



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

FRANCISCO ALEKSON CHAVES NOBREGA

**BIOSENSOR IMPEDIMÉTRICO CONTENDO A LECTINA CONBR PARA
DETECÇÃO DE CARBOIDRATOS**

FORTALEZA

2019

FRANCISCO ALEKSON CHAVES NOBREGA

BIOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO CONTENDO A LECTINA CONBR PARA DETECÇÃO
DE CARBOIDRATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química.

Orientador: Prof. Dr. Tércio de Freitas Paulo.
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Izaura Cirino Nogueira Diógenes.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- N675b Nobrega, Francisco Alekson Chaves.
Biossensor impedimétrico contendo a lectina ConBr para detecção de carboidratos /
Francisco Alekson Chaves Nobrega. – 2019.
78 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-
Graduação em Química, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Tércio de Freitas Paulo.
Coorientação: Profa. Dra. Izaura Cirino Nogueira
Diógenes.
1. Lectina ConBr. 2. Biossensor. 3. Impedância eletroquímica. 4. Manose. 5. Glicose. I. Título.
CDD 540
-

FRANCISCO ALEKSON CHAVES NOBREGA

BIOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO CONTENDO A LECTINA CONBR PARA DETECÇÃO
DE CARBOIDRATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Tércio de Freitas Paulo (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Paulo Naftali da Silva Casciano
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Idalina Maria Moreira de Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

In memoriam aos meus pais, Francisco
Dulcimar Medeiros Nobrega e Maria Nazaré
Chaves Nobrega

AGRADECIMENTOS

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNCAP, o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES por todo o apoio financeiro em forma de bolsa e manutenção da estrutura para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará por me dar oportunidade de publicar esta dissertação a comunidade científica.

Ao Prof. Dr. Tércio de Freitas Paulo, por me aceitar no Grupo de Bioinorgânica e me orientar no desenvolvimento desta pesquisa, pois ele foi um profissional dedicado e sério, suas orientações são fundadas na ética, atualidade e desenvolvimento científico. Seu conhecimento foi importante neste trabalho, pois ele repassou me para o desenvolvimento desta pesquisa. Suas orientações também foram parcialmente importantes para a minha formação intelectual.

A Prof^ª. Dr^ª. Izaura Cirino Nogueira Diógenes, que me orientou com o professor Dr. Tércio e foi decisiva nas importantes ações desta pesquisa, sua experiência científica foi repassada e contribuiu de forma construtiva na realização desta pesquisa.

A Dr^ª. Ana Cláudia Silva Gondim e o Dr. Dieric dos Santos de Abreu por me orientarem nos conhecimentos científicos relacionados a esta pesquisa durante a sua formação acadêmica de ambos (Pós-doutorado).

Aos professores participantes da banca examinadora Dr. Paulo Naftali da Silva Casciano e Dr^ª. Idalina Maria Moreira de Carvalho pela avaliação e sugestões que foram dadas a este trabalho. Ao prof. Dr. Adonay Rodrigues Loiola por ser suplente da banca examinadora.

Ao professor Dr. Edilberto Rocha Silveira e ao Laboratório de análise fitoquímica de plantas medicinais I da Universidade Federal do Ceará (UFC), a quem concedeu as sementes de *Canavalia brasiliensis*.

Aos alunos de Iniciação Científica que realizaram algumas práticas de laboratório durante a pesquisa, Luane Rochana Aires Lima, Macário Vitório Mota Rodrigues e Vitória Soares Dibo.

Aos professores do laboratório do Grupo de Bioinorgânica da UFC: Audisio Dias, Alda Karine Medeiros Holanda, Eduardo Henrique Silva de Sousa, Jackson Rodrigues de Sousa e Luiz Gonzaga de França Lopes pela convivência profissional no laboratório.

Aos colegas de turma do laboratório do Grupo de Bioinorgânica da UFC: Adolfo Ignácio Barros Homo, Allandeiverson Santos de Sousa, Auridéia Possidônio de Sousa, Edinilton Muniz Carvalho, Ednaira Deodato Nunes, Everton Diógenes Gomes, Florêncio Sousa Gouveia Júnior, Francisca Mayara Santos de Alencar, Francisco Fernando Silveira, Geângela de Fátima Sousa Oliveira, Giamwemberg de Almeida Barreto, Gilmara Mesquita Vieira, Iury Araújo Paz, José Marcos da Silveira Carvalho, Josiane Beserra da Silva Lobão, Juliana Sales do Nascimento, Leandro Araújo Costa, Leonardo Alves de Linhares, Lucas Fonseca Bezerra, Luis Ramon Linhares Araruna, Luiz Henrique da Costa Sousa, Maria Aparecida Santiago da Silva, Maria Karolina da Silva Oliveira, Monilson Pinheiro dos Reis, Patrícia Helenita Rocha Martins, Paulo Eduardo Cavalcante Martins Filho, Ricardo Douglas de Sousa Bernardo, Rodrigo Gibaut de Souza Goiz, Sueslley Gurgel Guimarães Rodrigues, Tallisson Oliveira Abreu, Walysson Gomes Pereira e Wellinson Gadêlha Guimarães pelo companheirismo e pela contribuição que cada um desses citados realizaram para as pesquisas no laboratório.

Também aos amigos que contribuíram de forma direta e indireta para a minha formação pessoal e intelectual.

“Conhecimento é o ato de entender a vida”

Aristóteles

RESUMO

A lectina ConBr, extraída de sementes da espécie *Canavalia brasiliensis*, é uma proteína capaz de ligar-se de forma específica e reversível aos carboidratos glicose e manose. A imobilização dessa lectina em eletrodo modificado pode ser uma estratégia interessante para o desenvolvimento de biossensores com alta seletividade para esses carboidratos. Explorando esta capacidade da lectina, o objetivo principal deste trabalho é desenvolver e avaliar um biossensor impedimétrico para detecção de glicose e manose baseado na lectina ConBr imobilizada na monocamada automontada (SAM, do inglês *Self-Assembled Monolayers*) do composto 4,4'- dimercaptobifenil (HS2BP) sobre eletrodo de ouro. O biossensor foi preparado a partir da imersão por 1 h de um eletrodo de ouro limpo em uma solução de HS2BP 10 mmol L⁻¹ em acetona para formação do eletrodo Au/HS2BP. Em seguida, o eletrodo Au/HS2BP foi imerso em solução de ConBr 10 nmol L⁻¹ em tampão Tris-HCl por 1 h, formando o biossensor Au/HS2BP/ConBr. As técnicas de impedância eletroquímica e voltametria cíclica, utilizando o par redox [Fe(CN)₆]^{3-/4-} (1,0 mmol L⁻¹) como espécies de prova, foram utilizadas para caracterizar o biossensor e para os estudos de detecção dos carboidratos em solução. Por voltametria de varredura linear, determinou-se a quantidade de moléculas adsorvidas (Γ) de HS2BP como $3,03 \times 10^{-10}$ mol cm² consistente com uma monocamada. Determinou-se também o valor de pKa de superfície da espécie HS2BP como 6,08. Os valores de resistência a transferência de carga (R_{CT}) entre o eletrodo Au/HS2BP/ConBr e as espécies de provas calculados por meio da técnica de Impedância Eletroquímica, apresentaram uma relação linear com a concentração (de 25 a 125 nmol L⁻¹) de manose ou glicose no meio. O limite de detecção do biossensor foi calculado como 0,73 e 0,07 nmol L⁻¹ para glicose e manose, respectivamente. Além disso, o biossensor quando armazenado em condições adequadas (4 °C em tampão Tris-HCl) apresentou boa estabilidade e reprodutibilidade por mais de três semanas.

Palavras-chave: Lectina ConBr. Biossensor. Impedância eletroquímica. Manose. Glicose.

ABSTRACT

The ConBr lectin, extracted from seeds of the *Canavalia brasiliensis* beans, is a protein capable of specifically and reversibly binding to the glucose and mannose carbohydrates. The immobilization of such lectin on a modified electrode can be an interesting strategy for the development of biosensors with high selectivity for these sugars. Therefore, the objective of this work is to develop and to evaluate an impedimetric biosensor for glucose and mannose detection, which is based on the immobilization of ConBr on self-assembled monolayers (SAM) of the compound 4,4'-biphenyldithiol (HS2BP) on gold electrode. The biosensor was prepared from the immersion of a previously cleaned gold electrode with a known electrochemically active area in a solution containing 10 mmol L^{-1} HS2BP in acetone for 1 h for SAM Au/HS2BP formation. Then, the Au/HS2BP electrode was immersed in 10 nmol L^{-1} ConBr solution in tris-HCl buffer for 1 h, thus the Au/HS2BP/ConBr biosensor was obtained. Electrochemical Impedance and Cyclic Voltammetry using the redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (1.0 mmol L^{-1}) as probe molecules were used to characterize the biosensor fabrication and detection of carbohydrates in solution. By Linear Scan Voltammetry it was determined the amount of adsorbed (Γ) HS2BP molecules on surface as $3.03 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ which is consistent with a monolayer. The surface pKa value of the HS2BP species was also determined by voltammetry as 6.0. The charge-transfer resistance (R_{CT}) values between the Au/HS2BP/ConBr electrode and the probe molecules, calculated from electrochemical impedance results, showed a linear relationship with the concentration (from 25 to 125 nmol L^{-1}) of mannose or glucose in the medium. Thus, the detection limit of the biosensor was calculated as 0.73 and 0.07 nmol L^{-1} for glucose and mannose, respectively. In addition, the biosensor when stored under suitable conditions (4°C in Tris-HCl buffer) showed good stability and reproducibility for more than three weeks.

Keywords: Lectin ConBr. Biosensor. Electrochemical impedance. Mannose. Glucose.

LISTA DE ESQUEMA

Esquema 1 - Mecanismo de detecção de um biossensor enzimático de glicose	61
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Ilustração representativa da interação lectina/carboidrato em células	20
Figura 2	– Representação ilustrativa da merolectina, hololectina, quimerolectina e superlectina	21
Figura 3	– (A) Sementes da espécie <i>Canavalia brasiliensis</i> e (B) representação da estrutura cristalina da lectina ConBr. <i>Protein Data Bank</i> - PDB (código PDB 3JU9)	22
Figura 4	– Representação ilustrativa de uma monocamada automontada (<i>self-assembled monolayers</i> – SAM)	25
Figura 5	– Representação de um diagrama de Nyquist para a resposta de impedância eletroquímica de um sistema onde ocorre transferência de carga controlada por difusão	26
Figura 6	– Potenciostato AUTOLAB PGSTAT 302N	30
Figura 7	– Célula eletroquímica para 3 eletrodos	30
Figura 8	– Fluorímetro Photon Technology International, Inc	33
Figura 9	– Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida para diferentes etapas da purificação da lectina ConBr extraída de sementes de <i>Canavalia brasiliensis</i>	36
Figura 10	– Espectros de fluorescência da lectina ConBr na ausência e presença de manose em diferentes concentrações e temperaturas. Em tampão Tris HCl, pH 7,4. Excitado a $\lambda_{exc} = 280$ nm	38
Figura 11	– Gráficos da relação $\text{Log}(f_o-f)/f \times \text{Log}[\text{man}]$ em diferentes temperaturas	39
Figura 12	– Voltamograma do eletrodo de ouro policristalino (área geométrica = 0,0314 cm ²) em solução de H ₂ SO ₄ 0,50 mol L ⁻¹ a 0,1 V s ⁻¹	40
Figura 13	– Voltamograma na faixa de -0,1 a 0,5 V a 0,05 V s ⁻¹ do eletrodo de Au em solução KF 0,5 mol L ⁻¹ contendo [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} 1,0 mmol L ⁻¹	41

Figura 14	– Diagrama de Nyquist do eletrodo de Au em solução KF 0,5 mol L ⁻¹ contendo [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} 1,0 mmol L ⁻¹	41
Figura 15	– Representação do composto HS2BP (4,4'-dimercaptobifenil)	42
Figura 16	– Voltamogramas na faixa de - 0,1 a 0,5 V a 0,05 V s ⁻¹ do eletrodo de Au antes e após a modificação com o composto HS2BP, aquisição realizada em solução KF 0,5 mol L ⁻¹ contendo [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} 1,0 mmol L ⁻¹	42
Figura 17	– Diagrama de Nyquist do eletrodo Au/HS2BP após uma hora de modificação, IE realizado em solução KF 0,5 mol L ⁻¹ contendo [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} 1,0 mmol L ⁻¹ . Em amplitude de 10 mV, potencial de 0,22 V e faixa de frequência de 100 mHz a 100 kHz	43
Figura 18	– Esquema de formação do eletrodo Au/HS2BP	45
Figura 19	– Voltamograma de varredura linear (LSV) de – 0,2 a – 1,6 V a 0,05 V s ⁻¹ para o eletrodo de ouro modificado por uma hora com HS2BP em acetona, aquisição realizada em KOH 0,5 mol L ⁻¹	45
Figura 20	– Esquema do processo de dessorção para compostos sulfurados	47
Figura 21	– Voltamograma na faixa de - 0,1 a 0,6 V a 0,015 V s ⁻¹ do eletrodo Au/HS2BP em solução eletrolítica KF 0,5 mol L ⁻¹ com [Fe(CN) ₆] ³⁻ 0,5 mmol L ⁻¹	48
Figura 22	– Valores das correntes de pico catódico em função do pH da solução eletrolítica referente a figura 21	49
Figura 23	– Comportamento do eletrodo Au/HS2BP e das espécies de prova [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} em função da variação do pH	50
Figura 24	– Voltamograma na faixa de - 0,1 a 0,5 V a 0,05 V s ⁻¹ do eletrodo Au/HS2BP/ConBr em solução KF 0,5 mol L ⁻¹ com [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} 1,0 mmol L ⁻¹	51
Figura 25	– Diagrama de Nyquist do eletrodo Au/HS2BP/ConBr em solução KF 0,5 mol L ⁻¹ com [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} 1,0 mmol L ⁻¹ . Em amplitude de 10 mV, potencial de 0,22 V e faixa de frequência de 100 mHz a 100 kHz	51
Figura 26	– Formação do biossensor impedimétrico baseado em ConBr	52

Figura 27	– (A) Voltamograma na faixa de – 0,1 a 0,5 V a 0,05 Vs ⁻¹ e (B) Diagrama de Nyquist do eletrodo Au/HS2BP/ConBr após sua construção em solução KF 0,5 mol L ⁻¹ contendo [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} 1,0 mmol L ⁻¹ . Amplitude de 10 mV, potencial de 0,22 V	53
Figura 28	– Diagramas de Nyquist do biossensor após adição de alíquotas de glicose. Aquisições obtidas em solução eletrolítica de KF 0,50 mol L ⁻¹ contendo 1,0 mmol L ⁻¹ de [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} . Em amplitude de 10 mV, potencial de 0,22 V e frequência de 100 mHz a 100 kHz	55
Figura 29	– Variação do valor de R _{CT} do biossensor em função da concentração de glicose.....	56
Figura 30	– Diagramas de Nyquist do biossensor após adição de alíquotas de manose. Aquisições obtidas em solução eletrolítica de KF 0,50 mol L ⁻¹ contendo 1,0 mmol L ⁻¹ de [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} . Em amplitude de 10 mV, potencial de 0,22 V e frequência de 100 mHz a 100 kHz	57
Figura 31	– Relação dos valores de R _{CT} do biossensor em função da concentração de manose	58
Figura 32	– Representações estruturais dos carboidratos: glicose e manose	59
Figura 33	– Voltamogramas cíclicos na faixa de – 0,1 a 0,6 V a 0,05 Vs ⁻¹ do eletrodo Au/HS2BP/ConBr em solução KF 0,5 mol L ⁻¹ com [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} 1,0 mmol L ⁻¹ em diferentes concentrações de (A) manose e (B) glicose	60
Figura 34	– Ilustração representativa do processo de detecção da manose pelo biossensor	63
Figura 35	– Diagrama de Nyquist do eletrodo de Au com alíquotas de manose em solução eletrolítica KF 0,5 mol L ⁻¹ contendo [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} 1,0 mmol L ⁻¹ . Em amplitude de 10 mV, potencial de 0,22 V e faixa de frequência de 100 mHz a 100 kHz	63
Figura 36	– Diagramas de Nyquist do eletrodo Au/HS2BP/ConBr na presença de glicose 25 nmol L ⁻¹ em solução eletrolítica KF 0,5 mmol L ⁻¹ contendo [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} 1,0 mmol L ⁻¹ . Em amplitude de 10 mV, potencial de 0,22 V e faixa de frequência de 100 mHz a 100 kHz.....	64

- Figura 37 – Diagramas de Nyquist para o biossensor na presença de glicose 125 nmol L⁻¹ em solução eletrolítica KF 0,5 mmol L⁻¹ contendo [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 1,0 mmol L⁻¹. Em amplitude de 10 mV, potencial de 0,22 V e faixa de frequência de 100 mHz a 100 kHz 65
- Figura 38 – Voltamogramas na faixa de – 0,1 a 0,5 V a 0,05 Vs⁻¹ do eletrodo Au/HS2BP/ConBr na detecção de glicose 25 nmol L⁻¹ em KF 0,5 mol L⁻¹ com [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 1,0 mmol L⁻¹ 66
- Figura 39 – Diagramas de Nyquist do biossensor em aquisições antes, durante e após a detecção de glicose em eletrólito de KF 0,5 mol L⁻¹ com [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 1,0 mmol L⁻¹. Em amplitude de 10 mV, potencial de 0,22 V e faixa de frequência de 100 mHz a 100 kHz 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de concentração inibitória mínima (CIM) de alguns monossacarídeos e dissacarídeos para a atividade hemaglutinante da ConBr	23
Tabela 2 – Valores das constantes de associação (K_{ass}) e número de sítios de ligação (n) para associação de carboidrato à lectina em diferentes temperaturas por espectroscopia de fluorescência	39
Tabela 3 – Parâmetros impedimétricos do par redox $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ em função do eletrodo de ouro limpo e modificado, aquisição em solução eletrolítica: KF 0,50 mol L ⁻¹ contendo 1,0 mmol L ⁻¹ de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ a 21 °C	44
Tabela 4 – Valores de potenciais de dessorção redutiva (E_{dr}) e recobrimento superficial (Γ) das SAM de Hpyt, HSBPCN e HS2BP sobre ouro obtidos por dessorção redutiva em meio alcalino, em LSV na faixa de - 0,2 a - 1,6 V a 0,05 V s ⁻¹ em KOH 0,5 mol	47
Tabela 5 – Valores de R_{CT} do eletrodo durante a formação do biossensor	52
Tabela 6 – Valores de R_{CT} do biossensor após a sua construção por determinados períodos	54
Tabela 7 – Valores de R_{CTs} do eletrodo Au/HS2BP/ConBr na detecção de glicose	56
Tabela 8 – Valores de R_{CTs} do eletrodo Au/HS2BP/ConBr na detecção de manose	57
Tabela 9 – Resultados de validação do método do biossensor na detecção de açúcares ...	59
Tabela 10 – Parâmetros de alguns sensores de glicose	62
Tabela 11 – Valores de R_{CT} do biossensor antes, durante e após a detecção de glicose em solução eletrolítica com $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A _{ativa}	Área eletroquimicamente ativa do eletrodo
Ag/AgCl/Cl ⁻	Eletrodo de prata cloreto de prata
C*	Concentração do par redox em solução
Cbol	Lectina de <i>Canavalia boliviana</i>
ConA	Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>
ConBr	Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>
DGra	Lectina de <i>Dioclea grandiflora</i>
DLasiL	Lectina de <i>Dioclea lasiocarpa</i>
DMeg	Lectina de <i>Dioclea sclerocarpa</i>
DRos	Lectina de <i>Dioclea rostrata</i>
DSclerL	Lectina de <i>Dioclea sclerocarpa</i>
DRC	Domínio de Reconhecimento de Carboidrato
E _{dr}	Dessorção redutiva
F	Constante de Faraday 96485 C mol ⁻¹
FBS	<i>Fetal Bovino Serum</i>
glic	Glicose
HS2BP	4,4'-dimercaptobifenil
HSBPCN	4'-mercapto-[1,1'-bifenil]-4-carbonitrila
Hpyt	5-(4-piridil)-1,3,4-oxadiazol-2-tiol
IE	Impedância eletroquímica
k _{app}	Constante de velocidade de reação heterogênea de transferência de carga
K _{ass}	Constante de associação
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
LSV	<i>Linear Sweep Voltammetry</i>
man	Manose
PDB	Protein Data Bank
pyS	4-mercaptopiridina
R _{CT}	Resistência à transferência de carga para o eletrodo de ouro limpo
R _{CT} *	Resistência à transferência de carga para a superfície modificada
SAM	<i>Self-Assembled Monolayers</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulphate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>

VC	Voltametria cíclica
Z_{Im}	Impedância imaginária
Z_R	Impedância real
θ	Taxa de recobrimento superficial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Lectinas	19
1.2	A Lectina ConBr	22
1.3	Biossensores	24
1.4	Impedância Eletroquímica (IE)	25
1.5	Sensores baseados em Lectinas	27
2.	OBJETIVOS	28
2.1	Objetivo geral	28
2.2	Objetivos específicos	28
3.	PARTE EXPERIMENTAL	29
3.1	Reagentes	29
3.2	Soluções	29
3.3	Procedimentos Eletroquímicos	29
3.4	Extração e purificação da lectina ConBr	31
3.5	Estudo de fluorescência da ConBr	32
3.6	Preparação do biossensor	33
3.6.1	<i>Dessorção redutiva</i>	34
3.6.2	<i>Estudo de pKa de superfície</i>	34
3.7	Detecção dos açúcares	34
3.7.1	<i>Estabilidade e reprodutibilidade do biossensor</i>	35
4.	RESULTADOS	36
4.1	Isolamento e purificação da lectina ConBr	36
4.2	Fluorescência da ConBr	37
4.3	Preparação do biossensor	40
4.3.1	<i>Limpeza do eletrodo de ouro</i>	40
4.3.2	<i>Formação da SAM de HS2BP sobre ouro</i>	42
4.3.2.1	<i>Dessorção redutiva</i>	45
4.3.2.2	<i>Estudo de pKa de superfície do filme molecular</i>	48
4.3.3	<i>Imobilização da ConBr sobre o filme molecular</i>	50
4.4	Estabilidade do biossensor Au/HS2BP/ConBr	53
4.5	Detecção de açúcar	54
4.6	Teste de Reprodutibilidade	64
5.	CONCLUSÃO	69

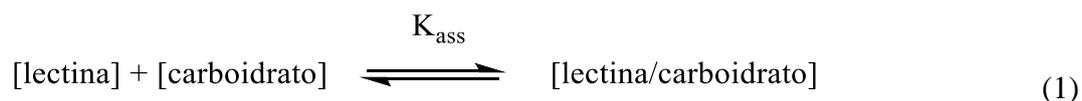
REFERÊNCIAS	70
--------------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

Moléculas presentes nas células dos seres vivos (biomoléculas) têm sido estudadas visando diversas aplicações científicas e tecnológicas. Lectinas, por exemplo, são uma classe de biomoléculas bastante estudadas devido à capacidade de ligar-se de forma seletiva a carboidratos, permitindo dessa forma, o desenvolvimento de biossensores.

1.1 Lectinas

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune encontradas em todos os seres vivos. Estas proteínas possuem pouca atividade enzimática e têm como principal característica a capacidade de ligar-se de forma específica e reversível a carboidratos (Equação 1) (CAGLIARI; KREMER; PINTO, 2018; DA SILVA *et al.*, 2019; COSTA *et al.*, 2018).



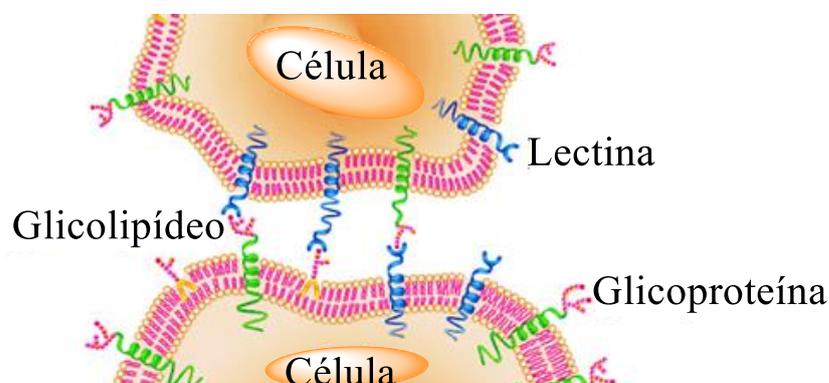
Ensaio realizado no fim do século XIX utilizando ricina, lectina presente em sementes de *Ricinus communis*, demonstraram sua capacidade de promover aglutinação de eritrócitos de coelho (SHARON; LIS, 2004). Em 1936, Summer e Howell demonstraram que a aglutinação de eritrócitos promovida pela lectina Concanavalia A (ConA), presentes em sementes de *Canavalia ensiformis*, era inibida pela presença de sacarose. Essa inibição foi atribuída à ligação entre açúcar e lectina. Dessa forma, demonstrou-se que as lectinas se ligam a carboidratos presentes nas membranas dos eritrócitos causando aglutinação (SHARON; LIS, 2004).

Cada monômero de uma lectina possui um sítio denominado domínio de reconhecimento de carboidrato (DRC) que permite a sua interação com açúcares (LUDWIG *et al.*, 2019; MITCHELL; RAMESSAR; O'KEEFE, 2017). Os DRC das lectinas são geralmente monovalentes e atuam como locais de ligação de substratos e podem ser combinados com enzimas ativas de carboidratos (BONNARDEL *et al.*, 2019). Os DRCs apresentam estrutura de dupla hélice- β que é um arranjo muito estável de repetições com múltiplos locais de ligação organizados simetricamente. Essa estrutura é perfeitamente adequada para promover a ligação de carboidratos, como em glicoconjugados presentes em superfícies celulares. (BONNARDEL *et al.*, 2019).

A interação lectina/carboidrato ocorre entre os resíduos de aminoácidos da lectina e as hidroxilas dos carboidratos, possibilitando que a lectina se ligue a um carboidrato solúvel ou a uma porção de carboidrato de uma glicoproteína ou glicolipídio. Isso faz das lectinas ferramentas extremamente úteis para a investigação de carboidratos em superfícies celulares, em particular aqueles que sofrem alterações em células tumorais malignas (BUYEL, 2018), bem como para o isolamento e caracterização de glicoproteínas.

Essa classe de proteína funcionam como moléculas de reconhecimento nas interações célula-molécula e célula-célula em uma variedade de sistemas biológicos (SHARON; LIS, 2004). E está envolvida em diversos processos biológicos, como: interações entre microrganismos e células hospedeiras, adesão de microrganismos na superfície de células, remoção de glicoproteínas do sistema circulatório e recrutamento de leucócitos em sítios de inflamação (AMBROSI *et al.*, 2005; BONNARDEL *et al.*, 2019; RABINOVICH *et al.*, 2007; SHARON; LIS, 2004). Em geral, a atividade biológica das lectinas resulta de sua capacidade de se ligar a resíduos de carboidratos presentes no glicocálice de células ou microrganismos (Figura 1).

Figura 1 – Ilustração representativa da interação lectina/carboidrato em células



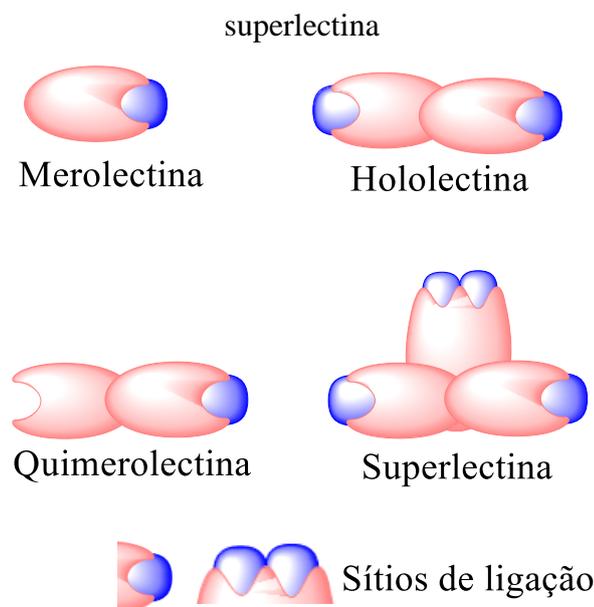
Fonte: Adaptado da referência. (SHARON; LIS, 2004). Copyright © 2019, Oxford University Press.

Lectinas de leguminosas têm sido usadas como sistemas modelo para estudos visando o entendimento de como proteínas reconhecem carboidratos. Esta classe de lectinas é obtida de forma relativamente fácil e, além disso, muitas estruturas cristalinas já são descritas na literatura trazendo uma visão detalhada das interações que ocorrem entre carboidratos e a proteína (NASCIMENTO *et al.*, 2018). Essa capacidade de interação específica é também o ponto chave de pesquisas científicas envolvendo lectinas (BATISTA *et al.*, 2017, 2018; BIES; LEHR; WOODLEY, 2004; FAHEINA-MARTINS *et al.*, 2012; GHAZARIAN; IDONI;

OPPENHEIMER, 2011; GONDIM *et al.*, 2017; SANZ-APARICIO *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 2016).

Pode-se classificar as lectinas de leguminosas em quatro grupos (Figura 2) de acordo com sua estrutura: 1 – Merolectinas apresentam apenas um DRC, são monovalentes e são incapazes de precipitar glicoconjugados e de aglutinar células; 2 – Hololectinas possuem dois ou mais domínios idênticos, apresentam capacidade de aglutinar células ou de precipitar conjugados; 3 – Quimerolectinas resultam da fusão de proteínas, possuem mais de um DRC não relacionados que agem de forma independente e 4 – Superlectinas contêm dois ou mais DRCs distintos (LIU; BIAN; BAO, 2010; PEUMANS; VAN DAMME, 1995; VAN DAMME *et al.*, 1998).

Figura 2 – Representação ilustrativa da merolectina, hololectina, quimerolectina e



Fonte: Adaptada a referência (VAN DAMME *et al.*, 1998). Copyright© 1998, CRC Press LLC.

Diversas lectinas vegetais embora apresentem alta similaridade entre si, apresentam perfis biológicos notavelmente distintos (GONDIM *et al.*, 2017; OSTERNE *et al.*, 2017), com uma extensa série de atividades biológicas como propriedades anti-inflamatórias (NASCIMENTO *et al.*, 2018), antidepressivas (DA SILVA PINTO *et al.*, 2019), contraceptivas (HOLANDA *et al.*, 2009) e vasodilatadoras (ASSREUY *et al.*, 2009).

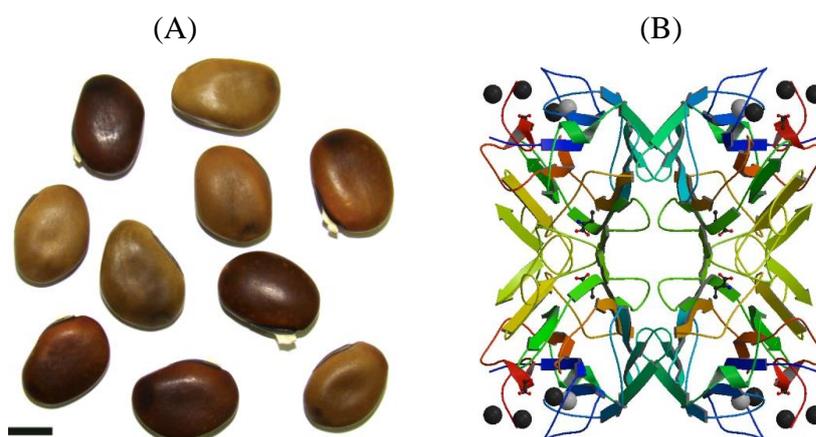
Lectinas extraídas a partir de sementes de plantas são as mais estudadas devido principalmente à sua facilidade de extração e ao alto teor dessas proteínas nas sementes. Atualmente, uma grande variedade de lectinas extraídas de sementes são conhecidas, por exemplo (GONDIM *et al.*, 2017; MIGUEL *et al.*, 2015): DLasiL (*Dioclea lasiocarpa*), DMeg,

(*Dioclea megacarpa*), DGra (*Dioclea grandiflora*), DRos (*Dioclea rostrata*), DSclerL (*Dioclea sclerocarpa*), ConA (*Canavalia ensiformis*), Cbol (*Canavalia boliviana*) e ConBr (*Canavalia brasiliensis*), dentre várias outras.

1.2 A lectina ConBr

A lectina ConBr (Figura 3) é extraída das sementes de *Canavalia brasiliensis* também conhecida como feijão bravo do Ceará, é encontrado em regiões semiáridas do Brasil. A ConBr pertence da classe das hololectinas possuindo afinidade aos carboidratos manose e glicose (MOREIRA; CAVADA, 1984). A estrutura dessa lectina é constituída geralmente por quatro monômeros contendo os íons cálcio (Ca^{2+}) e manganês (Mn^{2+}) que possuem a capacidade de fazer ligação monovalente ao carboidrato. Entretanto, em pH fisiológico, a ConBr encontra-se como uma mistura de dímeros e tetrâmeros (FAHEINA-MARTINS *et al.*, 2012). A interação desta lectina com manose ou glicose foi evidenciada experimentalmente (BATISTA *et al.*, 2018) a partir da inibição da atividade hemaglutinante da ConBr causada pela presença de poucas miligramas de manose ou glicose no meio, enquanto que essa inibição não ocorria com a presença de outros açúcares (Tabela 1).

Figura 3 – (A) Sementes da espécie *Canavalia brasiliensis* e (B) representação da estrutura cristalina da lectina ConBr. *Protein Data Bank* - PDB (código 3JU9)



Fonte: Adaptada a referência (MIGUEL *et al.*, 2015). Copyright © 2015 Elsevier GmbH.

Tabela 1 – Valores de concentração inibitória mínima (CIM) de alguns monossacarídeos e dissacarídeos para a atividade hemaglutinante da ConBr

Carboidrato	CIM (nmol L ⁻¹)
D-manose	25
D-glicose	50
D-galactose	NI
D-ramnose	NI
L-fucose	NI
N-acetil-D-glucosamina	NI
α-lactose	NI
β-lactose	NI
Sacarose	NI

Fonte: Adaptada a referência (BATISTA *et al.*, 2018). Copyright©, 1998 Elsevier B. V.

NI - Não inibitório abaixo de 100 mmol L⁻¹

Os estudos envolvendo a ConBr (BATISTA *et al.*, 2017) indicam que essa proteína possui diversas atividades biológicas, por exemplo: atividade imune contra células infectadas por *Salmonella enterica serovar typhimurium*, efeitos antiproliferativos em linhagens celulares de leucemia humana (FAHEINA-MARTINS *et al.*, 2012), atividade anti-helmíntica da *Haemonchus contortus* (BATISTA *et al.*, 2018), regulação da liberação de óxido nítrico derivada de infecção sistêmica causada por *Salmonella enterica serovar typhimurium* (SILVA *et al.*, 2016), proteção contra isquemia em ratos (DA SILVA PINTO *et al.*, 2019), efeitos de neuroproteção contra a toxicidade do glutamato (RIEGER *et al.*, 2017) e efeito antidepressivo em camundongos (JACQUES *et al.*, 2013).

Estudos anteriores realizados em nosso grupo de pesquisa indicaram que a ConBr pode ser imobilizada em superfície de ouro previamente modificada com gliotoxina (gtx), uma dicetopiperazina sulfurada isolada de fungos marítimos, formando um sensor eletroquímico capaz de detectar manose em solução (ABREU *et al.*, 2017). Isso demonstra que a lectina imobilizada manteve suas propriedades biológicas referentes à interação com carboidratos.

1.3 Biossensores

Sensores são dispositivos cuja função é detectar eventos. Um sensor químico é aquele usado para detectar a presença de substâncias a partir da interação entre uma molécula de reconhecimento acoplada ao sensor e a espécie a ser detectada. Para que o sensor seja específico, é necessário acoplar uma molécula que tenha afinidade específica ao analito. No geral, a resposta do sensor precisa ser obtida facilmente e proporcional a quantidade de analito no meio.

O dispositivo cujo elemento de reconhecimento é composto por uma substância biológica (anticorpo, enzima ou lectina) é definido como biossensor. Usa-se este tipo de sensor para detectar antígenos, substratos ou carboidratos, entre outros analitos (ABOLHASAN *et al.*, 2019; CHO; PARK, 2019; HULANICKI; GEAB; INGMAN, 1991; MAJDINASAB; MITSUBAYASHI; MARTY, 2019; PUNDIR; NARWAL; BATRA, 2016). Um biossensor pode ser usado de forma qualitativa para detectar somente a presença do analito no ambiente ou de forma quantitativa para detectá-lo e quantificá-lo (SILVA, 2018).

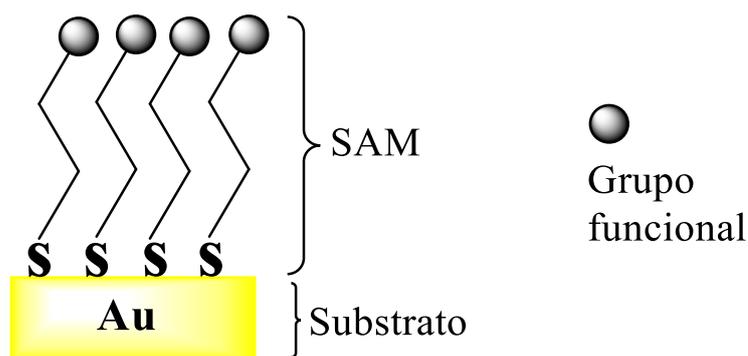
O uso de moléculas biológicas em sensores é uma estratégia para detecção de antígenos (HUANG *et al.*, 2019; PUNDIR; MALIK; CHAUDHARY, 2019), microrganismos (YANG *et al.*, 2016) e biomarcadores (BERTOK *et al.*, 2019). Com essa finalidade, biossensores são úteis para identificar contaminantes em alimentos e bebidas, identificar e diagnosticar determinados tipos de doenças (MARKWALTER *et al.*, 2019). Além disso, utiliza-se biossensores para detectar biomarcadores em pacientes com doenças infecciosas e câncer (HU *et al.*, 2013; SILVA, 2018; SINGH *et al.*, 2019).

Emprega-se diferentes métodos de transdução em biossensores. O método eletroquímico é bastante utilizado devido à relativa simplicidade de obtenção do sinal. Dentre as técnicas eletroquímicas, a impedância eletroquímica é empregada para sensoriamento com transdução eletroquímica (RANDVIIR; BANKS, 2013) pois causa menos danos a biomolécula. Para a formação de um biossensor impedimétrico, faz-se necessário a montagem do dispositivo associado à biomoléculas imobilizadas em um eletrodo, de forma que suas funções biológicas sejam preservadas (NADERI ASRAMI *et al.*, 2018a).

Muitos biossensores são construídos a partir da adsorção espontânea de moléculas em eletrodos metálicos para a formação de monocamadas automontadas (SAM do inglês *self-assembled monolayers*) conforme ilustrado na Figura 4. Isso possibilita, portanto, superfícies com propriedades desejadas. No caso, a SAM precisa interagir de modo a imobilizar a espécie biológica obtendo-se, assim, um biossensor. A SAM em um biossensor impedimétrico tem a

finalidade de intermediar a interação entre o substrato e a biomolécula, pois uma interação direta pode ocasionar a desnaturação e consequente perda das propriedades biológicas (KAUR *et al.*, 2019; SINGH *et al.*, 2017).

Figura 4 – Representação ilustrativa de uma monocamada automontada (*self-assembled monolayers - SAM*)



Fonte: Elaborado pelo Autor.

A modificação em geral ocorre pela formação de monocamadas em uma variedade de substratos, mas o sistema mais usado é a automontagem de tiois sobre superfície de ouro, uma vez que a interação covalente Au-S fornece boa estabilidade a SAM (BANDYOPADHYAY *et al.*, 1998; SHAMSIPUR *et al.*, 2008). Para tornar-se um biossensor o eletrodo deve ser modificado por compostos sulfurados que contenha um grupo terminal em sua extremidade que possibilite a interação com uma determinada biomolécula.

A formação do biossensor pode ser monitorada pela transferência de carga entre o substrato e uma dada espécie eletroativas de prova presente no meio. Ao passo que a superfície do substrato é parcialmente recoberta, ocorre o aumento da resistência à transferência de carga (R_{CT}). No funcionamento do biossensor a interação biomolécula/analito influencia na transferência de carga. Os resultados podem ser obtidos por algumas técnicas eletroquímicas como voltametria cíclica e impedância eletroquímica.

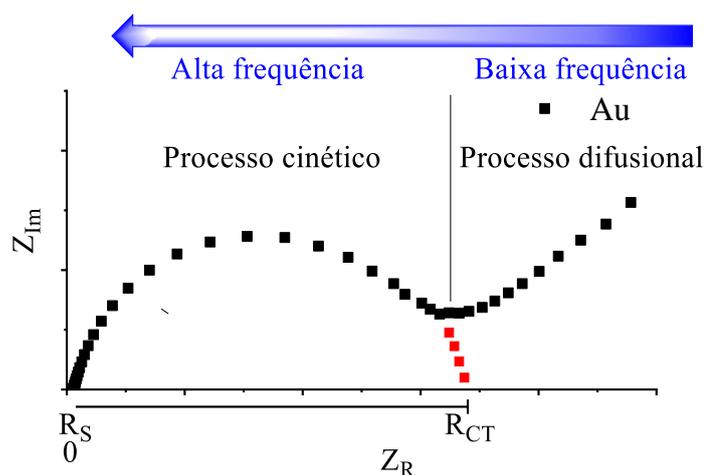
1.4 Impedância Eletroquímica (IE)

A impedância (Z) de um sistema é geralmente determinada por aplicação de um potencial senoidal com perturbação de pequena amplitude e a detecção da resposta de corrente. Esta técnica mede a relação entre a corrente e o potencial aplicado em um dado domínio de frequência (CIUCCI, 2019; RANDVIIR; BANKS, 2013). Para medição da impedância, um

sistema eletroquímico é sujeito a uma pequena tensão senoidal ou perturbação de corrente em um determinado conjunto de frequência e, concomitantemente, respostas a corrente senoidal ou tensão são registrados (CIUCCI, 2019). Em suma, impedância eletroquímica é uma técnica que descreve a resposta de um circuito a uma corrente alternada ou tensão em função da frequência (MAJDINASAB; MITSUBAYASHI; MARTY, 2019). Esta técnica fornece informações sobre a capacitância de dupla camada, impedância difusa e resistência a transferência de carga. Pode-se correlacionar os dados de impedância eletroquímica a algumas propriedades físicas importantes, incluindo taxas de difusão, reação e características microestruturais do sistema eletroquímico em estudo (MAJDINASAB; MITSUBAYASHI; MARTY, 2019).

O diagrama de Nyquist (Figura 5) é o mais utilizado para representar os fenômenos eletroquímicos. Apresenta os dados de impedância por meio da relação entre os valores de impedância imaginária ($-Z_{Im}$) em função da real (Z_R). Observa-se, geralmente, nesse diagrama a presença de um semicírculo (arco capacitivo) na região de frequência mais alta relacionado ao processo de transferência de carga das espécies eletroativas na interface eletrodo/solução (LEMAITRE *et al.*, 1983). Na região de mais baixas frequência, pode ser visualizada uma distribuição linear dos pontos, com um ângulo de 45° em função da frequência, que está relacionada ao processo difusional da espécie eletroativa.

Figura 5 – Representação de um diagrama de Nyquist para a resposta de impedância eletroquímica de um sistema onde ocorre transferência de carga controlada por difusão



Fonte: Elaborado pelo Autor.

A impedância é útil para o estudo de semicondutores, baterias, células de combustível e biossensores. Sendo utilizada para fins analíticos e aplicada para investigação da corrosão de metais, monitoramento de células combustíveis e aplicações biológicas. Sua

aplicação biológica permite a medição direta da matéria biológica, tanto sólida como dissolvida em meio tamponado e com menos danos à amostra (MARKWALTER *et al.*, 2019; NADERI ASRAMI *et al.*, 2018b; ZHAO *et al.*, 1999).

Quando comparada a outras técnicas eletroquímicas, impedância eletroquímica apresenta algumas vantagens, pois é aplicada uma faixa muito estreita de potencial causando, assim, menos danos estruturais nas biomoléculas. Devido à alta sensibilidade do método, é possível monitorar as mudanças na superfície do eletrodo em cada etapa de modificação e durante a detecção do analito (NADERI ASRAMI *et al.*, 2018b; SIUZDAK *et al.*, 2019).

1.5 Sensores baseados em Lectinas

As lectinas são utilizadas como elementos de reconhecimento molecular em dispositivos devido principalmente à facilidade de obtê-las e a sua estabilidade (BERTOK *et al.*, 2019). Biossensores baseados em lectinas podem ser usados tanto para detectar carboidratos livre como aqueles presentes em paredes celulares (HUANG *et al.*, 2019), antígeno específico da próstata (BERTOK *et al.*, 2019), antígeno carcinoembrionário em soro e em tecidos (WANG *et al.*, 2018), detecção de bactéria em água (RENGARAJ *et al.*, 2018), entre outros.

Biossensores baseados em lectinas também são importantes para detecção de biomarcadores e identificar enfermidades como o câncer e diabetes. A detecção dos biomarcadores ocorre pela interação lectina/carboidrato, em que esses carboidratos estão presentes nas membranas celulares do biomarcador. No câncer é detectado a presença de algum carboidrato na membrana da célula e na diabetes é detectado a presença de uma elevada quantidade de carboidrato no sangue. Com isso o desenvolvimento de biossensores de açúcares são muito importantes.

Atualmente alguns biossensores baseados em enzimas são aplicados para a detecção de carboidratos. Um exemplo é o biossensor de glicose que utiliza glicose oxidase. Neste, a detecção da glicose é de forma indireta e ocorre pela presença de peróxido de hidrogênio (SABU *et al.*, 2019). Dessa forma, o objetivo deste trabalho é desenvolver um biossensor impedimétrico baseado na lectina ConBr para a detecção direta de glicose e manose em solução.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho é preparar, caracterizar e avaliar a eficiência de um sensor impedimétrico para a detecção dos carboidratos manose e glicose. O biossensor será baseado na imobilização da lectina ConBr sobre um eletrodo de ouro previamente modificado com o composto sulfurados bifenílico 4,4'-dimercaptobifenil (HS2BP).

2.2 Objetivos específicos

- Extrair, isolar e purificar a ConBr de sementes de feijão bravo (*Canavalia brasiliensis*);
- Avaliar a fluorescência intrínseca da ConBr na ausência e presença de manose;
- Preparar monocamadas automontadas (SAM – *self-assembled monolayer*) do composto HS2BP sobre o eletrodo de ouro (Au/HS2BP);
- Avaliar a interação Au/HS2BP e a quantidade de moléculas adsorvidas (Γ) sobre o eletrodo de ouro;
- Determinar o valor do pKa de superfície da SAM Au/HS2BP;
- Imobilizar a lectina ConBr no eletrodo Au/HS2BP;
- Caracterizar o eletrodo Au/HS2BP/ConBr (biossensor);
- Avaliar a estabilidade do eletrodo Au/HS2BP/ConBr;
- Avaliar a capacidade do eletrodo Au/HS2BP/ConBr na detecção dos carboidratos manose e glicose por meio da técnica de impedância eletroquímica;
- Avaliar a reprodutibilidade do biossensor.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes

4'4-dimercaptobifenil (HS2BP) (Sigma-aldrich), Acetona (CH_3OCH_3) (Tedia Brasil), ácido sulfúrico (H_2SO_4) (Merck), cloreto de cálcio (CaCl_2) (Synth), Cloreto de manganês (MnCl_2) (Vetec), Cloreto de sódio (NaCl) (Synth), corante comasie R-250 (Thermo), glicose (Sigma-aldrich), manose (Sigma-aldrich), fluoreto de potássio (KF) (Sigma-aldrich), glicina (Sigma-aldrich), hexacianoferrato(II) de potássio ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) (Acros Organics), hexacianoferrato(III) de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) (Acros Organics), hidróxido de sódio (NaOH) (Synth), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Synth), Sephadex® G-50 (resina de cromatografia de afinidade) (Sigma-aldrich), tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreídrico (Tris-HCl) pKa 8,08 (Sigma-Aldrich).

3.2 Soluções

Todas as soluções aquosas foram preparadas com água deionizada (resistividade = 18,2 M Ω cm Mili-Q). Solução aquosa de 3 H_2SO_4 :1 H_2O_2 (v:v) (solução piranha) foi utilizada na limpeza das vidrarias (CUIDADO: a solução piranha é perigosa, corrosiva e pode explodir se contido em um vaso fechado e, deve ser manuseada com cuidado). A solução tampão Tris-HCl 0,15 mol L⁻¹ a 25 °C foi ajustada com KOH para o pH 7,4. As soluções de ConBr, glicose e manose foram preparadas em tampão Tris-HCl 0,15 mol L⁻¹, pH 7,4 e foram utilizadas nas medidas eletroquímicas. A concentração da solução de ConBr (massa molecular de 31,4 kDa) foi calculada espectroscopicamente considerando uma absorvidade molar (ϵ) de 32438,3 L mol⁻¹ cm⁻¹ (GONDIM *et al.*, 2017) para a banda com máximo de absorção em 280 nm.

3.3 Procedimentos Eletroquímicos

Nos procedimentos de caracterização e avaliação do sensor foram utilizadas as técnicas de voltametria cíclica (VC) e impedância eletroquímica por meio de um potenciostato AUTOLAB PGSTAT 302N (Figura 6). Essas medidas foram realizadas em uma célula eletroquímica convencional de vidro com entrada para três eletrodos (Figura 7). Um eletrodo de platina, um eletrodo de Ag/AgCl/ Cl^- (KCl_{sat}) e um eletrodo policristalino de ouro

(Bioanalytical System Inc. BAS, $A_{\text{geom}} = 0,0314 \text{ cm}^2$) foram usados como eletrodos auxiliar, de referência e de trabalho, respectivamente. Todos os potenciais citados neste trabalho referem-se ao eletrodo de referência supracitado que foram omitidos ou abreviado como Ag/AgCl/Cl⁻ (KCl_{sat}) nas Figuras para simplificar o título dos eixos.

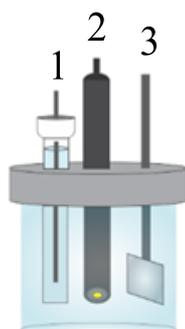
Todas as soluções utilizadas como eletrólito de suporte foram desaeradas, previamente utilizando argônio (White Martins) de alta pureza, durante 10 minutos. A atmosfera de Argônio foi mantida sobre as soluções durante as aquisições dos dados eletroquímicos.

Figura 6 – Potenciostato AUTOLAB PGSTAT 302N



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Figura 7 – Célula eletroquímica para 3 eletrodos



- 1- Eletrodo de referência;
- 2- Eletrodo de trabalho;
- 3- Eletrodo auxiliar.

Fonte: Elaborado pelo Autor.

As etapas de preparação do sensor foram monitoradas por impedância eletroquímica e VC utilizando os íons complexos $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (ambos $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em KF $0,5 \text{ mol L}^{-1}$) como espécies de prova, pois essas espécies tem um potencial de meia-onda de $E_{1/2} = 0,22 \text{ V}$ (CHAILAPAKUL; CROOKS, 1995). Nas medidas de impedância eletroquímica, elétrons são transferidos entre eletrodo e as espécies de provas, através desse processo pode se avaliar a velocidade de transferência de carga e o processo

difusional de transporte de massa das espécies de prova até o eletrodo em função da modificação do eletrodo.

Todas as medidas de impedância eletroquímica foram realizadas em triplicata utilizando uma variação decrescente de frequência de 100 kHz a 100 mHz com uma perturbação de amplitude de 10 mV em relação ao potencial aplicado de 0,22 V.

3.4 Extração e purificação da lectina ConBr

As sementes da *Canavalia brasiliensis* foram coletadas no município de Acarape, no estado do Ceará. Para a extração da lectina ConBr, as sementes foram moídas em um liquidificador industrial e a farinha obtida foi suspensa em NaCl 0,15 mol L⁻¹ em tampão Tris-HCl 0,10 mol L⁻¹ pH 7,4 e agitada utilizando um *Shaker orbital* a 20 °C durante 4 h para extração das proteínas solúveis. Em seguida, a solução foi centrifugada por 20 minutos a 16000 G a 4 °C (MOREIRA; CAVADA, 1984). O sobrenadante foi filtrado e adicionado à coluna Sephadex® G-50 para iniciar a cromatografia de afinidade (JACQUES *et al.*, 2013).

Inicialmente a coluna foi equilibrada usando uma solução contendo NaCl 0,15 mol L⁻¹, CaCl₂ 5,0 mmol L⁻¹ e MnCl₂ 5,0 mmol L⁻¹ para ativar as lectinas e repor seus minerais Ca²⁺ e Mn²⁺. Em seguida, foi adicionado à coluna uma solução tampão Tris-HCl 0,10 mol L⁻¹ contendo NaCl 0,15 mol L⁻¹ e CaCl₂ 5,0 mmol L⁻¹ para eluir a fração de proteínas não ligadas à fase estacionária (proteínas diferentes da ConBr) (RIEGER *et al.*, 2017). Nesta etapa as alíquotas cromatográficas foram coletadas e monitoradas por espectroscopia eletrônica nas regiões do ultravioleta e visível (UV-Vis) até a banda com máximo em 280 nm atingir absorvância inferior a 0,05 indicando, dessa forma, que não há mais proteínas diferentes da ConBr (MOREIRA;CAVADA, 1984).

Em seguida, para alterar o valor do pH na coluna, adicionou-se uma solução de glicina 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,4) para eluir as moléculas da proteína ConBr anteriormente ligadas à fase estacionária. As frações foram monitoradas por espectroscopia nas regiões do UV-Vis em função do aumento da absorvância em 280 nm até atingir o valor de 0,05. Ao atingir esse valor iniciou-se a coleta de amostras da lectina ConBr. Depois de extraídas, as amostras de ConBr foram dialisadas por dez vezes em água destilada e duas vezes em água deionizada, sendo que o tempo de cada diálise foi de 1 h. E posteriormente, as amostras foram liofilizadas e armazenadas em um recipiente fechado sem umidade e temperatura de 25 °C (WANG, 2000).

A caracterização da proteína foi realizada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate - Polyacrylamide Gel*

Electrophoresis) (CREIGHTON, 1984). Utilizou-se um sistema Mini-Protean II mini-gel (Bio-Rad) com potência de até 5 W, voltagem aproximada de 150 V e amperagem constante de 40 mA. As amostras foram depositadas no gel de poliacrilamida formado por um gel de concentração e um gel de separação. Depois o gel de poliacrilamida foi imerso em solução aquosa de fixação contendo isopropanol 25% e ácido acético 10% (v/v) durante 2 h. Após a fixação das proteínas, adicionou-se o corante comassie R-250. Em seguida, o gel foi descorado com uma solução aquosa de ácido acético 5% e metanol 10%.

3.5 Estudo de fluorescência da ConBr

Estudos envolvendo a lectina DLasiL extraídas de sementes de *Dioclea lasiocarpa* indicam a presença de fluorescência intrínseca e que esta é inibida por supressores como: acrilamida, cloreto de céσιο ou iodeto de potássio (GONDIM *et al.*, 2017). A fluorescência dessa lectina decorre da presença de resíduos de triptofanos em sua estrutura. Como na estrutura da ConBr também há resíduos de triptofano, espera-se que esta lectina também apresente fluorescência e que a interação com manose ou glicose afete a fluorescência da ConBr. Dessa forma, realizaram-se ensaios de espectroscopia de fluorescência para observar se esta lectina de fato apresenta fluorescência e se esta é afetada pela interação com o carboidrato manose.

As medidas de fluorescência foram realizadas utilizando um fluorímetro Photon Technology International, Inc. (Figura 8). Na fluorescência há um processo de transição não radioativa entre dois estados eletrônicos, em que um elétron é excitado do estado fundamental para o estado excitado, este processo é seguido por uma relaxação vibracional do elétron para o nível vibracional mais baixo do estado eletrônico.

Uma radiação excitante com comprimento de onda (λ_{exc}) de 280 nm foi utilizada para irradiar as amostras em uma cubeta de quartzo. Os espectros de emissão foram registrados na faixa de 290 a 420 nm.

Inicialmente, coletou-se espectros para a solução de ConBr 0,24 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e, em seguida, adicionaram-se alíquotas de manose visando avaliar o comportamento da fluorescência intrínseca da ConBr em função da concentração de açúcar no meio. As aquisições foram, então, obtidas para as concentrações finais de 0,16, 0,32, 0,48, 0,64, 0,80 e 0,96 $\mu\text{mol L}^{-1}$ nas temperaturas de 25, 35, 45 e 55°C.

A partir dos resultados de fluorescência calculou-se a constante de associação (K_{ass}) da manose à ConBr.

Figura 8 - Fluorímetro Photon Technology International, Inc.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.6 Preparação do biossensor

O biossensor foi preparado conforme etapas descritas a seguir:

a) Limpeza do eletrodo de ouro

A limpeza consiste em três etapas: (i) Limpeza química – o eletrodo de ouro foi imerso em solução piranha por 2 min depois foi lavado com água. (ii) Limpeza mecânica – posteriormente o eletrodo foi polido com movimentos em forma de oito em uma almofada específica com pasta de óxido de alumínio com o diâmetro de $0,05 \mu\text{m}$. Em seguida, o eletrodo foi imerso em água deionizada e levado a banho ultrassônico por 5 minutos para a remoção de eventuais partículas de óxido de alumínio adsorvidas no eletrodo. (iii) Limpeza eletroquímica – O eletrodo passou pela aplicação de 50 ciclos de variação de potencial de $-0,20$ a $-1,60$ V a $0,5 \text{ V s}^{-1}$ na presença de $\text{KOH } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Esse procedimento foi repetido até a obtenção de um voltamograma com processos bem característicos na região de formação dos óxidos de ouro.

b) Determinação da área eletroquimicamente ativa do eletrodo

O eletrodo de ouro limpo foi submerso em uma solução H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e submetido a varredura cíclica de $+0,2$ a $+1,60$ V a $0,5 \text{ V s}^{-1}$. A área eletroquimicamente ativa do eletrodo (A_{ativa}) foi calculada a partir da área do processo de formação de óxido (BURKE; NUGENT, 1997).

c) Modificação do eletrodo de ouro com o composto bifênílico e imobilização da ConBr

Após a limpeza o eletrodo de ouro foi modificado seguindo procedimentos da literatura (ABREU *et al.*, 2018; BOLLELLA *et al.*, 2017). O eletrodo foi imerso por 1 h em solução HS2BP 10 mmol em acetona a $21 \text{ }^\circ\text{C}$. Após esse período o eletrodo foi submetido a

aquisição de voltametria cíclica e impedância eletroquímica para a caracterização da formação do filme molecular sobre o eletrodo de Au.

d) Imobilização da lectina ConBr

Para a imobilização da ConBr, o eletrodo previamente modificado com composto bifenílico foi imerso por 1 h em solução tampão Tris-HCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) contendo ConBr 10 nmol L^{-1} , sendo que a baixa concentração da ConBr foi necessária para que os resultados das aquisições do biossensor não fossem excedidas. Após a imobilização o eletrodo foi lavado com o tampão Tris-HCl e, em seguida, foram realizados os ensaios de estabilidade e reprodutibilidade do biossensor, também a detecção de carboidratos.

3.6.1 Dessorção redutiva

Os estudos de desorção da SAM do composto HS2BP sobre ouro foram realizados em solução alcalina por meio da técnica de voltametria de varredura linear (LSV do inglês - *Linear Sweep Voltammetry*). Uma varredura linear de potencial de $-0,5$ a $-1,4 \text{ V}$ a $0,05 \text{ V s}^{-1}$ foi realizada no eletrodo Au/HS2BP em solução KOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. A partir da carga (Q) do processo de redução a quantidade de moléculas adsorvidas foi determinada usando a Equação $\Gamma = Q/nFA$ (WALCZAK *et al.*, 1991), onde n é o número de elétrons envolvidos, F é a constante de Faraday e A é a área eletroativa do eletrodo.

3.6.2 Estudo de pKa de superfície

Para a determinação do pKa de superfície da SAM Au/HS2BP, este eletrodo modificado foi submetido a aquisições de voltametria cíclica de $-0,2$ a $0,6$ a $0,015 \text{ V s}^{-1}$ na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução KF $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes valores de pH (ZHAO *et al.*, 1999). O valor de pH das soluções foi ajustado usando HCl ou KOH.

3.7 Detecção dos açúcares

Nesta etapa o eletrodo Au/HS2BP/ConBr foi usado em medidas de impedância eletroquímica para a detecção de glicose e manose.

Ao imobilizar a ConBr sobre o eletrodo de ouro forma-se o biossensor, que em sua extremidade apresenta ConBr com a propriedade de ligar-se especificamente a glicose e/ou

manose. Partindo dessa propriedade, o biossensor pode ser utilizado em ensaios para detecção direta de glicose e manose cujos ensaios são descritos a seguir.

Para a detecção de carboidratos o eletrodo Au/HS2BP/ConBr foi imerso em 2 mL de solução eletrolítica KF 0,5 mol L⁻¹ contendo [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 1,0 mmol L⁻¹ em solução eletrolítica de KF 0,5 mol L⁻¹, em seguida foi realizado VC e IE para obter o voltamograma e a resistência a transferência de carga (R_{CT} do inglês – “*Charge-transfer resistance*”) do biossensor. Para a detecção de carboidrato, na mesma célula foram adicionadas alíquotas de 5 µL de solução de carboidrato e após cada adição foram realizados VC e IE. As concentrações de carboidrato obtidas após a adição foram de 25, 50, 75, 100 e 125 nmol L⁻¹.

3.7.1 Estabilidade e reprodutibilidade do biossensor

Após a formação do biossensor, este foi lavado com água deionizada e impedância eletroquímica foi realizada nas condições já mencionadas. Em seguida o biossensor foi imerso em tampão Tris-HCl pH 7,4, em recipiente fechado e armazenado a 4 °C. A aquisição foi repetida após o período de armazenamento de uma, duas e três semanas.

Para o teste de reprodutibilidade, realizou-se uma série de cinco aquisições (n = 5), sendo que as aquisições foram realizadas em diferentes células eletroquímicas com solução eletrolítica KF 0,5 mol L⁻¹ contendo [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 1,0 mmol L⁻¹ e glicose 25 nmol L⁻¹ cada. O mesmo procedimento foi realizado com a concentração de 125 nmol L⁻¹ de glicose.

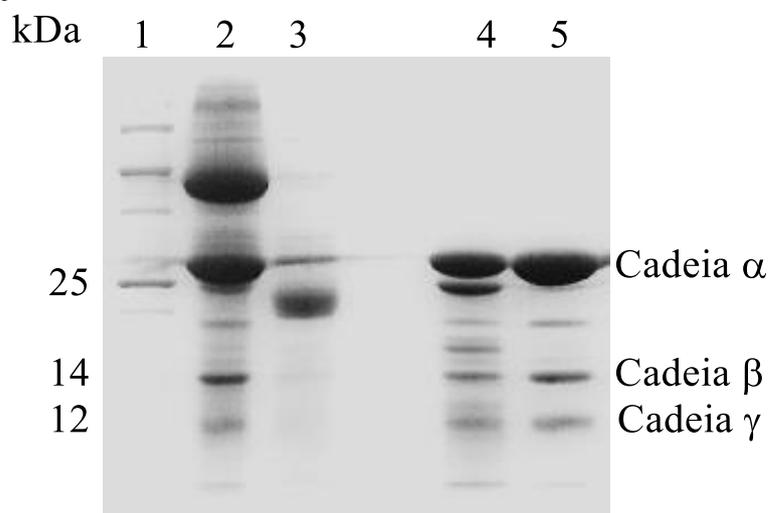
4. RESULTADOS

4.1 Isolamento e purificação da lectina ConBr

A identificação da ConBr, extraída de sementes da espécie *Canavalia brasiliensis*, foi realizada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) (CREIGHTON, 1984). Esta é uma técnica habitualmente aplicada na bioquímica e na biologia molecular para separar e identificar proteínas presentes em uma amostra a partir da sua massa molecular. A separação ocorre através da migração das proteínas pelos poros do gel sob influência de um campo elétrico. Essa migração é afetada principalmente pela forma e tamanho das macromoléculas e os resultados são expressos como bandas destacadas em um gel polimérico. Cada banda representa uma proteína ou uma subunidade em migração sob desnaturação.

A Figura 9 apresenta os resultados de SDS-PAGE para diferentes etapas de purificação da ConBr usando cromatografia em coluna Sephadex® G-50.

Figura 9 – Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida para diferentes etapas da purificação da lectina ConBr extraída de sementes de *Canavalia brasiliensis*



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Na Figura 9, pode-se observar 5 poços; o primeiro poço corresponde ao padrão enquanto os demais poços são referentes a frações resultantes do processo de purificação. No controle (poço 1) onde são utilizadas proteínas de diferentes massas moleculares, encontram-se bandas com valores de massa molecular (kDa) usados como referência. Os poços 2 e 3 correspondem ao extrato bruto das sementes de *Canavalia brasiliensis*, estas correspondem a

primeira e última fração, respectivamente, que contém o material não ligado à fase estacionária, ou seja, todas as proteínas presentes no extrato exceto a ConBr. Por esta razão observa-se uma grande quantidade de bandas oriundas das várias macromoléculas presentes no extrato bruto. Os poços 4 e 5, correspondem as frações do início e o final, respectivamente, da coleta do material que estava ligada à fase estacionária. Observa-se no poço 4 que ainda há impurezas, entretanto, no poço 5 observa-se majoritariamente as bandas atribuídas a cadeia polipeptídica α da lectina com uma massa de aproximadamente 25 kDa e as cadeias β e γ com massa de aproximadamente 14 e 12 kDa, respectivamente. As bandas presentes no último poço indicam, dessa forma, que a purificação da lectina foi bem-sucedida.

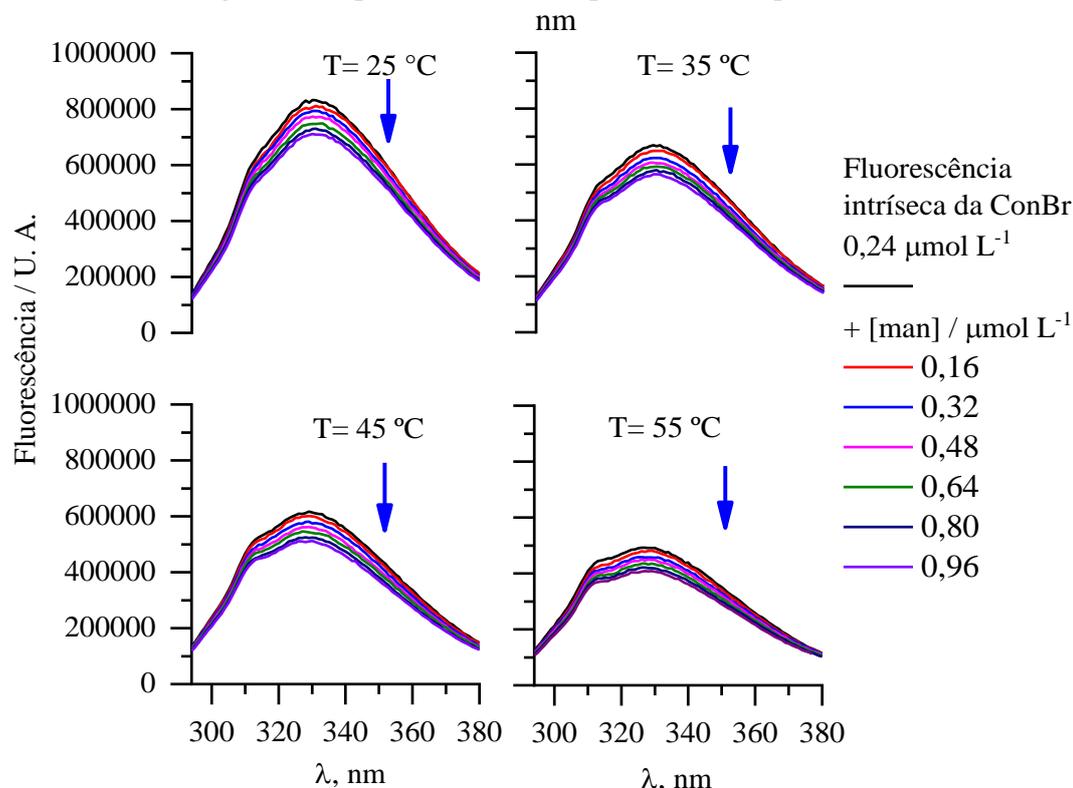
4.2 Fluorescência da ConBr

Por ser uma proteína que contém resíduos do aminoácido aromático triptofano, a ConBr deve apresentar fluorescência intrínseca. Em princípio, o triptofano quando é excitado ocorre uma transferência eletrônica $\pi \rightarrow \pi^*$ dos orbitais do estado fundamental para o estado excitado, ao retornar para o estado fundamental a molécula exibe fluorescência.

Para estudar a fluorescência intrínseca da ConBr e como esta é afetada pela interação da lectina com os carboidratos, realizou-se medidas de espectroscopia de fluorescência da ConBr na ausência e presença de manose em diferentes concentrações e temperaturas cujos resultados são apresentados na Figura 10.

Observa-se nos espectros apresentados na Figura 10, uma banda com máximo de intensidade em 330 nm atribuída a fluorescência intrínseca da ConBr. Como pode ser visto, ocorre uma ligeira supressão desta fluorescência à medida que a concentração do açúcar no meio aumenta. Isso ocorre provavelmente devido à interação da lectina com a manose que afeta a estrutura terciária da ConBr causando, assim, uma supressão da fluorescência (KHAN *et al.*, 1981). Há também uma diminuição da fluorescência intrínseca da ConBr em função do aumento da temperatura. Os resultados de fluorescência indicam que a manose se liga à lectina ConBr conforme esperado.

Figura 10 - Espectros de fluorescência da lectina ConBr na ausência e presença de manose em diferentes concentrações e temperaturas. Em tampão Tris HCl, pH 7,4. Excitado a $\lambda_{exc} = 280$



Fonte: Elaborado pelo Autor.

A partir dos espectros apresentados na Figura 10, determinou-se os valores da constante de associação (K_{ass}) (Tabela 2) para a interação ConBr/manose usando a Equação 2. (BOSE *et al.*, 2016).

$$\text{Log} \left[\frac{(f_0 - f)}{f} \right] = \text{Log} K_{ass} + n \text{Log} [man] \quad (2)$$

onde: f_0 é a intensidade de fluorescência intrínseca da ConBr, f é a intensidade da fluorescência após a adição de manose, n é a estequiometria de ligação e $[man]$ é a concentração de manose em solução.

Utilizando a Equação 2 também pode-se calcular o número de sítios de ligação (n) cujos valores encontram-se na Tabela 2. Os resultados demonstram uma estequiometria de ligação é 1:1 similar aos resultados obtidos para a lectina Litchi. (BOSE *et al.*, 2016)

Os gráficos de $\text{Log} [(f_0 - f)/f] \times \text{Log} [man]$ para diferentes temperaturas são apresentados na Figura 11 e os valores de K_{ass} obtidos são apresentados na Tabela 2. Os valores de K_{ass} relativamente elevados indicam que no equilíbrio da reação química o produto lectina/carboidrato é favorecido. Observa-se também que o aumento de temperatura de 25 a 45 °C acarreta no aumento do valor de K_{ass} , indicando que a associação da manose à ConBr é um

processo endotérmico. Este resultado é oposto ao obtido para a lectina litchi cujo a associação a maltose tem uma variação de entalpia negativa, ou seja, é um processo exotérmico. (BOSE *et al.*, 2016)

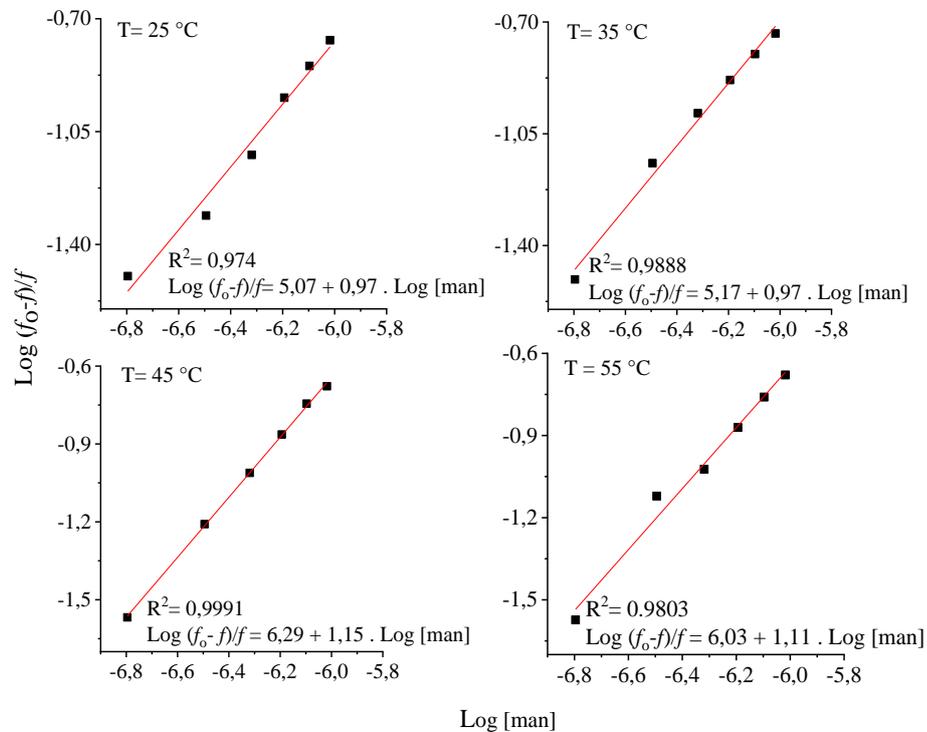
O valor da constante obtido para 55 °C não seguiu a tendência observadas para temperaturas mais baixas. Esse resultado resulta provavelmente de mudanças estruturais drásticas na proteína a partir dessa temperatura.

Tabela 2 – Valores das constantes de associação (K_{ass}) e número de sítios de ligação (n) para associação de carboidrato à lectina em diferentes temperaturas por espectroscopia de fluorescência

Temperatura / °C	Maltose/Litchi		Manose/ConBr	
	$K_{ass}/10^5$	n	$K_{ass}/10^4$	n
25	4,9	0,9	1,2	1,0
35	3,3	0,9	1,5	1,0
45	2,2	0,8	19,4	1,1
55	1,6	0,8	10,7	1,1
Referência	(BOSE <i>et al.</i> , 2016)		Este trabalho	

Fonte: Elaborado pelo Autor.

Figura 11 – Gráficos da relação $\text{Log}(f_0-f)/f \times \text{Log}[\text{man}]$ em diferentes temperaturas



Fonte: Elaborado pelo Autor.

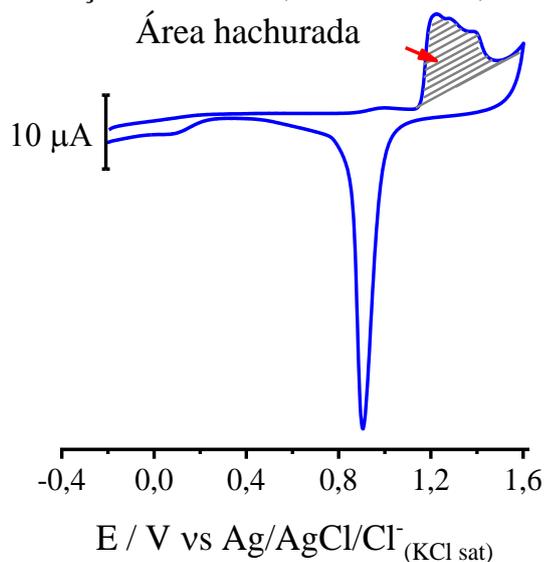
4.3 Preparação do biossensor

Após serem realizados estudos sobre a ConBr realizou-se a preparação do biossensor impedimétrico baseado na ConBr e os resultados das etapas de preparação são apresentados a seguir.

4.3.1 Limpeza do eletrodo de ouro

A limpeza do eletrodo é a etapa inicial e crucial para a formação do biossensor. Uma limpeza adequada é necessária para que as aquisições do biossensor sejam reprodutíveis. A Figura 12 apresenta o voltamograma característico do eletrodo de Au policristalino na presença de ácido sulfúrico (H_2SO_4) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 12 - Voltamograma do eletrodo de ouro policristalino (área geométrica = $0,0314 \text{ cm}^2$) em solução de H_2SO_4 $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ a $0,1 \text{ V s}^{-1}$

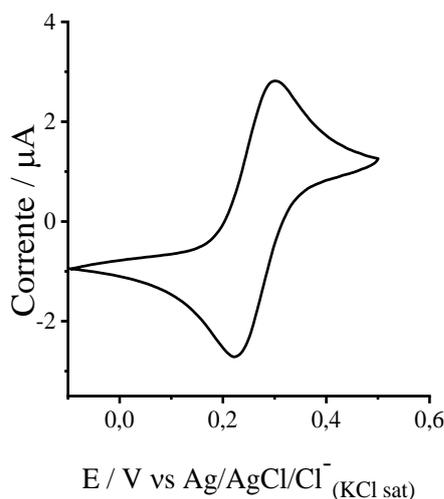


Fonte: Elaborado pelo Autor.

Na Figura 12, pode-se observar, na faixa de potencial de 1,0 a 1,5 V, o processo que corresponde a formação dos óxidos de ouro. A partir do valor da área hachurada ilustrada na Figura 12, pode-se determinar a área eletroquimicamente ativa (A_{ativa}) do eletrodo sabendo que a carga por unidade de área relacionada à formação de óxido do ouro policristalino é de $390 \mu\text{C cm}^2$ (TRASATTI; PETRII, 1991). O valor de A_{ativa} foi calculado antes de cada modificação para posterior normalização dos resultados.

Após a limpeza e determinação da A_{ativa} , um VC (Figura 13) para o eletrodo de ouro limpo, na presença de KF $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi obtido para avaliar os processos de oxidação e redução do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

Figura 13 – Voltamograma na faixa de $-0,1$ a $0,5 \text{ V}$ a $0,05 \text{ V s}^{-1}$ do eletrodo de Au em solução KF $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$

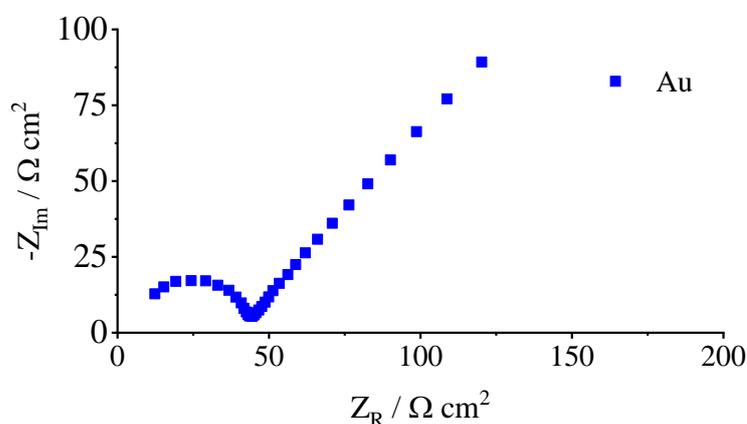


Fonte: Elaborado pelo Autor.

O potencial de meia onda, $E_{1/2}$, foi determinado como $0,22 \text{ V}$ sendo coerente com o valor esperado para o par redox ferri/ferro (CHAILAPAKUL; CROOKS, 1995).

Medidas de impedância eletroquímica também foram realizadas para o eletrodo limpo em solução eletrolítica de KF $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ como espécies eletroativas em uma faixa de frequência de 100 mHz a 100 kHz , cujo resultado é apresentado na Figura 14.

Figura 14 – Diagrama de Nyquist do eletrodo de Au em solução KF $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$



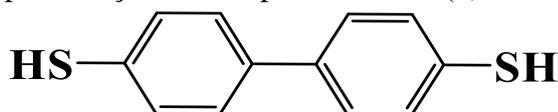
Fonte: Elaborado pelo Autor.

O valor da resistência de transferência de carga (R_{CT}) entre o eletrodo de Au limpo e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ foi determinado como $40 \Omega \text{ cm}^2$ a partir do diâmetro do arco capacitivo observado na região de maior frequência ilustrado na Figura 14. O diagrama apresentado na Figura 14 foi usado como referência para o eletrodo de Au limpo. Dessa forma, a modificação do eletrodo somente foi realizada após a reprodução desse diagrama.

4.3.2 Formação da SAM de HS2BP sobre ouro

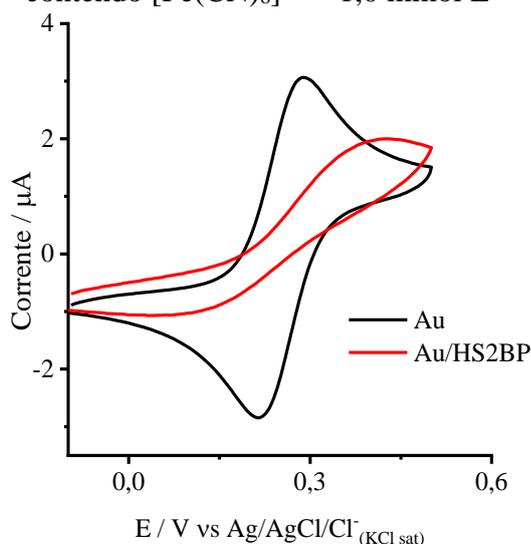
A modificação do eletrodo consistiu na formação de um filme sobre o eletrodo pela auto-montagem de moléculas do composto HS2BP (Figura 15) sobre a superfície do eletrodo de Au. A formação do filme gera uma barreira parcial para transferência de carga entre eletrodo de Au e a espécie de prova, isso pode ser caracterizado por voltametria cíclica conforme apresentado na Figura 16.

Figura 15 – Representação do composto HS2BP (4,4'-dimercaptobifenil)



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Figura 16 – Voltamogramas na faixa de $-0,1$ a $0,5 \text{ V}$ a $0,05 \text{ V s}^{-1}$ do eletrodo de Au antes e após a modificação com o composto HS2BP, aquisição realizada em solução KF $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$

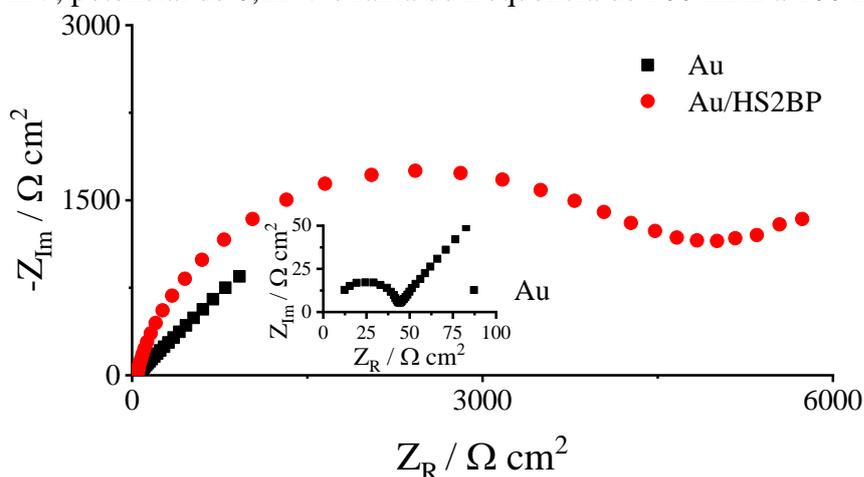


Fonte: Elaborado pelo Autor.

Na Figura 16, observa-se os voltamogramas do eletrodo de Au limpo e do eletrodo modificado (Au/HS2BP). Para o eletrodo de Au, observa-se os potenciais de oxidação e redução característicos das espécies de prova, já no voltamograma do eletrodo Au/HS2BP apresentou uma diminuição das correntes de pico e um aumento de ΔE em comparação ao eletrodo de Au limpo. O recobrimento da superfície do eletrodo por moléculas adsorvidas diminui a transferência de carga entre as espécies de prova e o eletrodo, provocando aumento na resistência a transferência de carga (R_{CT}) (BERTOK *et al.*, 2019; HUANG *et al.*, 2019). Isso ocorre devido à formação do filme que consequentemente bloqueia parcialmente a transferência de carga. A formação do filme molecular também foi caracterizada por impedância eletroquímica cujo resultado pode ser observado na Figura 17.

O diagrama de Nyquist referente ao eletrodo após uma hora de modificação com o composto HS2BP demonstra na região de mais alta frequência a formação de um arco capacitivo. Este arco é maior que aquele formado para a aquisição de impedância do eletrodo de Au, pois o diagrama do eletrodo Au/HS2BP apresenta um maior valor de R_{CT} , pois há uma maior dificuldade na transferência de carga entre o eletrodo e as espécies de prova.

Figura 17 – Diagrama de Nyquist do eletrodo Au/HS2BP após uma hora de modificação, IE realizado em solução KF 0,5 mol L⁻¹ contendo [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 1,0 mmol L⁻¹. Em amplitude de 10 mV, potencial de 0,22 V e faixa de frequência de 100 mHz a 100 kHz



Fonte: Elaborado pelo Autor.

A formação do filme sobre a superfície do eletrodo de Au não bloqueia completamente a transferência de carga. A transferência ocorre provavelmente através dos defeitos existente na monocamada que permitem a aproximação da espécie de prova (ABREU *et al.*, 2017; SABATANI; RUBINSTEIN, 1987; VERICAT *et al.*, 2014).

Considerando que a transferência de carga do processo redox das espécies de prova ocorre pelos sítios ativos, pode-se calcular a taxa de recobrimento superficial (θ) do eletrodo de Au usando a Equação 3 (SABATANI; RUBINSTEIN, 1987).

$$\theta = 1 - \frac{R_{CT}}{R_{CT}^*} \quad (3)$$

onde R_{CT} e R_{CT}^* são, respectivamente, os valores de resistência a transferência de carga para o ouro limpo e a superfície modificada obtidos a partir do diagrama de Nyquist. Também a partir dos resultados de impedância foi possível calcular a constante aparente de velocidade de reação heterogênea de transferência de elétrons (k_{app}) pela Equação 4 (SABATANI; RUBINSTEIN, 1987):

$$k_{app} = \frac{RT}{F^2 R_{CT}^* C^*} \quad (4)$$

onde R é a constante universal dos gases ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T é a temperatura (K), F é a constante de Faraday ($96485,33 \text{ C mol}^{-1}$), R_{CT}^* é a resistência a transferência de carga para o ouro modificado e C^* é a concentração do par redox (mol cm^{-3}). Os valores obtidos são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros impedimétricos do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em função do eletrodo de ouro limpo e modificado, aquisição em solução eletrolítica: KF $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a $21 \text{ }^\circ\text{C}$

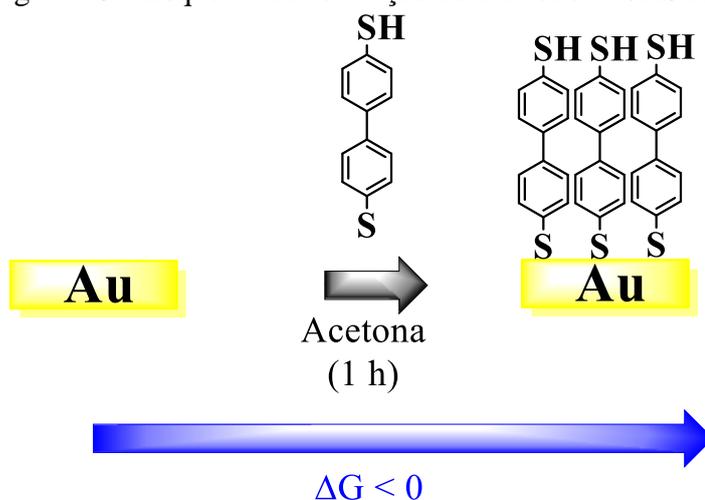
Eletrodo	Tempo de imersão (min)	R_{CT} ($\Omega \text{ cm}^2$)	θ	$k_{app} \times 10^{-4}$ cm s^{-1}
Au	-	45,0	-	58,3
Au/HS2BP	60	5110	0,991	0,510

Fonte: Elaborado pelo Autor.

Os resultados presentes na Tabela 3 indicam que após 1 h de imersão, o recobrimento superficial do eletrodo com o composto HS2BP atingiu quase a área total do eletrodo. Consequentemente a velocidade de reação heterogênea de transferência de elétrons, diminui drasticamente em relação ao eletrodo de Au limpo.

Os resultados de VC e impedância confirmam a formação da camada de HS2BP sobre o eletrodo com elevada cobertura superficial após uma 1 h de imersão. O processo de adsorção espontâneo da espécie HS2BP é ilustrado na Figura 18.

Figura 18 – Esquema de formação do eletrodo Au/HS2BP

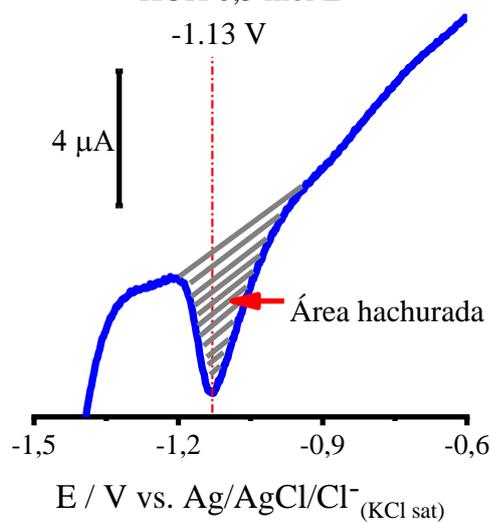


Fonte: Elaborado pelo Autor.

4.3.2.1 Dessorção redutiva

A força de ligação Au-S entre o eletrodo de Au e HS2BP foi avaliada pelo potencial de dessorção redutiva, que corresponde o valor de potencial redução, $E_{dr} = -1,13$ V, da ligação ouro/enxofre. O voltamograma de varredura linear para o eletrodo Au/HS2BP em solução KOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ em uma faixa de potencial de $-0,2$ a $-1,6$ V a $0,05 \text{ V s}^{-1}$ é apresentado na Figura 19.

Figura 19 – Voltamograma de varredura linear (LSV) de $-0,2$ a $-1,6$ V a $0,05 \text{ V s}^{-1}$ para o eletrodo de ouro modificado por uma hora com HS2BP em acetona, aquisição realizada em KOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$



Fonte: Elaborado pelo Autor.

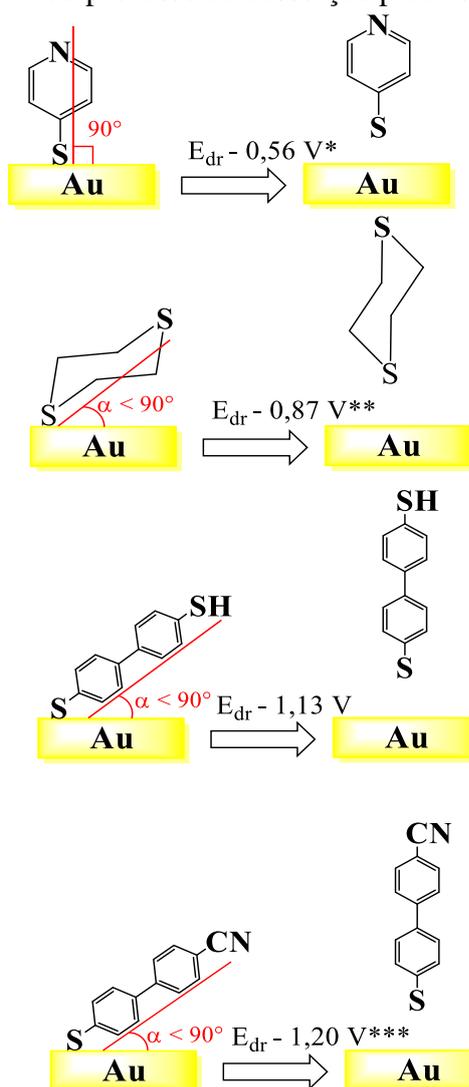
Como pode ser observado na Figura 19, o potencial de dessorção redutiva (E_{dr}) tem valor de $-1,13V$. Quando comparado a outras moléculas como 4-mercaptopiridina (pyS) e 1,4-ditiano adsorvidos no eletrodo de Au, com tempo de imersão em 1 h, cujos valores de E_{dr} são $-0,56$ e $-0,87$ V (DE O. PINHEIRO *et al.*, 2010; PAULO; DIÓGENES; ABRUÑA, 2011), respectivamente, o valor de E_{dr} para HS2BP é significativamente mais negativo, indicando, dessa forma, uma interação mais forte. Para pyS é atribuído a uma interação sigma desta espécie com a superfície do ouro, pois as moléculas adsorvidas (Figura 20) apresentam uma orientação perpendicular à superfície do ouro (NOGUEIRA DIÓGENES *et al.*, 2002). A SAM de 1,4-ditiano apresenta um valor mais negativo de E_{dr} que pyS. Dessa forma, uma adicional interação π favorecida pela inclinação $< 90^\circ$ das moléculas em relação a superfície (ABREU *et al.*, 2018). A Figura 20 mostra a orientação e a dessorção de algumas moléculas sob o eletrodo de ouro. A SAM formada pelo composto HS2BP sobre o eletrodo de ouro tem um valor de E_{dr} ainda mais negativo que os compostos supracitados. O valor observado é comparável aos obtidos para o composto bifenílico 4-mercaptobifenilcarbonitila (HSBPCN) (Tabela 4). Esses valores bem negativos, segundo a literatura (PAULO *et al.*, 2008), são consequência da orientação inclinada que permite interações π (ABREU *et al.*, 2018). Além disso, as interações laterais (ABREU *et al.*, 2018) (π -stacking) entre os anéis aromáticos resulta em um empacotamento denso e estabilizam o filme molecular dificultando em parte a dessorção. Esta conclusão está de acordo com relatórios anteriores (WALCZAK *et al.*, 1991) sobre o estudo de feniltiol SAM em que propuseram que interações intermoleculares mais fortes em SAM densamente carregadas aumentam a estabilidade e consequentemente, desloca o potencial de dessorção para valores mais negativos. Por meio dos resultados de dessorção redutiva determinou-se a quantidade de moléculas adsorvidas no eletrodo por meio da Equação 5.

$$\Gamma = \frac{Q_{dr}}{nFA_{ativa}} \quad (5)$$

onde Γ é a quantidade de moléculas adsorvidas sobre a superfície, Q_{dr} é a carga do processo de dessorção redutiva, n é o número de elétrons da reação de redução que neste caso é 1, F é a constante de Faraday (96485 C mol^{-1}), Q_{dr} pode ser obtido a partir da razão entre a área do processo referente à dessorção redutiva e a velocidade de varredura.

A partir do resultado de LSV, obteve-se o valor de $Q_{dr} = 4,97 \times 10^{-6} \text{ C cm}^2$ e consequentemente um valor de $\Gamma = 3,03 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$. Quando comparado a outras moléculas como HSBPCN e 5-(4-piridil)-1,3,4-oxadiazol-2-tiol (Hpyt), o HS2BP tem o valor de E_{dr} , adsorvido no eletrodo de Au, semelhante aos dos compostos sulfurados, como mostra a Tabela 4.

Figura 20 – Esquema do processo de dessorção para compostos sulfurados



Fonte: Elaborado pelo autor.

* referência (DE O. PINHEIRO *et al.*, 2010), ** referência (PAULO; DIÓGENES; ABRUÑA, 2011) e *** referência (ABREU *et al.*, 2018).

Tabela 4 – Valores de potenciais de dessorção redutiva (E_{dr}) e recobrimento superficial (Γ) das SAM de Hpyt, HSBPCN e HS2BP sobre ouro obtidos por dessorção redutiva em meio alcalino, em LSV na faixa de $-0,2$ a $-1,6$ V a $0,05$ V s^{-1} em KOH $0,5$ mol

SAM	E_{dr} (V)	Γ ($\times 10^{-10}$ mol cm^{-2})	Referência
Hpyt	-0,56	4,3	(PAULO <i>et al.</i> , 2008)
HSBPCN	-1,20	1,8	(ABREU <i>et al.</i> , 2018)
HS2BP	-1,13	3,0	este trabalho

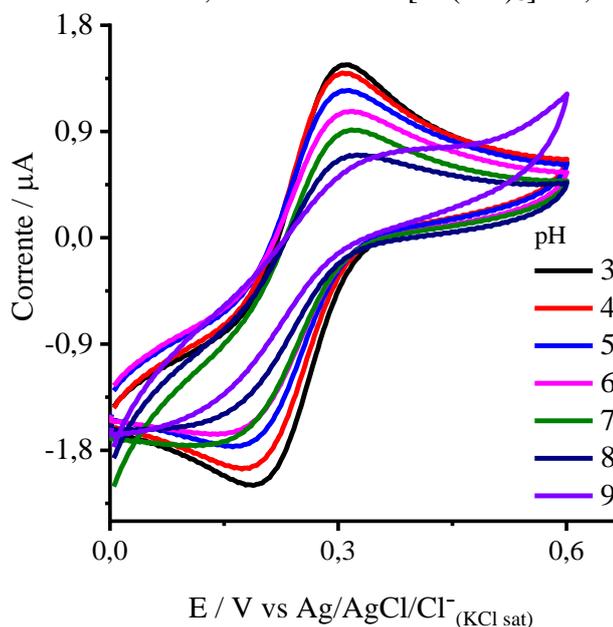
Fonte: Elaborado pelo Autor.

4.3.2.2 Estudo de pKa de superfície do filme molecular

O grupo terminal do modificador determina as propriedades das SAM. O composto HS2BP tem -SH como grupo terminal. Entretanto, este grupo pode perder o hidrogênio dependendo do valor de pH do meio, deixando a monocamada com densidade de carga negativa. A densidade de carga na superfície da SAM pode ser manipulada de acordo com o pH do meio. Dessa forma, a determinação do pKa de superfície da SAM é importante para o planejamento das condições experimentais de ensaios para a SAM Au/HS2BP (PAULO; DIÓGENES; ABRUÑA, 2011; ZHAO *et al.*, 1999).

O valor de pKa de superfície da SAM pode ser estimado medindo a corrente de pico (i_p) de um dado par redox em tampão em função do valor de pH (PAULO; DIÓGENES; ABRUÑA, 2011; ZHAO *et al.*, 1999). Os voltamogramas para o SAM na presença do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ em diferentes valores de pH são apresentados na Figura 21.

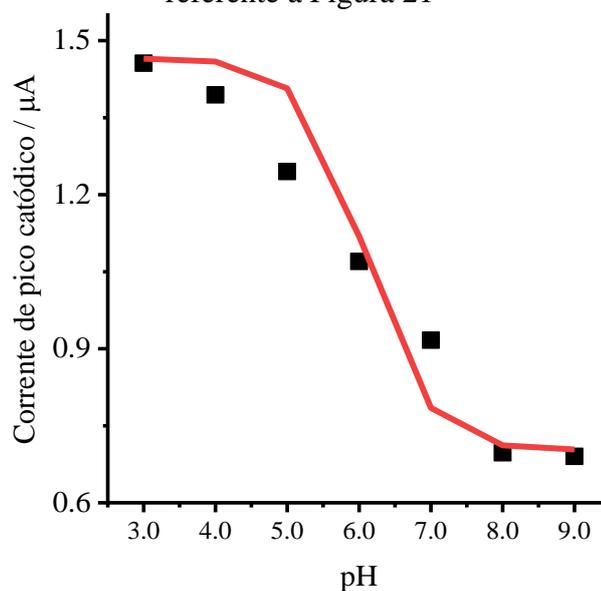
Figura 21 – Voltamograma na faixa de $-0,1$ a $0,6$ V a $0,015$ V s^{-1} do eletrodo Au/HS2BP em solução eletrolítica KF $0,5$ mol L^{-1} com $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $0,5$ mmol L^{-1}



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Como pode ser visto na Figura 21, o aumento do valor de pH dificulta a transferência de carga entre o eletrodo e as espécies de prova. Isso pode ser inferido pela diminuição da corrente de pico e do processo redox. O gráfico da corrente de pico catódico em função do pH é apresentado na Figura 22.

Figura 22 – Valores das correntes de pico catódico em função do pH da solução eletrolítica referente a Figura 21



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Observa-se na Figura 22 que a corrente de pico catódica é máxima (i_{AH}) quando a monocamada se encontra protonada, visto que o grupo tiól não apresenta repulsão eletrostática a espécie de prova negativamente carregada. Ao passo que se aumenta o valor do pH, parte das moléculas na superfície desprotonam, e a carga negativa na SAM resulta em uma repulsão entre a monocamada e o ferri/ferro como ilustrado na Figura 23.

O pKa de superfície de uma monocamada pode ser definido como o equilíbrio de ionização do grupo terminal da monocamada, de acordo com a Equação 6 (PAULO; DIÓGENES; ABRUÑA, 2011; ZHAO *et al.*, 1999) abaixo:

$$pKa = pH + \log \left(\frac{[AH]}{[A^-]} \right) \quad (6)$$

onde $[A^-]$ e $[AH]$ são as concentrações (mol L^{-1}), respectivamente, das espécies desprotonadas e protonadas.

Assumindo que a corrente total aparente (i) do íon $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ é constituída do somatório das respostas atribuídas à monocamada dissociada $[A^-]$ e não dissociada $[AH]$, então a expressão de i pode ser descrita como: (ZHAO *et al.*, 1999)

$$i = i_{A^-}[A^-] + i_{AH}[AH] \quad (7)$$

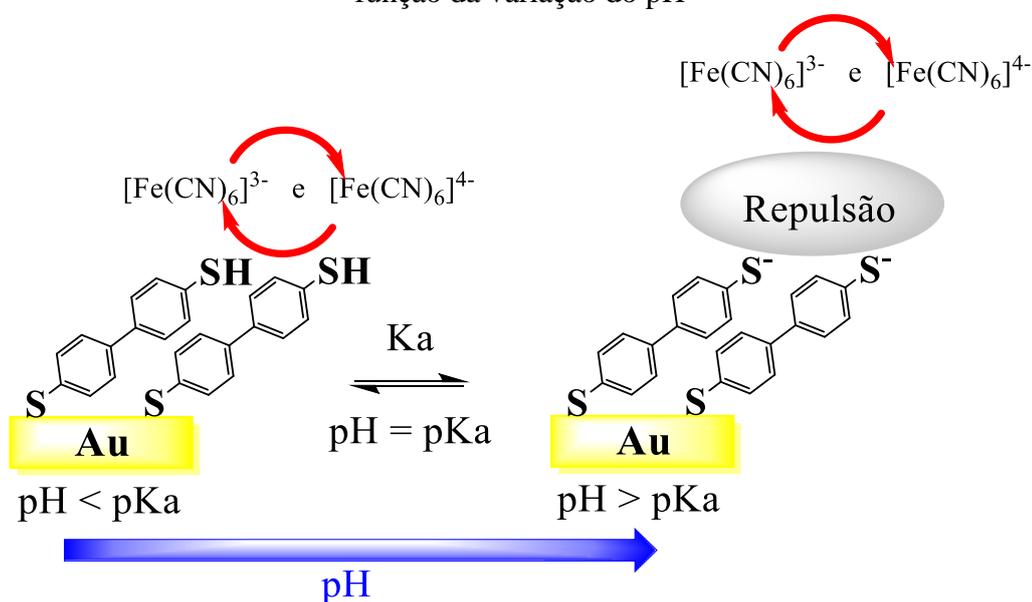
onde i_{A^-} e i_{AH} correspondem às correntes de pico da espécie de prova para a superfície desprotonada $[A^-]$ e protonada $[AH]$, respectivamente. Neste caso, $[AH]$ representa a concentração de moléculas adsorvidas ou recobrimento superficial. Admitindo-se que o

recobrimento superficial máximo é igual a 1 (100%), tem-se que $[A^-] + [AH] = 1$. Usando essa expressão e as Equações 7 e 8, a seguinte equação é obtida:

$$pKa = pH - \log \left[\left(\frac{i_{AH} - i_{A^-}}{i - i_{A^-}} \right) - 1 \right] \quad (8)$$

onde i_{A^-} e i_{AH} podem ser determinadas pelos valores médios obtidos nos diferentes patamares da curva i versus pH. O valor de pKa foi determinado como 6,1 a partir do gráfico de i vs. pH (Figura 22) e a Equação 8.

Figura 23 – Comportamento do eletrodo Au/HS2BP e das espécies de prova $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em função da variação do pH

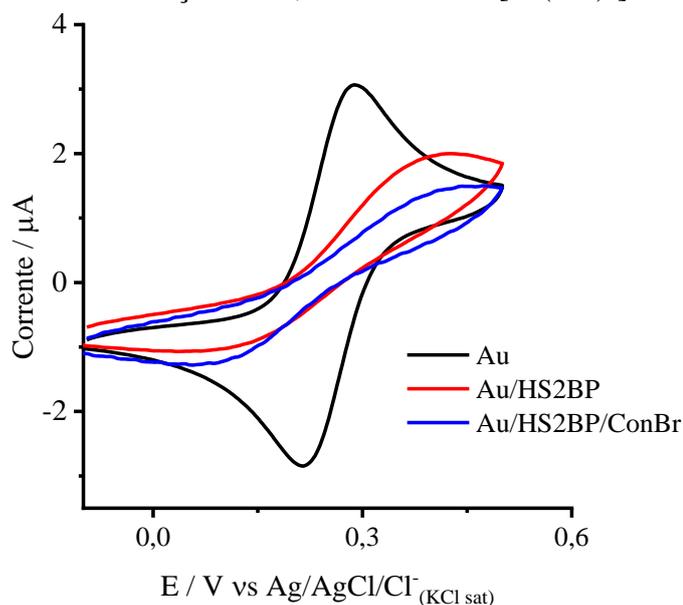


Fonte: Elaborado pelo Autor.

4.3.3 Imobilização da ConBr sobre o filme molecular

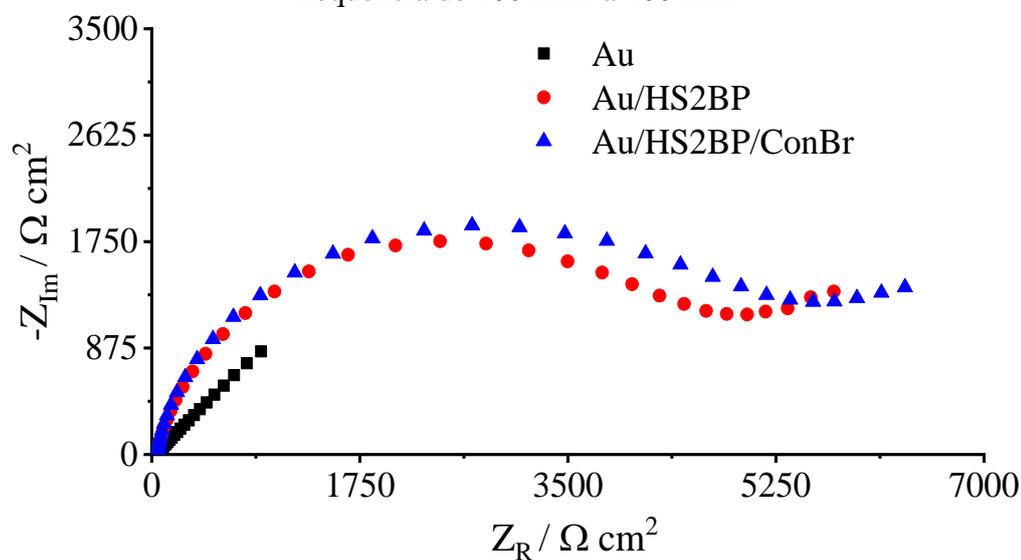
Após a formação do eletrodo Au/HS2BP, a ConBr foi imobilizada espontaneamente em sua superfície. A caracterização das etapas de formação do biossensor foi realizada por meio da técnica de VC e IE cujos resultados são apresentados nas Figuras 24 e 25.

Figura 24 – Voltamograma na faixa de $-0,1$ a $0,5$ V a $0,05$ V s $^{-1}$ do eletrodo Au/HS2BP/ConBr em solução KF $0,5$ mol L $^{-1}$ com $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0$ mmol L $^{-1}$



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Figura 25 – Diagrama de Nyquist do eletrodo Au/HS2BP/ConBr em solução KF $0,5$ mol L $^{-1}$ com $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0$ mmol L $^{-1}$. Em amplitude de 10 mV, potencial de $0,22$ V e faixa de frequência de 100 mHz a 100 kHz



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Os voltamogramas apresentados na Figura 24 mostram uma diminuição da corrente de pico e da carga do processo redox após cada etapa de preparação do biossensor. Estes resultados indicam que a lectina foi imobilizada sobre o eletrodo Au/HS2BP.

Adicionalmente, os diagramas de Nyquist obtidos após cada etapas de preparação do biossensor reforçam a imobilização da proteína visto o aumento do valor de R_{CT} , na Tabela 5, após cada etapa.

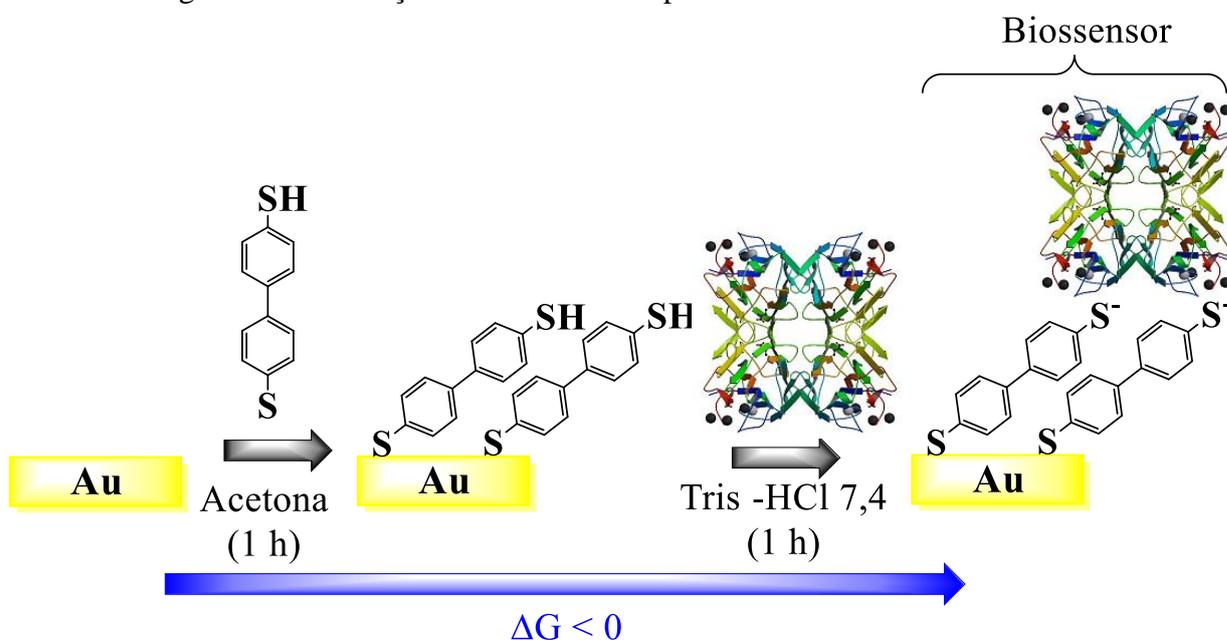
Tabela 5 – Valores de R_{CT} do eletrodo durante a formação do biossensor

Eletrodo	R_{CT} ($\Omega \text{ cm}^2$)
Au	$41 \pm 1,5$
Au/HS2BP	5110 ± 32
Au/HS2BP/ConBr	5800 ± 369

Fonte: Elaborado pelo Autor.

A modificação de HS2BP sobre a superfície do eletrodo de Au e a imobilização da ConBr são etapas termodinamicamente favoráveis, em que as moléculas se organizam espontaneamente sobre o metal como ilustrado na Figura 26. Uma vez preparado o eletrodo Au/HS2BP/ConBr, este pode ser utilizado como biossensor para a detecção dos carboidratos manose e glicose. Visto que a ConBr interage especificamente e reversivelmente a estes açúcares.

Figura 26 – Formação do biossensor impedimétrico baseado em ConBr

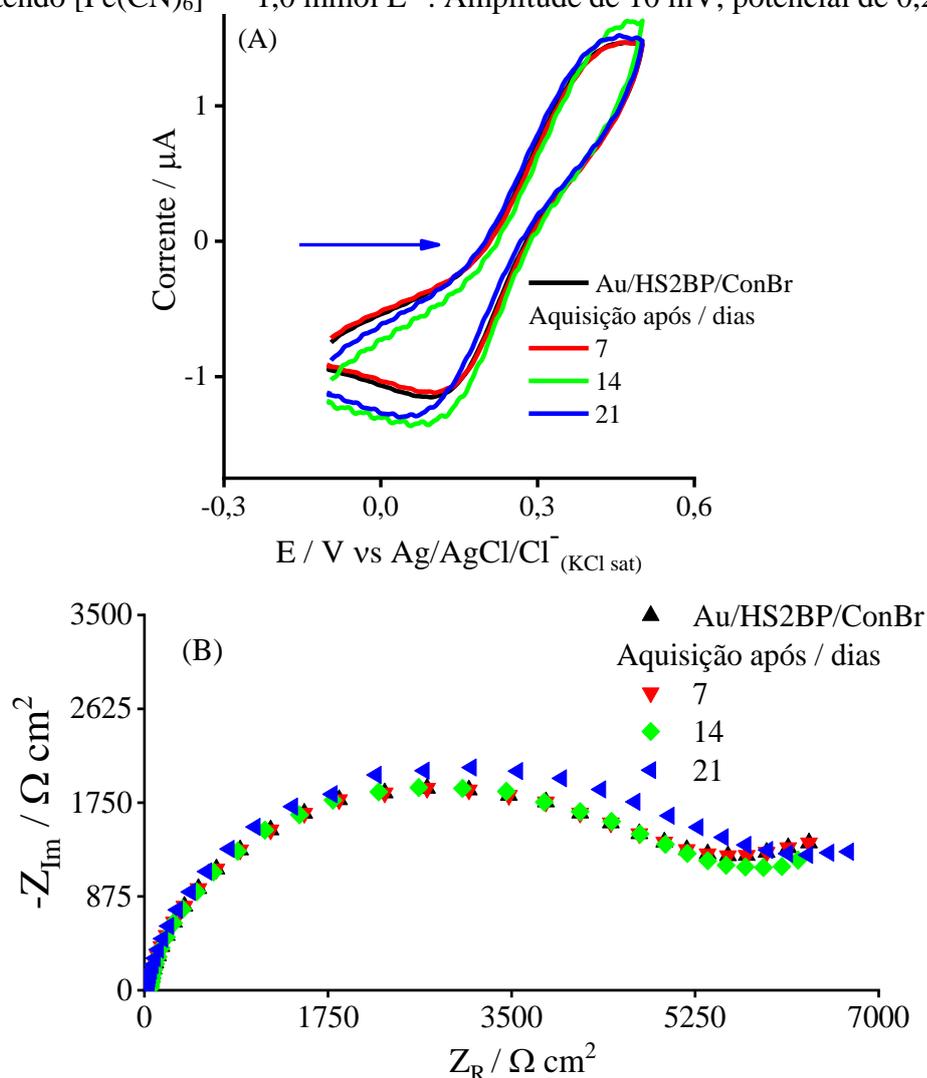


Fonte: Elaborado pelo Autor.

4.4 Estabilidade do biossensor Au/HS2BP/ConBr

A fim de avaliar a estabilidade do biossensor após longo tempo de armazenamento em tampão Tris-HCl pH 7,4 a 4 °C, realizou-se aquisições de VC e de impedância eletroquímica a cada semana até durante o período de 3 semanas. Sendo que após cada aquisição o eletrodo foi armazenado nas condições supracitadas. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 27.

Figura 27 – (A) Voltamograma na faixa de $-0,1$ a $0,5$ V a $0,05$ V s⁻¹ e (B) Diagrama de Nyquist do eletrodo Au/HS2BP/ConBr após sua construção em solução KF $0,5$ mol L⁻¹ contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-4-}$ $1,0$ mmol L⁻¹. Amplitude de 10 mV, potencial de $0,22$ V



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Como pode ser constatado na Figura 27(A), os VCs não foram afetados de forma significativa durante as três semanas. Na Figura 27(B), são apresentados os diagramas de

Nyquist obtidos a cada semana. Os valores de R_{CT} s determinados a partir dos diagramas durante o teste de estabilidade são apresentados na Tabela 5.

Na Tabela 6 também foram apresentados os valores de desvio padrão relativo “RSD do inglês - *Relative Standard Deviation*”. Esse parâmetro pode ser usado para avaliar a reprodutibilidade e a precisão de um biossensor (CHO; PARK, 2019; KAUSHIK *et al.*, 2018; MAHMOUD *et al.*, 2019; YOON *et al.*, 2019). O valor de RSD de um biossensor é obtido usando a Equação 9.

$$RSD = \frac{(\text{desvio padrão de } R_{CT} \times 100)}{\text{média de } R_{CT}} \quad (9)$$

Analisando os resultados obtido por impedância, pode-se inferir que, similarmente ao que foi observado nas medidas de VC, a resposta do sensor permaneceu praticamente constante (Tabela 6) nas duas primeiras semanas e um pequeno aumento no valor de R_{CT} ocorreu na terceira semana. Os valores de R_{CT} são aproximados e os valores de RSD da primeira e segunda semana estão abaixo de 5%, isso demonstra que o biossensor foi preciso e estável após as duas primeiras semanas. Já na terceira semana, o valor de RSD um pouco maior que 5% indica que o biossensor aparentemente começa a perder sua capacidade de leitura com precisão.

Tabela 6 – Valores de R_{CT} do biossensor após a sua construção por determinados períodos

Período (dias)	R_{CT} ($\Omega \text{ cm}^2$)	RSD (%)
0	5737	-
7	5854	1,4
14	5747	0,1
21	6217	6,3

Fonte: Elaborado pelo Autor.

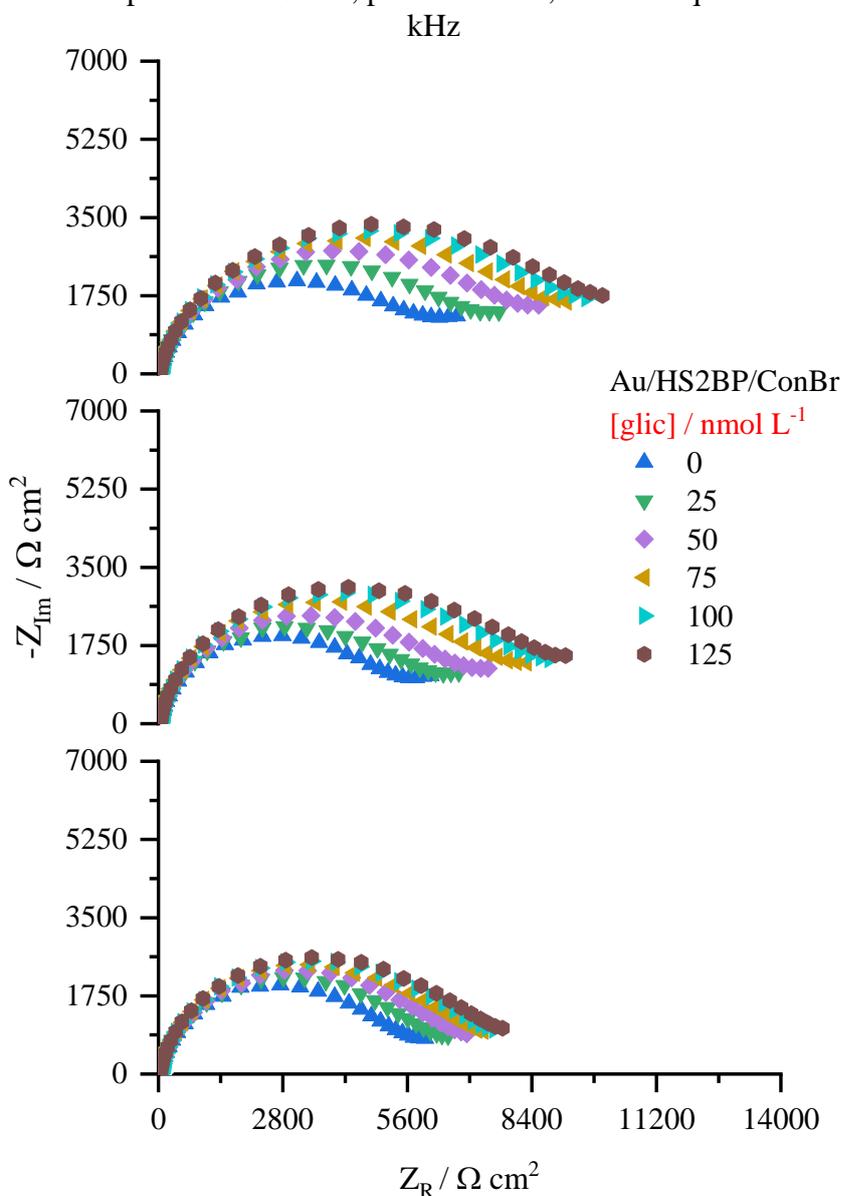
4.5 Detecção de açúcar

Para avaliar se a ConBr preserva sua capacidade de interagir com os carboidratos manose e glicose após a imobilização, foram realizadas medidas de CV e IE na presença das espécies $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ e desses carboidratos em diferentes concentrações. Na Figura 28 são apresentados os diagramas de Nyquist realizados em triplicata para o biossensor na detecção de glicose em diferentes concentrações. O aumento da concentração do açúcar no meio ocasiona o aumento do arco capacitivo, ou seja, aumento da resistência de transferência de elétrons

(Tabela 7). Esse aumento dos valores de R_{CT} ocorrem devido à adsorção da glicose na superfície do biossensor que dificulta a transferência de carga entre a superfície do ouro e as espécies de prova.

Os resultados indicam que a ConBr imobilizada no eletrodo Au/HS2BP não perde suas propriedades, dessa forma, o eletrodo Au/HS2BP/ConBr tem a capacidade de detectar a presença de glicose no meio.

Figura 28 – Diagramas de Nyquist do biossensor após adição de alíquotas de glicose. Aquisições obtidas em solução eletrolítica de KF $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Em amplitude de 10 mV, potencial de 0,22 V e frequência de 100 mHz a 100 kHz



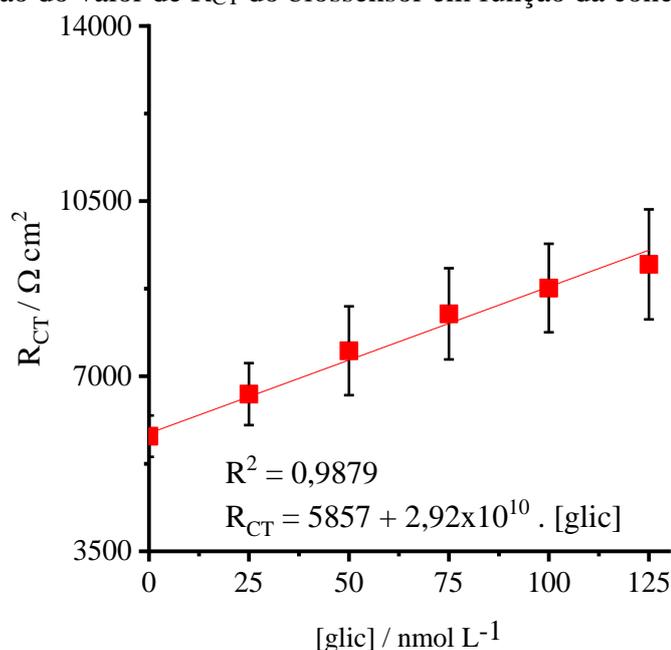
Fonte: Elaborado pelo Autor.

Tabela 7 - Valores de R_{CTs} do eletrodo Au/HS2BP/ConBr na detecção de glicose

[glicose] /nmol L ⁻¹	Eletrodo Au/HS2BP/ConBr		
	1º ensaio R_{CT} (Ω cm ²)	2º ensaio R_{CT} (Ω cm ²)	3º ensaio R_{CT} (Ω cm ²)
0	6277	5567	5556
25	7351	6377	6198
50	8522	7123	6877
75	9204	8145	7389
100	9661	8730	7892
125	10295	9311	8097

Fonte: Elaborado pelo Autor.

Avaliando a resposta analítica do biossensor, percebe-se que as médias dos valores R_{CT} apresentaram uma tendência linear na faixa de concentração de 25 a 125 nmol L⁻¹ conforme pode ser observado na Figura 29.

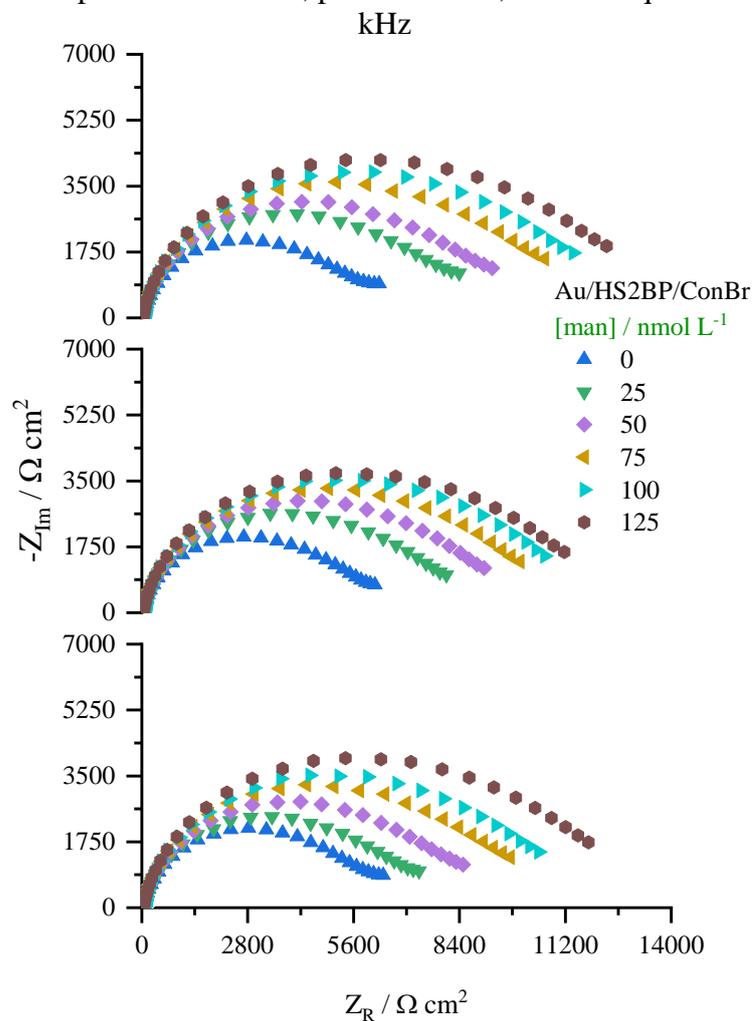
Figura 29 – Variação do valor de R_{CT} do biossensor em função da concentração de glicose

Fonte: Elaborado pelo Autor.

O mesmo ensaio de IE foi realizado para a detecção do carboidrato manose conforme pode ser visto na Figura 30.

A resposta para a manose foi similar ao observado para a glicose. Analisando os diagramas de Nyquist, observa-se que há um aumento do arco capacitivo e conseqüentemente um aumento dos valores de R_{CT} ao passo que se aumenta a concentração do açúcar em solução. Os valores de R_{CT} apresentados na Tabela 8 também apresentaram uma relação linear em função do aumento da concentração do açúcar como pode ser observado na Figura 31.

Figura 30 – Diagramas de Nyquist do biossensor após adição de alíquotas de manose. Aquisições obtidas em solução eletrolítica de KF $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Em amplitude de 10 mV, potencial de 0,22 V e frequência de 100 mHz a 100



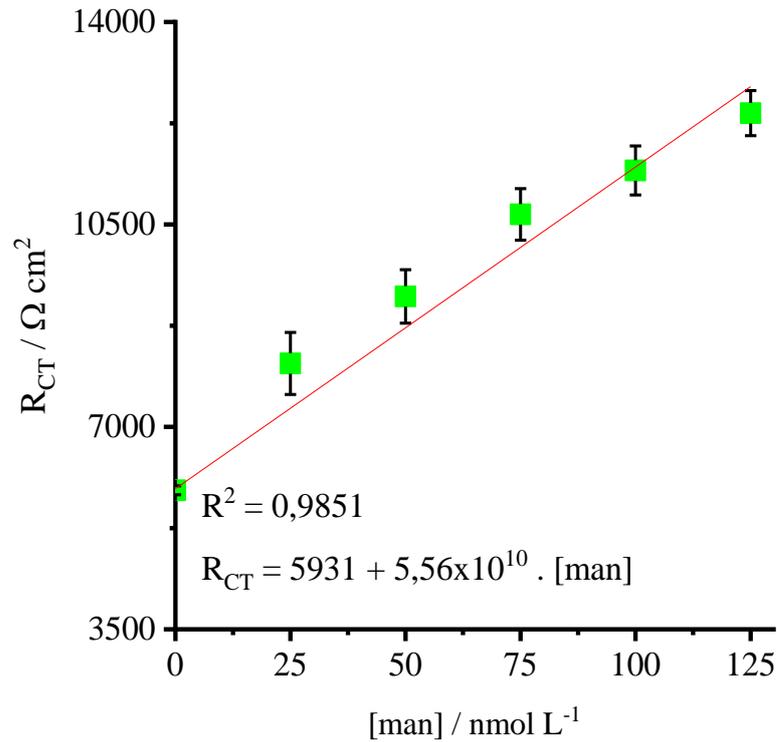
Fonte: Elaborado pelo Autor.

Tabela 8 - Valores de R_{CTs} do eletrodo Au/HS2BP/ConBr na detecção de manose
Eletrodo Au/HS2BP/ConBr

[manose] /nmol L ⁻¹	Eletrodo Au/HS2BP/ConBr		
	1º ensaio $R_{CT} (\Omega \text{ cm}^2)$	2º ensaio $R_{CT} (\Omega \text{ cm}^2)$	3º ensaio $R_{CT} (\Omega \text{ cm}^2)$
0	5859	5859	5992
25	8417	8393	7476
50	9412	9617	8736
75	11105	10702	10213
100	11825	11495	10984
125	12785	12010	12478

Fonte: Elaborado pelo Autor.

Figura 31 – Relação dos valores de R_{CT} do biossensor em função da concentração de manose



Fonte: Elaborado pelo Autor.

O biossensor também obteve uma boa resposta analítica para manose em solução, o que demonstra que o biossensor pode detectar glicose e manose separadamente em uma faixa de concentração de 0 a 125 nmol L⁻¹.

Para a validação do método, calculou-se o limite de detecção “LOD do inglês - *Limit of Detection*” e limite de quantificação “LOQ do inglês - *Limit of Quantification*” do biossensor para a glicose e manose (Tabela 9) conforme as Equações 10 e 11. (WINEFORDNER; LONG, 1983):

$$\text{LOD} = \frac{3 \sigma}{b} \quad (10)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \sigma}{b} \quad (11)$$

onde σ é o desvio padrão relativo (RSD) dos valores de R_{CT} do biossensor na ausência de açúcar, b é o coeficiente angular da relação entre R_{CT} e [man] apresentados nas Figuras 29 e 31.

Tabela 9 – Resultados de validação do método do biossensor na detecção de açúcares

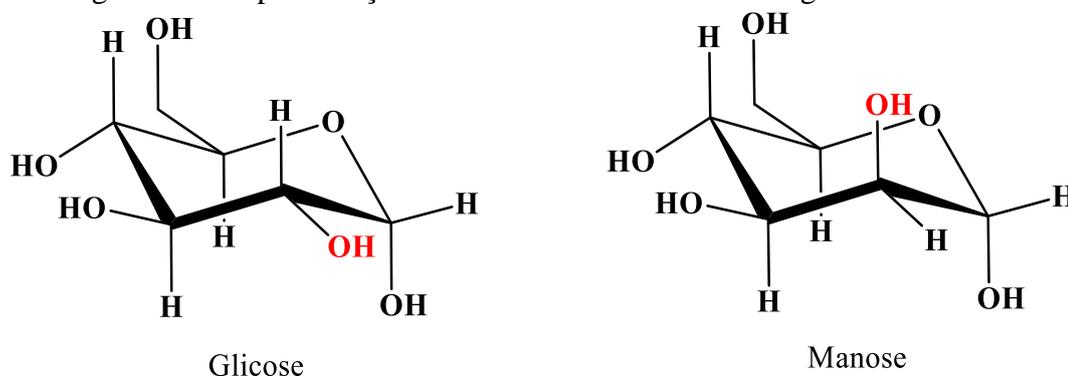
Analito	Biossensor Au/HS2BP/ConBr	
	LOD (nmol L ⁻¹)	LOQ (nmol L ⁻¹)
Glicose	0,73	2,44
Manose	0,07	0,23

Fonte: Elaborado pelo Autor.

Os resultados indicam que a interação específica ConBr/glicose e ConBr/manose, dificulta a transferência de carga entre a superfície do ouro e as espécies de provas.

Manose e glicose são isômeros (Figura 32), a diferença entre esses carboidratos está localizada nos grupos ligados ao carbono 2. A hidroxila está em uma posição equatorial na glicose enquanto na manose está na posição axial, isso pode ter influência na ligação com a ConBr. Tal diferença na posição da hidroxila pode influenciar na interação com a lectina, pois neste trabalho, observou-se que os valores de R_{CT} do biossensor na detecção de manose foram maiores do que aqueles determinados na detecção de glicose.

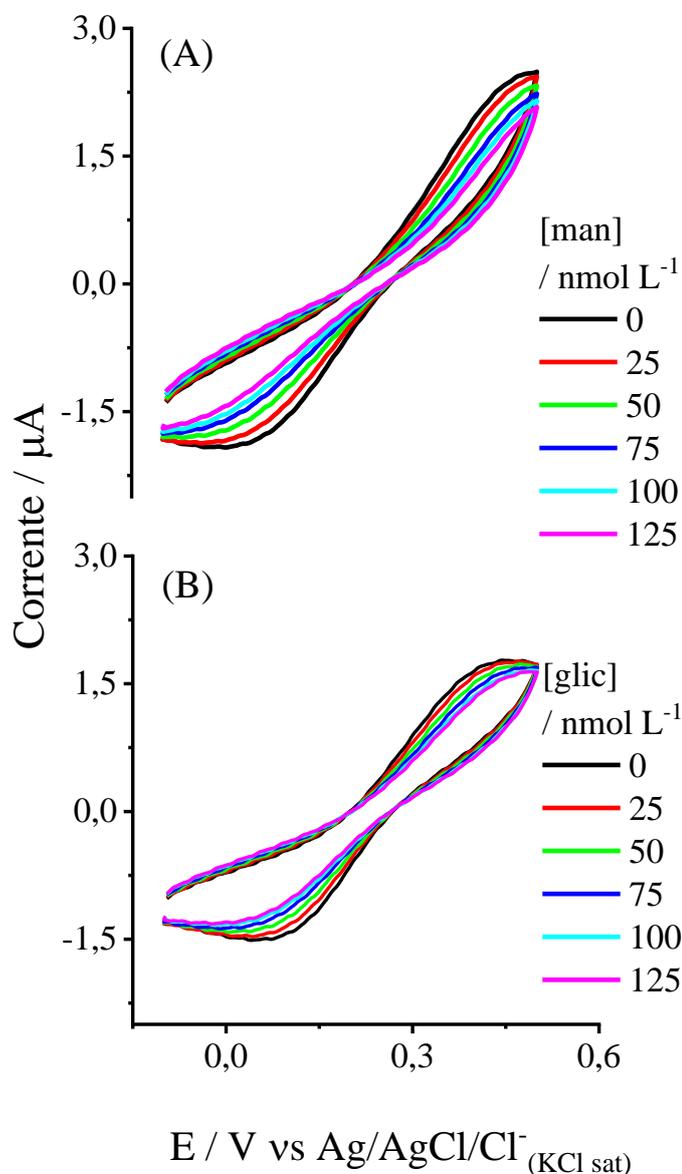
Figura 32 – Representações estruturais dos carboidratos: glicose e manose



Fonte: Elaborado pelo Autor.

O bloqueio a reação de transferência de elétrons também pode ser atestado por voltametrias cíclicas (Figura 33) obtidos durante a detecção de carboidratos.

Figura 33 – Voltamogramas cíclicos na faixa de $-0,1$ a $0,6$ V a $0,05$ V s $^{-1}$ do eletrodo Au/HS2BP/ConBr em solução KF $0,5$ mol L $^{-1}$ com $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0$ mmol L $^{-1}$ em diferentes concentrações de (A) manose e (B) glicose



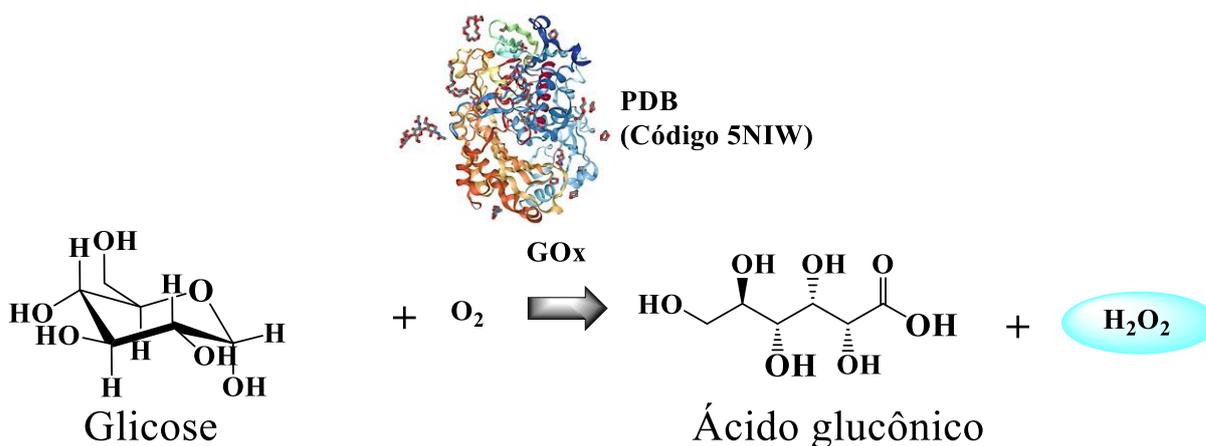
Fonte: Elaborado pelo Autor.

Os voltamogramas apresentados na Figura 33 indicam uma diminuição das correntes de pico, caracterizando que há uma dificuldade de transferência de carga. Em conjunto, os resultados de IE e VC demonstraram que o biossensor detecta diretamente a presença de manose e/ou glicose em solução. Dessa forma, o biossensor proposto traz vantagens em relação àqueles que detectam açúcares de modo indireto (SABU *et al.*, 2019; YOON *et al.*, 2019).

Alguns biossensores que detectam a presença de açúcar de maneira indireta utilizam, por exemplo, glicose oxidase (GOx) para oxidar a glicose e produzir peróxido de

hidrogênio (H_2O_2) (CHO; PARK, 2019; GAO *et al.*, 2018), com isso a resposta analítica deste biossensor é em função do H_2O_2 , como segue o Esquema 1. Neste trabalho, foi realizado a detecção direta da glicose e/ou manose, pois o açúcar liga-se diretamente no biossensor, e a resposta analítica ocorre em função do açúcar.

Esquema 1 – Mecanismo de detecção de um biossensor enzimático de glicose



Fonte: Elaborado pelo Autor.

GOx - Glicose oxidase; PDB - *Protein Data Bank*.

Uma comparação dos parâmetros de biossensores na detecção de glicose é apresentada na Tabela 10.

Os resultados sumarizados na Tabela 10 indicam que os sensores enzimáticos têm os valores de limites de detecção de glicose maiores que os sensores não enzimáticos. Uma das principais limitações encontradas em sensores enzimáticos, é a resposta do H_2O_2 , um exemplo está na medição amperométrica, pois para a resposta do H_2O_2 , é necessário a exigência de um alto potencial de operação, o que pode reduzir espécies e prejudicar a análise (SABU *et al.*, 2019).

Os sensores não enzimáticos, que não utilizam enzimas e não alteram a estrutura do analito, exibem menores valores de limites de detecção. O biossensor desenvolvido neste trabalho exibiu valores de parâmetros analíticos semelhantes a outros sensores reportados na literatura (MAHMOUD *et al.*, 2019).

A interação ConBr/açúcar ainda não é totalmente entendida, existem evidências que apontam para ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas entre os grupos polares dos carboidratos e íons metálicos (Ca^{2+} e Mn^{2+}) da ConBr (ABREU *et al.*, 2017). De qualquer maneira, a associação do açúcar à lectina (Au/HS2BP/ConBr/Carboidrato) deve acarretar em

mudanças morfológicas que por sua vez afetaram a transferência de elétrons conforme ilustrado na Figura 34.

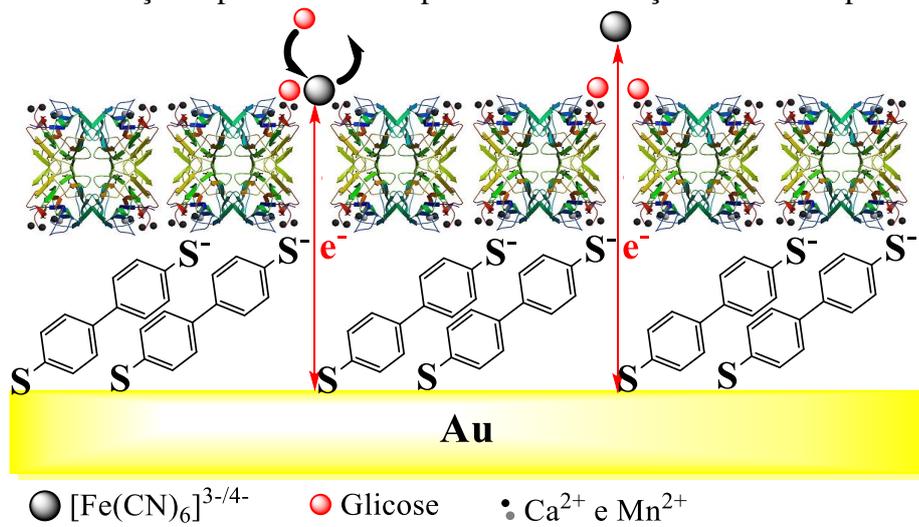
Tabela 10 – Parâmetros de alguns sensores de glicose

Matrix do eletrodo	Limite de detecção ($\mu\text{ mol L}^{-1}$)	Faixa de detecção ($\mu\text{ mol L}^{-1}$)	Método de detecção	Enzimático	Referência
CD/Rh6G/GOx/HRP	0,04	0,1 a 500	Fluorescência Ratiométrica	Sim	(CHO; PARK, 2019)
FTO/Nano-CuO/CHT/GOx	27	200 a 15000	VC	Sim	(NADERI ASRAMI <i>et al.</i> , 2018a)
Nano-filme de Au/MoS ₂ /Au/GOx	0,001	0,001 a 500	Amperometria	Sim	(YOON <i>et al.</i> , 2019)
ITO/Cu-ZO	0,001	0,001 a 10	IE	Não	(MAHMOUD <i>et al.</i> , 2019)
FTO/Nano-NiO/GOx	24	200 a 4000	VC	Sim	(NADERI ASRAMI <i>et al.</i> , 2017)
MPC-CHT-GOx	1	10 a 200	Amperometria	Sim	(BARATHI <i>et al.</i> , 2019)
Au/HS2BP/ConBr	0,00073	0,025 a 0,125	IE	Não	Este trabalho

Fonte: Elaborado pelo Autor.

GOx – Glicose oxidase, FTO - óxido de fluoreto de estanho, Nano-NiO - óxido de níquel nanoestruturado, MoS₂ - dissulfeto de molibdênio, MPC – carbono mesoporoso, CHT – quitosana, Nano-CuO- óxido de cobre nanoestruturado, CD - pontos de carbono, Rh6G - rodamina 6G, HRP - peroxidase do rábano, ITO - óxido de estanho dopado com índio, Cu-ZO - nanopartículas de óxido de zinco dopadas com cobre

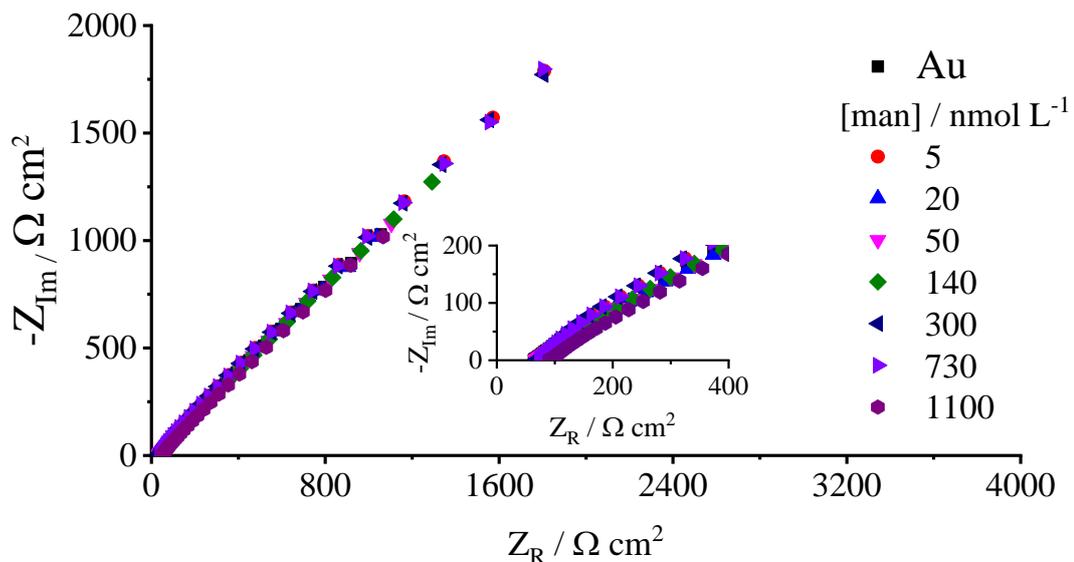
Figura 34 - Ilustração representativa do processo de detecção da manose pelo biossensor



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Neste trabalho também foi investigado se o carboidrato interage com o eletrodo de Au limpo, então foram realizadas medidas IE para o eletrodo de Au em solução eletrolítica KF $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e manose em diferentes concentrações, os resultados são apresentados na Figura 35.

Figura 35 – Diagrama de Nyquist do eletrodo de Au com alíquotas de manose em solução eletrolítica KF $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Em amplitude de 10 mV, potencial de 0,22 V e faixa de frequência de 100 mHz a 100 kHz



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Não é observada mudanças significativas nos diagramas (Figura 35), demonstrando que não há aumento da resistência a transferência de carga entre o eletrodo de Au e as espécies

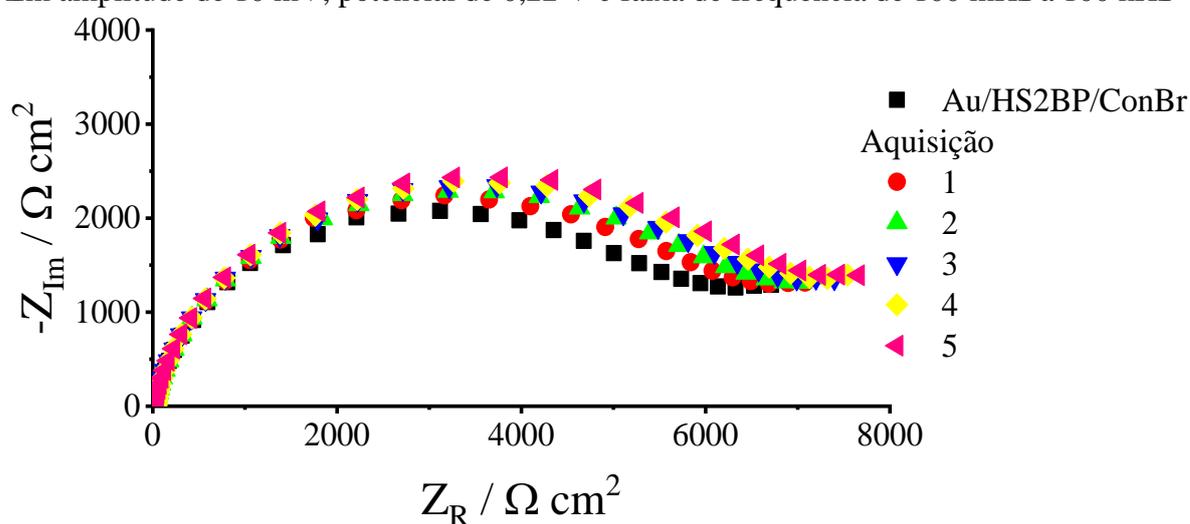
de prova na presença do carboidrato. Isso indica que não ocorre interações entre o carboidrato e a superfície de ouro.

4.6 Teste de Reprodutibilidade

Medidas de IE foram realizadas nas mesmas condições experimentais dos procedimentos anteriores visando avaliar a reprodutibilidade do biossensor produzido frente a detecção dos carboidratos. Foram realizadas 5 aquisições para as concentrações de 25 e 125 nmol L⁻¹ de glicose no meio. Entretanto cada aquisição foi realizada com uma nova solução do carboidrato. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 36 e 37.

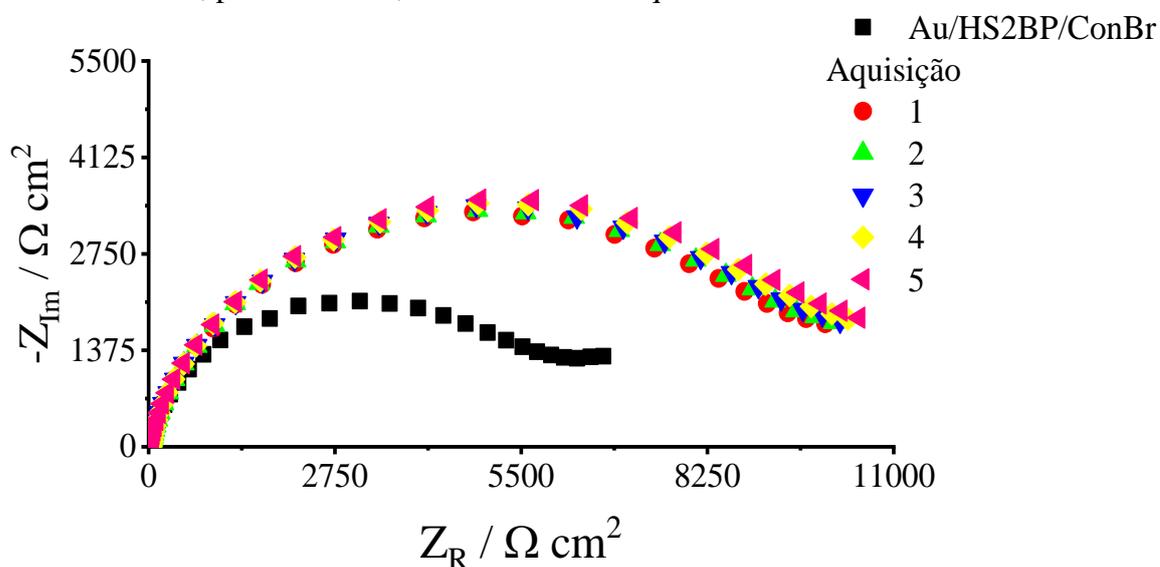
Os resultados mostram que houve uma pequena flutuação dos valores de R_{CT} para as aquisições nas concentrações de 25 nmol L⁻¹, o valor de RSD máximo foi de 3,6%, que segundo a literatura, esses resultados têm boa reprodutibilidade pois apresentou um valor de R_{CT} menor que 5% (KAUSHIK *et al.*, 2018; TERTIS *et al.*, 2019). O teste de reprodutibilidade também foi realizado com a maior concentração da faixa de detecção usada para a glicose cujos resultados estão apresentados na Figura 37.

Figura 36 – Diagramas de Nyquist do eletrodo Au/HS2BP/ConBr na presença de glicose 25 nmol L⁻¹ em solução eletrolítica KF 0,5 mmol L⁻¹ contendo [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 1,0 mmol L⁻¹. Em amplitude de 10 mV, potencial de 0,22 V e faixa de frequência de 100 mHz a 100 kHz



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Figura 37 - Diagramas de Nyquist para o biossensor na presença de glicose 125 nmol L^{-1} em solução eletrolítica KF $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Em amplitude de 10 mV, potencial de 0,22 V e faixa de frequência de 100 mHz a 100 kHz

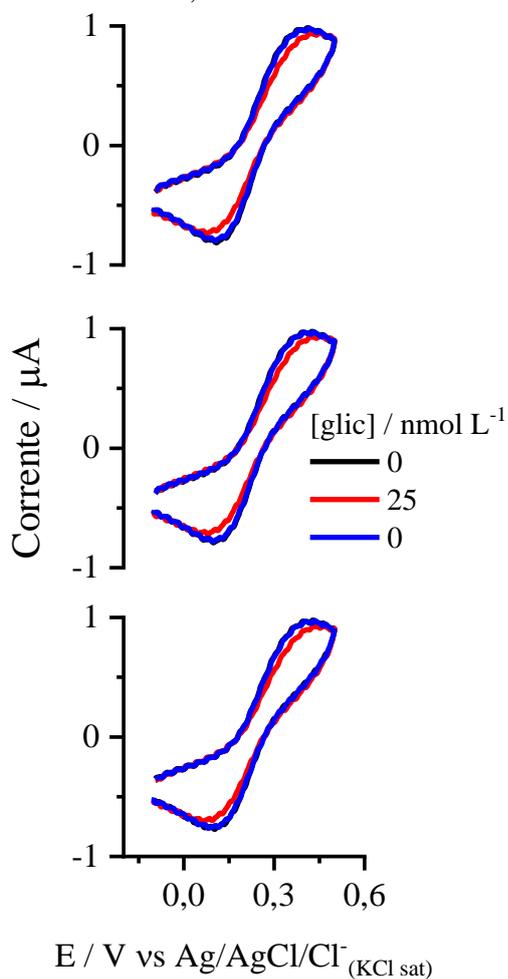


Fonte: Elaborado pelo Autor.

O resultado do teste de reprodutibilidade do biossensor para a detecção de 125 nmol L^{-1} de glicose, observa-se também uma pequena variação dos diâmetros dos arcos, o valor máximo de RSD dos valores de R_{CT} foi de 2,17% indicando, também, uma boa reprodutibilidade. Percebe-se que houve uma maior reprodutibilidade nos ensaios para 125 nmol L^{-1} de glicose, tal fato deve ocorrer porque maior quantidade de carboidrato está adsorvida no biossensor dificulta a transferência de carga entre o substrato e as espécies de prova.

Avaliou-se também a reversibilidade da interação do carboidrato com o biossensor durante as aquisições. Pois caso isso aconteça, as medidas posteriores sempre dariam um resultado falso positivo, mesmo sem a presença do açúcar em solução. Para avaliar isso, 3 aquisições de VC e IE foram realizadas: Na primeira (branco) foi realizada em uma célula eletroquímica contendo somente KF e as espécies de prova; Na segunda foi realizada nas mesmas condições da primeira, entretanto na presença de glicose 25 nmol L^{-1} e na terceira aquisição repetiu-se as condições do branco. Os resultados obtidos em triplicata são apresentados nas Figuras 38 e 39.

Figura 38 – Voltamogramas na faixa de $-0,1$ a $0,5$ V a $0,05$ V s $^{-1}$ do eletrodo Au/HS2BP/ConBr na detecção de glicose 25 nmol L $^{-1}$ em KF $0,5$ mol L $^{-1}$ com $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0$ mmol L $^{-1}$

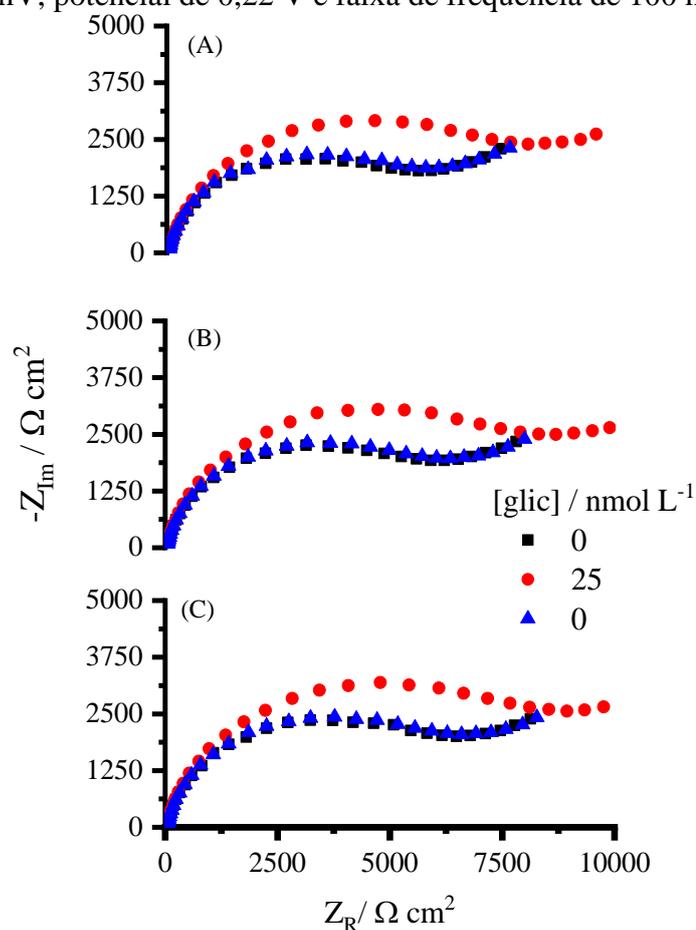


Fonte: Elaborado pelo Autor.

Os voltamogramas obtidos antes e depois da aquisição na presença do açúcar se sobrepõem. Isso implica que a glicose não se liga de forma irreversível ao biossensor. Isso é reforçado pelos resultados de impedância (Figura 39) cuja variação do sinal na presença e ausência do analito é significativamente mais pronunciada.

Nos resultados apresentados na Figura 39 observa-se que ocorre o aumento do valor de R_{CT} na presença do analito, entretanto, quando o biossensor é lavado e usado para aquisição sem a glicose no meio, o diagrama equivalente ao branco é obtido. Os valores de RSDs variaram em torno de 2% (Tabela 11). Dessa forma, estes resultados indicam que o biossensor desenvolvido apresenta boa reprodutibilidade.

Figura 39 - Diagramas de Nyquist do biossensor em aquisições antes, durante e após a detecção de glicose em eletrólito de $\text{KF } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ com $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-} 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Em amplitude de 10 mV, potencial de 0,22 V e faixa de frequência de 100 mHz a 100 kHz



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Tabela 11 – Valores de R_{CT} do biossensor antes, durante e após a detecção de glicose em solução eletrolítica com $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$

[Glicose] /nmol L ⁻¹	Biossensor		
	1º ensaio R_{CT} ($\Omega \text{ cm}^2$)	2º ensaio R_{CT} ($\Omega \text{ cm}^2$)	3º ensaio R_{CT} ($\Omega \text{ cm}^2$)
0	6278	6703	7013
25	9197	9625	9930
0	6470	6904	7153
RSD	±2,01	±2,08	±1,39

Fonte: Elaborado pelo Autor.

Em conjunto, os resultados obtidos para o biossensor impedimétrico baseado na lectina ConBr indicam potencial aplicação para a detecção do nível de açúcar em alimentos e

na corrente sanguínea e detecção de biomarcadores de doença (CECCHETTO *et al.*, 2015; SANTOS; BUENO, 2016).

5. CONCLUSÃO

Fluorescência intrínseca da ConBr exibe uma banda de emissão com máximo em 330 nm. Essa fluorescência é suprimida após a interação da lectina com o carboidrato manose. A partir dos resultados de espectroscopia de fluorescência a constante de associação (K_{ass}) foi calculada para diferentes temperaturas. O aumento de K_{ass} com o aumento da temperatura indica que o processo de associação é endotérmico.

Visto a afinidade da ConBr aos carboidratos glicose e manose, produziu-se um biossensor preparado pela imobilização da lectina no filme do composto HS2BP sobre Au. Medidas de voltametria cíclica e impedância eletroquímica na presença de ferri/ferro como espécies de prova indicam a efetiva preparação do biossensor etapa por etapa. E além disso, essas técnicas também foram usadas para avaliar a detenção destes carboidratos. A relação linear obtida tanto para a glicose como para a manose na faixa de concentração de 25 a 125 nmol L⁻¹ indica que o sensor tem potencial aplicação para detecção destes carboidratos mesmo em baixas concentrações.

O biossensor desenvolvido baseado em ConBr quando armazenado em condições adequadas é estável por mais de duas semanas. Além disso, apresenta boa reprodutibilidade visto que o açúcar não se liga reversivelmente ao biossensor.

A interação do elétrodo Au/HS2BP/ConBr com a glicose e manose mimetizam uma interação célula/célula onde a lectina presente em uma das células age como “conector” para a interação com a outra célula ou microrganismo que contenham resíduos desses carboidratos em suas paredes celulares. Dessa forma, o biossensor preparado tem potencial para detecção específica de células e bactérias.

REFERÊNCIAS

- ABOLHASAN, R.; MEHDIZADEH, A.; RASHIDI, M. R.; AGHEBATI-MALEKI, L.; YOUSEFI, M. Application of hairpin DNA-based biosensors with various signal amplification strategies in clinical diagnosis. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 129, n. December 2018, p. 164–174, 2019.
- ABREU, D. S.; SOUSA, T. P.; CASTRO, C. B.; SOUSA, M. N. V.; SILVA, T. T.; ALMEIDA-NETO, F. W. Q.; QUEIROS, M. V. A.; RODRIGUES, B. S. F.; OLIVEIRA, M. C. F.; PAULO, T. F.; CAVADA, B. S.; NASCIMENTO, K. S.; TEMPERINI, M. L. A.; DIÓGENES, I. C. N. SAM of Gliotoxin on Gold: A Natural Product Platform for Sugar Recognition based on the Immobilization of *Canavalia brasiliensis* lectin (ConBr). **Electrochimica Acta**, [s. l.], v. 241, p. 116–123, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2017.04.099>. Acesso em: 12 dez. de 2017
- ABREU, D. S.; TEMPERINI, M. L. A.; ABRUNA, H. D.; DIÓGENES, I. C. N. Modification of Gold's Work Function upon Adsorption of Mercaptobiphenylcarbonitrile: Experimental Evidence for a Theoretical Prediction. **Journal of Physical Chemistry C**, [s. l.], v. 122, n. 11, p. 6083–6092, 2018.
- AMBROSI, M.; CAMERON, R.; DAVIS, B. G.; CAMERON, N. R.; DAVIS, B. G. Lectins : tools for the molecular understanding of the glycode. [s. l.], p. 1593–1608, 2005.
- ASSREUY, A. M. S.; FONTENELE, S. R.; DE FREITAS PIRES, A.; FERNANDES, D. C.; RODRIGUES, N. V. F. C.; BEZERRA, E. H. S.; MOURA, T. R.; DO NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S. Vasodilator effects of Diocleinae lectins from the *Canavalia* genus. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, [s. l.], v. 380, n. 6, p. 509–521, 2009.
- BANDYOPADHYAY, K.; VIJAYAMOHANAN, K.; SHEKHAWAT, G. S.; GUPTA, R. P. Impedance analysis of self-assembled naphthalene disulfide monolayer on gold using external redox probes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 447, n. 1–2, p. 11–16, 1998.
- BARATHI, P.; THIRUMALRAJ, B.; CHEN, S. M.; ANGAIAH, S. A simple and flexible enzymatic glucose biosensor using chitosan entrapped mesoporous carbon nanocomposite. **Microchemical Journal**, [s. l.], v. 147, n. November 2018, p. 848–856, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.03.083>. Acesso em: 13 de nov. de 2018.
- BATISTA, J. E. C.; RALPH, M. T.; VAZ, R. V.; SOUZA, P. F. C.; SILVA, A. B.; NASCIMENTO, D. C. O.; SOUZA, L. T.; RAMOS, M. V.; MASTROENI, P.; LIMA-FILHO, J. V. Plant lectins ConBr and CFL modulate expression toll-like receptors, pro-inflammatory cytokines and reduce the bacterial burden in macrophages infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 25, p. 52–60, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2016.12.005>. Acesso em: 13 de nov. de 2017.
- BATISTA, K. L. R.; SILVA, C. R.; SANTOS, V. F.; SILVA, R. C.; ROMA, R. R.; SANTOS, A. L. E.; PEREIRA, R. O.; DELATORRE, P.; ROCHA, B. A. M.; SOARES, A. M. S.; COSTA-JÚNIOR, L. M.; TEIXEIRA, C. S. Structural analysis and anthelmintic activity of *Canavalia brasiliensis* lectin reveal molecular correlation between the carbohydrate

recognition domain and glycans of *Haemonchus contortus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [s. l.], v. 225, n. April, p. 67–72, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2018.09.002>. Acesso em: 21 de nov. 2017.

BERTOK, T.; LORENCOVA, L.; HRONCEKOVA, S.; GAJDOSOVA, V.; JANE, E.; HIRES, M.; KASAK, P.; KAMAN, O.; SOKOL, R.; BELLA, V.; ECKSTEIN, A. A.; MOSNACEK, J.; VIKARTOVSKA, A.; TKAC, J. Advanced impedimetric biosensor configuration and assay protocol for glycoprofiling of a prostate oncomarker using Au nanoshells with a magnetic core. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 131, n. January, p. 24–29, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.01.052>. Acesso em: 15 de fev. de 2019.

BIES, C.; LEHR, C. M.; WOODLEY, J. F. Lectin-mediated drug targeting: History and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 56, n. 4, p. 425–435, 2004.

BOLLELLA, P.; MAZZEI, F.; FAVERO, G.; FUSCO, G.; LUDWIG, R.; GORTON, L.; ANTIOCHIA, R. Improved DET communication between cellobiose dehydrogenase and a gold electrode modified with a rigid self-assembled monolayer and green metal nanoparticles: The role of an ordered nanostructuring. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 88, n. June 2016, p. 196–203, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.08.027>. Acesso em: 17 de mar. de 2018.

BONNARDEL, F.; KUMAR, A.; WIMMEROVA, M.; LAHMANN, M.; PEREZ, S.; VARROT, A.; LISACEK, F.; IMBERTY, A. Architecture and Evolution of Blade Assembly in β -propeller Lectins. **Structure**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 764–775.e3, 2019.

BOSE, P. P.; BHATTACHARJEE, S.; SINGHA, S.; MANDAL, S.; MONDAL, G.; GUPTA, P.; CHATTERJEE, B. P. A glucose/mannose binding lectin from litchi (*Litchi chinensis*) seeds: Biochemical and biophysical characterizations. **Biochemistry and Biophysics Reports**, [s. l.], v. 6, p. 242–252, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.05.001>. Acesso em: 04 de out. de 2017.

BURKE, L. D.; NUGENT, P. F. The electrochemistry of gold: I. The redox behaviour of the metal in aqueous media. **Gold Bulletin**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 43–53, 1997.

BUYEL, J. F. Plants as sources of natural and recombinant anti-cancer agents. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 506–520, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.02.002>. Acesso em: 23 de nov. de 2018.

CAGLIARI, R.; KREMER, F. S.; PINTO, L. da S. Bauhinia lectins: Biochemical properties and biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 119, p. 811–820, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.156>. Acesso em: 23 de nov. de 2018.

CECCHETTO, J.; CARVALHO, F. C.; SANTOS, A.; FERNANDES, F. C. B.; BUENO, P. R. An impedimetric biosensor to test neat serum for dengue diagnosis. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [s. l.], v. 213, p. 150–154, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2015.02.068>. Acesso em: 12 de nov. de 2017.

CHAILAPAKUL, O.; CROOKS, R. M. between Organized , Surface-Confined Synthesis and

Characterization of Nanoporous Molecular Assemblies : Mechanism of Probe Penetration Interactions. [s. l.], n. 6, p. 1329–1340, 1995.

CHO, M. J.; PARK, S. Y. Carbon-dot-based ratiometric fluorescence glucose biosensor. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [s. l.], v. 282, n. July 2018, p. 719–729, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.11.055>. Acesso em: 27 de jan. de 2019.

CIUCCI, F. Modeling electrochemical impedance spectroscopy. **Current Opinion in Electrochemistry**, [s. l.], v. 13, p. 132–139, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2018.12.003>. Acesso em: 12 de abr. de 2019.

COSTA, R. B.; CAMPANA, P. T.; CHAMBERGO, F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; PEREIRA, H. J. V.; OLIVA, M. L. V.; GOMES, F. S. Purification and characterization of a lectin with refolding ability from *Genipa americana* bark. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 119, p. 517–523, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.178>. Acesso em: 20 de jan. de 2019.

CREIGHTON, E. Gel Electrophoresis in Studies of Protein Conformation. [s. l.], v. 18, 1984.

DA SILVA, J. D. F.; DA SILVA, S. P.; DA SILVA, P. M.; VIEIRA, A. M.; DE ARAÚJO, L. C. C.; DE ALBUQUERQUE LIMA, T.; DE OLIVEIRA, A. P. S.; DO NASCIMENTO CARVALHO, L. V.; DA ROCHA PITTA, M. G.; DE MELO RÊGO, M. J. B.; PINHEIRO, I. O.; ZINGALI, R. B.; DO SOCORRO DE MENDONÇA CAVALCANTI, M.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G. Portulaca elatior root contains a trehalose-binding lectin with antibacterial and antifungal activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 126, p. 291–297, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.188>. Acesso em: 12 de fev. de 2019.

DA SILVA PINTO, L.; CARDOSO, G.; KREMER, F. S.; DOS SANTOS WOLOSKI, R. D.; DELLAGOSTIN, O. A.; CAMPOS, V. F. Heterologous expression and characterization of a new galactose-binding lectin from *Bauhinia forficata* with antiproliferative activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 128, p. 877–884, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.090>. Acesso em: 15 de mar. de 2019.

DE O. PINHEIRO, S.; DE F. PAULO, T.; DA SILVA, M. A. S.; ANDRADE, G. F. S.; TEMPERINI, M. L. A.; DE CARVALHO, I. M. M.; DE SOUSA, J. R.; LUIZ, L. G.; DIAS-FILHO, F. A.; SOUSA, E. H. S.; LONGHINOTTI, E.; SANTIAGO, M. O.; DE S. MOREIRA, Í.; DIÓGENES, I. C. N. On the correlation between electronic intramolecular delocalization and Au-S bonding strength of ruthenium tetraammine SAMs. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 21, n. 7, p. 1283–1292, 2010.

FAHEINA-MARTINS, G. V.; DA SILVEIRA, A. L.; CAVALCANTI, B. C.; RAMOS, M. V.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; ARAÚJO, D. A. M. Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. **Toxicology in Vitro**, [s. l.], v. 26, n. 7, p. 1161–1169, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2012.06.017>. Acesso em: 17 de dez. de 2017.

GAO, M.; HAZELBAKER, M. S.; KONG, R.; ORAZEM, M. E. Mathematical model for the electrochemical impedance response of a continuous glucose monitor. **Electrochimica Acta**,

[s. l.], v. 275, p. 119–132, 2018. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.04.103>. Acesso em: 16 de dez. de 2018

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochemica**, [s. l.], v. 113, n. 3, p. 236–247, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2010.02.004>. Acesso em: 16 de nov. de 2017.

GONDIM, A. C. S.; ROMERO-CANELÓN, I.; SOUSA, E. H. S.; BLINDAUER, C. A.; BUTLER, J. S.; ROMERO, M. J.; SANCHEZ-CANO, C.; SOUSA, B. L.; CHAVES, R. P.; NAGANO, C. S.; CAVADA, B. S.; SADLER, P. J. The potent anti-cancer activity of Dioclea lasiocarpa lectin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [s. l.], v. 175, p. 179–189, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.07.011>. Acesso em: 12 de jan. de 2018.

HOLANDA, F.; COELHO-DE-SOUSA, A.; ASSREUY, A.; LEAL-CARDOSO, J.; PIRES, A.; DO NASCIMENTO, K.; TEIXEIRA, C.; CAVADA, B.; SANTOS, C. Antinociceptive Activity of Lectins from Diocleinae Seeds on Acetic Acid-Induced Writhing Test in Mice. **Protein & Peptide Letters**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. 1088–1092, 2009.

HU, Y.; ZUO, P.; YE, B. Label-free electrochemical impedance spectroscopy biosensor for direct detection of cancer cells based on the interaction between carbohydrate and lectin. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 43, p. 79–83, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.11.028>. Acesso em: 01 de jul. de 2019.

HUANG, Z.; HU, S.; XIONG, Y.; WEI, H.; XU, H.; DUAN, H.; LAI, W. Application and development of superparamagnetic nanoparticles in sample pretreatment and immunochromatographic assay. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 114, p. 151–170, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.03.004>. Acesso em: 14 de mar. de 2019.

HULANICKI, A.; GEAB, S.; INGMAN, F. Chemical sensors definitions and classification. **Internation union pure and applied chemistry**, [s. l.], v. 63, n. 0, p. 1247–1250, 1991.

JACQUES, A. V.; RIEGER, D. K.; MAESTRI, M.; LOPES, M. W.; PERES, T. V.; GONÇALVES, F. M.; PEDRO, D. Z.; TASCA, C. I.; LÓPEZ, M. G.; EGEA, J.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S.; LEAL, R. B. Lectin from Canavalia brasiliensis (ConBr) protects hippocampal slices against glutamate neurotoxicity in a manner dependent of PI3K/Akt pathway. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 62, n. 6, p. 836–842, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2013.02.020>. Acesso em: 12 de jan. de 2018.

KAUR, A.; KAUR, S.; SHARMA, M.; KAUR, I. Self-assembled monolayers of 3-Hydroxy-N-(5-mercapto-1,3,4-thiadiazol-2-yl) benzamide (HMTB): A platform for Impedimetric sensing of Co(II). **Journal of Electroanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 833, n. December 2018, p. 221–230, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.11.054>. Acesso em: 20 de mar. de 2019.

KAUSHIK, A.; YNDART, A.; KUMAR, S.; JAYANT, R. D.; VASHIST, A.; BROWN, A. N.; LI, C. Z.; NAIR, M. A sensitive electrochemical immunosensor for label-free detection of

Zika-virus protein. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 3–7, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-28035-3>. Acesso em: 17 de dez. de 2018.

KHAN, M. I.; MAZUMDER, T.; PAIN, D.; GAUR, N.; SUROLIA, A. Binding of 4-methylumbelliferyl β -D-galactopyranoside to Momordica charantia Lectin: Fluorescence-Quenching Studies, **European Journal of Biochemistry**, v. 113, n. 3, p. 471-476, 1981. Disponível em: <http://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1981.tb05087.x>. Acesso em: 12 de nov. de 2017

LEMAITRE, L.; MOORS, M.; PETEGHEM, A. P. V. The estimation of the charge transfer resistance by graphical analysis of inclined semicircular complex impedance diagrams, **Journal of applied electrochemistry**, v. 13, p. 803-806, 1983. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00615830>. Acesso em: 12 de jan. de 2018.

LIU, B.; BIAN, H. jiao; BAO, J. ku. Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic. **Cancer Letters**, [s. l.], v. 287, n. 1, p. 1–12, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2009.05.013>. Acesso em: 12 de nov. de 2017.

LUDWIG, A. K.; KALTNER, H.; KOPITZ, J.; GABIUS, H. J. Lectinology 4.0: Altering modular (ga)lectin display for functional analysis and biomedical applications. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [s. l.], v. 1863, n. 5, p. 935–940, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.03.005>. Acesso em: 11 de abr. de 2019.

MAHMOUD, A.; ECHABAANE, M.; OMRI, K.; EL MIR, L.; BEN CHAABANE, R. Development of an impedimetric non enzymatic sensor based on ZnO and Cu doped ZnO nanoparticles for the detection of glucose. **Journal of Alloys and Compounds**, [s. l.], v. 786, p. 960–968, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2019.02.060>. Acesso em 11 de abr. de 2019.

MAJDINASAB, M.; MITSUBAYASHI, K.; MARTY, J. L. **Optical and Electrochemical Sensors and Biosensors for the Detection of Quinolones**, Elsevier Ltd, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.01.004>. Acesso em: 15 de mai. de 2019.

MARKWALTER, C. F.; KANTOR, A. G.; MOORE, C. P.; RICHARDSON, K. A.; WRIGHT, D. W. Inorganic Complexes and Metal-Based Nanomaterials for Infectious Disease Diagnostics. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 119, n. 2, p. 1456–1518, 2019.

MIGUEL, E. C.; MIGUEL, T. B. A. R.; PIREDA, S.; MARQUES, J. B. C.; DA CUNHA, M.; CAJAZEIRAS, J. B.; PEREIRA-JUNIOR, F. N.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S. Seed structure in *Canavalia brasiliensis* Mart. ex Benth. (Leguminosae) and subcellular localization of ConBr lectin: Implications for ConBr biological functions. **Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, [s. l.], v. 215, p. 46–53, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.flora.2015.07.002>. Acesso em: 14 de nov. de 2017.

MITCHELL, C. A.; RAMESSAR, K.; O'KEEFE, B. R. Antiviral lectins: Selective inhibitors of viral entry. **Antiviral research**, [s. l.], v. 142, p. 37–54, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28322922> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5414728>. Acesso em: 18 de jan. de 2018.

MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (MART.). Isolation,

Characterization and Behavior during Germination. **Biologia plantarum (PRAHA)**, v. 26, p. 113–120, 1984.

NADERI ASRAMI, P.; MOZAFFARI, S. A.; SABER TEHRANI, M.; ABEROOMAND AZAR, P. A novel impedimetric glucose biosensor based on immobilized glucose oxidase on a CuO-Chitosan nanobiocomposite modified FTO electrode. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 118, p. 649–660, 2018. a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.228>. Acesso em: 13 de jan. de 2019.

NADERI ASRAMI, P.; MOZAFFARI, S. A.; SABER TEHRANI, M.; ABEROOMAND AZAR, P. A novel impedimetric glucose biosensor based on immobilized glucose oxidase on a CuO-Chitosan nanobiocomposite modified FTO electrode. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 118, n. 2017, p. 649–660, 2018. b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.228>. Acesso em: 30 de jan. de 2019.

NADERI ASRAMI, P.; SABER TEHRANI, M.; ABEROOMAND AZAR, P.; MOZAFFARI, S. A. Impedimetric glucose biosensor based on nanostructure nickel oxide transducer fabricated by reactive RF magnetron sputtering system. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 801, n. May, p. 258–266, 2017.

NASCIMENTO, A. P. M.; KNAUT, J. L.; RIEGER, D. K.; WOLIN, I. A. V.; HEINRICH, I. A.; MANN, J.; JUAREZ, A. V.; SOSA, L. del V.; DE PAUL, A. L.; MOREIRA, C. G.; SILVA, I. B.; NOBRE, C. S.; OSTERNE, V. J. S.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S.; LEAL, R. B. Anti-glioma properties of DVL, a lectin purified from *Dioclea violacea*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 120, p. 566–577, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.106>. Acesso em: 25 de nov. de 2018.

NOGUEIRA DIÓGENES, I. C.; NART, F. C.; ARRUDA TEMPERINI, M. L.; DE SOUSA MOREIRA, Í. The stability study of pentacyano(4-mercaptopyridine)ruthenate(II) self-assembled monolayer onto gold surface. **Electroanalysis**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 153–157, 2002.

OSTERNE, V. J. S.; SILVA-FILHO, J. C.; SANTIAGO, M. Q.; PINTO-JUNIOR, V. R.; ALMEIDA, A. C.; BARRETO, A. A. G. C.; WOLIN, I. A. V.; NASCIMENTO, A. P. M.; AMORIM, R. M. F.; ROCHA, B. A. M.; DELATORRE, P.; NAGANO, C. S.; LEAL, R. B.; ASSREUY, A. M. S.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S. Structural characterization of a lectin from *Canavalia virosa* seeds with inflammatory and cytotoxic activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 94, p. 271–282, 2017.

PAULO, T. D. F.; DA SILVA, M. A. S.; PINHEIRO, S. D. O.; MEYER, E.; PINHEIRO, L. S.; FREIRE, J. A.; TANAKA, A. A.; NETO, P. D. L.; MOREIRA, Í. D. S.; DIÓGENES, I. C. N. 5-(4-Pyridinyl)-1,3,4-oxadiazole-2-thiol on gold: SAM formation and electroactivity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 711–719, 2008.

PAULO, T. D. F.; DIÓGENES, I. C. N.; ABRUÑA, H. D. Direct electrochemistry and electrocatalysis of myoglobin immobilized on l -cysteine self-assembled gold electrode. **Langmuir**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 2052–2057, 2011.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant physiology**, [s. l.], v. 109, n. 2, p. 347–52, 1995. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7480335> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC157596>. Acesso em: 30 de nov. de 2017.

PUNDIR, C. S.; MALIK, M.; CHAUDHARY, R. Quantification of pyruvate with special emphasis on biosensors: A review. **Microchemical Journal**, [s. l.], v. 146, n. January, p. 1102–1112, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.02.046>. Acesso em: 12 de mar. de 2019.

PUNDIR, C. S.; NARWAL, V.; BATRA, B. Determination of lactic acid with special emphasis on biosensing methods: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 86, p. 777–790, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.07.076>. Acesso em: 14 de out. de 2017

RABINOVICH, G. A.; TOSCANO, M. A.; JACKSON, S. S.; VASTA, G. R. Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. **Current Opinion in Structural Biology**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 513–520, 2007.

RANDVIIR, E. P.; BANKS, C. E. Electrochemical impedance spectroscopy: An overview of bioanalytical applications. **Analytical Methods**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 1098–1115, 2013.

RENGARAJ, S.; CRUZ-IZQUIERDO, Á.; SCOTT, J. L.; DI LORENZO, M. Impedimetric paper-based biosensor for the detection of bacterial contamination in water. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [s. l.], v. 265, p. 50–58, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.03.020>. Acesso em 14 de ago. de 2018.

RIEGER, D. K.; NAVARRO, E.; BUENDIA, I.; PARADA, E.; GONZÁLEZ-LAFUENTE, L.; LEON, R.; COSTA, A. P.; HEINRICH, I. A.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S.; LOPEZ, M. G.; EGEA, J.; LEAL, R. B. ConBr, A Lectin Purified from the Seeds of *Canavalia brasiliensis*, Protects Against Ischemia in Organotypic Culture of Rat Hippocampus: Potential Implication of Voltage-Gated Calcium Channels. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 347–359, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-016-2078-7>. Acesso em: 21 de out. de 2017.

SABATANI, E.; RUBINSTEIN, I. Organized self-assembling monolayers on electrodes. 2. Monolayer-based ultramicroelectrodes for the study of very rapid electrode kinetics. **Journal of Physical Chemistry**, [s. l.], v. 91, n. 27, p. 6663–6669, 1987.

SABU, C.; HENNA, T. K.; RAPHEY, V. R.; NIVITHA, K. P.; PRAMOD, K. **Advanced biosensors for glucose and insulin**. [s.l.] : Elsevier B.V., 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566319302386>. Acesso em: 14 de mar. de 2019.

SANTOS, A.; BUENO, P. R. Glycoprotein assay based on the optimized immittance signal of a redox tagged and lectin-based receptive interface. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 83, p. 368–378, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.04.043>. Acesso em: 15 de mar. de 2019.

SANZ-APARICIO, J.; HERMOSO, J.; GRANGEIRO, T. B.; CALVETE, J. J.; CAVADA, B. S. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. **FEBS**

Letters, [s. l.], v. 405, n. 1, p. 114–118, 1997. Disponível em:
[http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00137-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00137-3). Acesso em: 16 de mar. de 2019.

SHAMSIPUR, M.; KAZEMI, S. H.; MEHDINIA, A.; MOUSAVI, M. F.; SHARGHI, H. Electron transfer behavior through densely packed self-assembled monolayers of a novel heteroaromatic thiol derivative onto the gold surface. **Electroanalysis**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 513–519, 2008.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: From hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, [s. l.], v. 14, n. 11, p. 53–62, 2004.

SIMA, S.; GILL, A. A. S.; NLOOTO, M.; KARPOORMATH, R.. Prostate cancer biomarkers detection using nanoparticles based electrochemical biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 137, p. 213–221, 2019. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.03.065>. Acesso em 01 de jul. de 2019.

SILVA, A. F. B.; MATOS, M. P. V.; RALPH, M. T.; SILVA, D. L.; DE ALENCAR, N. M.; RAMOS, M. V.; LIMA-FILHO, J. V. Comparison of immunomodulatory properties of mannose-binding lectins from *Canavalia brasiliensis* and *Cratylia argentea* in a mice model of *Salmonella* infection. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 31, p. 233–238, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2015.12.036>. Acesso em 15 de dez. de 2017.

SILVA, M. L. S. Lectin-based biosensors as analytical tools for clinical oncology. **Cancer Letters**, [s. l.], v. 436, n. June, p. 63–74, 2018. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.08.005>. Acesso em: 27 de jun. de 2019.

SINGH, R. S.; WALIA, A. K.; KHATTAR, J. S.; SINGH, D. P.; KENNEDY, J. F. Cyanobacterial lectins characteristics and their role as antiviral agents. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 102, p. 475–496, 2017. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.041>. Acesso em: 27 de jun. de 2019.

SIUZDAK, K.; NIEDZIAŁKOWSKI, P.; SOBASZEK, M.; ŁĘGA, T.; SAWCZAK, M.; CZACZYK, E.; DZIĄBOWSKA, K.; OSSOWSKI, T.; NIDZWORSKI, D.; BOGDANOWICZ, R. Biomolecular influenza virus detection based on the electrochemical impedance spectroscopy using the nanocrystalline boron-doped diamond electrodes with covalently bound antibodies. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [s. l.], v. 280, p. 263–271, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.10.005>. Acesso em: 20 de fev. de 2019.

TERTIS, M.; LEVA, P. I.; BOGDAN, D.; SUCIU, M.; GRAUR, F.; CRISTEA, C. Impedimetric aptasensor for the label-free and selective detection of Interleukin-6 for colorectal cancer screening. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 137, n. April, p. 123–132, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.05.012>. Acesso em: 12 de fev. de 2019.

TRASATTI, S.; PETRII, O. A. Real surface area measurement in electrochemistry. **Pure & Applied Chemistry**, v. 63, n 6, p. 711–734, 1991. Disponível em:
[https://doi.org/10.1016/0022-0728\(92\)80162-W](https://doi.org/10.1016/0022-0728(92)80162-W). Acesso em: 12 de fev. de 2019.

VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 575–692, 1998.

VERICAT, C.; VELA, M. E.; CORTHEY, G.; PENSA, E.; CORTÉS, E.; FONTICELLI, M. H.; IBAÑEZ, F.; BENITEZ, G. E.; CARRO, P.; SALVAREZZA, R. C. Self-assembled monolayers of thiolates on metals: A review article on sulfur-metal chemistry and surface structures. **RSC Advances**, [s. l.], v. 4, n. 53, p. 27730–27754, 2014.

WALCZAK, M. M.; POPENOE, D. D.; DEINHAMMER, R. S.; LAMP, B. D.; CHUNG, C.; PORTER, M. D. Reductive Desorption of Alkanethiolate Monolayers at Gold: A Measure of Surface Coverage. **Langmuir**, [s. l.], v. 7, n. 11, p. 2687–2693, 1991.

WANG, Q. L.; CUI, H. F.; SONG, X.; FAN, S. F.; CHEN, L. L.; LI, M. M.; LI, Z. Y. A label-free and lectin-based sandwich aptasensor for detection of carcinoembryonic antigen. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [s. l.], v. 260, p. 48–54, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2017.12.105>. Acesso em: 14 de set. de 2018.

WANG, W. **Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals**. [s.l: s.n.]. v. 203

WINEFORDNER, J. D.; LONG, G. L. Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 55, n. 7, p. 712A-724A, 1983.

YANG, H.; ZHOU, H.; HAO, H.; GONG, Q.; NIE, K. Detection of Escherichia coli with a label-free impedimetric biosensor based on lectin functionalized mixed self-assembled monolayer. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [s. l.], v. 229, p. 297–304, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2015.08.034>. Acesso em: 20 de jan. de 2019

YOON, J.; LEE, S. N.; SHIN, M. K.; KIM, H. W.; CHOI, H. K.; LEE, T.; CHOI, J. W. Flexible electrochemical glucose biosensor based on GOx/gold/MoS₂/gold nanofilm on the polymer electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 140, n. March, p. 111343, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111343>. Acesso em: 19 de jan. de 2019

ZHAO, J.; LUO, L.; YANG, X.; WANG, E.; DONG, S. Determination of Surface pK_a of SAM Using an Electrochemical Titration Method. **Electroanalysis**, [s. l.], v. 11, n. 15, p. 1108–1113, 1999.