



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS NATURAIS

MAYARA QUEIROZ DE SANTIAGO

**CARACTERIZAÇÃO DE BIOCONJUGADOS DE PONTOS QUÂNTICOS DE
ZnCdTe COM A LECTINA DE *Canavalia brasiliensis***

FORTALEZA

2016

MAYARA QUEIROZ DE SANTIAGO

CARACTERIZAÇÃO DE BIOCONJUGADOS DE PONTOS QUÂNTICOS DE ZnCdTe
COM A LECTINA DE *Canavalia brasiliensis*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Nanobiotecnologia.

Orientadora: Dra. Kyria Santiago do Nascimento.

Coorientador: Dr. Benildo Sousa Cavada

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S226c Santiago, Mayara Queiroz.
Caracterização de bioconjugados de pontos quânticos de ZnCdTe com a lectina de *Canavalia brasiliensis* /
Mayara Queiroz Santiago. – 2016.
63 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2016.
Orientação: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.
Coorientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.
1. Bioconjugação. 2. Pontos Quânticos. 3. Lectina. 4. ZnCdTe. 5. *Canavalia brasiliensis*. I. Título.
CDD 660.6
-

MAYARA QUEIROZ DE SANTIAGO

CARACTERIZAÇÃO DE BIOCONJUGADOS DE PONTOS QUÂNTICOS DE ZnCdTe
COM A LECTINA DE *Canavalia brasiliensis*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de Concentração: Nanobiotecnologia.

Aprovada em: 17/02/2016.

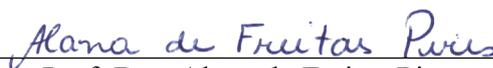
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Kyria Santiago do Nascimento (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Odair Pastor Ferreira
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dra. Alana de Freitas Pires
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Aos meus pais, Cláudia e Zelio,
Às minhas irmãs, Cibele e Larissa,
Aos meus avós, Soledade e Pedro,
Ao meu namorado, Vanir Junior.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à UFC, CNPq e a Funcap pelo fomento desta pesquisa.

À Central Analítica-UFC/CT-INFRA/MCTI-SISNANO/Pró-Equipamentos CAPES por possibilitar o uso dos equipamentos para a obtenção dos dados e aquisição das imagens.

Agradeço de forma especial à minha orientadora Professora Doutora Kyria Santiago do Nascimento e ao meu co-orientador Professor Doutor Benildo Sousa Cavada, por terem me recebido em seu laboratório desde a iniciação científica e terem me orientado neste trabalho e em minha carreira acadêmica, sempre acreditando em meu potencial.

Aos doutores Odair Pastor Ferreira e Alana de Freitas Pires por terem aceitado julgar esta dissertação de mestrado tão prontamente, em especial ao Professor Doutor Odair pela excelente orientação e vontade em me ajuda na finalização deste trabalho.

À amiga Manuela Castro, pelo auxílio na interpretação dos dados e pelas horas investidas em discussões construtivas. Muito obrigada, Manu!

Aos amigos e grandes incentivadores do BioMol-Lab Ana Cecília, Vinícius, Adolph, Alysson, Pereira Júnior, Ronniery, Cláudia, Clareane, Cleane, William, Hadson, David e Larissa.

Aos meus pais, Claudia e Zélio, por serem o meu alicerce, e em especial à minha mãe pelo apoio e incentivo em todas as minhas decisões, não só profissionais, mas pessoais. Sem você eu não seria o que sou hoje, Mãe!

À minha avó, Soledade, que além de avó é uma segunda mãe e me dá todo apoio e segurança sempre que eu necessito.

Às minhas irmãs, Cibele e Larissa, por todo apoio e carinho.

À minha madrinha Neuma Frota Madeira, minha terceira mãe, por tudo que você é e representa em minha vida, um Anjo da guarda.

Aos meus tios, Sandro, Glícia, Claudio, Júnior, Janice e Márcio, que contribuíram direta e indiretamente na minha formação pessoal.

Ao meu avô, por todo apoio.

Ao meu companheiro de trabalho e de vida Vanir Júnior pelo carinho, compreensão, apoio e, principalmente, por seu amor. Parte do que sou hoje profissionalmente devo a você, pois juntos nós construímos o que somos. Te amo!

RESUMO

Nos últimos anos, pesquisadores têm somado esforços voltados para o desenvolvimento de técnicas com interesse em estratégias de diagnósticos. Para compreender o surgimento e a progressão de várias doenças diante da ação de qualquer fármaco é necessário avaliar as interações das moléculas biológicas nos diversos processos celulares e isto pode ser feito com o uso de estratégias de biomarcação. Os pontos quânticos (PQs) são compostos inorgânicos semicondutores fluorescentes, que apresentam confinamento quântico em três dimensões e propriedades ópticas únicas e podem ser empregados na geração de imagens e detecção de sinais em diagnósticos. As lectinas, proteínas/glicoproteínas que interagem de forma reversível a carboidratos específicos, já são aplicadas em diversos estudos de atividades biológicas por esta propriedade de reconhecimento. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi a bioconjugação de pontos quânticos de ZnCdTe com a lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr), a caracterização físico-química e avaliação das propriedades de fluorescência e hemaglutinação do sistema formado. As nanopartículas de ZnCdTe sintetizadas foram funcionalizadas com um *crosslinker* de glutaraldeído, e em seguida submetidas à reação de bioconjugação com a lectina. O sistema obtido ZnCdTe-ConBr foi submetido a diversas análises como: tamanho de partícula por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS); avaliação das propriedades óticas por Espectroscopia de Absorção Ultravioleta/Visível (UV/Vis) e Espectroscopia de Fotoluminescência; avaliação química da bioconjugação por Espectroscopia no Infravermelho (FT-IR); avaliação da morfologia e microcomposição por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV); avaliação topográfica, propriedades mecânicas e físico-químicas por Microscopia de Força Atômica (AFM); e avaliação da integridade do sítio de ligação à carboidratos da lectina por Atividade Hemaglutinante (A.H.). Os resultados obtidos sugerem que o sistema ZnCdTe-ConBr foi conjugado covalentemente após a reação. Observou-se também um aumento do tamanho de partícula e uma homogeneidade maior comparado aos pontos quânticos não-conjugados. As propriedades óticas e funcionais do sistema ZnCdTe-ConBr foram mantidas e apresentaram alta estabilidade coloidal e funcional durante um período de até 60 dias. Concluiu-se então que o sistema aqui obtido pode ser utilizado como uma ferramenta biotecnológica para o uso em diagnósticos por imagem.

Palavras-Chave: Bioconjugação, pontos quânticos, lectina, ZnCdTe, *Canavalia brasiliensis*.

ABSTRACT

In recent years, researchers have focused their effort to the development of techniques with an interest in diagnostic strategies. To understand the onset and progression of various diseases before the action of any drug is necessary to evaluate the interactions of biological molecules in various cellular processes, this can be done by the use of biomarking strategies. Quantum dots (QDs) are fluorescent inorganic semiconductor compounds, which exhibit quantum confinement in three dimensions and unique optical properties and may be used in the imaging and detection of diagnostic signals. Lectins, proteins/glycoproteins that interact reversibly to specific carbohydrates, are already applied in several studies of biological activities due to its recognition properties. In view of this, the objective of this work was the bioconjugation of quantum dots ZnCdTe with the lectin of *Canavalia brasiliensis* (ConBr), the physicochemical characterization, evaluation of fluorescence properties and hemagglutination the formed system. The ZnCdTe synthesized nanoparticles were functionalized with a glutaraldehyde linker and then, submitted to bioconjugation reaction with the lectin. The obtained system ZnCdTe-ConBr was subjected to various analyzes such as particle size by Dynamic Light Scattering (DLS); evaluation of optical properties by UV/Visible Spectroscopy Absorption (UV/Vis) and photoluminescence spectroscopy; chemical evaluation of bioconjugation by Infrared Spectroscopy (FT-IR); assessment of morphology and microcomposition by Scanning Electron Microscopy (SEM); topographical evaluation, mechanical and physicochemical properties by Atomic Force Microscopy (AFM); and evaluation of lectin carbohydrate binding site integrity for haemagglutinating activity (H.A.). The results suggest that ZnCdTe-ConBr system was covalently conjugated after the reaction. It was also observed an increase in particle size and a greater homogeneity compared to non-conjugated quantum dots. The optical and functional properties of ZnCdTe-ConBr system was kept displaying a degree of high colloidal stability and functional over a period of 60 days. It was concluded that the system obtained here can be used as a biotechnological tool for use in diagnostic imaging technique.

Keywords: Bioconjugation, quantum dots, lectin, ZnCdTe, *Canavalia brasiliensis*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PQs	Pontos quânticos
BV	Banda de valência
BC	Banda de condução
e ⁻	Elétrons
I.V.	Infravermelho
ZnCdTe	Pontos quânticos constituídos de Zinco (Zn), Cádmiio (Cd) e Telúrio (Te) sintetizados com Glutationa (GSH)
Quibiom	Laboratório de Química e Biológica e Materiais
ConBr	Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>
UFS	Universidade Federal de Sergipe
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
UV/Vis	Espectroscopia de Absorção Ultravioleta/Visível
FT-IR	Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
AFM	Microscopia de Força Atômica
A.H.	Atividade Hemaglutinante
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SDS	Dodecil sulfato de sódio ou lauril sulfato de sódio
BSA	Proteína albumina sérica bovina
AV	Aglomeração visual
GSH	Glutationa

LISTA DE TERMOS TÉCNICOS

Quatum dots: Pontos quânticos

Bulk: Material que não apresenta propriedades de confinamento quântico.

Bottom up: Técnica de obtenção de nanopartículas através de crescimento controlado em meio coloidal.

Top Down: Técnica de obtenção de nanopartículas pela redução das dimensões (ablação) de um material pré-existente.

Desvio de *Stokes*: É a diferença em nanômetros entre os picos do espectro de excitação e do espectro de emissão.

Cantilever: Sensor de força microscópico, sendo o principal elemento do AFM.

Crosslinker: Agente de ligações cruzadas responsável por conectar duas ou mais moléculas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das bandas de energia para sólidos cristalinos.	16
Figura 2. Elementos da família VIA (calcogênios) e IIB (metais de transição) da tabela periódica constituintes dos pontos quânticos II-VI.	17
Figura 3. Fotoemissão normalizada de pontos quânticos de CdSe sob único comprimento de onda de excitação conseguida variando seletivamente o tamanho dos mesmos.	19
Figura 4. Comparação da fotoestabilidade entre PQ 630-estreptavidina e Alexa 488 e a em vermelho o PQs 630- estreptavidina. A marcação em verde representa Alexa 488 e a em vermelho o PQs 630- estreptavidina. A iluminação foi mantida contínua por 3 min a partir de uma lâmpada de mercúrio (100 W). Utilizou-se um filtro de excitação de 485 ± 20 nm para ambos, de emissão 535 ± 10 nm e 635 ± 10 nm, para monitorar os sinais do Alexa 488 e PQ 630, respectivamente.	20
Figura 5. Representação do processo de permutação circular em lectinas de leguminosas.	26
Figura 6. Esquema representativo de uma molécula de glutaraldeído e do seu polímero insaturado.	29
Figura 7. Em 1, exemplo de amostra bem dispersa. 2, Amostra turva com indícios de aglomeração. 3, amostra com sedimentação e formação de fase, indício claro de agregação das partículas conjugadas.	33
Figura 8. Perfil Cromatográfico e SDS-PAGE de ConBr.	37
Figura 9. Representação esquemática da funcionalização de ZnCdTe-GSH por glutaraldeído.	38
Figura 10. Dispersão do sistema ZnCdTe-ConBr (Glut 0,26% e ConBr 1 mg/mL). Primeira imagem, Luz Branca. Segunda imagem, UV.	39
Figura 11. Histograma do número percentual de tamanho de partícula obtido por espalhamento de luz dinâmico (DLS). (A), ZnCdTe 40 pH 11; (B), glutaraldeído na concentração de 0,26%; (C), solução de ConBr a 1 mg/mL em água ultrapura (Milli-Q). Fonte: Elaborada pelo autor.	41
Figura 12. Histograma do número percentual de tamanho de partícula obtido por espalhamento de luz dinâmico (DLS). (A), ZnCdTe 40 pH 11 tratados com Glut. 0,26%; (B), ZnCdTe-ConBr 0,25 mg/mL; (C), ZnCdTe-ConBr 0,5 mg/mL; (D) ZnCdTe-ConBr 1,0 mg/mL.	42
Figura 13. Espectros de absorbância UV/Visível de ZnCdTe 40 pH 11 puro (Preto); ZnCdTe 40 pH 11 tratados com Glut. 0,26% (Vermelho); ZnCdTe-ConBr 0,25 mg/mL (Azul); ZnCdTe-ConBr 0,5 mg/mL (Fúcsia); ZnCdTe-ConBr 1,0 mg/mL (Verde). Os espectros foram obtidos no intervalo de comprimentos de onda de 200 a 800 nm.	44

Figura 14. (A) Gráfico de intensidade de fotoluminescência de ZnCdTe 40 pH 11 puro e o mesmo com ConBr 1 mg/mL não-conjugado; (B) Gráfico de intensidade de fotoluminescência de ZnCdTe 40 pH 11 tratado com glutaraldeído 0.26%, e conjugados com concentrações crescentes de ConBr (0,25; 0,5; 1,0 mg/mL).....	45
Figura 15. Espectros de infravermelho de ZnCdTe 40 pH 11 puro (Preto); ZnCdTe 40 pH 11 Glut. 0,26% (Vermelho); ZnCdTe-ConBr 1,0 mg/mL (Azul).	46
Figura 16. (A) Imagem de Microscopia eletrônica de varredura com medição aparente dos aglomerados formado pelo sistema ZnCdTe-ConBr 1,0 mg/mL. (B) Microanálise de área total do sistema ZnCdTe-ConBr 1,0 mg/mL. (C) Microanálise de pontual do sistema ZnCdTe-ConBr 1, 0 mg/mL. (C) Microanálise de pontual do sistema ZnCdTe-ConBr 1,0 mg/mL.	48
Figura 17. Microscopia de força atômica de ZnCdTe não-conjugados e conjugados com ConBr. (a - b) Imagens de altura e amplitude dos PQs puros. (d - e) Imagens de altura e amplitude dos PQs conjugados à proteína. (c - f) Imagens de fase de PQs puros (c) e PQs conjugados (f). ..	50
Figura 18. Atividade hemaglutinante em microplaca de titulação com eritrócitos de coelho não tratado com enzimas proteolíticas a 3%. (A) Atividade do sistema ZnCdTe-ConBr a 1,0 mg/mL; (B) Atividade de ConBr a 1,0 mg/mL; (C) ZnCdTe tratados com Glut 0,26% (apresentou agregação); (D) Sistema ZnCdTe-ConBr 1,0 mg/mL em incubação prévia com 0,1 M D-manose (Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante).....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de materiais semicondutores do tipo II-VI com sua faixa de emissão....	17
Tabela 2. Teste de glutaraldeído vs teste da ConBr. ZnCdTe 40 pH 11,0.	38
Tabela 3. Potencial Zeta das amostras ZnCdTe 40 pH 11 puro, ZnCdTe 40 pH 11 Glut 0,26% e ZnCdTe-ConBr 1 mg/mL.	40
Tabela 4. Tabela dos títulos de hemaglutinação.....	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Materiais Semicondutores.....	16
1.2 Pontos Quânticos.....	18
1.3 Pontos Quânticos vs Fluoróforos Orgânicos Convencionais	18
1.4 Pontos Quânticos: CdTe vs ZnCdTe.....	20
1.5 Lectinas	21
<i>1.5.1 Especificidade e reversibilidade de interação</i>	<i>22</i>
<i>1.5.2 Potenciais biotecnológicos</i>	<i>23</i>
<i>1.5.3 Lectinas vegetais</i>	<i>24</i>
<i>1.5.4 A ConBr</i>	<i>25</i>
1.6 Bioconjugação	27
<i>1.6.1 Crosslinkers</i>	<i>27</i>
2 OBJETIVOS	30
2.1 Gerais	30
2.2. Específicos.....	30
3 METODOLOGIA.....	31
3.1 Síntese de ZnCdTe	31
3.2 Purificação da ConBr por cromatografia de afinidade à Sephadex-G-50®.....	31
<i>3.2.1 Análise da homogeneidade</i>	<i>31</i>
3.3 Funcionalização de ZnCdTe	32
3.4 Bioconjugação de ZnCdTe com ConBr	33
3.5 Avaliação qualitativa da dispersão coloidal formada pelo sistema ZnCdTe-ConBr	33
3.6 Caracterização físico-química do sistema ZnCdTe-ConBr	34
<i>3.6.1 Espalhamento de Luz Dinâmico</i>	<i>34</i>
<i>3.6.2 Espectroscopia de Absorção Ultravioleta/Visível</i>	<i>34</i>
<i>3.6.3 Espectroscopia de Fotoluminescência.....</i>	<i>34</i>
<i>3.6.4 Espectroscopia no Infravermelho</i>	<i>34</i>
<i>3.6.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	<i>35</i>
<i>3.6.6 Microscopia de Força Atômica (AFM)</i>	<i>35</i>
3.7 Avaliação da propriedade de hemaglutinação do sistema ZnCdTe-ConBr	35

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	37
4.1 Purificação de ConBr por afinidade a Sephadex-G-50[®] e SDS-PAGE.....	37
4.2 Funcionalização de ZnCdTe e Bioconjugação com ConBr	38
4.3 Avaliação qualitativa da estabilidade coloidal do sistema ZnCdTe-ConBr.	39
4.4 Caracterização de ZnCdTe-ConBr	40
4.4.1 Espalhamento de Luz Dinâmico	40
4.4.2 Espectroscopia de Absorção Ultravioleta/Visível e Fotoluminescência.....	43
4.4.3 Espectroscopia no Infravermelho	46
4.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	47
4.4.5 Microscopia de Força Atômica (AFM)	49
4.5 Propriedade de hemaglutinação de ZnCdTe-ConBr	51
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	53
5.1 Conclusões	53
5.2 Perspectivas	53
REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

Recentemente, pesquisadores da área da saúde têm reunido esforços voltados para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas biotecnológicas com um interesse especial em estratégias de diagnósticos. O aumento da expectativa de vida tem levado a extensas pesquisas em diagnóstico de fase inicial para a identificação de distúrbios fisiológicos, e agora, o tratamento de doenças exige um acompanhamento contínuo em adição à previsão de eficácia do tratamento aplicado. Além disso, para compreender o surgimento de uma doença, a progressão da mesma e o comportamento frente a qualquer fármaco é necessário entender a interação espaço-temporal das moléculas biológicas em vários processos celulares (PATRA *et al.*, 2007). Diante disto, a técnica de conjugação de moléculas/partículas revela-se promissora para esta finalidade, já que possibilita a união de duas propriedades inerentes à estas, tornando o procedimento de diagnóstico mais específico e efetivo.

Os pontos quânticos (PQs) ou *quantum dots* são compostos inorgânicos semicondutores tridimensionais, que possuem dimensões na escala nanométrica e apresentam propriedades ópticas únicas.

Quando comparados aos fluoróforos convencionais, os PQs, que emitem fluorescência ao serem excitados, possuem uma série de características vantajosas, podendo ser empregados na geração de imagens e detecção de sinais em amostras teciduais. Porém, para aplicações biológicas, é necessário funcionalizar e compatibilizar estes materiais inorgânicos através da inserção de grupamentos químicos. Através desta compatibilização é possível promover uma bioconjugação, ou seja, promover o acoplamento da nanopartícula (material inorgânico) ao material biológico (proteínas, DNA, carboidratos, dentre outras moléculas).

As lectinas, proteínas que se ligam de forma reversível a carboidratos específicos, mostram-se então promissoras para serem utilizadas como material biológico de acoplamento aos PQs, já que estas são capazes de reconhecer e interagir com as glicoproteínas presentes nas superfícies das células de diversos organismos facilitando o seu endereçamento específico e auxiliando na compreensão dos mecanismos celulares e moleculares que podem desencadear uma doença.

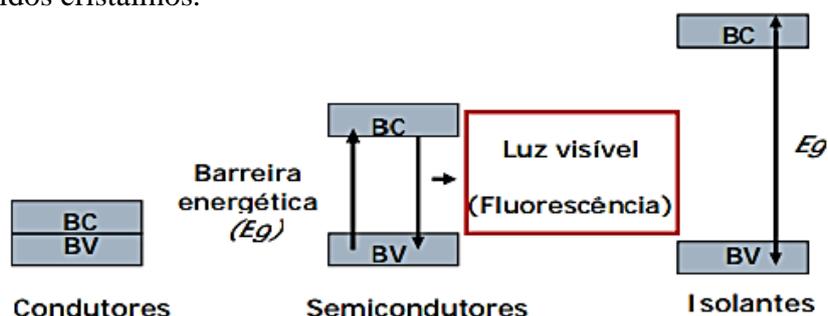
1.1 Materiais Semicondutores

Os materiais cristalinos apresentam estados eletrônicos representados por bandas energéticas, que são efetivamente preenchidas com elétrons (e^-) e originadas de sua natureza ondulatória nos cristais. A separação dos estados energéticos em bandas permitidas e não-permitidas decorre do efeito do potencial periódico sobre a distribuição energética dos elétrons livres.

Ao passarem da banda de valência (BV) para a banda de condução (BC), os elétrons (e^-) deixam na BV estados denominados de buracos que se comportam como portadores de carga elétrica positiva. Sob a ação de um campo externo, os e^- na BC e os buracos na BV produzem corrente elétrica. A diferença de energia que separa as duas bandas é chamada de barreira ou separação energética (E_g) (Figura 1). Existem diversas bandas cheias com e^- , cujo preenchimento da última banda é completo ou parcial em um cristal a $T=0$ K (estado fundamental). O fato da última banda estar cheia ou não reflete diretamente nas propriedades de condução do cristal.

Os materiais podem ser divididos em: isolantes, condutores e semicondutores. Nos materiais isolantes a última banda encontra-se completamente cheia e a E_g é grande (> 4 eV). Os condutores possuem a última banda parcialmente preenchida. Portanto, nestes materiais existe a possibilidade de mudar os estados dos e^- com um campo elétrico, resultando em uma corrente elétrica. Porém, quando os sólidos cristalinos a $T=0$ K têm E_g relativamente pequeno, aproximadamente 3 eV ou inferior, quando à temperatura ambiente, apresentam condutividade significativa, sendo por isso denominados de semicondutores. Nestes, o número de e^- na BC quando comparado a um isolante pode ser significativo, contudo é ainda muito inferior ao número de e^- livres em um metal (REZENDE, 2004).

Figura 1. Representação esquemática das bandas de energia para sólidos cristalinos.



Fonte: CARVALHO, 2010.

Materiais semicondutores são bastante estudados principalmente pelas suas propriedades elétricas e ópticas. Estes podem apresentar-se como: compostos binários, que apresentam dois elementos pertencente às famílias da tabela periódica, IV-IV (ex.: SiC), III-V (ex.: AlP, AlAs, AlSb, GaN, GaP, GaAs, GaSb, InP, InAs, InSb), II-VI (ex.: ZnO, ZnS, ZnSe, ZnTe, Cds, CdSe, CdTe, HgS), IV-VI (ex.: PbS, PbSe, PbTe); compostos terciários e compostos quaternários (ORTON, 2004). Dentre estes, os compostos binários do tipo II-VI são semicondutores constituídos pelos elementos da família IIB (metais de transição) e VIA (calcogênios) da tabela periódica, conforme Figura 2.

Figura 2. Elementos da família VIA (calcogênios) e IIB (metais de transição) da tabela periódica constituintes dos pontos quânticos II-VI.

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	
							H	He	Li		
		Be	B	C	N	O	F	Ne	Na		
		Mg	Al	Si	P	S	Cl	Ar	K		
Metais de transição		Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr	Rb	Ca
		Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe	Cs	Ba
		Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn	Fr	Ra
		Metais tipo B			Ametais		Metais tipo A				

Fonte: ROMANO, 2003.

Dentre os exemplos de semicondutores do tipo II-VI apresentados na Tabela 1 abaixo, destaca-se o CdTe que emite luz em toda faixa do visível, desde o azul, passando pelo verde e vermelho, até o infravermelho. Esta propriedade leva ao interesse em trabalhar com o CdTe em dimensões nanométricas, como nanopartículas fluorescentes para serem aplicadas em sistemas biológicos.

Tabela 1. Exemplos de materiais semicondutores do tipo II-VI com sua faixa de emissão.

Semicondutores II-VI	Coloração da emissão
ZnO, ZnS	Azul, UV
CdS	Azul, Verde
CdSe	Azul, Verde - Vermelho
CdTe	Azul, Verde, Vermelho – Infravermelho

Fonte: Elaborada pelo autor.

1.2 Pontos Quânticos

Pontos quânticos semicondutores (PQs) são compostos inorgânicos, constituídos por elementos pertencentes às famílias II–VI ou III–V da tabela periódica, que apresentam confinamento quântico em três dimensões e propriedades ópticas únicas (ZRAZHEVSKIY *et al.*, 2013; ZRAZHEVSKIY *et al.*, 2010; CHAN *et al.*, 2002). A origem dessas propriedades surge exatamente deste confinamento dos estados de portadores de carga por redução no tamanho físico das nanopartículas. Em essência, quando o tamanho das partículas é reduzido abaixo do raio de Bohr do éxciton do material *bulk* (material macroscópico que não apresenta propriedades de confinamento quântico) os níveis de energia de propriedades atômicas se tornam discretas comparadas com os níveis de energia observados em materiais *bulk* (CHAN *et al.*, 2002; JAMIESON *et al.*, 2007). As propriedades de tais nanopartículas podem ser descritas por uma partícula clássica em uma teoria quântica onde os estados de matéria tornam-se quantizados.

Os PQs podem ser obtidos através de duas abordagens: *bottom up*, por meio de técnicas de crescimento controlado em meio coloidal; ou *top down* pela redução das dimensões (ablação) de um material pré-existente. As propriedades ópticas desses sistemas são alteradas através da manipulação da composição química, tamanho e estrutura (SANTOS, FARIAS e FONTES, 2008).

1.3 Pontos Quânticos vs Fluoróforos Orgânicos Convencionais

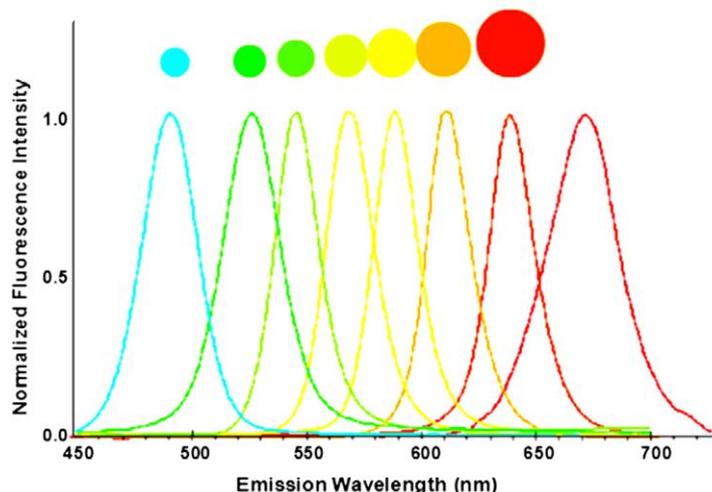
A promissora classe de marcadores, os PQs, apresentam uma série de vantagens diante dos fluoróforos orgânicos convencionais já usados em métodos de marcação celular e diagnóstico. Dentre as vantagens podemos ressaltar: a emissão em vários comprimentos de onda para um mesmo material, elevada fotoestabilidade, elevado desvio de *Stokes* possibilitando o não uso de filtros para eliminar interferências da radiação de excitação, marcação múltipla simultânea de diversos componentes e estruturas celulares em células vivas ou fixadas, e os resultados podem ser obtidos em alguns minutos (BRUCHEZ *et al.*, 1998).

Corantes convencionais e fluoróforos apresentam geralmente um máximo de absorção e emissão a um comprimento de onda fixo. O controle sobre a mudança na absorção e emissão requerem desenho de novos compostos orgânicos e protocolos de síntese complicados (HAUGLAND, 2005). Moléculas de fluoróforo convencionais também possuem espectros de absorção estreito e, conseqüentemente, exigem excitação por luz de comprimento

de onda específico sendo diferente para cada molécula orgânica (CHAN *et al.*, 2002; JAMIESON *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2006).

A estrutura eletrônica de PQs pode ser variada facilmente através do controle do tamanho dos PQs e isto permite o ajuste da absorção e comprimento de onda de emissão (DOHNALOVA *et al.*, 2013). PQs podem ser excitados em qualquer comprimento de onda abaixo da sua absorbância e a característica de emissão se obtém variando apenas o tamanho dos pontos quânticos. Exemplo: PQs de CdSe (Figura 3).

Figura 3. Fotoemissão normalizada de pontos quânticos de CdSe sob único comprimento de onda de excitação conseguida variando seletivamente o tamanho dos mesmos.



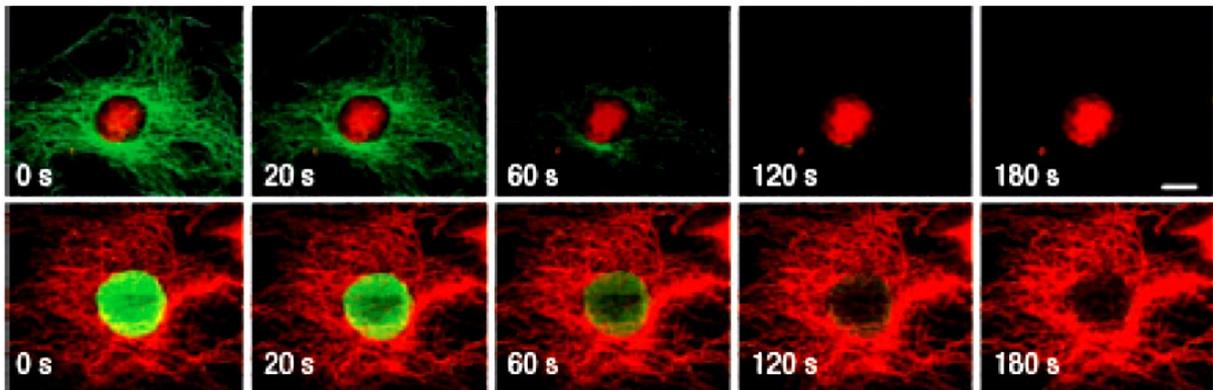
Fonte: KARAKOTI, 2015.

Comparados aos fluoróforos orgânicos convencionais, que perdem a fluorescência e sofrem degradação química após poucos minutos de exposição à luz ambiente ou à radiação, os PQs podem passar por repetidos ciclos de excitação e de emissão durante várias horas. Wu e colaboradores (2002) realizaram estudos da intensidade de fluorescência de PQs de CdSe, quando bioconjugados e utilizados em aplicações de marcação, e verificaram que a sensibilidade de detecção era determinada pela intensidade de emissão dos PQs em contato com o meio biológico e não isolados. Para realizar a comparação da intensidade de fluorescência foi realizado, simultaneamente, o monitoramento das mudanças na intensidade de fluorescência de PQs bioconjugados com estreptavidina e do corante orgânico Alexa Fluor 488 durante 3 minutos (WU *et al.*, 2002). A intensidade dos PQs bioconjugados com estreptavidina (PQ 535, PQ 560, e PQ 630) embora diferentes, foram duas a quatro vezes maiores do que a do Alexa

488. O corante orgânico Alexa 488 foi utilizado no experimento por ser mais fotoestável em comparação aos demais corantes (PANCHUK-VOLOSHINA *et al.*, 1999). Ainda de acordo com os estudos de Wu (2002) verificou-se, também, a fotoestabilidade do PQ 630 bioconjugado com estreptavidina em comparação ao Alexa 488 (Figura 4), confirmando que a intensidade do PQ 630-estreptavidina foi mais estável contra a fotodegradação do que Alexa 488, que não foi mais observada após 120 minutos de excitação.

Fonte: WU *et al.*, 2002.

Figura 4. Comparação da fotoestabilidade entre PQ 630-estreptavidina e Alexa 488 e a em vermelho o PQs 630- estreptavidina. A marcação em verde representa Alexa 488 e a em vermelho o PQs 630- estreptavidina. A iluminação foi mantida contínua por 3 min a partir de uma lâmpada de mercúrio (100 W). Utilizou-se um filtro de excitação de 485 ± 20 nm para ambos, de emissão 535 ± 10 nm e 635 ± 10 nm, para monitorar os sinais do Alexa 488 e PQ 630, respectivamente.



1.4 Pontos Quânticos: CdTe vs ZnCdTe

Os sistemas ideais para uso em aplicações biológicas devem cumprir os seguintes requisitos básicos, que incluem: a compatibilidade com meios aquosos, podendo ser obtidos por síntese aquosa direta, apresentarem biocompatibilidade com tecidos e células e alto rendimento quântico. Entre os nanocristais semicondutores que podem ser sintetizados com êxito num meio aquoso, os de CdTe são os mais amplamente estudados, pois oferecem um controle satisfatório de distribuições de tamanho, com um rendimento quântico relativamente elevado e emissões que cobrem quase toda a gama visível (LESNYAK, GAPONIK; EYCHMULLER, 2013). Entretanto, a utilização destes em aplicações biológicas é restrita, já que apresentam uma alta liberação de íons cádmio, que podem ser citotóxicos para células vivas, embora esta limitação possa, potencialmente, ser aliviada pelo uso de nanocristais semicondutores conjugados (DU *et al.*, 2012).

Os ajustes de composição de nanocristais semicondutores surgiram como uma possível solução para o uso destes materiais em estudos biológicos devido à possibilidade de substituir parcialmente os íons de cádmio, que são tóxicos, por zinco, bem como melhorar o rendimento de fotoluminescência quântica e controlar as emissões ao longo da faixa do visível (REGULACIO; HAN, 2010).

Rendimentos quânticos mais elevadas podem ser conseguidos por uma escolha adequada de elementos, visto que as diferenças na natureza das ligações químicas podem inibir a formação de defeitos. Por exemplo, a inclusão de ZnSe na rede CdSe aumenta a covalência e inibe a deformação (ZHU, LANG; JIANG, 2008). Teng e colaboradores relataram a primeira síntese aquosa do sistema $Zn_xCd_{1-x}Te$ e observaram que o pico de fluorescência mostrou um deslocamento para o azul quando a proporção de Zn^{2+} foi aumentada, o que foi atribuído ao efeito de ajuste de abertura da faixa mais ampla do semicondutor ZnTe (WANG *et al.*, 2007). Além disso, os rendimentos quânticos elevados foram alcançados também pela síntese aquosa com capeamento de glutathione (GSH) $Zn_{x-1}Cd_xTe$ (DU *et al.*, 2012).

1.5 Lectinas

As lectinas são definidas como um grupo heterogêneo de proteínas ou glicoproteínas, com propriedades bioquímicas e atividades biológicas diferentes, que possuem pelo menos um domínio não catalítico que se liga reversivelmente a um monossacarídeo ou oligossacarídeo específico (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Essa definição baseia-se na interação/ligação entre a lectina e o carboidrato ligante, não se detendo a características como a capacidade de hemaglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Este grupo de proteínas apresenta uma ampla distribuição, sendo essas proteínas encontradas em todas as classes de organismos: micro-organismos, plantas, fungos, insetos e animais e até mesmo em vírus.

As lectinas foram estudadas extensivamente nos últimos anos com base na sua utilidade geral como ferramentas moleculares em estudos envolvendo: 1) a composição da superfície celular, crescimento e diferenciação; 2) mecanismos patológicos; e 3) o isolamento e caracterização dos glicoconjugados (SHARON; LIS, 2004; SHARON, 2007).

Atualmente, essas moléculas representam uma importante classe de ferramentas biotecnológicas, sendo aplicadas em diversos estudos glicobiológicos baseando-se na sua capacidade de decifrar glicocódigo. Estas proteínas/glicoproteínas, que têm pelo menos um domínio não catalítico de reconhecimento e ligação reversível a carboidratos específicos (VAN DAMME, 1998), participam de uma variedade de processos celulares, sem alterar os

carboidratos envolvidos (GABIUS; GABIUS, 1997). As lectinas podem ser utilizadas em uma variedade de estudos biomédicos, incluindo o câncer, pesquisas imunológicas, isolamento e caracterização dos glicoconjugados e tipagem sanguínea. Em glicoproteômica, os estudos são facilitados pelo grande número de lectinas naturais que reconhecem e se ligam a carboidratos específicos.

1.5.1 Especificidade e reversibilidade de interação

As lectinas são, em sua maioria, di ou polivalentes e são capazes de formar interações entre carboidratos ou glicoproteínas que se apresentam em solução ou estão ligadas à membrana celular (FLEMMING *et al.*, 1992). Devido a esta habilidade, a presença de lectinas numa amostra pode ser facilmente detectada a partir de ensaios de aglutinação, nos quais estas interagem com células, através de seus sítios de ligação, formando diversas ligações reversíveis entre células. O ensaio de hemaglutinação é utilizado por promover a fácil visualização desta propriedade aglutinante de eritrócitos pelas lectinas. Os eritrócitos podem ser de humanos ou de outros animais, e tratados enzimaticamente (JUNG *et al.*, 2007; LEITE *et al.*, 2005) ou não (MO *et al.*, 2000; WITITSUWANNAKUL *et al.*, 1998).

Landsteiner e Raubitschek (1908) observaram que vários extratos de sementes apresentavam diferentes atividades hemaglutinantes com eritrócitos de diferentes fontes animais e que aglutininas vegetais eram específicas para determinados tipos sanguíneos. Boyd e Reguera (1949), estudando a aglutinina de *Phaseolus limenses*, descobriram sua especificidade para eritrócitos do tipo A, determinando que algumas aglutininas têm especificidade para determinado grupo do sistema ABO. Portanto, lectinas podem apresentar especificidade para eritrócitos de diferentes origens e tipos, como a lectina de *Zizyphus mauritiana* (GUPTA; SRIVASTAVA, 1998) que só aglutina eritrócitos humanos, as lectinas de *Charybdis japonica* (UMETSU, 1991) e do cogumelo *Marasmius oreades* (WINTER *et al.*, 2002) específicas para eritrócitos humanos tipo B, e a lectina de *Tachypleus tridentatus* (NAGAI, 1999) específica para eritrócitos humanos tipo A. Uma lectina de *Gracilaria ornata* (GOL) aglutina eritrócitos animais (de coelho e de galinha), mas não de humanos (LEITE *et al.*, 2005). Outras lectinas, no entanto, são caracterizadas como não específicas para grupos sanguíneos (LIU *et al.*, 2008; BANERJEE *et al.*, 2004).

A detecção de lectinas através do ensaio de hemaglutinação é confirmada e tem sua especificidade por carboidratos confirmada pelo fenômeno de inibição desta hemaglutinação na presença de um (ou mais) carboidrato (s) em concentração determinada na solução de ensaio.

De acordo com Sharon e Lis (1990), algumas lectinas apresentam interações mais fortes com oligossacarídeos em comparação com monossacarídeos, outras são quase exclusivas para oligossacarídeos. A determinação da especificidade de uma lectina é dada pelo carboidrato que, em menor concentração, possui maior habilidade para inibir sua atividade de hemaglutinação. Algumas lectinas não apresentam um monossacarídeo inibidor osmótico sendo inibidas por oligossacarídeos (WÄLTI *et al.*, 2008), glicoproteínas e/ou polissacarídeos (THAKUR *et al.*, 2007).

1.5.2 Potenciais biotecnológicos

Segundo estudos recentes as lectinas vegetais têm várias aplicações no interior do organismo, tais como a defesa (VANDENBORRE, 2011), ou fora do organismo de origem, tais como a entrega de drogas (BIES *et al.*, 2004), bem como uma variedade de aplicações de diagnóstico para um amplo espectro de patologias ou anomalias (GEMEINER *et al.*, 2009).

As lectinas foram estudadas extensivamente nos últimos anos com base na sua utilidade geral como ferramentas moleculares em estudos envolvendo: 1) a composição da superfície celular, crescimento e diferenciação; 2) mecanismos patológicos; e 3) o isolamento e caracterização dos glicoconjugados (SHARON; LIS, 2004; SHARON, 2007).

Atualmente, essas moléculas representam uma importante classe de ferramentas biotecnológicas, sendo aplicadas em diversos estudos baseando-se na sua capacidade de decifrar glicocódigos. Estas proteínas, participam de uma variedade de processos celulares, sem alterar os carboidratos envolvidos (GABIUS; GABIUS, 1997). Quando imobilizadas em matrizes inertes, as lectinas são utilizadas em cromatografias de afinidades, auxiliando na separação e purificação de glicoproteínas para testes analíticos (REGNIER *et al.*, 2007).

Trabalhos recentes demonstram que as lectinas já são empregadas em sensores através da sua bioconjugação com nanopartículas. Gao e colaboradores (2008), desenvolveram em seu trabalho uma plataforma de imagem baseada em um conjugado de PQs pela incorporação dos mesmos em núcleos de polietilenoglicol-nanopartículas de poliácido lático (PQs-NP). Este conjugado após ser funcionalizado com a lectina de gérmen de trigo (WGA) foi endereçado ao cérebro de ratos por via nasal. As nanopartículas resultantes apresentaram elevada capacidade de carga útil, alta estabilidade e solubilidade em água, seguras para o endereçamento cerebral e, ainda, excelente propriedade de imagem.

Wang e colaboradores (2010), desenvolveram um biossensor a partir do bioconjugado de PQs CdTe com a lectina de *Canavalia ensiformes* (ConA), PQs-ConA, para a detecção de glicose. Em condições propícias, a detecção da glicose era feita pela diminuição da intensidade de “fluorescência” ao passo que se aumentava linearmente a concentração da mesma. O limite de detecção deste biossensor foi de 0,01 mM de glicose.

Gao e colaboradores (2015), desenvolveram uma nova técnica de rastreamento através do encapsulamento de PQs em núcleos de conjugados de lectina de gérmen de trigo-nanopartículas (WGA-NP) para monitorar o transporte celular de nanocarreadores funcionalizados. As nanopartículas oriundas não apresentaram alterações no tamanho de partícula, potencial zeta ou da atividade de ligação, e, além disso, o biossensor apresentou excelente fotoestabilidade e capacidade de rastreamento. A partir das análises das imagens obtidas no trabalho os autores verificaram que a absorção celular começa com a ligação da WGA ao seu receptor específico na superfície da célula, o que torna estes bioconjugados de lectinas extremamente importante na compreensão dos mecanismos celulares.

Estes trabalhos confirmam os inúmeros benefícios que a associação entre os PQs e as moléculas biológicas, em especial as lectinas (que são capazes de serem seletivas/específicas nas interações com carboidratos e glicoproteínas) podem trazer para a elaboração de métodos de diagnósticos mais precisos e rápidos, além disso, essa interação poderá revolucionar a forma de entender os mecanismos celulares e moleculares que desencadeiam várias doenças, possibilitando também, o endereçamento efetivo de drogas.

1.5.3 Lectinas vegetais

Lectinas são comumente detectadas em plantas, principalmente em sementes da família *Leguminosae* (SPILATRO *et al.*, 1996). Os vegetais têm constituído uma fonte rica de lectinas, servindo como principais materiais de análise, objetivando o isolamento dessas moléculas.

Em geral, a maior fonte de lectinas vegetais são as sementes, nas quais essas moléculas podem representar um percentual significativo da matéria seca (LIS; SHARON, 1981). Sementes quiescentes constituem a principal fonte de lectinas de leguminosas, podendo corresponder a 10 % das proteínas totais presentes nesse tecido (SHARON; LIS, 1990). No entanto, a localização e a maior quantidade de lectinas nas plantas não se restringe a um só tecido, nem a maior concentração está necessariamente nas sementes. Outros tecidos de muitos vegetais apresentam-se como principais fontes de lectinas. Em *Bauhinia monandra*, por

exemplo, as folhas constituem um dos principais tecidos que são fontes de purificação da lectina (COELHO; SILVA, 2000).

Muitas lectinas são frequentemente detectadas e purificadas de sementes (ALVES *et al.* 2015; PINTO-JUNIOR *et al.*, 2015; SINGHA *et al.*, 2007; SITOHY *et al.*, 2007; KONOZY *et al.*, 2003; FREIRE *et al.*, 2002; REGO *et al.*, 2002; MACHUKA *et al.*, 1999; CAVADA *et al.*, 1998; GUPTA; SRIVASTAVA, 1998; MOREIRA *et al.*, 1998), por esse ser um tecido geralmente rico na sua presença. No entanto, elas também são detectadas em outros tecidos ou órgãos vegetais, embora de forma menos frequente, como em cascas de árvores (WITITSUWANNAKUL *et al.*, 1998), no cerne (SÁ *et al.*, 2008a), em folhas (RAMESHWARAM; NADIMPALLI, 2008; COELHO; SILVA, 2000), em frutos (WANG; NG, 2006; BENITO *et al.*, 1998; PEUMANS *et al.*, 1998), em raízes (NAEEM *et al.*, 2001), em tubérculos (KAUR *et al.*, 2006), em bulbos (BERTRAND *et al.*, 1998; PARISI *et al.*, 2008), em rizomas (CHU; NG, 2006; KAUR *et al.*, 2005; CITORES *et al.*, 1997; PEUMANS *et al.*, 1997), em coleóptilos (MARTINEZ; CORDOBA, 2000), em cotilédones (OLIVEIRA *et al.*, 2002; GUPTA; SRIVASTAVA, 1998; NOMURA *et al.*, 1998), no látex de algumas espécies (SESHAGIRIRAO; PRASAD, 1995; STIRPE *et al.*, 1993) e outras partes dos vegetais.

1.5.4 A ConBr

A lectina ConBr é uma proteína tetramérica encontrada em sementes de *Canavalia brasiliensis*, popularmente conhecida no Brasil como feijão-de-boi, pertencente à família das leguminosas. A ConBr é composta de subunidades idênticas, cada uma com 25 kDa e possuindo um sítio de reconhecimento a carboidratos, com especificidade para resíduos de D-Glucose, D-Manose, e açúcares derivados. As propriedades biológicas da ConBr conferem a esta proteína um grande potencial biotecnológico (CAVADA *et al.*, 2001).

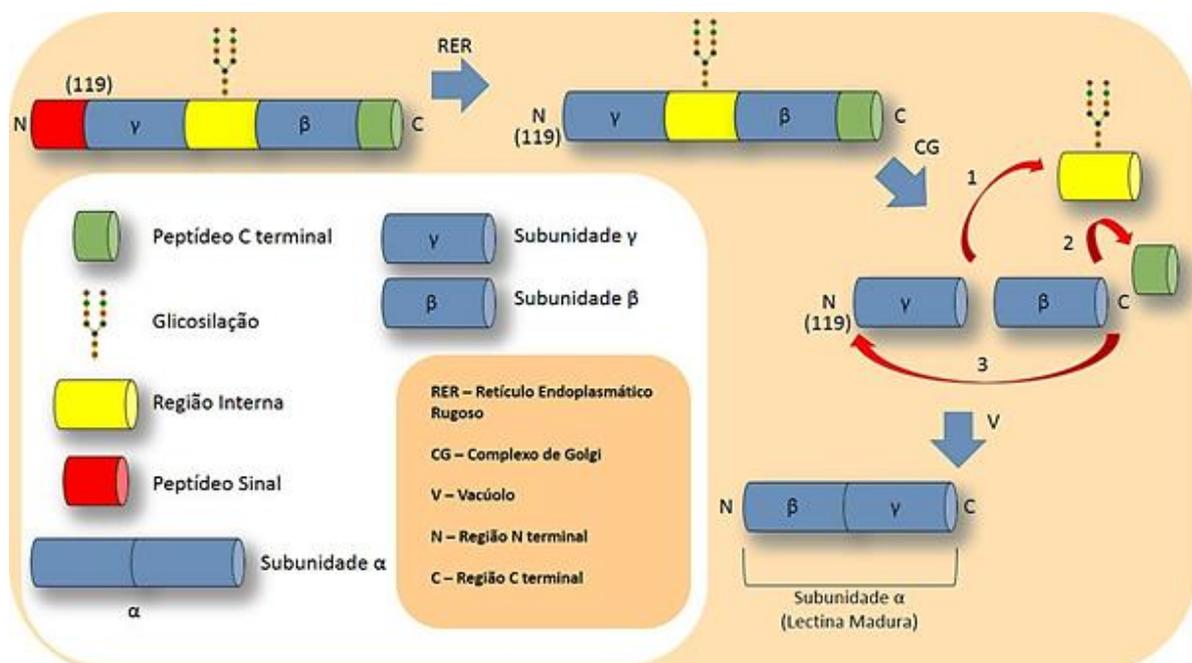
ConBr foi isolada e caracterizada em 1984, onde foi observado que ao longo da germinação no escuro, lectinas de sementes de *Canavalia brasiliensis* são preservadas até o final da exaustão das reservas proteicas cotiledonares e só então eram hidrolisadas para abastecer a plântula de aminoácidos (MOREIRA; CAVADA, 1984). Sua estrutura tridimensional foi resolvida por substituição molecular, onde apresentou 99% da sequência de aminoácidos idêntica a sequência de ConA e apresentou a mesma especificidade a glicose/manose (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997). Contudo, a ConBr quando comparada a ConA mostra efeito diferenciado em atividades biológicas, como indução de edema de pata de rato (BENTO *et al.*, 1992) e estimulação *in vitro* de linfócitos humanos (BARRAL-NETO, 1992).

Foi descrito que a lectina ConBr também pode induzir ativação de linfócitos e apoptose (BARBOSA *et al.*, 2001), bem como produção de NO (Óxido Nítrico) por macrófagos (ANDRADE *et al.*, 1999).

As atividades biológicas, no entanto, dependem de um complexo específico processamento pós-traducional da proteína, que resulta na lectina madura e funcional. Por ser um evento fundamental para a produção de uma proteína biologicamente ativa, os mecanismos de processamento pós-traducionais de proteínas devem ser compreendidos em detalhes (CARRINGTON *et al.*, 1985). Neste processo a lectina é produzida como pré-prolectina. No retículo endoplasmático ela perde o peptídeo sinal da extremidade N-terminal transformando-se na prolectina. No complexo de golgi a pro-lectina sofre uma quebra proteolítica perdendo um segmento glicosilado de quinze aminoácidos no centro de sua estrutura e um peptídeo agora na sua região C-terminal, liberando energia suficiente para que haja uma posterior religação. Com essa perda a cadeia inicial é dividida em duas, β e γ , que são em sua maioria religadas, mas em locais diferentes. A cadeia γ que antes estava na região N-terminal é religada à cadeia β havendo uma inversão entre as regiões N e C-terminal formando-se cadeia α (Figura 5).

Posteriormente, foi demonstrado que a reação é catalisada por uma asparaginil-endopeptidase (MIN; JONES, 1992). Esse evento já era conhecido em bactérias, mas nos eucariotos é exclusivo nas lectinas do tipo ConA. Acredita-se que a maioria das lectinas da subtribo Diocleinae apresente o mesmo processo.

Figura 5. Representação do processo de permutação circular em lectinas de leguminosas.



Fonte: SANTIAGO, 2013.

1.6 Bioconjugação

A técnica de bioconjugação envolve a interação entre duas ou mais moléculas formando um outro complexo que possui as propriedades de seus componentes combinados. Moléculas de origem biológica podem ser quimicamente ligadas a compostos inorgânicos, por diferentes métodos de reação (MEDINTZ *et al.*, 2005).

A bioconjugação pode ser utilizada não apenas visando a formação de complexos, mas podem exercer o papel de agentes modificadores da estrutura nativa e das funções de diversas moléculas biológicas como peptídeos, proteínas, açúcares, polissacarídeos, ácidos nucleicos, oligonucleotídeos, entre outros (MEDINTZ *et al.*, 2005; CHAN; NIE, 1998; HERMANSON, 2008).

A associação química entre duas ou mais moléculas dá-se por meio de um agente de ligação chamado comumente de crosslinker. O processo de bioconjugação depende da capacidade do crosslinker empregado em interagir com dois sistemas distintos, devendo apresentar afinidade química com os grupamentos presentes no sistema de origem inorgânica ou orgânica e os radicais da biomolécula (HERMANSON, 2008).

O importante é que durante o processo de bioconjugação, todas as etapas sejam cuidadosamente planejadas e desenvolvidas para que não ocorram desnaturações, modificações estruturais irreversíveis ou alterações químicas na biomolécula empregada. Outro fator de extrema importância é a escolha do crosslinker mais adequado para as condições reacionais e aplicação desejada, bem como a definição da estequiometria reacional ideal (CHAN; NIE, 1998; MAMEDOVA; KOTOV, 2001).

O número de grupos-alvo (aminas, carboxilatos, tióis) presentes na superfície da molécula biológica é essencial para que o processo ocorra de modo eficaz. Quando os grupos-alvo estão prontamente disponíveis para a conjugação, o processo reacional é otimizado. A quantidade de crosslinker empregado (estequiometria reacional) está diretamente relacionada ao número de grupamentos encontrados na superfície da biomolécula (HERMANSON, 2008; MAMEDOVA; KOTOV, 2001).

1.6.1 Crosslinkers

Os *Cosslinkers* ou agentes de ligação cruzada possuem pelos menos dois grupos reativos, os quais possibilitam a interação com uma grande diversidade de grupamentos

químicos presentes em biomoléculas ou nos mais variados compostos sintéticos (WALT; AGAYN, 1994). Estes reagentes promovem a formação de ligações covalentes entre duas ou mais moléculas. De uma forma geral, os agentes de ligação cruzada se ligam covalentemente a grupos como aminas primárias, carboxilatos e sulfidrilas (BRASIL-JÚNIOR, 2010).

A grande maioria das moléculas de origem biológica possui ao menos um destes grupos funcionais, o que acaba viabilizando a conjugação via crosslinkers. Esses reagentes são amplamente empregados no estudo da estrutura e função protéica, na ancoragem de proteínas em fase sólida, na preparação de imunógenos, imunotoxinas e na conjugação de biomoléculas a sistemas inorgânicos como pontos quânticos (MEDINTZ *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2008; MAMEDOVA; KOTOV, 2001).

Agentes de ligação cruzada podem ser divididos em dois grupos de acordo com a similaridade dos seus grupos reativos: Homobifuncionais, que possuem dois grupamentos terminais idênticos, ou Heterobifuncionais, que possuem dois grupamentos terminais distintos. O primeiro é utilizado em reações de conjugação que possuem apenas uma ou duas etapas, enquanto que o segundo é utilizado em reações de duas ou mais etapas.

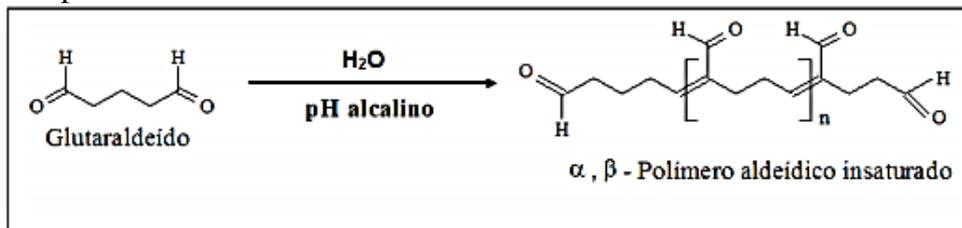
Atualmente, existem dezenas de crosslinkers disponíveis comercialmente, os quais possuem os mais variados comprimentos de cadeia carbônica e grupos reativos. Dentre eles podemos destacar: os ésteres da N-hidroxisuccinamida, os imidoésteres, os derivados do difluorobenzeno e os aldeídos (HERMANSON, 2008).

A grande maioria das reações é realizada em condições de pH fisiológico. Entretanto alguns crosslinkers só apresentam rendimento ideal em meio levemente ácido ou alcalino. Para tanto são empregados tampões específicos, visando a manutenção das condições ideais do processo reacional, bem como a integridade da biomolécula. O agente homobifuncional glutaraldeído é um bom exemplo (FARIAS *et al.*, 2005). Ele apresenta rendimento ideal apenas em meio levemente alcalino (pH 8,0-8,5).

1.6.1.1 Glutaraldeído

O glutaraldeído é o composto homobifuncional mais utilizado na atualidade (HERMANSON, 2008). Apesar da sua simplicidade estrutural, este composto apresenta uma série de possíveis mecanismos reacionais. Ele promove a formação de bases de Schiff em reações com proteínas ou outros compostos aminados. O glutaraldeído em soluções aquosas pode formar polímeros com pontos de insaturação. Os polímeros insaturados α e β são extremamente reativos na presença de agentes nucleófilos, especialmente aminas primárias (CHAVES, 2006; FARIAS *et al.*, 2005; HERMANSON, 2008; WALT; AGAYN, 1994), figura 6.

Figura 6. Esquema representativo de uma molécula de glutaraldeído e do seu polímero insaturado.



Fonte: BRASIL-JUNIOR, 2010.

A reação com uma proteína resulta em alquilação dos grupamentos aminados disponíveis, promovendo a formação de ligações amida. Este mecanismo reacional resulta em conjugados, proteína-glutaraldeído, de elevada estabilidade. Para minimizar a formação de polímeros de alto peso molecular, em geral são adotados protocolos de duas etapas (HERMANSON, 2008). Este aldeído tem sido amplamente utilizado como crosslinker homobifuncional em aplicações biomédicas, especialmente para conjugações de anticorpos-enzimas e proteínas-pontos quânticos (FARIAS *et al.*, 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

Bioconjugar a lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) com os pontos quânticos de ZnCdTe, caracterizar físico-quimicamente e avaliar as propriedades de fluorescência e hemaglutinação do sistema formado.

2.2. Específicos

- Funcionalizar os pontos quânticos de ZnCdTe e torná-los aptos à conjugação com a lectina;
- Estabelecer a melhor condição de bioconjugação;
- Bioconjugar a ConBr com os pontos quânticos de ZnCdTe;
- Caracterizar físico-quimicamente o sistema formado;
- Avaliar a propriedade de fluorescência dos pontos quânticos de ZnCdTe antes e após a conjugação;
- Avaliar a propriedade de hemaglutinação da ConBr antes e após a conjugação.

3 METODOLOGIA

3.1 Síntese de ZnCdTe

Os pontos quânticos de ZnCdTe foram sintetizados na Universidade Federal de Sergipe pelo Laboratório Química Biológica e Materiais (Quibiom), Departamento de Química segundo a metodologia de Andrade e colaboradores (2014). O tempo de síntese foi de 40 min em condições de pH 11,00 (ZnCdTe 40 pH 11).

3.2 Purificação da ConBr por cromatografia de afinidade à Sephadex-G-50[®]

A purificação da ConBr foi realizada através da adaptação da metodologia de (MOREIRA; CAVADA, 1984) como descrito a seguir.

Sementes de *Canavalia brasiliensis* foram descascadas e moídas em um moedor de grãos (Cadence) até obtenção de um fino pó. As proteínas solúveis foram extraídas a partir do contato da farinha (obtida através da moagem) com NaCl 0,15 M na proporção de 1:10 (p/v), sob agitação constante por 4 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, o extrato foi centrifugado a 10.000 x g, a 4 °C por 20 minutos, o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro (WhatmanTM) e aplicado em uma matriz (16 x 5,1 cm) de Sephadex-G-50[®], utilizada como matriz de afinidade, previamente equilibrada com NaCl 0,15 M. A fração não retida na matriz (PI) foi eluída com a mesma solução de equilíbrio a um fluxo de 3,0 mL/min. A fração retida (PII), contendo a lectina, foi eluída com 0,1 M de D-glicose e, posteriormente, dialisada contra água destilada e acetato de sódio 0,1 M pH 4,0 para a remoção da glicose e, conseqüentemente, o desbloqueio do sítio ativo da lectina. Ao longo do processo de purificação da lectina, frações de 1 mL foram coletadas e monitoradas a 280 nm por espectrofotometria. A fração PII pós-dialise foi liofilizada e a proteína isolada foi submetida a teste de hemaglutinação e utilizada nos ensaios de bioconjugação.

3.2.1 Análise da homogeneidade

A homogeneidade e a massa molecular aparente da ConBr foram monitoradas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE). O experimento foi realizado em um sistema descontínuo adaptando-se a metodologia descrita por (LAEMMLI, 1970). Utilizou-se 15% de poliacrilamida como concentração total do gel de separação e de 4%

de poliacrilamida como concentração total do gel de empilhamento. O gel de empilhamento foi preparado usando acrilamida/bisacrilamida 4 % em tampão Tris/HCl 0,5 mol/L, pH 6,8, SDS 1 %, persulfato de amônio (100mg/ml) e TEMED concentrado. O gel de separação da amostra (main gel) foi preparado em tampão Tris/HCl 1,5 mol/L, pH 8,8 contendo SDS 1 %, TEMED (concentrado) e persulfato de amônio (100mg/ml).

A ConBr liofilizada foi solubilizada a uma concentração de 1 mg/mL em tampão de amostra contendo Tris/HCl 0,0625 mol/L pH 6,8, 10 % de glicerol, 0,02 % de azul de bromofenol e 1 % de SDS).

O procedimento foi realizado em um aparelho Mini Protean II (BioRad, Milan, Itália) com uma corrente constante de 25 mA por 60 min. Ao final da eletroforese, para a visualização das bandas proteicas separadas utilizou-se o Azul de Coomassie R-250 como corante revelador. Usou-se um marcador comercial de referência contendo as seguintes proteínas: fosforilase b (97 kDa), BSA (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa). A revelação do gel (descoloração) foi realizada por uso de uma solução descorante contendo metanol, ácido acético e água destilada na proporção de 4:1:5 (v/v/v). A imagem foi obtida através do fotodocumentador Gel Doc™ EZ System, Bio-Rad.

3.3 Funcionalização de ZnCdTe

Para funcionalizar os pontos quânticos de ZnCdTe-GSH e então torná-los aptos para a reação de conjugação, realizou-se um tratamento com glutaraldeído, porém, para a correta funcionalização dos PQs de ZnCdTe, realizou-se antes um teste com diferentes concentrações de glutaraldeído (0,13%; 0,20%; 3 0,26%) e a aglomeração visual (AV) foi utilizada como base para a escolha da concentração favorável à conjugação. Após o teste, 600 μ L, de uma dispersão de ZnCdTe, foram transferidos para um flaconete de vidro com capacidade de 5 mL. Em seguida foram adicionados à esta dispersão 3 mL de água ultrapura (Milli-Q) para diluir a dispersão recém-sintetizada. Após isto, 150 μ L da solução de glutaraldeído na concentração adequada foi adicionada a fim de se obter um volume final de 3,750 mL. A dispersão foi deixada em repouso por aproximadamente 30 min. Por fim, submeteu-se a dispersão a uma diálise contra água ultrapura (Milli-Q) para remoção do excesso de glutaraldeído.

3.4 Bioconjugação de ZnCdTe com ConBr

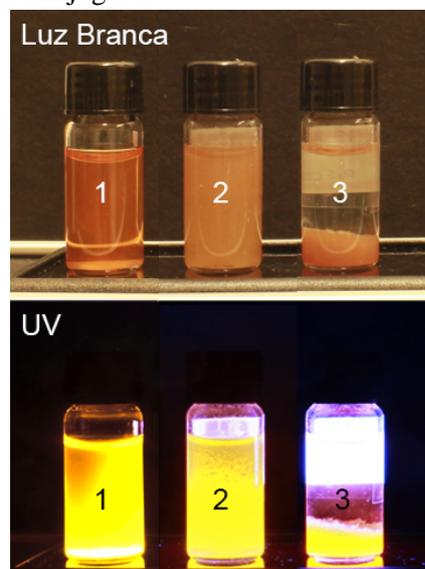
Um teste da concentração de ConBr também foi realizado. Nesta etapa, amostras de ConBr liofilizada foram pesadas de modo que as concentrações finais, ao se adicionar a dispersão pós-diálise, estivessem a 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL. Após este procedimento foram realizados novos testes cruzando as informações da concentração de glutaraldeído pela concentração de ConBr.

Após o teste, novamente amostras de ConBr liofilizadas foram pesadas e adicionadas em um flaconete. 3,750 mL da dispersão coloidal obtida após a diálise foi adicionada às amostras pesadas. A dispersão coloidal foi revolvida suavemente com o auxílio de uma pipeta (*up and down*) até que a proteína estivesse completamente solúvel.

3.5 Avaliação qualitativa da dispersão coloidal formada pelo sistema ZnCdTe-ConBr

A análise da melhor condição de conjugação do sistema ZnCdTe-ConBr foi realizada baseando-se na aglomeração visual (AV). A avaliação foi realizada através de visualização da dispersão coloidal após um tempo de 2 h/24 h/7 dias após a conjugação. Com base na sedimentação e formação de fase (Figura 7) foi possível inferir a aglomeração das partículas, e estas características foram levadas em consideração para a seleção da melhor condição de bioconjugação.

Figura 7. Em 1, exemplo de amostra bem dispersa. 2, Amostra turva com indícios de aglomeração. 3, amostra com sedimentação e formação de fase, indício claro de agregação das partículas conjugadas.



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.6 Caracterização físico-química do sistema ZnCdTe-ConBr

3.6.1 Espalhamento de Luz Dinâmico

As medidas de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) foram realizadas utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS, da Malvern (com laser de He-Ne de comprimento de onda de 633 nm), instalado no Laboratório de Materiais Funcionais Avançados (LaMFA) do Departamento de Física da UFC. Para as análises, 1 mL de cada amostra foi inserido em cubetas de poliestireno. Todas as medidas foram feitas em triplicata.

3.6.2 Espectroscopia de Absorção Ultravioleta/Visível

As medidas de Espectroscopia de Absorção Ultravioleta/Visível (UV/Vis) foram realizadas em Espectrofotômetro Specord 250, da Analytik Jena, instalado no LEVM do Departamento de Física da UFC. Para as medidas, as amostras foram diluídas em água deionizada (0,1:3 mL) e inseridas em cubeta de quartzo de 1 cm de espessura. Os espectros foram obtidos no intervalo de comprimentos de onda de 200 a 800 nm, com velocidade de 10 nm/s. A água deionizada foi utilizada como branco.

3.6.3 Espectroscopia de Fotoluminescência

As medidas de Espectroscopia de Fotoluminescência foram realizadas no Espectrômetro Nanolog, da Horiba Jobin Yvon, instalado no LEVM do Departamento de Física da UFC. Para as medidas, 3 mL de cada amostra foram inseridos em cubeta de quartzo e submetidos à radiação com comprimento de onda de 450 nm proveniente de lâmpada de xenônio de 450 W.

3.6.4 Espectroscopia no Infravermelho

As medidas de Espectroscopia no Infravermelho (FT-IR) foram realizadas utilizando o espectrômetro Vertex 70v, da Bruker, instalado no laboratório de Espectroscopia Vibracional e Molecular (LEVM) do Departamento de Física da UFC. Para a obtenção dos espectros, pequenas quantidades dos produtos resultantes da liofilização das amostras foram maceradas em almofariz de ágata e dispersas em brometo de potássio (KBr). Em seguida, as

dispersões foram pastilhadas com auxílio de prensa (10 toneladas, durante 10 minutos). Os espectros foram obtidos na região do infravermelho médio (4000 - 400 cm^{-1}), com resolução de 2 cm^{-1} e acumulação de 128 *scans*, sob vácuo.

3.6.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Gotas das amostras foram dispostas diretamente em *stubs* (suportes de alumínio) ou sobre fita de carbono e foram secas em estufa. Após a evaporação completa da fase líquida, o material foi observado em microscópio eletrônico de varredura (Quanta FEG450-FEI) no modo alto vácuo (aproximadamente 10^{-4} Pa na câmara durante toda a análise), com tensões variando entre 10-20 kV. As imagens foram obtidas com resolução de 1024x884 pixels, a distância de trabalho de 10 mm.

Para microanálise de raios-X (espectroscopia por energia dispersiva de elétrons) foi utilizado o mesmo microscópio acoplado a um detector (X-ray detector (model 150, Oxford). As imagens e gráficos foram obtidos e processadas com a ajuda do software Aztec (versão 3.0). Nesta técnica foram utilizadas apenas amostras dispostas diretamente em *stubs* de modo que o carbono detectado pertencia exclusivamente a amostra.

3.6.6 Microscopia de Força Atômica (AFM)

Os pontos quânticos puros e conjugados foram analisados através de microscopia de força atômica. As amostras primeiramente foram diluídas em água deionizada numa proporção 2:1, com o intuito de melhor dispersar as nanopartículas no substrato. Em seguida, um pouco da amostra diluída foi colocada num substrato de mica e aplicada em o *spin coater*. Posteriormente foram aquecidas por 3 minutos e em seguida realizadas as medidas. As imagens foram coletadas no modo *tapping* do AFM, onde foram obtidas as imagens de altura, fase e amplitude.

3.7 Avaliação da propriedade de hemaglutinação do sistema ZnCdTe-ConBr

O ensaio de hemaglutinação foi feito segundo MOREIRA e PERRONE (1977), com algumas adaptações. O ensaio de atividade hemaglutinante das amostras foi realizada através de diluições (50 μL) em duplicatas e seriadas (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, etc.) em placas de microtitulação, contendo 50 μL tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, com NaCl 0,15 M. A 50

μL de cada diluição foi adicionado igual volume de uma suspensão de eritrócitos de coelho a 3%, levemente agitados e incubados em estufa a 37°C por 30 minutos. A mistura foi deixada em repouso por mais 30 minutos à temperatura ambiente e a aglutinação foi observada macroscopicamente. A menor concentração proteica que apresentou hemaglutinação visível é considerada a concentração correspondente a uma unidade de hemaglutinação (UH), sendo o título expresso em unidades de hemaglutinação (U.H.).

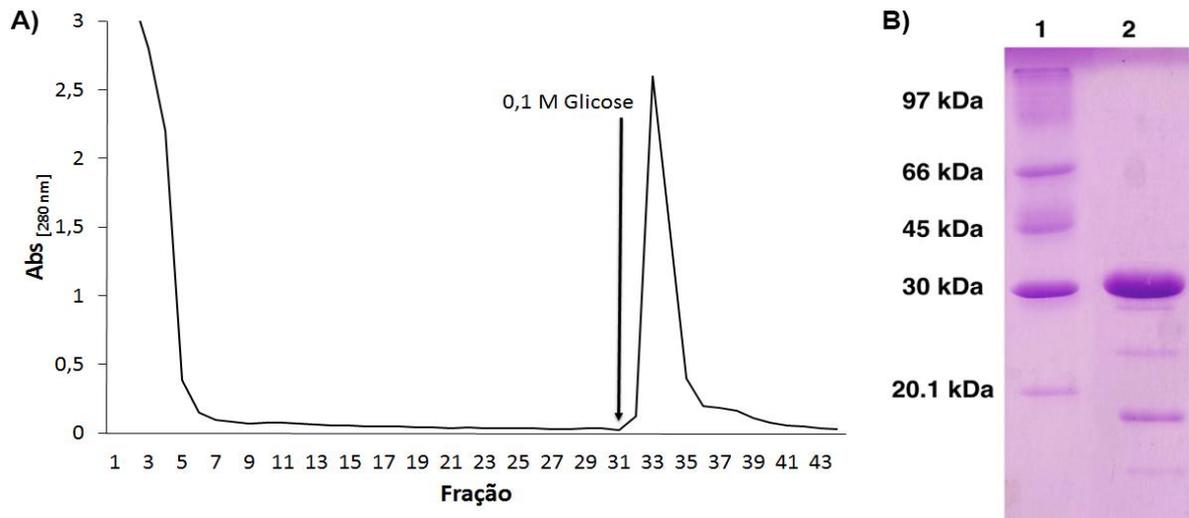
Realizou-se também um teste de inibição da atividade hemaglutinante com o açúcar D-manose na concentração de 100 mM para confirmar se a aglutinação dos eritrócitos é causada pelo domínio de reconhecimento a carboidratos da ConBr, presente no sistema ZnCdTe-ConBr.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Purificação de ConBr por afinidade a Sephadex-G-50[®] e SDS-PAGE

A ConBr foi purificada em um único passo em cromatografia de afinidade a Sephadex-G-50[®] (Figura 8.A). O perfil eletroforético obtido por SDS-PAGE da ConBr isolada (Figura 8.B), revelou uma banda principal de massa molecular aparente de aproximadamente 30 kDa, supostamente cadeia α . Foi possível observar também fragmentos com massa aparente de, aproximadamente, 20,1 e 14,4 kDa, que correspondem aos fragmentos beta e gama, respectivamente, característicos das lectinas do tipo ConA devido ao processamento pós-traducional de permutação circular (SHARON, LIS, 1990; SHARON, 2007).

Figura 8. Perfil Cromatográfico e SDS-PAGE de ConBr. **A)** Perfil da ConBr em cromatografia de afinidade. Volume de Extrato total = 150 mL. Sephadex G-50 (16 x 5,1 cm). Fluxo: 1,5 mL/min. O pico não retido (P1) foi eluído com NaCl 0,15 M e o pico retido (P2), eluído com uma solução de 0,1 M de Glicose. **B)** SDS-PAGE da ConBr. Raia 1 - Marcador comercial: Fosforilase b (97,0 kDa), Albumina sérica bovina (66,0 kDa) Ovalbumina (45,0 kDa) Anidrase carbônica (30,0 kDa), Inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -Lactalbumina (14 kDa); Raia 2 – ConBr isolada.

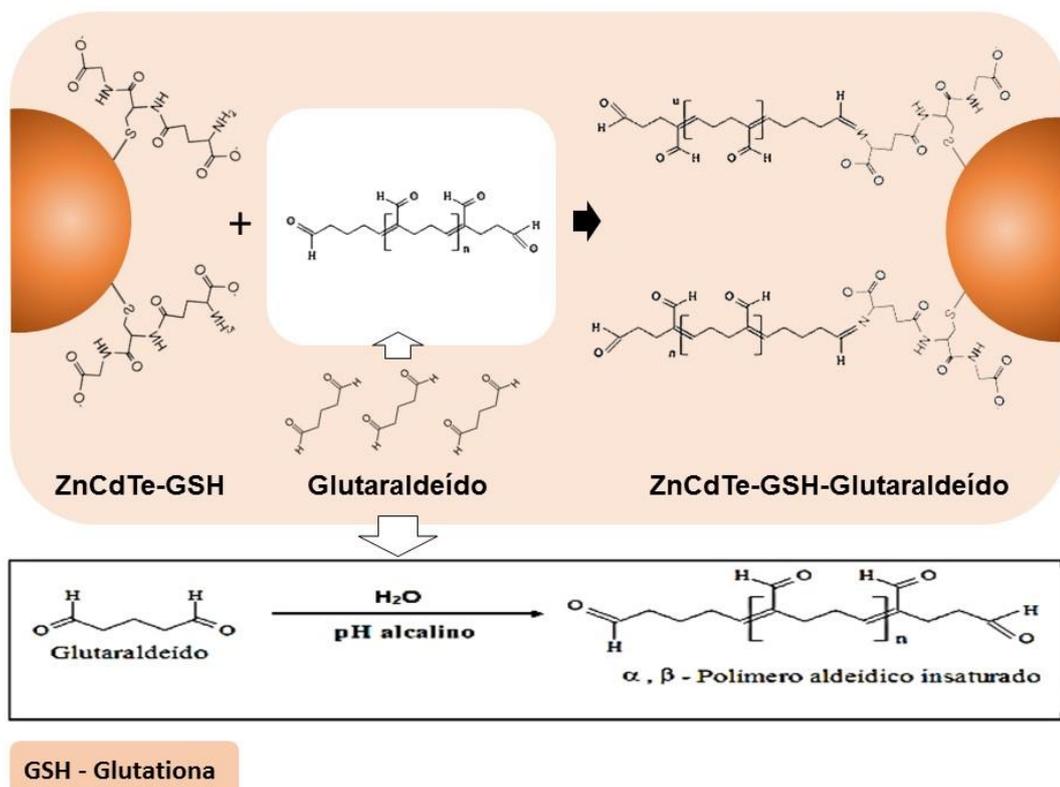


Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Funcionalização de ZnCdTe e Bioconjugação com ConBr

O tratamento com glutaraldeído promoveu a funcionalização dos radicais de glutationa na superfície dos PQs. Os grupamentos carboxílicos do polímero do glutaraldeído são altamente reativos e interagem de forma covalente com as amins primárias presentes na glutationa. Dessa forma ocorre a funcionalização do ZnCdTe tornando possível agora a ligação com a proteína (Figura 9).

Figura 9. Representação esquemática da funcionalização de ZnCdTe-GSH por glutaraldeído.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A tabela 2 mostra os resultados das concentrações testadas tanto de glutaraldeído quanto de ConBr. Levando-se em consideração a aglomeração, as amostras tratadas com 0,26% de glutaraldeído e conjugadas com 0,25, 0,5 e 1,0 mg/mL de ConBr foram as melhores, pois não apresentaram a formação de agregados e nem sedimentação com formação de fase. Porém, a amostra selecionada para o prosseguimento dos experimentos foi a ZnCdTe tratada com glutaraldeído 0,26% conjugado à ConBr a 1,0 mg/mL, por apresentar maior concentração de ConBr podendo atingir maiores títulos de hemaglutinação.

Tabela 2. Teste de glutaraldeído vs teste da ConBr. ZnCdTe 40 pH 11,0.

Concentração de ConBr	Concentração de Glutaraldeído		
	0,13%	0,20%	0,26%
0,25 mg/mL	FA7d	FA7d	NA
0,50 mg/mL	FA7d	FA7d	NA
1,0 mg/mL	FA2h	FA2h	NA*

Legenda:

FA2h – Formação de agregados em até 2 h após a conjugação, temperatura ambiente.

FA7d – Formação de agregados após 7 dias, quando acondicionados à 10 °C.

NA – Não formação de agregados por um período de até 60 dias, quando acondicionados a 10 °C.

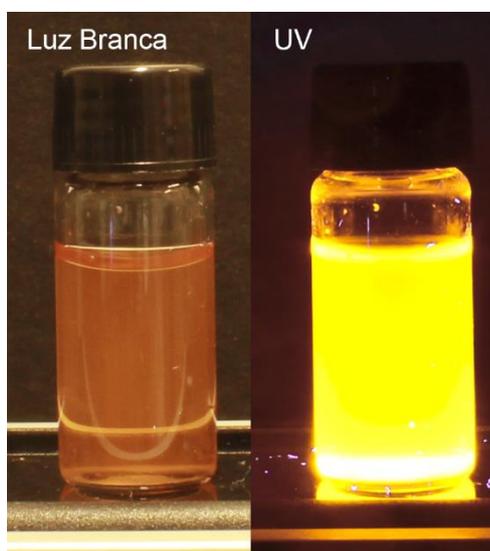
*Melhor condição de bioconjugação, por apresentar uma maior concentração de ConBr, 1 mg/mL, possivelmente mantendo o melhor título de hemaglutinação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3 Avaliação qualitativa da estabilidade coloidal do sistema ZnCdTe-ConBr.

Levando-se em consideração a aglomeração visual (AV), a condição mais estável para a realização dos procedimentos de caracterização e atividade hemaglutinante foi a de 0,26% de glutaraldeído e 1,0 mg/mL de ConBr, por manter-se estável, sem turbidez e apresentar maior concentração de ConBr podendo atingir maiores títulos de hemaglutinação (Figura 10).

Figura 10. Dispersão do sistema ZnCdTe-ConBr (Glut 0,26% e ConBr 1 mg/mL). Primeira imagem, Luz Branca. Segunda imagem, UV.



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4 Caracterização de ZnCdTe-ConBr

4.4.1 Espalhamento de Luz Dinâmico

O espalhamento de luz dinâmico (DLS), neste trabalho, foi utilizado para a medição do tamanho médio de partícula, antes da funcionalização, após a funcionalização e após a bioconjugação de ZnCdTe. Foi possível medir também por DLS, o potencial zeta das amostras, cujo o objetivo foi verificar a estabilidade das partículas antes e após os procedimentos experimentais realizados, os valores obtidos são mostrados na tabela 3.

Tabela 3. Potencial Zeta das amostras ZnCdTe 40 pH 11 puro, ZnCdTe 40 pH 11 Glut 0,26% e ZnCdTe-ConBr 1 mg/mL.

Amostra	Potencial Zeta (mV)
<i>ZnCdTe 40 pH 11 puro</i>	-36,5
<i>ZnCdTe 40 pH 11 Glut 0,26%</i>	-32,8
<i>ZnCdTe-ConBr 0,25 mg/mL</i>	-28,7
<i>ZnCdTe-ConBr 0,5 mg/mL</i>	-29,1
<i>ZnCdTe-ConBr 1,0 mg/mL</i>	-29,3

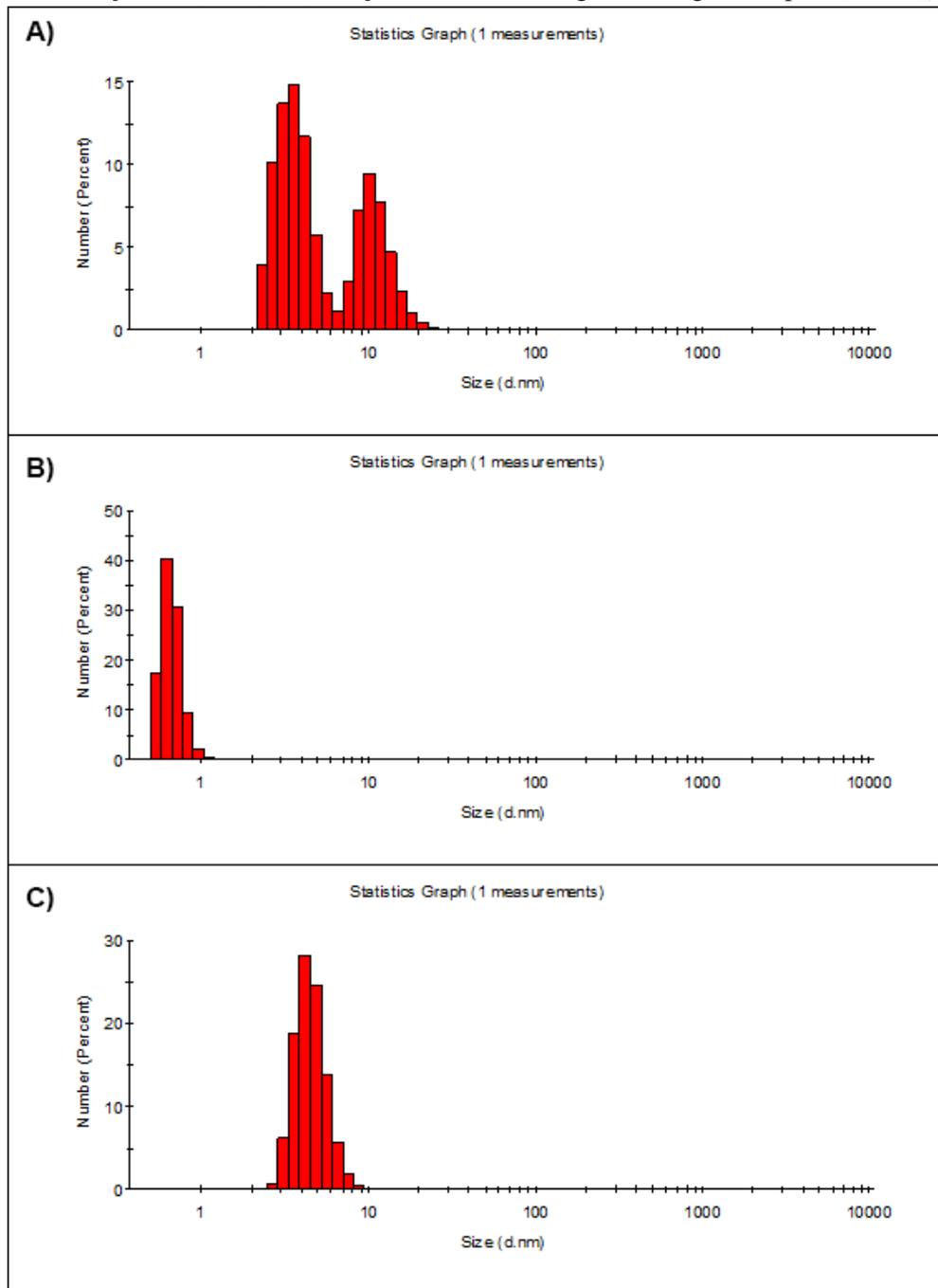
Fonte: Elaborada pelo autor.

O potencial zeta indica a carga superficial e pode ser utilizado para prever a estabilidade de suspensões ou emulsões coloidais. Para suspensões estáveis de coloides, admite-se um valor padrão de potencial zeta igual ou superior a +/- 30 mV (FERREIRA, OSVALDO, RÓZ, 2015). A medida zeta para ZnCdTe puro foi de -36,5 mV, para as suspensões de ZnCdTe tratadas com glutaraldeído 0,26% foi de -32,8 mV, e os bioconjugados de ZnCdTe com ConBr à 0,25, 0,5 e 1 mg/mL foram de -28,7, -29,1 e -29,3 mV, respectivamente. Percebeu-se então, após os experimentos de funcionalização e conjugação, um aumento do valor do potencial zeta, ou seja, indica uma dispersão mais estável. Valores abaixo do padrão de referência podem indicar instabilidade coloidal gerando a agregação.

PQs de ZnCdTe 40 pH 11 puros, recém-sintetizados, apresentaram dois tamanhos de partículas predominantes. 14,9% das partículas apresentou um diâmetro médio de 3,615 nm e a segunda população predominante, 9,5%, apresentou um diâmetro médio de 10,10 nm (Figura 11.A).

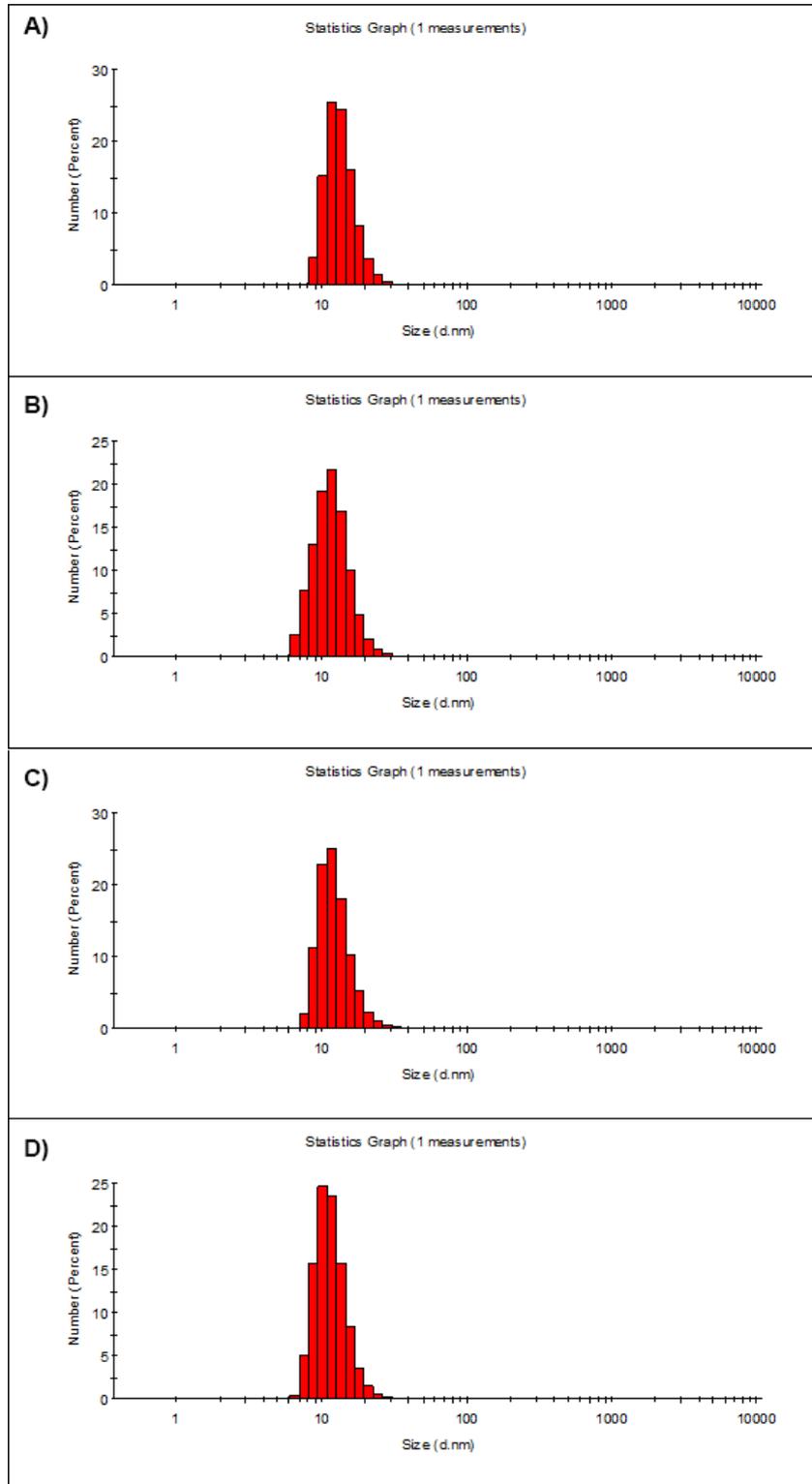
A ação de glutaraldeído na concentração de 0,26%, forma agregados que exibiram um diâmetro médio de partícula que variam de 0,5365 nm (menor) a 1,117 nm (maior), exibindo um diâmetro predominante de 0,6213 nm (40,2%), figura 11.B. A ConBr, a lectina usada na conjugação, em solução, apresenta, predominantemente, um diâmetro médio de 4,187 nm (Figura 11.C).

Figura 11. Histograma do número percentual de tamanho de partícula obtido por espalhamento de luz dinâmico (DLS). (A), ZnCdTe 40 pH 11; (B), glutaraldeído na concentração de 0,26%; (C), solução de ConBr a 1 mg/mL em água ultrapura (Milli-Q).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 12. Histograma do número percentual de tamanho de partícula obtido por espalhamento de luz dinâmico (DLS). (A), ZnCdTe 40 pH 11 tratados com Glut. 0,26%; (B), ZnCdTe-ConBr 0,25 mg/mL; (C), ZnCdTe-ConBr 0,5 mg/mL; (D) ZnCdTe-ConBr 1,0 mg/mL.



Fonte: Elaborada pelo autor.

PQs de ZnCdTe 40 pH 11 após serem funcionalizados com glutaraldeído 0,26% apresentaram uma alteração do tamanho de partícula. O gráfico da figura 12.A, mostra que as novas partículas formadas apresentaram um tamanho médio que variou de 8,721 a 32,67 nm, sendo predominante (25,5%) o tamanho de 11,70 nm. Apesar de apresentar um tamanho médio relativamente pequeno, 0,6213 nm, o glutaraldeído pode ter promovido, além da reação com a glutatona (funcionalização), uma agregação das partículas menores dos PQs modificando o tamanho da partícula, o que provocou o deslocamento observado nos tamanhos de partícula.

As diferentes concentrações de ConBr testadas (ZnCdTe-ConBr), 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL e 1,0 mg/mL (Figura 12.B, C e D, respectivamente) apresentaram resultados semelhantes na distribuição de tamanho de partícula, variando de 6,500 nm a 32,84 nm. Além disso, as concentrações testadas (ZnCdTe-ConBr) apresentaram valores de potencial zeta também muito semelhantes (amostras estáveis). Entretanto, na concentração de 1,0 mg/mL, foi possível observar uma maior homogeneidade, além de possuir também uma maior concentração de proteína, podendo promover maiores títulos de hemaglutinação. Com base nestas características, o conjugado ZnCdTe-ConBr 1,0 mg/mL foi eleito o mais apropriado para o prosseguimento dos testes seguintes.

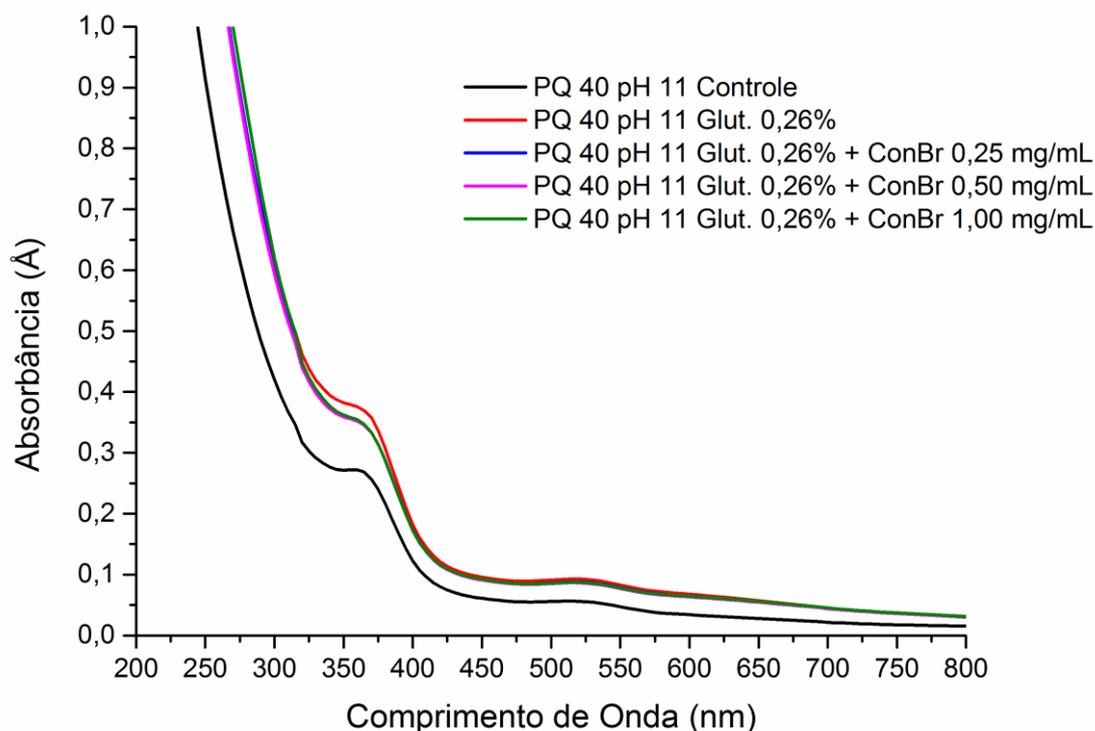
4.4.2 Espectroscopia de Absorção Ultravioleta/Visível e Fotoluminescência

O efeito da bioconjugação na absorção e emissão das amostras de ZnCdTe foram avaliados por espectrofotometria e fotoluminescência.

O espectro de absorção UV/visível de ZnCdTe antes da conjugação revelou bandas em 405 e 600 nm. Sendo a última banda mais larga e fraca, semelhante ao que foi descrito por Wang *et al*, 2012 para CdTe:Zn²⁺.

Os perfis de absorção das amostras de ZnCdTe mostraram-se diferentes, entretanto, a banda de absorção entre 500 e 550 nm permaneceu essencialmente inalterada após a funcionalização de ZnCdTe e a conjugação com as diferentes concentrações de ConBr (Figura 13). Foi observado um “ombro” entre 350 e 375 nm, na amostra de ZnCdTe pura (Controle) atribuiu-se a presença da glutatona presente no PQ, já os outros “ombros” observados (amostras ZnCdTe 40 pH 11 tratados com Glut. 0,26% (Vermelho), ZnCdTe-ConBr 0,25 mg/mL (Azul), ZnCdTe-ConBr 0,5 mg/mL (Fúcsia) e ZnCdTe-ConBr 1,0 mg/mL (Verde) podem estar relacionados ao processo de funcionalização, adição de glutaraldeído e bioconjugação, adição de ConBr, mostrando que ocorreu a bioconjugação.

Figura 13. Espectros de absorvância UV/Visível de ZnCdTe 40 pH 11 puro (Preto); ZnCdTe 40 pH 11 tratados com Glut. 0,26% (Vermelho); ZnCdTe-ConBr 0,25 mg/mL (Azul); ZnCdTe-ConBr 0,5 mg/mL (Fúcsia); ZnCdTe-ConBr 1,0 mg/mL (Verde). Os espectros foram obtidos no intervalo de comprimentos de onda de 200 a 800 nm.



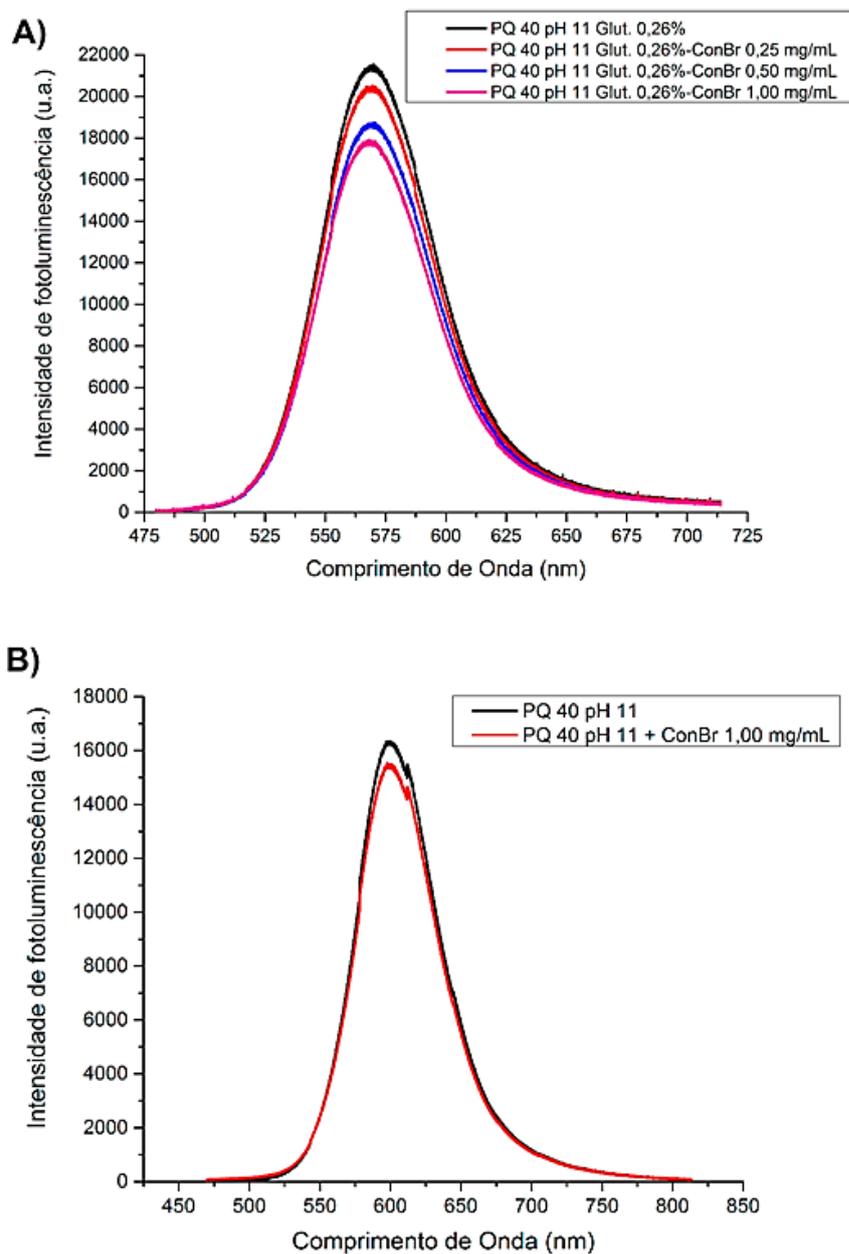
Fonte: Elaborada pelo autor.

O efeito intensidade de fotoluminescência de nanocristais semicondutores após a sua interação com as proteínas foi descrito previamente usando-se a BSA (Albumina sérica bovina) como proteína modelo. Zhang e colaboradores (2013) em seu trabalho descreveu um aumento na intensidade de fotoluminescência após a interação dos nanocristais com a proteína. Neste mesmo trabalho também descobriram que a estrutura da proteína influencia significativamente na intensidade da fotoluminescência após a bioconjugação.

Contudo, os dados obtidos neste estudo por espectroscopia de fotoluminescência revelaram uma diminuição na intensidade de fotoluminescência de ZnCdTe proporcional ao aumento da concentração da ConBr (Figura 14.A). Resultado semelhante foi descrito por Andrade e colaboradores (2014), após a conjugação de ConA com pontos quânticos de ZnCdTe houve uma diminuição na intensidade de fotoluminescência. A análise por AFM das partículas após a conjugação (ZnCdTe-ConBr), descritas neste trabalho na seção 4.3.5, indicou que há a formação de uma camada orgânica na superfície das partículas de ZnCdTe, o que provavelmente colaborou com a diminuição da intensidade de fotoluminescência dos PQs. Na

figura 14.B, onde foi avaliado somente a mistura entre a ConBr e os PQs de ZnCdTe, podemos observar um decréscimo menos expressivo comparado àqueles obtidos nas amostras bioconjugadas, inferindo que a mistura entre PQs de ZnCdTe e ConBr não-conjugada não é suficiente para reduzir expressivamente a intensidade de fotoluminescência. Portanto, a diminuição da emissão é resultado da ligação covalente entre a lectina e os pontos quânticos.

Figura 14. (A) Gráfico de intensidade de fotoluminescência de ZnCdTe 40 pH 11 puro e o mesmo com ConBr 1 mg/mL não-conjugado; (B) Gráfico de intensidade de fotoluminescência de ZnCdTe 40 pH 11 tratado com glutaraldeído 0.26%, e conjugados com concentrações crescentes de ConBr (0,25; 0,5; 1,0 mg/mL).



Fonte: Elaborada pelo autor.

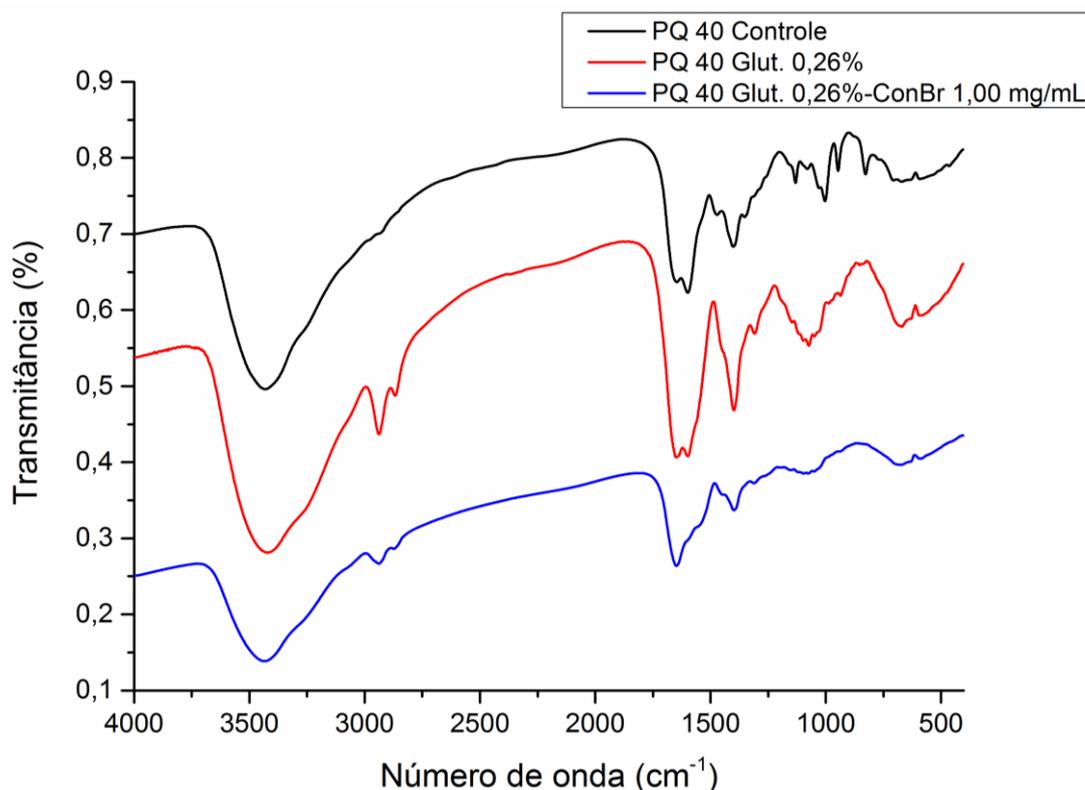
4.4.3 Espectroscopia no Infravermelho

A formação de ligações químicas de acoplamento entre ConBr e PQs de ZnCdTe foi investigada por espectroscopia FTIR (Figura 15). O glutaraldeído foi usado para promover o acoplamento de proteínas e de outras espécies contendo amina, resultando na formação de grupos imina ($R_2C = NR$) (FRIGERIO *et al.*, 2013), que pode ser facilmente detectado usando espectroscopia de FTIR.

O espectro obtido para o sistema ZnCdTe-ConBr 1 mg/mL foi dominada por bandas de proteínas, apresentando sinais adicionais do reagente de acoplamento em 2945 e 2866 cm^{-1} , devido à extensão de CH. Estas bandas eram fracas ou ausentes no espectro de ZnCdTe puro, e mais intensas no espectro da amostra funcionalizada, ZnCdTe Glut 0,26% (vermelho), indicando a presença de grupos do agente de acoplamento no conjugado e no funcionalizado.

A região de $1600\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$ também mostrou evidências de formação de bioconjugados com a presença de uma nova banda a 1654 cm^{-1} , que foi designada para os grupos imina-substituídos (FRIGERIO *et al.*, 2013), inferindo a ligação covalente entre os PQs e a ConBr.

Figura 15. Espectros de infravermelho de ZnCdTe 40 pH 11 puro (Preto); ZnCdTe 40 pH 11 Glut. 0,26% (Vermelho); ZnCdTe-ConBr 1,0 mg/mL (Azul).

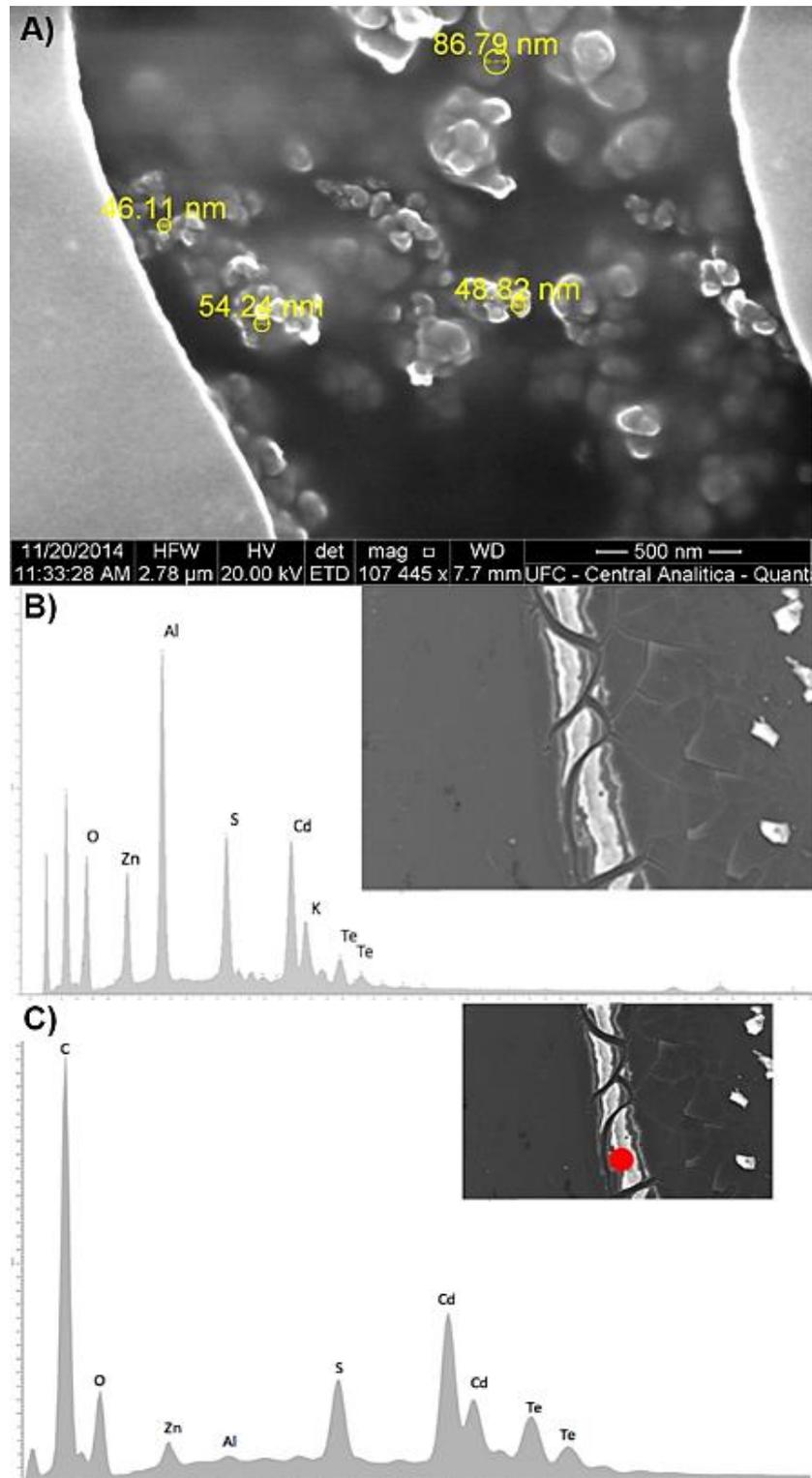


Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Na figura 16.A podemos observar que o sistema obtido, após secos, formam aglomerados de tamanhos que variam de 46,11 nm – 86,79 nm. Na figura 16.B mostra a composição do sistema ZnCdTe-ConBr 1,0 mg/mL, que é constituído pelos elementos químicos O, Zn, S, Cd e Te. A microanálise pontual, figura 16.C, confirma os dados obtidos anteriormente para a análise de composição total, porém com proporções e intensidades diferentes dos elementos químicos. Os dados de microanálise não são precisos e exatos, oferecendo apenas uma visão qualitativa dos elementos que constituem a amostra analisada.

Figura 16. (A) Imagem de Microscopia eletrônica de varredura com medição aparente dos aglomerados formado pelo sistema ZnCdTe-ConBr 1,0 mg/mL. (B) Microanálise de área total do sistema ZnCdTe-ConBr 1,0 mg/mL. (C) Microanálise de pontual do sistema ZnCdTe-ConBr 1,0 mg/mL. (C) Microanálise de pontual do sistema ZnCdTe-ConBr 1,0 mg/mL.

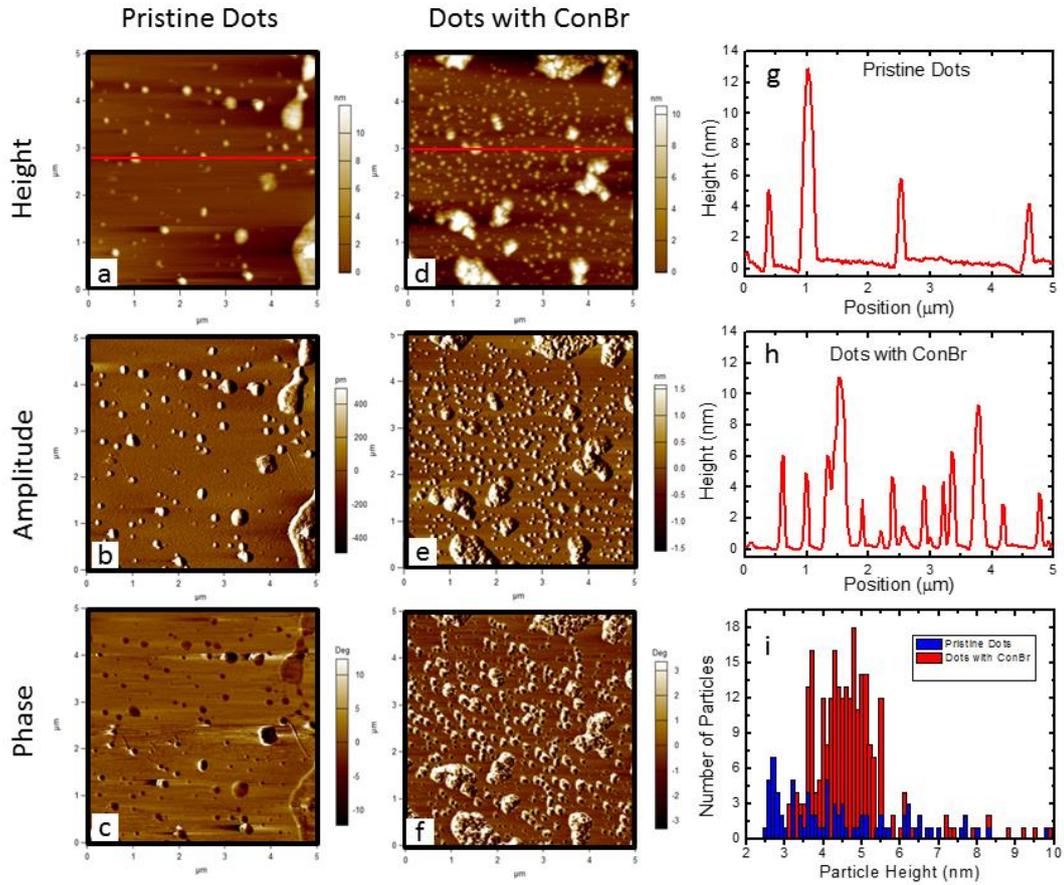


Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4.5 Microscopia de Força Atômica (AFM)

Na figura 16, temos imagens de altura e amplitude dos PQs puros (Figura 17.**a-b**) e dos PQs conjugados à proteína (Figura 17.**d-e**). Em **a** e **b**, observamos as nanopartículas bem dispersas no meio, com algumas partículas maiores sendo observadas, prováveis aglomerados de PQs que não foram bem dispersados. O tamanho médio das partículas mostrou-se em torno de 4,427 nm, tamanho de partícula próximos aos obtidos por DLS, porém nesta análise as amostras estavam em meio aquoso. Nas imagens **d** e **e**, temos os PQs conjugados à ConBr (ZnCdTe-ConBr 1,0 mg/mL), onde observamos um número maior de aglomerados, o que poderia ser resultado dos PQs conjugados e/ou proteína que não interagiu com os PQs, formando aglomerados. O tamanho médio dessas partículas é 4,713 nm, um pouco maior que os PQs puro. Na figura 17 **c-f** temos as imagens de fase dos dois tipos de amostra. As informações obtidas com as imagens de fase vão além da topografia da amostra, ela depende da mecânica do material, ou seja, regiões com estruturas diferentes geram uma resposta diferente na medida. Durante o experimento, a sonda é posta para vibrar na frequência de oscilação do cantilever, mas durante a varredura, essa frequência é alterada devido a interação sonda-amostra. Estruturas diferentes geram mudanças diferentes na frequência do cantilever, o que torna possível identificar essas estruturas dentro da imagem. A partir disto, é possível observar que na amostra de ZnCdTe puro (**c**) há regiões mais escuras, o que possivelmente corresponde aos PQs, parte inorgânica. Já na imagem (**f**) é possível observar regiões mais claras, possivelmente aglomerados de PQs recobertos pela ConBr, parte orgânica. Com isto, é possível comprovar a interação ocorrida pela presença da ConBr na superfície dos PQs.

Figura 17. Microscopia de força atômica de ZnCdTe não-conjugados e conjugados com ConBr. **(a - b)** Imagens de altura e amplitude dos PQs puros. **(d - e)** Imagens de altura e amplitude dos PQs conjugados à proteína. **(c - f)** Imagens de fase de PQs puros **(c)** e PQs conjugados **(f)**.



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.5 Propriedade de hemaglutinação de ZnCdTe-ConBr

Constatou-se com este experimento que a ConBr, após o procedimento de bioconjugação, manteve a sua propriedade de hemaglutinar eritrócitos. As unidades de hemaglutinação obtidas são mostrados na tabela 4 abaixo.

Tabela 4. Tabela dos títulos de hemaglutinação.

Amostra	U.H. Total ^a
<i>ZnCdTe 40 pH 11 puro*</i>	NE
<i>ZnCdTe 40 pH 11 Glut 0,26%**</i>	NE
<i>ConBr 1mg/mL</i>	512 U.H.
<i>ZnCdTe-ConBr 0,25 mg/mL</i>	256 U.H.
<i>ZnCdTe-ConBr 0,5 mg/mL</i>	512 U.H.
<i>ZnCdTe-ConBr 1,0 mg/mL</i>	512 U.H.
<i>ZnCdTe-ConBr 1,0 mg/mL + 0,1 M de D-Manose***</i>	NE

Legenda:

^a Hemaglutinação expressa em unidades de hemaglutinação (U.H.)

NE – Não exibiu atividade hemaglutinante

*A amostra apresentou hemólise após 30 min de contato

** A amostra apresentou uma leve granulação

*** Inibição testada para a maior concentração de ConBr

Fonte: Elaborada pelo autor.

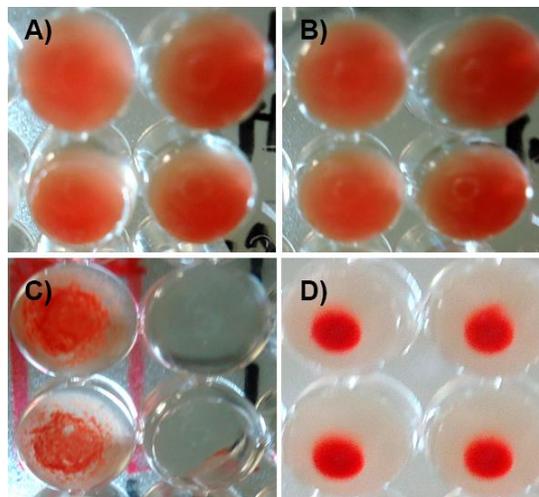
A amostra pura de ZnCdTe, apresentou hemólise após um período de 30 min. de contato com os eritrócitos, demonstrando que as nanopartículas isoladas oferecem riscos à células e estruturas biológicas, necessitando de compatibilização para serem aplicadas como ferramentas biotecnológicas diretamente em tecidos vivos. Alguns trabalhos relatam estes efeitos tóxicos em nanopartículas inorgânicas (MATHIAS, 2013).

A amostra de ZnCdTe-ConBr 1,0 mg/mL (18.A) apresentou o mesmo título de hemaglutinação que a ConBr pura na mesma concentração (18.B), comprovando que o procedimento de conjugação aqui descrito não provoca uma diminuição na atividade da ConBr. Porém, não foi possível precisar qual a concentração de ConBr acoplada à superfície dos PQs, já que os PQs interferem no método de quantificação proteica disponível no laboratório (Bradford).

A mostra funcionalizada, ZnCdTe Glut 0,26% apresentou aglomeração semelhante à aglutinação promovida pela ConBr (figura 18.C), porém para diferenciar a aglutinação promovida pela lectina da falsa aglutinação promovida pelo glutaraldeído, fez-se um ensaio de inibição por bloqueio do sítio ativo da lectina incubando-se previamente a amostra ZnCdTe-ConBr 1 mg/mL com um açúcar capaz de se ligar e bloquear o sítio ativo da ConBr, a D-manose a 0,1 M. Com este teste foi possível concluir que a ConBr é a responsável pela hemaglutinação, já que não foi observado este fenômeno na amostra pré-incubada (figura 18.D).

Na figura 18 abaixo estão demonstrados alguns resultados de hemaglutinação obtidos:

Figura 18. Atividade hemaglutinante em microplaca de titulação com eritrócitos de coelho não tratado com enzimas proteolíticas a 3%. (A) Atividade do sistema ZnCdTe-ConBr a 1,0 mg/mL; (B) Atividade de ConBr a 1,0 mg/mL; (C) ZnCdTe tratados com Glut 0,26% (apresentou agregação); (D) Sistema ZnCdTe-ConBr 1,0 mg/mL em incubação prévia com 0,1 M D-manose (Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante).



Fonte: Elaborada pelo autor.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

5.1 Conclusões

Os resultados obtidos sugerem que o sistema ZnCdTe-ConBr foi conjugado covalentemente após a metodologia de reação desenvolvida neste trabalho. Com a caracterização deste sistema foi possível observar algumas modificações físicas sofridas, como, por exemplo, o aumento do tamanho de partícula e a alteração da superfície do ponto quântico pela deposição de uma camada orgânica, comprovando a existência da interação entre a ConBr e os pontos quânticos de ZnCdTe. Além disso, modificações químicas características de interações covalentes também foram observadas por FTIR, comprovado pelo desaparecimento e surgimento de bandas após a conjugação.

A propriedade funcional da ConBr foi mantida após a conjugação, pois observou-se que o título de hemagutinação obtido para o sistema ZnCdTe-ConBr foi o mesmo obtido para a ConBr pura, recém isolada, a uma concentração de 1 mg/mL, demonstrando a eficiência da metodologia de conjugação aqui descrita. A propriedade funcional de ZnCdTe foi mantida após a conjugação, pois apesar da redução observada na intensidade de fotoluminescência os PQs ainda apresentaram uma emissão de fluorescência elevada e duradoura.

O sistema obtido ZnCdTe-ConBr apresentou alta estabilidade coloidal, já que os valores de potencial zeta obtidos por DLS exibiram-se próximos do padrão de referência para soluções com estabilidade coloidal, provando que este sistema é aplicável em testes biológicos. Algumas amostras após a conjugação permaneceram estáveis e sem formação de aglomerados por até 60 dias.

Conclui-se então que o sistema aqui obtido pode ser utilizado como uma ferramenta biotecnológica para o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico por imagem.

5.2 Perspectivas

Como perspectivas para este trabalho têm-se: o estudo da toxicidade destes sistemas obtidos em tecidos animais; a utilização dos sistemas para o processo de marcação celular e investigação mais profunda da constituição das glicoproteínas presentes em células com alguma anomalia; fazer uso destes sistemas em futuros ensaios com imunoglobulinas em diagnósticos sorológicos para doenças negligenciadas e a produção de kits de diagnósticos de menor custo.

REFERÊNCIAS

- ALVES, A.C. VASCONCELOS, M.A. SANTIAGO, M.Q. PINTO-JUNIOR, V.R. OSTERNE, V.J.S. LOSSIO, C.F. SOUZA FERREIRA BRINGEL, P.H. CASTRO, R.R. NAGANO, C.S. DELATORRE, P. SOUZA, L.A.G. NASCIMENTO, K.S. ASSREUY, A.M.S. CAVADA, B.S. A novel vasorelaxant lectin purified from seeds of *Clathrotropis nitida*: partial characterization and immobilization in chitosan beads. **Archives of Biochemistry and Biophysics** (Print), v. 588, p. 33-40. 2015.
- ANDRADE, G.R.S. NASCIMENTO, C.C. MATOS, C.R.S. SUSSUCHI, E.M. COSTA, L.P. NASCIMENTO, K.S. CAVADA, B.S. GIMENEZ, I.F. Study of the bioconjugation of ternary alloyed ZnCdTe nanocrystals to Concanavalin A. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**. 295. 46–52. 2014.
- ANDRADE, J.L. ARRUDA, S. BARBOSA, T. PAIM, L. RAMOS, M.V. CAVADA, B.S. BARRAL-NETTO, M. Lectin-induced nitric oxide production. *Cellular Immunology*, v 194, p. 98-102. 1999.
- BANERJEE, S. CHAKI, S. BHOWAL, J. CHATTERJEE, B.P. Mucin binding mitogenic lectin from freshwater Indian *Belamya bengalensis*: purification and molecular characterization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 421, p. 125-34. 2004.
- BARBOSA, T. ARRUDA, S. CAVADA, B. S. GRANGEIRO, T. B. FREITAS, L. A. R. BARRAL-NETTO, M. In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae subtribe. **Mem. Inst.Oswaldo Cruz**, v 96, p. 673-678. 2001.
- BARRAL-NETTO, M. SANTOS, S.B. BARRAL, A. MOREIRA, L.I.M. SANTOS, C.F. MOREIRA, R.A. OLIVEIRA, J.T.A. CAVADA, B.S. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the Diocleae tribe. **Immunol. Invest.** v. 21, p. 297-303. 1992.
- BENITO, F.M. IGLESIAS, R. FERRERAS, J.M. CITORES, L. CAMAFEITA, E. MÉNDEZ, E. GIRBÉS, T. Constitutive and inducible type 1 ribosome-inactivating proteins (RIPs) in elderberry (*Sambucus nigra* L.). **FEBS Letters**, v. 428, p. 75-9. 1998.
- BERTRAND, O. COCHET, S. CARTRON, J-P. Expanded bed chromatography for one-step purification of mannose binding lectin from tulip bulbs using mannose immobilized on DEAE Streamline. **Journal of Chromatography A**, v. 822, p. 19-28. 1998.
- BIES, C. LEHR, C.M. WOODLEY, J.F. Lectin-mediated drug targeting history and applications. **Adv. Drug Deliver.** Rev. 56, 425–435. 2004.
- BOYD, W.C. REGUERA, R.M. Hemagglutinating substances for human cells in various plants. **J. Immunol.**, v. 62, p. 333- 9. 1949.
- BRASIL-JÚNIOR, A.G. Desenvolvimento de processos de bioconjugação empregando pontos quânticos fluorescentes de semicondutores II-VI. **Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.** Universidade Federal de Pernambuco. 2010.

BRUCHEZ, J.R. MORONNE, M. GIN, P. WEISS, S. ALIVISATOS, A. P. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. **Science**, 281, 2013-2016. 1998.

CARRINGTON, D.M. AUFFRET, A. HANKE, D.E. Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of concanavalin A. **Nature**, v. 313, p. 64–67. 1985.

CAVADA, B.S. BARBOSA, T. ARRUDA, S. GRANGEIRO, T.B. BARRAL-NETTO, M. Revisiting proteus: Do Minor Changes in Lectin Structure Matter in Biological Activity? Lessons from and Potential Biotechnological Uses of the Diocleinae Subtribe Lectins. **Current Protein and Peptide Science**, v. 2, p. 123-135. 2001.

CAVADA, B.S. SANTOS, C.F. GRANGEIRO, T.B. NUNES, E.P. SALES, P.V.P. RAMOS, R.L. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Ducke. **Phytochemistry**, 49, 675-680. 1998.

CHAN, W.C. MAXWELL, D.J. GAO, X. BAILEY, R.E. HAN, M. NIE, S. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. **Curr Opin Biotechnol**. 13(1):40–6. 2002.

CHAN, W.C. NIE S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. **Science**. 281, 2016. 1998.

CHAVES, C.R. Síntese e caracterização de nanopartículas de sulfeto de cádmio: aplicação biomédicas. 111 f. Dissertação de Mestrado em Ciências de Materiais. **Recife: Universidade Federal de Pernambuco – UFPE**. 2006.

CHU, K.T. NG, T.B. Smilaxin, a novel protein with immunostimulatory, antiproliferative, and HIV-1-reverse transcriptase inhibitory activities from fresh *Smilax glabra* rhizomes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 340, p. 118-24. 2006.

CITORES, L. BENITO, F.M. IGLESIAS, R. FERRERAS, J.M. ARGÚESO, P. JIMÉNEZ, P. TESTERA, A. CAMAFEITA, E. MÉNDEZ, E. GIRBÉS, T. Characterization of a new non-toxic two-chain ribosome-inactivating protein and a structurally-related lectin from rhizomes of dwarf Elder (*Sambucus ebulus* L.). **Cellular and Molecular Biology**. v. 43, p. 485-99. 1997.

COELHO, L.C.B.B. SILVA, M.B.R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**. v. 11, p. 295-300. 2000.

DOHNALOVA, K. ALEXANDER, N. PODDUBNY, A. ALEXEI, A. PROKOFIEV, A.A. DE BOER, W.D. Surface brightens up Si quantum dots: direct bandgap-like size-tunable emission. **Light Sci Appl**. 2. 2013.

DU, J. LI, X. WANG, S. WU, Y. HAO, X. XU, C. ZHAO, Z. Microwave-assisted synthesis of highly luminescent glutathione-capped $Zn_{1-x}Cd_xTe$ alloyed quantum dots with excellent biocompatibility, **J. Mater. Chem**. 22. 11390–11395. 2012.

FARIAS, P.M.A. SANTOS, B.S. MENEZES, F.D. CESAR, C.L. FONTES, A. LIMA, P.R.M. BARJAS-CASTRO, M.L. CASTRO, V. FERREIRA, R. "CdS Quantum dots, efficient fluorescent markers for red cells", **J. Microscopy**, 219, 103-108. 2005.

FERREIRA, M. OSVALDO, J. RÓZ, A. **Livro: Nanoestruturas: Coleção Nanociência E Nanotecnologia: Princípios E Aplicações Volume 1**. Elsevier Brasil. 2015.

FLEMMING, C. ULRICH, M. SCHWALL, G. SCHRODER, H.C. MULLER, W.E.G.W. Determination of lectin characteristics by a novel agglutination technique. **Analytical Biochemistry**, v. 205, p. 251-6. 1992.

FREIRE, M.G.M. GOMES, V.M. CORSINI, R.E. MACHADO, O.L.T. DE SIMONE, S.G. NOVELLO, J.C. MARANGONI, S. MACEDO, M.L.R. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 61-68. 2002.

FRIGERIO, C. SANTOS, J.L.M. BARBOSA, J.A.C. EATON, P. SARAIVA, M.L.M.F.S. PASSOS, M.L.C. A soft strategy for covalent immobilization of glutathione and cysteine capped quantum dots onto amino functionalized surfaces, **Chem. Commun.** 49. 2518–2520. 2013.

GABIUS, H.J. GABIUS, S. *Glycoscience, Status and perspectives*; **Chapman & Hall: New York, NY, USA**, 1997.

GAO, X. CHEN, J. CHEN, J. WU, B. CHEN, H. JIANG, X. Quantum Dots Bearing Lectin-Functionalized Nanoparticles as a Platform for In Vivo Brain Imaging. **Bioconjugate Chem.** 19, 2189–2195. 2008

GAO, X. WANG, T. WU, B. CHEN, J. CHEN, J. YUE, Y. DAI, N. CHEN, H. JIANG, X. Quantum dots for tracking cellular transport of lectin-functionalized nanoparticles. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 377:1, 35–40. 2008.

GEMEINER, P. MISLOVICOVÁ, D. TKÁC, J. SVITEL, J. PÄTOPRSTÝ, V. HRABÁROVÁ, E. KOGAN, G. KOZÁR, T. Lectinomics II. A highway to biomedical/clinical diagnostics. **Biotechnol. Adv.** 27, 1–15. 2009.

GUPTA, N. SRIVASTAVA, P.S. Purification and characterization of a lectin from seeds and cotyledonary callus of *Zizyphus mauritiana*. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 552-6. 1998.

HAUGLAND, R.P. *The handbook-a guide to fluorescent probes and labeling technologies. 2nd ed.* **San Diego: Invitrogen Corporation**. 2005.

HERMANSON, G.T. *Bioconjugate Techniques, 2nd edition, USA*, Elsevier. 2008.

JAMIESON, T. BAKHSHI, R. PETROVA, D. POCOCK, R. IMANI, M. SEIFALIAN, A.M. Biological applications of quantum dots. **Biomaterials**. 28(31):4717–32. 2007.

JUNG, E.C. KIM, K.D. BAE, C.H. KIM, J.C. KIM, D.K. KIM, H.H. A mushroom lectin from ascomycete *Cordyceps militaris*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, p. 833–8. 2007.

KARAKOTI, A.S. SHUKLA, R. SHANKER, R. SINGH, S. Surface functionalization of quantum dots for biological applications. **Adv. Coll Interf. Sci.** 215. 28–45. 2015.

KAUR, A. SINGH, J. KAMBOJ, S.S. SEXANA, A.K. PANDITA, R.M. SHAMNUGAVEL, M. Isolation of an N-acetyl-d-glucosamine specific lectin from the rhizomes of *Arundo donax* with antiproliferative activity. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1933–40. 2005.

KAUR, M. SINGH, K. RUP, P.J. SAXENA, A.K. KHAN, R.H. ASHRAF, M.T. KAMBOJ, S.S. SINGH, J. A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with anti-insect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anti-cancer effect on human cancer cell. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 445, p. 156–165. 2006.

KONOZY, E.H.E. BERNARDES, E.S. ROSA, C. FACA, V. GREENE, L.J. WARD, R.J. Isolation, purification, and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 410, p. 222–29. 2003.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the bacteriophage t4, **Nature**, 227, 680–685. 1970.

LANDSTEINER, K. RAUBITSCHKEK, H. Beobachtungen über hamolyse und hamagglutination. **Cbl. Bakt.**, vol. 45, p. 660–7. 1908.

LEITE, Y.F.M.M. SILVA, L.M.C.M. AMORIM, R.C.N. FREIRE, E.A. JORGE, D.M.M. GRANGEIRO, T.B. BENEVIDES, N.M.B. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1724, p. 137–45. 2005.

LESNYAK, V. GAPONIK, N. EYCHMULLER, A. Colloidal semiconductor nanocrystals: the aqueous approach, **Chem. Soc. Rev.** 42. 2905–2929. 2013.

LIS, H. SHARON, N. Lectins in higher plants. In: Marcus, A. The Biochemistry of Plants, a Comprehensive Treatise. Proteins and nucleic acids, **New York, Academic Press**, v. 6, p. 371–447. 1981.

LIU, C. ZHAO, X. XU, X-C. LI, L-R. LIU, Y-H. ZHONG, S-D. BAO, J-K. Hemagglutinating activity and conformation of a lactose-binding lectin from mushroom *Agrocybe cylindracea*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, p. 138–44. 2008.

MACHUKA, J.S. OKEOLA, O.G. CHRISPEELS, M.J. JACKAI, L.E.N. The African yam bean seed lectin affects the development of the cowpea weevil but does not affect the development of larvae of the legume pod borer. **Phytochemistry**, v. 53, p. 667–674. 2000.

- MAMEDOVA, N.N. KOTOV, N.A. Albumin-CdTe Nanoparticle Bioconjugates: Preparation, Structure, and Interunit Energy Transfer with Antenna Effect. **Nano Letters**, 1, 281-285. 2001.
- MARTINEZ, M. CORDOBA, F. Isolation of fully active and stable corn coleoptile lectins. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 30, p. 199-208. 2000.
- MATHIAS, F.T. Estudo do efeito das nanopartículas de sais de prata sobre parâmetros reprodutivos e funcionais espermáticos em ratos wistar. **Dissertação de mestrado. UNICENTRO. Guarapuava**. 2013.
- MEDINTZ, I. L. TETSUO UYEDA, H. GOLDMAN, E.R; MATTOUSSI, H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. **Nature Materials**, 4, 435-446. 2005.
- MIN, W. JONES, D.H. Stability and expression of recombinant prepro-concanavalin A after cytoplasmatic expression in Escherichia coli, **FEBS Letter**. v.301, p. 315-8. 1992.
- MO, H. WINTER, H.C. GOLDSTEIN, I.J. Purification and characterization of a Neu5Acalpha2-6Galbeta1-4Glc/GlcNAc-specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom Polyporus squamosus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 10623-9. 2000.
- MOREIRA, R.A. CASTELO-BRANCO, C.C. MONTEIRO, A.C.O. TAVARES, R.O. BELTRAMINI, L.M. Isolation and partial characterization of a lectin from Artocarpus incisa L. seeds. **Phytochemistry**, v. 47, p. 1183-8. 1998.
- MOREIRA, R.A. CAVADA, B.S. Lectin from Canavalia brasiliensis (MART.). isolation, characterization and behavior during germination. **Biologia Plantarum**, 26 (2), pp. 113-120. 1984.
- MOREIRA, R.A. PERRONE, J.C. Purification and partial characterization of a lectin from Phaseolus vulgaris. **Plant Physiol.**, 59, 783-787. 1977.
- NAEEM, A. KHAN, R.H. VIKRAM, H. AKIF, M. Purification of Cajanus cajan root lectin and its interaction with rhizobial lipopolysaccharide as studied by different spectroscopic techniques. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 396, p. 99-105. 2001.
- NAGAI, T. KAWABATA, S. SHISHIKURA, F. SUGITA, H. Purification, characterization, and amino acid sequence of an embryonic lectin in perivitelline fluid of the horseshoe crab. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 37673-8. 1999.
- NOMURA, K. ASHIDA, H. UEMURA, N. KUSHIBE, S. OZAKI, T. YOSHIDA, M. Purification and characterization of a mannose/glucose-specific lectin from Castanea crenata. **Phytochemistry**, v. 49, p. 667-73. 1998.
- OLIVEIRA, J.T.A. MELO, V.M.M. CÂMARA, M.F.L. VASCONCELOS, I.M. BELTRAMINI, L.M. MACHADO, O.L.T. GOMES, V.M. PEREIRA, S.P. FERNANDES, C.F. NUNES, E.P. CAPISTRANO, G.G.G. MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O. Purification

and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. **Phytochemistry**, v. 61, p. 301-10. 2002.

ORTON, J. The Story of Semiconductors. **New York: Oxford University Press Inc.** 2004.

PANCHUK-VOLOSHINA, N. et al. Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. **J Histochem Cytochem.**, v. 47, p. 1179–88. 1999.

PARISI, M.G. MORENO, S. FERNÁNDEZ, G. Isolation and characterization of a dual function protein from *Allium sativum* bulbs which exhibits proteolytic and hemagglutinating activities. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, p. 403-13. 2008.

PATRA, C.R. BHATTACHARYA, R. PATRA, S. BASU, S. MUKHERJEE, P. MUKHOPADHYAY, D. Lanthanide phosphate nanorods as inorganic fluorescent labels in cell biology research. **Clin Chem.** 53(11): 2029–31. 2007.

PEUMANS, W.J. VAN DAMME, E.J.M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.** 109: 347–352. 1995.

PEUMANS, W.J. WINTER, H.C. BEMER, V. VAN LEUVEN, F. GOLDSTEIN, I.J. TRUFFA-BACHI, P. VAN DAMME, E.J.M. Isolation of a novel plant lectin with an unusual specificity from *Calystegia sepium*. **Glycoconjugate Journal**, v. 14, p. 259-65. 1997.

PINTO-JUNIOR, V.R. CORREIA, J.L.A. PEREIRA, R.I. PEREIRA-JUNIOR, F.N. SANTIAGO, M.Q. OSTERNE, V.J.S. MADEIRA, J.C. CAJAZEIRAS, J.B. NAGANO, C.S. DELATORRE, P. ASSREUY, A.M.S. NASCIMENTO, K.S. CAVADA, B.S. Purification and molecular characterization of a novel mannose-specific lectin from *Dioclea reflexa* hook seeds with inflammatory activity. **JMR. Journal of Molecular Recognition.** 2015.

RAMESHWARAM, N.R. NADIMPALLI, S.K. An efficient method for the purification and quantification of a galactose-specific lectin from vegetative tissues of *Dolichos lablab*. **Journal of Chromatography B**, v. 861, p. 209–17. 2008.

REGNIER, F.E. JUNG, K. HOOSER, S.B. WILSON, C.R. Glycoproteomics based on lectin affinity chromatographic selection of glycoforms. **Lectins: Anal. Technol.** 8, 193–212. 2007.

REGO, E.J.L. CARVALHO, D.D. MARANGONI, S. OLIVEIRA, B. NOVELLO, J.C. Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (smooth rattlebox). **Phytochemistry**, v. 60, p. 441-446. 2002.

REGULACIO, M.D. HAN, M.-Y. Composition-tunable alloyed semiconductor nanocrystals, **Acc. Chem. Res.** 43. 621–630. 2010.

REZENDE, S. M. Materiais e dispositivos eletrônicos. **São Paulo: Editora Livraria da Física: São Paulo**, 2ª ed. 2004.

ROMANO, R. Monografia: Estrutura e modelos de ligação química para semicondutores III-V e II-VII. Laboratório de Química do Estado Sólido – **Instituto de Química-UNICAMP**. 2003.

SÁ, R.A. NAPOLEÃO, T.H. SANTOS, N.D.L. GOMES, F.S. ALBUQUERQUE, A.C. XAVIER, H.S. COELHO, L.C.B.B. BIEBER, L.W. PAIVA, P.M.G. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. **International Biodeterioration & Biodegradation**, in press. 2008a.

SANTIAGO, M.Q. Purificação, caracterização e atividade biológica de uma lectina extraída de sementes de *Canavalia oxyphylla* Standl. & L. O. Williams. **Monografia – Bacharelado em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará**. 2013.

SANTOS, B. S. FARIAS, P. M. A. FONTES, A. Semiconductor quantum dots for biological applications. In: Mohamed Henini (Editor in Chief). (Org.). **Handbook of Self Assembled Semiconductor Nanostructures Novel Devices in Photonics and Electronics: Elsevier**, 771-798. 2008.

SANZ-APARICIO, J. HERMOSO, J. GRANGEIRO, T.B. CALVETE, J.J. CAVADA, B.S. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. **FEBS Letters**, v. 405, n. 1, p. 114-118. 1997.

SESHAGIRIRAO, K. PRASAD, M.N.V. Purification and partial characterization of a lectin from *Euphorbia nerifolia* latex. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 35, p. 1199-204. 1995.

SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. **J. Biol. Chem.** 282: 2753-2764. 2007.

SHARON, N. LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, 14: 53-62. 2004.

SHARON, N. LIS, H. Legume lectins – a large family of homologous proteins. **Federation American Societies Experimental Journal**, Bethesda, v. 4, p. 3198-208. 1990.

SINGHA, B. ADHYA, M. CHATTERJEE, B.P. Multivalent II [-d-Galp-(14)--d-GlcpNAc] and T [-d-Galp-(13)-d-GalpNAc] specific Moraceae family plant lectin from the seeds of *Ficus bengalensis* fruits. **Carbohydrate Research**, v. 342, p. 1034-43. 2007.

SITOHY, M. DOHEIM, M. BADR, H. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seeds. **Food Chemistry**, v. 104, p. 971-9. 2007.

SPILATRO, S.R. COCHRAN, G.R. WALKER, R.E. CABLISH, K.L. BITTNER, C.C. Characterization of a new lectin of soybean vegetative tissues. **Plant Physiology**, v. 110, p. 825-34. 1996.

STIRPE, F. LICASTRO, F. MORINI, M.C. PARENTE, A. SAVINO, G. ABBONDANZA, A. BOLOGNESI, A. FALASCA, A.I. ROSSI, C.A. Purification and partial characterization of a mitogenic lectin from the latex of *Euphorbia marginata*. **Biochimica et Biophysica Acta** (BBA) - General Subjects, v. 1158, p. 33-9. 1993.

THAKUR, A. RANA, M. LAKHANPAL, T.N. AHMAD, A. KHAN, M.I. Purification and characterization of lectin from fruiting body of *Ganoderma lucidum*: Lectin from *Ganoderma lucidum*. **Biochimica et Biophysica Acta** (BBA) - General Subjects, v. 1770, p. 1404-12. 2007.

UMETSU, K. YAMASHITA, K. SUZUKI, T. Purification and carbohydrate-binding specificities of a blood type B binding lectin from hemolymph of a crab (*Charybdis japonica*). **The Journal of Biochemistry**, v. 109, p. 718-21. 1991.

VAN DAMME, E.J.M. PEUMANS, W.J. BARRE, A. ROUGÉ, P. A Novel Family of Lectins Evolutionarily Related to Class V Chitinases: An Example of Neofunctionalization in Legumes. **Crit. Rev. Plant Sci.** 17: 575-692. 1998.

VANDENBORRE, G. SMAGGHE, G. VAN DAMME, E.J.M. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, 72: 1538–1550. 2011.

WALT, D.R. AGAYN, V.I. The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaldehyde. **Trends in a analytical.** 13. 1994.

WÄLTI, M.A. WALSER, P.J. THORE, S. GRÜNLER, A. BEDNAR, M. KÜNZLER, M. AEBI, M. Structural Basis for Chitotetraose Coordination by CGL3, a Novel Galectin-Related Protein from *Coprinopsis cinerea*. **Journal of Molecular Biology**, v. 379, p. 146-59. 2008.

WANG, H. NG, T.B. A lectin with some unique characteristics from the samta tomato. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 181-5. 2006.

WANG, J-H. LI, Y-Q. ZHANG, H-L. WANG, H-Q. LIN, S. CHEN, J. ZHAO, Y-D. LUO, Q-M. Bioconjugation of concanavalin and CdTe quantum dots and the detection of glucose. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects** 364. 82–86. 2010.

WANG, Q. FANG, T. LIU, P. DENG, B. MIN, X. LI, X. Direct synthesis of high-quality water-soluble CdTe:Zn²⁺ quantum dots, **Inorg. Chem.** 51. 9208–9213. 2012.

WANG, Q. KUO, Y. WANG, Y. SHIN, G. RUENGRUGLIKIT, C. HUANG, Q. Luminescent properties of water-soluble denatured bovine serum albumin-coated CdTe quantum dots. **J Phys Chem B.** 110(34):16860–6. 2006.

WANG, Y. HOU, Y. TANG, A. FENG, B. LI, Y. LIU, J. TENG, F. Synthesis and optical properties of composition-tunable and water-soluble Zn_xCd_{1-x}Te alloyed nanocrystals, **J. Cryst. Growth** 308. 19–25. 2007.

WINTER, H.C. MOSTAFAPOUR, K. GOLDSTEIN, I.J. The mushroom *Marasmius oreades* lectin is a blood group type B agglutinin that recognizes the Gala1,3Gal and Gala1, 3Galb1,

4GlcNAc porcine xenotransplantation epitopes with high affinity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 14996-15001. 2002.

WITITSUWANNAKUL, R. WITITSUWANNAKUL, D. SAKULBORIRUG, C. A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Phytochemistry**, v. 47, p. 183-7. 1998.

WU, X. et al. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. **Nature Biotechnology**, v. 21, p. 41 – 46, 2002.

ZHANG, L.L. DING, Y. WANG, Y. ZHANG, L. Synthesis of Functionalized ZnSe Nanoparticles and their Applications in the Determination of Bovine Serum Albumin. **J. Fluorescence**, 19, 437-441. 2008.

ZHANG, Y.L. TU, L.P. ZHENG, Q.H. KONG, X.G. Effect of protein molecules on the photoluminescence properties and stability of water-soluble CdSe/ZnS core-shell quantum dots, **Chin. Sci. Bull.** 58. 2616–2621. 2013.

ZHU, Y.F. LANG, X.Y. JIANG, Q. The effect of alloying on the band gap energy of nanoscaled semiconductor alloys, **Adv. Funct. Mater.** 18. 1422–1429. 2008.

ZRAZHEVSKIY, P. SENA, M. GAO, X. Designing multifunctional quantum dots for bioimaging, detection, and drug delivery. **Chem Soc Rev.** 39(11): 4326–54. 2010.

ZRAZHEVSKIY, P. TRUE, L.D. GAO, X. Multicolor multicycle molecular profiling with quantum dots for single-cell analysis. **Nat Protoc.** 8(10):1852–69. 2013.