

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE GLICOSILAÇÃO DO ANTÍGENO
PROSTÁTICO HUMANO (PSA) EM SORO HUMANO PELA LECTINA
CRAMOLL 1,4 UTILIZANDO UM BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO
EM NANOTUBO DE CARBONO**

PRISCILA MARCELINO DOS SANTOS SILVA

Orientadora: Prof^a Dr^a MARIA TEREZA DOS SANTOS CORREIA

Co-orientadora: Prof^a Dr^a ROSA AMALIA FIREMAN DUTRA

RECIFE, 2015

PRISCILA MARCELINO DOS SANTOS SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE GLICOSILAÇÃO DO ANTÍGENO
PROSTÁTICO HUMANO (PSA) EM SORO HUMANO PELA LECTINA
CRAMOLL 1,4 UTILIZANDO UM BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO
EM NANOTUBO DE CARBONO**

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre
em Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de
Pernambuco

Aprovada por:

Presidente: Prof^ª Dr^ª Maria Tereza dos Santos Correia

1^ª Examinadora: Dr^ª Alessandra Batista de Mattos

2^ª Examinadora: Prof^ª Dr^ª Rosa Amalia Fireman Dutra

3^ª Examinadora: Prof^ª Dr^ª Maria Danielly Lima de Oliveira

Data:26/02/2015

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva, Priscila Marcelino dos Santos

Caracterização do padrão de glicosilação do antígeno prostático humano (PSA) em soro humano pela lectina CramoLL 1,4 utilizando um biossensor eletroquímico baseado em nanotubo de carbono / Priscila Marcelino dos Santos Silva. – Recife: O Autor, 2015.

113 f.: il.

Orientadores: Maria Tereza dos Santos Correia, Rosa Amalia Fireman Dutra

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, 2015.

Inclui referências e anexos

1. Próstata – Câncer 2. Glicoproteínas 3. Lectinas I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orient.) II. Dutra, Rosa Amalia Fireman (coorient.) III. Título.

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-121

Dedico aos meus pais, Alúzio e Josefa, por estarem ao meu lado, pelo afeto, incentivo e confiança em todos os momentos. Sempre.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela sua imensa bondade, pelas dádivas e oportunidades vividas em cada conquista.

À Prof^a Dr^a Maria Tereza dos Santos Correia pela sua valiosa orientação, apoio, oportunidades e ensinamentos essenciais para meu crescimento científico. Obrigada pela confiança e paciência durante esses anos!

À Profa. Dra. Rosa Amália Fireman Dutra, pelo acolhimento e oportunidade de desenvolver meu trabalho no Laboratório de Engenharia Biomédica da UFPE, pela valiosa orientação e contribuição científica. Obrigada pela confiança!

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), pelo apoio financeiro.

Ao Centro de Tecnologia Estratégicas do Nordeste (CETENE), pelo apoio na caracterização estrutural das superfícies eletródicas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia (PPGBF-UFPE), que contribuíram para minha formação científica e aprendizado durante o mestrado, em especial à Prof^a Dr^a Patrícia Paiva, coordenadora do PPGBF, pelo estímulo e confiança!

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica da UFPE pela ajuda e atenção, e ao secretário do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, Djalma, pela disposição e competência.

À Dr^a Amanda Lima, que gentilmente cedeu as amostras sorológicas dos pacientes, utilizadas neste trabalho;

À todos que fazem o Laboratório de Engenharia Biomédica da UFPE, pela convivência, amizade e aprendizado, em especial às doutorandas Ana Carolina e Bárbara, pela companhia diária, ajuda e explicações, e ao Dr. Igor Teixeira, pela recepção e aprendizado proporcionado.

À todos colegas do Laboratório de Glicoproteínas da UFPE, pelo carinho e parceria desde minha iniciação científica.

Aos colegas do mestrado, pela companhia, amizade e incentivo, que nos fizeram superar muitas dificuldades e alcançarmos nossos objetivos e conquistas.

Aos meus pais, Aluizio Francisco da Silva e Josefa Marcelino dos Santos Silva, pelo grande amor e dedicação constantes voltados para mim; pelos conselhos, pela paciência e compreensão, por todo o bem! Vocês foram essenciais na jornada para essa conquista.

À minha irmã Abigail Marcelino dos Santos Silva, pela amizade, carinho e incentivo.

Aos meus parentes e amigos, que próximos ou distantes acreditaram nos meus esforços e com palavras, orações e pequenos gestos mostraram seu carinho e apoio.

*“Não basta dar os passos que nos devem levar um dia ao objetivo;
cada passo deve ser ele próprio um objetivo em si mesmo,
ao mesmo tempo que nos leva para diante”.*

Johann Goethe

RESUMO

O câncer de próstata (CaP) é um dos tipos de tumor maligno mais incidente na população mundial, sendo também uma das principais causas de mortalidade por câncer. Geralmente ocorre em homens idosos e não é percebido em seus estágios iniciais. Para detectar o câncer de próstata, é de grande importância a avaliação pela dosagem sérica do antígeno específico da próstata (PSA), considerado o marcador tumoral da próstata. Porém, alterações nos níveis séricos do PSA são observadas também em doenças benignas da próstata, reduzindo a sensibilidade e especificidade do teste para se obter o diagnóstico. Uma peculiaridade do câncer que pode ser relevante no diagnóstico é a alteração no padrão de glicosilação de glicoproteínas secretadas e de superfície celular. A identificação de mudanças na expressão de glicanos permite a detecção precoce de vários tipos de câncer, inclusive o câncer de próstata. As lectinas são ferramentas empregadas para detectar tais alterações, graças à propriedade de reconhecer carboidratos com especificidade. Uma grande novidade no campo de estudos com lectinas é o desenvolvimento de pequenos dispositivos conhecidos como biossensores eletroquímicos baseados em lectinas para análise do perfil de glicoproteínas em processos fisiopatológicos. Esses dispositivos são elaborados utilizando eletrodos geralmente modificados com polímeros e nanomateriais, onde a lectina pode ser imobilizada e sua interação com o carboidrato quantificada com elevada sensibilidade e em tempo real. Neste trabalho foi realizado um estudo bioeletroquímico da lectina de *Cratylia mollis* (CramoLL) para caracterizar o padrão de glicosilação em soros de indivíduos saudáveis, com hiperplasia benigna da próstata (HBP) e CaP, utilizando biossensor eletroquímico baseado em CramoLL, imobilizada sobre eletrodo de carbono vítreo modificado com o polímero catiônico poli-L-lisina (PLL) e nanotubos de carbono (NTC). Análises eletroquímicas e ópticas mostraram a formação de um filme de PLL e NTC na superfície eletródica, onde os NTC proporcionaram um aumento na área sensora de 71,2%, e nos valores de corrente anódica e catódica, e aumentaram a estabilidade da superfície, graças às propriedades físico-químicas dessas nanoestruturas. Foram investigadas as concentrações ótimas de PLL e NTC. CramoLL foi imobilizada com sucesso, numa concentração ótima de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A interação entre CramoLL e metil- α -D-manopiranosose (Me α Man)/ fetuína foi confirmada utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada, mostrando que a lectina manteve sua atividade biológica após imobilização. Foram obtidas curvas de calibração para diferentes concentrações dos glicanos, com faixa linear de 0,96 e 38,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Me α Man ($r=0,982$, $p < 0,001$) e limite de detecção (LD) de 0,04 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e de 0,5 a 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de fetuína ($r=0,994$, $p < 0,001$) e LD = 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O biossensor baseado em CramoLL foi exposto à amostras de soro de indivíduos sadios (controle), com HBP e CaP com escores de Gleason 6, 7 e 9 para analisar a interação entre CramoLL e glicoproteínas dos soros de cada grupo. Os sinais de correntes obtidos por voltametria de onda quadrada mostraram diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos HBP, CaP escore 6 e 7; entre HBP e CaP escore 6; entre CaP escore 6 e os grupos CaP escore 7 e 9 e entre CaP escore 7 e CaP 9. O potencial de reconhecimento da lectina permitiu identificar alterações de glicosilação associadas ao câncer de próstata e distinguir das amostras não cancerosas e entre os diferentes escores de CaP. Esses resultados sugerem a possibilidade de aplicação em estudos futuros envolvendo caracterização de glicosilação em câncer.

Palavras-chave: biossensor eletroquímico, câncer de próstata, CramoLL, glicanos, glicoproteínas, nanotubos de carbono.

ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) is a most frequently type of malignancy in global population and is also a major cause of cancer mortality. It usually occurs in older men and is not perceived in early stages. To detect the prostate cancer, this is of great importance the evaluation of serum prostate specific antigen (PSA), considered the prostate tumor marker. But, changes in serum PSA levels are also observed in benign prostate diseases, reducing the sensitivity and specificity of the test to obtain the diagnosis. A peculiarity of cancer that may be relevant in the diagnosis is the change in the pattern of glycosylation in glycoproteins secreted and cell surface. The identification of changes in the expression of glycans permits detection early of various types of cancer, including prostate cancer. Lectins are tools used to analyze such changes in diseases, through to the property to recognize carbohydrates with specificity. A great innovation in the field of studies with lectins is the development of smalls devices known as electrochemical biosensors based on lectins for analysis of the glycoproteins profile in physiopathological processes. These devices are typically produced using modified electrodes containing polymers, nanomaterials, where in the lectin may be immobilized and the interaction with carbohydrate quantified with high sensitivity in real time. This work presents a bioelectrochemical study of lectin of *Cratylia mollis* (CramoLL) to characterize the glycosylation pattern in sera from healthy individuals, with benign prostatic hyperplasia (BPH) and PCa, using electrochemical biosensor based on CramoLL immobilized on glassy carbon electrode modified with the polymer cationic poly-L-lysine (PLL) and carbon nanotubes (CNT). Electrochemical and optical analysis showed the formation of a PLL and CNT film on the electrode surface, where the CNT provided an increase in sensor area of 71.2%, and the anodic and cathodic current values, and increased stability of the surface due to the physical and chemical properties of these nanostructures. The optimal concentrations of PLL and NTC were investigated. CramoLL was successfully immobilized at a great concentration of 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The interaction between CramoLL and methyl- α -D-mannopyranose (Me α Man)/ fetuin was confirmed using voltammetry square wave technique, showing that the lectin retained its biological activity after immobilization. Calibration curves were plotted for different concentrations of the glycans with a linear range of 0.96 and 38.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for Me α Man ($r = 0.982$, $p < 0.001$) and limit of detection (LOD) of 0.04 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and from 0.5 to 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for fetuin ($r = 0.994$, $p < 0.001$) and LOD = 0.05 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The CramoLL-based biosensor was exposed to serum samples from healthy individuals (control), and patients with BPH and PCa with Gleason scores of 6, 7 and 9 to analyze the interaction between CramoLL and glycoproteins of sera from each group. The signals of current by square wave voltammetry show significant differences between the control group and the groups of BPH, PCa score 6 and 7; between BPH and PCa score 6; between PCa score 6 and groups PCa score 7 and 9 and between PCa score 7 ad PCa score 9. The potential of specific recognition of the lectin allowed to identify changes in glycosylation associated at prostate cancer and to distinguish of non-cancerous samples and between the different scores of PCa. The results suggest the possibility of using in future studies involved characterization of glycosylation in cancer.

Keywords: carbon nanotubes, CramoLL, electrochemical biosensor, glycans, glycoproteins, prostate cancer.

LISTA DE FIGURAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma *	17
Figura 2. Trato reprodutivo masculino	20
Figura 3. Sistema de Gleason modificado	23
Figura 4. Ilustração da biossíntese do PSA	25
Figura 5. Composição completa de aminoácidos do PSA *	26
Figura 6. Exemplos de estruturas típicas de glicanos N- e O- ligados expressas em glicoproteínas de plasma humano	27
Figura 7. Lectinas da família <i>Leguminosae</i> distribuída em várias tribos com especificidades para diferentes monossacarídeos	31
Figura 8. (A) Vagens e sementes de <i>Cratylia mollis</i> . (B) Estrutura terciária de CramoLL 1, uma lectina de semente de <i>Cratylia mollis</i>	33
Figura 9. Componentes de um biossensor	35
Figura 10. Representação esquemática para diferentes tipos de preparação de EQM	38
Figura 11. Estrutura molecular da Poli-L-lisina	39
Figura 12. Nanotubos de parede simples (NTCPS) e nanotubos de paredes múltiplas (NTCPM)	41
Figura 13. Representação esquemática de um potenciostato conectado à uma célula eletroquímica	44
Figura 14. Representação esquemática da dupla camada elétrica	46
Figura 15. (A) Sinal de excitação potencial-tempo na voltametria cíclica. (B) Voltamograma cíclico	49
Figura 16. Representação esquemática da voltametria de onda quadrada	50
Figura 17. Representação esquemática de um espectrofotômetro FT-IR	52
Figura 18. Esquema de operação de um MEV	53

ARTIGO

Fig. S1. Successives cyclic voltammograms of electrodeposition PLL $0.05 \mu\text{mol L}^{-1}$ in the solution 10 mmol L^{-1} of PBS buffer (pH 7.4) in the GCE. (a) Oxidation peak of PLL. (b) Reducing peak of PLL. Potential range: -2.0 V to $+2.0 \text{ V}$, 15 cycles, 50 mV s^{-1} **81**

Scheme. 1. Diagram of sensor construction steps **81**

Fig. 1. FTIR spectrum by FTIR spectrum by diffuse reflection mode from COOH-CNT (a), PLL (b) and PLL/ COOH-CNT (c)**83**

Fig. 2. (a) Cyclic voltammograms of GCE modifications steps: (1) GCE after cleaning; (2) GCE/ PLL; (3) GCE/ PLL/ COOH-CNT; (4) GCE/ PLL/ COOH-CNT/ CramoLL; (5) GCE/ PLL/ COOH-CNT/ CramoLL/ Glycine. (b) PLL film stability in the glassy carbon surface (20 cycles); (c) Stability of PLL/ COOH-CNT film in the glassy carbon surface (20 cycles). Measurements performed in a solution of 5 mmol L^{-1} $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ prepared in 100 mmol L^{-1} KCl**84**

Fig. S2. (a) Effect of PLL concentration in the biosensor response; (b) COOH-CNT concentration effect in the biosensor response**85**

Fig. 3. SEM images (a and b 1) and cyclic voltammograms (a and b 2) of the surface electrode (a) GCE/ PLL; (b) GCE/ PLL /CNT-COOH. In a. 2 and b. 2, (1) GCE after cleaning; (2) GCE/ PLL; (3) GCE/ PLL/ COOH-CNT. Voltammetry measurements in 5 mmol L^{-1} $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ with 100 mmol L^{-1} KCl solution**86**

Fig. S3. (a) Effect of CramoLL concentration in the sensor response; (b) Study of immobilization time of CramoLL; (c) Cyclic voltammograms of the GCE/ PLL/ CNT-COOH/ CramoLL sensor in 5 mmol L^{-1} $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ solution in 100 mmol L^{-1} of KCl at velocities (inside to outside): 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 mV s^{-1} ; (d) Plotting of the current peaks in the function of velocity of the square root. Measurements in 5 mmol L^{-1} $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ in 100 mmol L^{-1} KCl solution.....**87**

Fig. 4. (a). Calibration curve of biosensor incubated with different concentrations of Me α Man in 10 mmol L^{-1} PBS buffer solution (pH 7.4). (b) Calibration curve of biosensor incubated with different concentrations of fetuin in 10 mmol L^{-1} PBS buffer solution (pH 7.4). Measurements in 5 mmol L^{-1} $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ in 100 mmol L^{-1} KCl solution.....**88**

Fig. S4. (a) Reproducibility of the biosensor incubated with $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ fetuin in 10 mmol L^{-1} PBS buffer solution (pH 7.4). (b) Repetibility assay of the biosensor incubated with $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ fetuin in 10 mmol L^{-1} PBS buffer solution (pH 7.4). Measurements in 5 mmol L^{-1} $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ in 100 mmol L^{-1} KCl solution**89**

Fig. S5. Biosensor response for fetuin (A) in the presence of interferences glucose (B); galactose (C); fructose (D); fucose (E) and BSA (F). Measurements in 5 mmol L^{-1} $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ in 100 mmol L^{-1} KCl solution**90**

Fig. 5. Graphical representation of ΔI_{rel} of modified electrode after detection of serum glycoproteins from healthy subjects and prostatic tumor alterations. Groups: 1- Healthy (control); 2- BPH; 3- PCa score 6; 4- PCa score 7; 5- PCa score 9. Measurements in 5 mmol L^{-1} $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ in 100 mmol L^{-1} KCl solution. In the graphic, $a \neq b \neq c$ and $b \neq d \neq e$**91**

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAL - “*Aleuria aurantia lectin*” – Lectina de *Aleuria aurantia*
- AQT – Antiquimotripsina
- BPH – benign prostatic hyperplasia
- BPSA – “*benign PSA*” – PSA benigno
- BSA – “*Bovine serum albumin*” – Albumina sérica bovina
- CaP – Câncer de próstata
- CNT – carbon nanotube
- ConA – Concanavalina A
- cPSA – PSA complexado
- CramoLL- “*Cratylia mollis lectin*” – Lectina de *Cratylia mollis*
- DNA – “*Deoxyribonucleic acid*” – ácido desoxirribonucleico
- DSL – “*Datura stramonium lectin*” – Lectina de *Datura stramonium*
- E-PHA – “*Phaseolus vulgaris erythro agglutinin*” – Eritroaglutinina de *Phaseolus vulgaris*
- EQM – Eletrodos quimicamente modificados
- FDA – “*Food and Drug Administration*” – Administração de Comidas e Remédios
- fPSA – “*free PSA*” – PSA livre
- FT-IR – “*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*” - Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
- Gal – Galactose
- GalNAc – N-acetil-galactosamina
- HBP – Hiperplasia benigna da próstata
- hK2 - “*human Kallikrein 2*” – Calicreína humana 2
- hK3 – “*human Kallikrein 3*” – Calicreína humana 3
- hK4 - “*human Kallikrein 4*” – Calicreína humana 4
- INCA – Instituto Nacional do Câncer
- IUPAC – “*International Union of Pure and Applied Chemistry*” - União Internacional de Química Pura e Aplicada
- iPSA – “*intact PSA*” – PSA intacto
- LD – Limite de detecção
- LOD – Limit of detection

Me α Man – Metil- α -D-manopirranose

MEV - microscopia eletrônica de varredura

MUC5b – Mucina 5b

Neu5Ac – ácido N-acetilneuramínico

NTC – Nanotubo(s) de carbono

NTCPM - nanotubos de carbono de paredes múltiplas

NTCPS - nanotubos de carbono de parede simples

OMS – Organização Mundial da Saúde

p – coeficiente de correlação de Pearson

PCa – Prostate cancer

PLL – Poli-L-lisina – *Poly-L-lysine*

PNA – “*peanut agglutinin*” aglutinina de amendoim

PSA – “*specific prostatic antigen*” – Antígeno Específico da próstata

PSALT – Relação PSA livre/total r – coeficiente de correlação linear

SAM – “*self-assembled monolayer*” - monocamada auto-organizada

SBU – Sociedade Brasileira de Urologia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1 Câncer: considerações gerais.....	17
2.2 Câncer de Próstata	18
2.2.1 Diagnóstico do Câncer de próstata	21
2.2.2 Bioquímica do PSA	24
2.3 Glicosilação	26
2.3.1 Glicosilação no Câncer de próstata	27
2.4 LECTINAS.....	29
2.4.1 Aplicações biotecnológicas de lectinas	30
2.4.2 Lectina de <i>Cratylia mollis</i> – CRAMOLL.....	32
2.5 BIOSSENSORES	34
2.5.1 Considerações gerais	34
2.5.2 Biossensores eletroquímicos	36
2.6 ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS.....	37
2.7 POLI-L-LISINA	39
2.8 NANOTECNOLOGIA.....	40
2.8.1 Nanotubos de carbono	41
2.8.2 Funcionalização de nanotubos de carbono	42
2.9 TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS	43
2.9.1 Voltametria	43
2.9.2 Transporte de massa	45
2.9.3 Transferência de carga e Dupla camada elétrica	45
2.9.4 Métodos voltamétricos	47
2.9.4.1 Voltametria cíclica.....	47
2.9.4.2 Voltametria de onda quadrada.....	49
2.10 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E MORFOLÓGICA	51
2.10.1 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR).....	51
2.10.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	53
2.11 BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS BASEADOS EM LECTINAS	54
3. OBJETIVOS.....	56
3.1. Geral	56
3.2. Específicos.....	56
4. REFERÊNCIAS.....	57
5. ARTIGO.....	74
6. CONCLUSÕES.....	97
7. ANEXOS.....	99

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, milhões de pessoas na população mundial são diagnosticadas com câncer de diversos tipos. Considerando os tipos de câncer que acometem a população masculina, o câncer de próstata é o segundo mais incidente e a quinta causa de mortalidade por câncer em homens no mundo (Sociedade Americana do Câncer, 2014). No Brasil, o câncer de próstata é considerado um problema de saúde pública. Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) apontam o câncer de próstata como segundo mais incidente em homens brasileiros, atrás apenas dos tumores de pele não-melanoma, e a segunda causa de mortalidade, sendo superado apenas pelo câncer de pulmão (INCA, 2014).

O teste do PSA (do inglês *prostatic specific antigen*) é rotineiramente utilizado para diagnóstico e monitoramento da doença. Embora o PSA seja considerado o marcador tumoral da próstata, seu uso isolado no diagnóstico do CaP é altamente controverso, pois níveis elevados de PSA podem estar relacionados a doenças benignas, como hiperplasia e prostatites, bem como a possibilidade de incidência de câncer de próstata em níveis de PSA considerados normais. Tais fatores reduzem a sensibilidade e especificidade do teste (NARDI et al, 2013). Portanto, o PSA encontra-se na corrente sanguínea em diferentes formas e padrões de glicosilação, que comumente modificam-se no surgimento e progressão do câncer (HORI; BLANCHET; McLOUGHLIN, 2012; GILGUNN et al, 2013).

A análise de alterações na expressão de glicanos representa uma nova abordagem para estudar e detectar o CaP. Os níveis de expressão de glicanos sofrem alterações, não apenas no PSA, mas também em outras glicoproteínas, resultando na formação de perfis específicos que podem auxiliar na detecção precoce do câncer (CHANDLER; GOLDMAN, 2013). Estudos na área de glicômica envolvendo amostras oriundas de tecido prostático, soro e fluido seminal de indivíduos saudáveis, com HBP e CaP revelam diferenças significativas na estrutura de glicanos (LIMA et al, 2010; SARRATS et al, 2010). Visto a importância da glicosilação como indicador do câncer de próstata, tem-se buscado biomoléculas que possam reconhecer carboidratos e detectar alterações estruturais em glicanos. Neste contexto, as lectinas tem sido amplamente empregadas como biomoléculas de reconhecimento específico de carboidratos, pois são um grupo de proteínas estruturalmente diversificadas que possuem sítio de ligação a carboidratos com diferentes especificidades (RAMOS et al, 2000). São valiosos instrumentos para caracterizar e identificar variações na composição de glicanos em glicoproteínas circulantes e de superfície celular, que podem indicar a presença do câncer ainda em estágios iniciais de desenvolvimento. Tem sido reportado o uso de lectinas para caracterização de

glicanos de vários tipos de câncer, por meio de técnicas cromatográficas, espectrometria de massa, histoquímica, imunoenaios e métodos eletroquímicos (ABBOTT et al, 2010; LIMA et al, 2010; BERTÓK et al., 2013).

O estudo bioeletroquímico de lectinas pode fornecer informações analíticas qualitativas e quantitativas associadas à afinidade da lectina com os glicanos presentes na amostra em estudo. Para este propósito, tem-se desenvolvido biossensores eletroquímicos baseados em lectinas, que podem detectar e quantificar interações lectina-carboidrato, com simplicidade, rapidez e elevada sensibilidade, superando algumas das limitações encontradas em outras tecnologias (BERTÓK et al., 2013). Visando a obtenção de sistemas sensíveis, eletrocatalíticos e estáveis, são comumente utilizados eletrodos modificados com polímeros iônicos e nanomateriais na construção desses biossensores. O polímero catiônico poli-L-lisina torna-se interessante pela grande quantidade de grupos amino carregados disponíveis em sua estrutura, favorecendo as trocas iônicas e a imobilização de biomoléculas em superfícies eletródicas (WANG; ZHANG; ZHANG, 2010). Porém, filmes poliméricos podem limitar a área de imobilização na superfície eletródica. Para contornar esta situação, o uso de nanomateriais como nanotubos de carbono são atrativos por aumentar a área de superfície, possibilitando a imobilização de maior quantidade de biomoléculas, além de adicionar grupos funcionais, melhorar a condutividade elétrica e a estabilidade química (XUE et al, 2011; SILVA et al, 2015).

Estudos bioeletroquímicos utilizando biossensores baseados na lectina de *Cratylia mollis*, CramoLL, mostraram o potencial da lectina de reconhecer as glicoproteínas de diferentes sorotipos de dengue em soro humano (OLIVEIRA et al, 2011 a; AVELINO et al., 2014). Este trabalho descreve o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico baseado na lectina CramoLL utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com poli-L-lisina e nanotubos de carbono para caracterizar o padrão de glicosilação em amostras de soro humano caracterizados com diferentes níveis de PSA, oriundas de indivíduos saudáveis, com HBP e CaP. Foi possível detectar diferenças no padrão de glicosilação entre amostras não cancerosas e oriundas de câncer de próstata em diferentes escores de Gleason, confirmando a capacidade das lectinas de reconhecer diferenças na expressão de glicanos em diferentes estágios patológicos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Câncer: considerações gerais

O câncer é considerado uma doença crônica e umas das principais causas de morte mundial, excedido apenas por doenças cardiovasculares no mundo desenvolvido. De acordo com estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (Iarc, do inglês *International Agency for Research on Cancer*), da Organização Mundial da Saúde (OMS), houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, em 2012 (OMS, 2013). Nos países desenvolvidos, os tipos de câncer mais frequentes na população masculina foram próstata, pulmão e cólon e reto; e entre as mulheres, o câncer de mama, de cólon e reto e de pulmão. Nos países em desenvolvimento, os três cânceres mais frequentes em homens foram pulmão, estômago e fígado; e mama, colo do útero e pulmão nas mulheres (OMS, 2013).

No Brasil, o número de casos novos de câncer cresce a cada ano. A estimativa para o biênio 2014/ 2015 indica a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. O câncer de pele do tipo não melanoma é o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata, mama feminina, cólon e reto, pulmão, estômago e colo do útero, como pode ser observado na Figura 1 (INCA, 2014).

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma *.

Localização primária	casos	%			Localização primária	casos	%
Próstata	68.800	22,8%	Homens 	Mulheres	Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%			Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%			Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%			Leucemias	4.320	1,6%

Fonte: INCA, 2014. * Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

A segunda parte do século XX caracteriza-se por um considerável progresso na melhoria da saúde e sobrevivência em todo o mundo. A expectativa de vida ao nascer para a população mundial aumentou de 48 anos em 1950-1955 a 68 anos em 2005-2010 (NAÇÕES UNIDAS, 2012), como resultado da transição demográfica observada nos países desenvolvidos e em países em desenvolvimento como o Brasil. Tal transição reflete na transição epidemiológica, caracterizada por quedas na incidência de doenças infecciosas e transmissíveis, seguida por aumentos subsequentes na incidência e mortalidade por doenças não transmissíveis de caráter crônico, como o câncer, cujo número de novos casos e mortalidade tem aumentado consideravelmente. Na tentativa de controlar a incidência do câncer, a OMS tem desenvolvido estratégias de prevenção primária, que objetivam minimizar a incidência do câncer através do controle da exposição a fatores de risco e ações de rastreamento para detecção precoce (OMS, 2013). Também são propostas ações de apoio à terapêutica, aos cuidados paliativos e às ações clínicas para o seguimento dos doentes tratados. Tais estratégias podem reduzir a incidência e a mortalidade do câncer em diferentes proporções para alguns tipos de câncer mais comuns (FRANCESCHI; WILD, 2013).

O câncer tem sido alvo de muitas pesquisas científicas visando o desenvolvimento de novas ferramentas para o diagnóstico eficiente e terapêutica com melhoramento na sobrevivência e qualidade de vida. A análise das alterações moleculares envolvidas é fundamental na busca de novos biomarcadores e métodos alternativos que possam ser incluídos nos exames preventivos, e auxiliar na detecção precoce da doença (NAKAYAMA et al, 2014).

2.2 Câncer de próstata

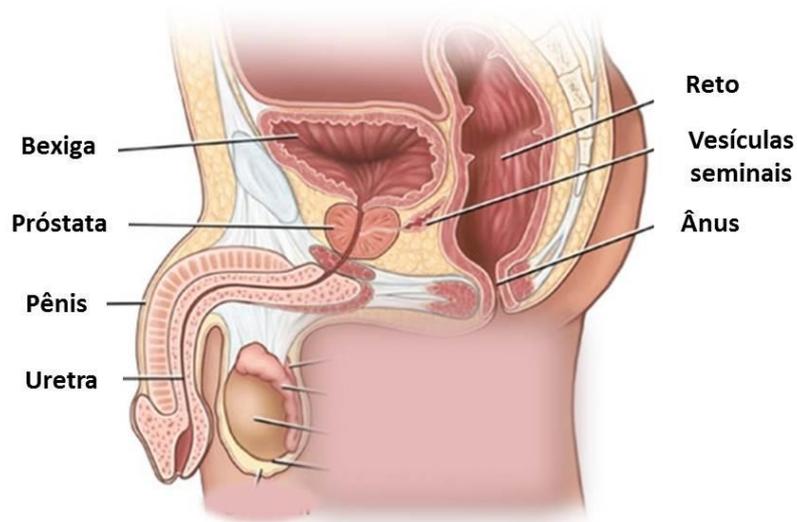
A última estimativa mundial apontou o câncer de próstata como o segundo tipo mais frequente em homens, cerca de 1,1 milhão de casos novos no ano de 2012. Excetuando câncer de pele, câncer de próstata (CaP) é o tumor maligno mais comum em homens americanos. CaP é o mais frequentemente diagnosticado em homens ao lado do câncer de pele e a segunda causa principal de morte por câncer em homens, ficando atrás apenas de câncer de pulmão (SIEGEL et al, 2012; Sociedade Americana do Câncer, 2014). As taxas de incidência de CaP permanecem maiores nas regiões de maior renda do mundo, incluindo América do Norte, Oceania, e oeste e norte da Europa, ao passo que as taxas de mortalidade tendem a ser mais elevadas em ambientes de baixa renda média, incluindo partes da América do Sul, Caribe e

África Subsaariana. As maiores taxas de incidência prevalecem nos países desenvolvidos, em grande parte devido a ampla disseminação do rastreamento pelo teste do Antígeno específico da próstata (PSA), bem como a alta longevidade da população nesses países (CENTER et al, 2012). Para o Brasil, estimam-se 68.800 mil casos novos de CaP no biênio 2014/ 2015, sendo o câncer mais incidente em todas as regiões do país, excetuando casos de câncer de pele não melanoma (INCA, 2014). As taxas de incidência do CaP no Brasil têm aumentado ao longo dos anos devido a melhoria na qualidade dos sistemas de informação do país e evolução dos métodos diagnósticos, com atenção para o rastreamento, e ao aumento da expectativa de vida (INCA, 2012; 2014).

Mais do que qualquer outro tipo, o CaP é considerado um câncer da terceira idade, ocorrendo principalmente em homens idosos. A idade é um fator de risco cuja relação com o CaP já está bem estabelecida. Cerca de 62 % dos casos diagnosticados no mundo ocorrem em homens com 65 anos ou mais, sendo esperado um aumento de cerca de 60 % devido ao aumento da expectativa de vida mundial (INCA, 2014). Outro fator de risco considerado é a etnia. O CaP é aproximadamente duas vezes mais frequente em homens negros que em homens de outras raças (70 % maior em afrodescendentes que em brancos) e são duas vezes mais propensos a morrer de CaP que homens brancos (REBBECK et al, 2013). Estudos genéticos sugerem que a predisposição familiar pode ser responsável por 5-10% dos casos. Ter um pai ou irmão com CaP, principalmente antes dos 60 anos, aumenta para mais que duas vezes a possibilidade do homem desenvolver a doença. O risco é maior para homens com vários parentes afetados, particularmente se seus parentes eram jovens quando o câncer foi encontrado (FITZGERALD et al, 2009; Sociedade Americana do Câncer, 2013). Outros fatores de risco são investigados quanto a relação com a doença, como mutações genéticas, dieta, obesidade, tabagismo, inflamações na próstata, infecções sexualmente transmissíveis e vasectomia (LEITZMANN; ROHRMANN, 2012).

A próstata é uma glândula exócrina que faz parte do sistema genital masculino e se localiza na parte baixa do abdômen. É uma glândula muito pequena, tem a forma de maçã e situa-se abaixo da bexiga e à frente do reto (Figura 2). A uretra, que é o tubo que transporta urina e sêmen para fora do corpo através do pênis, atravessa o centro da próstata. A próstata produz parte do sêmen, um líquido espesso que contém os espermatozoides denominado líquido espermático ou esperma, composto basicamente por fosfatase ácida, ácido cítrico, fibrinolizina, antígeno específico da próstata, enzimas proteolíticas e zinco.

Figura 2. Trato reprodutivo masculino.



Fonte: <http://www.labluxor.com/exames-prostata> (adaptado).

A próstata tem o tamanho aproximado de uma castanha, podendo ser maior em homens idosos, devido a um crescimento benigno da glândula que geralmente ocorre na maioria dos homens adultos (WILSON, 2014). As doenças que afetam a glândula prostática podem ser divididas em duas classes: não-cancerosas, como prostatites e hiperplasia benigna prostática, e cancerosas, o câncer de próstata (SCIARRA et al., 2008).

O termo médico utilizado para o câncer que inicia nas células glandulares prostáticas é adenocarcinoma. Alguns cânceres de próstata podem crescer e espalhar-se rapidamente para outros órgãos, mas a maioria cresce lentamente. Estudos de autópsia mostram que muitos homens idosos e alguns homens jovens que morreram de outras doenças também tinham câncer de próstata e nunca os afetaram durante suas vidas (INCA, 2012; Sociedade Americana do Câncer, 2012). Em seus estágios iniciais, o CaP usualmente não causa sintomas, fato que dificulta a detecção precoce da doença, principalmente em indivíduos que não fazem os exames de triagem. Na doença mais avançada, o crescimento do tumor frequentemente pressiona e obstrui a uretra, causando os sintomas característicos: fluxo urinário fraco ou interrompido; incapacidade de urinar ou dificuldade para controlar o fluxo de urina; necessidade frequente de urinar, especialmente à noite; presença de sangue na urina e dor ou ardência ao urinar (AXCRONA et al, 2012). Encontrando-se em estado avançado, o

câncer de próstata pode se disseminar pelo corpo, vindo a atingir outros órgãos e, principalmente, os ossos, podendo atingir a coluna vertebral, quadril, costelas, fêmures, ou outras áreas. Uma dor na coluna vertebral num indivíduo na idade de risco ou fratura espontânea do fêmur sem qualquer trauma pode ser provocada por uma disseminação do tumor (IBRAHIM et al, 2010; Sociedade Americana do Câncer, 2013).

A hiperplasia benigna prostática (HBP) é outra condição patológica muito comumente associada ao envelhecimento, bastante prevalente em homens a partir dos 40 anos, atingindo mais da metade da população masculina na sétima década de vida e a quase totalidade na oitava década (AVERBECK et al, 2010; PARSONS, 2010). HBP é uma condição clínica caracterizada pelo aumento benigno da próstata, resultante da hiperplasia progressiva das células glandulares prostáticas, levando a formação de nódulos e consequente aumento volumétrico, podendo interferir no fluxo normal de urina causada pela compressão da uretra prostática e pelo relaxamento inadequado do colo vesical (NICKEL, 2008; AVERBECK et al, 2010). Evidências sugerem que os hormônios andrógenos iniciam a hiperplasia do tecido prostático, levando a obstrução do colo vesical ou uretra prostática devido à hipertrofia dos lobos, dificultando o fluxo da urina e causando o esvaziamento incompleto da bexiga com retenção urinária, vindo a ocorrer uma dilatação gradual dos ureteres e rins. A avaliação do paciente com HBP é realizada através da anamnese com aplicação do escore de sintomas prostáticos, exame físico com toque retal, avaliação laboratorial (PSA sérico, exame de urina e função renal), além dos exames de imagem e urodinâmica (AVERBECK et al, 2010; CHAPPLER et al, 2011).

2.2.1 Diagnóstico do Câncer de próstata

A Sociedade Americana do Câncer e a Sociedade Brasileira de Urologia (SBU) postulam o rastreamento populacional para o CaP pelo exame digital retal em conjunto com a dosagem do PSA, com periodicidade anual, em homens com idade igual ou superior a 50 anos e a partir dos 45 anos em homens pertencentes a grupos de risco (afro-americanos ou com um parente diagnosticado com CaP antes dos 65 anos), e ainda a partir dos 40 anos em homens com vários parentes já diagnosticados com CaP em idade precoce (Sociedade Americana do Câncer, 2013; SBU, 2013).

O PSA (do inglês *Prostatic Specific Antigen*), considerado o marcador tumoral da próstata, é sintetizado pelo epitélio ductal e acinal da próstata e é secretado para o interior do

lúmen prostático. A maior parte do PSA produzido está presente no fluido seminal em concentrações relativamente altas (0,5 a 5 ng mL⁻¹) e apenas uma pequena fração é liberada para a circulação sanguínea, onde a concentração varia de 0 a 4 ng mL⁻¹ (ROOBOL et al, 2010). Em indivíduos saudáveis, os níveis de PSA sérico são comumente < 0,1 ng mL⁻¹, sendo considerado normal até 4 ng mL⁻¹. Porém, qualquer alteração na arquitetura da glândula prostática permite que maiores concentrações de PSA entrem na circulação. Valores acima de 10 ng mL⁻¹ são fortes indícios de câncer; entre 4 e 10 ng mL⁻¹ são classificados dentro da categoria de zona “cinzenta” de diagnóstico, não permitindo uma diferenciação clara entre CaP e outras patologias, fazendo com que a biópsia seja indicada em níveis de PSA a partir de 4 ng mL⁻¹ (LILJA; ULMERT; VICKERS, 2008; ROOBOL et al, 2012).

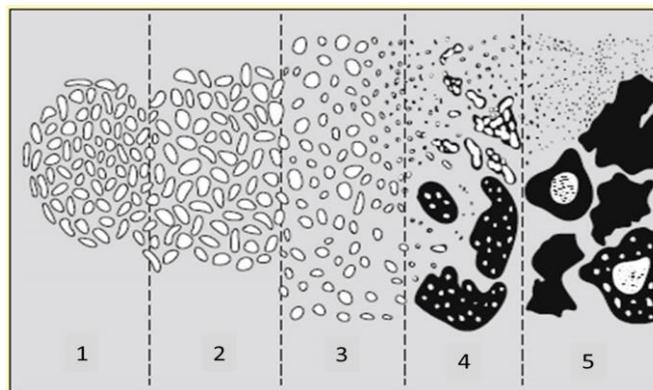
Embora o PSA revolucionou os testes oncológicos desde a sua primeira aprovação pela FDA em 1986, a sua especificidade clínica para detecção do CaP é questionável. Outras doenças da próstata, como HBP e prostatites também causam aumento do PSA na circulação (PARK et al, 2013), ou ainda casos de CaP que ocorrem quando os níveis de PSA são considerados normais. Estudos têm relatado uma incidência de 15% de CaP quando os níveis de PSA são <0,1 a 4 ng mL⁻¹ e 25 % dos casos de CaP ocorrem com PSA entre 4 e 10 ng mL⁻¹ (HEIDENREICH et al., 2011; ROOBOL et al, 2012). Esses fatores reduzem a sensibilidade e especificidade do PSA como teste diagnóstico para o CaP (KRYVENKO et al, 2012). Considerando um ponto de corte em 4,0 ng mL⁻¹, a sensibilidade estimada varia de 35 % a 71% e a especificidade de 63 % a 91 %. Estudos que estimaram seu valor preditivo positivo apontam para valores em torno de 28%, o que significa que cerca de 72 % dos pacientes com dosagem do PSA alterada são submetidos a biópsias desnecessárias (ROOBOL et al, 2010). Quando o PSA total está entre 4 e 10 ng mL⁻¹ é recomendado considerar a relação PSA livre/total (% PSALT), que está inversamente proporcional ao volume prostático e tumoral e ao escore de Gleason. A relação < 25 % é sugestivo de CaP, e > 25% é sugestivo de HBP (NARDI et al., 2013). Estudos indicam que a expressão do PSA não é tecido específica. O antígeno já foi detectado por imunohistoquímica no endométrio, glândulas sudoríparas, periuretrais e anais masculinos, tumores de mama, adenocarcinoma de pulmão, entre outros tumores (CHEN et al, 2008). Considerando esta afirmação e os demais fatores citados, é importante associar o teste do PSA a outros exames, como exame digital retal, para o câncer ser detectado.

O exame digital retal é recomendável e fundamental na avaliação do volume prostático, detecção e estadiamento da doença, bem como para definição do tratamento,

apesar de suas limitações (ROOBOL et al, 2012). Como apenas as porções posterior e lateral da próstata podem ser palpadas, cerca de 40 % a 50 % dos tumores ficam fora do seu alcance. As estimativas de sensibilidade variam entre 48% e 59% e a especificidade de 89-92%. O valor preditivo positivo é estimado entre 28% e 40%. Apesar da recomendação da realização do exame em cada consulta, a aderência na prática clínica é cerca de 22%, considerada baixa (NARDI et al, 2013).

Havendo anormalidades nas avaliações no exame digital retal ou dosagem do PSA igual ou superior a 4 ng mL^{-1} , ou ambos, é indicada a realização do exame histopatológico do tecido obtido pela biópsia da próstata (NARDI et al, 2013). A biópsia guiada por ultrassonografia transretal é o método preferido para obter a amostra de tecido da próstata para análise histopatológica, pela qual se tem o diagnóstico definitivo de CaP. A ultrassonografia transretal é utilizada para orientar o local da biópsia e acompanha o aumento do volume prostático, que é fator preditivo de detecção precoce de CaP (GHAI; TOI, 2012; NARDI et al, 2013). Uma vez detectado, o tumor pode ser classificado pelo sistema de Gleason, que descreve o grau de agressividade do tumor (GLEASON et al, 2002). Na graduação histológica, as células do câncer são comparadas às células prostáticas normais. Quanto mais diferentes das células normais forem as células cancerosas, mais agressivo será o tumor e mais rápida será sua disseminação. A escala de graduação do sistema de Gleason varia de 1 a 5 (Figura 3), com o grau 1 sendo a forma menos agressiva e o grau 5 representado o tumor anaplásico (MONTIRONI et al, 2011).

Figura 3. Sistema de Gleason modificado.



Fonte: EPSTEIN et al, 2010.

Para se obter o escore total da classificação de Gleason, que varia de 2 a 10, gradua-se de 1 a 5 as duas áreas mais frequentes do tumor e soma os resultados. Quanto mais baixo o escore de Gleason, melhor será o prognóstico do paciente. Escores entre 2 e 4 significam que o câncer provavelmente terá um crescimento lento. Escores intermediários, entre 5 e 7, podem significar um câncer de crescimento lento ou rápido dependente de fatores como o tempo durante o qual o paciente tem o câncer. Escores entre 8 e 10 significam um câncer de crescimento muito rápido (CAMBRUZZI et al, 2010). Apesar de permitir o diagnóstico definitivo do CaP, estudos mostram que em até um terço dos casos, o câncer não é detectado na biópsia inicial (VOURGANTI et al, 2012). Quando a primeira biópsia é negativa, é recomendada a realização de uma segunda biópsia, que quando negativa também, reduz a possibilidade de desenvolvimento e diagnóstico do CaP (NARDI et al, 2013).

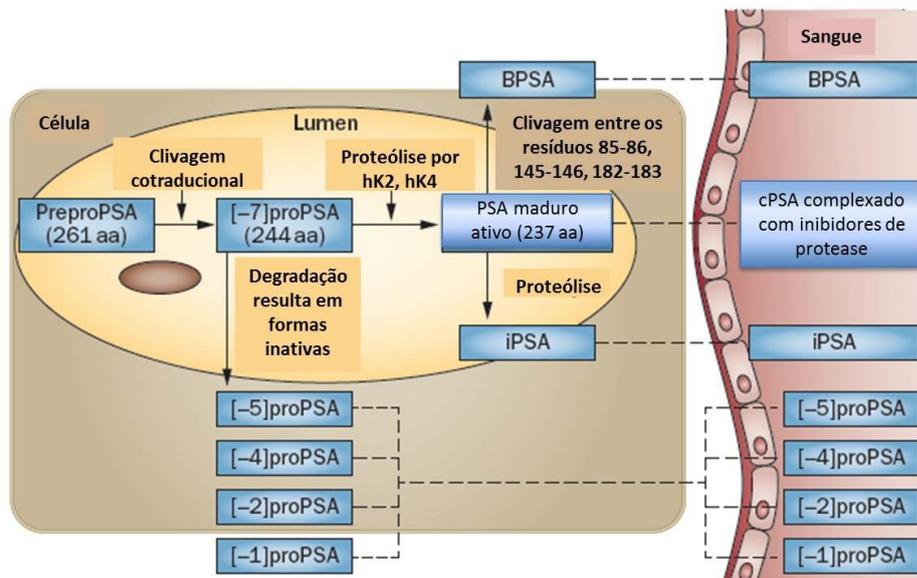
2.2.2 Bioquímica do PSA

PSA, também conhecido como hK3, é uma serino-protease regulada por andrógeno pertencente a família das calicreínas, codificadas por um aglomerado de genes localizados dentro de uma região de 300 kb no cromossomo 19q13.4 humano (CLEMENTS et al, 2001). O PSA é sintetizado no epitélio ductal e acinal da próstata e inicialmente, é traduzido como um pre-propolipeptídeo com uma sequência líder de 17 aminoácidos, que é cotraducionalmente clivada e removida na passagem através da via secretória, produzindo um precursor enzimaticamente inativo denominado [-7]proPSA. Este precursor contém um pro-peptídeo líder de sete aminoácidos além de 237 aminoácidos do PSA maduro. Uma vez secretado dentro dos ductos prostáticos, o pró-peptídeo líder é removido por outras duas calicreínas da próstata, hK2 e hK4, que cliva 7 aminoácidos na porção N-terminal do proPSA, que torna-se rapidamente ativado para PSA, uma protease ativa de 33 kDa, consistindo de cinco pontes dissulfeto intracadeia e um oligossacarídeo N-ligado do tipo complexo - biantenário (Figura 4; GILGUNN et al., 2013). No fluido seminal, as funções do PSA são para clivar as proteínas seminogelina I e II, que conduz à liquefação do sêmen (LILJA et al, 1987).

Outras formas de proPSA também são geradas por clivagem. Isoformas com sequência líder de um, dois, quatro e cinco aminoácidos denominadas [-1]proPSA, [-2]proPSA, [-4]proPSA e [-5]proPSA, respectivamente, tem sido identificadas. Ainda no lúmen, o PSA maduro ativo é clivado em sítios específicos, gerando as isoformas BPSA (conhecida como

PSA benigno) e iPSA (PSA inativo; Figura 4). Todas essas isoformas do PSA são encontradas como PSA livre circulante (fPSA), que corresponde a 16 % do PSA total (VÉGVÁRI et al, 2012). A maior parte do PSA circulante corresponde ao PSA complexado (cPSA), ligado a inibidores de protease principalmente alfa-1-antiquimotripsina (AQT) e alfa-2-macroglobulina (BALK; KO; BUBLEY, 2003)

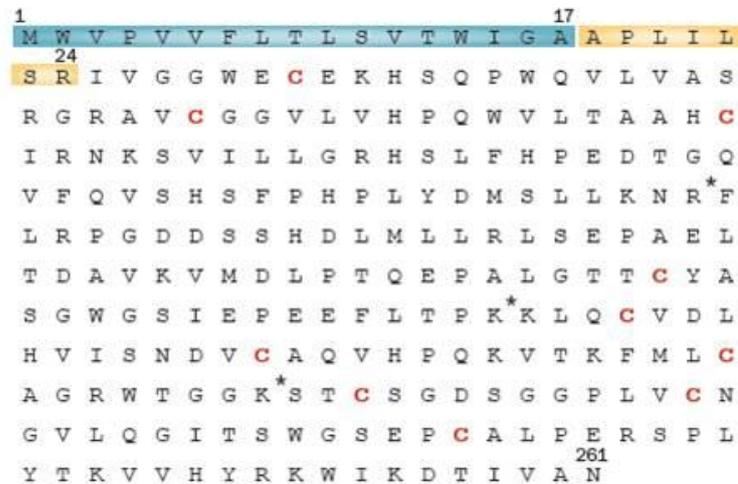
Figura 4. Ilustração da biossíntese do PSA.



Fonte: Adaptação de GILGUNN et al., 2013.

As subformas de proPSA têm sido identificadas como os constituintes predominantes do fPSA. Vários estudos tem mostrado a especificidade de proPSA para detecção do CaP, especialmente [-2]proPSA e [-4]proPSA. O aumento da expressão de [-2]proPSA tem sido associada com o aumento da agressividade do câncer e tende a acumular-se no soro de homens com CaP (MYKOLAJCZYK et al, 1997). BPSA é uma forma inativa de PSA propensa à degradação interna nos resíduos Arg85-Phe86, Lys145-Lys146, e Lys182-Ser183 (Figura 5). BPSA é predominantemente encontrado na zona de transição prostática de homens com HBP. Pensa-se que BPSA surge da clivagem pós-tradução por proteases específicas em tecido hiperplásico de HBP (MYKOLAJCZYK et al, 2004).

Figura 5. Composição completa de aminoácidos do PSA*.



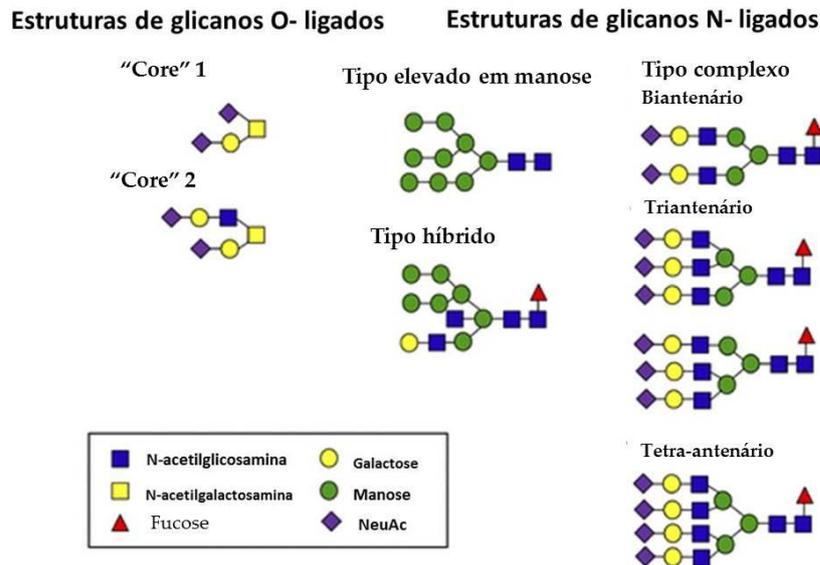
* A sequência líder de 17 aa do pre-propolipeptídeo está destacada em azul; a região de clivagem de 7 aa do propeptídeo está destacada em amarelo. As regiões de pontes intracadeias de cisteína são mostradas em vermelho, e os símbolos de estrela mostram os sítios de clivagem interno do PSA benigno. Fonte: GILGUNN et al., 2013.

2.3 Glicosilação

Glicosilação é uma das modificações pós-traducionais mais comuns promovida por um sistema altamente regulado de enzimas e transportadores que adicionam covalentemente cadeias de açúcares (glicanos) a proteínas, produzindo um grupo diversificado de glicoproteínas de superfície celular ou secretados na circulação sanguínea. Esse mecanismo participa do processamento secundário de proteínas nas células, exercendo um papel crítico na determinação da estrutura da proteína, função, estabilidade e proteção contra proteases (WANG et al, 2012; AEBI, 2013).

Estimativas sugerem que cerca de 70 % do proteoma humano é glicosilado (VOGLMEIR et al, 2010). Os glicanos são ligados às proteínas via grupo amino (N-ligação) ou grupo hidroxila (O- ligação). Fucose, galactose, glicose, manose, N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina, e ácido siálico são as principais unidades de formação dos N- e O-glicanos humanos (Figura 6). Os processos de O-glicosilação e N-glicosilação ocorrem durante a passagem da proteína através do retículo endoplasmático e compartimentos de Golgi (HASSINEN et al, 2011; AEBI, 2013). Dentro do retículo endoplasmático, carboidratos são adicionados a proteínas recém-formadas em um resíduo de aminoácido específico.

Figura 6. Exemplos de estruturas típicas de glicanos N- e O- ligados expressas em glicoproteínas de plasma humano.



Fonte: PRESTON et al, 2013.

Na N-glicosilação, blocos pré-montados de açúcares são transferidos durante a transdução via grupo amida de um resíduo de asparagina, e na O-glicosilação, os açúcares são adicionados à hidroxila dos aminoácidos serina e treonina. Mais de duzentos tipos de transferases e outras proteínas reguladoras adicionais expressos em padrões e níveis específicos em cada tecido participam da síntese de um conjunto diversificado de glicanos (DENNIS; NABI; DEMETRIOU, 2009).

O conjunto de glicanos sintetizados por uma célula em condições específicas é chamado de glicoma. Porém, a constituição de um glicoma pode mudar drasticamente em resposta a mudanças sutis no ambiente celular, incluindo alterações extensas dos padrões de glicosilação, tornando-se um fenômeno característico de muitas doenças (LAUGHLIN; BERTOZZI, 2009).

2.3.1 Glicosilação no Câncer de próstata

Recentes estudos no campo da glicômica têm mostrado que padrões de glicosilação anormais são uma característica fundamental da transformação maligna e progressão do câncer. Aberrações na expressão de glicanos e glicoproteínas podem ser observadas na presença do câncer, inclusive redução ou aumento na expressão de uma estrutura ou padrão

particular, sugerindo que glicoproteínas com porções de glicanos modificadas são alvos viáveis para distinguir entre condições malignas e benignas e auxiliar no diagnóstico do câncer (CHANDLER; GOLDMAN, 2013).

Muitos estudos têm identificado alterações nos padrões de glicosilação que possibilitam detectar o câncer de próstata e distinguir de condições benignas. Um estudo que analisou o perfil de N-glicanos expressos em soros de homens saudáveis e de homens com câncer de próstata metastático identificou um aumento na fucosilação nos glicanos, na presença do câncer (KYSELOVA et al, 2007). SALDOVA et al (2011) investigaram se os padrões de glicosilação poderiam distinguir entre diferentes estágios de CaP e HBP, analisando soros de homens com HBP e com CaP escore de Gleason 5 e 7. Foi encontrada maior expressão de glicanos biantenares fucosilados e ligados a α 2-3 ácido siálico nos soros oriundos de CaP em comparação com HBP, e observaram redução notável na expressão de glicanos triantênarios trigalactosilados e glicanos tetrasialilados com um braço externo fucosilado, e aumento nos níveis de glicanos tetra-antênarios tetrasialilados em CaP escore 7 em comparação com escore 5, possibilitando classificar os tumores com maior sensibilidade e especificidade que o teste de PSA atual.

Também têm sido descritas alterações na glicosilação de diferentes formas do PSA oriundas de CaP e HBP, a maioria delas relacionadas aos níveis de ácido siálico. A presença de resíduos de ácido siálico α 2-3 ligados no PSA pode discriminar entre doença maligna e benigna quando se compara os perfis de oligossacarídeos de fPSA e cPSA no soro e plasma seminal de CaP (TAJIRI; OHYAMA; WADA, 2008). Um estudo utilizando cromatografia de afinidade com lectina de *Maackia amurensis* imobilizada para identificar resíduos de ácido siálico α 2-3 ligados em tPSA e fPSA de homens com CaP e HBP relatou que a lectina ligou-se a maiores concentrações de fPSA de CaP do que HBP (OHYAMA et al, 2004). Outro estudo de caracterização de glicanos presentes em subformas (F1-F5) obtidas por eletroforese bidimensional do PSA, revelaram diferenças no grau de sialilação para as subformas F3 e F4 que podem distinguir o CaP de HBP. A subforma F3, que possui N-glicanos mono- e disialilados, está reduzida no CaP quando comparado à HBP, e diminui gradativamente com o estágio do câncer, enquanto a subforma F4, que está aumenta gradativamente com o estágio do CaP, apresenta apenas a forma monosialilada. Os resultados indicaram redução nos níveis de ácido siálico no CaP, e a quantificação de subformas F3 pode auxiliar no diagnóstico da doença (SARRATS et al, 2010).

Estes estudos mostram que a expressão de padrões de glicanos diferenciados, tanto no PSA como também em outras glicoproteínas, são úteis como marcadores para o câncer de próstata e apresentam maior especificidade que o teste de PSA sérico atual.

2.4 LECTINAS

As lectinas são uma família de proteínas de ligação à glicanos, de ocorrência natural, que pode discriminar entre diferentes estruturas de glicanos e são, portanto, ferramentas muito úteis para glicanálise. Estão envolvidas em eventos fisiológicos cruciais de interações proteínas-carboidrato, como adesão, migração e interação celular (LI et al, 2011; AHN et al, 2012).

O termo lectina, oriundo do latim “lectus” (escolhido, selecionado), foi introduzido por BOYD e SHAPLEIG (1954), para definir um grupo de proteínas que apresentavam seletividade na interação com carboidratos. Uma definição mais aceita foi proposta por PEUMANS e VAN DAMME (1995; 1998), que as definiram como proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que contém pelo menos um sítio não-catalítico de ligação reversível e específica a monossacarídeos ou oligossacarídeos. SHARON e LIS (2002) ampliaram esse conceito, abrangendo todas as proteínas presentes em fontes naturais, de origem não imunológica, capazes de ligarem-se a carboidratos com especificidade ou não para eritrócitos de um determinado grupo sanguíneo. A origem não imunológica das lectinas distinguem-as de anticorpos anticarboidratos, que também aglutinam células. Diferente dos anticorpos, que são estruturalmente similares, as lectinas diferenciam-se entre si pela composição aminoacídica, requerimento de metais, peso molecular e estrutura tridimensional (MOREIRA et al, 1998; SOUZA et al, 2003).

A constante de associação entre lectinas e monossacarídeos varia de 10^3 a $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, e entre lectinas e oligossacarídeos, 10^4 a 10^7 M^{-1} , valores inclusos na mesma faixa encontrada para ligações anticorpo-antígeno e enzima-substrato (SHARON; LIS, 1990; SHARON; LIS, 2002). Cada lectina liga-se a um monossacarídeo específico ou complexos de carboidratos de oligossacarídeos ou glicoconjugados através de seus sítios de ligação que tendem a se localizar na superfície da proteína. Essa interação ocorre por ligações de hidrogênio, interações de Van der Waals e interações hidrofóbicas (SHARON; LIS, 2002; SOUZA et al, 2003). No entanto, a maioria dessas interações é feita pelas ligações de hidrogênio devido a disponibilidade de grupos hidroxila nos açúcares, permitindo a formação dessas ligações entre

os aminoácidos do sítio de ligação na lectina e o açúcar, além da participação de moléculas de água como pontes na formação de ligações de hidrogênio entre lectina-carboidrato.

Embora tenham sido inicialmente encontradas em plantas, as lectinas estão amplamente distribuídas entre vegetais, vírus, microrganismos e animais (HUSKENS et al, 2010; NUNES et al, 2011; SOARES et al, 2011; CHEN; LI, 2013). Lectinas de leguminosas é a família de lectinas de plantas que compreende o maior número de proteínas já identificadas e melhor caracterizadas. Lectinas tem sido detectadas em mais de 600 espécies, sendo cerca de 70 já purificadas, geralmente por cromatografia de afinidade com açúcares ou derivados imobilizados, e mais de 40 dessas lectinas estão disponíveis comercialmente (SHARON; LIS, 1990). Todas lectinas de leguminosas, embora derivadas de espécies taxonomicamente distintas, tem muitas características moleculares e propriedades físico-químicas em comum, porém com grande variedade em sua especificidade para carboidratos (Figura 7) (SHARON; LIS 1990; RAMOS et al, 2000). Usualmente consistem de duas ou quatro subunidades (25-30 kDa), cada uma com um sítio de ligação a carboidrato (VAREJÃO; CORREIA; FOGUEL, 2011). Também possuem sítio de ligação a metais, cátions divalentes, como Ca^{2+} e Mn^{2+} para estabilizar e fixar a estrutura protéica, indispensáveis para a ligação do carboidrato. A ligação do metal é importante para o dobramento correto de *loops* que formam o sítio de ligação de monossacarídeos (SOUZA et al, 2003).

2.4.1 Aplicações biotecnológicas de lectinas

A disponibilidade de um grande número de lectinas e seu potencial de reconhecer carboidratos com diferentes especificidades tem introduzido esta classe de proteínas em diversas pesquisas biotecnológicas. Graças à especificidade para mono- e oligossacarídeos expressos na superfície celular, as lectinas podem ser utilizadas para tipagem de células sanguíneas (DAM et al, 2011); como inseticida, ao prejudicar o desenvolvimento e mortalidade de larvas (ALBUQUERQUE et al, 2012); como bactericida e fungicida (CHARUNGCHITRAK et al, 2011) e são utilizadas em matrizes de afinidade para a purificação de várias glicoproteínas (ARAÚJO et al, 2012). Também têm sido aplicadas como ferramentas para sistemas de liberação de drogas em mucosas (SINGH et al, 2011) e vêm sendo investigadas como antivirais, por impedir a invasão e replicação viral (TAKEBE et al, 2013).

Figura 7. Lectinas da família *Leguminosae* distribuída em várias tribos com especificidades para diferentes monossacarídeos.

Tribo ou sub-tribo	Espécies	Especificidade
<i>Diocleinae</i>	<i>Canavalia ensiformis</i>	Man/Glc
	<i>C. brasiliensis</i>	Man/Glc
	<i>Dioclea grandiflora</i>	Man/Glc
	<i>Cratylia floribunda</i>	Man/Glc
<i>Hedysareae</i>	<i>Onobrychis vicifolia</i>	Man/Glc
<i>Dalbergieae</i>	<i>Vatairea macrocarpa</i>	Gal
<i>Vicieae</i>	<i>Pisum sativum</i>	Man/Glc
	<i>Vicia faba</i>	Man/Glc
	<i>V. villosa-B4</i>	GalNAc
	<i>Lens culinaris</i>	Man/Glc
<i>Genisteae</i>	<i>Lathyrus ochrus</i>	Man/Glc
	<i>Crotalaria striata</i>	GalNAc
	<i>Ulex europaeus I</i>	L-Fucose
<i>Trifolieae</i>	<i>Ulex europaeus II</i>	GlcNAc
	<i>Medicago sativa</i>	Gal
	<i>M. truncatolata</i>	Man/Glc
<i>Glycineae</i>	<i>Trifolium repens</i>	Gal
	<i>Glycine max</i>	GalNAc
<i>Phaseoleae</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Complex
	<i>Dolichos biflorus</i>	GalNAc
	<i>Arachis hypogaea</i>	Gal
<i>Hedysareae</i>	<i>Onobrychis vicifolia</i>	Glc/Man
<i>Shophoreae</i>	<i>Shophora japonica</i>	GalNAc
<i>Erytrineae</i>	<i>Erythrina velutina</i>	Gal
<i>Lotae</i>	<i>Lotus tetragonolobus</i>	L-Fucose
<i>Bauhinieae</i>	<i>Griffonia simplicifolia</i>	GalNAc
	<i>Bauhinia purpurea</i>	GalNAc
<i>Parkieae</i>	<i>Parkia platycephala</i>	Man/Glc

Fonte: RAMOS et al, 2000.

Recentemente, as lectinas tem sido amplamente utilizadas em gliconálise, para elucidação de alterações em glicanos relacionadas à determinada condição fisiológica e patologias como o câncer, em consequência de modificações em genes reguladores das enzimas que participam da glicosilação (COELHO et al, 2010; WANG et al, 2012). O aumento ou redução na ramificação dos glicanos e nos níveis de expressão de monossacarídeos como ácido siálico, fucose e manose em diferentes estágios de transformação tumoral, ou ainda o surgimento de antígenos glicosilados câncer-associado, como o antígeno Tn-siálico (Neu5Ac α 2-6GalNAc-O-Ser/Thr), são alterações comumente relacionadas à progressão do câncer e metástase (WANG et al, 2009; CONZE et al, 2010; SHIMOJO et al, 2011). A especificidade com que as lectinas reconhecem os glicanos permite

a identificação de alterações tumor-específicas e a descoberta de biomarcadores glicosilados.

Na tentativa de caracterizar o padrão de glicosilação do PSA, foi desenvolvido um imunoenensaio com as lectinas de *Sambucus nigra* (SNA) e lectinas de *Maackia amurensis* (MAL-I e MAL-II) para comparar a expressão de ácido siálico no PSA de soros de CaP e soros não cancerosos. Os resultados do estudo sugerem que os padrões de sialilação do PSA são mais heterogêneos no CaP, podendo discriminar entre amostras cancerosas e não cancerosas (MEANY et al, 2009). ABBOTT e colaboradores (2010) utilizaram lectina de *Phaseolus vulgaris* (E-PHA), lectina de *Aleuria aurantia* (AAL) e lectina de *Datura stramonium* (DSL) para caracterização glicoproteômica comparativa de soros e tecidos saudáveis e tumorais de pacientes com câncer de ovário endometrióide e detectaram alterações tumor-específicas na glicosilação de algumas glicoproteínas, entre elas periostina, trombospondina e MUC5b, glicoproteínas pouco exploradas como biomarcadores, porém potenciais candidatas a marcadores glicosilados do câncer de ovário.

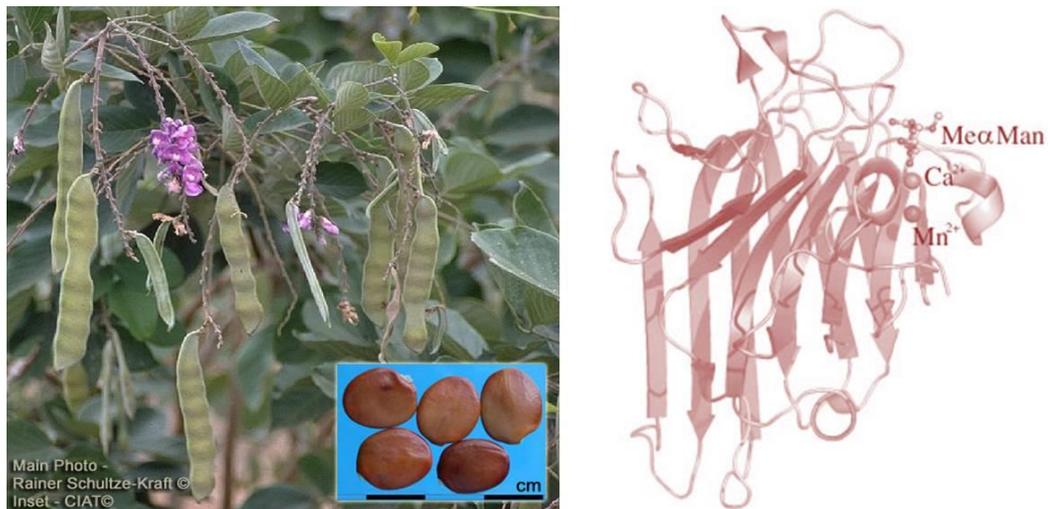
2.4.2 Lectina de *Cratylia mollis* – CRAMOLL

Cratylia mollis Mart. é uma forrageira nativa da região Semi-árida de Pernambuco, estado do nordeste do Brasil, popularmente conhecida como feijão camaratu ou camaratuba. Pertence a família Leguminosae, grupo *Phaseoleae* e subgrupo *Diocleinae*, que também contém o gênero *Canavalia*, ao qual pertence a espécie *Canavalia ensiformes*, de cujas sementes é obtida a lectina Concanavalina A (Con A) (SUMNER, 1919; MATTIASSON; RAMSTORP, 1984). As sementes de *Cratylia mollis* são fontes de lectinas denominadas CramoLL (Figura 8 A e B), que encontra-se em quatro isoformas moleculares, com especificidade variada: CramoLL 1, CramoLL 2, CramoLL 3 e CramoLL 4, além de uma preparação contendo as isoformas 1 e 4, denominada CramoLL 1, 4, similar a Con A. As isoformas mais estudadas são a CramoLL 1 e a CramoLL 1, 4, com especificidade glicose/manose, diferentemente de CramoLL 2 e CramoLL 3 que são galactose específica (PAIVA; COELHO, 1992; CORREIA; COELHO, 1995; SANTOS et al, 2004).

Em um estudo de caracterização utilizando cristalografia de raio-X, CramoLL 1 apresentou estrutura terciária clássica de lectinas de leguminosa. Sua estrutura primária é constituída por 236 resíduos de aminoácidos, com 82 % de homologia com a estrutura de ConA, e ambas possuem sítios de ligação ao carboidrato metil- α -D-manopiranosídeo idênticos, com o qual interagem por ligações de hidrogênio também idênticas, e sítios de

ligação aos metais Ca^{2+} e Mn^{2+} (Figura 8 B). CramoLL 1 é uma lectina do grupo de especificidade glicose/ manose, sendo metil- α -D-manopiranosídeo o monossacarídeo para o qual apresenta melhor afinidade (CORREIA e COELHO, 1995). A estrutura secundária é composta exclusivamente por folhas β , todas conectadas por voltas (SOUZA et al, 2003).

Figura 8. (A) Vagens e sementes de *Cratylia mollis*. (B) Estrutura terciária de CramoLL 1, uma lectina de semente de *Cratylia mollis*.



Fonte: (A) <<http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media>> (B) SOUZA et al, 2003.

Estudos desenvolvidos com as isolectinas de *Cratylia mollis* tem mostrado seus potenciais em diversas aplicações biotecnológicas, principalmente CramoLL 1 e CramoLL 1, 4. Algumas aplicações têm chamado a atenção, como ação antitumoral (ANDRADE et al, 2004); atividade mitogênica (MELO et al, 2011b); atividade pró-inflamatória e cicatrizante de lesões teciduais experimentais (MELO et al, 2011a); marcadores de superfície celular de tecido prostático e mamário (BELTRÃO et al, 1998; LIMA et al, 2010), anti-helmíntico (MELO et al, 2011c); composição de matriz para purificação de glicoproteínas (SILVA et al, 2011) e como biomolécula de reconhecimento em biossensores eletroquímicos para detecção de glicoproteínas de diferentes sorotipos de dengue e reconhecimento de bactérias gram-negativas (OLIVEIRA et al, 2008; 2011a; 2011b; AVELINO et al, 2014).

2.5 BIOSSENSORES

2.5.1 Considerações gerais

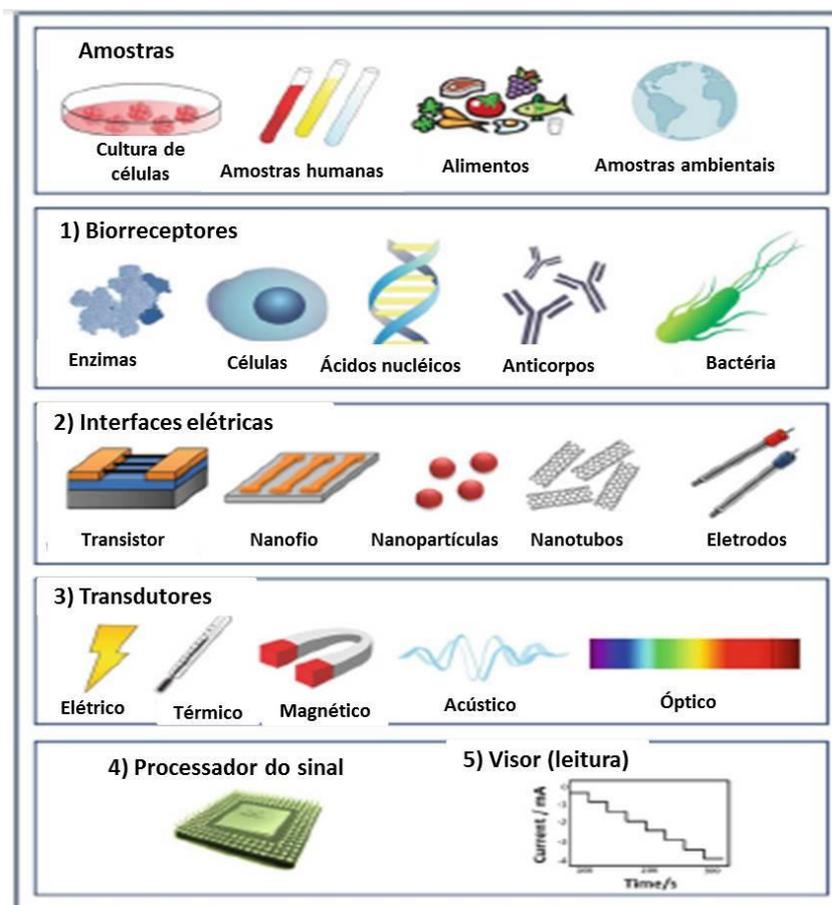
A importância biológica dos glicanos na detecção de doenças como o câncer está impulsionando o desenvolvimento de novas ferramentas glicoanalíticas. As técnicas utilizadas na análise de glicanos incluem eletroforese de zona capilar, espectrometria de massa, cromatografia líquida de alta eficiência e combinações de ensaio imunossorvente com lectinas (MEANY et al, 2009; SARRATS et al., 2010). Em comparação à essas técnicas, o uso de biossensores permite detectar anormalidades na expressão de glicanos com rapidez, sensibilidade e baixo custo. O desenvolvimento desses dispositivos bioanalíticos tem ganhado espaço e colaborado na elucidação de fenômenos bioquímicos e biológicos, incluindo informações sobre um analito, monitoramento e diagnóstico de patologias baseados em técnicas de eletroanálise (OLIVEIRA et al, 2011 a; BERTÓK et al, 2013).

Uma definição proposta pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*) aponta o biossensor como um dispositivo analítico integrado capaz de fornecer informação específica quantitativa ou semi-quantitativa utilizando um elemento de reconhecimento biológico imobilizado à superfície sensora do transdutor, que identifica e converte o sinal da reação bioquímica em um sinal analiticamente útil e mensurável através de um sistema de detecção específico (FERREIRA et al, 2009; KIMMEL et al, 2012). Em geral, um biossensor é composto por cinco partes (Figura 9): (1) o elemento de reconhecimento biológico (biorreceptor), que se liga de forma específica ao analito; (2) uma interface eletroquimicamente ativa, onde ocorrem as interações bioquímicas específicas, dando origem a um sinal; (3) um elemento transdutor, que converte a reação bioquímica específica em um sinal elétrico, amplificado por um circuito de detecção; (4) um processador de sinal (por exemplo, software de computador), para converter o sinal eletrônico em um parâmetro físico significativo, e (5) uma interface apropriada para apresentar os resultados (LUZ; IOST; CRESPILO, 2013).

O primeiro biossensor foi desenvolvido por CLARK e LYONS em 1962, para detecção de glicose através da reação catalisada pela glicose oxidase. Eles elaboraram um sistema conhecido como eletrodo enzimático, utilizando a enzima glicose oxidase imobilizada em um filme de poliácridamida, na superfície de eletrodo de platina, e a determinação da concentração de glicose era baseada na mensuração do consumo de oxigênio. Mais tarde, a

Yellow Spring Instrument Company desenvolveu a tecnologia de Clark e Lyons para introdução no mercado do primeiro biossensor de glicose em 1975, baseado na detecção amperométrica do peróxido de hidrogênio (YOO; LEE, 2010). Desde então, a tecnologia dos biossensores tem sido marcada pelo desenvolvimento de novas abordagens nas formas de detecção e na elaboração de dispositivos mais eficientes e precisos, visando os mais diversos tipos de análises (YOO; LEE, 2010; D’ORAZIO, 2011).

Figura 9. Componentes de um biossensor.



Fonte: LUZ; IOST; CREPILHO, 2013.

Atualmente, os biossensores podem ser aplicados a uma grande variedade de amostras, como fluidos corporais, amostras de alimentos, culturas de células e amostras para análise ambiental. O elemento de reconhecimento biológico, ou componente biológico pode ser células, como microrganismos, e biomoléculas como receptores celulares, enzimas, anticorpos, ácidos nucleicos e lectinas (MONOŠIK; STREĎANSKÝB; ŠTURDÍK, 2012; BERTÓK et al, 2013), que reconhecem o(s) analito(s) de interesse por meio de uma reação

bioquímica, gerando alterações no microambiente que sinalizam a reação: mudanças de estado de oxidação, liberação de calor, emissão de luz, variação de massa, entre outras. O transdutor converte este sinal em uma resposta mensurável do tipo corrente, potencial, etc. (D'ORAZIO, 2011). Com base no sistema de detecção e resposta, os transdutores podem ser classificados como eletroquímicos; térmicos ou calorimétricos, ópticos, piezoelétricos e acústicos (PERUMAL; HASHIM, 2014). Também são utilizados sistemas de detecção para leitura e processamento dos dados obtidos pelo transdutor e transformação em gráficos ou valores numéricos. Nos diversos tipos de biossensores, esses componentes são fundamentais para a construção dos dispositivos.

Os biossensores ainda podem ser classificados de acordo com o tipo de interação entre o elemento de reconhecimento biológico e o substrato de interesse, como catalíticos ou de afinidade. Os biossensores catalíticos utilizam enzima, célula, tecido, organela, e microorganismo como estrutura de reconhecimento e são caracterizados pela ocorrência de reação química com o substrato, gerando produtos (RABA et al, 2013). Os biossensores de afinidade baseiam-se na formação de complexos entre o substrato e o receptor, sem levar a transformações químicas. Entre os sistemas de bioafinidade destacam-se o imunocomplexo antígeno-anticorpo, a interação lectina-carboidrato e a hibridização de sequências de ácidos nucleicos de fita simples (BERTÓK et al, 2013; PERUMAL; HASHIM, 2014).

2.5.2 Biossensores eletroquímicos

Diversos são os sistemas de transdução empregados nos biossensores, sendo os transdutores eletroquímicos os mais atrativos e predominantes em bioanálise, devido à diversidade de técnicas e materiais transdutores que colaboram para alta seletividade e sensibilidade desses sensores; facilidade de construção e mensuração; portabilidade e possibilidade de miniaturização (BRETT; OLIVEIRA-BRETT, 2011). Os biossensores eletroquímicos caracterizam-se pela capacidade de converter o sinal da interação biológica em um sinal elétrico utilizando eletrodos com o elemento de reconhecimento biológico imobilizado (TURNER, 2013). Eletrodos de diversos materiais tais como: platina, ouro, grafite, carbono vítreo e pasta de carbono são usados na construção dos biossensores (MOYO; OKONKWO; AGYEI, 2012). Os dispositivos podem ser portabilizados e produzidos em grande escala empregando a tecnologia do eletrodo impresso, de design flexível e possibilidade de automação (HONEYCHURCH, 2012).

Dentre os tipos de transdutores eletroquímicos, os mais utilizados são os amperométricos, potenciométricos e condutimétricos. Os biossensores amperométricos baseiam-se na mensuração de corrente resultante da oxidação ou redução de uma espécie eletroativa, tal como a presença de grupamentos oxidáveis nas estruturas biológicas, onde o valor de pico da corrente medida sob um potencial de escala linear é diretamente proporcional à concentração em massa do analito (espécie eletroativa) (BERTOK et al, 2013). Nos sensores potenciométricos, mede-se o potencial ou acúmulo de carga no eletrodo de trabalho em comparação com o eletrodo de referência em uma célula eletroquímica quando o fluxo de corrente entre eles é zero ou insignificante (CHIRIZZI et al, 2011). Os dispositivos condutimétricos medem a capacidade de uma substância ou um meio de conduzir uma corrente elétrica entre os eletrodos ou no eletrodo de referência. A concentração de carga (condutividade) é obtida através de medições da resistência da solução entre dois eletrodos (TEKAYA et al, 2014).

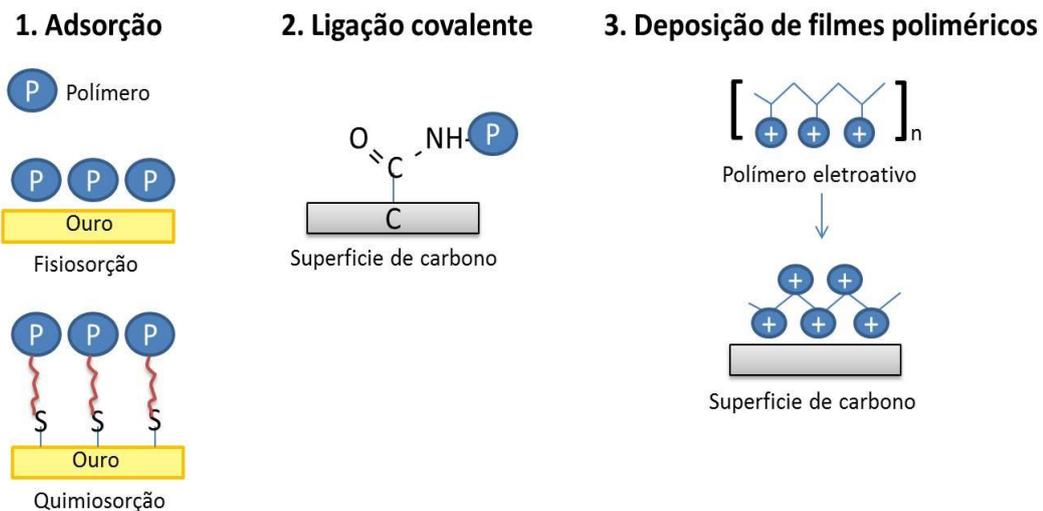
2.6 ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS

Apesar do grande potencial analítico apresentado pelos biossensores eletroquímicos, os eletrodos utilizados na construção desses dispositivos podem apresentar algumas limitações que prejudicam as propriedades analíticas. A gradual passivação na superfície eletródica devido a adsorção dos produtos das reações de oxidorredução na interface eletrodo/solução é uma das principais limitações (BRETT; OLIVEIRA-BRETT, 2011; RAHMAN et al, 2012). Além disso, a sensibilidade à muitos analitos pode ser reduzida em função da cinética de transferência de elétrons ser lenta na superfície desses eletrodos (TUNCER et al, 2012). Uma alternativa para minimizar tais problemas é a construção de biossensores eletroquímicos baseados em eletrodos quimicamente modificados (EQM). Muitos estudos tem empregado polímeros e nanomaterias na modificação de eletrodos de platina, ouro, carbono vítreo, entre outros (MOYO; OKONKWO; AGYEI, 2012).

Um EQM consiste em um eletrodo base (substrato) recoberto pelo modificador químico, capaz de agregar ao eletrodo novas propriedades físico-químicas de interesse. Os principais benefícios para o emprego de eletrodos modificados na eletroanálise tem sido a possibilidade de aceleração de reações de transferência de carga e permeação seletiva de analitos na superfície. Tais processos podem melhorar a seletividade, reatividade e estabilidade de biossensores eletroquímicos como métodos analíticos (KANG et al, 2009).

Um modificador químico pode ser incorporado na superfície de um eletrodo pelos métodos de adsorção, ligação covalente e deposição de filmes poliméricos (Figura 10). A adsorção é realizada simplesmente pela imersão do eletrodo em solução contendo o agente modificador (polímero, nanomateriais ou nanocompósitos) ou deposição dessa solução na superfície eletródica, seguida da evaporação do solvente e formação de filme através da combinação de propriedades de adsorção e atração eletrostática. Na ligação covalente, o modificador é ligado covalentemente à superfície eletródica baseado na reatividade de grupamentos funcionais, como óxidos e aminas. Na deposição de filmes, são imobilizadas camadas do polímero, geralmente eletroativo, sobre o eletrodo a partir de soluções de polímeros pré-formados, ou através da polimerização de unidades monoméricas (ZEN; KUMAR; TSAI, 2003; MEDANY et al, 2012; GOMES-FILHO et al, 2013).

Figura 10. Representação esquemática para diferentes tipos de preparação de EQM.



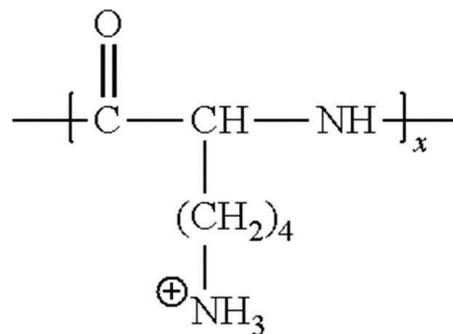
Fonte: Elaborada pela autora.

Os polímeros condutores e polieletrólitos sintéticos são os mais escolhidos na construção de EQMs, pois favorecem a transferência de elétrons, a eletrocatalise, a transdução de sinal, e adição de grupamentos reativos para interação com nanoestruturas e biorreceptores. Tais propriedades melhoram o tempo de resposta, a sensibilidade e o limite de detecção dos biossensores (WANG; ZHANG; ZHANG, 2010; SILVA et al, 2015). Entre os polímeros condutores mais aplicados em estudos com biossensores, estão a polianilina, o politiofeno e o polipirrol, e como polieletrólito, a poli-L-lisina.

2.7 POLI-L-LISINA

O estudo do comportamento eletroquímico dos eletrodos modificados com poliaminoácidos iônicos são de grande importância na área de eletroanálise. A poli-L-lisina (PLL) é um poliaminoácido conhecido pela facilidade com que modifica superfícies eletródicas. É um polímero obtido pela condensação de várias unidades de seu monômero, L-lisina, um aminoácido dotado de uma cadeia de hidrocarbonetos com cinco grupamentos $-CH_2$ e um grupo amino ($-NH_2$) na posição ϵ (Figura 11). As reações de formação do polímero ocorrem entre as unidades monoméricas da L-lisina através da formação de ligações peptídicas. A estrutura final do polímero apresenta as funções peptídicas e grupos amino ativos (NH_3^+) abundantes nas cadeias laterais, em pH neutro, que conferem várias vantagens, incluindo troca iônica e eletrocatalise, propriedades de grande interesse na área de biossensores, além da flexibilidade estrutural, biocompatibilidade, biodegradável e relativamente boa solubilidade em água (HAMANO, 2011). Comercialmente, pode ser encontrado sobre diversos pesos moleculares resultantes do número de unidades matriciais utilizadas para sua confecção. O polímero apresenta pK_a de 10,7; sendo catiônico em pH neutro (ANSON, 1983 a; 1983 b).

Figura 11. Estrutura molecular da Poli-L-lisina.



Poli-L-lisina

Fonte: Disponível em <<http://www.google.com/patents/US8574384>>. Acesso em: 02/01/2015.

PLL pode existir em 3 tipos de conformação: α -hélice, β -folha, ou aleatória, dependendo do ambiente externo. Estudos mostram que transições conformacionais na cadeia livre de PLL em soluções podem ser induzidas por vários estímulos externos, incluindo pH,

surfactantes, ânions, poliânions, solventes, calor, força de cisalhamento, que podem modificar suas propriedades (WANG; CHANG, 2003).

PLL tem sido utilizada na composição de nanocápsulas e vesículas de liberação controlada de genes e drogas, na imobilização celular e como agente antimicrobiano (HAMANO, 2011). A modificação de eletrodos com PLL tem sido investigada, utilizando-se diversos substratos eletródicos e técnicas de modificação. O uso de filmes de polieletrólitos na eletroanálise tem se baseado em mecanismos típicos de troca-iônica, na incorporação de pares redox, conferindo propriedades eletrocatalíticas ao eletrodo, ou ainda grupamentos ligantes capazes de interagir especificamente com o analito através de reações de complexação (ZHAO et al, 2010). Os estudos pioneiros empregando PLL na formação de filmes sobre eletrodos foram realizados por ANSON e colaboradores (1983 a; 1983 b), que conseguiram formar filmes de PLL sobre eletrodo de grafite, a partir de soluções aquosas do polímero gotejadas sobre o eletrodo e aquecidas a 80°C, promovendo mudança conformacional da cadeia de PLL da forma α -helicoidal para β -laminar. Mais tarde, foram realizados estudos com eletrodos de outros materiais e utilizando outras metodologias. JIANG et al (2008) elaboraram um biossensor para DNA utilizando eletrodo de pasta de carbono modificado com filme de PLL, obtido a partir da eletródica, e ZHAO et al (2010) efetuaram a eletropolimerização de L-lisina na superfície de eletrodo de carbono vítreo. Outros trabalhos descrevem a formação de filmes de nanocompósitos de PLL com nanomateriais (DING et al, 2008; JALIT et al, 2008).

2.8 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é uma área abrangente relacionada à pesquisa e desenvolvimento de nanoestruturas, que possuem dimensões na escala nanométrica, ou mais especificamente, pelo menos uma das dimensões menor que 100 nm. Nessa ordem, as estruturas podem apresentar propriedades especiais, diferentes daqueles apresentados em estruturas maiores, como alta resistência mecânica e boa condutividade elétrica. A versatilidade das nanoestruturas proporciona aplicações em diversas áreas, como medicina, dispositivos óticos, supercondutores e produção industrial (BIANCO; KOSTARELOS; PRATO, 2011).

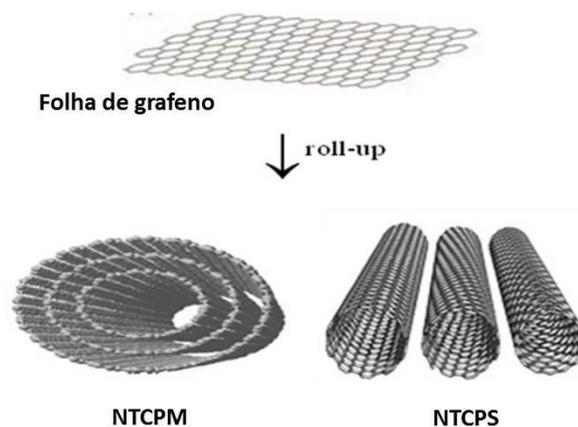
Nanotecnologia tem sido introduzida em ensaios de bioafinidade e biocatálise altamente sensíveis baseados na transdução de sinal eletrônico (ZHOU et al, 2009). Nanopartículas, como ouro coloidal, nanocristais inorgânicos e nanotubos de carbono são

consideráveis promessas de marcadores de ensaios biológicos quantitativos devido a capacidade única de amplificação de resposta, importante na construção de biossensores eletroquímicos com baixos limites de detecção, sensíveis, seletivos e rápidos (WANG et al, 2011).

2.8.1 Nanotubos de carbono

Nanotubos de carbono (NTC) podem ser descritos como folha(s) de grafeno enrolada(s) em torno de um cilindro imaginário, mantida por interações de Van der Waals nas camadas adjacentes. Do ponto de vista estrutural, os NTC podem ser classificados em duas formas: nanotubos de parede simples (NTCPS), formados por uma única folha de grafeno, e nanotubos de paredes múltiplas (NTCPM), que consiste em camadas concêntricas de folhas de grafeno arranjadas em torno de uma área central (Figura 12). O comprimento dos NTC pode variar de nanômetros a centímetros, porém o diâmetro varia na ordem de nanômetros, dependendo do tipo de nanotubo (PRASEK et al, 2011).

Figura 12. Nanotubos de parede simples (NTCPS) e nanotubos de paredes múltiplas (NTCPM).



Fonte: IYUKE; SIMATE, 2011.

Desde seu descobrimento em 1991, quando foi anunciada pela primeira vez a preparação dessas nanoestruturas por Sumio Iijima (1991), os NTC tem ganhado considerável interesse devido as suas propriedades mecânicas e elétricas, e estabilidade química e térmica. A maioria das propriedades dos NTC depende do seu diâmetro, dimensão e quiralidade dos

átomos de carbono, inclusive o comportamento condutor e semicondutor (DUQUE et al, 2010; RAJTER et al, 2010). Em geral, os nanotubos são caracterizados pela estrutura ordenada, peso ultraleve, alta resistência mecânica, elevada condutividade elétrica e térmica e elevada área superficial.

A primeira tentativa de uso de NTC em biossensores eletroquímicos foi executada por BRITTO; SANTHANAM e AJAYAN (1996). Desde então, o interesse de usar NTC para desenvolvimento de biossensores eletroquímicos tem aumentado consideravelmente, devido as suas conhecidas vantagens, como elevada condutividade elétrica, acentuada propriedade eletrocatalítica, além de proporcionar aumento da área da superfície sensora e adição de grupos funcionais. Estas características podem aumentar a cinética de transferência de elétrons na interface sensora e melhorar a reprodutibilidade, estabilidade e a sensibilidade (SGOBBA; GULDI, 2009; KHAN et al, 2010).

2.8.2 Funcionalização de nanotubos de carbono

Um grande problema para na manipulação de NTC é sua insolubilidade ou baixa solubilidade em solventes comuns. São extremamente hidrofóbicos e formam agregados em solventes polares. No entanto, é interessante selecionar condições que melhorem a solubilidade ou dispersão de NTC para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos. A funcionalização através da adição de diferentes grupos químicos podem melhorar sua biocompatibilidade e solubilidade em solventes, além de permitir a imobilização de biomoléculas de modo mais estável (LEINONEN et al, 2011; GOMES-FILHO et al, 2013).

Grupamentos funcionais como carboxila (-COOH), amino (-NH₂) e hidroxila (-OH) podem ser introduzidos através de ligações covalentes ou não-covalentes (MENG et al, 2009; STYLIANAKIS et al, 2010). Os nanotubos funcionalizados adquirem solubilidade em muitos solventes, devido ao aumento da hidrofilicidade pela inserção de grupos polares; podem interagir com polímeros e formar nanocompósitos; e permitem a imobilização de maior número de biomoléculas na superfície eletródica (THOMAS et al, 2012; FREITAS et al, 2014).

2.9 TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS

As técnicas eletroquímicas podem identificar e quantificar analitos de interesse com praticidade e eficiência a partir da relação estabelecida entre os sinais elétricos detectados e a concentração da espécie em estudo (BRETT; OLIVEIRA-BRETT, 2011). Dentre os métodos eletroquímicos existentes, a voltametria constitui importante ferramenta, uma vez que além de informações qualitativas e quantitativas, pode-se estabelecer um mecanismo de cinética de redução ou oxidação de um dado sistema de interesse (PACHECO et al, 2013).

2.9.1 Voltametria

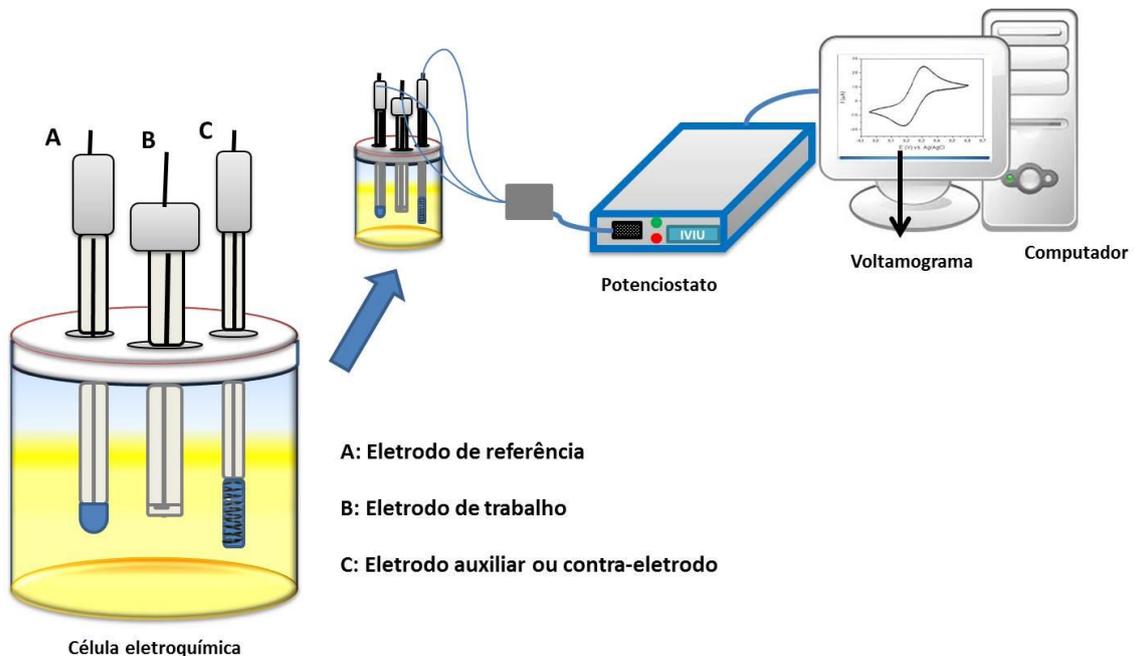
A voltametria é uma técnica eletroquímica utilizada na análise qualitativa e quantitativa de uma espécie química eletroativa, onde as informações são obtidas a partir do registro de curvas corrente-potencial feitas durante eletrólise da espécie eletroativa, em uma célula eletroquímica. O potencial é aplicado em um eletrodo, na forma de varredura, isto é, variando a uma velocidade constante em função do tempo (t), numa determinada região que desencadeia as reações de oxidação ou redução cineticamente favoráveis da espécie eletroativa, criando-se um fluxo de elétrons na interface eletrodo-solução, a corrente elétrica (WANG, 2000).

A célula eletroquímica onde ocorre a eletrólise é normalmente constituída por uma solução contendo as espécies eletroativas e o eletrólito suporte, e três eletrodos: um eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência e um eletrodo auxiliar ou contra-eletrodo (Figura 13).

O eletrodo de trabalho é o mais importante, pois é nele onde o potencial é aplicado e ocorrem os fenômenos eletroquímicos que se pretendem estudar, possui área superficial reduzida e é comumente feito de um material inerte, como ouro, platina, carbono, mercúrio. O eletrodo de referência é usado para controlar com rigor o potencial imposto ao eletrodo de trabalho, uma vez que mantém seu potencial constante durante as varreduras. Os mais comuns eletrodos de referência utilizados são os eletrodos de calomelano saturado ($\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{Hg}$) e o de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl). O eletrodo auxiliar completa o circuito elétrico por onde circula a corrente resultante e geralmente é feito de um material condutor inerte, como platina e grafite. A corrente passa entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar, sem interferir no funcionamento do eletrodo de referência (WANG, 2000; BRETT; OLIVEIRA-BRETT, 2011). O fato da área do eletrodo de trabalho ser menor faz com que este se polarize, variando

o potencial de acordo com o que lhe é aplicado. O eletrodo de referência, por possuir uma área maior não se polariza, mantendo o seu potencial constante durante as medições. A corrente gerada circula entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar, assegurando que a corrente resultante produzida não provoque distúrbios na função do eletrodo de referência (WANG, 2000). Os sistemas voltamétricos assentam na utilização de potenciostatos, equipamentos que controlam o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho e permitem a medição da intensidade de corrente (Figura 13). O potencial e a corrente resultante são registrados simultaneamente em curvas corrente vs. potencial, denominadas voltamograma.

Figura 13. Representação esquemática de um potenciostato conectado à uma célula eletroquímica.



Fonte: Elaborada pela autora.

A voltametria compreende um grupo de técnicas eletroanalíticas que avaliam os fenômenos eletroquímicos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície. O parâmetro ajustado é o potencial (E), e o parâmetro medido é a corrente resultante, obtida pela transferência de elétrons durante um processo de oxirredução, que pode fornecer informações sobre modificações na superfície ou sobre o analito presente na interface. Na medição eletroquímica, o eletrodo pode atrair espécies carregadas positivamente ou negativamente, presentes na solução, que podem ou não

reagir na superfície. Assim, a corrente ou velocidade das reações eletroquímicas é regulada pelos processos de transferência de massa (eletrólitos) do seio da solução para a interface do eletrodo-solução, transferência de carga (elétrons) na superfície do eletrodo, e ainda reações químicas que antecedem ou sucedem a transferência de elétron (adsorção, dessorção, protonação, etc.) (PACHECO et al., 2013).

2.9.2 Transporte de massa

Para que a relação com a concentração do analito do seio da solução seja mantida, o transporte de massa deve ser contínuo. Existem três formas de transporte de massa: migração, convecção e difusão. Em voltametria, as condições experimentais são ajustadas para que os transportes por migração e convecção sejam minimizados. Na migração, os íons em solução movem-se em direção ao eletrodo pela atração ou repulsão pelo eletrodo de trabalho, onde os cátions migram para o cátodo e os ânions migram para o ânodo, criando uma corrente de migração para reduzir a diferença de potencial gerada após aplicação do potencial, que prejudica as análises quantitativas. Esse transporte é minimizado pela adição de eletrólitos inertes (eletrólitos de suporte) em concentrações de 50 a 100 vezes maiores que a espécie eletroativa (WANG, 2000; PACHECO et al, 2013). No processo de convecção, as espécies carregadas são transportadas para a superfície do eletrodo por meios mecânicos, tais como agitação da solução ou do eletrodo, afetando a corrente resultante, podendo ser minimizado mantendo o sistema sem agitação (WANG, 2000; PACHECO et al, 2013).

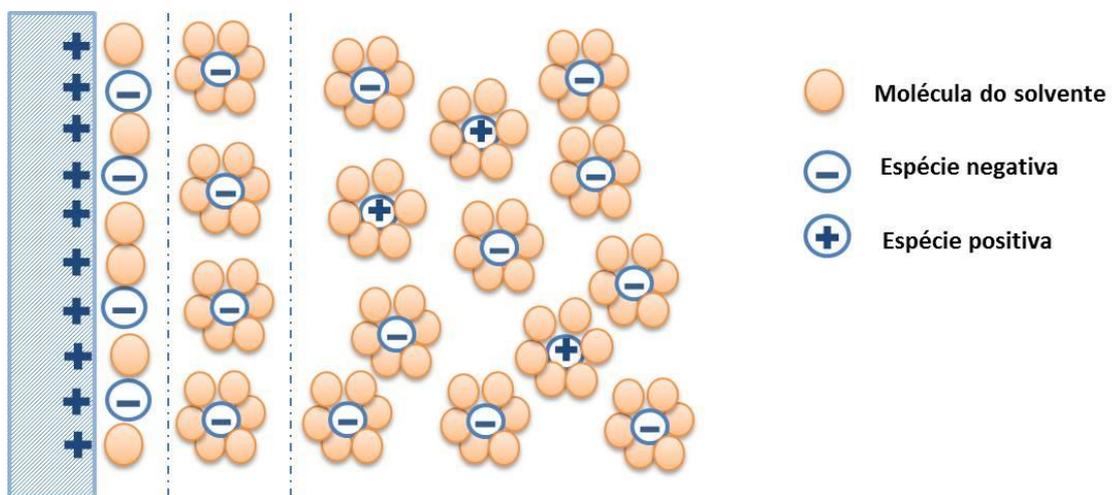
Utilizando meio com eletrólito suporte e sem agitação, o transporte de massa na voltametria é feito basicamente por difusão, que é o movimento espontâneo da espécie eletroativa devido a formação de um gradiente de concentração do analito de interesse entre a superfície do eletrodo e o seio da solução pela aplicação de um potencial no eletrodo de trabalho que leva a redução ou oxidação das espécies imediatamente vizinhas ao eletrodo (PACHECO et al, 2013).

2.9.3 Transferência de carga e Dupla camada elétrica

A interface eletrodo/solução é uma região bem diferenciada do restante da solução e é bem representada pelo modelo de dupla camada elétrica (Figura 14). O eletrodo de trabalho carregado positivamente ou negativamente ao ser imerso numa solução de eletrólitos, a

camada de solução imediatamente adjacente a superfície do eletrodo é modificada e carregada por íons de carga oposta á da superfície eletródica. A primeira camada de íons de soluto e moléculas do solvente adjacente ao eletrodo estão adsorvidas a superfície eletródica por força eletrostática e força de Van der Waals, mantendo os íons compactadas, imobilizados na superfície. Essa região da dupla camada é conhecida como camada interna ou Plano interno de Helmholtz. Entre a camada interna e o seio da solução está a camada externa ou difusa da dupla camada ou plano externo de Helmholtz, onde se encontram espécies eletroativas solvatadas e com mobilidade, sendo atraídos pelo eletrodo, porém, não chegam a superfície do eletrodo devido ao raio de hidratação. Esses íons da camada difusa são necessários para que exista a neutralidade na superfície, uma vez que os íons da camada interna não polarizam completamente a carga do eletrodo. Na camada difusa, a concentração da espécie química eletroativa é proporcional a concentração no seio da solução (BRETT; BRETT, 1993; PACHECO et al, 2013).

Figura 14. Representação esquemática da dupla camada elétrica.



Fonte: Elaborada pela autora.

A transferência de elétrons que ocorre na interface eletrodo/solução gera uma corrente elétrica total composta por duas componentes: a corrente faradaica (segue a lei de Faraday), associada as reações de oxidação-redução dos eletrólitos na superfície do eletrodo proporcional a concentração desses eletrólitos no seio da solução; e a corrente capacitiva, corrente necessária para manter carregada a dupla camada elétrica existente na interface eletrodo/solução, gerada pelo acúmulo de elétrons na superfície eletródica, não obedece á lei

de Faraday e não é proporcional á concentração do analito (WANG, 2000; PACHECO et al, 2013). Os equipamentos e metodologias tem sido melhorados no sentido de reduzir a interferência da corrente não faradaica na corrente total medida. Sugere-se a medição da corrente faradaica em ambiente de baixo ruído, utilizar eletrodos de pequena área superficial e polarizados, e modos de aquisição de sinal mais apropriados.

2.9.4 Métodos voltamétricos

A escolha da técnica voltamétrica a ser utilizada está relacionada com o tipo e a qualidade de informação quantitativa e/ou qualitativa que se quer obter a respeito do analito ou do processo que envolve a interação entre o analito e a superfície do eletrodo de trabalho. Com esta técnica podem ser estudados processos de oxidação e redução de vários eletrólitos, processos de adsorção em diferentes materiais, e mecanismos de transferência eletrônica em superfícies de eletrodos quimicamente modificados. Há ainda a possibilidade de utilizar a técnica para efetuar modificações químicas por eletrodeposição, adsorção, entre outros (PACHECO et al, 2013).

As vantagens analíticas das várias técnicas voltamétricas incluem excelente sensibilidade, podendo alcançar limites de detecção baixíssimos (10^{-1} a 10^{-12} mol L⁻¹), variedade de solventes e eletrólitos, uma vasta gama de temperaturas, tempo reduzido de resposta (segundos), determinação simultânea de vários analitos, capacidade de determinar parâmetros cinéticos e mecânicos, e a facilidade com que as diferentes formas de onda dos potenciais podem ser geradas e obter as medições de correntes (BRETT; OLIVEIRA-BRETT, 2011). Neste trabalho, foram empregadas a voltametria cíclica e a voltametria de onda quadrada na elaboração e caracterização do biossensor.

2.9.4.1 Voltametria cíclica

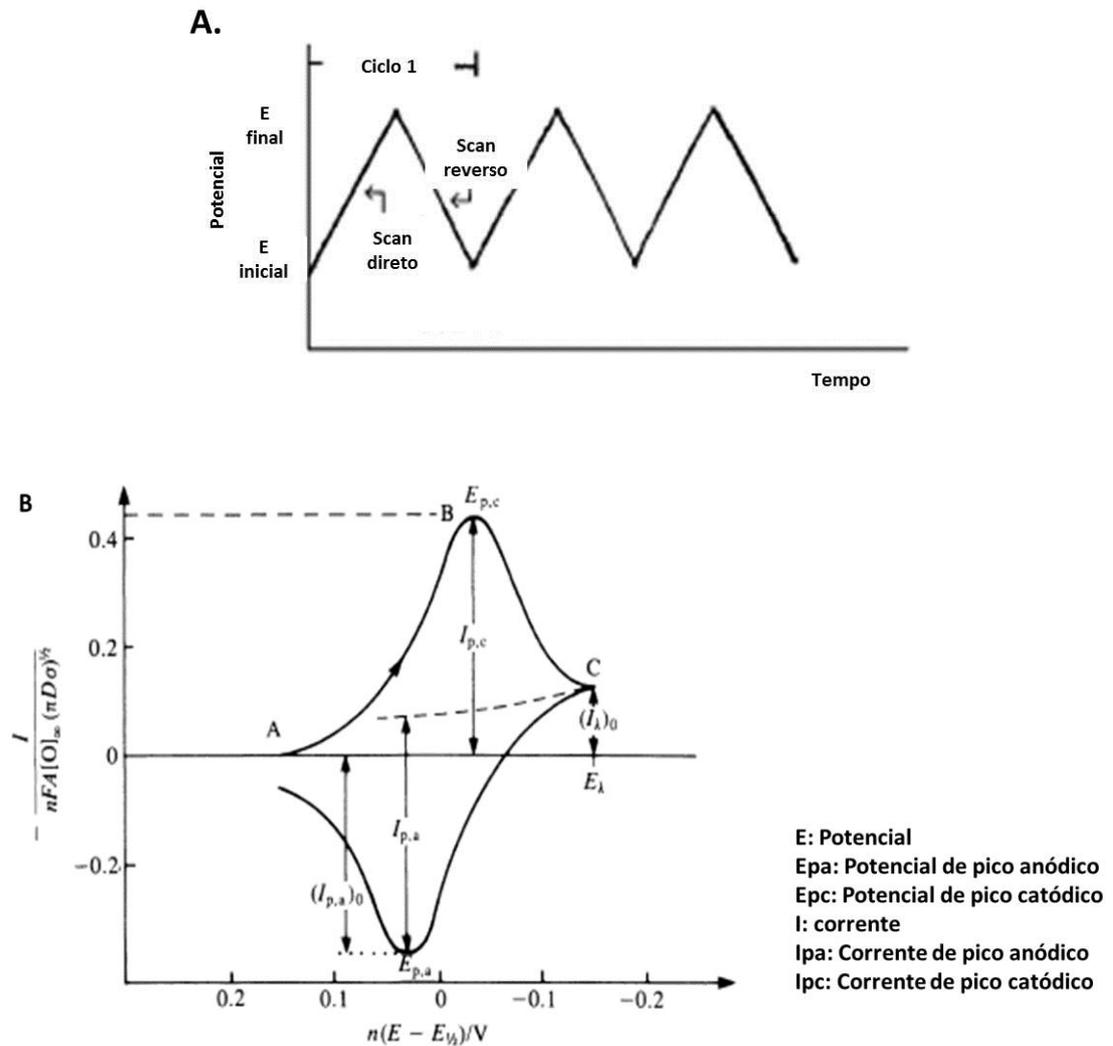
Na voltametria cíclica, são feitas varreduras de potencial-corrente a partir da aplicação de uma determinada faixa de potenciais. Inicialmente o potencial é aplicado no eletrodo de trabalho de um valor no qual nenhuma redução ocorre. Com o aumento do potencial para regiões mais negativas (catódica), o eletrodo torna-se uma fonte de elétrons, favorecendo a redução das espécies eletroativas na interface eletrodo/solução, gerando um pico de corrente proporcional à concentração desta espécie, conhecido como pico de redução ou catódico.

Quando o potencial já tiver atingido um valor no qual nenhuma reação de redução ocorre, ocorre a varredura no sentido inverso, aumentando para regiões mais positivas (anódicas) até o valor inicial (PACHECO et al, 2013). No caso de uma reação reversível, as espécies reduzidas que foram geradas no sentido direto (e se localizarem ainda próximos à superfície do eletrodo) serão oxidadas, gerando um pico simétrico ao pico da redução, denominado pico de oxidação ou anódico (Figura 15 A e B). As varreduras de potencial direto e inverso são efetuados em vários ciclos sucessivos observando-se a oxidação e/ou a redução e as contribuições anódicas e catódicas envolvendo as espécies eletroativas (BRETT; BRETT, 1993).

Os parâmetros mais importantes num voltamograma desta técnica são os potenciais e intensidades de corrente dos picos anódico e catódico. A presença de pares redox, ou seja, substâncias que apresentam simultaneamente potenciais de oxidação e redução podem ser trabalhadas por voltametria cíclica, que permite a avaliação das regiões redox das biomoléculas. As informações obtidas são muito úteis para descrever os sistemas com as análises de corrente e potencial de oxidação e redução, concentração das espécies, coeficientes de difusão, área dos eletrodos, cinética das reações, dentre outros, sendo bastante usada no estudo de formação e caracterização de filmes poliméricos (STRYCHARZ et al, 2011; SEBEZ et al, 2013).

Na voltametria cíclica, o potencial é varrido linearmente com o tempo no eletrodo de trabalho, em uma solução sem agitação, de um valor inicial a um outro valor específico e, em um tempo t , o potencial é varrido no sentido inverso até o valor inicial, caracterizando um potencial em forma de triângulo. Durante a varredura do potencial, o potenciostato mede a corrente resultante, com a qual obtém-se gráficos corrente versus o potencial aplicado (Figura 15 A e B). Dependendo da informação desejada, podem ser efetuados ciclos simples ou múltiplos. Alguns instrumentos digitais aplicam o potencial na forma de escada (staircase), com degraus de potenciais pequenos (da ordem de 10 mV) e tempo de duração pequena (50 ms), onde a corrente é lida apenas no final deste intervalo. Esse método substitui satisfatoriamente a varredura linear, uma vez que minimiza a contribuição da corrente capacitiva na corrente total. Como as etapas de potencial são pequenas, as equações para as respostas da voltametria cíclica “staircase” são consideradas como idênticas das provenientes da voltametria cíclica de varredura linear (PACHECO et al, 2013).

Figura 15. (A) Sinal de excitação potencial-tempo na voltametria cíclica. (B) Voltamograma cíclico.



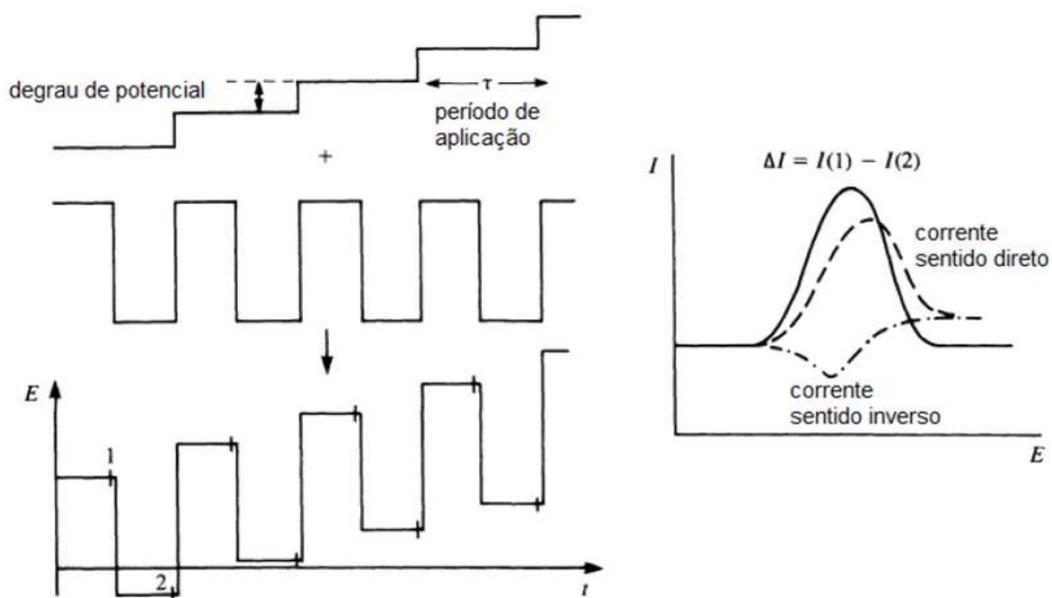
Fonte: BRETT; BRETT, 1993; WANG, 2000.

2.9.4.2 Voltametria de onda quadrada

É uma técnica muito conveniente que tem sido incorporada em estudos analíticos, conhecida pela rapidez e elevada sensibilidade em relação à outras técnicas voltamétricas. Na voltametria de onda quadrada (do inglês *square-wave*) uma onda quadrada simétrica de amplitude E_p sobreposta a uma rampa de potencial na forma de escada (*staircase*) de

amplitude E_s é aplicada ao eletrodo de trabalho (PACHECO et al, 2013). O modo de amostragem do sinal na técnica de voltametria de onda quadrada é representado na Figura 16, onde se pode ver o perfil da variação de potencial com a forma de onda apresentada. A corrente é amostrada duas vezes, uma ao final do pulso direto, quando a direção do pulso é igual à direção da varredura, e outro ao final do pulso reverso (que ocorre no meio do “degrau” da onda *staircase*), onde a direção do pulso é contrária à direção da varredura. Esta dupla amostragem da corrente garante uma minimização da contribuição da corrente capacitiva sobre a corrente total medida. O voltamograma resultante consiste da diferença entre estas duas correntes versus a rampa de potencial aplicado (SKOOG, 2006).

Figura 16. Representação esquemática da voltametria de onda quadrada.



Fonte: PACHECO et al, 2013

Esta técnica permite a discriminação temporal da corrente capacitiva da corrente faradaica fazendo-se a amostragem da corrente perto do final da duração do pulso, uma vez que a corrente capacitiva diminui mais rapidamente que a faradaica. A diferença da corrente entre as duas amostragens é registrada em função do potencial de rampa em degraus. A voltametria de onda quadrada produz picos para processos faradaicos, cuja altura é proporcional à concentração da espécie eletroativa, e permite obter limites de detecção da ordem de 10^{-7} a 10^{-8} mol L⁻¹ (WANG, 2000; SKOOG, 2006). A maior vantagem desta

técnica é a velocidade de aquisição dos dados. As frequências usadas em voltametria de onda quadrada encontram-se tipicamente na região de 1 a 100 Hz. Dentro destas faixas de frequências, as medições podem ser feitas com velocidades de varredura 100 vezes maiores ou mais que nas demais técnicas de pulso, podendo variar de 100 a 1000 mV s⁻¹. Isto diminui o tempo de análise de 3 a 5 minutos para alguns poucos segundos (3 a 10 s) sem haver perda da resolução dos picos. Além da frequência, a amplitude do pulso deve ser otimizada antes da realização das análises. O produto entre a frequência e a amplitude de pulso determina a velocidade de varredura (PACHECO et al, 2013).

2.10 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E MORFOLÓGICA

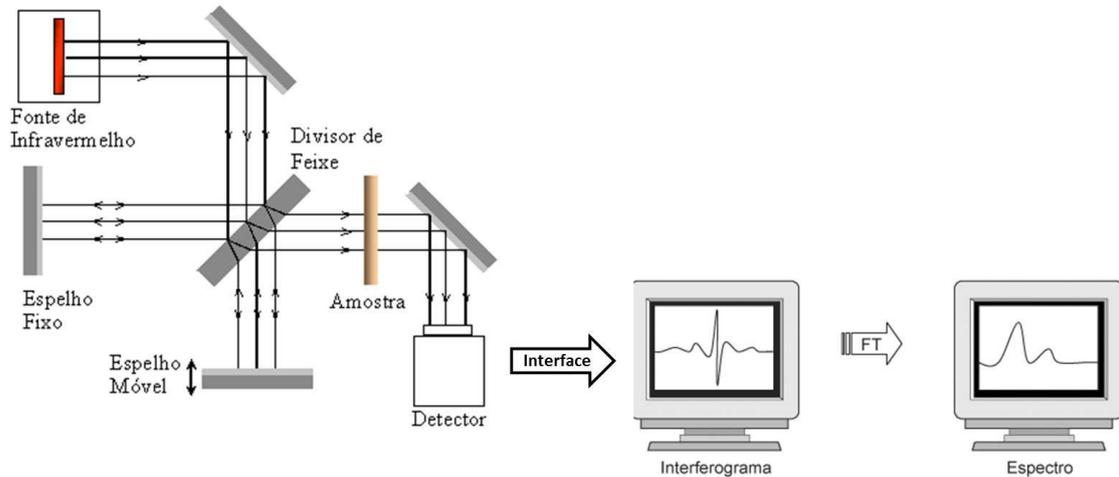
Junto às técnicas de caracterização eletroquímica, a caracterização estrutural e morfológica é de grande importância para análise e comprovação de modificações estruturais e morfológicas em superfície de eletrodos, principalmente após uso de polímeros, nanomaterias e biomoléculas (OLIVEIRA et al, 2011 a; SILVA et al, 2015). Neste trabalho, análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR, do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) foram empregadas para caracterização do biossensor.

2.10.1 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

O FT-IR é uma técnica versátil que detecta a radiação absorvida pelas ligações moleculares para obtenção de espectros mediante a passagem de radiação de infravermelho através da molécula. Ao incidir numa molécula, a radiação provoca a excitação dos seus grupos químicos em modos vibracionais. Parte da radiação incidente é absorvida em diferentes energias, que aparecem como picos no espectro de absorção e correspondem as frequências de vibrações das ligações moleculares do material, o qual pode estar nos estados líquido, sólido ou gasoso (GRIFFITHS; De HASETH, 2007; SMITH, 2011).

Os componentes básicos de um espectrômetro de FTIR são uma fonte de luz na região do infravermelho, um interferômetro com um espelho móvel, um detector, um conversor analógico/digital e um computador (Figura 17).

Figura 17. Representação esquemática de um espectrofotômetro FT-IR.



Fonte: Adaptação de HELFER et al., 2006; <<http://www.sorocaba.unesp.br>>.

A luz da fonte do espectrofotômetro incide sobre o interferômetro, que separa a mesma em dois feixes, um incide sobre um espelho fixo e outro incide sobre um espelho móvel. Os feixes de luz refletidos pelo espelho móvel e fixo se sobrepõem. Este feixe de luz sobreposto passa pelo material e incide no detector. O espectro detectado não pode ser diretamente interpretado. Assim, os dados são convertidos para a forma digital por um conversor analógico/ digital e transferido para o computador para aplicação do método matemático da transformada de Fourier, que faz a interconversão da distância e frequência dos feixes de luz. Os dados tratados representam a relação da absorvância ou transmitância (%) da ligação dos grupos químicos *vs.* a frequência ou número de onda (cm^{-1}). Dependendo da amostra, o espectro pode ser medido em modo de transmitância ou de refletância (STUART, 2004; GRIFFITHS; HASETH, 2007).

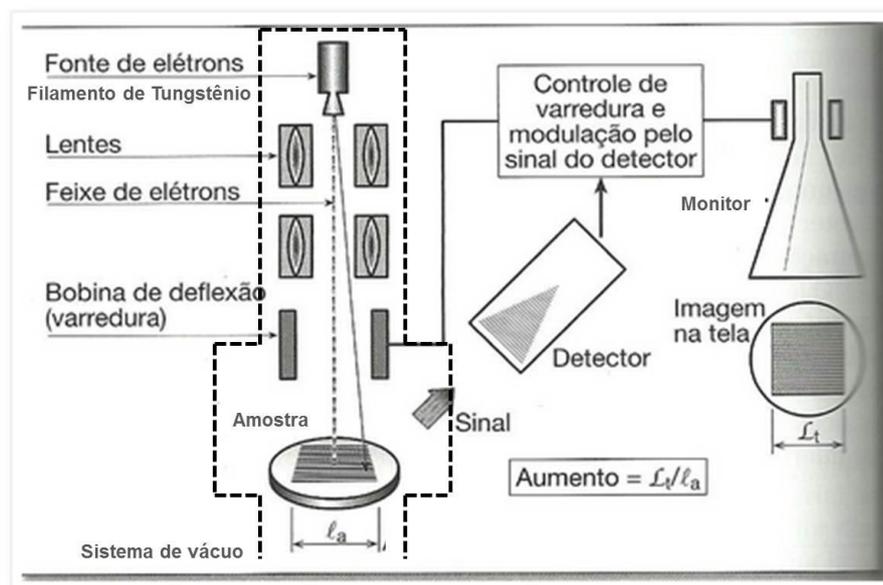
Cada molécula possui um espectro de absorção único, como uma impressão digital. Uma vez registrado o espectro de infravermelho, o próximo passo é a interpretação, baseada nas bandas de absorção, relacionadas aos grupos funcionais da molécula, conhecidos como grupos de frequência (STUART, 2004). A partir do conhecimento da localização das bandas de absorção é possível caracterizar o material.

2.10.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise de características microestruturais de materiais sólidos, fornecendo com grande rapidez informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos da amostra. As imagens são obtidas com alta resolução, geralmente valores da ordem de 2 a 5 nanômetros são apresentados por instrumentos comerciais, enquanto instrumentos de pesquisa avançada são capazes de alcançar uma resolução melhor que 1 nm. Outra característica importante do MEV é a aparência tridimensional da imagem das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007; POWER et al, 2014).

O MEV convencional é basicamente composto por uma coluna óptico-eletrônica adaptada a uma câmara com porta-amostra aterrado, sistema de detectores e sistema de vácuo (Figura 18).

Figura 18. Esquema de operação de um MEV



Fonte: Adaptação de COLPAERT, 2008.

O princípio do funcionamento do MEV consiste na utilização de um feixe de elétrons de pequeno diâmetro, produzido na coluna óptico-eletrônica, para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela

catódica. O sinal de imagem resulta da interação do feixe incidente com a superfície da amostra. A maioria dos instrumentos usa como fonte de elétrons um filamento de tungstênio (W) aquecido, localizado no canhão eletrônico, operando numa faixa de tensões de aceleração de 1 a 50 kV. A interação do feixe com a amostra produz elétrons e fótons que podem ser coletadas por detectores adequados e convertidas em um sinal de vídeo. A imagem formada a partir do sinal captado na varredura eletrônica de uma superfície pode apresentar diferentes características, uma vez que a imagem resulta da amplificação de um sinal obtido de uma interação entre o feixe eletrônico e o material da amostra (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

2.11 BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS BASEADOS EM LECTINAS

O desenvolvimento de biossensores eletroquímicos, ópticos e piezoelétricos baseados em lectinas tem sido relatados na literatura para estudar e identificar alterações de glicosilação em glicoproteínas ou células, associadas a fenômenos fisiológicos, infecções ou doenças (MARASOVA; DEY; DANIELSSON, 2004; SAFINA; VAN LIER; DANIELSSON, 2008; BERTÓK et al, 2013). A propriedade das lectinas de reconhecimento específico de carboidratos permite identificar células modificadas, estruturas antigênicas e biomarcadores.

A literatura reporta o desenvolvimento de vários biossensores eletroquímicos baseados em lectinas para detecção e monitoramento do câncer e doenças infecciosas (BERTÓK et al, 2013). A primeira tentativa para detectar a interação entre lectina e glicanos de glicoproteínas utilizando métodos eletroquímicos foi revelada por DAI et al (2006). Foi realizado um ensaio competitivo para detectar os analitos sacarídicos galactose (Gal), N-Acetil-galactosamina (GalNAc) e o antígeno T (β -D-Gal-[1 \rightarrow 3]-D-GalNAc), associado ao câncer de mama, utilizando lectina de *Arachis hypogaea* (PNA) imobilizada sobre uma superfície de ouro contendo grupo carboxílico (-COOH) ativado, para fixação da lectina. O princípio de detecção foi baseado na competição entre o açúcar não-marcado e o açúcar marcado com um nanocristal (CdS). Após a ligação com a lectina, os CdS foram eletroquimicamente ativados e o cádmio liberado foi detectado usando voltametria de onda quadrada. Foi detectada a interação dos açúcares com a lectina, fenômeno representado por uma redução no sinal eletroquímico (corrente), que foi mais significativa para o antígeno T (DAI et al, 2006).

Mais tarde, XUE e colaboradores (2011) desenvolveram um biossensor eletroquímico baseado na da lectina Concanavalina A utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com

nanotubos de carbono, pelo qual conseguiram estudar e monitorar a dinâmica de expressão de glicanos na superfície de células cancerosas da linhagem k562 em resposta a uma droga. Na área de doenças infecciosas, OLIVEIRA e colaboradores (2011a) elaboraram um biossensor baseado na lectina CramoLL e nanopartículas de Fe_3O_4 sobre eletrodo de ouro para analisar as interações entre a lectina e glicoproteínas de soros de pacientes contaminados com o vírus da dengue dos sorotipos 1, 2 e 3. Através de medições eletroquímicas, foi observado heterogeneidade nos sinais eletroquímicos resultantes das interações de CramoLL com as glicoproteínas dos diferentes sorotipos, podendo ser útil no diagnóstico da dengue. O mesmo grupo desenvolveu também um biossensor eletroquímico baseado em nanopartículas de ouro e CramoLL para reconhecimento de lipopolissacarídeo de diferentes bactérias gram negativas (OLIVEIRA et al, 2011b).

Tais exemplos de biossensores baseados em lectinas para detecção e acompanhamento de doenças e agentes infecciosos, revelam o potencial e a versatilidade dessas ferramentas, estimulando o emprego dessa tecnologia no estudo de outras doenças. Neste trabalho, foi desenvolvido um biossensor eletroquímico baseado em PLL, NTC e lectina CramoLL para caracterização do padrão de glicosilação em soro humano com diferentes níveis de PSA associados à HBP e CaP.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Realizar um estudo bioeletroquímico da lectina de *Cratylia mollis* (CramoLL) utilizando um biossensor eletroquímico empregando poli-L-lisina e nanotubos de carbono funcionalizados com grupos carboxílicos para caracterização do padrão glicoprotéico em soro humano com diferentes níveis de PSA, oriundos de indivíduos saudáveis, com HBP e CaP em diferentes escores de Gleason.

3.2. Específicos

- Desenvolver plataformas sensoras empregando PLL e NTC, visando à aplicação em ensaios eletroquímicos;
- Efetuar análises por técnicas eletroquímicas, FT-IR e MEV para caracterização eletroquímica, estrutural e morfológica do sensor;
- Imobilizar a lectina CramoLL as plataformas sensoras;
- Otimizar os parâmetros cinéticos e experimentais, tais como velocidade de varredura, concentração do polímero e NTC, estudos de estabilidade, concentração da lectina e tempo de imobilização;
- Avaliar a resposta analítica do sensor à diferentes concentrações de Metil- α -D-manopiranosose e fetuína e estabelecer uma curva de calibração;
- Realizar estudos de seletividade e verificar a reprodutibilidade e estabilidade das medidas eletroquímicas do biossensor;
- Analisar a interação de CramoLL e glicoproteínas dos soros de CaP em diferentes graus de estadiamento, de HBP e saudáveis.

4. REFERÊNCIAS

ABBOTT, K. L. et al. Identification of candidate biomarkers with cancer-specific glycosylation in the tissue and serum of endometrioid ovarian cancer patients by glycoproteomic analysis. **Proteomics**, v. 10, p. 470-481, 2010.

AEBI, M. N-linked protein glycosylation in the ER. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1833, n. 11, p. 2430-2437, 2013.

AHN, Y. H., et al. A lectin-coupled, multiple reaction monitoring based quantitative analysis of human plasma glycoproteins by mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, p. 2101-2112, 2012.

ALBUQUERQUE, L. P. et al. Effect of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on survival and digestive enzymes of *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 75, p. 158-166, 2012.

ANDRADE, C. A. S. et al. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, n. 2, p. 435-445, 2004.

ANSON, F. C.; SAVEANT, J.; SHIGEHARAT, K. New model for the interior of polyelectrolyte coatings on electrode surfaces. mechanisms of charge transport through protonated poly(L-lysine) films containing $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{EDTA})^-$ and $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{EDTA})^{2-}$ as counterions. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 105, n. 5, p. 1096-1106, 1983a.

ANSON, F. C.; SAVEANT, J.; SHIGEHARAT, K. Kinetics of mediated electrochemical reactions at electrodes coated with redox polymer films. **Journal of the Electroanalytical Chemistry**, v. 145, p. 423-430, 1983b.

ARAÚJO, R. M. S. et al. *Crataeva tapia* bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent. **Plant Science**, v. 183, p. 20-26, 2012.

AVELINO, K. Y. P. S. et al. Biosensor based on hybrid nanocomposite and CramoLL lectin for detection of dengue glycoproteins in real samples. **Synthetic metals**, v. 194, p. 102-108, 2014.

AVERBECK, M. A. et al. Diagnóstico e tratamento da hiperplasia benigna da próstata. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, v. 54, n. 4, p. 471-477, 2010.

AXCRONA, K. et al. Androgen deprivation therapy for volume reduction, lower urinary tract symptom relief and quality of life improvement in patients with prostate cancer: degarelix vs goserelin plus bicalutamide. **BJU International**, v. 110, p. 1721-1728, 2012.

BALK, S. P.; KO, Y.; BUBLEY, G. J. Biology of prostate-specific antigen. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 2, p. 383-391, 2003.

BELTRÃO, E. I. C. et al. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 74, p. 125-134, 1998.

BERTÓK, T. et al. Electrochemical lectin based biosensors as a label free tool in glycomics. **Microchemical Acta**, v. 180, p. 1-13, 2013.

BIANCO, A.; KOSTARELOS, K.; PRATO, M. Making carbon nanotubes biocompatible and biodegradable. **Chemical Communications**, v. 47, n. 37, p. 10182-10188, 2011.

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, v. 119, p. 419, 1954.

BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Electrochemistry: principles, methods, and applications**. New York: Oxford University Press, 1993.

BRETT, C. M. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Electrochemical sensing in solution - origins, applications and future perspectives. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 15, p. 1487-1494, 2011.

BRITTO, P. J.; SANTHANAM, K. S. V.; AJAYAN, P. M. Carbon nanotube electrode for oxidation of dopamine. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 41, p. 121-125, 1996.

CAMBRUZZI, E. et al. Relação entre escore de Gleason e fatores prognósticos no adenocarcinoma acinar de próstata. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 1, p. 61-68, 2010.

CENTER, M. M. et al. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. **European Urology**, v. 61, p. 1079–1092, 2012.

CHANDLER, K.; GOLDMAN, R. Glycoprotein disease markers and single protein-omics. **Molecular & Cell Proteomics**, v. 12, n. 4, p. 836-845, 2013.

CHAPPLER, C. R. et al. Silodosin therapy for lower urinary tract symptoms in men with suspected benign prostatic hyperplasia: results of an international, randomized, double-blind, placebo- and active-controlled clinical trial performed in Europe. **European Urology**, v. 59, p. 342-352, 2011.

CHARUNGCHITRAK, S. et al. Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1025–1032, 2011.

CHEN, J. C. et al. Immunohistochemical detection of prostate-specific antigen expression in primary urothelial carcinoma of the urinary bladder. **Anticancer Research**, v. 28, p. 4149-4154, 2008.

CHEN, L.; LI, F. Structural analysis of evolutionary origins of influenza hemagglutinin and other viral lectins. **Journal of Virology**, v. 87, n. 7, p. 4118-4120, 2013.

CHIRIZZI, D.; MALITESTA, C. Potentiometric urea biosensor based on urease immobilized by an electro synthesized poly(o-phenylenediamine) film with buffering capability. **Sensors and Actuators B**, v. 157, p. 211–215, 2011.

CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, p.29-45, 1962.

CLEMENTS, J. et al. The expanded human kallikrein (KLK) gene family: genomic organization, tissue-specific expression and potential functions. **Biological Chemistry**, v. 382, p. 5-14, 2001.

COELHO, V. et al. Glycosylation of surface Ig creates a functional bridge between human follicular lymphoma and microenvironmental lectins. **PNAS**, v. 107, n. 43, p. 18587–18592, 2010.

COLPAERT, H. **Metalografia dos Produtos Siderúrgicos Comuns**. Edgard Blücher. São Paulo. 2008.

CONZE, T. et al. MUC2 mucin is a major carrier of the cancer-associated sialyl-Tn antigen in intestinal metaplasia and gastric carcinomas. **Glycobiology**, v. 20, n. 2, p. 199–206, 2010.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B.B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 55, n. 3, p. 261-273, 1995.

DAI, Z. et al. Nanoparticle-based sensing of glycan-lectin interactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, p. 10018-10019, 2006.

DAM, T. K. et al. Fine specificities of two lectins from *Cymbosema roseum* seeds: a lectin specific for high-mannose oligosaccharides and a lectin specific for blood group H type II trisaccharide. **Glycobiology**, v. 21, n. 7, p. 925–933, 2011.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia Eletrônica de Varredura: Aplicações e preparação de amostras**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

DING, Y. et al. Poly-L lysine/ hydroxyapatite/ carbon nanotube hybrid nanocomposite applied for piezoelectric immunoassay of carbohydrate antigen 19-9. **Analyst**, v. 133, p. 184–190, 2008.

D'ORAZIO, P. Biosensors in clinical chemistry — 2011 update. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, p. 1749–1761, 2011.

DUQUE, J. G. et al. Diameter-dependent solubility of single-walled carbon nanotubes. **ACS Nano**, v. 4, n. 6, p. 3063-3072, 2010.

EPSTEIN, J. I. An update of the Gleason Grading System. **The Journal of Urology**, v.183, p. 433-440, 2010.

FERREIRA, G. N. M.; Da SILVA, A.; TOMÉ, B. Acoustic wave biosensors: physical models and biological applications of quartz crystal microbalance. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 12, p. 689-697, 2009.

FITZGERALD, L. M. et al. Analysis of recently identified prostate cancer susceptibility loci in a population-based study: Associations with family history and clinical features. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 9, p. 3231–3237, 2009.

FRANCESCHI, S., WILD, C. P. Meeting the global demands of epidemiologic transition – The indispensable role of cancer prevention. **Molecular Oncology**, v. 7, p. 1-13, 2013.

FREITAS, T. A. et al. Amino-functionalization of carbon nanotubes by using a factorial design: human cardiac troponin T immunosensing application. **Biomed Research International**, v. 2014, article ID 929786, 9 pages, 2014.

GHAI, S.; TOI, A. Role of transrectal ultrasonography in prostate cancer. **Radiologic Clinics of North American**, v. 50, p. 1061-1073, 2012.

GILGUNN, S. et al. Aberrant PSA glycosylation – a sweet predictor of prostate cancer. **Nature Reviews Urology**, v. 10, n. 2, p. 99-107, 2013.

GLEASON, D. F.; MELLINGER, G. T. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. **The Journal of Urology**, v. 167, p. 953-958, 2002

GOMES-FILHO, S. L. R. et al. A carbon nanotube-based electrochemical immunosensor for cardiac troponin T. **Microchemical Journal**, v. 109, p. 10-15, 2013.

GRIFFITHS, P. R.; De HASETH, J. A. **Fourier Transform Infrared Spectrometry**. 2^o Edition. Wiley, 2007.

HAMANO, Y. Occurrence, biosynthesis, biodegradation, and industrial and medical applications of a naturally occurring ϵ -poly-L-lysine. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 75, n. 7, p. 1226-1233, 2011.

HEIDENREICH, A. et al. Diretrizes para o câncer de próstata. **European Urology**, v. 59, n. 4, p. 572-83, 2011 (Texto atualizado em fevereiro de 2012).

HONEYCHURCH, K. C. Screen-printed electrochemical sensors and biosensors for monitoring metal pollutants. **Insciences Journal**, v. 2, n. 1, p. 1-51, 2012.

HORI, S.; BLANCHET, J.; McLOUGHLIN, J. From prostate-specific antigen (PSA) to precursor PSA (proPSA) isoforms: a review of the emerging role of proPSAs in the detection and management of early prostate cancer. **BJU International**, 2012. doi:10.1111/j.1464-410X.2012.11329.x

HUSKENS, D. et al. Microvirin, a novel $\alpha(1,2)$ -mannose-specific lectin isolated from *Microcystis aeruginosa*, has anti-HIV-1 activity comparable with that of cyanovirin-N but a much higher safety profile. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 32, p. 24845–24854, 2010.

IBRAHIM, T. et al. Pathogenesis of osteoblastic bone metastases from prostate cancer. **Cancer**, v. 116, p. 1406–18, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014. 124 p.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2012. 129 p.

JALIT, Y. et al. Glassy carbon electrodes modified with multiwall carbon nanotubes dispersed in polylysine. **Electroanalysis**, v. 20, n. 15, p. 1623-1631, 2008.

JIANG, C. et al. A DNA electrochemical sensor with poly-L-lysine/single-walled carbon nanotubes films and its application for the highly sensitive EIS detection of PAT gene fragment and PCR amplification of NOS gene. **Electrochimica Acta**, v. 53, p. 2917–2924, 2008.

KANG, X. et al. Glucose oxidase graphene–chitosan modified electrode for direct electrochemistry and glucose sensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 901–905, 2009.

KHAN, U. et al. The preparation of hybrid films of carbon nanotubes and nanographite/graphene with excellent mechanical and electrical properties. **Carbon**, v. 48, n. 10, p. 2825–2830, 2010.

KIMMEL, D. W. et al. Electrochemical Sensors and Biosensors. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 685–707, 2012.

KRYVENKO, O. N. et al. Inflammation and preneoplastic lesions in benign prostate as risk factors for prostate cancer. **Modern Pathology**, v. 25, n. 7, p. 1023–1032, 2012.

KYSELOVA, Z. et al. Alterations in the serum glycome due to metastatic prostate cancer. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 5, p. 1822-1832, 2007.

LEINONEN, H.; PETTERSSON, M.; LAJUNEN, M. Water-soluble carbon nanotubes through sugar azide functionalization. **Carbon**, v. 49, p. 1299-1304, 2011.

- LEITZMANN, M. F.; ROHRMANN, S. Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. **Clinical Epidemiology**, v. 4, p. 1-11, 2012.
- LI, C. et al. A multiplexed bead assay for profiling glycosylation patterns on serum protein biomarkers of pancreatic cancer. **Electrophoresis**, v. 32, n. 15, p. 2028–2035, 2011.
- LILJA, H. et al. Seminal vesicle-secreted proteins and their reactions during gelation and liquefaction of human semen. **Journal of Clinical Investigation**, v. 80, p. 281-285, 1987.
- LILJA, H.; ULMERT, D.; VICKERS, A. J. Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. **Nature**, v. 8, p.268-279, 2008.
- LIMA, A. L. R. et al. Histochemical evaluation of human prostatic tissues with *Cratylia mollis* seed lectin. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, Article ID 179817, 6 pages, 2010.
- LUZ, R. A. S.; IOST, R. M.; CRESPILO, F. N. Nanomaterials for biosensor and implantable biodevices. In: CRESPILO, F. N. (Org.). **Nanobioelectrochemistry**. Ed. Springer, 2013. p. 27-48.
- MARASOVA, J.; SZWAJECER, D. E.; DANIELSSON, B. Optical lectin based biosensor as tool for bacteria identification. In: WOLSKA, K. I. (Org.). **Acta Microbiologica Polonica**, v. 53, 2004.
- MATTIASSON, B.; RAMSTORP, M. Ultrafiltration affinity purification isolation of Concanavalin A from seeds of *Canavalia Ensiformis*. **Journal of Chromatography**, v. 283, p. 323-330, 1984.
- MEANY, D. L.; CHAN, D. W. Aberrant glycosylation associated with enzymes as cancer biomarkers. **Clinical Proteomics**, v. 8, p.7-20, 2011.

MEDANY, S. S.; ISMAIL, K. M.; BADAWEY, W. A. Kinetics of the electropolymerization of aminoanthraquinone from aqueous solutions and analytical applications of the polymer film. **Journal of Advanced Research**, v. 3, p. 261–268, 2012.

MELO, C. M. L. et al. Healing activity induced by Cramoll 1, 4 lectin in healthy and immunocompromised mice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 408, p. 113–119, 2011a.

MELO, C. M. L. et al. Mitogenic response and cytokine production induced by Cramoll 1, 4 Lectin in splenocytes of inoculated mice. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 73, p. 112–121, 2011b.

MELO, C. M. L. et al. Potential effects of Cramoll 1, 4 lectin on murine *Schistosomiasis mansoni*. **Acta Tropica**, v. 118, p. 152–158, 2011c.

MENG, L.; FU, C.; LU, Q. Advanced technology for functionalization of carbon nanotubes. **Progress in Natural Science**, v. 19, p. 801–810, 2009.

MYKOLAJCZYK, S. D. et al. A precursor form of PSA (pPSA) is a component of the free PSA in prostate cancer serum. **Urology**, v. 50, p. 710-714, 1997.

MYKOLAJCZYK, S. D. et al. Are multiple markers the future of prostate cancer diagnostics? **Clinical Biochemistry**, v. 37, p. 519-528, 2004.

MONOŠIK, R.; STREĎANSKÝB, M.; ŠTURDÍK, E. Biosensors – classification, characterization and new trends. **Acta Chimica Slovaca**, v. 5, n. 1, p. 109-120, 2012.

MOREIRA, R. A. et al. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artucarpus incisa* L. seeds. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1183-1188, 1998.

MOYO, M.; OKONKWO, J. O.; AGYEI, N .M. Recent advances in polymeric materials used as electron mediators and immobilizing matrices in developing enzyme electrodes. **Sensors**, v. 12, p. 923-953, 2012.

NAÇÕES UNIDAS. **Changing levels and trends in mortality: the role of patterns of death by cause.** Nova Iorque: Nações Unidas, 2012.

NARDI, A. C. et al. **Câncer de próstata: Diagnóstico.** Rio de Janeiro: SBU – Sociedade Brasileira de Urologia, 2013.

NICKEL, J. C. Inflammation and benign prostatic hyperplasia. **Urologic Clinics of North American**, v. 35, n. 1, p. 109–115, 2008.

NUNES, E. S. et al. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 159, p. 57–63, 2011.

OHYAMA, C. et al. Carbohydrate structure and differential binding of prostate specific antigen to *Maackia amurensis* lectin between prostate cancer and benign prostate hypertrophy. **Glycobiology**, v. 14, p. 671-679, 2004.

OLIVEIRA, M. D. L. et al. Electrochemical evaluation of lectin–sugar interaction on gold electrode modified with colloidal gold and polyvinyl butyral. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, p. 13–19, 2008.

OLIVEIRA, M. D. L. et al. Detection of dengue virus serotypes on the surface of gold electrode based on *Cratylia mollis* lectin affinity. **Sensors and Actuators B**, v. 155, p. 789–795, 2011 a.

OLIVEIRA, M. D. L. et al. Impedimetric biosensor based on self-assembled hybrid cysteine-gold nanoparticles and CramoLL lectin for bacterial lipopolysaccharide recognition. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 362, p. 194–201, 2011 b.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020.** Geneva: Organização Mundial da Saúde, 2013.

PACHECO, W. F. et al. Voltamétrias: uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013.

PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 113-118, 1992.

PARK, D. S. et al. Serum prostate-specific antigen as a predictor of prostate volume and lower urinary tract symptoms in a community-based cohort: a large-scale Korean screening study. **Asian Journal of Andrology**, v. 15, p. 249-253, 2013.

PARSONS, J. K. Benign prostatic hyperplasia and male lower urinary tract symptoms: epidemiology and risk factors. **Current Bladder Dysfunction Reports**, v. 5, n. 4, p. 212-218, 2010.

PERUMAL, V.; HASHIM, U. Advances in biosensors: principle, architecture and applications. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 12, p. 1-15, 2014.

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

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 15, n. 1, p. 199-228, 1998.

POWER, R. C. et al. Assessing use and suitability of scanning electron microscopy in the analysis of micro remains in dental calculus. **Journal of Archaeological Science**, v. 49, p. 160-169, 2014.

PRASEK, J. et al. Methods for carbon nanotubes synthesis-review. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, p. 15872–15884, 2011.

RABA, J. et al. Analytical biosensors for the pathogenic microorganisms determination. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Org.). **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**. Ed.: FORMATEX, 2013. p. 227-238

RAHMAN, N. A. et al. Development of electrochemical sensor for simultaneous determination of Cd (II) and Hg (II) ion by exploiting newly synthesized cyclic dipeptide. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 7, p. 186–196, 2012.

RAJTER, R. F. et al. Chirality-dependent properties of carbon nanotubes: electronic structure, optical dispersion properties, hamaker coefficients and van der Waals – London dispersion interactions. **Journal NAME**, v. 1-22, 2010.

RAMOS, M .V. et al. Carbohydrate/ glycan-binding specificity of legumes lectins in respect to their proposed biological functions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 43, n. 4, 2000.

REBBECK, T. R. et al. Global patterns of prostate cancer incidence, aggressiveness, and mortality in men of African descent. **Prostate Cancer**, v. 2013, Article ID 560857, 12 pages, 2013.

ROOBOL, M. J. et al. A risk-based strategy improves prostate-specific antigen-driven detection of prostate cancer. **European Urology**, v. 57, p. 79-85, 2010.

ROOBOL, M. J. et al. Prediction of prostate cancer risk: the role of prostate volume ad digital rectal examination in the ERSPC risk calculators. **European Urology**, v. 61, p. 577–583, 2012.

SAFINA, G.; VAN LIER, M.; DANIELSSON, B. Flow-injection assay of the pathogenic bacteria using lectin-based quartz crystal microbalance biosensor. **Talanta**, v. 77, p. 468-472, 2008.

SALDOVA, R. et al. Core fucosylation and α 2-3 sialylation in serum N-glycome is significantly increased in prostate cancer comparing to benign prostate hyperplasia. **Glycobiology**, v. 21, n. 2, p. 195–205, 2011.

SANTOS, A. C. O.; PEIXOTO, C. A.; COELHO, L. C. B. B. Ultrastructural analysis and immunocytochemical localization of isolectins in *Cratylia mollis* seeds. **Micron**, v. 35, p. 613–618, 2004.

SARRATS, A. et al. Differential percentage of serum prostatic-specific antigen subforms suggests a new way to improve prostate cancer diagnosis. **The Prostate**, v. 70, p. 1-9, 2010.

SCIARRA, A. et al. Prostate growth and inflammation. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 108, p. 254–260, 2008.

SEBEZ, B. et al. Functioning of antimony film electrode in acid media under cyclic and anodic stripping voltammetry conditions. **Analytica Chimica Acta**, v. 785, p. 43–49, 2013.

SGOBBA, V.; GULDI, D. M. Carbon nanotubes-electronic/electrochemical properties and application for nanoelectronics and photonics. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 165–184, 2009.

SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins - a large family of homologous proteins. **FASEB Journal**, v.4, n. 14, p. 3198-208, 1990.

SHARON, N.; LIS, H. How Proteins bind carbohydrates: lessons from legume lectins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6586–6591, 2002.

SHIMOJO, H. et al. Reduced glycosylation of α -dystroglycans on carcinoma cells contributes to formation of highly infiltrative histological patterns in prostate cancer. **Prostate**, v. 71, n. 11, p. 1151–1157, 2011.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 62, p. 10–29, 2012.

SKOOG, D. A; WEST; HOLLER; CROUCH. **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução da 8ª Edição norte-americana. São Paulo: Editora Thomson, 2006.

SILVA, M. C. C. et al. Immobilized *Cratylia mollis* lectin: an affinity matrix to purify a soybean (*Glycine max*) seed protein with in vitro platelet antiaggregation and anticoagulant activities. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 74–80, 2011.

SILVA, M. M .S. et al. Electrochemical detection of dengue virus NS1 protein with a poly(allylamime)/ carbono nanotube layered immunoelectrode. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 90, n. 1, p. 194-200, 2015.

SMITH, B. C. **Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy**. CRC Press, 2011. 207 p.

SINGH, A.; DILNAWAZ, F.; SAHOO, S. K. Long circulating lectin conjugated paclitaxel loaded magnetic nanoparticles: a new theranostic avenue for leukemia therapy. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, e26803, 2011.

SOARES, P. A. G. et al. Purification of a lectin from *Canavalia ensiformis* using PEG–citrate aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 457–460, 2011.

SOCIEDADE AMERICANA DO CÂNCER. **Prostate Cancer**. Atlanta: Sociedade Americana do Câncer, 2012.

SOCIEDADE AMERICANA DO CÂNCER. **Cancer Facts & Figures 2013**. Atlanta: Sociedade Americana do Câncer, 2013.

SOCIEDADE AMERICANA DO CÂNCER. **Cancer facts & figures 2014**. Atlanta: Sociedade Americana do Câncer; 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA. **Diretrizes: Câncer de próstata**. Disponível em < <http://www.sbu.org.br/?noticias&id=1701>>. Acesso em 01/12/2014.

SOUZA, G. A. et al. Amino acid sequence and tertiary structure of *Cratylia mollis* seed lectin. **Glycobiology**, v. 13, n. 12, p. 961-972, 2003.

STRYCHARZ, S. M. et al. Application of cyclic voltammetry to investigate enhanced catalytic current generation by biofilm-modified anodes of *Geobacter sulfurreducens* strain DL1 vs. variant strain KN400. **Energy Environmental Science**, v. 4, p. 896–913, 2011.

STYLIANAKIS, M. M.; MIKROYANNIDIS, J. A.; KYMAKIS, E. A facile, covalent modification of single-wall carbon nanotubes by thiophene for use in organic photovoltaic cells. **Solar Energy Materials & Solar Cells**, v. 94, p. 267–274, 2010.

STUART, B. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. Wiley, 2004. 244 p.

SUMNER, J. B. The globulins of the jack bean, *Canavalia ensiformis* preliminary paper. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 37, p.137-142, 1919.

TAJIRI, M.; OHYAMA, C.; WADA, Y. Oligosaccharide profiles of the prostate specific antigen in free and complexed forms from the prostate cancer patient serum and in seminal plasma: a glycopeptide approach. **Glycobiology**, v. 18, n. 1, p. 2-8, 2008.

TAKEBE, Y. et al. Antiviral lectins from red and blue-green algae show potent *in vitro* and *in vivo* activity against hepatitis C virus. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, e64449, 2013.

TEKAYA, N. et al. Bi-enzymatic conductometric biosensor for detection of heavy metal ions and pesticides in water samples based on enzymatic inhibition in *Arthrospira platensis*. **Journal of Environmental Protection**, v. 5, p. 441-453, 2014.

THOMAS, P. S. et al. Electrical properties of natural rubber nanocomposites: effect of 1-octadecanol functionalization of carbon nanotubes. **Journal of Materials Science**, v. 47, p. 3344–3349, 2012.

TUNCER, C. et al. Synthesis and characterization of water-insoluble statistical copolymer and its application in the development of electrochemical DNA sensor. **Talanta**, v. 100, p. 270–275, 2012.

TURNER, A. P. F. Biosensors: sense and sensibility. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 3184-3196, 2013.

VAREJÃO, N.; CORREIA, M. T. S.; FOGUEL, D. Characterization of the unfolding process of the tetrameric and dimeric forms of *Cratylia mollis* seed lectin (CRAMOLL 1): effects of natural fragmentation on protein stability. **Biochemistry**, v. 50, n. 34, p. 7330-7340, 2011.

VÉGVÁRI, Á. et al. Molecular microheterogeneity of prostate specific antigen in seminal fluid by mass spectrometry. **Clinical Biochemistry**, v. 45, n. 4-5, p. 331-338, 2012.

VOURGANTI, S. et al. Multiparametric magnetic resonance imaging and ultrasound fusion biopsy detects prostate cancer in patients with prior negative TRUS biopsies. **Journal of Urology**, v. 188, n. 6, p. 2152-2157, 2012.

WANG, J. **Analytical Electrochemistry**. 2^o Edition. New York: Wiley, 2000.

WANG, Y.; CHANG, Y. C. Synthesis and conformational transition of surface – tethered polypeptide: Poly(L-lysine). **Macromolecules**, 36, p. 6511-6518, 2003.

WANG, F. et al. High expression of α 2, 3-linked sialic acid residues is associated with the metastatic potential of human gastric cancer. **Cancer Detection and Prevention**, v. 32, p. 437–443, 2009.

WANG, J.; ZHANG, S.; ZHANG, Y. Fabrication of chronocoulometric DNA sensor based on gold nanoparticles/poly(L-lysine) modified glassy carbon electrode. **Analytical Biochemistry**, v. 396, p. 304–309, 2010.

WANG, L. et al. Electrochemical synthesis of gold nanostructure modified electrode and its development in electrochemical DNA biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 30, p. 151–157, 2011.

WANG, Y. et al. Platelet biogenesis and functions require correct protein O-glycosylation. **PNAS**, v. 100, n. 40, p. 16143-16148, 2012.

WILSON, A. H. The prostate gland: a review of its anatomy, pathology and treatment. **JAMA**, v. 312, n. 5, p. 562, 2014.

XUE, Y. et al. Noncovalent functionalization of carbon nanotubes with lectin for label-free dynamic monitoring of cell-surface glycan expression. **Analytical Biochemistry**, v. 410, p. 92-97, 2011.

YOO, E. & LEE, S. Glucose biosensors: an overview of use in clinical practice. **Sensors**, v. 10, p. 4558-4576, 2010.

ZEN, J.; KUMAR, A. S.; TSAI, D. Recent updates of chemically modified electrodes in analytical chemistry. **Electroanalysis**, v. 15, n. 13, p. 1073-1087, 2003.

ZHANG, G. et al. First isolation and characterization of a novel lectin with potent antitumoractivity from a *Russula mushroom*. **Phytomedicine**, v. 17, p. 775–781, 2010.

ZHAO, W. et al. Electrochemical studies of chloroperoxidase on poly-L-lysine film modified GC electrode. **Chinese Chemical Letters**, v. 21, p. 93-96, 2010.

ZHOU, H. et al. Enhanced photoelectrochemical detection of bioaffinity reactions by vertically oriented Au nanobranches complexed with a biotinylated polythiophene derivative. **Sensors**, v. 9, p. 1094-1107, 2009.

5. ARTIGO

A new strategy to recognize serum prostate cancer using lectin in an electrochemical biosensor

Artigo a ser submetido ao periódico Biosensors and Bioelectronics

Fator de impacto: 6,451



A new strategy to recognize serum prostate cancer using lectin in an electrochemical biosensor

Priscila M. S. Silva ^{a,b}, Amanda L. R. Lima ^a, Luana C. B. B. Coelho ^a, *Rosa F. Dutra ^b,
*Maria T. S. Correia ^a

^aLaboratório de Bioquímica de Proteínas, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE,
50670-901 Recife, PE, Brazil

^bLaboratório de Engenharia Biomédica, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, 50670-
901 Recife, PE, Brazil

*Corresponding Authors:

Rosa Fireman Dutra

E-mail: rfiremandutra@yahoo.com.br; rosa.dutra@pq.cnpq.br

Phone/Fax: +55 81 2126.8000

Maria Tereza dos Santos Correia

E-mail: mtscorreia@gmail.com

Phone: + 55 81 2126.8540; Fax: +55 81 2126.8576;

ABSTRACT

It was developed a lectin-based nanostructured biosensor for electrochemical study of interactions between the lectin and glycoproteins sera from patients with prostate cancer (PCa). Carboxylated carbon nanotubes (COOH-CNT) were anchored on the surface of glassy carbon electrode modified with the Poly-L-lysine (PLL) polymer. In the nanostructured surface, the lectin from *Cratylia mollis* seeds (CramoLL) was immobilized. The construction stages of the sensor platform and analytical sensor response were analyzed by electrochemical techniques of cyclic voltammetry (CV) and square wave voltammetry (SWV). Morphological and structural characterization of the surface by Scanning electron microscopy (SEM) and spectroscopic Fourier transform infrared (FT-IR) showed the formation of the PLL/ CNT film. The addition of CNT promoted increase of 71.2% in the sensing area and improved stability of the surface. The biosensor showed a linear response to fetuin of 0.5 to 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($r = 0.994$, $p < 0.001$) and limit of detection (LOD) of 0.05 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and to methyl- α -D-manopiranosose between 0.96 and 38.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($r = 0.982$, $p < 0.001$) and LOD of 0.04 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The proposed biosensor was used to recognize glycoprotein profiles in sera of patients with PCa. Due to specific recognition ability of the lectin was possible to discriminate glycoproteins profiles of PCa in different stages from non-cancerous conditions.

Keywords: carbon nanotubes, CramoLL, electrochemical biosensor, glycoproteins, lectin, prostate cancer.

1. Introduction

Prostate cancer (PCa) is the most commonly cancer diagnosed and the second cause of cancer death among men in the United States and other regions of the world (Siegel et al., 2014). The serum concentration of PSA (prostatic specific antigen) is a biomarker assay recommended for PCa screening. When detected in blood from healthy men, PSA concentrations are commonly low ($< 0.1 \text{ ng mL}^{-1}$) and can elevate until 10^4 ng mL^{-1} in men with PCa (Gilgunn et al., 2013). However, the association between elevated levels of PSA and PCa is controversial, because noncancerous prostatic diseases such as benign prostatic hyperplasia (BPH) also can elevate PSA, and PCa patients can have normal level of PSA serum (Nardi et al., 2013). Thus, screening methods that would be more reliable for PCa detection and to distinguish between low-grade Gleason system and high-grade Gleason types have been development based in the analysis of glycosylation patterns tumor-associated.

Alterations in the glycosylation patterns are inherent features of the malignant transformation and cancer progression, and are potential tools to identify various types of cancer (Chandler and Goldmann, 2013). Lectins are natural proteins from non immune origin that recognize glycans with high degree of specificity, being valuable to research this changes in secreted and cell surface glycoproteins cancer-associated (Ahn et al., 2012). Concanavalin A (Con A), *Aleuria aurantia* lectin (AAL), *Cratylia mollis* lectin (CramoLL), and others lectins have been used to investigate serum, tissue and seminal plasma and to discriminate PCa of normal and benign conditions. The analysis of ConA-binding serum revealed differential expression of glycoproteins between BPH and PCa patients (Drake et al., 2006). Also was identified a modified distribution of glycans patterns in tumoral prostate tissues (Lima et al., 2010), a enhanced expression of sialic acid in cancer cell derived of prostate (Zhang et al., 2010) and significantly increased of core fucosylation in serum PSA and correlated with tumor Gleason scores (Li et al., 2015).

Compared to conventional glycan analysis methods, such as mass spectrometry, high-performance liquid chromatography and immune sorbent assay, the electrochemical biosensors have gained great attention for glycans detection since their simple instrumentation, can be label-free, requires a very small volume, rapid response, high sensitivity, and low cost (Svarovsky and Joshi, 2014). Electrochemical biosensors based in lectins has been used for label free detection of glycosylation changes in glycoproteins.

Biosensors that not require labeling of the targets (label-free) are more attractive, because the use of bioconjugates labels become the method more complex and affect the its affinity bioreceptor-analyte. Electrochemical label-free method using lectin was applied for monitoring of dynamic variation of glycan expression on K562 cell, a human multipotential leukemia cell line, in response to drugs (Xue et al., 2011).

Despite of the great analytical potential showed by electrochemical biosensors, the electrodes used in the construction these devices can have some limitations. The gradual passivation in electrode surface due the adsorption of the products of the redox reactions at the electrode/ solution interface (Rahman et al., 2012) and the slow kinetics of the electron transfer at the surface of these electrodes (Tuncer et al., 2012) are prevalent limitations. To minimize these problems, polymers conductive and polyelectrolytes are employed. Polyelectrolytes such as poly-L-lysine (PLL) has been appreciated due to the advantages of electrocatalysis, provision of functional groups to immobilize biomolecules and increased sensitivity. PLL have abundant active amino groups, that are useful to improve ionic exchange and biomolecule immobilization (Wang, Zhang and Zhang, 2010).

Currently, carbon nanotubes (CNT) have been introduced in the electrochemical biosensor fabrication due to valuable chemical and physical properties, such as electrical conductivity, chemical stability and can be functionalized with reactive groups for the attachment of biomolecules (Sgobba and Guldi, 2009). These properties promote faster electron transfer reactions, reduction of the response time, enhancing stability, increase of electroactive area, and greater amount of biomolecules on the sensor interface (Dias et al., 2013). Here in, it was developed an electrochemical biosensor based in CramoLL lectin specific for glucose/ mannose to distinguish serum from PCa previous characterized with different levels of PSA and grades of Gleason. Carboxylated carbon nanotubes (COOH - CNT) were attach on the PLL film coating the glassy carbon electrode. CramoLL was immobilized on carboxylated carbon nanotubes layer. The label-free strategy may provide a differential detection of glycoproteins serum from PCa in differents grades of Gleason system, BPH and healthy subjects.

2. Material and methods

2.1 Materials and reagents

Fetuin, bovine serum albumin (BSA), α -methyl-D-mannopyranose (Me α Man), galactose, fucose and poly-L-lysine hydrobromide were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Multilayer carbon nanotubes functionalized with carboxylic groups (COOH-CNT), purity of 95% were purchased from DropSens (Oviedo, Spain). The lectin from *Cratylia mollis* seeds (CramoLL) was obtained in Biochemical of proteins Laboratory (Department of Biochemistry, UFPE), according to protocol established by Correia and Coelho (1995). Fructose, glucose, glycine, potassium ferrocyanide ($K_4Fe(CN)_6$) and potassium ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$) were obtained from Vetek (Sao Paulo, Brazil). The other reagents used were of analytical grade. The 10 mmol L⁻¹ phosphate buffered saline solution (PBS, pH 7.4) used in the experiment was prepared by dissolving 0.2 g KCl, 8.0 g NaCl, 0.24 g KH₂PO₄ and 1.44 g Na₂HPO₄ in 1000 ml of Milli-Q water.

The evaluation of analytical response to serum glycoproteins were prepared pools of sera samples from healthy subjects (control), BPH patients and PCa patients with Gleason scores 6, 7 and 9 previously diagnosed. Each pool consisted of 4 samples from volunteer donors, obtained in Unity Laboratory of the Hospital of the Federal University of Pernambuco, in accordance with the recommendations of the ethics committee. Venous blood samples were collected and immediately centrifuged at 1500 g for 5 min, aliquoted into 0.5 ml and stored at -80 °C.

The solutions of PLL and carbohydrates and dilutions of sera were prepared in 10 mmol L⁻¹ phosphate buffered saline solution (PBS, pH 7.4). The ultrapure water (18 m Ω cm) used to prepare all solutions was obtained from a water purification system Milli-Q (MilliporeInc., Billerica, USA).

2.2 Apparatus

The electrochemical studies were performed in a closed glass cell containing a tri-electrode system composed of a glassy carbon electrode (GCE) as working electrode, a helical platinum wire as auxiliary electrode and an Ag/AgCl electrode (sat. KCl) as a

reference, all connected to a potentiostat/galvanostat portable Ivium CompactStat (Netherlands) coupled to a microcomputer and controlled by IviumSoft software. The electrochemical analysis was based in cyclic voltammetry (CV) measurements, performed in the potential range of -0.1 to 0.5 V at 50 mV s^{-1} , and square wave voltammetry (SWV) measurements, performed in the range 0.0 to 0.4 V at 50 mV s^{-1} , both in KCl solution (100 mmol L^{-1}) containing $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (5 mmol L^{-1}) as a redox probe. The morphological characterization of the film surface was performed by the Scanning Electron Microscopy technique (SEM) using a microscope Philips XL-30 FEG with the acceleration voltage of 10 kV and working distance of 1 μm . Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectra of samples for structural characterization were recorded by using a Bruker IFS 66model FT-IR spectrometer in the region 4000 cm^{-1} to 500 cm^{-1} and executed 24 scans, by diffuse reflection technique using the standard KBr pellet.

2.3 Construction of the sensor platform nanostructured

Before the changes of the sensor surface, GCE was mechanically polished with Al_2O_3 ($1 \mu\text{m}$) for 3 minutes and after washed with fresh water to remove surface impurities. PLL solution ($0.05 \mu\text{mol L}^{-1}$) prepared in 10 mmol L^{-1} PBS (pH 7.4) was electrodeposited on clean glassy carbon surface using the CV technique, in the potential range -2.0 to 2.0 V at 50 mV s^{-1} for 15 cycles (Fig. S1-supplementary information). At the same time, 1 mg of COOH-CNT was dispersed in 1 mL of dimethylformamide in an ultrasonic bath for 2 h to form a homogeneous suspension. 15 μL of COOH-CNT suspension was deposited on GCE/ PLL and subjected to drying in an oven at $40 \text{ }^\circ\text{C}$ for evaporation of the solvent. Subsequently, the GCE with the nanostructured film was incubated with 10 μL of CramoLL solution ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) for 60 min at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ for immobilization of the lectin. The free reactive and nonspecific sites on the electrode surface were blocked with a solution of glycine (50 mmol L^{-1}) for 60 min. All modification steps of GCE were recorded by CV technique in the presence of the redox probe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (5 mmol L^{-1}) in KCl solution (100 mmol L^{-1}). Scheme. 1 outlines the steps of preparing the sensor.

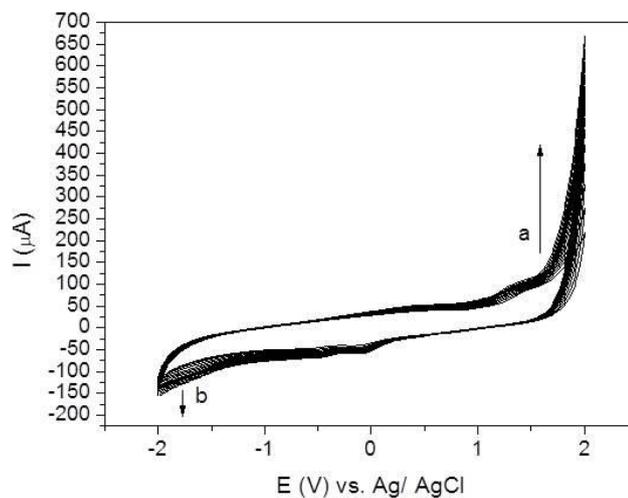


Fig. S1. Successive cyclic voltammograms of electrodeposition PLL $0.05 \mu\text{mol L}^{-1}$ in the solution 10 mmol L^{-1} of PBS (pH 7.4) in the GCE. (a) Oxidation peak of PLL. (b) Reducing peak of PLL. Potential range: -2.0 V to $+2.0 \text{ V}$, 15 cycles, 50 mV s^{-1} .



Scheme 1. Schematic representation of sensor construction steps.

2.4 Analytical response of the sensor

After CramoLL immobilization and blocking of nonspecific sites with glycine solution, the modified GCE was incubated for 20 min with $10 \mu\text{L}$ samples containing Me α Man in the concentrations of $0.96 - 38.4 \mu\text{g mL}^{-1}$, and fetuin in different concentrations

of 0.5 - 25.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, all prepared in PBS solution. The GCE/ PLL/ COOH-CNT/ CramoLL electrode was exposed to pools serum from healthy individuals and patients with BPH and PCa in Gleason's score of 6, 7 and 9, diluted 1:30 in PBS for 20 min at room temperature. The measurements were effected in triplicate. The detection of lectin-carbohydrates interactions were monitored by SWV in the presence of the redox probe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (5 mmol L^{-1}) in KCl solution (100 mmol L^{-1}).

2.5 Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using Microsoft Excel 2010 program. Data were analyzed using paired t test to identify significance of difference between the groups. Data are expressed as mean \pm SEM. P value < 0.05 was considered to be statistically significant.

3 Results and discussion

3.1 Structural characterization of the PLL and CNT film

FTIR analyzes were performed to characterize the interaction of PLL with COOH-CNT and the formation of nanostructured film on the sensing interface. Fig. 1 shows the spectra of COOH-CNT, PLL, and PLL/ COOH-CNT. The FTIR spectrum of the COOH-CNT shows typical peaks of carboxylic groups at 3432 cm^{-1} , which corresponds to the presence of OH groups, and another peak at 1629 cm^{-1} resulting from molecular elongation of C=O group (Silva et al., 2015). The PLL spectrum showed several bands at $3420\text{-}3050\text{ cm}^{-1}$ resulting from symmetric and asymmetric vibration of primary amines groups ($-\text{NH}_2$) of the polymer, and other bands at 1619 and 1534 cm^{-1} , associated with the groups amide I (C=O) and amide II (C-N) (Jalit et al.,2008). In the PLL spectrum after binding of COOH-CNT appear a unique and elongated peak in 3450 cm^{-1} and another peak at 1629 cm^{-1} , confirming that the nanotubes were bound with the polymer.

PLL is a polyaminoacid rich in amino groups and highly cationic at neutral pH, this improve the interaction with nanomaterials and biomolecules (Wang, Zhang and Zhang, 2010). The protonation of amino groups on PLL structure is favored at neutral pH (pH 7.4) of the PBS solution where the polymer was dissolved, since this has a pKa of 10.7 for the amino group, resulting in a cationic polymer. Another factor that contributes to the emergence of

these positive charges is the strong oxidation that the polymer undergoes during PLL electrodeposition process on GCE, where we observe the formation of various oxidation peaks in the potential of 2 V (Fig S1). Thus, this suggest that the protonated PLL favors the binding to COOH-CNT, which generally undergoes reduction and presents negative charges that interact with the cationic polymer.

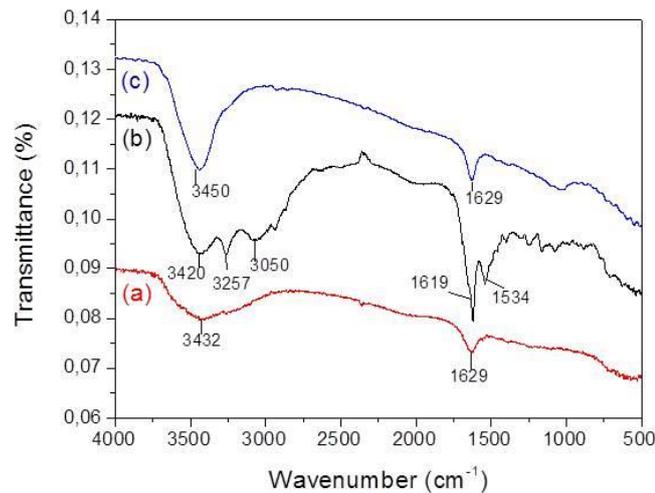


Fig. 1. FTIR spectrum by diffuse reflection mode from COOH-CNT (a), PLL (b) and PLL/ COOH-CNT (c).

3.2 Electrochemical characterization of nanostructured platform

Each step of modification of the glassy carbon surface was monitored by CV, obtaining the voltammograms shown in Fig. 2 (a). The electrodeposition of PLL film reduced current peaks, characterizing the insulating behavior of the film. The attachment of COOH-CNT on the PLL film promoted an increase of approximately 71.2% of the current density, observed in the pair redox peaks in potential values 0,27 V for anodic peak and 0.18 V for cathodic peak. This behavior confirming that the carbon nanotubes contribute to increase of surface area and higher electron transfer, providing greater conductivity and performance on the sensor interface. The lectin immobilization is represented by a reduction in amplitude of the redox peaks due to the insulating nature of the biomolecule, which reduces the charge transfer kinetics at the electrode surface. The blocking glycine was recorded by a small reduction in redox peaks.

The operational stability of the PLL/ COOH-CNT film was evaluated by subjecting

the chemically modified GCE to 20 successive voltammetric cycles performed in presence of 5 mmol L^{-1} of $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ prepared in 100 mmol L^{-1} of KCl electrolyte, at 50 mV s^{-1} scanning rate and a potential ranging from -0.1 V to 0.5 V . To control of this study, measurements in the GCE only with PLL film were carried out in parallel. The redox peaks were practically constant. The coefficient of variation estimated from current peaks values of GCE/ PLL/ COOH-CNT was 0.6%, that is more stable than the GCE/ PLL without carbon nanotubes, that coefficient of variation was 1.30% (Fig. 2 (b) and (c)). The nanostructured film was around twice more electrochemically stable than PLL film, probably related strong interaction between the functional groups of the polymer and the nanotubes. The abundance of amino groups in the polymer possible an effective interaction with the COOH-CNT, especially by the presence of carboxyl groups in these nanotubes, ensuring the stability of the surface.

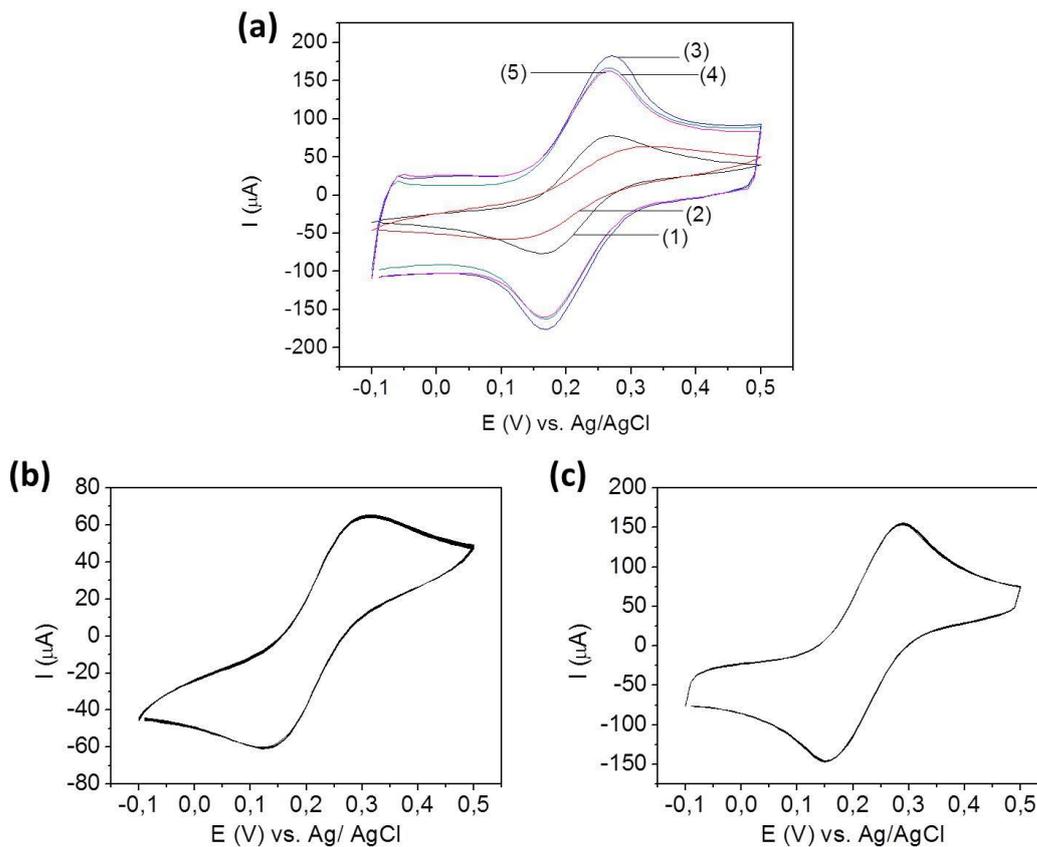


Fig. 2. (a) Cyclic voltammograms of GCE modifications steps: (1) GCE after cleaning; (2) GCE/ PLL; (3) GCE/ PLL/ COOH-CNT; (4) GCE/ PLL/ COOH-CNT/ CramoLL; (5) GCE/ PLL/ COOH-CNT/ CramoLL/ Glycine. (b) PLL film stability in the glassy carbon surface (20 cycles); (c) Stability of PLL/ COOH-CNT film in the glassy carbon surface (20 cycles). Measurements performed in a solution of 5 mmol L^{-1} $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ prepared in 100 mmol L^{-1} KCl.

3.3 Effect of PLL and COOH-CNT concentration

To determine the influence of the PLL concentration in the electrode performance, concentrations varied from $0.0001 \mu\text{mol L}^{-1}$ to $0.2 \mu\text{mol L}^{-1}$ were evaluated according to maximal amplitude of the current redox peaks. An increase in the redox peaks in function of the PLL concentrations was found, reaching a plateau at $0.05 \mu\text{mol L}^{-1}$ PLL (Fig. S2 (a)-supplementary information), which is the concentration used in all remaining experiments. The influence of CNT concentration also was investigated, ranging the concentrations from 0.5 mg mL^{-1} to 3.5 mg mL^{-1} . The current peaks increased up to a concentration of 1.5 mg mL^{-1} (Fig. S2 (b)-supplementary information). After this point, the current decreased indicating a saturation of free reactive groups of the polymer in the sensing interface or the fact that the excess of nanotubes on the surface to favor the adsorption phenomena and charges accumulated in the electric double layer which may hinder the diffusion process at the electrode surface and cause the detachment of the nanotubes.

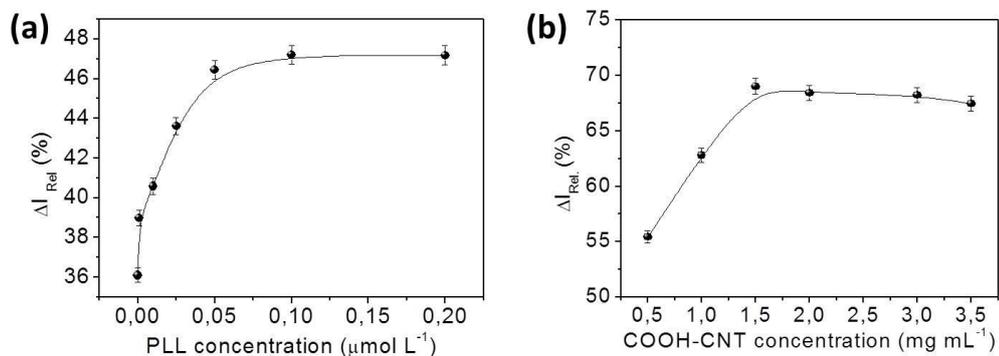


Fig. S2 (a) Effect of PLL concentration in the biosensor response; (b) COOH-CNT concentration effect in the biosensor response.

3.4 Morphological characterization of the PLL and CNT film

The SEM technique was used for morphological characterization of PLL and COOH-CNT film on the glassy carbon surface. The images in Fig. 3 (a) demonstrate the GCE after the coating film of the PLL such as slightly rough layer. The picture in Fig. 3 (b) shows the

surface GCE/ PLL after the attachment of COOH-CNT. Note the presence of three-dimensional nanostructures such as long and abundant filaments characteristic of the nanotubes attached to the surface (Xue et al., 2011).

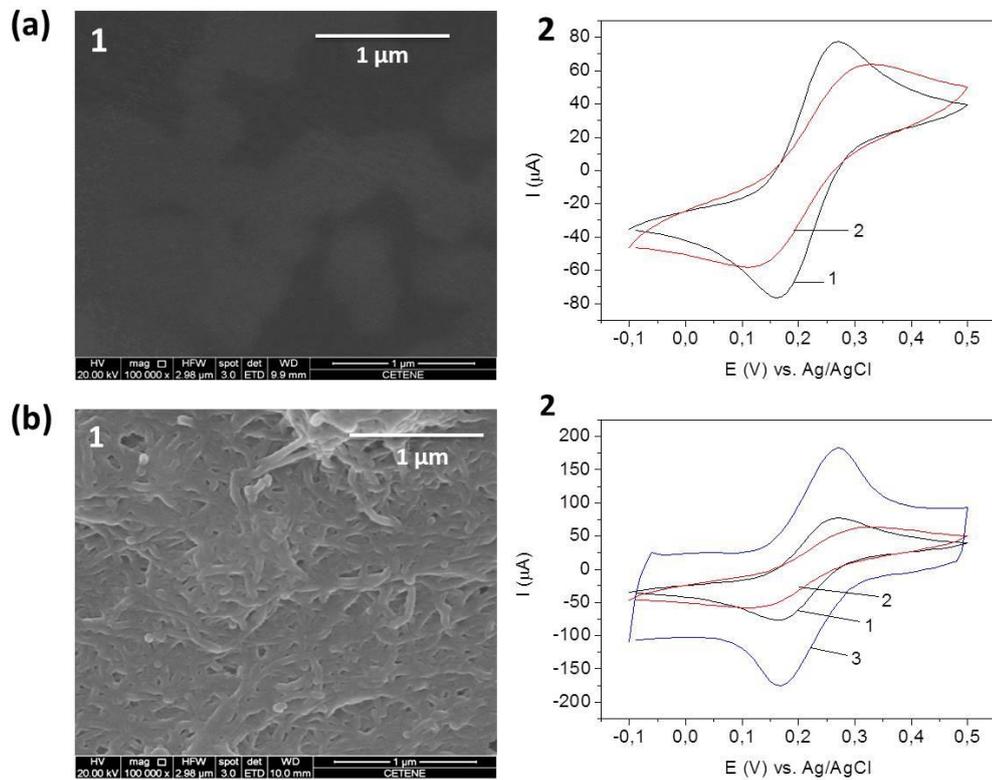


Fig. 3. SEM images (a and b 1) and cyclic voltammograms (a and b 2) of the surface electrode (a) GCE/ PLL; (b) GCE/ PLL /CNT-COOH. In a. 2 and b. 2, (1) GCE after cleaning; (2) GCE/ PLL; (3) GCE/ PLL/ COOH-CNT. Voltammetry measurements in $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ with $100 \text{ mmol L}^{-1} \text{ KCl}$ solution.

3.5 Immobilization of CramoLL lectin and scan rate study

The modified electrode was incubated with CramoLL solutions at different concentrations (varied $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ at $200 \mu\text{g mL}^{-1}$) and time intervals (20 at 70 min). When the lectin concentration was higher than $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, the response remained nearly constant, then this concentration was selected for subsequent experiments (Fig. S3 (a) - supplementary information). When the time was longer than 50 minutes, the response remained almost constant, and the 60 minute was time selected for the experiments (Fig. S3 (b) - supplementary information).

The reversibility of an electrochemical system may be confirmed from the behavior of

the cathode and anode current peaks and scanning rate of CV (Silva et al., 2014). The electrochemical reversibility of nanostructured film with the lectin CramoLL immobilized was investigated by subjecting the modified GCE to different velocities scanning rates of the CV ranging from 10 mV s^{-1} to 120 mV s^{-1} performed in $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/ \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ prepared in $100 \text{ mmol L}^{-1} \text{ KCl}$ solution with potential ranging from -0.1 V to 0.5 V . With the increase of scan rate, the CVs of all redox couples showed a pair of symmetric peaks with a gradually increasing peak current (Fig. S3 (c)-supplementary information). The anodic and cathodic current peaks increased linearly with the square root of the scanning rate, showed coefficient (r) values of 0.997 and 0.995, respectively (Fig. S3 (d)-supplementary information). This indicate that the process is controlled by diffusion. The proportionality between the anodic and cathodic peak current and the square root of the scanning rate shows that the charge transfer occurred reversibly.

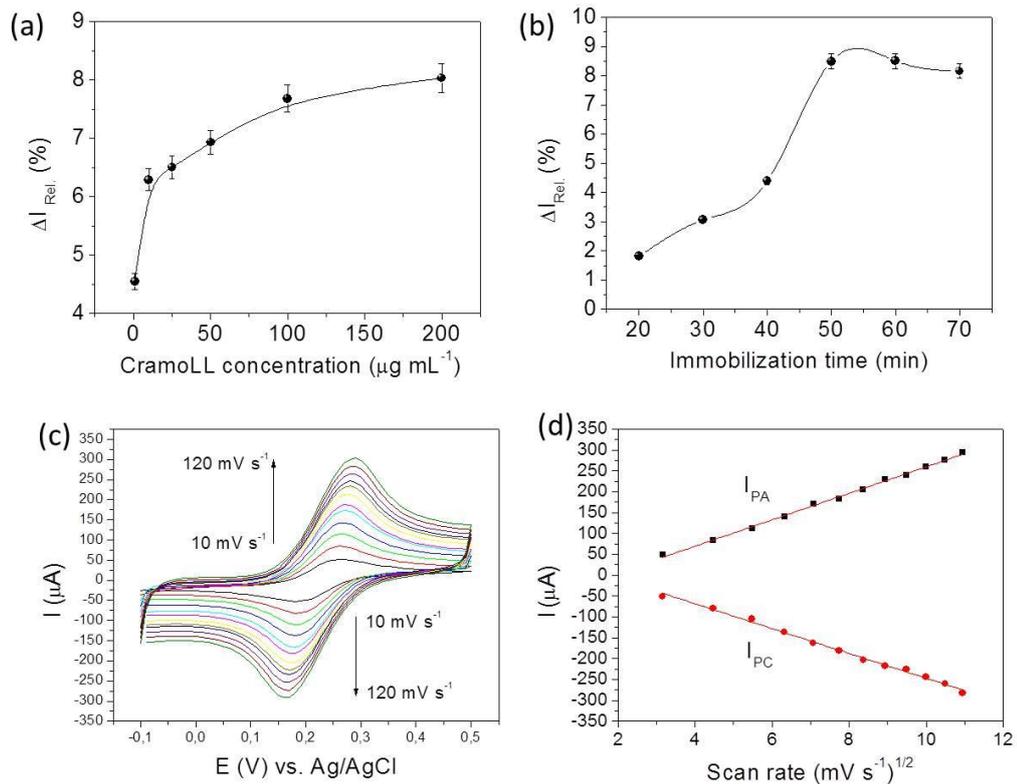


Fig. S3. (a) Effect of CramoLL concentration in the sensor response; (b) Study of immobilization time of CramoLL; (c) Cyclic voltammograms of the GCE/ PLL/ CNT-COOH/ CramoLL sensor in $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/ \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ solution in 100 mmol L^{-1} of KCl at velocities (inside to outside): 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 mV s^{-1} ; (d) Plotting of the current peaks in the function of velocity of the square root. Measurements in $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/ \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ in $100 \text{ mmol L}^{-1} \text{ KCl}$ solution.

3.6 Analytical response of the biosensor

The retention of biological activity of lectin was analyzed by correlating the electrochemical measurement and different concentrations of glycans evaluated. The electrodes were incubated with 10 μL of solutions containing different concentrations of Me α Man and fetuin for 20 min and submitted to SWV measurements in the presence of 5 mmol L^{-1} $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ in 100 mmol L^{-1} KCl solution. The results show an increase of relative current variation ($\Delta I_{\text{Rel}}(\%)$) with the increase in Me α Man and fetuin concentration (Fig. 4 (a) and (b)). Linear calibration curves were obtained over the range from 0.96 to 38.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of Me α Man ($r = 0.982$, $p < 0.001$) and the limit of detection (LOD) was of 0.04 $\mu\text{g mL}^{-1}$. For fetuin, a linear range of 0.5 to 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($r = 0.994$, $p < 0.001$) and LOD of 0.05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ was obtained. The application of the GCE modified with PLL and COOH-CNT film to detect the interaction between CramoLL and Me α Man and fetuin possible to obtain a low limit of detection, similar to that found by Oliveira et al., 2008.

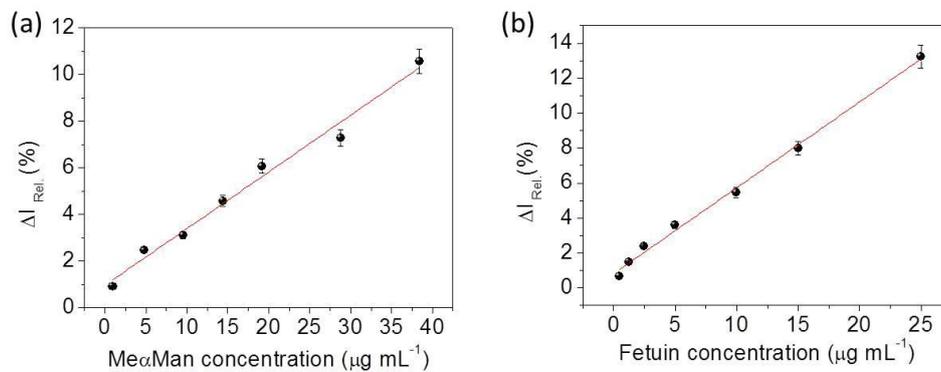


Fig. 4. (a) Calibration curve of biosensor incubated with different concentrations of Me α Man in 10 mmol L^{-1} PBS buffer solution (pH 7.4); (b) Calibration curve of biosensor incubated with different concentrations of fetuin in 10 mmol L^{-1} PBS buffer solution (pH 7.4). Measurements in 5 mmol L^{-1} $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ in 100 mmol L^{-1} KCl solution.

3.7 Reproducibility and Repetability

The reliability and stability of the analytical response of a biosensor are crucial to ensure the quality and reliability of the final product. A study was conducted of reproducibility and stability to fetuin. In the reproducibility study, 8 different electrodes were prepared under the same conditions and incubated with 10 μL of 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of fetuin during 20 min. Using SWV technique, the electrodes show a response with 4.24% variation coefficient within the acceptable range ($<5\%$) (Fig. S4 (a)-supplementary information). To evaluate the repeatability were recorded 20 measurements by SWV on the same electrode pre-incubated with fetuin with an interval of 1 min, which showed low coefficient of variation of 1.24% ($<5\%$), representing a significantly stable system (Fig. S4 (b)-supplementary information). These results may be related to the strong interaction between the COOH-CNT and immobilized CramoLL.

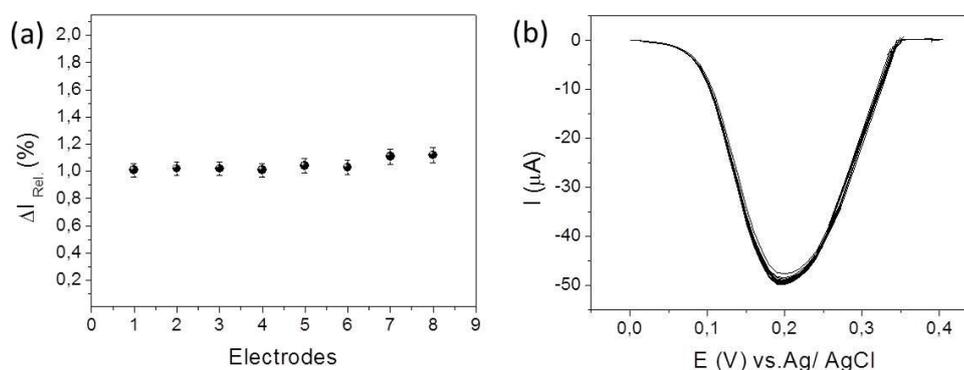


Fig. S4 (a) Reproducibility of the biosensor incubated with 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fetuin in 10 mmol L^{-1} PBS buffer solution (pH 7.4). (b) Repeatability assay of the biosensor incubated with 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fetuin in 10 mmol L^{-1} PBS buffer solution (pH 7.4). Measurements in 5 mmol L^{-1} $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ in 100 mmol L^{-1} KCl solution.

3.8 Interfering study

Glucose (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), galactose (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), fructose (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), fucose (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and BSA (5 g L^{-1}) were individually tested as potential interferents present in the samples. The electrodes were incubated with 10 μL of solution content 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of fetuin (control) or solution with fetuin plus interferent. Measurements by SWV showed low level of

interference (less than 10%) compared to the control. Considering the sensor response to control of 100%, the molecules tested interfered with 1.51%; 0.18%, 5.2%; 2.06% and 3.45%, respectively (Fig. S5-supplementary information).

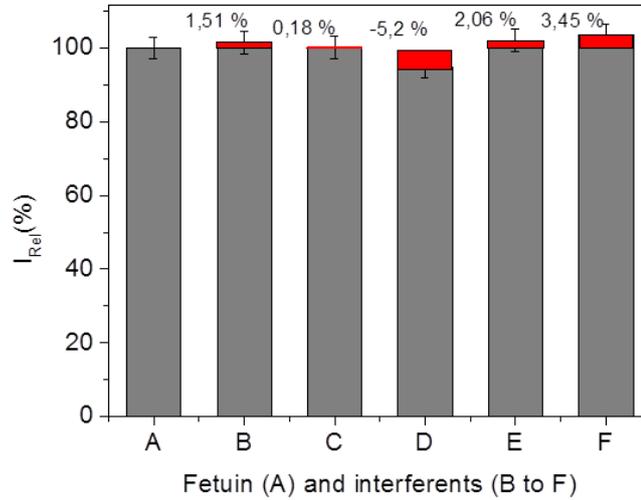


Fig. S5. Biosensor response for fetuin (A) in the presence of interferents glucose (B); galactose (C); fructose (D); fucose (E) and BSA (F). Measurements in $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ in $100 \text{ mmol L}^{-1} \text{ KCl}$ solution.

3.9 Biosensor response to serum samples from BPH and PCa

The proposed biosensor was applied to detect the glycoproteins presents in sera from healthy men (control group), and patients with BPH, PCa Gleason score 6, score 7 and score 9. The modified electrodes were incubated with $10 \mu\text{L}$ of pools of sera diluted 1:30 in PBS for 20 min, at room temperature, and biosensor response analyzed by SWV in presence of $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ in $100 \text{ mmol L}^{-1} \text{ KCl}$ solution. The results can be examined in terms of variation in the electron transfer, or current variation on the interface (ΔI_{rel}), reflecting the interaction of lectin with glycoproteins, according to the equation S1:

$$\text{Equation S1: } \Delta I_{\text{rel}} (\%) = [I_{(\text{CramoLL})} - I_{(\text{CramoLL-glycoproteins})} / I_{(\text{CramoLL})}] \times 100$$

$I_{(\text{CramoLL})}$ corresponding the value of the current of electrode before contact with serum glycoproteins and $I_{(\text{CramoLL} - \text{glycoproteins})}$ is the value of the current after exposure to solutions containing serum glycoproteins. Measurements were executed in triplicate and the effect of

dilution in response was observed an increase of ΔI_{rel} gradually with concentration. The biosensor based in CramoLL lectin was able to recognize the glycoproteins from normal, BPH and PCa 6, 7 and 9 Gleason scores and specific electrochemical responses were obtained for these groups. The statistical analysis of responses using paired t-test ($p < 0,05$) showed significant difference among the control, BPH and PCa score 6, and among BPH, PCa score 7 and 9. Also it was observed an increase in the electrochemical response correlated with malignancy and the grade of Gleason, suggesting the potential of this biosensor to predict aggressives grades of PCa (Fig 5).

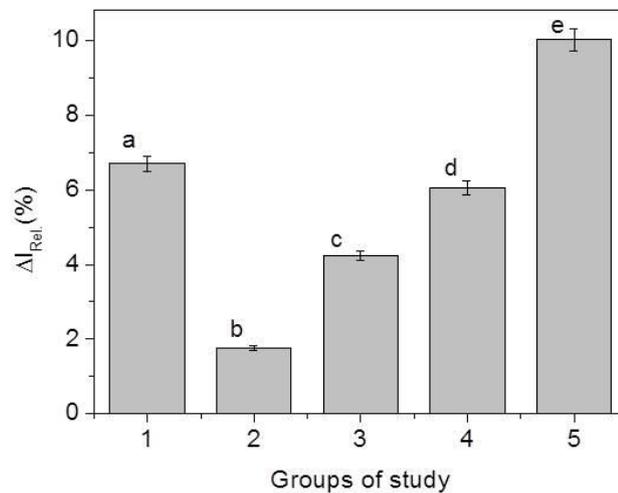


Fig. 5. Graphical representation of ΔI_{rel} of modified electrode after detection of serum glycoproteins from healthy subjects and prostatic tumor alterations. Groups: 1- Healthy (control); 2- BPH; 3- PCa score 6; 4- PCa score 7; 5- PCa score 9. Measurements in $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ in $100 \text{ mmol L}^{-1} \text{ KCl}$ solution. In the graphic, $a \neq b \neq c$ and $b \neq d \neq e$.

The analysis of glycomic profiles profiles have provided to discriminate PCa from normal and benign conditions. The specificity of the lectins favored the recognition of different patterns of glycoproteins expressed in human samples and several techniques employed lectins have found alterations that provide to discriminate among different grades of PCa and benign conditions with more reliability and security than PSA levels. Glycosylation altered in PSA and others glycoproteins have contributed for PCa detection. PSA glycans isolated from tumoral cell and sera of PCa showed tri- and tetraantennary structures (Tajiri, Ohyama and Wada, 2008) and increase in alpha 2-3 sialic acid and decrease in core fucosylation in PSA also were related (Sarrats et al., 2010). A differential binding of

lectins to glycans express on surface tissues from normal, hyperplastic and malignant human prostate was observed (Lima et al., 2010). The analysis of lectin ConA-binding serum glycoproteins by mass spectrometry revealed differential expression between BPH and PCa (Drake et al., 2006). It was identified a fucosylation increased of glycan structures in cancer sera (Kyselova et al., 2007). A study reports an increase in levels and glycosylation of serum haptoglobin in PCa compared with BPH and healthy individuals (Fujimura et al., 2008). Saldova et al., 2011 founded more glycan expression biantennary fucosylated and connected to $\alpha 2$ -3 sialic acid in PCa sera compared to BPH and a marked reduction in the expression of triantennary trigalactosylated glycans and tetrasialylated glycans with an outer arm fucosylated and increased levels of tetra-antennary tetrasialylated glycans in PCa score 7 compared to PCa score 5 (Saldova et al., 2011). Some glycoproteins were identified that had quantitative changes associated with aggressive PCa in tissues, including periostin, cartilage oligomeric matrix protein and membrane primary amine oxidase (Chen et al., 2013).

Here in, the response of biosensor for PCa score 9 sample was more strong than for BPH and the others scores of PCa. Considering the specificity for glucose/mannose of CramoLL, this may indicate an increased of the contents of mannose in glycans serum associated with higher-grade of Gleason. Increased in the ΔI_{rel} also may indicate a specific marker expression correlated with grade and stage of PCa. The relation between alterations of glycan structures with the cancer progression suggests the occurrence of differences in glycoprotein profiles express in each degree of staging, and the lectin interacts differentially with healthy, BPH and PCa scores 6, 7 and 9 samples. The results suggest the possibility of using in future studies involved characterization of glycosylation in diseases conditions and therapies.

4 Conclusions

We have introduced a new approach to developing a biosensor based on immobilized lectin CramoLL on a glassy carbon electrode modified with poly-L-lysine and carbon nanotubes. Carbon nanotubes promoted better stability, increased electronic conductivity and sensing area, favoring immobilization of CramoLL and detection of the electrochemical signal. The biological activity of the lectin was maintained, as demonstrated by interaction with α -Methyl-D-mannopyranose and fetuin with low limits of detection and reproducibility. The potential of recognition of lectin biosensor also has been shown to detect serum glycoproteins of different groups with prostate tumor alterations and therefore may provide a new alternative to detect PCa and the grade and stage of disease. However, additional validation studies would need to be carried out to further support these findings.

Acknowledgements

The authors are grateful for the support provided by the Pernambuco State Foundation for the Support of Science and Technology (FACEPE), Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel (CAPES).

References

- Ahn, Y. H., Shin, P. M., Ji, E. S., Kim, H., Yoo, J. S. 2012. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402, 2101-2112.
- Chandler, K., Goldman, R. 2013. *Molecular and Cellular Proteomics* 12 (4), 836-845.
- Chen, J., Xi, J., Tian, Y., Bova, G. S., Zhang, H. 2013. *Proteomics* 13, 2268-2277.
- Correia, M. T. S., Coelho, L. C. B. B. 1995. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 55, 261-273.

- Dias, A. C. M. S., Gomes-Filho, S. L. R., Silva, M. M. S., Dutra, R. F. 2013. *Biosens. Bioelectron.* 44, 216-221.
- Drake, R. R., Schwegler, E. E., Malik, G., Diaz, J., Block, T., Mehta, A., Semmes, O. J. 2006. *Mol. Cell. Proteomics* 5 (10), 1957-1967.
- Fujimura T., Shinohara, Y., Tissot, B., Pang, P., Kurogochi, M., Saito, S., Arai, Y., Sadilek, M., Murayama, K., Dell, A., Nishimura, S., Hakomori, S. 2008. *Int. J. Cancer* 122, 39-49.
- Gilgunn, S., Conroy, P. J., Saldova, R., Rudd, P. M., O'Kennedy, R. J. 2013. *Nat. Rev. Urol.* 10 (2), 99-107.
- Jalit, Y., Rodríguez, M. C., Rubianes, M. D., Bollo, S., Rivas, G. A. 2008. *Electroanal.* 20 (15), 1623-1631.
- Kyselova, Z., Mechref, Y., Al Bataineh, M. M., Dobrolecki, L. E., Hickey, R. J., Vinson, J., Sweeney, C. J., Novotny, M. V. 2007. *J. Proteome Res.* 6 (5), 1822-1832.
- Li, Q. K., Chen, L., Ao, M., Chiu, J. H., Zhang, Z., Zhang, H., Chan, D. W. 2015. *Theranostics* 5 (3), 267-276.
- Lima, A. L. R., Cavalcanti, C. C. B., Silva, M. C. C., Paiva, P. M. G., Coelho, L. C. B. B., Beltrão, E. I. C., Correia, M. T. S. 2010. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, article ID 179817, 6 pages.
- Nardi, A. C., Pompeu, A. C. L., Faria, E. F., Guimarães, G. C., Calixto, J. R., da Ponte, J. R. T., Nogueira, L., Leal, M. L. O., Berger, M., Andrade, N., Bernardo, W. M. 2013. *Diretrizes SBU*. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Urologia, 2013.
- Oliveira, M. D. L., Correia, M. T. S., Coelho, L. C. B. B., Diniz, F. B. 2008. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 66, 13-19.

Rahman, N. A., Yusof, N. A., Maamor, A. M., Noor, S. M. M. 2012. *Int. J. Electrochem. Sci.* 7, 186-196.

Saldova, R., Fan, Y., Fitzpatrick, J. M., Watson, R. W. G., Rudd, P. M. 2011. *Glycobiol.* 21 (2), 195-205.

Sarrats, A., Comet, J., Tabarés, G., Ramírez, M., Aleixandre, R. N., de Llorens, R., Peracaula, R. 2010. *The prostate* 70, 1-9.

Sgobba, V., Guldi, D. M. 2009. *Chem. Soc. Rev.* 38, 165-184.

Siegel, R., Ma, J., Zou, Z., Jemal, A. 2014. *CA. Cancer J. Clin.* 14 (64), 9-29.

Silva, M. M. S., Dias, A. C. M. S., Silva, B. V. M., Gomes-Filho, S. L. R., Kubota, L. T., Goulart, M. O. F., Dutra, R. F. 2015. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 90 (1), 194-200.

Svarovsky, S. A., Joshi, L. 2014. *Anal. Methods* 6, 3918-3936.

Tajiri, M., Ohyama, C., Wada, Y. 2008. *Glycobiol.* 18 (1), 2-8.

Tuncer, C., Canavar, E., Congur, G., Karaderitz, H., Erdem, A., Butun, V. 2012. *Talanta* 100, 270-275.

Wang, J.; Zhang, S.; Zhang, Y. 2010. *Anal. Biochem.* 396, 304-309.

Xue, Y., Bao, L., Xiao, X., Ding, L., Lei, J., Ju, H. 2011. *Anal. Biochem.* 410, 92-97.

Zhang, X., Teng, Y., Fu, Y., Zhang, S., He, B., Wang, C., Zhang, W. 2010. *Anal. Chem.* 82, 9455-9460.

Zhao, W., Wu, X. Q., Lu, Z. Q., Hou, W. J., Li, H. X. 2010. *Chin. Chem. Lett.* 21, 93-96.

Zeng, X.; Andrade, C. A. S.; Oliveira, M. D. L.; Sun, X. 2012. *Anal. Bioanal. Chem.* 402: 3161-3176.

6. CONCLUSÕES

6.1 Foi desenvolvido um biossensor utilizando eletrodo de carbono vítreo com poli-L-lisina e nanotubos de carbono carboxilados, onde a CramoLL foi mobilizada;

6.2 Análises de MEV e FT-IR mostraram a formação do filme de PLL e nanotubos de carbono, que funcionalizados com grupos carboxílicos (COOH) permitiram a imobilização da lectina CramoLL;

6.3 A melhor concentração de PLL para modificação de ECV nas condições estudadas foi $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ e para NTC-COOH foi $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$;

6.4 A associação de NTC-COOH ao filme de PLL proporcionou um aumento de 71,2% nos picos de corrente devido a área superficial adicional e melhora da condutividade elétrica promovida pelos nanotubos de carbono;

6.5 O filme PLL/ NTC-COOH foi duas vezes mais estável (0,6 %) que o filme PLL (1,3%), graças à estabilidade química e mecânica dos nanotubos de carbono. Porém, ambos coeficientes foram ótimos (< 5%);

6.6 O uso da técnica de eletrodeposição na formação do filme de PLL sobre ECV colaborou para manutenção e estabilidade do filme de PLL obtido;

6.7 Para imobilização de CramoLL, foram encontradas concentração ótima de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ e tempo ótimo de 60 min;

6.8 Os resultados do estudo de velocidade de varredura mostram que ECV/ PLL/ NTC-COOH/ CramoLL é um sistema estável e controlado por difusão;

6.9. O biossensor PLL/ NTC-COOH/ CramoLL exibiu boa sensibilidade e reprodutibilidade para fetuína e metil- α -D-manopiranosose, com resposta linear entre 0.5 e $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($r = 0.994$, $p < 0.001$) e limite de detecção de $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$ para fetuína, e para metil- α -D-manopiranosose apresentou resposta linear de 0.96 à $38.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($r = 0.982$, $p < 0.001$) e limite de detecção de

0.04 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os limites de detecção alcançados são considerados baixos, mostrando o potencial do biossensor para detectar alterações de glicosilação;

6.10 ECV/ PLL/ NTC-COOH/ CramoLL/glicina apresentou estabilidade de 1,24% e reprodutibilidade de 4,24% ($< 5\%$) para fetuína 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo considerado um sistema estável, reprodutível e confiável para análise de glicoproteínas;

6.11 Glicose, galactose, frutose, fucose e BSA apresentaram baixa taxa de interferência ($< 10\%$) na resposta do biossensor para fetuína;

6.12 PLL/ NTC-COOH/ CramoLL foi utilizado para caracterizar os perfis de glicoproteínas em soros de indivíduos saudáveis e pacientes de HBP e CaP. Foi possível distinguir entre os escores 6, 7 e 9 de CaP e amostras não cancerosas. A habilidade de reconhecimento específico da lectina somada as propriedades dos nanotubos permitiu obter respostas diferenciadas para os grupos estudados, por análise eletroquímica de voltametria de onda quadrada.

6.13 Essas estratégias contribuiu para o desenvolvimento de um sistema analítico simples, rápido, de baixo custo, promissora para identificar alterações no perfil de glicosilação relacionadas à hiperplasia benigna da próstata e câncer de próstata. O aperfeiçoamento deste sistema na forma de dispositivos portáteis poderá futuramente, gerar um protótipo para o uso em grande escala em sistema de saúde para auxiliar no diagnóstico e prognóstico de doenças como o câncer.

7. ANEXOS

Anexo 1: Diretrizes para autores – periódico *Biosensors and Bioelectronics*

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Essential title page information

Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail

address of each author.

Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.

Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

The abstract is the part of your paper which will be read by the largest number of scientists so it plays a crucial role. The abstract is a condensation of the information (facts) in the paper and should be brief (150 - 250 words), specific and self-contained including the methods of the research and the principal results. The abstract should not include trivial experimental details, references, figures or equations.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes. Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when crossreferencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply "the text".

1.Introduction

This section should state the objectives of the work and provide an adequate background. It should also describe briefly the work presented in the paper. Avoid a detailed literature survey or a summary of the results.

2. Material and methods

It should provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

3. Results

Results should be clear and concise.

4. Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. Avoid extensive citations and discussion of published literature. A combined Results and Discussion section is often appropriate. The Results and Discussion should deal with the interpretation of the results in the light of previously published findings.

5. Conclusions

It should be kept short and must be fully supported by the results reported. The Conclusions section should include the major conclusions, the limitations of the work and the future work.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Subdivision - unnumbered sections

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when crossreferencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors'

Affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

• ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

• ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

The abstract is the part of your paper which will be read by the largest number of scientists so it plays a crucial role. The abstract is a condensation of the information (facts) in the paper; it is not a description of the contents of the paper. The abstract should present as much as possible of the qualitative and quantitative information contained in the paper yet it should be brief (150 – 250 words), specific and self-contained. The abstract may include the following:

1. The context for the work.
2. The purpose or objectives of the work (what was the research question or problem and why it is important).
3. Theoretical or experimental methods used.
4. Results (qualitative and quantitative).
5. Conclusions and their limitations (what was the meaning of the results).
6. Safety information concerning dangerous compounds or procedures if relevant.

If the paper reports a new instrument or method then the abstract should include a description of its advantages and disadvantages compared to other established techniques. The abstract should not include trivial experimental details, references, figures or equations.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: <http://www.iupac.org> for further information.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately

at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.
- The figures/schemes/tables should be inserted directly where the authors want them in the text. A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required. If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used. The preferred positions for all figures should be indicated in the text.

Tables

Please note that a full paper should contain no more than 6 single figures/ tables/schemes. A short communication should contain no more than 3 single figures/ tables/schemes. Tables should be typed in double spacing on separate pages and provided with a suitable heading.

Tables should be clearly referred to in the text using Arabic numerals. Considerable thought should be given to layout so that the significance of the results can be easily grasped. Each table should have a title which makes the general meaning understandable without reference to the text. Vertical lines should not be used to separate columns. Column headings should be sufficiently explanatory, and presented in a way consistent with the column width. Columns of figures multiplied by the same power of ten should not be presented as such. The power of ten should be indicated in the column heading, e.g.:

10⁴[NaCl]/mol l⁻¹

4.2

3.5

0.26

rather than

[NaCl]/mol l⁻¹

4.2 x 10⁻⁴

3.5 x 10⁻⁴

2.6 x 10⁻⁵

In order to demonstrate the repeatability/reproducibility of the method, Authors are asked to include relative standard deviations (RSD) or the coefficient of variations (CV) in tables.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Reference management software

Most Elsevier journals have a standard template available in key reference management packages. This covers packages using the Citation Style Language, such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and also others like EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to word processing packages which are available from the above sites, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style as described in this Guide. The process of including templates in these packages is constantly ongoing. If the journal you are looking for does not have a template available yet, please see the list of sample references and citations provided in this Guide to help you format these according to the journal style.

Reference Style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by "et al." and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown"

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same

year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations:

<http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary material

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Interactive plots

This journal encourages you to include data and quantitative results as interactive plots with your publication. To make use of this feature, please include your data as a CSV (comma-separated values) file when you submit your manuscript. Please refer to <http://www.elsevier.com/interactiveplots> for further details and formatting instructions.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet) Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white
- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.
- For reproduction in black-and-white, please supply black-and-white versions of the figures for printing purposes. For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given

DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):
<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/89/p/8045/.

You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

Guide For Authors last updated on 28 August, 2012

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>