

Andrés Renaud¹, Federico Sastre², Fernando Ferreira⁴, Fernanda Cerda³.

¹ Facultad de Ingeniería, Universidad de la República. Montevideo. Uruguay. andresrenaud@gmail.com

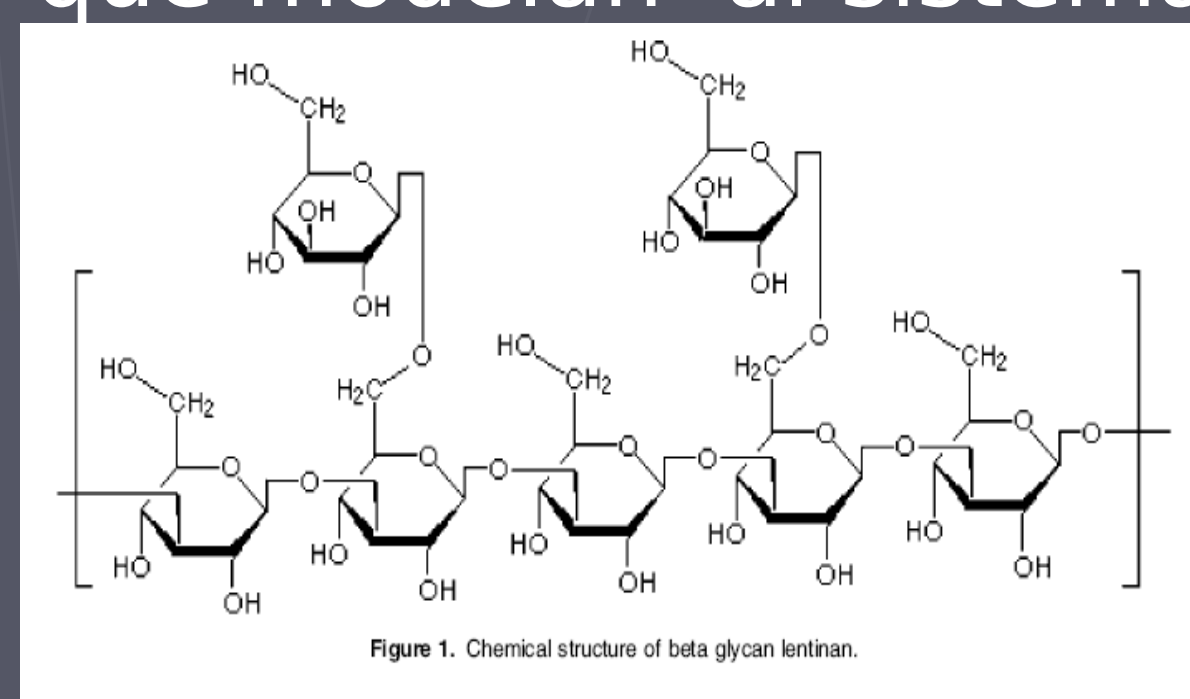
² Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Montevideo. Uruguay. fedesastre@gmail.com

³ Laboratorio de Biomateriales, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Iguá 4225. CP 11400, Montevideo, Uruguay.

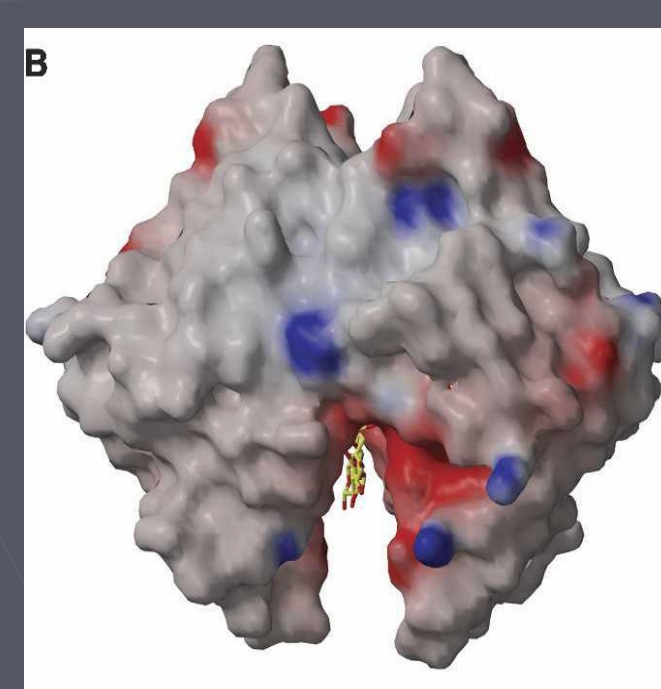
⁴ Laboratorio de Carbohidratos y Glicoconjugados (LCG). Instituto de Higiene, Av. Alfredo Navarro 3051. CP 11600, Montevideo, Uruguay.

Introducción

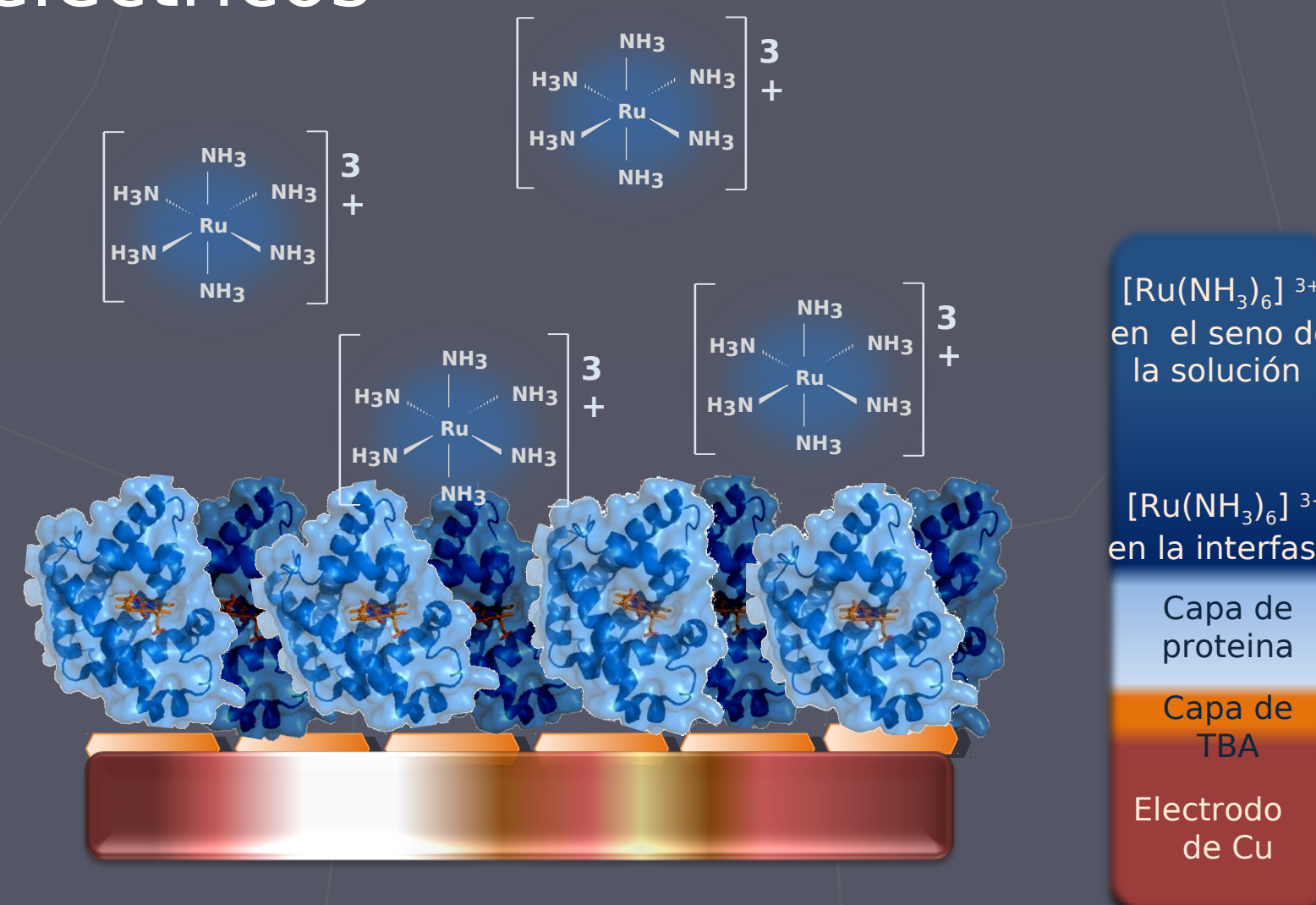
La Espectroscopia de Impedancia (EI) permite evaluar el comportamiento de los electrodos de trabajo en un amplio rango de frecuencias y voltajes de polarización. Esto la convierte en una herramienta muy apropiada para caracterizar la interacción entre proteínas y polisacáridos (en este caso Dectina - Lentinano). Al electrodo de cobre, previamente modificado con un tiol de autoensamblado (ácido 2 tiobarbitúrico, TBA) se lo incubaba con la proteína. Una vez comprobado el anclaje de la misma mediante mediciones en electrolito soporte con una cupla redox, se procede a incubar este electrodo con el polisacárido, para luego evaluar el pegado y observar variaciones en los parámetros eléctricos que modelan al sistema.



Cadena principal del (1-3)β - D – glucano: Lentinano



Dectina-1 al acoplarse a un (1-3)β- D – glucano de bajo peso molecular⁴.



Esquema del Sistema³

Método Experimental

Electrodo de trabajo: Cu, Cu/TBA, Cu/TBA/Dec, Cu/TBA/Dec/Len.

Electrodo de referencia: Hg/Hg₂Cl₂

Electrodo auxiliar: Grafito

Electrolito soporte: NaClO₄ 0.1 M

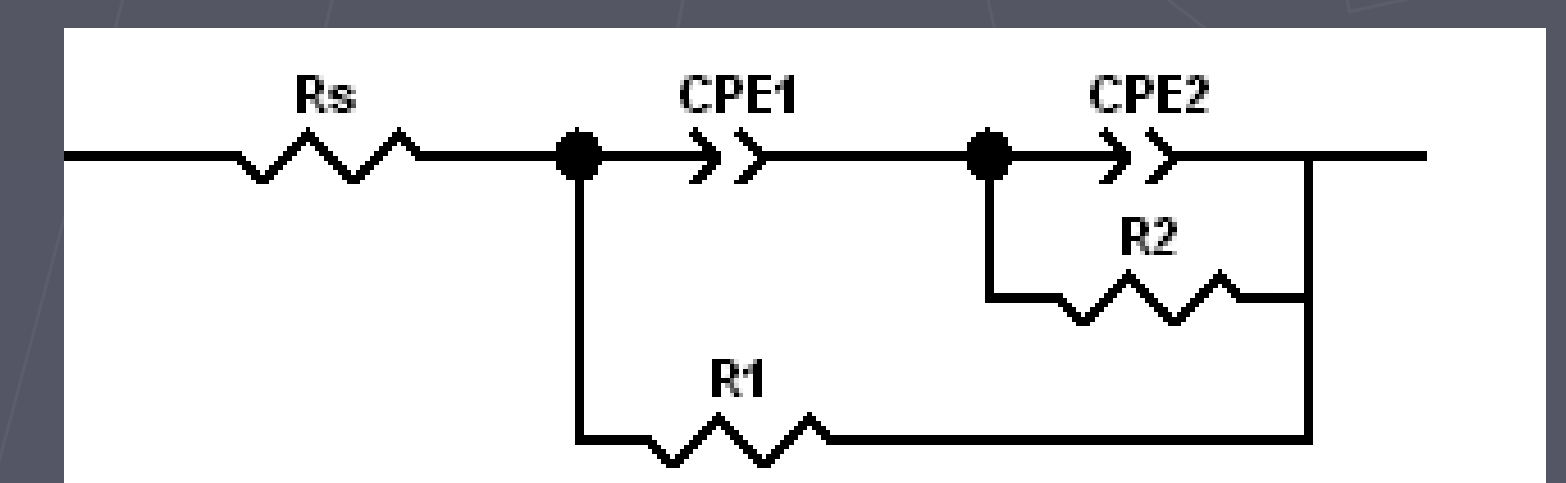
Cupla redox: [Ru(NH₃)₆]Cl₃ 1 mM

Proteína: Dectina-1 0.5 mg/mL

Polisacárido: (1-3) β - D - glucano Lentinano

Los experimentos fueron realizados bajo atmósfera de Nitrógeno.

Modelo



Circuito Eléctrico que modela el comportamiento del sistema³

Resultados

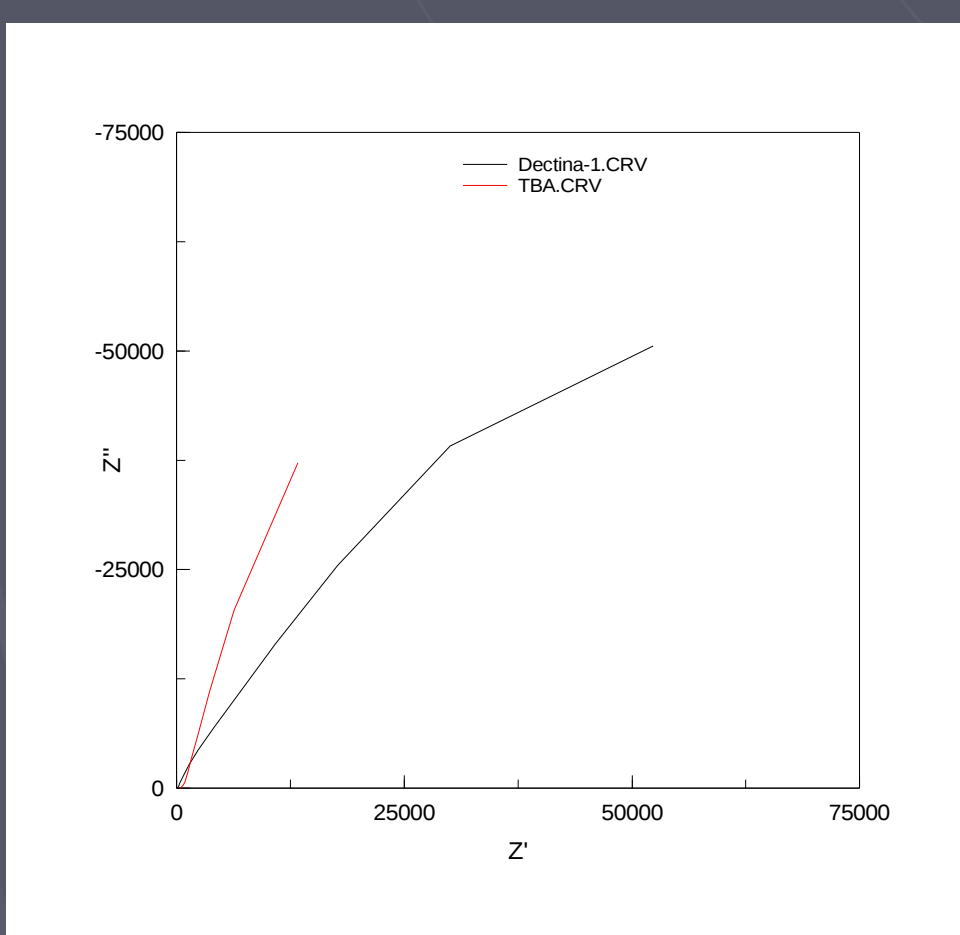


Diagrama en el plano complejo y bode de las impedancias obtenidas para los electrodos Cu/TBA y Cu/TBA/Dec, en solución de [Ru(NH₃)₆]Cl₃ 1 mM y electrolito soporte NaClO₄ 0.1 M (-0.45V vs. SCE).

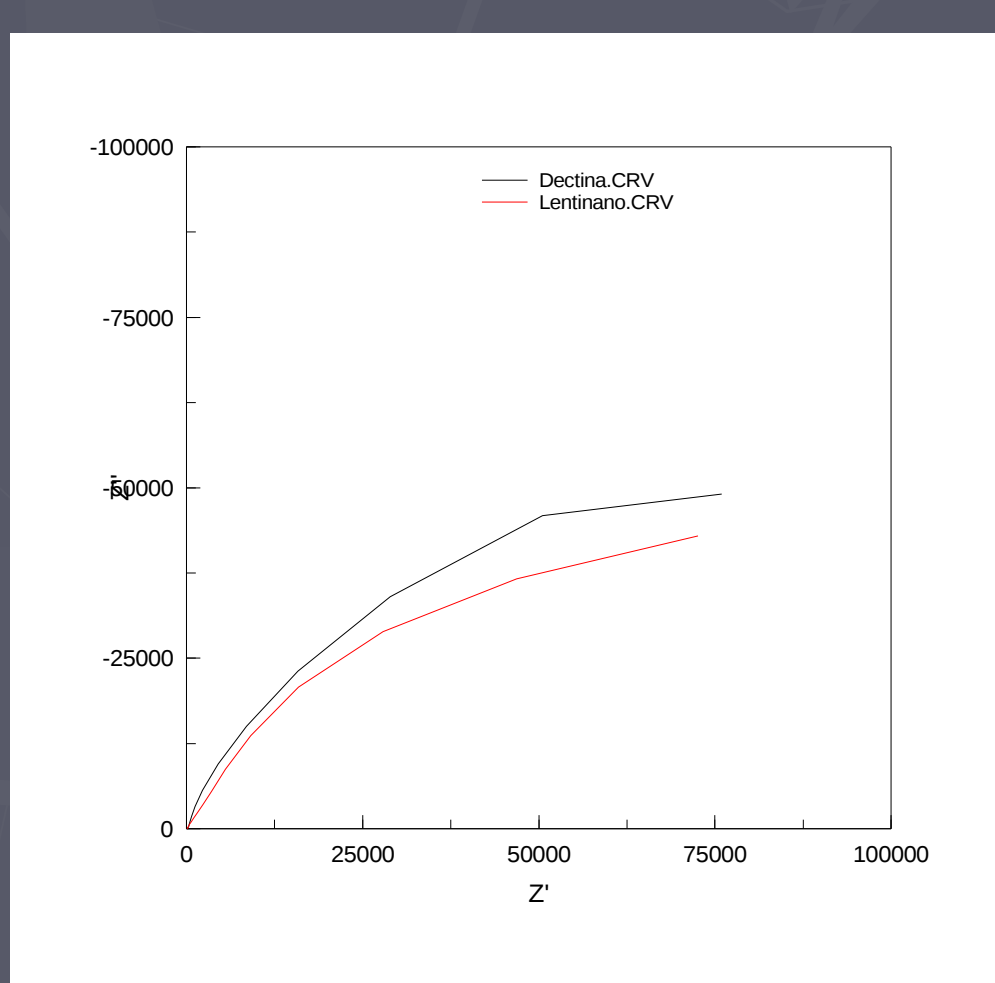
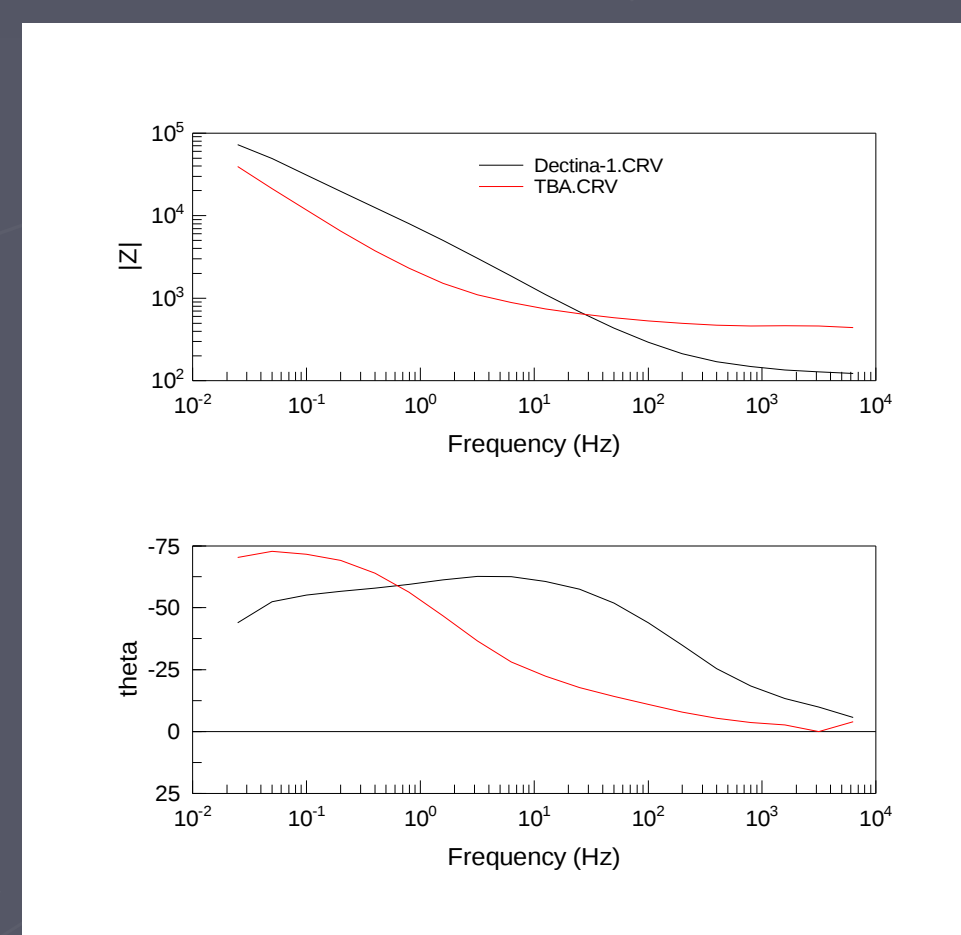
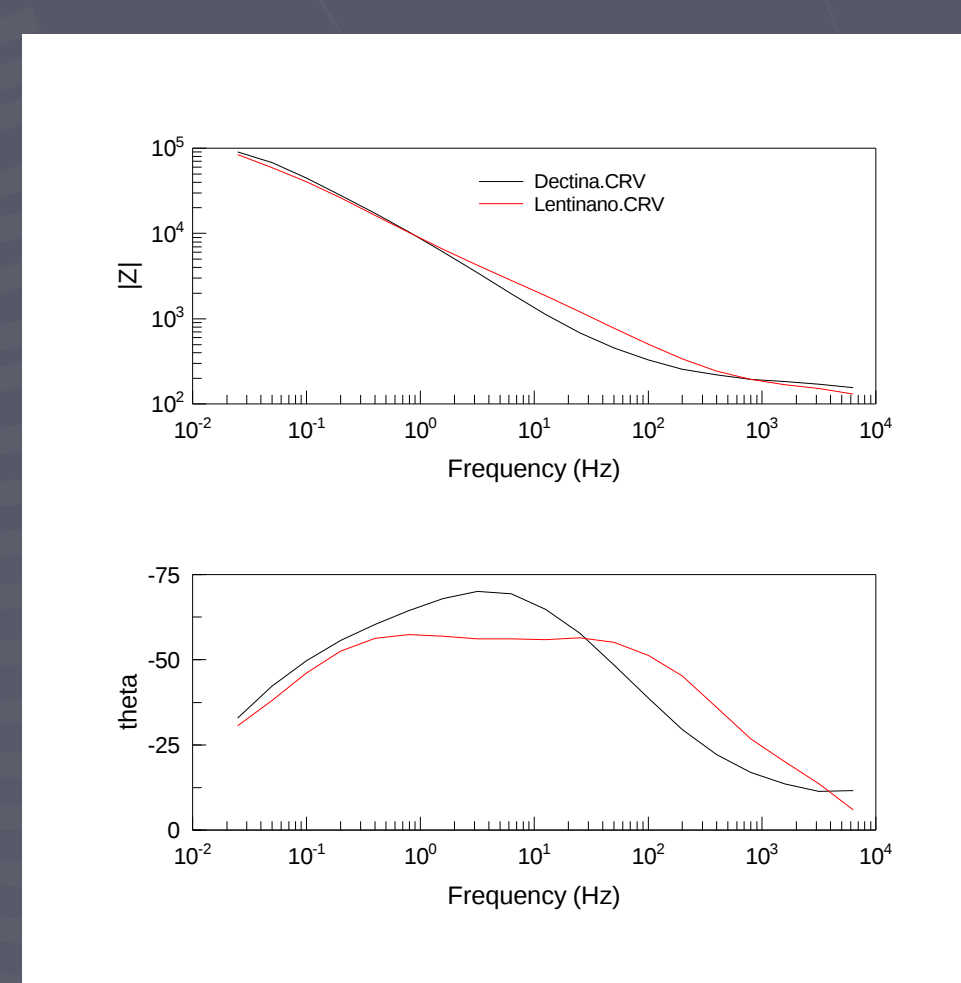


Diagrama en el plano complejo y bode de las impedancias obtenidas para los electrodos Cu/TBA/Dec y Cu/TBA/Dec/Len, electrolito soporte NaClO₄ 0.1 M (-0.6V vs. SCE).



Elemento	Volts DC	Cu/TBA	Cu/TBA/Dec
Rs (Ω)		111.1± 3%	121.2± 2%
R1 (kΩ)		301.6± 10%	200.3± 6%
CPE1 (μF)	-0,45	128.3± 0.9%	42.12± 2%
R2 (Ω)		450.0± 3 %	1599 ±12%
CPE2 (μF)		183.5± 6%	137.4± 8%
		0.5925 ± 2%	0.9150 ± 4%

Parámetros estimados del modelo y errores relativos en el ajuste, para el experimento de la izquierda, los cuales se ajustaron por CNLS utilizando el programa ZView.

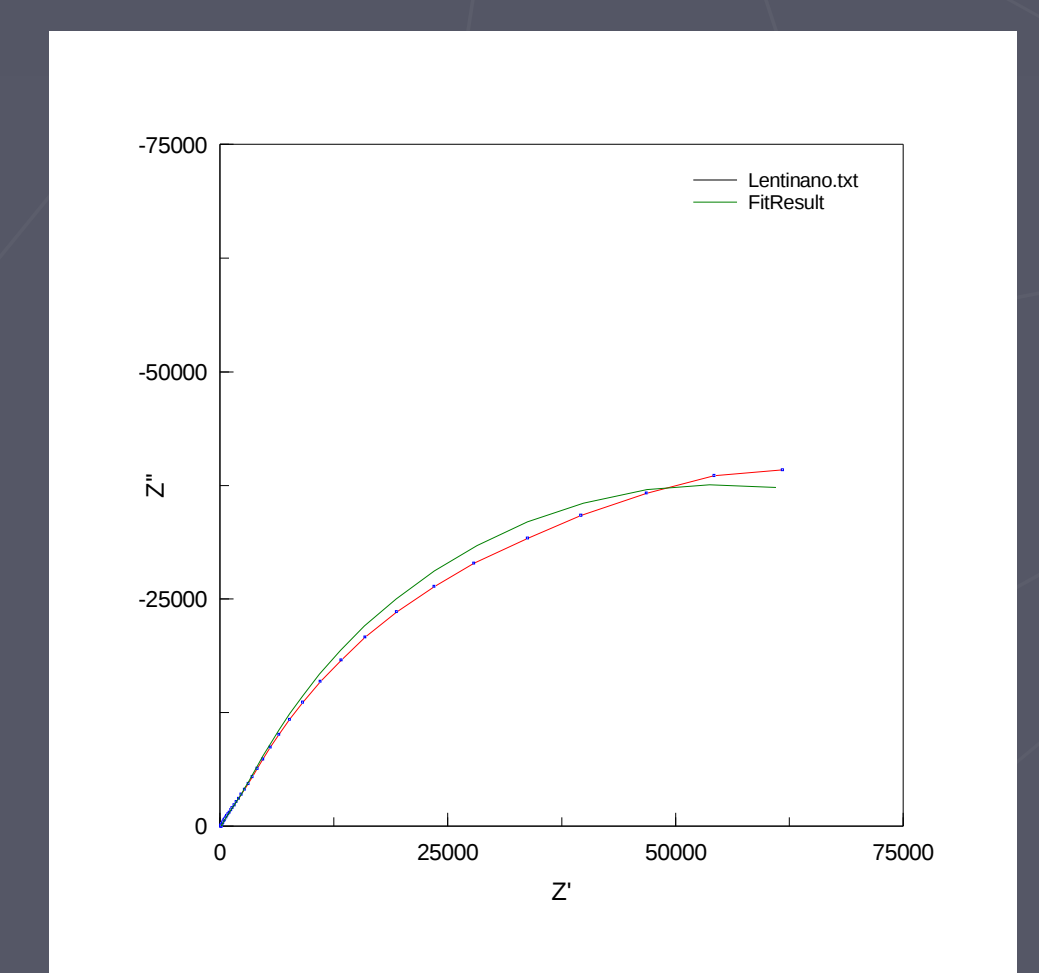


Diagrama en el plano complejo de datos experimentales y ajuste por CNLS para Cu/TBA/Dec/Len.

Elemento	Volts DC	Cu/TBA/Dec	Cu/TBA/Dec/Len
Rs (Ω)		108,4 ± 3%	129.0± 2%
R1 (kΩ)		129.7± 4%	148.4± 3%
CPE1 (μF)	-0,60	26.93± 2%	27.73± 2%
R2 (Ω)		99,63± 5%	768,0± 6%
CPE2 (μF)		63.32± 16%	79.16± 4%
		0.5339 ± 3%	0.7139 ± 3%

Parámetros estimados del modelo y errores relativos en el ajuste, para el experimento de la izquierda, los cuales se ajustaron por CNLS utilizando el programa ZView.

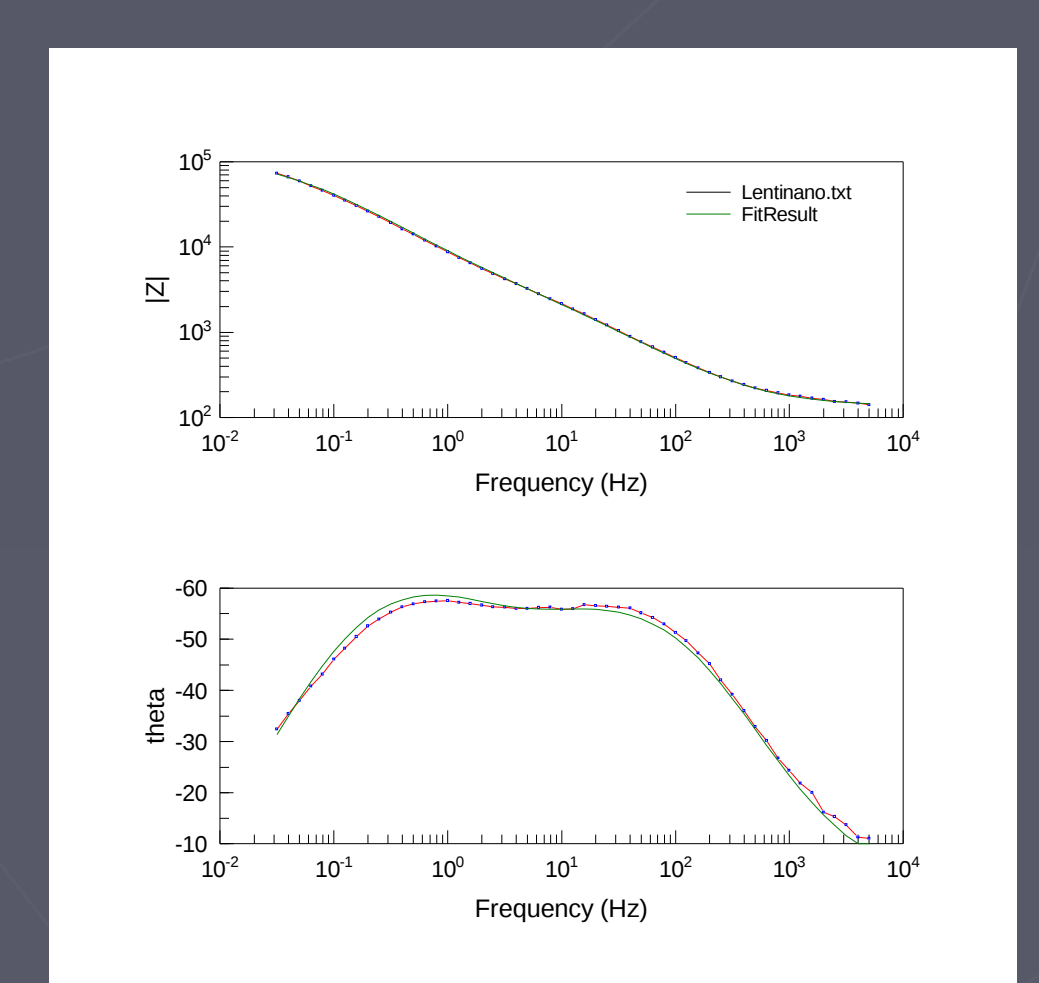


Diagrama de Bode de datos experimentales y ajuste por CNLS para Cu/TBA/Dec/Len.

Conclusiones

Los resultados de la EI para Cu/TBA y Cu/TBA/Dec en presencia de la cupla redox reafirman la adherencia de la Dectina al electrodo de cobre, ya que existe un incremento en el modulo de la impedancia, y particularmente en la parte real de la misma, a frecuencias bajas. El modelo utilizado ajusta bien los datos experimentales para las frecuencias medias y altas pero comienza a discrepar por debajo de 0.1Hz , posiblemente porque no toma en cuenta la difusión de las especies involucradas. Si bien el modelo ajusta mejor para la polarización de -0.45V, los cambios entre Cu/TBA/Dec y Cu/TBA/Dec/Len para el sistema expuesto son mayores para -0.6V y la región óptima para observarlos es entre 10Hz y 1000Hz. Estos resultados dan pie a estudios posteriores y favorecen la construcción de herramientas tecnológicas de bajo costo para aplicaciones similares, en las cuales la integración de las facultades involucradas permitirá acelerar la generación de conocimiento.

Agradecimientos a CSIC por el apoyo financiero, al Lab. de Biomateriales y al Lab. de Carbohidratos y Glicoconjugados por el suministro de materiales. Un especial agradecimiento a Martin por proveernos la Dectina recombinante, la cual preparo en el Laboraorio

Referencias

1. E. Barsukov, J.R. MacDonald. Impedance Spectroscopy 2^{da} Ed., Wiley 2005.
2. M. E. Orazem, B. Tribollet. Electrochemical Impedance Spectroscopy, Wiley 2008.
3. M. F. Cerda, L. Luzuriaga, M. Wörner,, E. Méndez. Electrodo de cobre como sensores de la interacción metal-proteína. Poster presentado en el XVI Congreso Argentino de Físicoquímica y Química Inorgánica, 2009 Salta-Argentina.
4. Structure of the fungal β-glucan-binding immune receptor dectin-1: Implications for function. J. Brown, C. O'Callaghan , A. Marshall, R. Gilbert, C. Siebold, S. Gordon, G. Brown, E. Jones. Protein Sci.16/6 (2007)1042-52.
5. F. Cerdá, G. Obal, J. S. Gancheff, C. Kremer, A. M. Castro, A. M. Braun, M. Wörner, E. Méndez. Myoglobin modified electrodes as anchors for d metal cationic complexes. Bioelectrochemistry 70 (2007) 394-400.