



## IMOBILIZAÇÃO DE LECTINAS EM SUPERFÍCIE DE OURO

Roselayne Ferro Furtado (PQ)<sup>1</sup>, Vitor Paulo Andrade da Silva (IC)<sup>2</sup>, Maria Gardenny Ribeiro Pimenta (PG)<sup>3</sup>, João Bosco de Carvalho (IC)<sup>2</sup>, Carlucio Roberto Alves (PQ)<sup>2</sup>, Maria Izabel Florindo Guedes (PQ)<sup>3</sup>, Rosa Fireman Dutra (PQ)<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Agroindústria Tropical, CNPAT, Fortaleza-CE, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Química, UECE, Fortaleza-CE, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Nutrição, UECE, Fortaleza-CE, Brasil

<sup>4</sup>Departamento de Ciências Biológicas, UPE, Recife-PE, Brasil

*Resumo* - Este trabalho tem o objetivo de avaliar a adsorção química de lectinas sobre superfície de ouro, com prévio tratamento químico com ácido nítrico, em diferentes intervalos de tempo: 5, 15 e 30 minutos. Os resultados eletroquímicos de voltametria cíclica para o processo redox  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$  mostraram que o tempo de 30 minutos para imobilização das lectinas foi suficiente para promover a deposição na superfície eletroativa de ouro.

**Palavras-chaves:** lectina, ácido nítrico, imobilização, ouro

### INTRODUÇÃO

A imobilização de moléculas de origem biológica em eletrodos convencionais e descartáveis tem sido empregada no desenvolvimento de biossensores para serem aplicados em diferentes áreas do conhecimento. Lectinas são proteínas presentes em animais e vegetais que possuem afinidade a carboidratos específicos. Por esta razão, as lectinas têm sido amplamente utilizadas na área de purificação de complexos de carboidratos e glicoconjugados [1, 2]. Neste sentido, essas proteínas podem ser utilizadas como superfície sensora de sistemas eletroquímicos, no intuito de desenvolver biossensor para detecção de carboidratos de interesse.

A imobilização de lectinas em diferentes superfícies tem sido estudada, principalmente, empregando camada intermediária entre o eletrodo e proteína, a partir de substâncias como cisteamina, glutaraldeído e outras que irão promover interface entre a molécula sensora e a superfície [3]. No entanto, trabalhos na literatura têm indicado a possibilidade de proteínas se ligarem diretamente a superfícies oxidadas mediante tratamento químico ou eletroquímico, eliminando a necessidade de substâncias intermediárias na superfície de biossensores [4, 5].

No presente trabalho lectinas encontradas em sementes de *Ricinus communis* (mamona), Ricina e Ricinus aglutinina foram imobilizadas em eletrodos de ouro modificados por tratamento químico em diferentes intervalos de tempo de imobilização de solução contendo as lectinas. O estudo do tempo de imobilização nos eletrodos foi importante para determinar o melhor intervalo de saturação da superfície pelas lectinas.

### PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Amostra de sementes de mamona, da cultivar Nordestina produzida pela Embrapa Algodão, foi utilizada para a obtenção da torta de mamona. As sementes foram trituradas, prensadas e deixadas em repouso com hexano para retirada do óleo residual. Após evaporação do solvente, a torta de mamona, propriamente dita, foi diluída em NaCl 0,15 M na proporção de 1:10 e homogeneizada em agitadores por 30 minutos e centrifugadas a  $32.980 \times g$  por 20 minutos para retirada do sobrenadante. O sobrenadante foi transferido para coluna de cromatografia de afinidade de goma de Guar (*Sigma Aldrich*), preparada segundo instruções do fabricante. A cromatografia de afinidade foi realizada a temperatura ambiente. As frações foram eluídas com solução de glicina 0,1 M e NaCl 0,15 M pH 2,6, e acompanhamento espectrofotométrico em 280 nm, sendo aquelas que apresentaram absorvância foram coletadas e dialisadas contra água para remoção da glicina. Após diálise a solução foi concentrada por liofilização e caracterizada por eletroforese e teste de hemaglutinação.

Para o ensaio eletroquímico, eletrodo de ouro ( $0,05 \text{ cm}^2$ ) foi polido em alumina  $0,03 \mu\text{m}$  e sonificado em água Milli-Q por 1 minuto. O eletrodo foi exposto à solução de ácido nítrico P.A. por 5 minutos, para que ocorresse a oxidação química, com posterior lavagem com água. Solução contendo as lectinas Ricina e Ricinus aglutinina foi diluída em solução salina 0,15 M na concentração de  $1 \mu\text{g/mL}$ . A

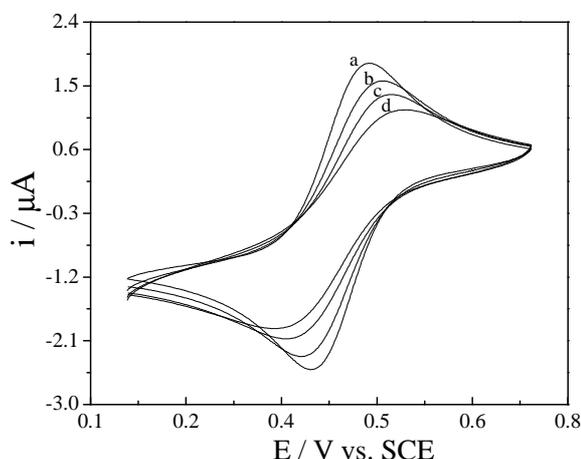


adsorção das proteínas ocorreu por exposição do eletrodo de ouro a solução das lectinas em diferentes intervalos de tempo: 5, 15 e 30 minutos.

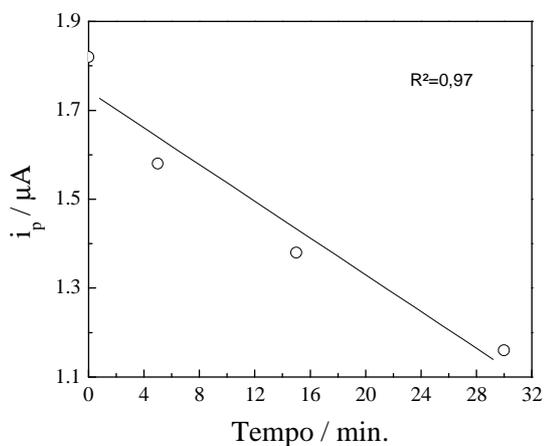
Solução de ferricianeto de potássio 5 mM em NaCl 0,15 M foi preparada para as medidas de voltametria cíclica. As medidas eletroquímicas foram realizadas em potenciostat Autolab Potenciostato/Galvanostato PGSTAT302N. A velocidade empregada na voltametria cíclica foi 50 mV/s. Foram utilizados eletrodo auxiliar de platina e eletrodo de referência Ag/AgCl saturado com KCl 3 M. Todas as soluções foram desoxigenadas com nitrogênio antes de cada ensaio eletroquímico.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados indicaram que a superfície de ouro tratada com ácido nítrico promoveu a adsorção de proteínas proporcional ao tempo de imobilização do eletrodo na solução de lectinas (Figuras 1). A superfície de ouro ao ser recoberta pelas lectinas diminui gradativamente a área eletroativa para transferência eletrônica para o ferricianeto de potássio. Sendo verificado assim, a redução gradativa na amplitude de corrente e deslocamento dos potenciais de pico para os processos de oxidação e redução do par redox  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  quando comparado à superfície de ouro limpa. O processo de adsorção da proteína é linear com o tempo (Figura 2).



**Figura 1.** Perfil voltamétrico de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  5 mM (em NaCl 0,15 M) em superfície de ouro previamente oxidada com ácido nítrico, para o processo de deposição química de lectinas 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em intervalos de tempo de 0 (a), 5 (b), 15 (c), e 30 (d) minutos.



**Figura 2.** Comportamento do processo de adsorção de proteínas em superfície de ouro previamente oxidada com ácido nítrico em  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  5 mM e NaCl 0,15 M ao longo do tempo.



## CONCLUSÕES

O tratamento químico com ácido nítrico promoveu a oxidação da superfície de ouro e propiciou a imobilização linear das lectinas estudadas. O tempo mínimo para o recobrimento da superfície pelas lectinas foi de 30 minutos.

**AGRADECIMENTOS:** EMBRAPA, FINEP, CNPq

## REFERÊNCIAS

- [1] SHARON, N.; LIS H. How proteins bind carbohydrates: lessons from legume lectins. **J. Agric. Food Chem.** v. 50, p. 6586–6591. 2002.
- [2] GUZMÁN-PARTIDA, A. M., ROBLES-BURGUEÑO, M. R., ORTEGA-NIEBLAS, M., VÁZQUEZ-MORENO I. Purification and characterization of complex carbohydrate specific isolectins from wild legume seeds: *Acacia constricta* is (vinorama) highly homologous to *Phaseolus vulgaris* lectins. **Biochimie**, V. 86, n. 4-5, p. 335-342. 2004.
- [3] EDLA M.A. PEREIRA, MARIA RITA SIERAKOWSKI, TATIANE A. JÓ, RENATO A. MOREIRA, ANA CRISTINA O. MONTEIRO-MOREIRA, RAFAEL F.O. FRANÇA, BENEDITO A.L. FONSECA AND DENISE F.S. PETRI. Lectins and/or xyloglucans/alginate layers as supports for immobilization of dengue virus particles. **Colloids and surfaces Biointerfaces**. v .66, n.1, p. 45-52. 2008.
- [4] DINIZ, F.B.; UETA, R.R.; PEDROSA, A.M. da C., AREIAS, M.C., PEREIRA, V.R. A., SILVA, E.D.; SILVA, J.G., FERREIRA, A.G.P. GOMES, Y.M. Impedimetric evaluation for diagnosis of Chagas' disease: antigen–antibody interactions on metallic electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**. v.19, n.2, 15, p. 79-84. 2003.
- [5] DINIZ, F.B.; UETA, R.R. Platinum oxidation and its effect on Concanavalin A adsorption. **Electrochimica Acta**. v.49, p. 4281-4286. 2004.

**E-mail do autor principal:** roselayne@cnpat.embrapa.br