


FIGURA 3.3. Microbalança de cristal de quartzo modelo EQCN-601 (Elchema).

3.2.3. Sistema com injeção em fluxo (FIA)

As medidas gravimétricas foram realizadas em uma microbalança de cristal de quartzo modelo EQCN-601 (Elchema). Para a construção do sistema FIA-QCM utilizou-se uma bomba peristáltica Ismatec IPC, modelo EW-78001-22 de 8 canais, equipada com tubos de propulsão com diâmetro interno de 0,8mm. O sistema FIA-QCM utilizado foi acoplado ao sistema QCM descrito no item 2.2. e as variações de frequência foram registradas utilizando-se um computador PC. O sistema FIA-QCM utilizado está representado na Figura 3.4.

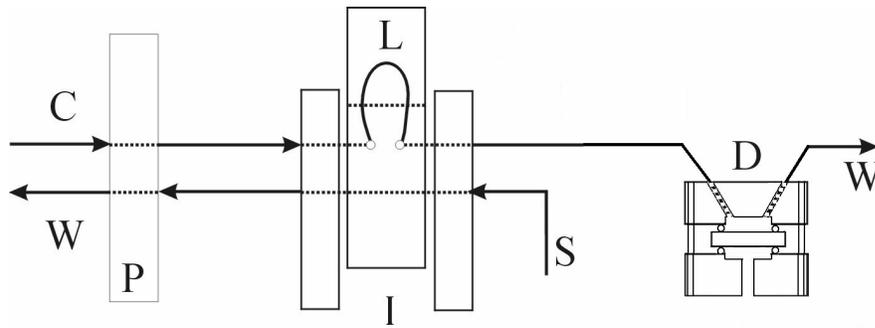


FIGURA 3.4. Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo em linha única. C – transportador, P – bomba peristáltica, I – injetor, L – alça de amostragem, D – detector, W – descarte e S – soluções de amostra ou padrões.

3.2.4. Espectrometria de infravermelho

As medidas de espectroscopia de infravermelho foram realizadas utilizando um espectrômetro Marca Bruker modelo Equinox 55 com acessório de reflectância difusa 30Spec.

3.2.5. Impedância eletroacústica

As medidas de admitância eletroacústica foram realizadas em um analisador de impedância de precisão da Agilent modelo 4294 A. O analisador permite a varredura de frequência de 40 Hz a 110 MHz com precisão na impedância de $\pm 0,8\%$. A Figura 3.5 apresenta o equipamento utilizado nas medidas.



FIGURA 3.5. Analisador de impedância de precisão Agilent modelo 4294 A.

3.3. Formação das monocamadas auto-organizadas

3.3.1. Cistamina, glutaraldeído e lectina

A imobilização das lectinas estudadas foi realizada em três etapas, utilizando-se os reagentes cistamina e glutaraldeído para a formação da monocamada de proteína. Para este estudo foram utilizadas soluções estoques de cistamina com concentração de $0,5 \text{ mol. L}^{-1}$ e de glutaraldeído com concentração de 25% v/v.

Para a formação da monocamada de cistamina foi adicionado um volume constante de água desionizada à célula contendo o cristal de quartzo limpo. Esta foi conectada ao circuito oscilador, esperou-se a estabilização da frequência de oscilação do cristal piezelétrico e então se adicionou um pequeno volume da solução estoque de cistamina.

Após a formação do filme de cistamina, a célula foi lavada com água desionizada para eliminar o excesso de cistamina que não foi imobilizada na superfície do eletrodo, evitando-se com isso, que estas moléculas interagissem com o glutaraldeído adicionado na etapa seguinte.

Após a lavagem da célula com água, foi novamente adicionado um volume constante de água à célula e esta foi conectada ao circuito oscilador. Após estabilização da frequência de oscilação do cristal de quartzo foi adicionado um pequeno volume da solução estoque de glutaraldeído à célula de forma a obter uma concentração final de 5% v/v. Após a imobilização do glutaraldeído, a célula foi lavada com solução tampão fosfato (pH 7,4) para remover o excesso de glutaraldeído que não foi imobilizado sobre a superfície do eletrodo.

Foi adicionado um volume constante de solução tampão fosfato à célula, que foi conectada ao circuito oscilador e iniciou-se a aquisição dos dados de frequência. Adicionou-se um pequeno volume da lectina, jacalina ou concanavalina A, ao eletrodo contendo a monocamada de cistamina e glutaraldeído. Os analitos estudados foram adicionados ao cristal contendo a proteína imobilizada em meio de tampão fosfato. Foram registradas as variações na frequência de oscilação do cristal piezelétrico referentes aos diferentes analitos.

3.3.1.1. Estudo da formação da monocamada de cistamina

A formação do filme de cistamina sobre o eletrodo de ouro foi realizada em diferentes concentrações (1 a 20 mmol. L⁻¹). O cristal limpo foi colocado na célula de politetrafluoretileno e conectado ao circuito oscilador. Adicionou-se um pequeno volume da solução estoque de cistamina e fez-se a aquisição dos dados de frequência. Esse procedimento foi realizado para as diferentes concentrações estudadas, em triplicata. Após o término de cada medida, o cristal foi lavado com solução “piranha” para remoção das moléculas de cistamina imobilizadas sobre o cristal de quartzo.

Outro procedimento utilizado para o estudo da formação do filme de cistamina sobre o cristal de quartzo foi a construção de uma curva de calibração

fazendo-se adições crescentes da solução estoque de cistamina ao cristal piezométrico. Nesse caso, as adições foram sucessivas e sem a limpeza do cristal entre as adições.

3.3.2. Imobilização da proteína em multicamadas

Um outro procedimento utilizado foi a imobilização da lectina em multicamadas. Neste método, após imobilização da lectina sobre uma monocamada prévia de cistamina e glutaraldeído, adicionou-se uma solução de glutaraldeído (0,05% v/v) sobre a proteína, seguindo-se a adição da lectina ao glutaraldeído e assim, sucessivamente. Este procedimento de adição do glutaraldeído e da proteína foi realizado repetidas vezes, obtendo-se um filme com cinco camadas de lectina imobilizada. A célula foi lavada com água desionizada, para os reagentes cistamina e glutaraldeído na formação da primeira camada e tampão fosfato para as adições de lectina e glutaraldeído para formação das multicamadas. O procedimento de lavagem da célula contendo o cristal de quartzo tinha como objetivo remover as moléculas que não foram imobilizadas sobre o cristal de quartzo.

3.3.3. Monocamadas auto-organizadas pelo método de ativação com EDC/NHS

Um outro método utilizado para imobilização das lectinas estudadas foi a modificação da superfície do cristal de quartzo utilizando-se ácido 11-mercaptopundecanóico e 2-mercaptoetanol. A superfície modificada foi ativada com N-etil N-(dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) para o acoplamento da proteína com os reagentes imobilizados sobre o cristal de quartzo. Os sítios não específicos de ligação foram bloqueados com albumina de soro bovino (BSA). Adicionou-se ao cristal piezométrico limpo uma

mistura contendo 1 mmol.L⁻¹ de ácido 11-mercaptoundecanóico e 10 mmol.L⁻¹ de 2-mercaptoetanol. O objetivo é que o filme formado tenha a mesma estequiometria da solução, ou seja, 1:10 de ácido 11-mercaptoundecanóico e 2-mercaptoetanol, respectivamente. A utilização de tióis com cadeias diferentes⁴⁷ objetivava definir o número de sítios de ligação para a proteína, que se liga apenas ao ácido 11-mercaptoundecanóico, resultando em diminuição do impedimento estérico. O cristal ficou em contato com a mistura por uma noite inteira, num total de 14 horas.

O cristal foi lavado com água e adicionou-se então, uma mistura contendo 0,4 mol.L⁻¹ de EDC e 0,1 mol.L⁻¹ de NHS ao cristal contendo a monocamada de tióis. O cristal ficou em contato com a mistura EDC/NHS por 45 minutos⁵⁶. O cristal foi novamente lavado com água desionizada e conectado ao circuito oscilador da microbalança de cristal de quartzo. A imobilização das proteínas e posterior adição dos carboidratos estudados foi realizada em meio de solução tampão fosfato 0,01 mol.L⁻¹ contendo 0,15 mol.L⁻¹ de NaCl.

As lectinas imobilizadas por este método foram jacalina e concanavalina A e os analitos estudados foram a glicoproteína fetuína e o monossacarídeo glicose, respectivamente.

3.3.4. Espectrometria na região do infravermelho da superfície do cristal de quartzo

Realizaram-se medidas de reflectância da região do infravermelho como forma de comprovar a formação das monocamadas sobre o cristal piezométrico. As medidas foram realizadas utilizando-se um mesmo cristal piezométrico. Primeiramente, fez-se um espectro de infravermelho do cristal piezométrico limpo, para ser usado como branco analítico. Fez-se um espectro de infravermelho do cristal de quartzo contendo cistamina imobilizada em monocamada. Em seguida, imobilizou-se glutaraldeído sobre a monocamada de

cistamina e mediu-se o espectro de infravermelho. Sobre a monocamada cistamina+glutaraldeído imobilizou-se a lectina concanavalina A e mediu-se novamente o espectro de infravermelho.

3.4. Extração e purificação da lectina jacalina

O procedimento utilizado para extração e purificação foi realizado segundo ROQUE-BARREIRA⁵⁷ e colaboradores e será brevemente descrito nesse item.

A jacalina foi extraída das sementes de jaca da espécie *Artocarpus integrifolia*. Para tanto, a semente da jaca foi seca (desidratada em estufa a 37 graus) e ⁴⁸ pulverizada em moinho. Esse material é ressuspenso em uma solução de tampão fosfato contendo cloreto de sódio (PBS), mantido em suspensão à temperatura de 4 graus, durante uma noite, e então centrifugado. O sobrenadante foi dializado em tampão fosfato, à temperatura de 4 graus, durante 24 horas. Finalizada esta etapa, o sobrenadante estava pronto para ser aplicado à coluna de D-galactose. O material não ligado à coluna foi eluido com PBS, até que absorvância no comprimento de onda de 280 nm fosse zerada. A seguir, o material ligado à coluna foi eluido com uma solução de D-galactose 0,1 mol.L⁻¹, em tampão fosfato. A preparação obtida foi ultradialfiltrada em sistema Amicon, utilizando-se membrana YM30, para eliminação do açúcar. A preparação de jacalina foi, então estocada a uma temperatura de -20°C, até o momento do uso.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. Resultados e Discussão

4.1. Formação das monocamadas auto-organizadas

4.1.1. Estudo da formação da monocamada de cistamina utilizando QCM

Para imobilização das lectinas estudadas utilizou-se o método das monocamadas auto-organizadas, no qual cistamina e glutaraldeído foram utilizados para modificar a superfície do cristal do quartzo.

Durante as etapas de imobilização das lectinas, realizaram-se experimentos com diversas concentrações de cistamina que provocaram diferentes decréscimos na frequência de oscilação do cristal de quartzo. As Figuras 4.1, 4.2 e 4.3 apresentam a variação na frequência de oscilação do cristal piezométrico ao adicionar-se uma solução de cistamina em concentrações de 1; 5 e 12,5 mmol. L⁻¹, respectivamente.

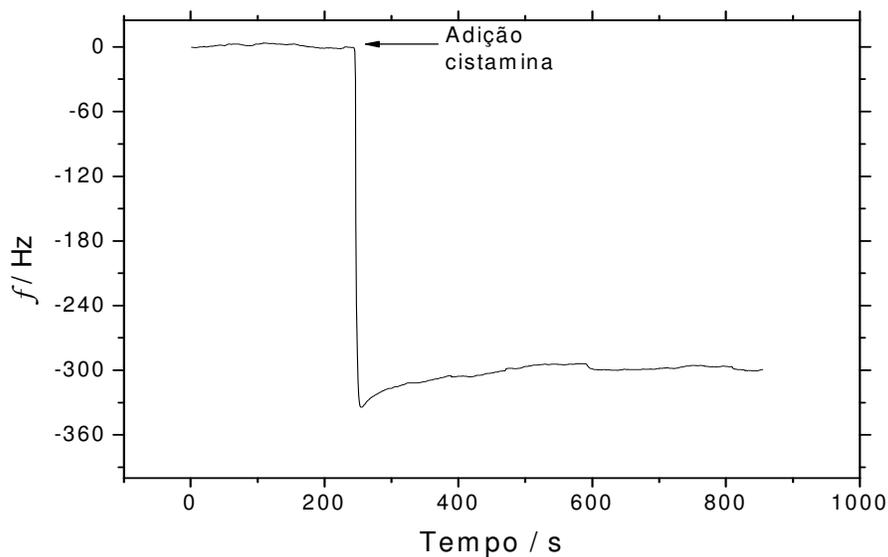


FIGURA 4.1. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para a adição de uma solução de cistamina. Concentração 1 mmol L⁻¹. Resultado representativo dos obtidos em seis diferentes experimentos.

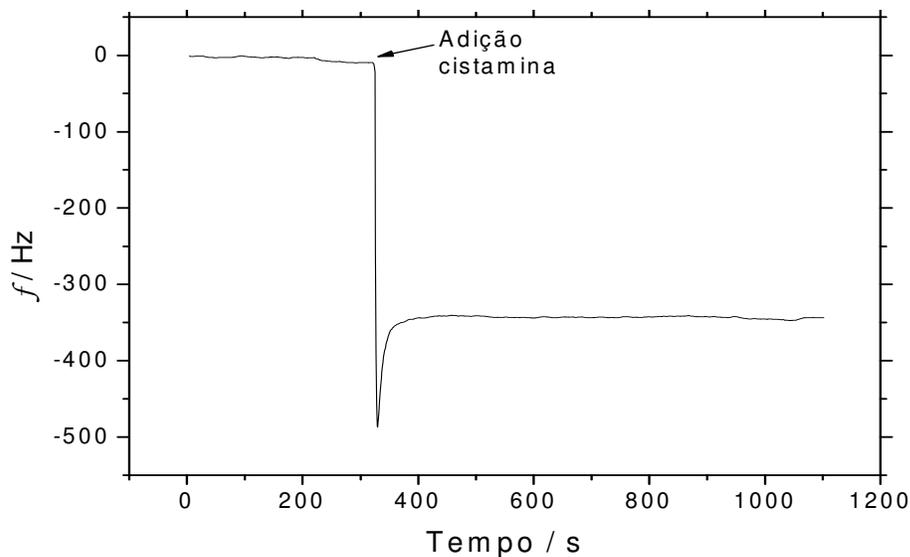


FIGURA 4.2. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para a adição de uma solução de cistamina. Concentração 5 mmol L^{-1} . Resultado representativo dos obtidos em seis diferentes experimentos.

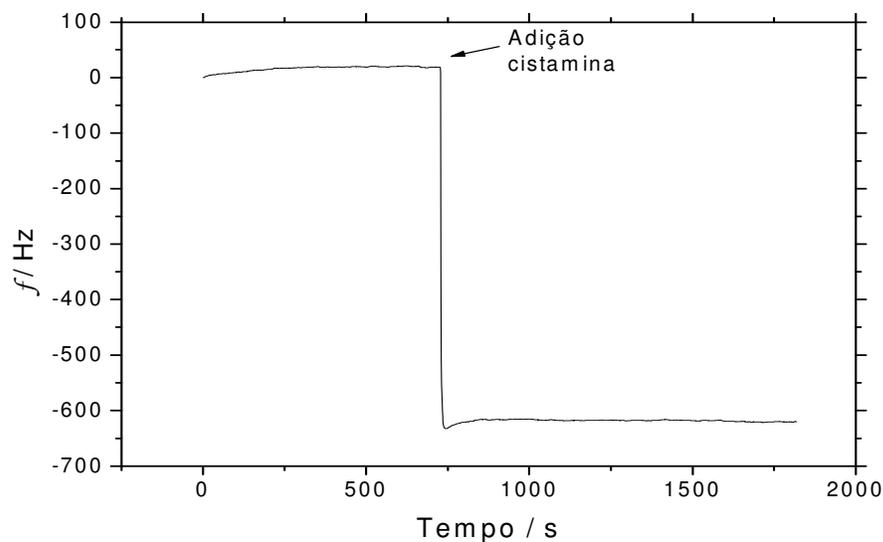


FIGURA 4.3. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para a adição de uma solução de cistamina. Concentração $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Resultado representativo dos obtidos em dez diferentes experimentos.

A Figura 4.1 mostra uma variação na frequência de oscilação do cristal de quartzo de aproximadamente 300 Hz para uma concentração de cistamina de 1 mmol L⁻¹. Na Figura 4.2 observa-se uma variação na frequência de oscilação do cristal de quartzo de aproximadamente 340 Hz (5 mmol L⁻¹) e a Figura 4.3 mostra uma variação na frequência de oscilação do cristal de quartzo de 620 Hz (12,5 mmol L⁻¹).

Baseado nas diferentes variações de frequência observadas avaliou-se a influência da concentração de cistamina no processo de imobilização sobre o ouro. As medidas foram realizadas em triplicatas, nas seguintes concentrações: 1; 3; 5; 7; 10; 12,5; 15; 17 e 20 mmol. L⁻¹. Os cristais de quartzo foram lavados com solução “piranha” entre as medidas. A Figura 4.4 apresenta a variação na frequência de oscilação do cristal de quartzo para cada adição, bem como o desvio padrão entre as medidas realizadas.

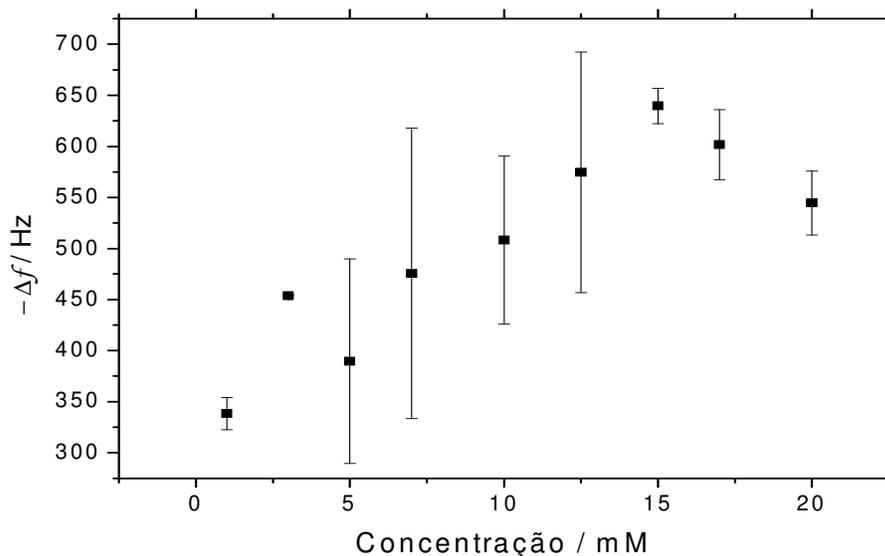


FIGURA 4.4. Variação de frequência de oscilação do cristal de quartzo em função da concentração de cistamina adicionada ao cristal limpo.

Observa-se na figura que na concentração de 15 mmol. L⁻¹ o sistema apresentou uma maior variação na frequência de oscilação do cristal que está relacionada a uma maior deposição de massa sobre a superfície do eletrodo, bem

como uma melhor repetitividade, pois nessa concentração obteve-se o menor desvio padrão entre as medidas realizadas.

Um outro estudo realizado envolvendo a imobilização da cistamina foi a construção de uma curva de calibração, com adições sucessivas de uma solução de cistamina ao cristal piezelétrico limpo, como mostrado na Figura 4.5.

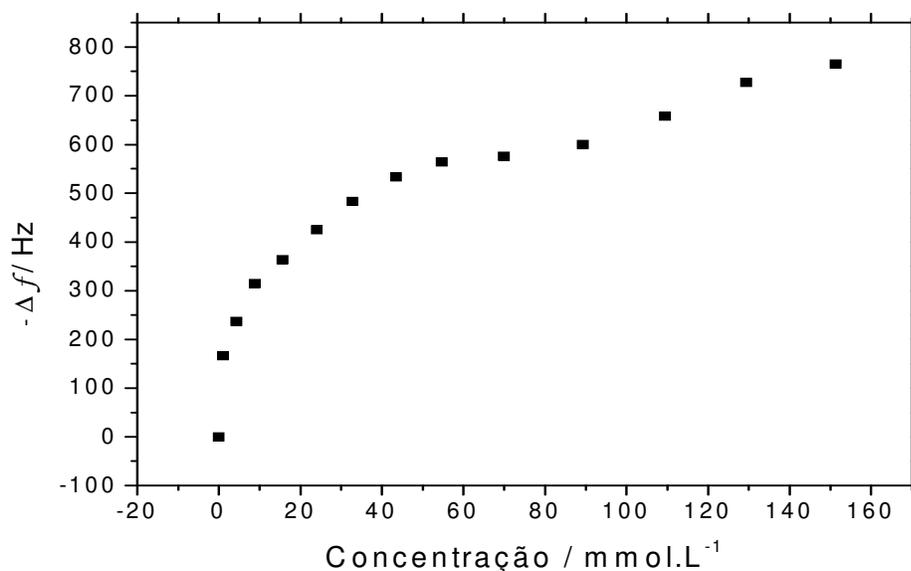


FIGURA 4.5. Variação da frequência de oscilação em função da concentração para adições sucessivas de uma solução de cistamina ao cristal de quartzo.

Analisando-se a Figura 4.5 podemos observar que a variação de frequência com uma única adição de solução de cistamina 15 mmol.L⁻¹ ao eletrodo limpo, variação de aproximadamente 600 Hz, é obtida quando a concentração de cistamina é de 90 mmol.L⁻¹. Esta concentração é maior do que a necessária para obter a mesma variação de frequência quando é realizada uma única adição de solução de cistamina ao cristal limpo (Figura 4.4). Isto indica que uma única adição de solução 15 mmol.L⁻¹ de cistamina resulta em uma melhor organização das moléculas na formação da monocamada e conseqüentemente, maior adsorção das moléculas sobre a superfície do filme de ouro. Portanto este processo foi mais eficiente do que o que utiliza várias adições consecutivas do reagente.

Desta forma, acredita-se que o determinante da máxima variação de frequência de oscilação do cristal de quartzo é a concentração inicial de cistamina que atinge a superfície do eletrodo. Com base nestes resultados optou-se pela utilização de cistamina em uma concentração de 15 mmol.L^{-1} .

4.1.2. Estudo da formação da monocamada de cistamina utilizando a técnica de admitância eletroacústica

Foram realizados experimentos com a técnica de admitância eletroacústica (AE) no estudo da influência da concentração de cistamina na formação da monocamada. O experimento foi realizado utilizando-se as mesmas concentrações de cistamina usadas nos experimentos com a QCM, de 1 a 20 mmol. L^{-1} . O tratamento dos dados foi feito em parceria com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno do Instituto de Química, Unesp/Araraquara.

As propriedades físicas do cristal de quartzo na frequência de ressonância fundamental podem ser representadas por meio de um circuito equivalente. Este circuito é constituído de dois ramos: o ramo dinâmico e o ramo estático. O ramo *RLC* é chamado ramo dinâmico. O parâmetro *R* é a resistência dinâmica relacionada com as perdas de energias mecânicas, por exemplo, devido à viscosidade do líquido ou a propriedades viscoelásticas do filme que está em contato ou adsorvido à superfície. O parâmetro *L* é a indutância dinâmica relacionada com a oscilação da massa do cristal e o parâmetro *C* é a capacitância dinâmica, relacionado com a elasticidade do cristal. O capacitor C_0 está relacionado com a capacitância estática, devido aos eletrodos depositados em ambas as faces do cristal de quartzo, formando um capacitor tendo o cristal de quartzo como um dielétrico. A Figura 4.6 (A) mostra uma representação dos ramos estático e dinâmico do circuito equivalente, a (B) mostra uma analogia

entre o ramo dinâmico do circuito equivalente e a propriedade mecânica de cada componente.

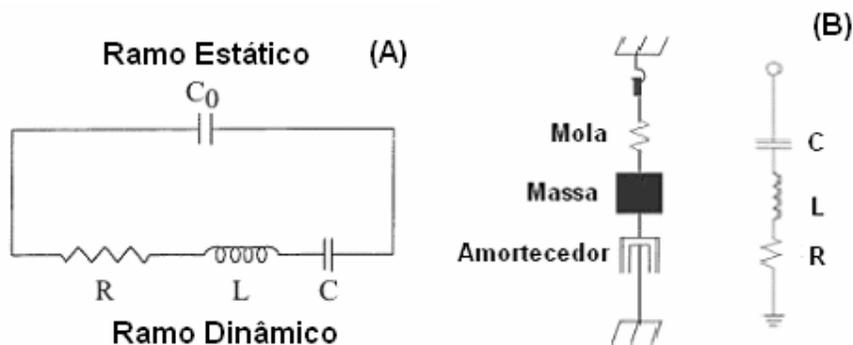


FIGURA 4.6. (A) Circuito equivalente representando o cristal de quartzo, dividido em ramo dinâmico e ramo estático na frequência de ressonância fundamental; (B) Representação esquemática comparando cada componente do ramo dinâmico do circuito equivalente com suas propriedades mecânicas, constituído de mola, massa e um amortecedor.

As curvas de AE foram feitas nas seguintes condições: a) célula contendo água; b) após 25 minutos da adição de cistamina e c) depois que a célula foi lavada com água desionizada. Nesta etapa as medidas foram submetidas a ajustes com o objetivo de extrair os valores dos parâmetros do circuito equivalente do cristal de quartzo, mais especificamente do ramo dinâmico, sendo, portanto, a resistência, a indutância e a capacitância. A partir destes dados, calculou-se a frequência em série para o cristal nas diferentes etapas descritas acima.

A partir da análise da variação na frequência de oscilação do cristal observa-se que a maior variação, 190 Hz, foi obtida utilizando-se uma concentração de 20 mmol. L⁻¹ de cistamina. Entretanto a utilização de 15 mM proporcionou variação muito próxima à observada com 20 mmol. L⁻¹ (Figura 4.7 (A)). Na análise do parâmetro R nota-se que a maior perda de

energia mecânica foi obtida ao utilizar-se uma concentração de 15 mmol. L⁻¹. Para concentrações menores, 1 e 2,5 mmol. L⁻¹, as perdas energéticas diminuem, o que pode indicar a formação de um filme mais rígido (Figura 4.7 (B)). Entretanto, nestas concentrações, as variações de frequência

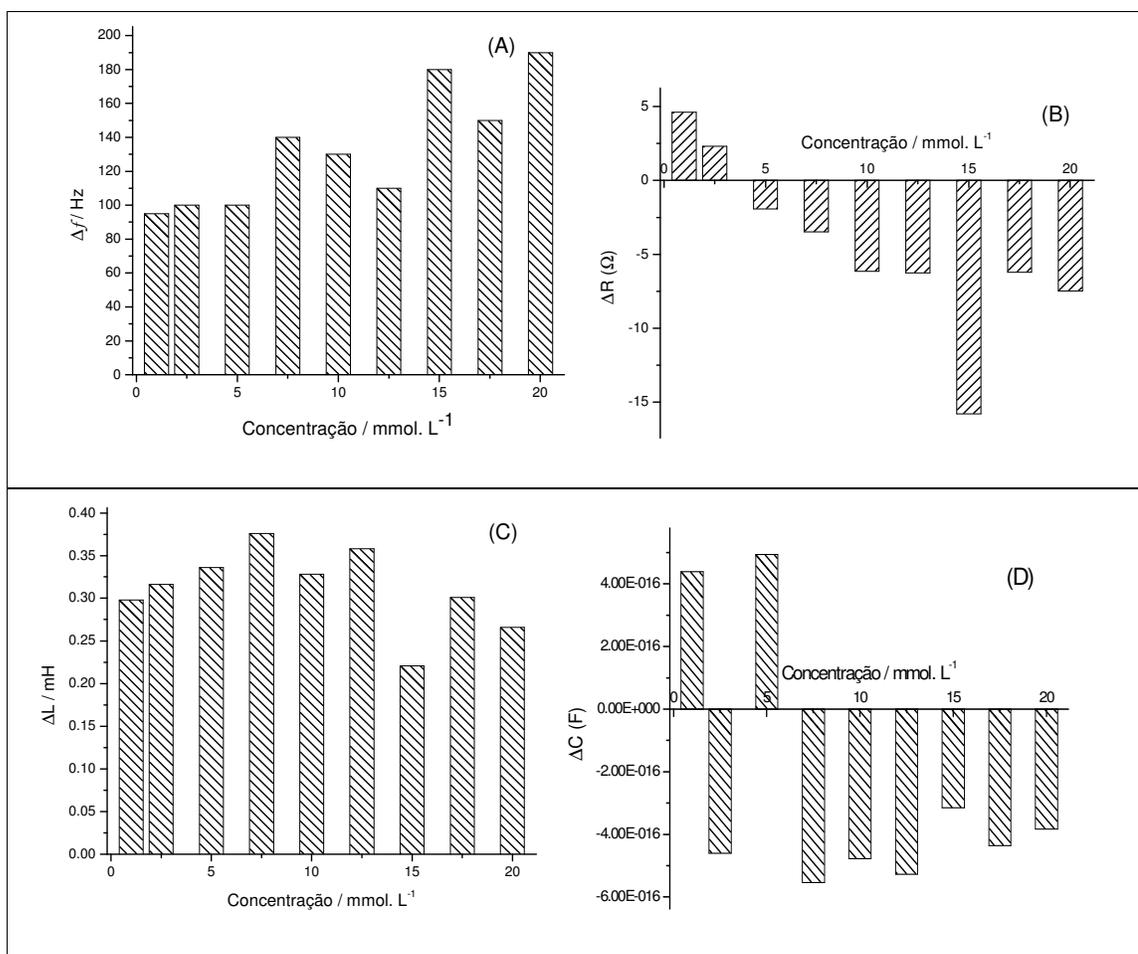


FIGURA 4.7. – Variação dos parâmetros do ramo dinâmico do circuito equivalente do cristal de quartzo em função da concentração de cistamina utilizando a técnica de admitância eletroacústica. (A) frequência, (B) resistência R , (C) indutância L e (D) capacitância C . Onde Δ é a diferença entre o valor obtido para a célula contendo água e o valor obtido para os parâmetros após 25 minutos da adição da cistamina.

foram menores quando comparadas às demais concentrações, indicando que a superfície não foi totalmente preenchida com a monocamada de cistamina. Depois que as medidas de AE foram feitas, o cristal foi lavado com água desionizada para eliminar o possível excesso de cistamina. Após tal procedimento, a concentração de 15 mmol. L⁻¹ de cistamina apresentou uma queda de 30 Hz, sendo esta a maior variação observada.

As curvas de AE foram submetidas a ajustes com o intuito de extrair os parâmetros do circuito equivalente, apresentados na Tabela 4.1. Os principais parâmetros estudados foram aqueles que compõem o ramo dinâmico, ou seja, R , L e C em série. Estes parâmetros são importantes, pois viabilizam o cálculo de outros parâmetros relevantes como a frequência em série, que depende somente dos parâmetros L e C , e o fator D . A importância deste fator está no fato de que ele fornece informações sobre as propriedades viscoelásticas do filme imobilizado sobre a superfície do cristal de quartzo.

TABELA 4.1. Parâmetros do circuito equivalente extraídos da curva de admitância para o cristal inserido na célula contendo água e após a formação da monocamada de cistamina. Concentração 20 mmol. L⁻¹.

	R (Ω)	L (mH)	C (fF)	Fator D (10^{-4})	$\Delta f_{\text{série}}$ (Hz)
Cristal em água	392	13,497	18,852	4,633	0
Cistamina	408	13,275	19,167	4,903	-190
Após lavagem	394	13,493	18,857	4,658	-30

Os dados obtidos pela técnica de AE, apresentados na Tabela 4.1, mostram uma variação na frequência de oscilação do cristal de quartzo de 190 Hz quando é adicionado cistamina ao cristal. Entretanto, após a lavagem da

célula esse valor diminuiu para 30 Hz. Isto pode estar relacionado com interações fortes e não específicas (interação eletrostática) entre a cistamina livre e aquela que está ligada à superfície do ouro formando a monocamada, resultando numa grande variação na frequência de oscilação do cristal. As moléculas de cistamina que não foram imobilizadas covalentemente sobre o cristal de quartzo foram removidas com a lavagem da célula e o valor final da variação de frequência (30 Hz) corresponde à quantidade de cistamina que efetivamente foi imobilizada sobre a superfície do cristal.

O parâmetro D sofre um aumento após a adição da cistamina e, após lavagem o valor retorna aos níveis iniciais. O parâmetro D está relacionado com a viscoelasticidade do filme; a diminuição de seu valor após a lavagem da célula pode ser associada à formação de um filme mais rígido e compacto sobre a superfície do cristal. Este parâmetro pode ser relacionado à massa de cistamina que não se liga diretamente ao ouro e é removida após a lavagem da célula contendo o cristal de quartzo. Assim, postula-se que somente a monocamada de cistamina que realiza ligação covalente contribui para a variação da frequência (30 Hz).

Analisando todo o conjunto de dados apresentados, tanto na técnica de AE como na técnica de QCM, a concentração de 15 mmol. L⁻¹ apresentou o melhor resultado, visto que, mesmo após a lavagem, esta concentração apresentou maior decréscimo na frequência de oscilação do cristal, devido ao aumento de massa na superfície do cristal, indicando melhor recobrimento da superfície pelas moléculas de cistamina.

4.1.3. QCM com sistema de injeção em fluxo no estudo da formação da monocamada de cistamina

Realizou-se um estudo da formação da monocamada de cistamina sobre o cristal de quartzo utilizando a microbalança de cristal de quartzo com sistema de injeção em fluxo.

O uso da injeção em fluxo teve como objetivo validar os resultados obtidos com a técnica de admitância eletroacústica, uma vez que, com o uso do fluxo foi possível acompanhar todo o processo de formação da monocamada de cistamina sobre o cristal de quartzo, incluindo a adição e posterior lavagem.

Em diversos trabalhos na literatura⁵⁰, o cristal de quartzo contendo o filme de ouro depositado é mantido por períodos longos (12 – 24 h) em contato com a solução contendo o reagente com o grupamento tiol que se deseja imobilizar. Como na injeção em fluxo a solução de cistamina permanece pouco tempo em contato com o cristal de quartzo, o fluxo foi interrompido por 900s, a partir do momento em que a solução de cistamina entrou em contato com o cristal piezométrico, visando aumentar o tempo de exposição da solução de cistamina com o cristal. A Figura 4.8 apresenta a variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo.

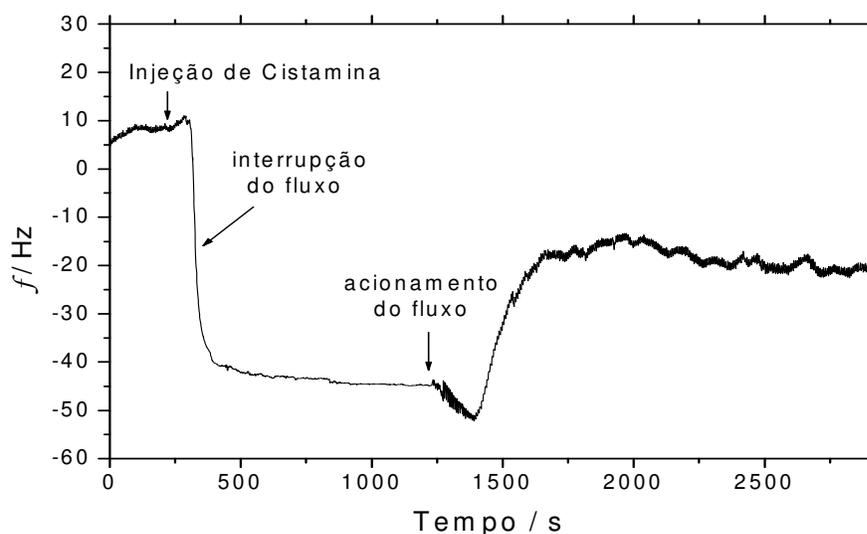


FIGURA 4.8. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para a injeção de 250 μL de solução de cistamina a uma vazão de 235 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Concentração 15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Analisando-se a Figura 4.8, observa-se que a injeção da solução de cistamina seguiu-se de um decréscimo de aproximadamente de 55 Hz na frequência de oscilação do cristal. Após interrupção do fluxo a frequência de oscilação estabilizou-se rapidamente e assim permaneceu até o fluxo ser reiniciado. Com isto houve um aumento de aproximadamente 25 Hz na frequência que pode estar associado ao fato de que a monocamada não se encontrava totalmente organizada. Neste sentido a solução carreadora pode ter removido as moléculas de cistamina que estavam adsorvidas não especificamente, arrastando-as e provocando o aumento de frequência devido à diminuição de massa na superfície do cristal. Isto é um indicativo que há uma interação forte e não específica entre a cistamina livre com aquela que está ligada à superfície do ouro formando a monocamada. Esta cistamina não ligada é, então, removida pelo fluxo carreador.

Os resultados do uso do sistema de injeção em fluxo aliada à QCM indicam que as variações de frequência observadas nos sistemas estáticos não

representam a massa real de cistamina adsorvida na superfície do ouro, observação coerente com as medidas de admitância eletroacústica.

Utilizando-se o sistema em fluxo, realizou-se um estudo da influência de injeções consecutivas de solução de cistamina 15 mmol.L^{-1} ao cristal de quartzo, cujos resultados são mostrados na Figura 4.9. Após a primeira injeção de reagente houve um decréscimo de aproximadamente 400 Hz, seguido de um aumento da frequência. A diferença entre o valor final e inicial ficou em torno de 40 Hz. Após a estabilização da frequência de oscilação do cristal, foram realizadas novas injeções de solução de cistamina. Após a segunda injeção a frequência de oscilação do cristal voltou praticamente ao mesmo valor de frequência detectados após a primeira injeção, fato que se repetiu até a terceira injeção. Após a última injeção houve um decréscimo adicional na frequência de oscilação do cristal, provavelmente relacionado a alguma perturbação no sistema do circuito oscilador ou eventual variação na célula de fluxo. O que se observa na Figura 4.9 é que a formação da monocamada é determinada pela primeira injeção de cistamina, uma vez que as demais injeções não provocaram variações significativas de frequência, confirmando os resultados obtidos para os estudos realizados na QCM sem o sistema em fluxo, apresentados no item 4.1.1 dos resultados e discussão.

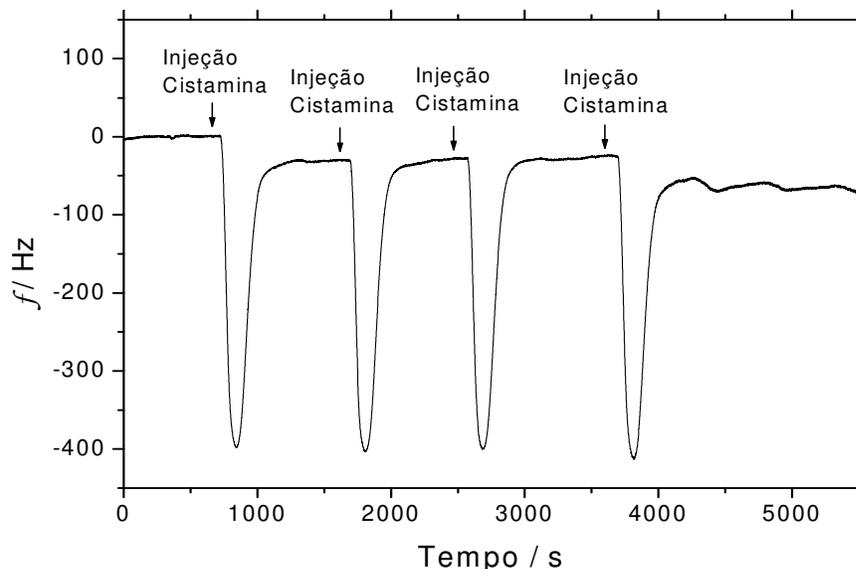


FIGURA 4.9. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para injeções consecutivas de 375 μL de solução de cistamina a uma vazão de 235 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Concentração 15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$.

4.2. Estudo da imobilização das lectinas utilizando cistamina e glutaraldeído

Na primeira etapa de formação da monocamada, imobilizou-se cistamina sobre a superfície de ouro, como descrito nos itens anteriores. Na segunda etapa, agora descrita, adicionou-se ao cristal já contendo a monocamada de cistamina, uma solução de glutaraldeído que, imobilizado, funcionaria como um espaçador entre a cistamina e a lectina. A Figura 4.10 mostra o gráfico da variação de frequência em função do tempo correspondente à adição da solução de glutaraldeído.

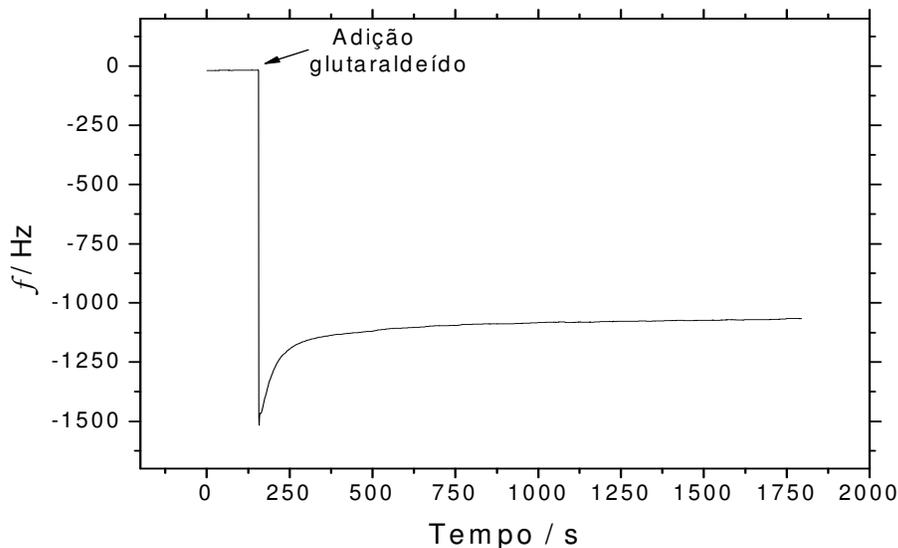


FIGURA 4.10. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para adição de uma solução de glutaraldeído ao cristal de quartzo contendo a monocamada de cistamina. Concentração 2,5% v/v.

Observa-se um decréscimo na frequência de oscilação do cristal piezelétrico ao adicionar-se uma solução de glutaraldeído ao cristal de quartzo contendo a cistamina imobilizada. Isso se deve a ligação entre o grupo aldeído do glutaraldeído e o grupo amina presente na cistamina, por meio da formação de uma ligação do tipo base de Schiff (uma ligação imina). A Figura 4.11 mostra a reação responsável pela formação da imina.

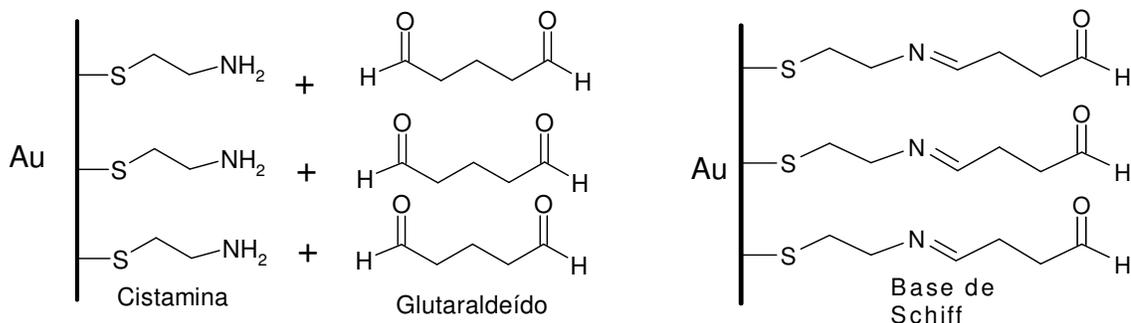


FIGURA 4.11. Diagrama esquemático da formação da monocamada de cistamina e glutaraldeído sobre o eletrodo de ouro.

O glutaraldeído é um reagente bifuncional, possuindo dois grupos aldeído em sua estrutura, funcionando como um espaçador entre a monocamada de cistamina e a proteína immobilizada. A ligação entre a proteína e o glutaraldeído ocorre por meio da interação entre o grupo amina presente na proteína e o grupo aldeído do glutaraldeído, também por meio de uma ligação do tipo base de Schiff, com formação de uma imina, como mostra a Figura 4.12.

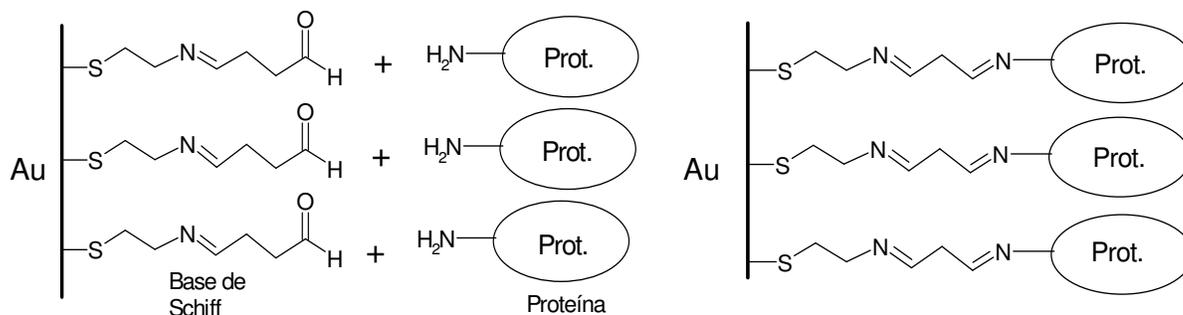


FIGURA 4.12. Diagrama esquemático da interação entre o glutaraldeído e a lectina por meio da formação de uma imina.

Ambas as proteínas estudadas foram immobilizadas sobre a monocamada de cistamina e glutaraldeído. A Figura 4.13 apresenta o gráfico referente à imobilização da lectina jacalina e a Figura 4.14 à imobilização da ConA.

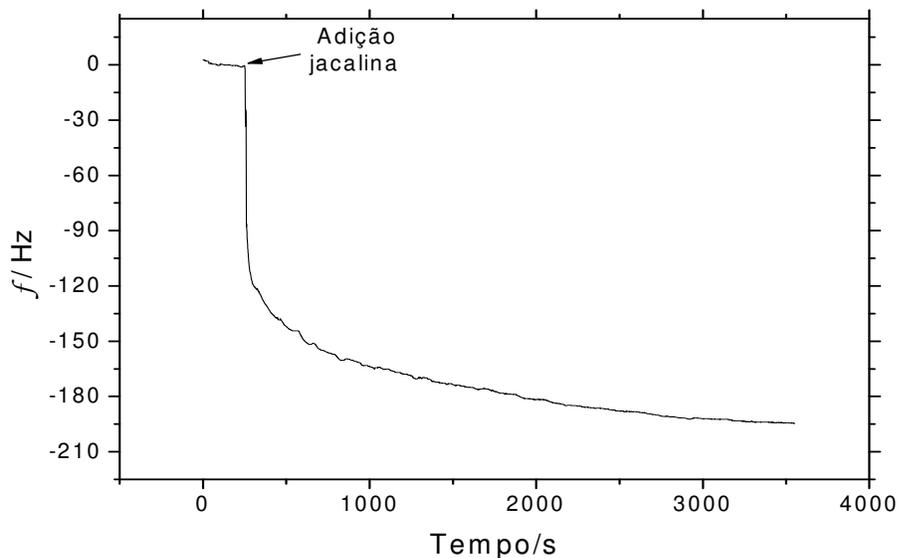


FIGURA 4.13. Variação de frequência em função do tempo para adição de uma solução de jacalina (1 mg mL^{-1}) ao eletrodo de ouro contendo a monocamada de cistamina e glutaraldeído. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl; pH 7,4.

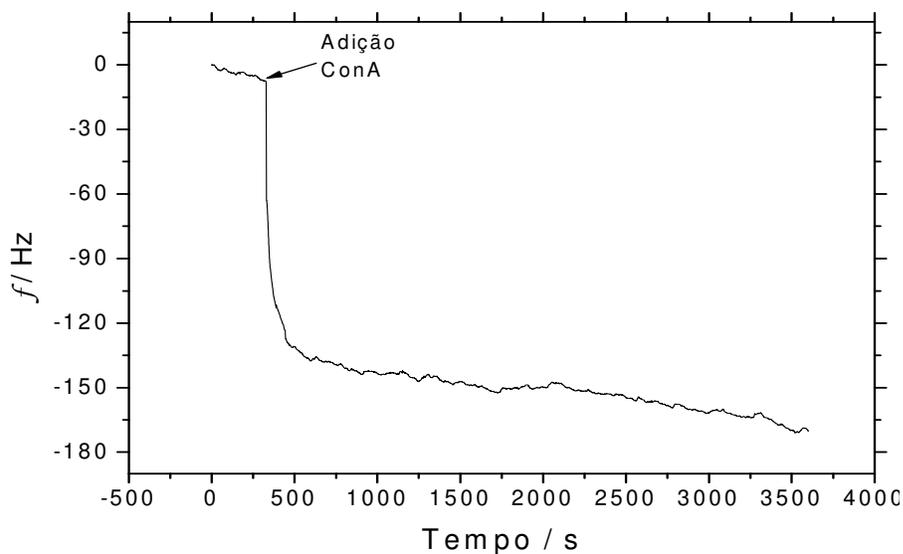


FIGURA 4.14. Variação de frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para adição de uma solução de ConA (1 mg. mL^{-1}) ao eletrodo de ouro contendo a monocamada de cistamina e glutaraldeído. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl e $0,015 \text{ mol. L}^{-1}$ de íons Ca^{2+} e Mn^{2+} ; pH 7,4.

Os decréscimos na frequência de oscilação do cristal de quartzo observados ao adicionar-se uma solução contendo jacalina e ConA, Figuras 4.13 e 4.14 respectivamente, correspondem a um aumento de massa na superfície do cristal devido à interação entre a proteína e o glutaraldeído immobilizado sobre o filme de cistamina. Ambas as medidas foram facilmente repetidas e reproduzidas para diferentes concentrações das lectinas utilizadas.

4.2.1. Estudo da imobilização das lectinas utilizando a técnica de admitância eletroacústica

A etapa de imobilização da lectina jacalina sobre a superfície do cristal de quartzo contendo cistamina e glutaraldeído também foi analisada pela técnica de admitância eletroacústica, como mostra a Figura 4.15.

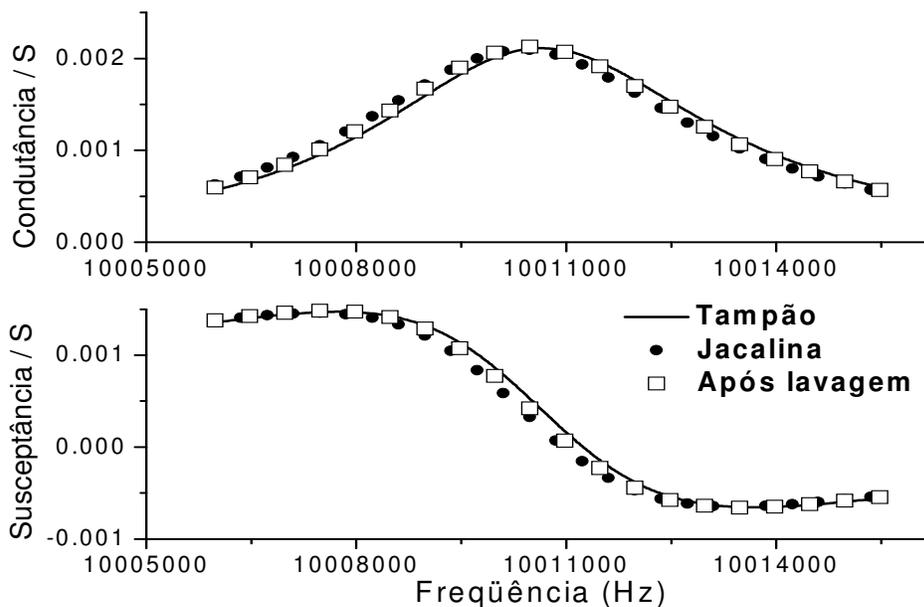


FIGURA 4.15. Curvas de admitância eletroacústica para o estudo imobilização da jacalina sobre o cristal de quartzo contendo a monocamada de cistamina e glutaraldeído. (-) Após adição de tampão ao cristal contendo cistamina e glutaraldeído; (•) Após adição de jacalina ao cristal contendo cistamina e glutaraldeído; (□) Após lavagem do cristal contendo jacalina imobilizada.

As curvas de AE apresentadas na Figura 4.15 foram ajustadas para que fosse possível extrair os parâmetros do cristal de quartzo e realizar a análise destes separadamente. Estes parâmetros são apresentados na Tabela 4.2.

TABELA 4.2. Parâmetros do circuito equivalente para as curvas de admitância eletroacústica no estudo da imobilização da jacalina sobre a monocamada de cistamina e glutaraldeído.

	R (Ω)	L (mH)	C (fF)	Fator D (10^{-4})	$\Delta f_{\text{série}}$ (Hz)
Tampão	472	12,838	19,688	5,845	0
Jacalina (1 h)	476	12,835	19,694	5,896	-30
Após Lavagem	469	12,849	19,673	5,803	-20

De acordo com a Tabela 4.2 a adição de jacalina ao cristal contendo a monocamada de cistamina e glutaraldeído provocou um decréscimo na frequência de oscilação do cristal de quartzo caracterizada por um deslocamento à esquerda na curva de admitância de 30 Hz. Após a lavagem do cristal com uma solução tampão fosfato o deslocamento observado foi de 20 Hz. Essa pequena queda observada após lavagem indica que diferentemente do que se observou para o estudo da imobilização da cistamina com a técnica de QCM, os valores de frequência obtidos antes e depois da lavagem da célula contendo a lectina imobilizada não apresentaram diferenças significativas; 30 Hz após adição de jacalina e 20 Hz após lavagem com tampão fosfato. Isto pode indicar que, durante a imobilização das proteínas, não ocorreram interações não específicas e, portanto, todo sinal de frequência provocado pela adição da lectina e conseqüente aumento de massa, é devido a interações estabelecidas pela proteína com glutaraldeído imobilizado sobre a superfície do cristal.

4.3. Caracterização das monocamadas auto-organizadas

Com o objetivo de se avaliar a presença dos filmes sobre a superfície do cristal de quartzo, realizaram-se medidas de reflectância difusa na região do infravermelho. As medidas foram realizadas em todas as etapas de imobilização e utilizou-se um cristal de quartzo limpo como referência. A Figura 4.16 apresenta os espectros de infravermelho dos filmes de cistamina, cistamina+glutaraldeído e cistamina+glutaraldeído+ConA, respectivamente.

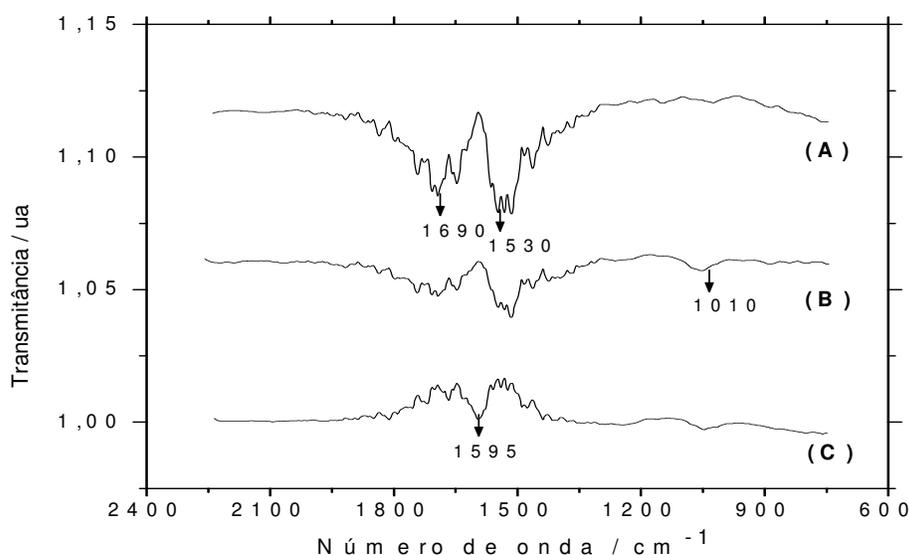


FIGURA 4.16. Espectro de infravermelho do cristal de quartzo contendo (A) filme de cistamina, (B) filme de cistamina+glutaraldeído e (C) filme de cistamina+glutaraldeído+ConA.

Na Figura 4.16 (A) observam-se duas bandas no espectro de infravermelho, 1530 e 1690 cm^{-1} , que podem ser atribuídas a amina primária N-H da molécula de cistamina. Na Figura 4.16 (B) observa-se a formação de uma nova banda em torno de 1010 cm^{-1} que pode ser atribuída à ligação C-N existente entre a cistamina e o glutaraldeído. Na Figura 4.16 (C) o sistema cistamina+glutaraldeído+ConA, principalmente a ligação do glutaraldeído com a ConA foi confirmada por meio da análise do espectro de infravermelho, com a

formação de uma banda em torno de 1595 cm^{-1} que pode ser atribuída ao grupo carbonil presente na proteína.

As medidas de reflectância difusa na região do infravermelho estão de acordo com as análises realizadas com a técnica de microbalança de cristal de quartzo, dando suporte as ligações existentes entre as moléculas e a presença do filme sobre a superfície do cristal.

4.4. Estudos de interações moleculares utilizando a QCM com injeção em fluxo

A avaliação da interação da lectina com glicoconjugado foi realizado no sistema de análise por injeção em fluxo utilizando jacalina imobilizada em monocamada sobre a superfície do ouro. Para formação da monocamada de jacalina utilizou-se sistema estacionário para a imobilização da cistamina e do glutaraldeído devido à maior facilidade e também menor consumo de reagente.

O cristal de quartzo contendo a jacalina previamente imobilizada em monocamada foi transferido para célula de fluxo e então, injetou-se uma solução de fetuína $0,5\text{ mg. mL}^{-1}$. Mediu-se a variação de frequência em função do tempo conforme observa-se na Figura 4.17.

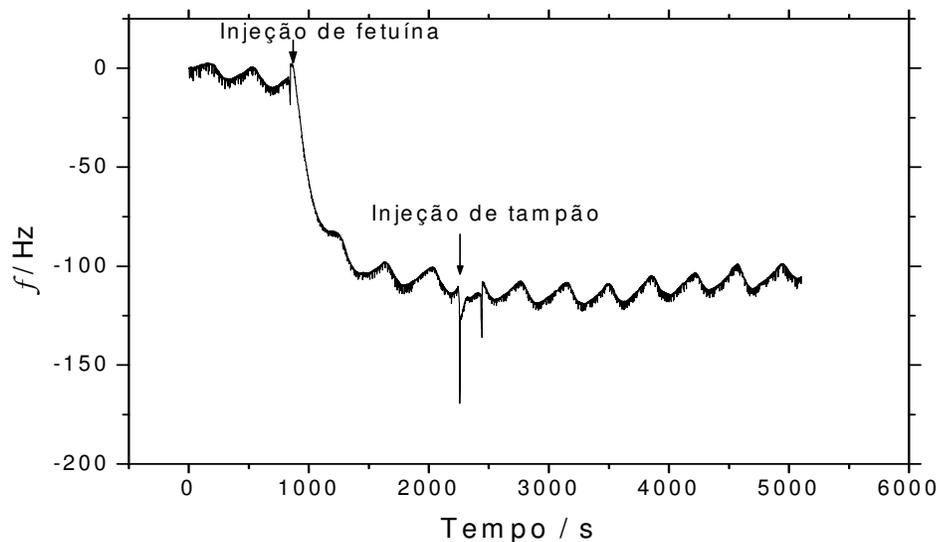


FIGURA 4.17. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para injeções de 500 μL de uma solução 0,5 mg. mL^{-1} de fetuína em uma vazão de 235 $\mu\text{L. min}^{-1}$.

Na Figura 4.17 observa-se que após a injeção de fetuína houve um decréscimo de aproximadamente 125 Hz e que, em seguida, após a passagem de uma solução tampão, a frequência permaneceu estável. O gráfico acima apresentou ondulações periódicas durante a medida, e isto pode estar relacionado com a rede elétrica do departamento de química desta universidade, pois problemas semelhantes foram observados com outros equipamentos elétricos ou mesmo a geometria da célula de fluxo e variações na vazão da bomba peristáltica. Entretanto estes problemas não influenciaram significativamente a resposta do sistema.

Durante o estudo da adição de cistamina ao cristal observou-se uma queda acentuada na frequência de oscilação do cristal. Entretanto, ao passar a solução carreadora, a frequência de oscilação do cristal sofreu um aumento, sendo que a diferença entre os valores final e inicial foi menor do que a variação inicialmente observada. Isto é um indicativo de que grande parte da variação de frequência inicial obtida é resultado da adsorção não específica da cistamina

livre àquela ligada à superfície do cristal. No entanto, o mesmo resultado não foi observado para a interação jacalina-fetuína indicando que neste estudo a variação de frequência é semelhante tanto no sistema estático como no sistema em fluxo. Desta forma, a técnica de microbalança de cristal de quartzo sem o sistema em fluxo pode ser utilizada no estudo de interações moleculares como as estabelecidas pelas lectinas com glicanas, uma vez que não se observaram interações não específicas.

4.5. Estudos de interações moleculares utilizando a QCM

Utilizando-se a técnica de microbalança de cristal de quartzo, realizaram-se diversos estudos com lectinas jacalina e concanavalina A e seus respectivos ligantes, entre eles, mono e dissacarídeos e glicoproteínas.

4.5.1. Jacalina

A jacalina, como descrito nos itens anteriores apresenta alta afinidade aos carboidratos D-galactose e N-acetilgalactosamina que foram utilizados como analitos, após a imobilização da lectina em monocamada de cistamina e glutaraldeído. Além destes carboidratos, também se utilizou como analito a glicoproteína fetuína. A Figura 4.18 apresenta um gráfico de variação na frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para adição de uma solução de D-galactose ao cristal contendo a lectina jacalina imobilizada.

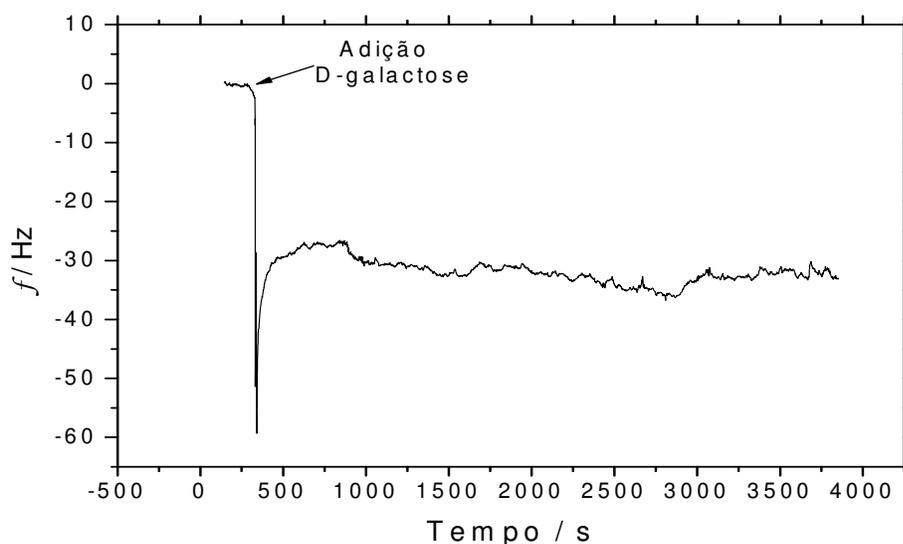


FIGURA 4.18. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para adição de uma solução D-galactose ($0,013 \text{ mol. L}^{-1}$) ao cristal de quartzo contendo jacalina (1 mg. mL^{-1}) immobilizada em monocamada. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl; pH 7,4.

A Figura 4.18 apresenta uma variação na frequência de oscilação do cristal de quartzo de aproximadamente 32 Hz. O decréscimo na frequência de oscilação observado indica um aumento de massa na superfície do cristal, que pode ser atribuído a interação entre a jacalina e a galactose, devido a sua seletividade com relação a este açúcar, como relatado na literatura^{20,25}.

As Figuras 4.19 e 4.20 também apresentam outros resultados da adição de uma solução de D-galactose à jacalina immobilizada em monocamada.

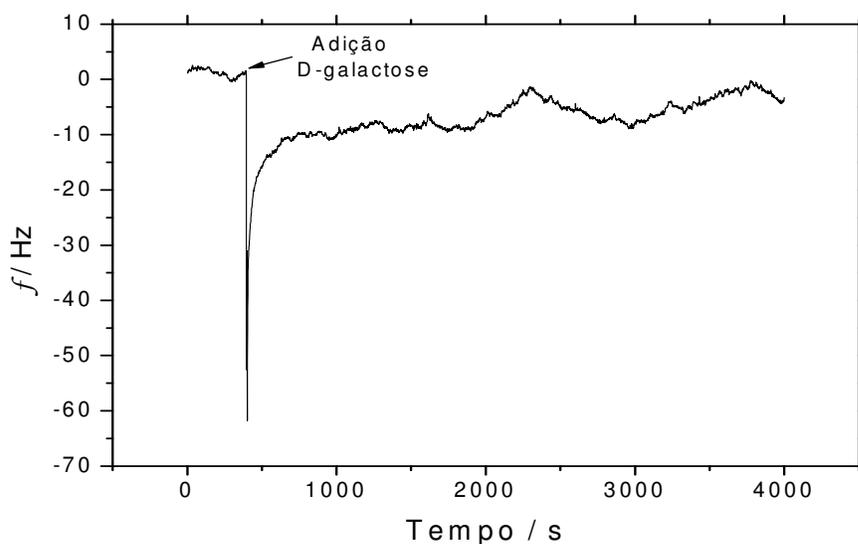


FIGURA 4.19. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para adição uma solução D-galactose ($0,013 \text{ mol. L}^{-1}$) ao cristal de quartzo contendo jacalina (1 mg. mL^{-1}) immobilizada em monocamada. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl; pH 7,4.

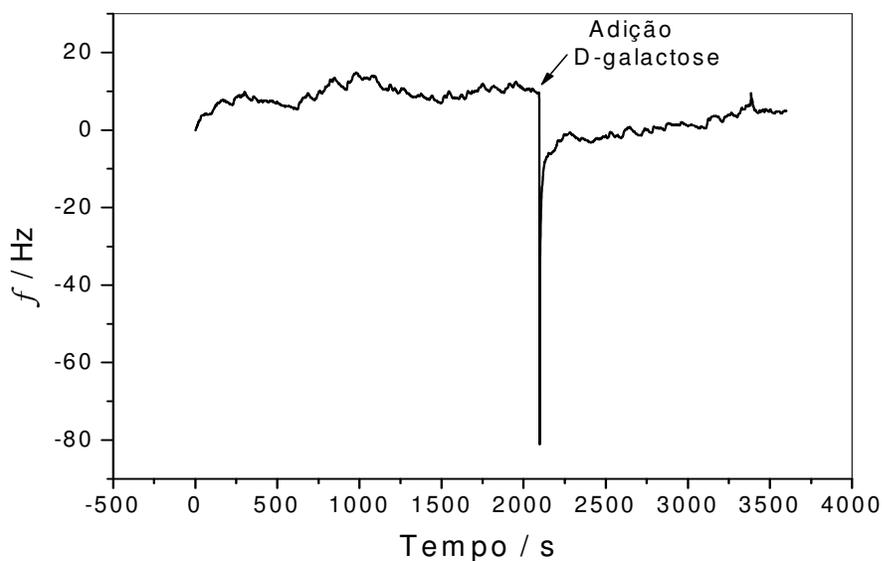


FIGURA 4.20. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para adição uma solução D-galactose ($0,013 \text{ mol. L}^{-1}$) ao cristal de quartzo contendo jacalina (1 mg. mL^{-1}) immobilizada em monocamada. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl; pH 7,4.

Os sinais proporcionados pela interação da jacalina com o carboidrato D-galactose não foram reprodutíveis, como os obtidos nas medidas de interação da jacalina com a fetuína que serão mostrados mais adiante. Um explicação estaria no fato que a interação com monossacarídeos se faz com menos afinidade do que com certos oligossacarídeos contendo D-galactose em posição terminal¹⁵, como os encontrados na fetuína. Além disso, o monossacarídeo D-galactose apresenta massa molar muito pequena (118 g. mol^{-1}), quando comparado à proteína, proporcionando sinais muito baixos de variação na frequência de oscilação do cristal de quartzo, apenas 6 Hz e 8 Hz (Figuras 4.19 e 4.20). Outros analitos estudados foram os carboidratos N-acetilgalactosamina (Figura 4.21) e o dissacarídeo α -lactose (Figura 4.22) constituído de D-galactose e D-glicose.

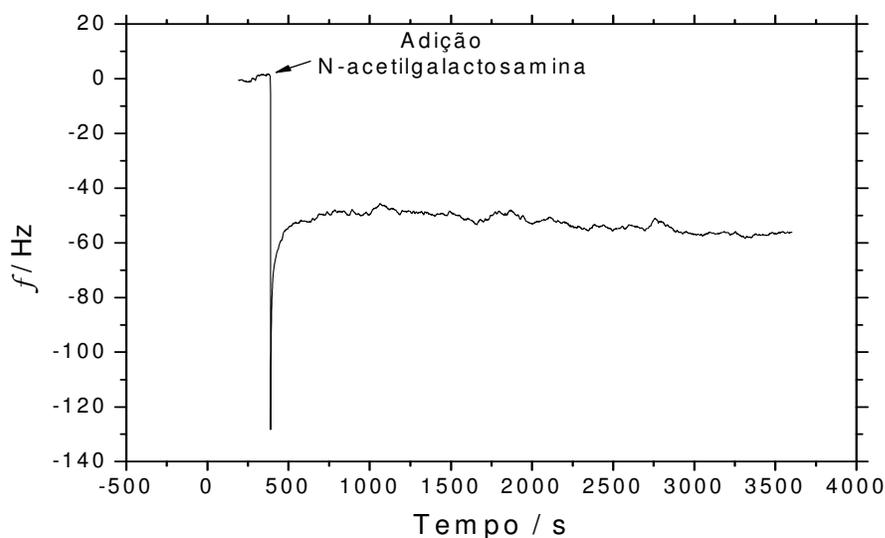


FIGURA 4.21. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para adição uma solução N-acetilgalactosamina ($0,013 \text{ mol. L}^{-1}$) ao cristal de quartzo contendo jacalina (1 mg. mL^{-1}) imobilizada em monocamada. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de; pH 7,4.

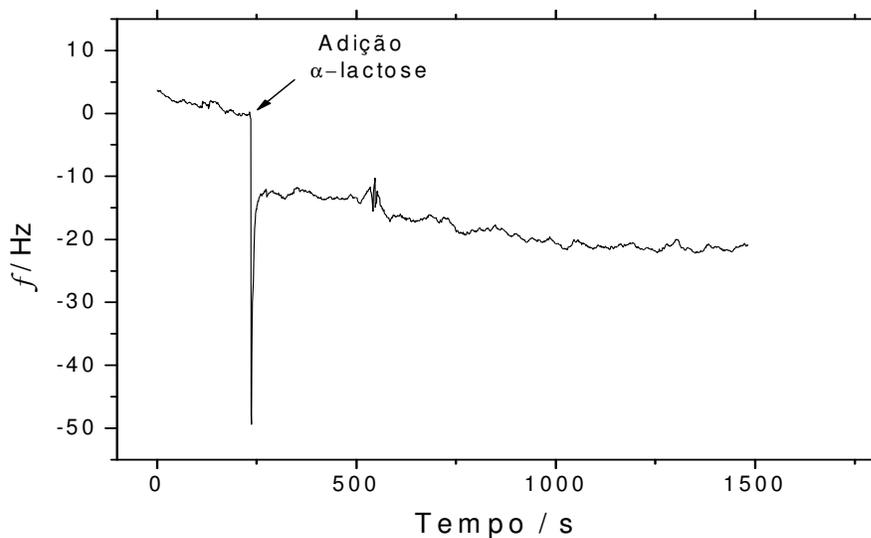


FIGURA 4.22. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para adição uma solução α -lactose ($0,013 \text{ mol. L}^{-1}$) ao cristal de quartzo contendo jacalina (1 mg. mL^{-1}) imobilizada em monocamada. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl; pH 7,4.

A Figura 4.21 apresenta uma variação na frequência de oscilação do cristal de quartzo de aproximadamente 55 Hz, que indica um aumento de massa na superfície do cristal, podendo ser atribuído à interação entre a jacalina e o carboidrato N-acetilgalactosamina. Na Figura 4.22, observa-se uma variação na frequência de oscilação do cristal de 20 Hz. Entretanto, as medidas realizadas com estes carboidratos também apresentaram problemas de repetitividade. Os problemas de sensibilidade e repetitividade destas medidas podem ser atribuídos ao fato de utilizar-se monossacarídeos, ou seja, analitos de baixa massa molecular, dificultando a realização das medidas.

Para evitar estes problemas de repetibilidade das medidas, e sabendo-se que as lectinas apresentam em geral, maior afinidade (maior constante de associação) por polissacarídeos, ou monossacarídeos terminais presentes em glicoconjugados, realizaram-se estudos utilizando-se o glicoconjugado fetuína. O analito foi escolhido com base na especificidade da lectina jacalina por

carboidratos. A fetuína é uma glicoproteína de camundongo, com massa molar de 70 KDa, que possui em sua estrutura oligossacarídeos contendo D-galactose e N-acetilgalactosamina. A Figura 4.23 apresenta a variação de frequência observada ao adicionar-se uma solução de fetuína a jacalina imobilizada em monocamada.

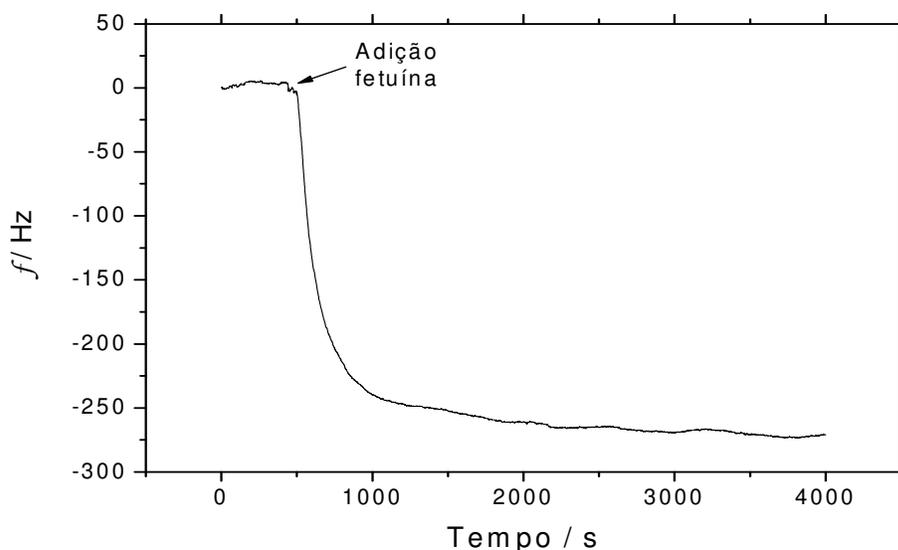


FIGURA 4.23. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para adição uma solução de fetuína ($0,13 \text{ mg. mL}^{-1}$) ao cristal de quartzo contendo jacalina (1 mg. mL^{-1}) imobilizada em monocamada. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl; pH 7,4.

Observa-se, a partir da Figura 4.23, que a adição de fetuína ao eletrodo contendo jacalina imobilizada causou uma grande variação na frequência de oscilação do cristal de quartzo, aproximadamente 300 Hz, o que indica interação entre a jacalina e os grupos D-galactose e N-acetilgalactosamina presentes na fetuína. Para este analito as medidas gravimétricas são mais reprodutíveis, o que se explica pelo fato da fetuína ter massa molar muito superior aos monossacarídeos estudados, facilitando a medida da variação de massa. A partir desses resultados construiu-se uma curva analítica com adições crescentes de

fetuína a jacalina imobilizada em monocamada de cistamina e glutaraldeído, como mostrado na Figura 4.24.

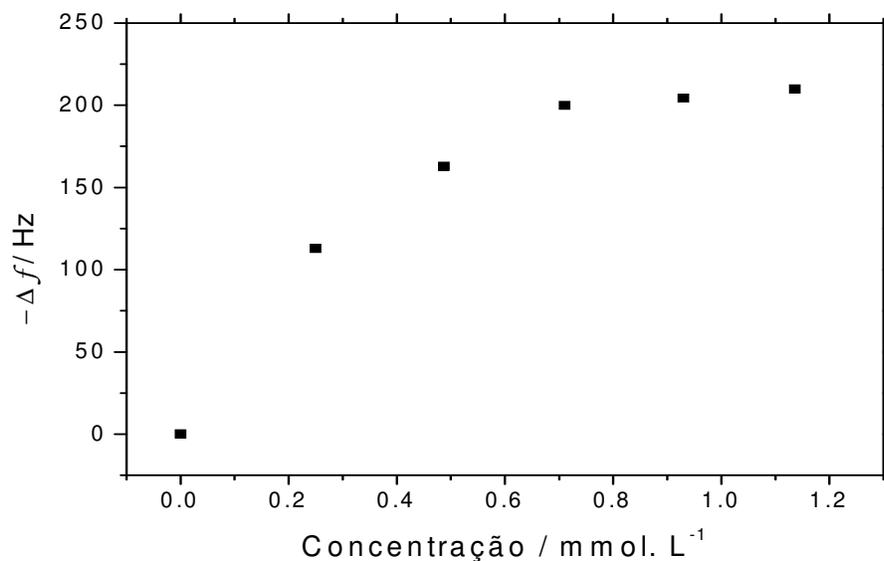


FIGURA 4.24. Curva de calibração para as adições de uma solução de fetuína (10 mg. mL⁻¹) ao cristal de quartzo contendo jacalina (1 mg mL⁻¹) imobilizada em monocamada. Solução tampão fosfato 0,01 mol. L⁻¹ contendo 0,15 mol. L⁻¹ de NaCl; pH 7,4.

Para confirmar que o decréscimo na frequência de oscilação do cristal observado na Figura 4.24 foi causado pela interação entre a lectina e a fetuína, fez-se a adição crescente de uma proteína inerte, albumina de soro bovino (BSA), que não é glicosilada, à jacalina imobilizada em monocamada. A Figura 4.25 apresenta as curvas de calibração para adições de fetuína e BSA à jacalina em um mesmo gráfico para melhor visualização.

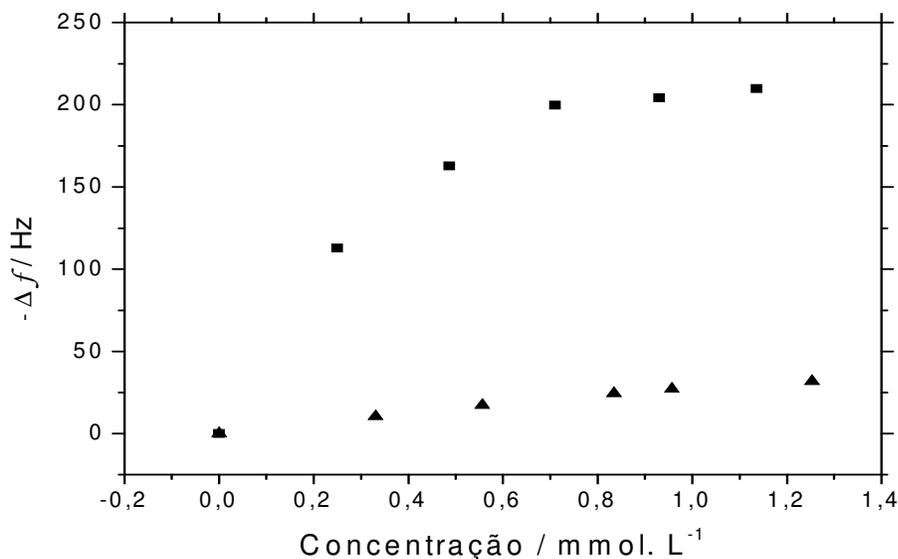


FIGURA 4.25. Curva de calibração para as adições de (■) fetuína (10 mg. mL⁻¹) e (▲) BSA (10 mg. mL⁻¹) ao cristal de quartzo contendo jacalina (1 mg mL⁻¹) imobilizada em monocamada. Solução tampão fosfato 0,01 mol. L⁻¹ contendo 0,15 mol. L⁻¹ de NaCl; pH 7,4.

Analisando a figura 4.25, observamos que não houve decréscimo significativo na frequência de oscilação do cristal de quartzo, quando se adicionou BSA à jacalina imobilizada, indicando que ocorreu interação entre a jacalina e os carboidratos presentes na fetuína. A jacalina não interagiu com BSA já que esta proteína não apresenta carboidratos em sua estrutura. Tal fato confirma a especificidade da interação lectina-glicoconjugado.

Um outro analito pelo qual a jacalina possui afinidade, utilizado neste trabalho, foi a IgA humana. As imunoglobulinas são um grupo de glicoproteínas presentes no soro e nos fluidos orgânicos. A jacalina liga-se especificamente a imunoglobulina A, imunoglobulina que predomina nas secreções do corpo humano²⁸ e apresenta massa molar da ordem de 370 KDa na forma dimérica. A Figura 4.26, apresenta um gráfico da adição de IgA ao cristal contendo a jacalina imobilizada em monocamada.

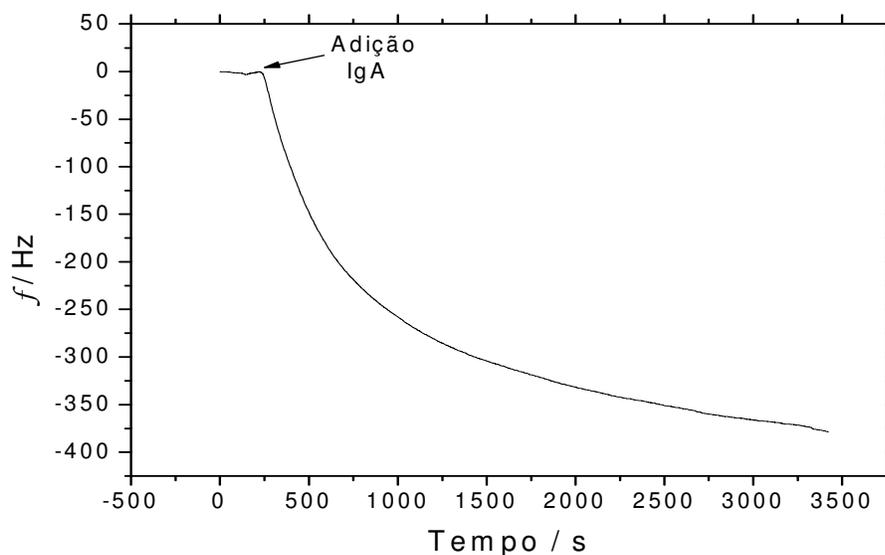


FIGURA 4.26. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para adição uma solução de IgA ($0,20 \text{ mg. mL}^{-1}$) ao cristal de quartzo contendo jacalina (1 mg. mL^{-1}) imobilizada em monocamada. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl; pH 7,4.

Analisando a Figura 4.26 observa-se que adição de uma solução de IgA ao cristal contendo a jacalina imobilizada causou grande decréscimo na frequência de oscilação do cristal de quartzo, aproximadamente 380 Hz. Assim como para fetuína, estas medidas apresentaram grande repetibilidade. Isto também pode ser associado com a alta massa molar da IgA e com o fato, já ressaltado, de lectinas apresentarem maiores constantes de associação com oligossacarídeos. Para a IgA humana, não foram construídas curvas analíticas, pois realizaram-se apenas alguns testes preliminares.

4.5.2. Concanavalina A

Outra lectina estudada foi a concanavalina A (ConA), obtida do feijão-deporco (*canavalia ensiformes*). A ConA é uma metaloproteína, e por isso os experimentos com essa proteína foram realizados em solução tampão fosfato

contendo os íons Ca^{2+} e Mn^{2+} . De acordo com a literatura^{58,59} a ConA consiste de quatro subunidades, cada uma com um CRD que se liga a D-manose e D-glicose. A massa molar de cada subunidade é de 26 KDa. A ConA foi imobilizada utilizando-se o mesmo procedimento com cistamina e glutaraldeído empregado para imobilização da lectina jacalina. As Figuras 4.27 e 4.28 mostram os gráficos de variação na frequência de oscilação do cristal de quartzo quando adicionados D-manose e D-glicose ao cristal contendo a lectina ConA imobilizada.

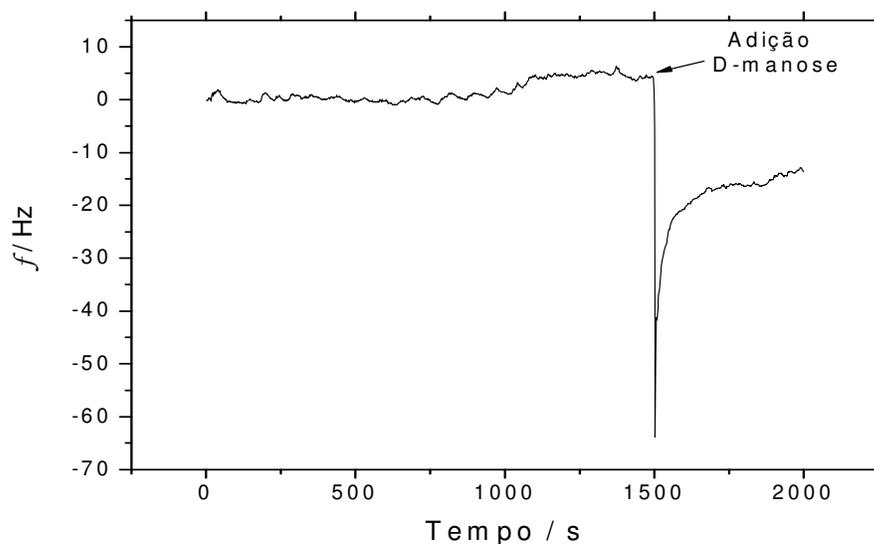


FIGURA 4.27. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para adição uma solução de D-manose ($0,013 \text{ mol. L}^{-1}$) ao cristal de quartzo contendo ConA (1 mg. mL^{-1}) imobilizada em monocamada. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl e $0,015 \text{ mol. L}^{-1}$ de íons Ca^{2+} e Mn^{2+} ; pH 7,4.

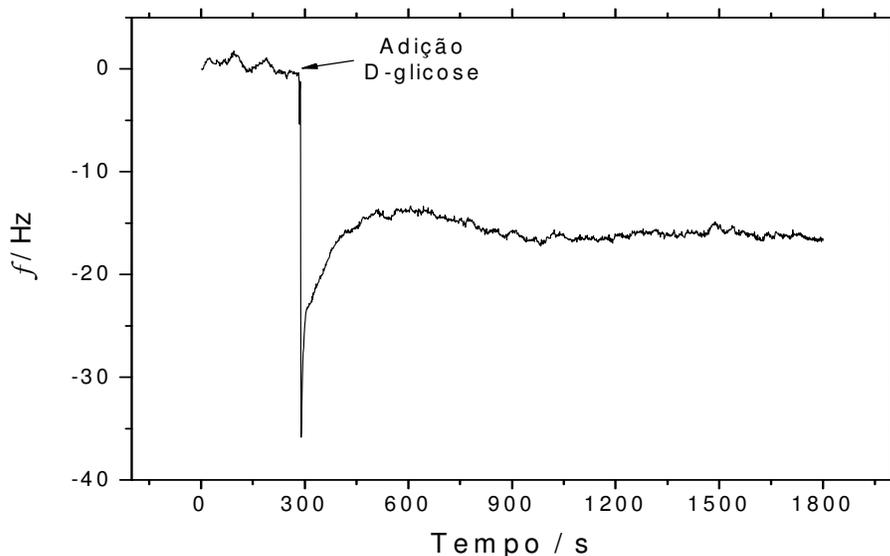


FIGURA 4.28. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para adição uma solução de D-glicose ($0,013 \text{ mol. L}^{-1}$) ao cristal de quartzo contendo ConA (1 mg. mL^{-1}) immobilizada em monocamada. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl e $0,015 \text{ mol. L}^{-1}$ de íons Ca^{2+} e Mn^{2+} ; pH 7,4.

Observou-se nas Figuras 4.27 e 4.28 que as variações de frequência obtidas para adição dos carboidratos D-manose e D-glicose ao cristal contendo a ConA immobilizada foram pequenas, 14 e 16 Hz respectivamente. Além disso, os experimentos utilizando estes monossacarídeos não apresentaram boa repetibilidade. Isto pode estar relacionado com a baixa massa molar dos carboidratos utilizados, dificultando as medidas. Estes baixos valores de variação na frequência de oscilação do cristal de quartzo também podem ser justificados pela baixa constante de afinidade das lectinas por monossacarídeos¹⁵, o que representa uma menor quantidade de açúcares ligados à proteína.

Com o objetivo de melhorar a repetibilidade das medidas, realizou-se um experimento utilizando-se o carboidrato D-maltose. A escolha deste analito deve-se ao fato de que ele é um dissacarídeo, portanto, apresenta massa molar

maior que os carboidratos testados anteriormente e é formado por duas unidades do monossacarídeo D-glicose unidas por uma ligação glicosídica entre C1 (o carbono anomérico) de uma unidade de glicose e C-4 da outra. A Figura 4.29 mostra um gráfico da adição de D-maltose ao cristal piezelétrico contendo a ConA imobilizada.

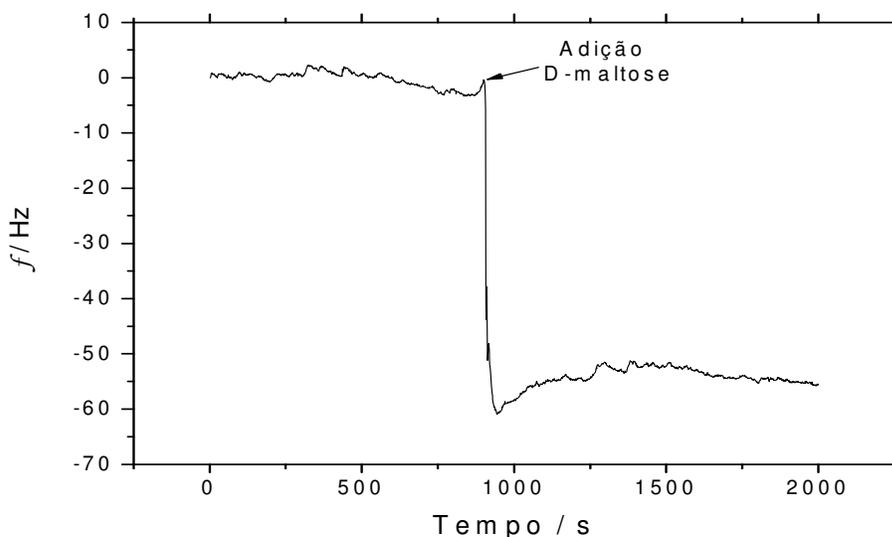


FIGURA 4.29. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para adição uma solução de D-maltose ($0,013 \text{ mol. L}^{-1}$) ao cristal de quartzo contendo ConA (1 mg. mL^{-1}) imobilizada em monocamada. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl e $0,015 \text{ mol. L}^{-1}$ de íons Ca^{2+} e Mn^{2+} ; pH 7,4.

O gráfico acima mostra uma variação na frequência de oscilação do cristal de quartzo de aproximadamente 55 Hz, indicando um aumento de massa na superfície do cristal que pode ser associado à interação entre a lectina e o dissacarídeo D-maltose. Essas medidas apresentaram melhor repetibilidade, sendo possível com isso a construção de uma curva analítica com adições crescentes do carboidrato à proteína imobilizada, mostrado na Figura 4.30.

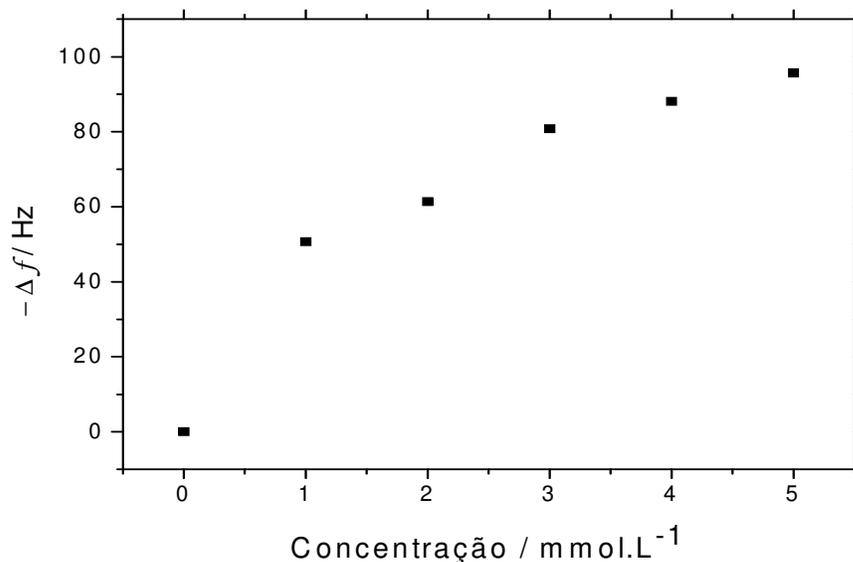


FIGURA 4.30. Curva de calibração para as adições de uma solução de D-maltose ($0,013 \text{ mol. L}^{-1}$) ao cristal de quartzo contendo a ConA (1 mg. mL^{-1}) imobilizada em monocamada. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl e $0,015 \text{ mol. L}^{-1}$ de íons Ca^{2+} e Mn^{2+} ; pH 7,4.

Em alguns artigos encontrados na literatura^{4,50}, a mistura HCl/glicina em baixas concentrações é usada como agente eficiente para remoção de antígeno ligados ao anticorpo no sensor piezelétrico, regenerando-o. Dessa maneira, realizaram-se estudos para testar a regeneração da monocamada contendo a lectina imobilizada, com o objetivo de remoção do açúcar ligado à proteína. Depois de imobilizar a lectina ConA, construiu-se uma curva analítica com adições crescentes do dissacarídeo D-maltose. Em seguida, lavou-se o cristal com a mistura HCl/glicina ambas em uma concentração de 1 mmol. L^{-1} , pH 2,8, e realizaram-se novas adições de maltose ao cristal. Esse procedimento de lavagem foi repetido e uma terceira curva analítica foi construída, como é mostrado na Figura 4.31.

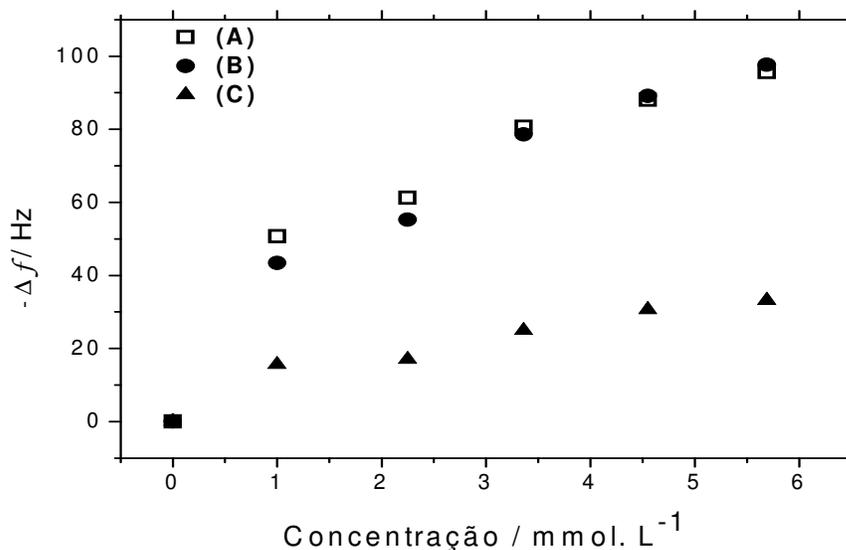


FIGURA 4.31. Curva de calibração para as adições de uma solução de maltose (10 mg. mL^{-1}) ao cristal de quartzo contendo a ConA (1 mg mL^{-1}) imobilizada. (A) curva construída sem lavagem com HCl/glicina; (B) curva construída após lavagem com HCl/glicina; (C) curva construída após 2^a lavagem com HCl/glicina. Solução 1 mmol. L^{-1} de HCl/glicina (pH 2,8). Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl e $0,015 \text{ mol. L}^{-1}$ de íons Ca^{2+} e Mn^{2+} ; pH 7,4.

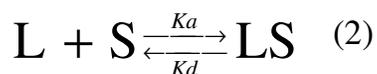
Com base nas curvas analíticas apresentadas na Figura 4.31, observa-se que a adição do açúcar ao cristal contendo a ConA após a lavagem da célula com HCl/glicina (curva B) causou decréscimos na frequência de oscilação do cristal semelhantes aos da curva A cujas adições de açúcar foram feitas sem a lavagem do cristal com ácido. Mudanças no pH do meio podem ter causado a desnaturação da lectina, ocasionando a perda de algumas unidades monoméricas da ConA. A mistura HCl/glicina deve ter removido apenas algumas destas unidades, restando ainda sítios de ligação para interação com o açúcar, o que resultou em curvas de calibração semelhantes (A e B). A segunda lavagem com HCl/glicina foi, provavelmente mais drástica e também por desnaturação a proteína perdeu a sua estrutura tridimensional e, portanto, suas propriedades,

não interagindo mais com o carboidrato, o que justifica as pequenas variações na frequência de oscilação do cristal piezométrico observadas na curva C para adição do dissacarídeo D-maltose.

4.6. Cálculos das constantes de afinidade aparente

As constantes de afinidade aparente (K') da interação lectina-carboidrato foram calculadas utilizando-se o modelo de adsorção de Langmuir^{60,61}. Estas constantes estão relacionadas com a afinidade das lectinas pelos diferentes açúcares estudados⁵¹⁻⁵⁴, sendo que para o cálculo das constantes de afinidade aparente, utilizaram-se as curvas de calibração construídas a partir de adições crescentes de carboidratos às lectinas imobilizadas em monocamada de cistamina e glutaraldeído.

Considerando-se a interação lectina-carboidrato como sendo um equilíbrio reversível entre ligante e substrato, este pode ser descrito de acordo com a seguinte reação:



Onde, L é o ligante e S o substrato e, podemos expressar a constante de equilíbrio, K' , como a relação entre a constante de associação (K_a) e a constante de dissociação (K_d), como mostra a Equação 3.

$$K' = \frac{K_a}{K_d} \quad (3)$$

Podemos, a partir do modelo da isoterma de Langmuir, estabelecer uma relação, entre o número de sítios ocupados e o número total de sítios, θ , como sendo:

$$\theta = \frac{\text{n}^\circ \text{ de sítios de adsorção ocupados}}{\text{n}^\circ \text{ total de sítios de adsorção}} \quad (4)$$

Podemos definir θ como sendo a seguinte relação:

$$\theta = \frac{K'C}{1 + K'C} \quad (5)$$

onde a C é a concentração da ligante adicionado.

É possível substituir θ por:

$$\theta = \frac{\Delta f}{\Delta f_{\max}} \quad (6)$$

onde Δf é a variação de frequência para a adição de uma determinada concentração de ligante no caso o carboidrato e Δf_{\max} representa a variação de frequência máxima e está relacionada ao número de sítios ligantes presentes no substrato no caso a lectina imobilizada.

Substituindo a Equação 5 em 6 e rearranjando-as obtêm-se a seguinte equação:

$$\frac{C}{\Delta f} = \frac{1}{\Delta f_{\max}} C + \frac{1}{\Delta f_{\max} K'} \quad (7)$$

A Equação 7 estabelece uma relação entre variação de frequência (Δf) com a concentração do carboidrato adicionado (C). Um gráfico de $C/\Delta f$ versus C irá fornecer uma reta e da qual se obtém os valores de Δf_{\max} e K' por intermédio dos valores de coeficiente angular e coeficiente linear.

4.6.1. Jacalina

Para a lectina jacalina calculou-se a constante de afinidade aparente, K' , da interação jacalina-fetuína. A partir da curva de calibração construída para jacalina com adições crescentes de fetuína, realizou-se uma regressão linear e com base no gráfico de $C/\Delta f$ em função de C , representado na Figura 4.32, obtiveram-se os valores de Δf_{\max} e K' por meio da Equação 7.

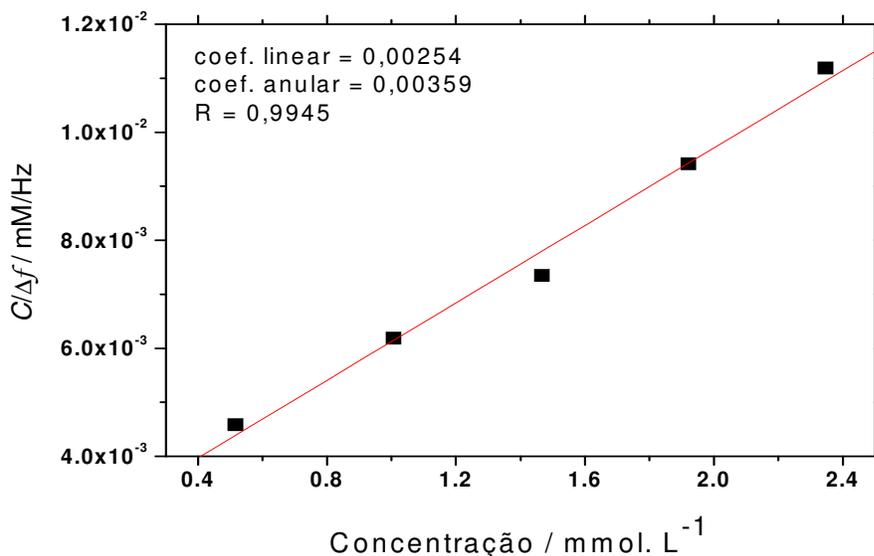


FIGURA 4.32. Isotherma de Langmuir obtida para a adição de fetuína à jacalina imobilizada sobre o cristal de quartzo calculada a partir dos dados da Figura 4.24.

O valor da constante de afinidade aparente, K' , calculado a partir da Figura 4.32, para a interação jacalina-fetuína, foi de $1,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Este valor está relacionado com a afinidade do glicoconjugado fetuína com a lectina jacalina. Quanto maior o valor de K' , maior a afinidade deste carboidrato pela lectina estudada. Segundo SHARON e LIS¹³ as constantes de afinidade das lectinas por polissacarídeos ou glicoconjugados, calculados por meio de diferentes técnicas, apresentam valores da ordem de 10^5 a 10^7 M^{-1} . O valor calculado, utilizando-se a técnica de microbalança de cristal de quartzo, está de

acordo com os valores relatados na literatura⁵¹. Também foram realizados cálculos da constante de afinidade aparente da interação entre a jacalina e o monossacarídeo D-galactose. Os dados utilizados para estes cálculos foram os melhores resultados obtidos para interações das lectinas com monossacarídeos, já que estas medidas não apresentaram boa repetitividade. A curva de calibração utilizada para os cálculos foi realizada por FARIA⁴¹ e é apresentada na Figura 4.33.

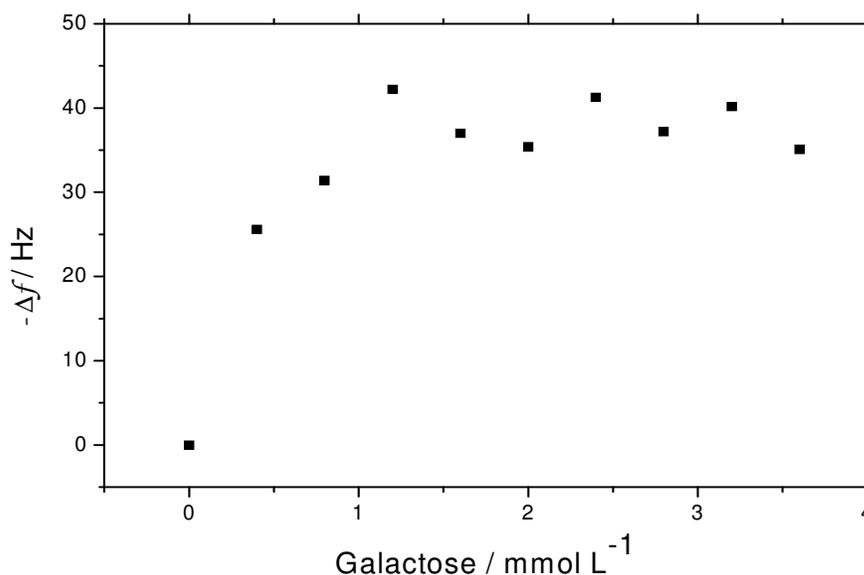


FIGURA 4.33. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função da concentração para as adições de galactose ao cristal contendo jacalina imobilizada em monocamada.

A partir dos dados da curva de calibração apresentada na figura acima, construiu-se um gráfico de $C/\Delta f$ em função de C , representado na Figura 4.34, do qual foi possível extrair os valores de Δf_{\max} e K' a partir dos coeficientes angulares e lineares da Equação 7.

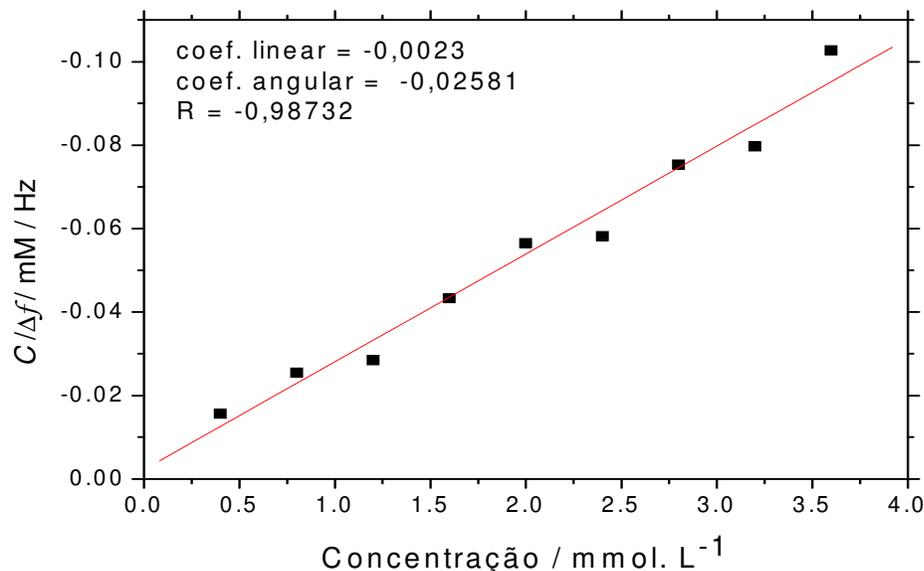


FIGURA 4.34. Isotherma de Langmuir obtida para a adição de D-galactose à jacalina imobilizada sobre o cristal de quartzo calculada a partir dos dados da Figura 4.33.

A curva de calibração e os cálculos das constantes de afinidade aparente para a interação do monossacarídeo com a jacalina foram realizados objetivando comparar as constantes de afinidade obtidas com as encontradas na literatura. De acordo com SHARON e LIS, a interação das lectinas com monossacarídeos apresentam constantes de afinidade da ordem de 10^3 a 10^4 M⁻¹. Os cálculos realizados a partir da curva de calibração apresentada na Figura 4.32, forneceram uma constante de afinidade aparente de $9,4 \times 10^3$ M⁻¹, concordando com os valores encontrados na literatura.

4.6.2. Concanavalina A

Para a lectina ConA calculou-se a constante de afinidade aparente, K' , da interação desta com a D-maltose. Com os dados da curva de calibração construída a partir da adição de diferentes concentrações de D-maltose ao cristal

contendo a ConA immobilizada em monocamada, Figura 4.30, construiu-se um gráfico de $C/\Delta f$ em função de C , apresentado na Figura 4.35.

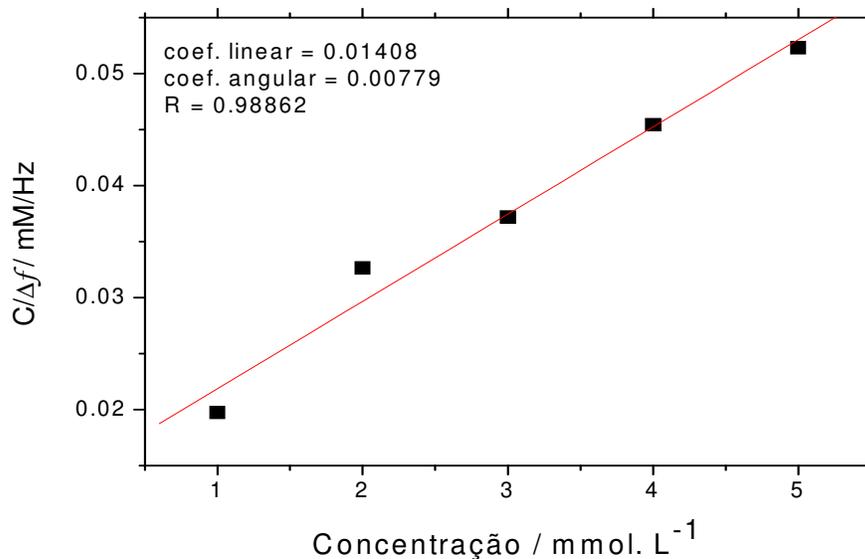


FIGURA 4.35. Isoterma de Langmuir obtida para a adição de D-maltose à ConA immobilizada sobre o cristal de quartzo calculada a partir dos dados da Figura 4.30.

A partir da Figura 4.35, calcularam-se os parâmetros Δf_{\max} e K' , de acordo com a Equação 7. A constante de afinidade aparente obtida para a interação entre o carboidrato D-maltose e a lectina ConA foi de $5.6 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, o que também está de acordo com os valores encontrados na literatura⁵¹.

Foram realizados cálculos das constantes de afinidade aparente para as curvas de calibração do dissacarídeo D-maltose adicionado ao cristal contendo ConA immobilizada apresentadas na Figura 4.31. Neste estudo, o cristal com a ConA foi reutilizado após lavagem com solução de HCl/glicina. Os valores das constantes obtidas estão apresentados na Tabela 4.3.

TABELA 4.3. Constantes de afinidade aparente para a interação entre D-maltose e a ConA imobilizada.

K' (M^{-1})	K' (M^{-1})	K' (M^{-1})
Curva A	Curva B	Curva C
$1,99 \cdot 10^2$	$1,22 \cdot 10^2$	$1,10 \cdot 10^2$

O que se observa na tabela é que não houve variação significativa na constante de afinidade da lectina pelo carboidrato. Portanto, mesmo que a lavagem do cristal com a mistura HCl/glicina tenha levado a uma diminuição acentuada na resposta do sistema a constante aparente obtida em todas as respostas foi semelhante. Isto é um indicativo de que a resposta observada quando adicionado D-maltose à lectina, deve-se unicamente a presença da ConA ativa na superfície do cristal.

Em todos os cálculos das constantes de afinidade aparente efetuados para ambas lectinas, jacalina e concanvalina A, observou-se que estes valores encontram-se na mesma ordem de magnitude da literatura, que foram obtidos por diferentes metodologias, como cromatografia de afinidade⁶², análise por fluorescência⁶³ e ressonância de plasma de superfície⁵¹.

4.7. Multicamadas utilizando cistamina e glutaraldeído

Com objetivo de melhorar a repetibilidade das medidas realizadas com os monossacarídeos estudados para as lectinas, utilizou-se um método de imobilização construindo-se multicamadas de glutaraldeído e lectina. Após imobilizar a lectina em monocamada de cistamina e glutaraldeído, fez-se novamente adição de glutaraldeído sobre a lectina e posterior adição de lectina ao glutaraldeído. Este procedimento foi realizado várias vezes, tendo como resultado várias camadas de proteína ancorada ao glutaraldeído, como mostrado na Figura 4.36.

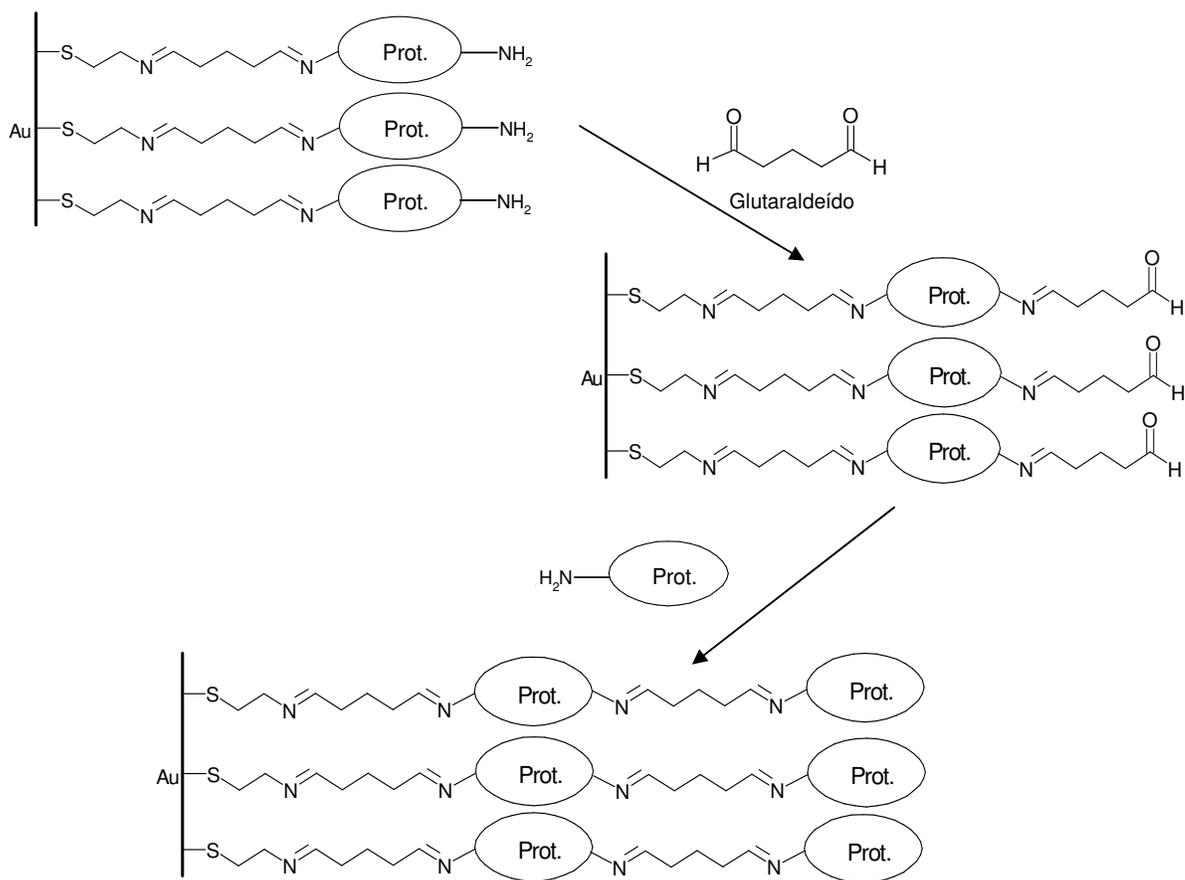


FIGURA 4.36. Etapas de imobilização da lectina utilizando-se o método de multicamadas.

Este método de imobilização foi utilizado para as lectinas jacalina e concanavalina A, e os resultados serão descritos nos itens seguintes.

4.7.1. Jacalina

O analito estudado para a jacalina imobilizada pelo método das multicamadas foi o monossacarídeo D-galactose, mostrado na Figura 4.37.

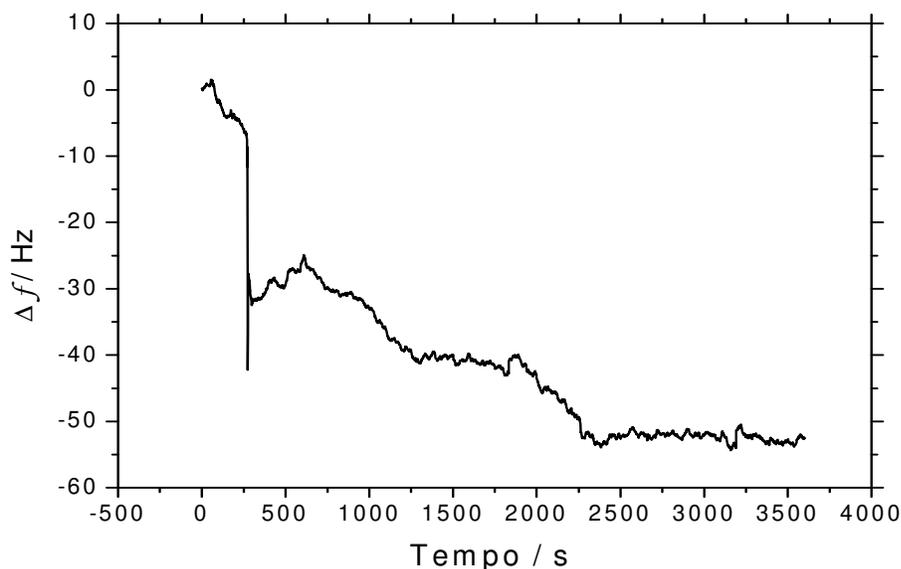


FIGURA 4.37. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para adição uma solução de D-galactose ($0,013 \text{ mol. L}^{-1}$) ao cristal de quartzo contendo jacalina (1 mg. mL^{-1}) imobilizada em multicamadas. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl; pH 7,4.

A adição do monossacarídeo D-galactose ao cristal contendo a jacalina imobilizada causou decréscimo na frequência de oscilação do cristal, indicando a interação entre a proteína e o carboidrato. Os sinais de frequência observados no método de imobilização por meio das multicamadas foram semelhantes aos observados quando a proteína foi imobilizada em uma monocamada de cistamina e glutaraldeído (Figura 4.18). A repetibilidade das medidas melhorou quando se utilizou o monossacarídeo galactose como analito. Entretanto, ao utilizar-se o método das multicamadas cria-se uma rede de proteínas e, apesar de aumentarmos o número de sítios de ligação para o carboidrato, por impedimento estérico, os analitos com massas molares maiores, fetuína e IgA, podem interagir apenas com os sítios ligantes da lectina localizados na superfície.

4.7.2. Concanavalina A

O analito estudado para a ConA, imobilizada pelo método das multicamadas, foi o dissacarídeo D-maltose, e o gráfico da variação na frequência de oscilação do cristal em função do tempo é mostrado na Figura 4.38.

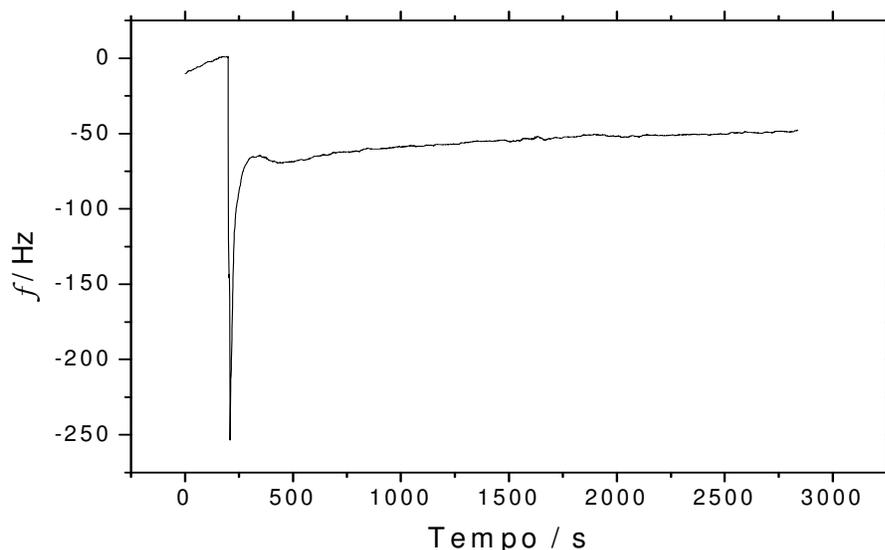


FIGURA 4.38. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para adição uma solução de D-maltose ($0,013 \text{ mol. L}^{-1}$) ao cristal de quartzo contendo ConA (1 mg. mL^{-1}) imobilizada em multicamadas. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl e $0,015 \text{ mol. L}^{-1}$ de íons Ca^{2+} e Mn^{2+} ; pH 7,4.

Utilizando-se o método de imobilização da lectina por meio da formação de multicamadas os valores de variação de frequência de oscilação do cristal de quartzo com a adição de D-maltose à ConA imobilizada foram semelhantes aos encontrados para adições utilizando-se apenas uma camada da proteína, aproximadamente 55 Hz (Figura 4.29).

Por este motivo, utilizou-se o método de imobilização com apenas uma camada da proteína pela facilidade no preparo e pelo baixo consumo de reagentes.

4.8. Estudo das monocamadas auto-organizadas pelo método de ativação com EDC/NHS

Um outro método utilizado para imobilização covalente de jacalina e de concanavalina A, por meio das monocamadas auto-organizadas, foi a modificação da superfície do cristal de quartzo utilizando-se os reagentes ácido 11-mercaptoundecanóico e 2-mercaptoetanol, na proporção de 1:10. A superfície modificada com os tióis foi ativada com N-etil N-dimetilpropil carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) para o acoplamento da proteína com o tiol de cadeia longa imobilizado sobre o cristal de quartzo^{1,64}. Os reagentes EDC e NHS convertem o ácido carboxílico em um intermediário reativo o qual torna-se mais susceptível a interação com os grupos amina presentes na proteína. A Figura 4.39 mostra um diagrama esquemático do procedimento de imobilização.

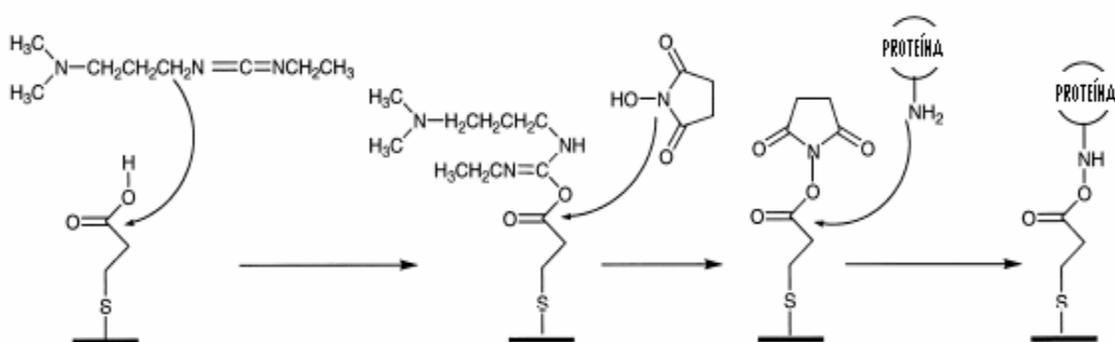


FIGURA 4.39. Diagrama esquemático das etapas de imobilização dos tióis sobre a superfície do cristal de quartzo e posterior ativação com os reagentes EDC/NHS. Adaptado de GOODING e HIBBERT¹.

Para bloqueio dos sítios não específicos de ligação utilizou-se a proteína albumina de soro bovino, adicionada após a imobilização da lectina. A Figura 4.40 mostra um gráfico de variação da frequência em função do tempo para adição de jacalina ao cristal de quartzo contendo a mistura de tióis imobilizada.

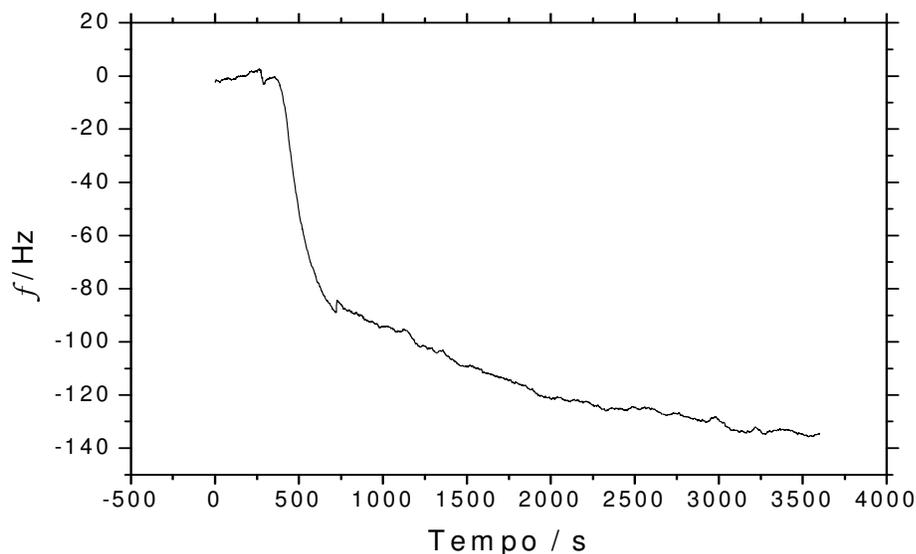


FIGURA 4.40. Variação de frequência em função do tempo para adição de uma solução de jacalina (1 mg mL^{-1}) ao cristal de quartzo contendo a mistura de tióis imobilizada. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl; pH 7,4.

Analisando a Figura 4.40 observa-se que a adição de uma solução de jacalina ao cristal contendo os tióis imobilizados, ativados com a mistura EDC/NHS, causou um decréscimo na frequência de oscilação do cristal indicando um aumento de massa na superfície do mesmo, que pode ser associado à interação entre a jacalina e o ácido 11-mercaptoundecanóico. Após imobilização da lectina, realizou-se a adição do glicoconjugado fetuína ao cristal contendo a jacalina imobilizada que é mostrado na Figura 4.41.

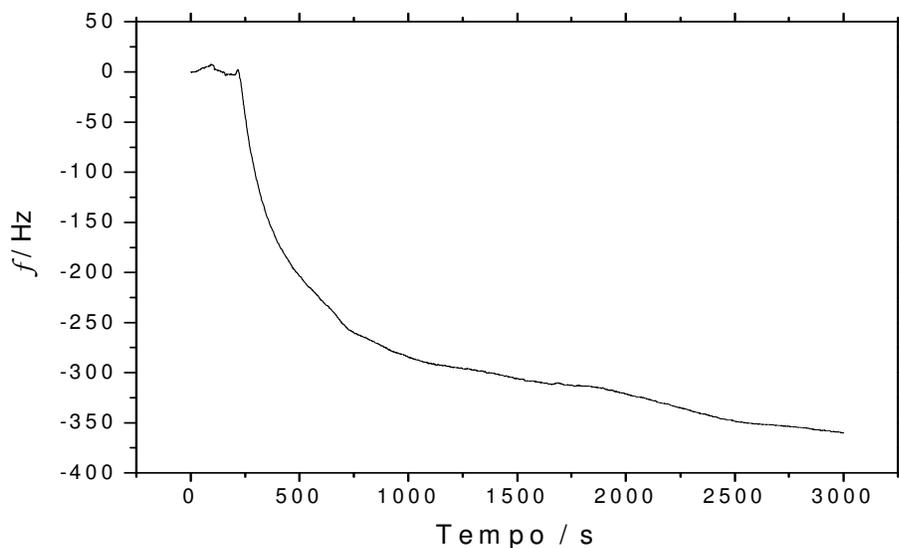


FIGURA 4.41. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para adição uma solução de fetuína ($0,13 \text{ mg. mL}^{-1}$) ao cristal contendo jacalina (1 mg. mL^{-1}) imobilizada sobre o ácido 11-mercaptoundecanóico. Solução tampão fosfato $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$, contendo $0,15 \text{ mol. L}^{-1}$ de NaCl; pH 7,4.

A adição de fetuína ao cristal contendo jacalina imobilizada sobre o ácido 11-mercaptoundecanóico, apresentou um decréscimo na frequência de oscilação do cristal de aproximadamente 360 Hz. Este valor é semelhante ao encontrado para adição de fetuína a jacalina imobilizada sobre uma monocamada de cistamina e glutaraldeído que foi de 330 Hz, apresentados no item 4.5.1 (Figura 4.23).

Os resultados obtidos por este método de imobilização são oriundos de alguns testes realizados para avaliar a viabilidade do uso das monocamadas auto-organizadas pelo método de ativação com EDC/NHS em substituição aos reagentes cistamina e glutaraldeído. Entretanto, apesar do glutaraldeído apresentar capacidade de polimerizar-se, sendo este um dos motivos da sua substituição, os resultados apresentados mostraram que a imobilização das lectinas e o estudo das interações moleculares destas com glicanas apresentou

resultados concordantes com os encontrados na literatura utilizando-se diferentes reagentes.

CONCLUSÕES

5. Conclusões

O trabalho teve como objetivo o estudo das interações moleculares estabelecidas entre proteínas da classe das lectinas com glicanas, utilizando-se a técnica de microbalança de cristal de quartzo. Foram realizados experimentos visando análise das etapas de imobilização das lectinas, com os reagentes cistamina e glutaraldeído, e a influência do processo de imobilização nas interações moleculares, utilizando-se as técnicas de QCM, AE e QCM com injeção da amostra por meio de um sistema em fluxo.

No estudo da formação da monocamada de cistamina observou-se que os valores de variação de frequência obtidos com a técnica de QCM, sem a lavagem da célula, não representavam a massa real de cistamina adsorvida sobre a superfície do cristal. As técnicas de admitância eletroacústica e a microbalança de cristal de quartzo aliada a um sistema de injeção em fluxo, mostraram que as moléculas de cistamina que não foram imobilizadas covalentemente sobre o cristal de quartzo, devido às interações não específicas, são removidas com a lavagem do sistema e o valor final da variação de frequência corresponde à quantidade de cistamina que efetivamente foi imobilizada sobre a superfície do cristal. No entanto, ambas as técnicas, AE e QCM, confirmaram que uma concentração de cistamina de 15 mmol. L⁻¹ apresentou, mesmo após a lavagem, o maior decréscimo na frequência de oscilação do cristal, indicando melhor recobrimento da superfície pelas moléculas de cistamina, com melhor repetibilidade.

Ao contrário do que foi observado durante a imobilização da cistamina, os valores de frequência obtidos antes e depois da lavagem da célula contendo a lectina imobilizada não apresentaram diferenças significativas. Com base nestes resultados podemos concluir que todo sinal de frequência observado para adição da lectina, utilizando a técnica de QCM ou AE, está associado com aumento de

massa devido a interações específicas entre a proteína e o glutaraldeído imobilizado sobre a superfície do cristal.

No estudo das interações entre as lectinas e seus ligantes também se utilizou a QCM com um sistema de injeção em fluxo. No entanto, para a interação jacalina-fetuína, as variações de frequência de oscilação do cristal obtidas foram semelhantes tanto no sistema estático como no sistema em fluxo. Desta forma, o uso da técnica de QCM sem o sistema em fluxo no estudo das interações entre as lectinas e seus ligantes mostrou-se viável, uma vez que não se observaram interações não específicas.

A técnica de QCM também apresentou vantagens quando comparada à técnica de SPR no estudo das interações entre as lectinas e carboidratos de baixa massa molar.

As monocamadas auto-organizadas utilizando cistamina e glutaraldeído mostraram-se eficientes para imobilização das lectinas e estudo das interações destas com carboidratos, com baixo consumo de reagentes, facilidade no preparo e possibilidade de construir filmes de espessura fina.

Utilizando-se o modelo de adsorção de Langmuir foi possível calcular os valores das constantes de afinidade para ambas as lectinas frente a diferentes ligantes. Os valores encontrados são da mesma ordem de grandeza daqueles encontrados na literatura utilizando-se diferentes metodologias. As constantes de afinidade aparente calculadas por meio da técnica de microbalança de cristal de quartzo são um forte indicativo de que a utilização da técnica é viável para o estudo de interações do tipo receptor-ligante, lectina-carboidrato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. Referências Bibliográficas

1. GOODING, J.J. & HIBBERT, D.B., "The application of alkanethiol self-assembled monolayers to enzyme electrodes". *Trends Anal. Chem.* **18**(8) 1999.
2. STRYER, L., *Bioquímica*. 4 ed. 1996: Guanabara Koogan.
3. LIU, Y.; ZHANG, W.; YU, X.; ZHANG, H.; ZHAO, R.; SHANGGUAN, D.; LI, Y.; SHEN, B. & LIU, G., "Quartz crystal biosensor for real-time kinetic analysis interaction between human TNF- α and monoclonal antibodies". *Sens. Actuators, B.* **99**: 416, 2004.
4. LIU, Y.; YU, X.; ZHAO, R.; SHAGGUAN, D.H.; BO, Z. & LIU, G., "Quartz crystal biosensor for real-time monitoring of molecular recognition between protein and small molecular medicinal agents". *Biosens. Bioelectron.* **19**(9): 325, 2003.
5. O'SULLIVAN, C.K. & GUILBAULT, G.G., "Commercial quartz crystal microbalances - theory and applications". *Biosens. Bioelectron.* **14**: 663, 1999.
6. TZONG-ZENG, W.; CHIH-CHENG, S.; LI-KUANG, C.; HUI-HUA, Y.; DAR-FU, T. & KOU-CHENG, P., *Biosens. Bioelectron.* **21**: 689, 2005.
7. GUILBAULT, G.G.; HOCK, B. & SCHMID, R., "A piezoelectric immunobiosensor for atrazine in drinking water". *Biosens. Bioelectron.* **7**: 411, 1992.
8. KOBLINGER, C.; DROST, S.; ALBERT, F.; WOLF, S.; KOCK, S. & WOIAS, P., "A quartz crystal biosensor for measurement in liquids". *Biosens. Bioelectron.* **7**: 397, 1992.
9. BERTOZZI, C.R. & KIESSLING, L.L., "Chemical glycobiology". *Sci.* **291**(5512): 2357, 2001.

10. PANUNTO-CASTELO, A.; SOUZA, M.A.; ROQUE-BARREIRA, M.C. & SILVA, J.S., "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". *Glycobiol.* **12**: 1035, 2001.
11. WANG, T.B.H.; NG, T.B.; OOI, V.E.C. & LIU, W.K., "Effects of lectins with different carbohydrate-binding specificities on hepatoma, choriocarcinoma, melanoma and osteosarcoma cell lines". *Inter. J. Biochem. Cell Biol.* **32**: 365, 2000.
12. FRANZ, H., "The ricin story". *Adv. Lectin Res.* **1**: 10, 1988.
13. SHARON, N. & LIS, H., *Lectins*. 2a ed ed. 2003: Kluwer Academic Publishers. 31.
14. PEUMANS, L.J. & VAN DAMME, E.J.M., "Lectins as plant defense proteins". *Plant Physiol.* **109**: 347, 1995.
15. LIS, H. & SHARON, N., "Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition". *Chem. Rev.* **98**: 637, 1998.
16. VOZÁRI-HAMPE, M.M.; VIEGAS, C.; SAUCEDO, C.; ROSSETO, S.; MANICA, G.G. & HAMPE, O.G., "A lectin from *Sechium edule* fruit exudate". *Phytochemistry (Elsevier)*. **31**(35): 1477, 1992.
17. KENNEDY, J.F.; PALVA, P.M.G.; CORRELA, M.T.S.; CAVALCANTI, M.S.M. & COELHO, L.C.B.B., "Lectins, versatile proteins of recognition: a review ". *Carbohydr. Polym.* **26**: 219, 1995.
18. MODY, R.; JOSHI, S. & CHANEY, W., "Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer". *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* **33**: 1, 1995.
19. SILVA, M.R. & DA SILVA, M.A.A.P., "Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas". *Revista Nutrição.* **13**(1): 3, 2000.

20. JEYAPRAKASH, A.A.; KATIYAR, S.; SWAMINATHAN, C.P.; SEKAR, K.; SUROLIA, A. & VIJAYAN, M., "Structural basis of the carbohydrate specificities of jacalin: an x-ray and modeling study". *J. Mol. Biol.* **332**: 217, 2003.
21. SAHASRABUDDHE, A.A.; GAIKWAD, S.M.; KRISHNASASTRY, M.V. & KHAN, M.I., "Studies on recombinant single chain Jacalin lectin reveal reduced affinity for saccharides despite normal folding like native Jacalin". *Protein Sci.* **13**: 3264, 2004.
22. RUDIGER, H. & GABIUS, H.J., "Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications". *Glycoconjugate J.* **18**: 589, 2001.
23. VAN DAMME, E.J.; PEUMANS, W.J.; PUSZTAI, A. & BARDOCZ, S., *Handbook of plant lectins: properties and biological applications*. 1998: Chichester, UK.
24. PEUMANS, W.J. & VAN DAMME, E.J.M., "Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods". *Trends Food Sci. Technol.* **7**: 132, 1996.
25. WU, A.M.; WU, J.H.; LIN, L.H.; LIN, S.H. & LIU, J.H., "Binding profile of *Artocarpus integrifolia* agglutinin (Jacalin)". *Life Sci. Res. Rep.* **72**: 2285, 2003.
26. BUNN-MORENO, M.M. & CAMPOS-NETO, A., "Lectin(s) extracted from seeds of *Artocarpus integrifolia* (jackfruit): potent and selective stimulator(s) of distinct human T and B cell functions". *J. Immunol.* **127**: 427, 1981.
27. KABIR, S., "Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research". *J. Immunol. Methods.* **212**: 193, 1998.
28. ROQUE-BARREIRA, M.C. & CAMPOS-NETO, A., "Jacalin: An IgA-binding lectin". *J. Immunol.* **134**(3): 1740, 1985.

29. KONDOH, H.; KOBAYASHI, K.; HAGIWARA, K. & KAJII, T., "Jacalina, a jackfruit lectin, precipitates IgA1 but not IgA2 subclass on gel diffusion reaction". *J. Immunol. Methods*. **88**: 171, 1986.
30. CORBEAU, P.; PASQUALI, J.L. & DEVAUX, C., "Jacalin, a lectin interacting with O-linked sugars and mediating protection of CD4⁺ cells against HIV-1, binds to the external envelope glycoprotein gp120". *Immunol. Lett.* **47**: 141, 1995.
31. HORTIN, G.L. & TRIMPE, B.L., "Lectin affinity chromatography of proteins bearing O-linked oligosaccharides: application of jacalin agarose". *Anal. Biochem.* **188**: 271, 1990.
32. SUMMER, J.B. & HOWELL, S.F., "The identification of the hemagglutinin of the Jack bean with concanavalin A". *J. Bacteriol Virol.* **32**: 227, 1936.
33. VAN DAMME, E.J.; PEUMANS, L.J.; BARRE, A. & ROUGÉ, P., "Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles". *Crit Rev Plant Sci.* **17**(6): 575, 1998.
34. HILDEGRAND, A.; SCHAEDELICH, A.; ROTHE, U. & NEUBERT, R., "Sensing Specific Adhesion of Liposomal and Micellar Systems with Attached Carbohydrate Recognition Structures at Lectin Surfaces". *J. Colloid Interface Sci.* **249**: 274, 2002.
35. ROSATTO, S.S.; FREIRE, R.S.; DURÁN, N. & KUBOTA, L.T., "Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental". *Quim. Nova.* **24**(1): 77, 2001.
36. FATIBELLO-FILHO, O. & CAPELATO, M.D., "Biossensores". *Quim. Nova.* **15**(1): 85, 1992.
37. BUNDE, R.L.; JARVI, E.J. & ROSENRETER, J.J., "Piezoelectric quartz crystal biosensors". *Talanta.* **46**: 1223, 1998.

38. CARVALHO, R.M.; RATH, S. & KUBOTA, L.T., "SPR - Uma nova ferramenta para biossensores ". *Quim. Nova.* **26**(1): 97, 2003.
39. DUVERGER, E.; FRISON, N.; ROCHE, A.C. & MONSIGNY, M., "Carbohydrate-lectin interactions assessed by surface plasmon resonance". *Biochimie (Paris)*. **85**: 167, 2003.
40. SAUERBREY, G., "Verwendung von schwingquarzen zur wagung dunner schichten und zur mikrowagung". *Z. Phys.* **155**: 206, 1959.
41. FARIA, R.C., *Desenvolvimento de instrumentação em microbalança de cristal de quartzo para aplicações em eletroanalítica e biossensores*, in *Programa de Pós-Graduação em Química 2000*, UFSCar: São Carlos. p. 125p.
42. ANDRADE, J.F.; FATIBELLO - FILHO, O.; NETO, G.O. & GUILBAULT, G.G., "Aplicações analíticas dos cristais piezelétricos". *Quim. Nova.* **14**(4): 21, 1991.
43. RUYS, D.P.; ANDRADE, J.F. & GUIMARÃES, O.M., "Mercury detection in air a coated piezoeletric sensor". *Anal. Chim. Acta.* **404**: 95, 2000.
44. MANGANIELLO, L.; RÍOS, A. & VALCÁRCEL, M., "Automatic determination of fat in milk by use of a flow injection system with a piezoeltric detector". *Anal. Chim. Acta.* **406**: 309, 2000.
45. FREIRE, R.S.; PESSOA, C.A. & KUBOTA, L.T., "Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos". *Quim. Nova.* **26**(3): 381, 2003.
46. CHAKI, N.K. & VIJAYAMOHANAN, K., "Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications". *Biosens. Bioelectron.* **17**: 1, 2002.
47. WINK, T.; VAN ZUILEN, S.J.; BULT, A. & VAN BENNEKOM, W.P., "Self-assembled monolayers for biosensors". *Analyst.* **122**: 43R, 1997.

48. HE, P.G.; YE, J.N.; FANG, Y.Z.; ANZAI, J. & OSA, T., "Self-assembled biotinylated disulfide derivative monolayer on gold electrode for immobilizing enzymes". *Talanta*. **44**: 885, 1997.
49. COHEN, Y.; LEVI, S.; RUBIN, S. & WILLNER, I., "Modified monolayer electrodes for electrochemical and piezoelectric analysis of substrate-receptor interactions: novel immunosensor electrodes". *J. Electroanal. Chem.* **417**: 65, 1996.
50. LEE, Y.G. & CHANG, K.S., "Application of a flow type quartz crystal microbalance immunosensor for real time determination of cattle bovine ephemeral fever virus in liquid". *Talanta*. **65**: 1335, 2005.
51. ZHANG, Y.; LUO, S.; TANG, Y.; YU, L.; HOU, K.Y.; CHENG, J.P.; ZENG, X. & WANG, P.G., "Carbohydrate-protein interactions by "clicked" carbohydrate self-assembled monolayers". *Anal. Chem.* **78**: 2001, 2006.
52. EBARA, Y. & OKAHATA, Y., "A kinetic study of concanavalin A binding to glycolipid monolayers by using a quartz-crystal microbalance". *J. Am. Chem. Soc.* **116**(25): 1119, 1994.
53. CHO, Y.-K.; KIM, S.; KIM, Y.A.; LIM, H.K.; LEE, K.; YOON, D.; LIM, G.; PAK, Y.E.; HA, T.H. & KIM, K., "Characterization of DNA immobilization and subsequent hybridization using in situ quartz crystal microbalance, fluorescence spectroscopy, and surface plasmon resonance". *J. Colloid Interface Sci.* **278**(1): 44, 2004.
54. PEI, Z.; ANDERSON, H.; AASTRUP, T. & RAMSTROM, O., "Study of real-time lectin-carbohydrate interactions on the surface of a quartz crystal microbalance". *Biosens. Bioelectron.* **21**: 60, 2005.
55. BAIN, C.D.; EVALL, J. & WHITESIDES, G.M., "Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: variation in the head group, tail group, and solvent". *J. Am. Chem. Soc.* **111**: 7155, 1989.
56. TLILI, A.; ABDELGHANI, A.; HLELI, S. & MAAREF, M.A., "Electrical characterization of a thiol SAM o gold as a first step for the fabrication

- of immunosensors based on a quartz crystal microbalance". *Sensors*. **4**: 105, 2004.
57. ROQUE-BARREIRA, M.C.; PRAZ, F.; HALBWACHESNECARELLI, L.; CAMPOS-NETO, A. & GREENE, L.J., "IgA-affinity purification and characterization of the lectin jacalin". *Braz. J. Med. Biol. Res.* **19**(2): 149, 1986.
58. SUGAWARA, K.; SHIOTORI, T.; HIRABAYASHI, G.; KURAMITZ, H. & TANAKA, S., "Voltammetric evaluation of lectin-sugar binding at a mannose/thionine-modified Au electrode". *J. Electroanal. Chem.* **568**: 7, 2004.
59. CHATTERJEE, A. & MANDAL, D.K., "Quaternary association and reactivation of dimeric concanavalin A". *Int. J. Biol. Macromol.* **35**: 103, 2005.
60. ATKINS, P.W., *Physical Chemistry*. 2a ed. International Student Edition. 1994: Oxford University Press.
61. ADAMSON, A.W. & GAST, A.P., *Physical chemistry of surfaces*. 6 ed. 1997: John Wiley & Sons p.625.
62. SHIMURA, K. & KASAI, K., "Determination of the Affinity Constants of Concanavalin A for Monosaccharides by Fluorescence Affinity Probe Capillary Electrophoresis". *Anal. Biochem.* **227**(1): 186, 1995.
63. MAHANTA, S.K.; SASTRY, M.V.K. & SUROLIA, A., "Topography of the Combining Region of a Thomsen-Friedenreich-Antigen-Specific Lectin Jacalin (*Artocarpus-Integrifolia* Agglutinin) - a Thermodynamic and Circular-Dichroism Spectroscopic Study". *Biochem. J.* **265**(3): 831, 1990.
64. WISSINK, M.J.B.; BEERNINK, R.; PIEPER, J.S.; POOT, A.A.; ENGBERS, G.H.M.; BEUGELING, T.; VAN AKEN, W.G. & FEIJEN, J., "Immobilization of heparin to EDC/NHS-crosslinked collagen. Characterization and vitro evaluation". *Biomaterials*. **22**: 151, 2001.