



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS DE SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ALINE DE CARVALHO OLIVEIRA

**ESTUDO DO EFEITO DE MARCADORES BIOLÓGICOS NA ATIVIDADE
HEMAGLUTINANTE ESPECÍFICA E NA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA
LECTINA DE *Canavalia brasiliensis* MART. EX BENTH.**

SOBRAL

2013

ALINE DE CARVALHO OLIVEIRA

**ESTUDO DO EFEITO DE MARCADORES BIOLÓGICOS NA ATIVIDADE
HEMAGLUTINANTE ESPECÍFICA E NA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA
LECTINA DE *Canavalia brasiliensis* MART. EX BENTH.**

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

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pires dos Santos.

SOBRAL

2013

ALINE DE CARVALHO OLIVEIRA

**ESTUDO DO EFEITO DE MARCADORES BIOLÓGICOS NA ATIVIDADE
HEMAGLUTINANTE ESPECÍFICA E NA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA
LECTINA DE *Canavalia brasiliensis* MART. EX BENTH.**

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

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Pires dos Santos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. João Batista Cajazeiras
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Emmanuel Silva Marinho
Secretaria de Educação do Estado do Ceará (SEDUC-CE)

A minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a minha amada família, primeiramente.

Ao CNPq, pelo fomento à pesquisa.

Ao Prof. Dr. Ricardo Pires, pela oportunidade e pela confiança para executar este trabalho; além da compreensão e da excelente orientação.

Aos participantes da banca examinadora: João Batista Cajazeiras e Emmanuel Marinho, pelo tempo despendido e pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos amigos do IFCE, minha família de Sobral! Socorro Hortegal, Sarah Moreira, Germário Araújo, Marcos Erick Silva, Mariana Lima, Anna Kelly Moreira, Daniele Martinele, Michael Viana e Edirsana Carvalho.

Aos colegas de trabalho e novos amigos do Biomol: Raquel Benevides, Maria Júlia Bezerra, Artur Hermano, Suzete Roberta, Cíntia Camurça, Bruno Rocha, Vinícius Osterne, Júnior Reis, Mayara Queiroz, Ito Liberato e Rafael Simões, pela colaboração na pesquisa e incentivo; e em especial ao amigo querido Mayron Vasconcelos, pela paciência e apoio constante durante todo o desenvolvimento experimental deste estudo.

Ao professor Benildo Cavada, pela infra-estrutura e materiais necessários à realização dessa pesquisa.

“Como professor não me é possível
ajudar o educando a superar sua
ignorância se não supero
permanentemente a minha.”

Paulo Freire

RESUMO

A ConBr é uma proteína tetramérica presente em sementes de *Canavalia brasiliensis* e que possui afinidade para os açúcares D-mannose e D-glucose. É vasto o uso desta lectina em ensaios biotecnológicos devido as suas propriedades biológicas. É comumente utilizada conjugada ao FITC, um fluoróforo amplamente utilizado nas diversas áreas da biotecnologia para anexar um marcador fluorescente a proteínas através do grupamento amina. No entanto, a influência deste fluoróforo na atividade de tais proteínas precisa ser mais bem evidenciada. Essa pesquisa visou obter informações sobre as alterações na estrutura secundária da proteína ConBr nativa e conjugada com FITC, além de iniciar um estudo desta lectina também conjugada com pontos quânticos. Amostras de ConBr nativa, conjugada com o FITC (ConBr-FITC (2%)), misturada com FITC na proporção de 2% em massa (ConBr/FITC (2%)), misturada com FITC na proporção de 20% em massa (ConBr/FITC (20%)) e processada mas não conjugada com o FITC (ConBr-), foram analisadas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) através da técnica de reflectância total atenuada (ATR). Foram realizados testes de atividade hemaglutinante específica com ConBr nativa, ConBr-FITC (2%), ConBr/FITC (2%), ConBr- e ConBr conjugada com pontos quânticos (ConBr-QD Zn/Cd). A atividade hemaglutinante específica nos extratos foi determinada usando-se suspensões de hemácias de coelho a 3% em placas de microtitulação. Os dados obtidos nos ensaios de atividade específica foram submetidos ao teste estatístico de Mann-Whitney. Quando os espectros de ConBr nativa e ConBr-FITC (2%) foram comparados, observou-se que o pico da lectina nativa referente às estruturas de folhas β , não sofreu qualquer modificação quando a proteína foi conjugada com FITC, entretanto, notou-se uma diminuição da intensidade na região do espectro referente às estruturas em α -hélice, o que permite inferir uma redução da quantidade destas estruturas. Houve também um aumento de intensidade na região referente às estruturas irregulares. Os espectros de ConBr nativa, ConBr- e ConBr/FITC (2%) não sugeriram alterações na estrutura secundária. Nos testes de atividade hemaglutinante específica de ConBr nativa e ConBr-FITC (2%) houve uma diminuição da atividade específica para esta última em relação a primeira e estes resultados demonstraram diferença estatisticamente significativa entre si. ConBr nativa e ConBr- não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si. A atividade de ConBr/FITC

(2%) também não apresentou diferenças estatísticas em relação à ConBr nativa. Em conjunto, estes resultados contribuem e reforçam a proposição de que é a ligação do FITC à proteína que promove a alteração estrutural na região de α -hélice. A atividade específica de ConBr-QD Zn/Cd diminuiu drasticamente quando comparada com a atividade de ConBr nativa, apresentando diferença estatisticamente significativa entre estas amostras. Análises estatísticas realizadas com os dados obtidos no teste de atividade específica e análise dos espectros de infravermelho sugerem alterações na estrutura secundária da lectina ConBr conjugada ao FITC. Porém, ainda é necessária a elucidação da natureza dessa alteração e se essa é realmente devida à ligação da proteína ao fluoróforo.

Palavras-chave: ConBr. FITC. Espectroscopia de infravermelho. Pontos quânticos.

ABSTRACT

ConBr is a tetrameric protein found in *Canavalia brasiliensis* seeds and has affinity for D-mannose and D-glucose carbohydrates. Its vast use of this lectin in biotechnological assays due their biological properties, and it's used commonly linked to FITC, a fluorophore widely used in various fields of biotechnology to attach to proteins a fluorescent marker through amine grouping. However, the fluorophore influence in proteins activity must be further highlighted. This research aimed obtain informations about native ConBr secondary structure and FITC-conjugated changes and start a study of this lectin conjugated quantum dots also. Samples of native ConBr, ConBr-FITC conjugated (FITC-ConBr (2%)), ConBr mixed with the FITC proportion of 2% by mass (ConBr/FITC (2%)), ConBr mixed with FITC at 20 mass% (ConBr/FITC (20%)) and processed but not conjugated with FITC ConBr (ConBr-) were analyzed by Fourier Transform Infrared spectroscopy (FTIR), mode ATR (Attenuated Total Reflectance). The native ConBr, ConBr-FITC (2%), ConBr/FITC (2%), ConBr-, and conjugated quantum dots ConBr (QD ConBr-Zn / Cd) specific haemagglutinating activity were performed. The specific haemagglutinating activity in the extracts was determined using the rabbit erythrocytes suspensions at 3% in microtiter plates. The specific activity data were tested using the Mann-Whitney test. When the native ConBr and FITC-ConBr (2%) spectra were compared, it was found the peak of the native lectin relating to β -sheet structures not suffered modification when the protein was conjugated with FITC, but there was a intensity reduction in the spectrum region relating to α -helix structures, which allows a reduction in the amount these structures. There was an intensity increase of irregular structures also. Native ConBr, ConBr- e ConBr/FITC (2%) spectra suggested no changes in secondary structure. There was a ConBr-FITC (2%) hemagglutinating activity decrease and that result showed statistically significant difference to native ConBr. Native ConBr and ConBr- do not have significantly differences. The ConBr/FITC (2%) activity didn't showed statistical differences regarding native ConBr. These results contribute and reinforce the proposition that is the FITC binding to protein promotes the structural change in the α -helix region. The ConBr-QD Zn/Cd specific activity decreased compared with the activity of native ConBr, demonstrating statistically significant differences between these samples. Statistical analyzes using the data obtained in the specific activity test and infrared

spectra analysis suggest lectin ConBr FITC-conjugated secondary structure changes. However, it's still necessary elucidate the nature of this change, and whether this is really due to the protein-fluorophore binding.

Keywords: ConBr. FITC. Infrared spectrometry. Quantum dots.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Infecção de uma célula hospedeira por um microrganismo qualquer. No processo, a proteína reconhecedora de carboidrato (lectina) presente no microrganismo se liga ao carboidrato específico presente na célula hospedeira..... 16
- Figura 2 - Representação esquemática dos diferentes grupos de lectinas. As merolectinas (A) consistem de um único domínio de ligação a carboidratos. Hololectinas (B) também são exclusivamente constituídas de domínios de ligação a carboidratos, mas que contêm, pelo menos, dois domínios tais que são idênticos ou homólogos e se ligam a um único açúcar ou açúcares de estrutura semelhante. As quimerolectinas (C) são proteínas de fusão que consistem em um ou mais domínios de ligação a carboidratos porém, possuem também um outro domínio não relacionado à ligação com açúcares. Já as superlectinas (D) são constituídas por, pelo menos, dois diferentes domínios de ligação a carboidratos..... 17
- Figura 3 - Estrutura tridimensional de lectina de planta leguminosa. As lectinas de leguminosas geralmente possuem dois núcleos hidrofóbicos, uma entre as duas folhas grandes e outro entre a folha encurvada e as alças salientes das bordas desta folha. A maioria das lectinas de leguminosas contêm um sítio de ligação ao carboidrato composto por quatro alças na parte superior frontal da subunidade A. 19
- Figura 4 - A ricina possui duas subunidades , uma delas com atividade enzimática (A) e outra com um sítio de ligação específica ao açúcar galactose (B), exercendo seu mecanismo de toxidez através da inativação dos ribossomos. A unidade A da ricina é uma proteína inativadora do ribossomo – RIP. A subunidade B se liga à parede celular e permite a entrada da subunidade A por endocitose para o citossol e promove a morte da célula por inibição da síntese protéica. 20
- Figura 5 - Bactéria *E. coli* uropatogênica e suas fímbrias, as quais possuem uma lectina específica para N-acetyl-D-glucosamine, a GafD. 22
- Figura 6 - Processo de adesão do vírus influenza à célula hospedeira. 23
- Figura 7 – Representação esquemática de aglutinação sanguínea (hemaglutinação) produzida por lectinas. 24

Figura 8 – Esquema da entrega de droga ou fármaco a uma célula específica baseado na ligação da droga a uma lectina.	25
Figura 9 - Taxonomia de Lineu para <i>Canavalia brasiliensis</i>	26
Figura 10 – Planta <i>Canavalia brasiliensis</i> , à esquerda; e suas sementes, à direita, conhecida como feijão-de-boi.	26
Figura 11 – Alinhamento dos resíduos de aminoácidos da proteína ConBr. Resíduos identificados por setas correspondem a folhas β ; resíduos representados por uma mola formam estruturas em α -hélice; e o restante dos aminoácidos formam estruturas irregulares.	27
Figura 12 - Estrutura geral da lectina tetramérica ConBr e a localização relativa das quatro subunidades. Em vermelho estão as estruturas em α -hélice; setas coloridas representam as folhas β ; e demais estruturas coloridas e finas são referentes às estruturas irregulares.	28
Figura 13 - Isômero I do Isotiocianato de fluoresceína (FITC).	30
Figura 14 – Demonstração simples da ligação do FITC com proteína formando uma ligação estável tioureia.	31
Figura 15 - Estudos que utilizaram FITC como marcados. Em A, B e C, imagem da retina de ratos (LI <i>et al.</i> 2011); em D, cóclea de rato (ZHANG <i>et al.</i> , 2012); em E e F, imunoglobulina de cabra (http://tinyurl.com/astlv3t).	31
Figura 16 - Processo de ligação covalente do FITC a um resíduo de lisina, em um processo de derivação química que originará um derivado fluorescente.	32
Figura 17 - Imagens de fluorescência de um rato após a injeção do conjugado de hidroxietil-quitosana ligado ao FITC (A) e de seus rins, separadamente, demonstrando a predominância da ligação do conjugado com FITC no órgão alvo.	33
Figura 18 - Representação esquemática de pontos quânticos: um núcleo metalóide e uma casca que protege o núcleo e torna o ponto quântico biodisponível. A adição outras formas de revestimento ou grupos funcionais podem dar à nanopartícula a atividade biológica desejada.	34

Figura 19 – Dez cores de emissão de pontos quânticos de CdSe/ZnS excitados com uma lâmpada no ultravioleta próximo.	35
Figura 20 - Diferentes estratégias utilizadas para ligação de pontos quânticos a biomoléculas. Em a, ligações a grupos tiol ou a metal, com posterior interação a biomoléculas, como interações eletrostáticas, ligações covalentes ou ligações químicas por afinidade; em b, o encapsulamento das nanopartículas em matrizes poliméricas, como o envólucro de sílica, de polímeros anfifílicos e a formação de micelas ou microesferas (nanobeads).	37
Figura 21 – Diagrama de um interferômetro de Michelson. Um feixe da fonte de luz (A) é dividido em dois feixes (A' e B) que percorrem caminhos separados e convergem, em seguida, para o detector. Um padrão de interferência é registrado e chamado de interferograma de referência. Uma amostra é adicionada ao equipamento e um novo interferograma é obtido. Os dois interferogramas são, então, usados para computar o interferograma da amostra.	39
Figura 22 – Frequências de grupos para as principais funções orgânicas.	41
Figura 23 - Espectrômetro de reflexão interna (ATR, do inglês: <i>attenuated total reflectance</i>).	42
Figura 24 – Esquema do processo de marcação de ConBr com FITC. I - as lectinas foram dissolvidas em 1mL de tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,1M; II - adição de 250µL de uma solução de FITC (1mg/mL) e III - agitação constante por 2h ao abrigo da luz; IV - Separação por cromatografia de exclusão molecular, em coluna PD 10, das frações contendo lectina conjugada com FITC e não conjugada; V - diálise contra água mili-Q.	46
Figura 25 - Gráfico da banda amida III mostrando as diferenças entre os espectros médios da ConBr nativa, misturada com FITC a 2%, misturada com FITC a 20%, processada para marcação com FITC e conjugada com FITC numa proporção em massa de 2% (a); estrutura 3D do monômero de ConBr mostrando a localização das estruturas α -hélice, folhas β e estruturas irregulares (b).	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teste estatístico de Mann-Whitney aplicado aos resultados obtidos nos ensaios de atividade hemaglutinante específica, em UH/mg.	56
---	----

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Lectinas	16
<i>1.1.1</i>	<i>Conceito e classificação</i>	<i>16</i>
<i>1.1.2</i>	<i>Estrutura, ocorrência e funções.....</i>	<i>19</i>
<i>1.1.3</i>	<i>Atividades e aplicabilidade biológica</i>	<i>23</i>
<i>1.1.4</i>	<i>ConBr.....</i>	<i>26</i>
1.2	Isotiocianato de fluoresceína – FITC	29
1.3	Pontos quânticos	33
1.4	Espectroscopia de Infravermelho.....	37
<i>1.4.1</i>	<i>Instrumentação no Infravermelho.....</i>	<i>38</i>
<i>1.4.2</i>	<i>Aplicações da espectrofotometria de absorção no infravermelho</i>	<i>39</i>
<i>1.4.2.1</i>	<i>Espectroscopia de infravermelho no estudo da estrutura secundária de proteínas.....</i>	<i>42</i>
1.5	Objetivos	43
<i>1.5.1</i>	<i>Objetivos específicos</i>	<i>43</i>
2.	METODOLOGIA.....	45
2.1	Material vegetal e descrição das amostras.....	45
2.2	Experimentos com FITC	45
<i>2.2.1</i>	<i>Marcação da lectina com FITC</i>	<i>45</i>
<i>2.2.2</i>	<i>Preparação das soluções, determinação e verificação da concentração de proteínas solúveis</i>	<i>46</i>
<i>2.2.2.1</i>	<i>Determinação da fração de FITC/proteína (F/P)</i>	<i>47</i>
<i>2.2.2.2</i>	<i>Verificação da concentração de proteína nas amostras de ConBr nativa e ConBr-</i>	<i>48</i>
<i>2.2.2.3</i>	<i>Verificação da concentração de proteína nas amostras de ConBr misturada com FITC)</i>	<i>49</i>

2.2.3	<i>Ensaio de atividade hemaglutinante específica.....</i>	<i>49</i>
2.2.4	<i>Análises no FTIR.....</i>	<i>50</i>
2.3	Experimentos com pontos quânticos.....	50
2.3.1	<i>Conjugação dos pontos quânticos.....</i>	<i>50</i>
2.3.2	<i>Preparação da solução de ConBr-QD Zn/Cd.....</i>	<i>51</i>
2.3.3	<i>Ensaio de atividade hemaglutinante específica.....</i>	<i>51</i>
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
3.1	Análises no FTIR	52
3.1.1	<i>ConBr conjugada com FITC</i>	<i>52</i>
3.2	Testes de atividade hemaglutinante específica.....	55
3.2.1	<i>ConBr conjugada com FITC</i>	<i>55</i>
3.2.2	<i>ConBr conjugada com pontos quânticos.....</i>	<i>57</i>
4.	CONCLUSÕES.....	59
5.	PERSPECTIVAS.....	60
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

1. INTRODUÇÃO

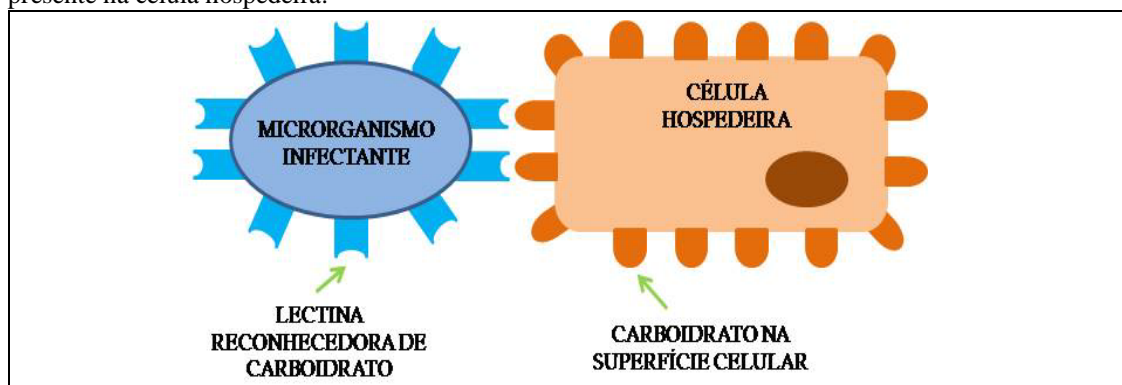
1.1 Lectinas

1.1.1 Conceito e classificação

Lectinas podem ser definidas como proteínas de origem não imune que reconhecem e se ligam de forma específica a carboidratos estruturais sem modificá-los. Possuem pelo menos um domínio não-catalítico que se liga de forma reversível a um carboidrato específico (PEUMANS & VAN DAMME, 1995), funcionando como mediadoras de informação em sistemas biológicos, como no reconhecimento de moléculas em células e em interações célula-célula. Por esse motivo, esse grupo de proteínas é bastante utilizado em modelos de estudo das interações proteína-carboidrato (GUPTA, SUROLIA, SAMPATHKUMAR, 2010; GOMES *et al.*, 2010) e podem ser utilizadas como alvos terapêuticos ou para entrega de drogas em seu sítio de ação (BIES, LEHR, WOODLEY, 2004).

As lectinas podem ser detectadas desde vírus e microrganismos até animais e plantas, e possuem uma diversidade de funções, como adesão microbiana, reconhecimento célula-célula e via de infecção por microrganismos (ESKO; SHARON, 2009; VEELDERS *et al.*, 2010), como ilustra a Figura 1. O grupo de lectinas mais bem caracterizado é do reino vegetal, pois são geralmente hidrofílicas, de fácil acesso e frequentemente produzida em grandes quantidades (CARRINGTON, AUFFRET, HANKE, 1985; LAM, NAG, 2010).

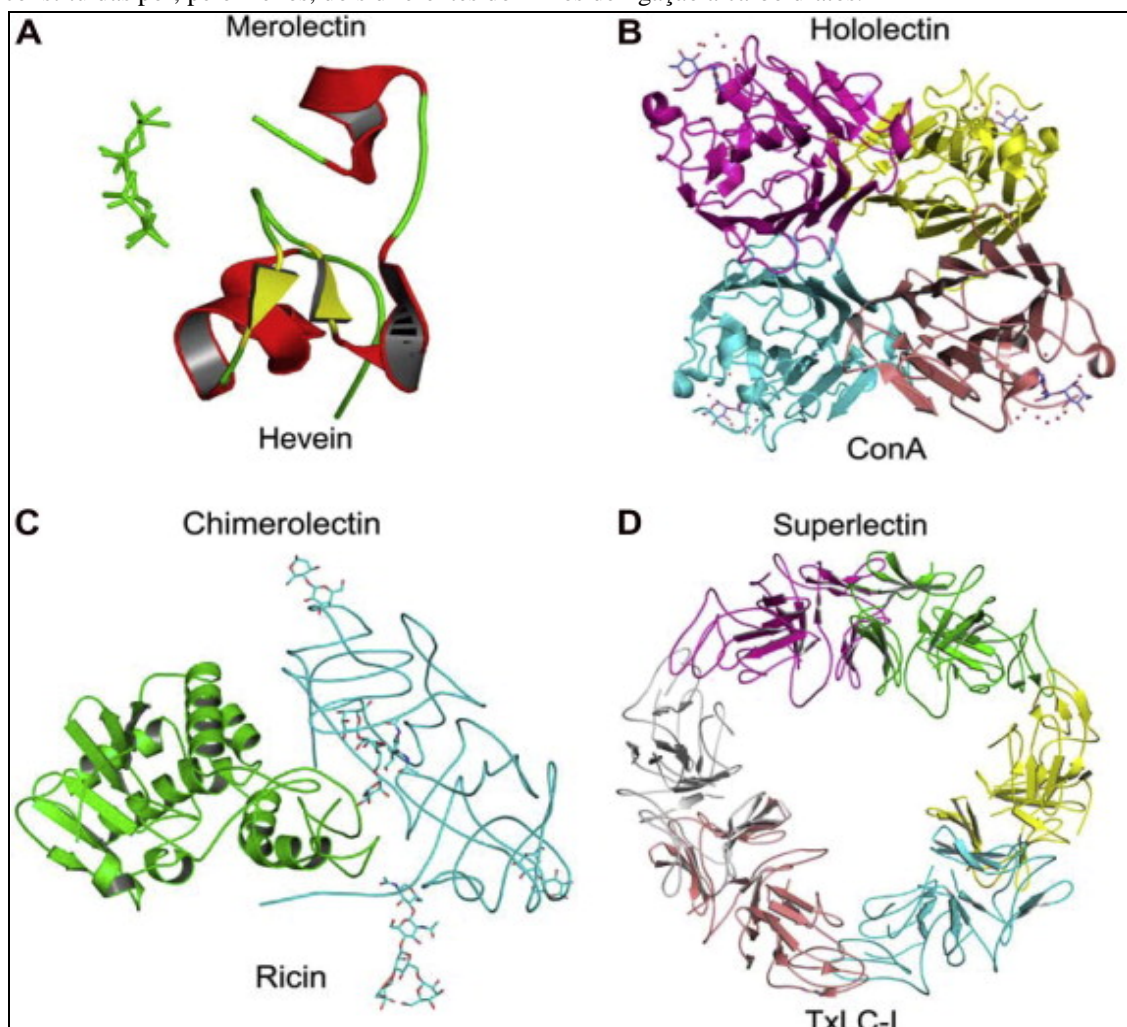
Figura 1 – Infecção de uma célula hospedeira por um microrganismo qualquer. No processo, a proteína reconhedora de carboidrato (lectina) presente no microrganismo se liga ao carboidrato específico presente na célula hospedeira.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2013.

Peumans e Van Damme (1995) e Van Damme *et al.* (1998) *apud* Liu, Bian e Bao (2010), mostraram uma forma de classificação das lectinas que baseia-se em características como a quantidade e o tipo de sítios de ligação a carboidratos. Tais proteínas ficaram distribuídas em quatro grupos, sendo eles: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas, conforme apresentado na Figura 2.

Figura 2 - Representação esquemática dos diferentes grupos de lectinas. As merolectinas (A) consistem de um único domínio de ligação a carboidratos. Hololectinas (B) também são exclusivamente constituídas de domínios de ligação a carboidratos, mas que contêm, pelo menos, dois domínios tais que são idênticos ou homólogos e se ligam a um único açúcar ou açúcares de estrutura semelhante. As quimerolectinas (C) são proteínas de fusão que consistem em um ou mais domínios de ligação a carboidratos porém, possuem também um outro domínio não relacionado à ligação com açúcares. Já as superlectinas (D) são constituídas por, pelo menos, dois diferentes domínios de ligação a carboidratos.



Fonte: Liu, Bian, Bao (2010).

As merolectinas são aquelas que possuem apenas um sítio de ligação a carboidrato, não sendo capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Um

exemplo a ser citado é o da proteína extraída do látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*), a haveína, que se liga à quitina (VAN DAMME *et al.*, 1998).

O grupo das hololectinas compreende as proteínas que possuem dois ou mais sítios de ligação a um mesmo carboidrato e são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Fazem parte dessa classe as hemaglutininas, onde estão presentes a maior parte das lectinas já estudadas (PEUMANS; HAUSE; VAN DAMME, 2000), sendo a maioria lectinas de plantas. Um exemplo é a lectina ConA, que apresenta especificidade a glicose/manose.

Lectinas que possuem um ou mais sítios de ligação a carboidratos, e que apresentam também um outro domínio molecular diferente do sítio de ligação a carboidrato, fazem parte do grupo das quimerolectinas, que são proteínas de fusão. Esse domínio não relacionado à ligação com um açúcar confere às quimerolectinas uma atividade catalítica bem definida ou outra atividade biológica que independa de ligação à carboidratos. São excelentes representantes desse grupo as proteínas inativadoras de ribossomos - RIP (PEUMANS; HAO; VAN DAMME, 2001).

Já as superlectinas são proteínas que possuem pelo menos dois sítios de ligação a carboidratos, os quais são estruturalmente diferentes e reconhecem açúcares também diferentes. Um exemplo desse grupo é a lectina BC2L-C, uma lectina solúvel do patógeno oportunista *Burkholderia cenocepacia* que tem dois domínios distintos, com especificidades únicas e atividades biológicas. O domínio N-terminal de BC2L-C liga-se à fucose, enquanto a parte C-terminal apresenta especificidade para manose e L-glicero-D-mano-heptose (ŠULÁK, *et al.*, 2010).

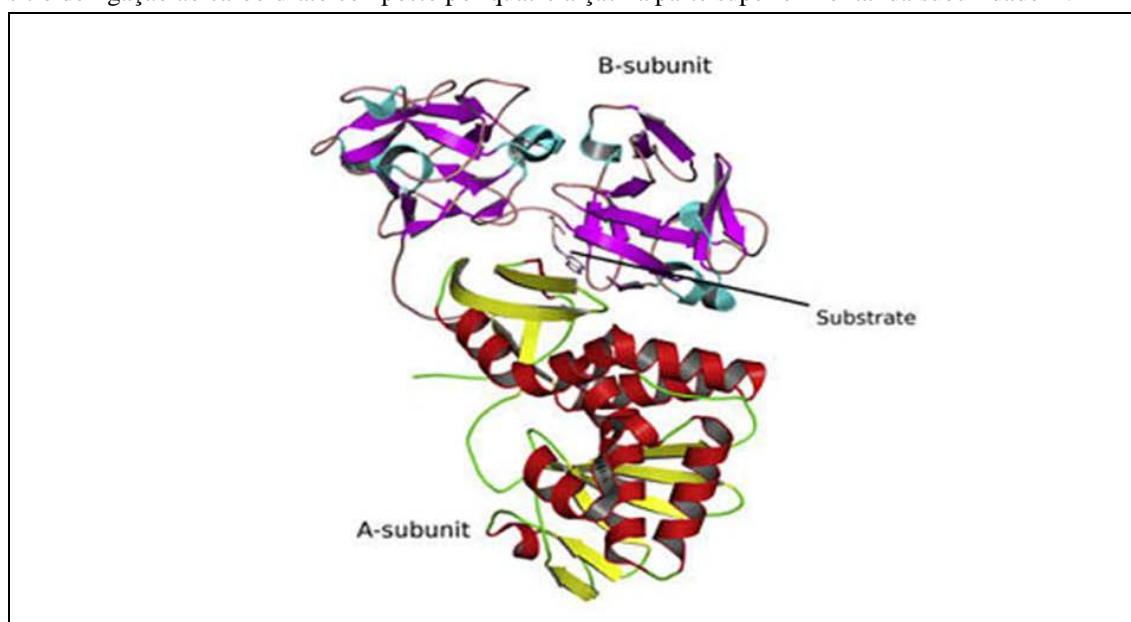
Outra forma de classificar as lectinas, sejam elas de origem animal ou vegetal, é de acordo com o monossacarídeo pelo qual elas exibem maior afinidade, podendo, assim, serem divididas em: ligantes de L-frutose, ligantes de D-glicose/D-manose, ligantes de D-galactose/N-acetil-D-galactosamina, ligantes de N-acetil-D-glicosamina e ligantes de N-acetilneuramínico (RUDIGER, 1998).

Uma terceira forma de classificação de lectinas, referente apenas à lectinas animais, as divide em pelo menos dez famílias de lectinas: Tipo-C, Tipo-I, Tipo-P, Tipo-L, galectinas, eglectinas, pentraxinas, calreticulinas/calnexinas, anexinas e discoidinas. Essa classificação é baseada na especificidade de ligação dessas proteínas aos carboidratos, na homologia de suas estruturas primárias e na relação evolutiva entre elas (MOURA, 2007).

1.1.2 Estrutura, ocorrência e funções

A estrutura tridimensional de lectinas foi primeiro estudada do reino vegetal, (HARDMAN *et al.*, 1971; LOBSANOV *et al.*, 1993), sendo as lectinas de plantas superiores as primeiras a serem descobertas e melhor caracterizadas. As lectinas de leguminosas, ilustradas na Figura 3, normalmente possuem dois núcleos hidrofóbicos, e a maioria contém um sítio de ligação ao carboidrato composto por quatro alças na parte superior frontal da subunidade-A.

Figura 3 - Estrutura tridimensional de lectina de planta leguminosa. As lectinas de leguminosas geralmente possuem dois núcleos hidrofóbicos, uma entre as duas folhas grandes e outro entre a folha encurvada e as alças salientes das bordas desta folha. A maioria das lectinas de leguminosas contém um sítio de ligação ao carboidrato composto por quatro alças na parte superior frontal da subunidade A.

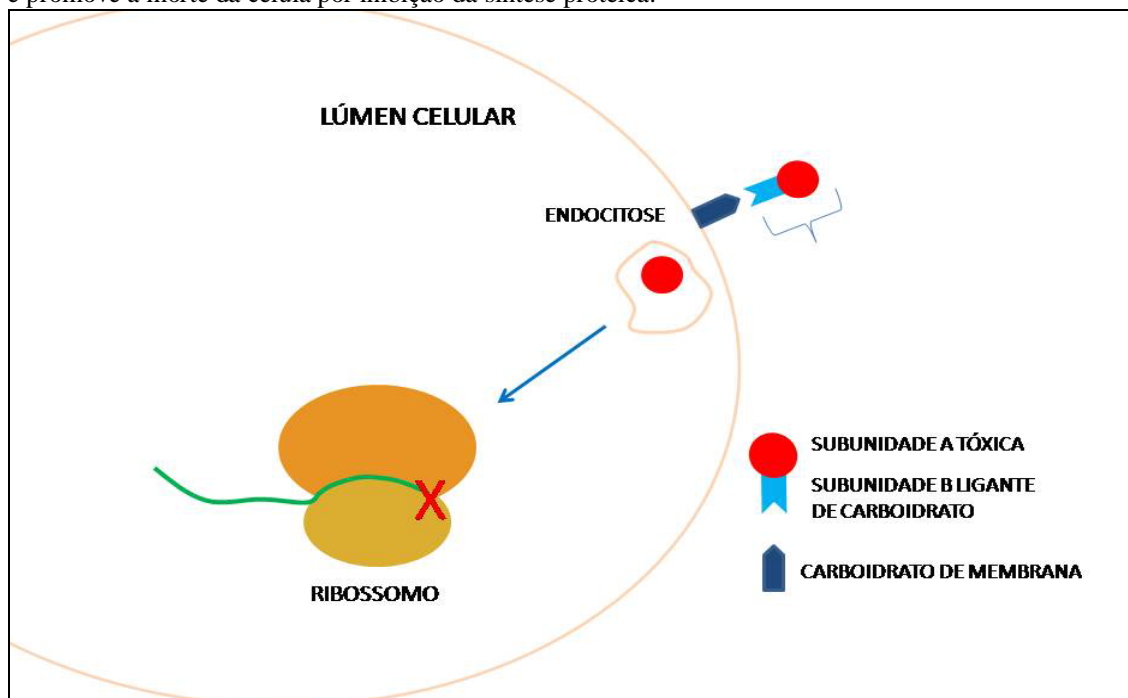


Fonte: Liu, Bian, Bao (2010).

Por apresentarem propriedades particularmente interessantes, essas proteínas tem sido empregadas largamente no campo da fisiologia, bioquímica e ciências biomédicas (CARNEIRO, 2011). Mesmo lectinas semelhantes em suas estruturas primárias e conformacionais podem servir a diferentes propósitos. Entretanto, a verdadeira função biológica dessas proteínas ainda não foi elucidada. Lectinas da família Leguminosae, em plantas, ou galectinas, em animais, com sequências primárias homólogas, podem não possuir uma função comum, pois as especificidades de carboidratos, localização e tempo de produção são diferentes.

As lectinas podem assumir tanto um papel fisiológico como também podem atuar na interação com fontes externas, agressores ou simbioses. As lectinas de *Ricinus communis* (ricina) e de *Phaseolus vulgaris*, por exemplo, são tóxicas e funcionam como protetores contra animais e fitopatógenos. Tal toxicidade é provocada por um elaborado mecanismo executado pelas “proteínas inativadoras de ribossomo” (RIPs, do inglês *Ribosome Inactivated Proteins*). As RIPs inibem especificamente e de forma irreversível a tradução e conseqüentemente a produção de proteínas. Um esquema simplificado da ação da lectina dimérica ricina pode ser observado na Figura 4. A maioria das RIPs de plantas e bactérias, tais como a shiga, das bactérias *Shigella dysenteriae*, exercem os seus efeitos tóxicos por meio da ligação à subunidade 60S dos ribossomos, incapacitando-os para alongamento. Essas proteínas estão amplamente distribuídas na natureza, mas são encontradas predominantemente em plantas, bactérias e fungos. Além de sua atividade em rRNA, algumas RIPs exibem *in vitro* uma variedade de atividades antimicrobianas como antifúngicos, antibacterianos, e anti-virais, inclusive contra o vírus da imunodeficiência humana, o HIV (VIRGILIO, 2010).

Figura 4 - A ricina possui duas subunidades, uma delas com atividade enzimática (A) e outra com um sítio de ligação específica ao açúcar galactose (B), exercendo seu mecanismo de toxicidade através da inativação dos ribossomos. A unidade A da ricina é uma proteína inativadora do ribossomo – RIP. A subunidade B se liga à parede celular e permite a entrada da subunidade A por endocitose para o citossol e promove a morte da célula por inibição da síntese proteica.



Fonte: Ilustração elaborada pelo autor.

Em vertebrados, lectinas de membranas tem sido encontradas em fígado de vários animais (rato, coelho e galinha), em hepatócitos e em células de Kuppfer, associadas com a membrana plasmática e com as membranas intracelulares (SHARON, LIS, 1989 *apud* BEZERRA, 2011). Em répteis foram encontradas lectinas com propriedades físico-químicas semelhantes nos venenos das cobras *Agkistrodum contortrix*, *Ancistrodum piscivarius* e *Crotalus atrox* (GARTNER, OGILVE, 1984). Em mamíferos são encontradas em diversos tecidos, e podem atuar, dentre outros, na adesão celular (BARONDES *et al.*, 1994).

Em invertebrados, as lectinas estão presentes em praticamente todas as classes examinadas, como caranguejos e camarões (NA *et al.*, 2007; SONG *et al.*, 2010). Wang *et al.* (2004) sugerem que uma lectina presente em *Armigeres subalbatus*, espécie de inseto da família Culicida, é responsável pela imunidade inata desse artrópode à bactérias

Quanto às algas, Teixeira *et al.* (2012) afirmaram que a presença de lectinas já foi analisada em cerca de 800 espécies de algas. No entanto, para os autores esse número ainda é pequeno, considerando que há milhares de espécies de algas marinhas. Cerca de 60% das espécies analisadas mostram atividade hemaglutinante. As algas vermelhas são as que apresentam o maior número de espécies com atividade hemaglutinante e também o maior número de lectinas isoladas (SAMPAIO, ROGERS, BARWELL, 1998).

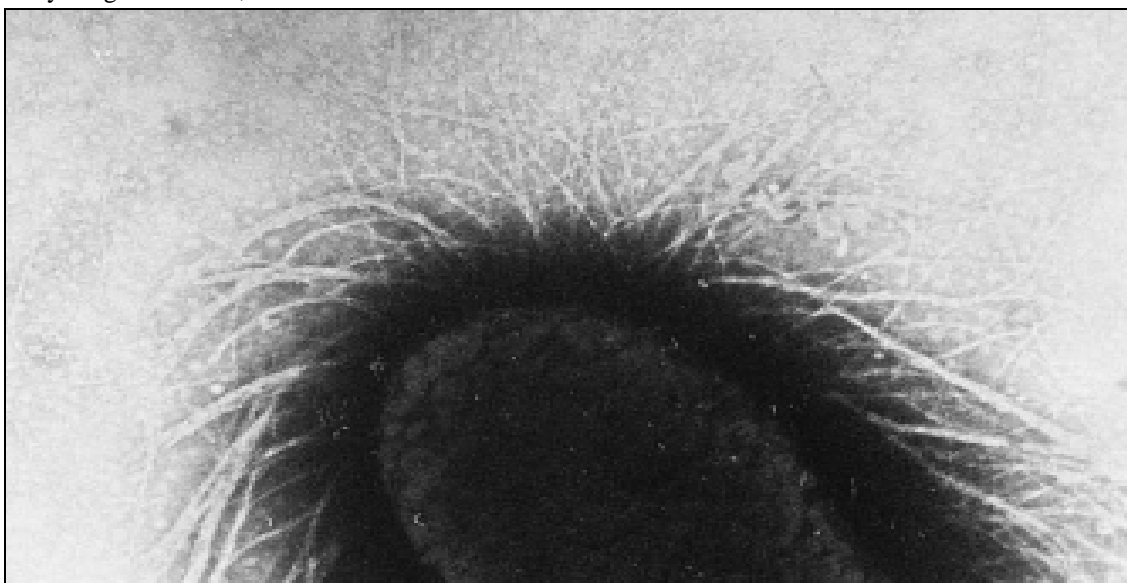
Devido a grande disponibilidade de sementes e sua facilidade de isolamento, as lectinas de plantas vasculares tem sido as mais bem estudadas. Na classe das angiospermas, a família Gramineae (SHIBUYA *et al.*, 1988) possui o maior número de lectinas isoladas e caracterizadas. São diversos os trabalhos envolvendo lectinas de plantas: Schoupe *et al.* (2011) observaram que a lectina Nictaba, presente no tabaco (*Nicotiana tabacum*), é um membro de uma nova classe de lectinas de plantas que residem no núcleo e no citoplasma das células de tabaco, e sua expressão somente é observada depois da planta ter sido submetida a situações de estresse, tais como o ataque de insetos; Yamaji *et al.* (2012) analisaram a resistência de certos ecotipos de *Arabidopsis thaliana* a um vírus e esse estudo revelou que o gene da lectina JAX1 é responsável pela resistência.

As lectinas também podem ser encontradas em fungos. A descoberta de lectina fúngica teve início com o estudo toxicológico em fungos superiores. A primeira hemaglutinina de origem fúngica foi descoberta em *Amanita muscaria* (FORD, 1911).

Podem estar envolvidas com o crescimento e a morfogênese, como na coesão das hifas durante o desenvolvimento; na dormência do micélio; e no reconhecimento molecular durante o estágio inicial de formação de micorrizas (GUILLOT, KONSKA, 1997).

Diversas bactérias produzem lectinas que comumente fazem parte de suas fímbrias. As lectinas bacterianas parecem funcionar também nas etapas iniciais das infecções, como por exemplo, quando ocorre a aderência das bactérias a células epiteliais do trato urinário e gastrintestinal. A bactéria *Escherichia coli*, mostrada na Figura 5, apresenta em suas fímbrias a lectina GafD, que participa tanto da biogênese fimbrial como também no reconhecimento de N-Acetyl-D-Glucosamine (SAARELA, *et al.* 1995). *Porphyromonas gingivalis*, um patógeno com importância etiológica em doenças periodontais, liga-se através de suas fímbrias a estruturas periodontais contendo glicoproteínas (SOJAR, SHARMA, GENCO, 2004). As lectinas também estão envolvidas no processo de adesão de *Corynebacterium diphtheriae* aos seus hospedeiros (COLOMBO *et al.*, 2001).

Figura 5 - Bactéria *E. coli* uropatogênica e suas fímbrias, as quais possuem uma lectina específica para N-acetyl-D-glucosamine, a GafD.



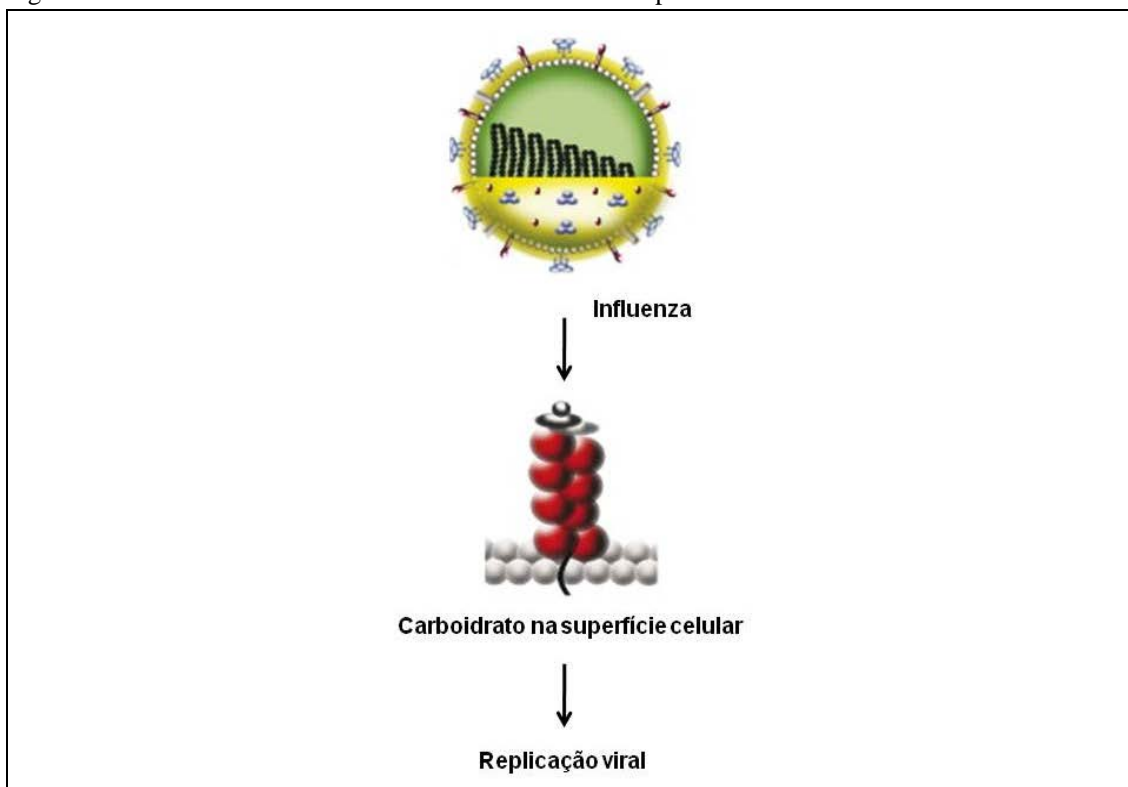
Fonte: Saarela *et al.*, 1995.

Em protozoários, a lectina de *Entamoeba histolytica* parece desempenhar importante papel na citotoxicidade em células epiteliais do cólon e atuando na etapa de aderência á célula hospedeira (SAFFER, PETRI, 1991). WOOTTON *et al.* (2007) identificaram uma lectina de ligação a manose, Ca^{2+} dependente, no dinoflagelado marinho *Oxyrrhis marina*, a qual é utilizada como um receptor no reconhecimento de

presa. O bloqueio do receptor utilizando de manose-BSA foi capaz de inibir a ingestão de presas como o fitoplâncton *Isochrysis galbana* em 60%.

Nos vírus, as lectinas parecem estar envolvidas com a adesão á célula hospedeira. Como mostrado na Figura 6, a infecção pelo vírus da influenza tem início com a adesão, onde uma hemaglutinina presente no vírus reconhece e se liga a resíduos de ácido siálico existentes na superfície da célula hospedeira (VIGERUST, SHEPHERD, 2007).

Figura 6 - Processo de adesão do vírus influenza à célula hospedeira.



Fonte: Ilustração adaptada de Vigerust, Shepherd, 2007.

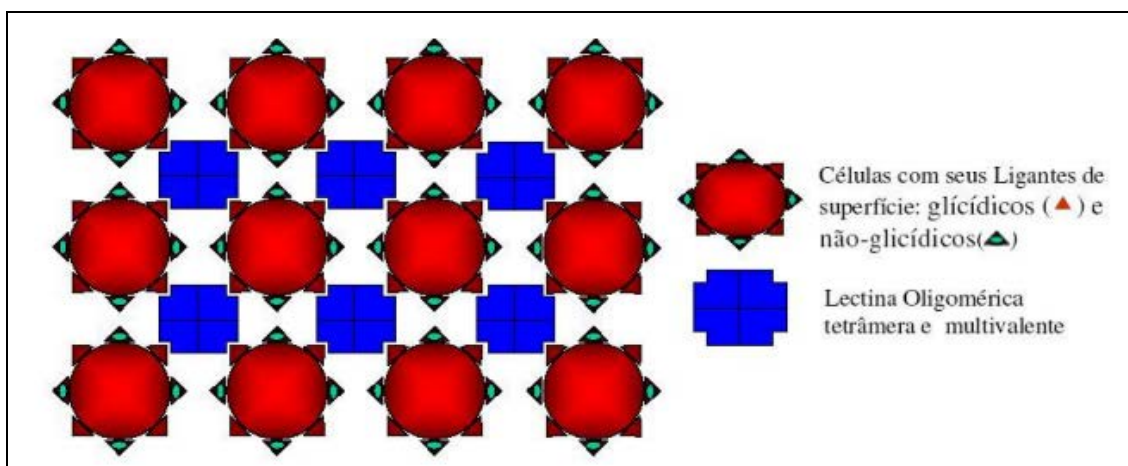
1.1.3 Atividades e aplicabilidade biológica

Como já mencionado anteriormente neste trabalho, existe sobre a superfície celular carboidratos na forma de glicoproteínas, glicolipídeos e polissacarídeos que participam diretamente em muitos processos celulares, como a interação célula-célula, sendo assim elementos determinantes de reconhecimento em uma grande variedade de processos biológicos. Assim, pelo fato das lectinas muitas vezes detectarem estas diferenças de configuração dos carboidratos, elas seriam instrumentos poderosos para esta troca de informações entre células.

As possibilidades do uso de lectinas como ferramentas biotecnológicas são consideráveis devido ao grande número de trabalhos científicos exibindo atividades biotecnológicas relevantes para essas proteínas (TAKEBE *et al.*, 2012; CAO *et al.*, 2010; LIAO, 2003).

As lectinas são proteínas capazes de promover aglutinação. Essa aglutinação resulta da interação entre carboidratos e sítios ligantes a carboidratos presentes nas lectinas, funcionando como uma ponte. Esse fenômeno permite a avaliação da atividade dessas proteínas, pois a aglutinação pode ser visualizada facilmente após um determinado período de incubação. Salvo algumas exceções, as lectinas se ligam a carboidratos presentes na membrana de eritrócitos, promovendo então a aglutinação sanguínea, ou hemaglutinação (SANTANA, 2004). O processo de hemaglutinação é descrito na Figura 7.

Figura 7 – Representação esquemática de aglutinação sanguínea (hemaglutinação) produzida por lectinas.



Fonte: Santana, 2004.

Algumas lectinas demonstram atividade antibacteriana (HOLANDA *et al.*, 2005; WONG *et al.*, 2010) enquanto outras podem interferir no processo de formação de biofilmes microbianos (TEIXEIRA *et al.*, 2006).

Ao estudar a atividade de lectinas de duas espécies de algas marinhas vermelhas, *Eucheuma serra* e *Galaxaura marginata*, Liao (2003) confirmou atividade antibiótica contra vírus marinhos. Os resultados indicaram que muitos dos extratos salinos das espécies de algas foram ativos contra *V. vulnificus*, um patógeno de peixes.

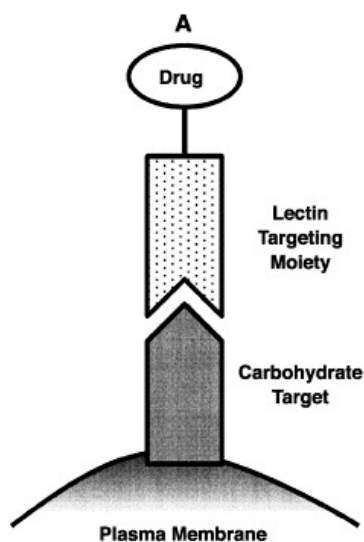
Avanços recentes de estudos pré-clínicos e clínicos de lectinas de plantas apontam-nas como potenciais drogas anti-neoplásicas na terapêutica do câncer no futuro

(LIU, BIAN, BAO, 2010). Nas duas últimas décadas, as lectinas de plantas têm sido usadas como ferramentas de reconhecimento para diferenciar tumores benignos de malignos enquanto várias lectinas têm sido adotadas para tratamento alternativo de câncer (GORELIK, GALILI, RAZ, 2001; SCHUMACHER *et al.*, 2003). Poiroux *et al.* (2011) estudaram a capacidade de morniga G, uma lectina de planta, como ligante em células cancerosas, encontrando bons resultados na utilização dessas lectinas no reconhecimento dessas células.

Recentemente, vários estudos têm ainda apresentado as atividades anti-tumorais de lectinas de plantas contra uma variedade de células malignas. Lectinas, tais como ConA e PCL podem induzir autofagia após internalização em células tumorais (NARAYANAN *et al.* 2005; LIU *et al.* 2009).

Sistemas de distribuição de drogas baseados na ligação dessas à lectinas tem aplicabilidade na entrega de medicamentos a determinadas células, como as células do cólon, por exemplo (MINKO, 2004). Um esquema demonstrando esta entrega de uma droga está ilustrado na Figura 8.

Figura 8 – Esquema da entrega de droga ou fármaco a uma célula específica baseado na ligação da droga a uma lectina.



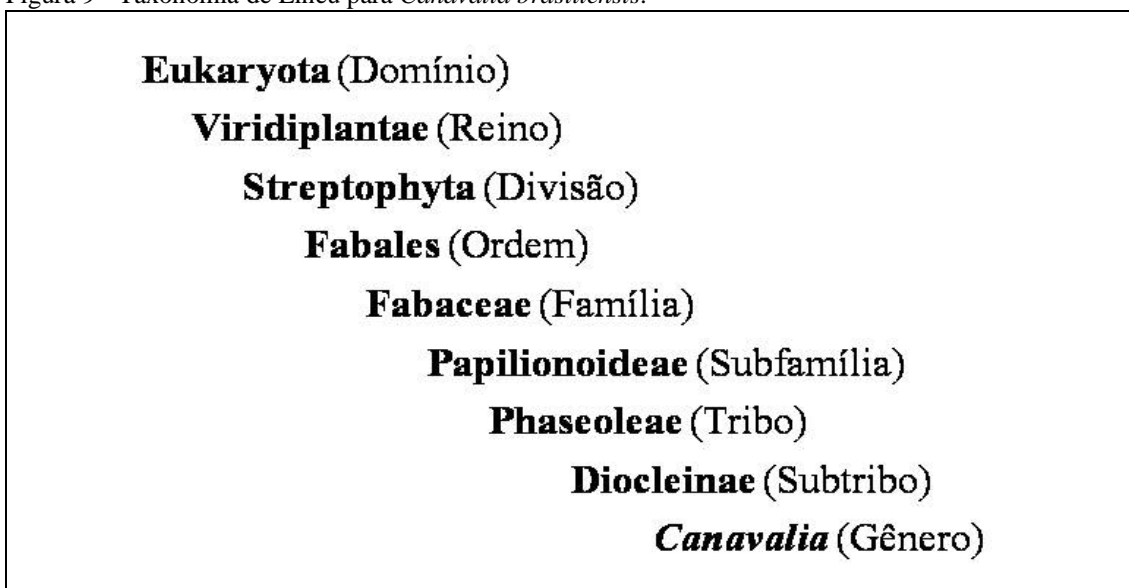
Fonte: Minko (2004).

Lectinas isoladas a partir de algas vermelhas e azuis mostram potencial atividade contra o vírus da Hepatite C (HCV, do inglês *Hepatitis C Virus*), tanto *in vitro* como *in vivo*. Essas proteínas inibem a infectividade viral pela ligação à glicoproteína E2 do envelope de HCV, bloqueando a entrada do vírus para os hepatócitos humanos (TAKEBE *et al.*, 2012).

1.1.4 ConBr

A lectina ConBr (Concanavalina-Br) é uma proteína tetramérica encontrada em sementes da leguminosa *Canavalia brasiliensis* Mart. Ex Benth, espécie da subtribo Diocleinae popularmente conhecida como feijão-de-boi. A taxonomia de *Canavalia brasiliensis* é mostrada na Figura 9 e a morfologia da planta, bem como suas sementes, estão ilustradas na Figura 10.

Figura 9 - Taxonomia de Lineu para *Canavalia brasiliensis*.



Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, com informações obtidas em <<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=3ju9>>.

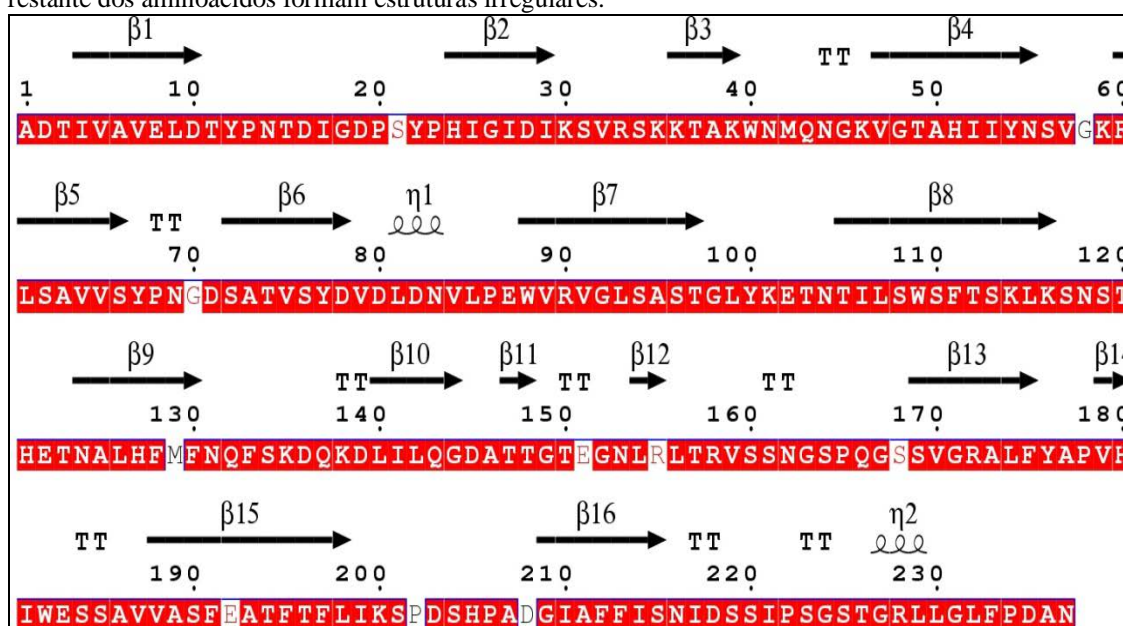
Figura 10 – Planta *Canavalia brasiliensis*, à esquerda; e suas sementes, à direita, conhecida como feijão-de-boi.



Fonte: *Canavalia Brasiliensis*, 2013.

A estrutura tridimensional de ConBr é composta de quatro subunidades idênticas, cada uma com 25 KDa, e esta proteína liga-se com especificidade a resíduos dos carboidratos D-Glucose, D-Manose, e seus derivados (CAVADA *et al.*, 2001). A proteína possui 237 resíduos de aminoácidos, que estão alinhados conforme mostrado na Figura 11.

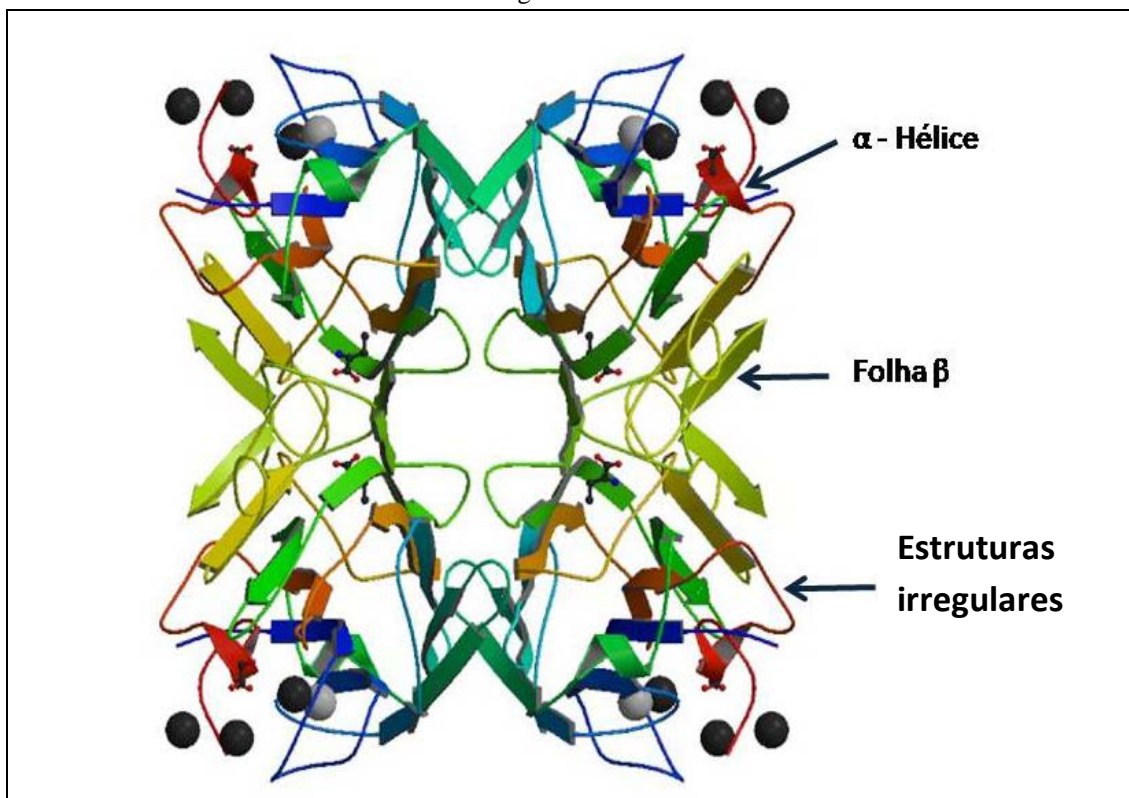
Figura 11 – Alinhamento dos resíduos de aminoácidos da proteína ConBr. Resíduos identificados por setas correspondem a folhas β ; resíduos representados por uma mola formam estruturas em α -hélice; e o restante dos aminoácidos formam estruturas irregulares.



Fonte: Figura elaborada em: <<http://espript.ibcp.fr/ESPrIPT/ESPrIPT/>>.

Na proteína encontram-se estruturas em α -hélice, folhas β e estruturas irregulares (do inglês, *coil*), nas proporções de, respectivamente, 6,4, 41,4 e 52,2% em área. Detalhes da estrutura secundária e tridimensional de ConBr estão apresentados na Figura 12. Para melhor compreensão da ilustração, reitera-se que apenas as partes em vermelho, em cada monômero, representam as estruturas em α -hélice; as estruturas coloridas em forma de setas representam as folhas β e as demais estruturas, que aparecem coloridas, mas bem finas, são referentes às estruturas irregulares.

Figura 12 - Estrutura geral da lectina tetramérica ConBr e a localização relativa das quatro subunidades. Em vermelho estão as estruturas em α -hélice; setas coloridas representam as folhas β ; e demais estruturas coloridas e finas são referentes às estruturas irregulares.



Fonte: Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=3ju9>).

A ConBr foi isolada e caracterizada por Moreira e Cavada (1984), ao estudarem a germinação de sementes de *Canavalia brasiliensis* no escuro. ConBr possui alto grau de semelhança com a ConcanavalinaA (ConA), lectina de *Canavalia ensiformes*, possuindo 99% de sua sequência de aminoácidos idêntica a sequência de ConA e a mesma especificidade de ligação à glicose/manose, apesar de apresentarem *in vitro* diferentes atividades biológicas (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997). Os mesmos autores sugerem, ainda, que tais diferenças nas propriedades biológicas dessas lectinas podem ocorrer devido às diferenças existentes em suas estruturas quaternárias.

As propriedades biológicas da ConBr lhe conferem grande potencial biotecnológico (CAVADA *et al.*, 2001). O efeito de ConBr sobre o crescimento de leveduras isoladas a partir de secreções vaginais foi avaliado por Gomes *et al.* (2012), e a lectina mostrou potencial antifúngico, demonstrando-se promissora no desenvolvimento de estratégias terapêuticas contra infecções fúngicas vaginais. Ao estudarem os efeitos de três lectinas em ratos, sendo uma delas a ConBr, Barbosa *et al.* (2001) verificaram que essa lectina apresentou alta capacidade estimulante sobre as células T dos linfonodos. Elas foram capazes de induzir a apoptose e a inflamação.

Cavalcante *et al.* (2011), ao verificarem a ação inibitória e antibiofilmes de lectinas da subtribo Diocleinae contra *Streptococcus mutans* e *Streptococcus oralis*, mostraram que a ConBr apresentou atividade inibitória sobre *S. mutans*, porém estimulou significativamente o crescimento de *S. oralis* quando contactada a células planctônicas. Também foi relatado que a administração *in vivo* de ConBr foi protetora contra lesões de ratos BALB/c na infecção desses por *Leishmania amazonensis* (BARRAL-NETTO *et al.* 1996).

Outros estudos avaliaram o efeito antidepressivo de ConBr quando administrada em ratos (BARAUNA, *et al.*, 2006) e sua atividade inseticida sobre *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) e *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) (FREITAS *et al.*, 2011). Jacques *et al.* (2013) analisaram a atividade neuroprotetora da ConBr contra a neurotoxicidade glutamato-induzida e observaram que através de um mecanismo dependente da interação com carboidratos, a lectina impediu a redução da viabilidade das células, sugerindo um efeito neuroprotetor. Russi *et al.* (2012) também estudando os efeitos neuroprotectores de ConBr contra ácido quinolínico, encontraram uma actividade neuroprotetora contra as convulsões induzidas por esse ácido e capacidade para reduzir significativamente a severidade das convulsões. ConBr também poderia ser usada como um imunomodulador, como mostraram Silva *et al.* (2011), pois estimulando o crescimento de esplenócitos e induzindo um aumento da produção de citocinas.

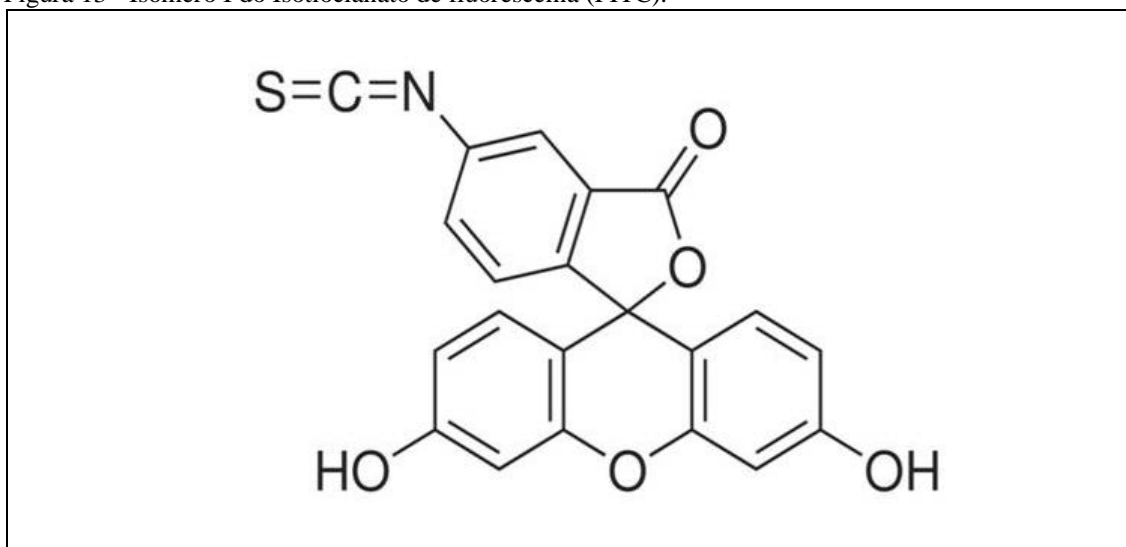
1.2 Isotiocianato de fluoresceína – FITC

O Isotiocianato de fluoresceína é um derivado da fluoresceína, um xanteno largamente utilizado como corante. De fórmula molecular $C_{21}H_{11}NO_5S$, o FITC consiste na molécula original de fluoresceína adicionada de um grupo reativo isocianato ($-N=C=S$), que substitui um átomo de hidrogênio no anel inferior da estrutura. O fluoróforo possui peso molecular de 398g/mol, é excitado a um comprimento de onda mínimo de 495 nm e emite luz a um comprimento de onda de 525 nm (SIGMA, Fluorescein isothiocyanate, Saint Louis, USA).

O FITC possui dois isômeros, que diferem pela localização do grupo tiocianato. O isômero I tem o grupo tiocianato localizado no carbono quatro do anel benzeno, conforme a Figura 13, enquanto o isômero II tem o tiocianato no carbono cinco. Os dois

isômeros não são distintos espectralmente, quer por comprimento de onda ou intensidade. O isômero I é mais facilmente isolado na forma pura, por isso é menos oneroso e mais comumente utilizado para a marcação. Em outras ocasiões, no entanto, os isômeros mistos de FITC são mais adequados (SIGMA, Fluorescein isothiocyanate, Saint Louis, USA).

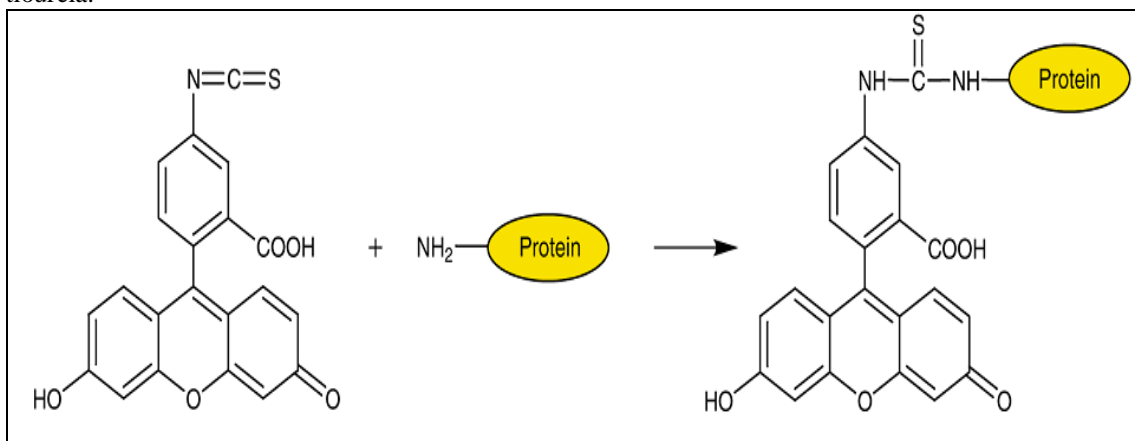
Figura 13 - Isômero I do Isotiocianato de fluoresceína (FITC).



Fonte: SIGMA, Fluorescein isothiocyanate, Saint Louis, USA.

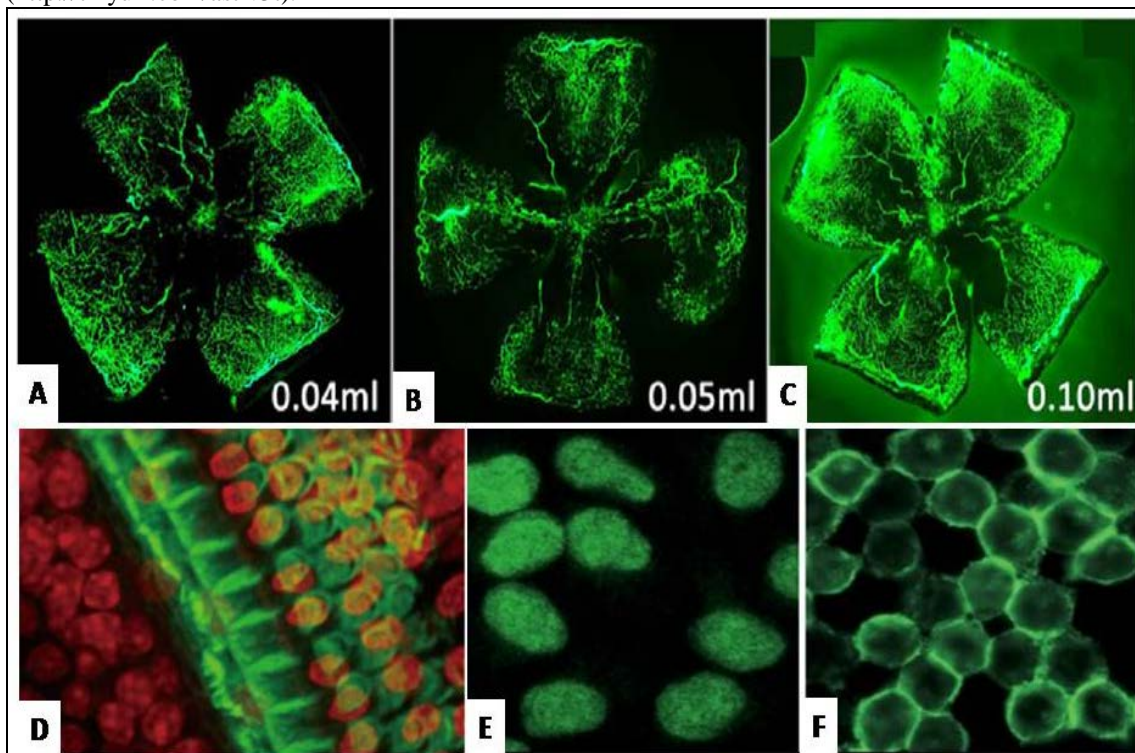
O Isotiocianato de fluoresceína (FITC) é amplamente utilizado para anexar um marcador fluorescente a proteínas através do grupamento amina. O grupo isotiocianato reage com aminas terminais e primárias em proteínas, conforme a Figura 14, formando uma ligação estável tioureia. Tem sido utilizado para a marcação de proteínas incluindo anticorpos e lectinas (SIGMA, Fluorescein isothiocyanate, Saint Louis, USA). Sua fluorescência pode ser observada na Figura 15.

Figura 14 – Demonstração simples da ligação do FITC com proteína formando uma ligação estável tioureia.



Fonte: SIGMA. FluoroTag FITC Conjugation Kit. Saint Louis, Missouri, USA.

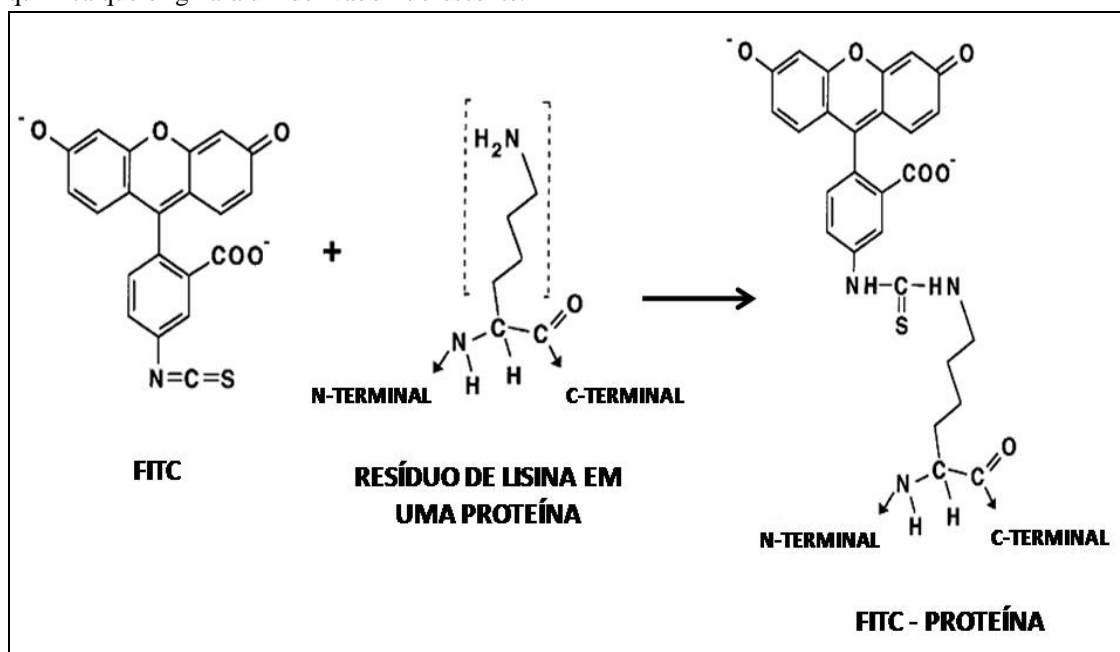
Figura 15 - Estudos que utilizaram FITC como marcados. Em A, B e C, imagem da retina de ratos (LI *et al.* 2011); em D, cóclea de rato (ZHANG *et al.*, 2012); em E e F, imunoglobulina de cabra (<http://tinyurl.com/astlv3t>).



Fonte: Imagens A, B e C: LI *et al.*, 2011; D: Zhang *et AL.*, 2012; E e F: <http://tinyurl.com/astlv3t>.

O procedimento de acoplamento é simples e a reação é rápida. A Figura 16 mostra o processo de ligação do FITC a um resíduo de lisina, em um processo de derivação química que originará um derivado fluorescente. A ligação ocorre através da ligação covalente de um grupo amina reativo do FITC a aminas primárias, tais como o N-terminal ou resíduos de lisina das proteínas (BANKS, 1998).

Figura 16 - Processo de ligação covalente do FITC a um resíduo de lisina, em um processo de derivação química que originará um derivado fluorescente.

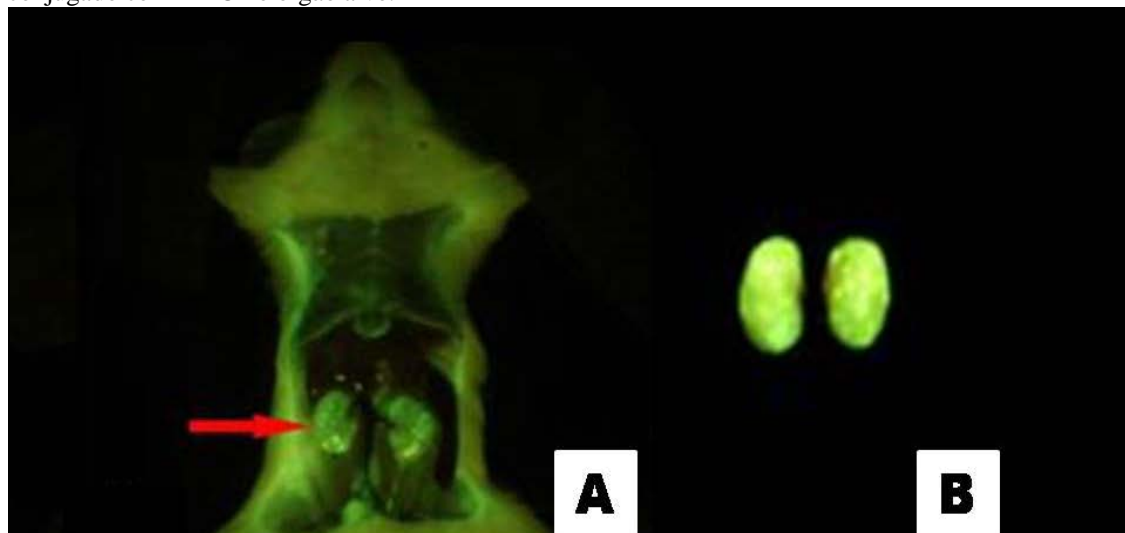


Fonte: Adaptada de Banks, 1998.

O FITC adsorvido à celite (terra de diatomáceas) tem sido reportado por aumentar a eficiência da dispersão de FITC numa solução de proteína. Essa metodologia tem sido utilizada para a marcação do fibrinogênio (SIGMA, Fluorescein isothiocyanate, Saint Louis, USA).

Diversos são os trabalhos realizados utilizando o FITC como marcador, como ilustrado na Figura 17. Ela demonstra bem a visualização do FITC como marcador *in vivo*. Ao estudar o perfil do potencial de hidroxietil-quitosana de baixo peso molecular (HQBPM) como transportador do fármaco glicocorticóide prednisolona até os órgãos alvo (rins), He *et al.* (2012) conjugaram as duas substâncias e obtiveram HQBPM-prednisolona. A fim de visualizar o destino do HQBPM-prednisolona após administração intravenosa o isotiocianato de fluoresceína (FITC) foi acoplado ao conjugado. Através de imagens de fluorescência pôde-se observar a predominância do conjugado nos rins de ratos.

Figura 17 - Imagens de fluorescência de um rato após a injeção do conjugado de hidroxietil-quitosana ligado ao FITC (A) e de seus rins, separadamente, demonstrando a predominância da ligação do conjugado com FITC no órgão alvo.



Fonte: He *et al.*, 2012.

Com o objetivo de estudar os mecanismos de absorção celular e a citocompatibilidade de nanopartículas de quitosana hidrofílica aplicadas ao controle da taxa de liberação de fármacos em sistemas biológicos para aumentar a duração da ação de um agente terapêutico, Hu *et al.* (2012) realizaram o encapsulamento de FITC-BSA em nanopartículas.

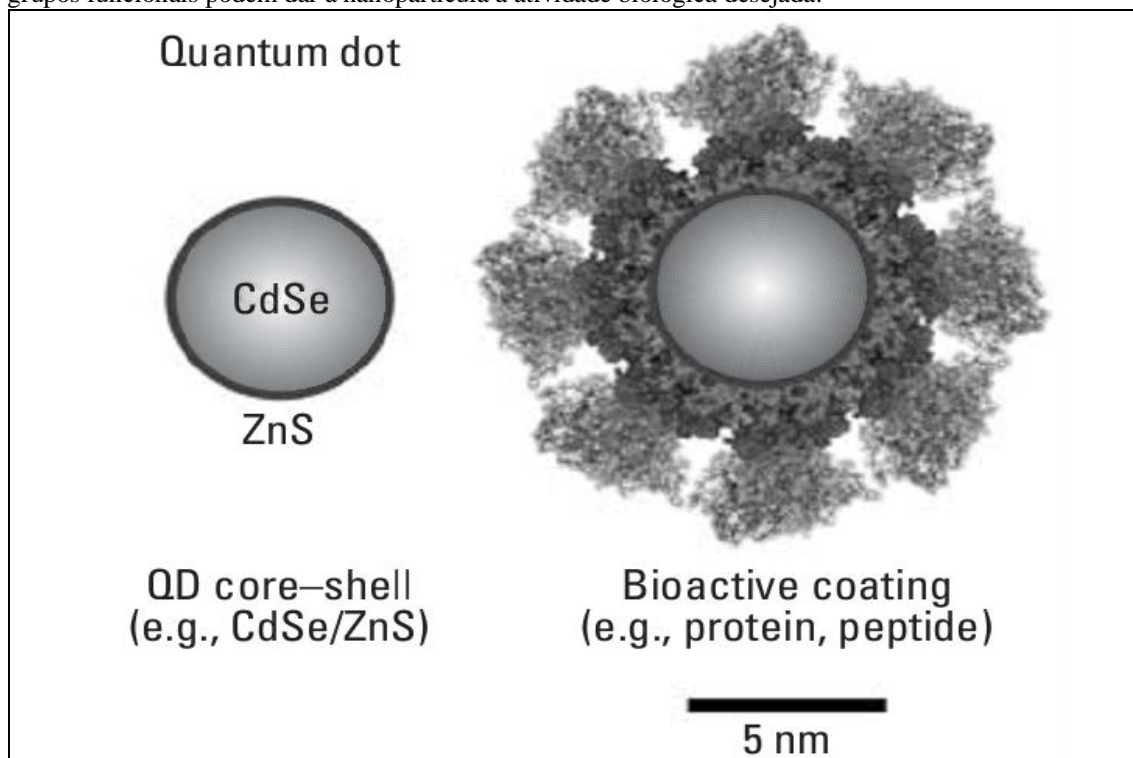
FITC de alto e baixo pesos moleculares ligados a dextranos são utilizados para avaliar o rompimento da barreira hematoencefálica (HOFFMAN *et al.*, 2011) e para observar vasos da retina de ratos (LI *et al.* 2011). Oliveira (2007) investigou o efeito crioprotetor da inclusão de colesterol nas membranas espermáticas antes do congelamento sobre a motilidade, a integridade funcional e física da membrana plasmática pós-descongelamento utilizando FITC ligado à lectina de *Arachis hypogaea* (PNA), que por sua vez, é capaz de ligar-se a carboidratos presentes no acrossoma do espermatozóide.

1.3 Pontos quânticos

Pontos quânticos são nanocristais semicondutores com singulares propriedades ópticas e elétricas, com tamanhos variando entre 2 e 100 nm. Estruturalmente, consistem de um núcleo metalóide cristalino (muitas vezes denominado de caroço) e uma casca, que protege o núcleo e o torna biodisponível, como na Figura 18. Uma

variedade de complexos de metais pode estar presente nos núcleos de pontos quânticos, tais como semicondutores, metais nobres, e metais de transição (HARDMAN, 2006).

Figura 18 - Representação esquemática de pontos quânticos: um núcleo metalóide e uma casca que protege o núcleo e torna o ponto quântico biodisponível. A adição outras formas de revestimento ou grupos funcionais podem dar à nanopartícula a atividade biológica desejada.



Fonte: Hardman, 2006.

Atualmente os pontos quânticos estão sendo amplamente aplicados na indústria eletrônica e especialmente na área biomédica devido a sua fluorescência, o que os torna ideais para fluoróforos em diagnóstico por imageamento (HARDMAN, 2006). A exemplo disso, diversos autores tem citado o potencial dos pontos quânticos como sondas utilizadas na marcação de células cancerosas (HARDMAN, 2006; FRASCO, CHANIOTAKES, 2010; MICHALET, *et al.*, 2005; MEDINTZ *et al.*, 2005; GAO, CHEN, CHENG, 2010; WAGNER, LI, LI, 2010; KAIRDOLF *et al.*, 2013).

Uma característica atraente dos pontos quânticos é a possibilidade de detecção simultânea de múltiplos alvos a diferentes comprimentos de onda com um simples comprimento de onda de excitação, característica essa associada ao tamanho da partícula. A Figura 19 mostra diferentes cores de emissão de pontos quânticos de CdSe/ZnS excitados com uma lâmpada no ultravioleta próximo.

Figura 19 – Dez cores de emissão de pontos quânticos de CdSe/ZnS excitados com uma lâmpada no ultravioleta próximo.



Fonte: Frasco, Chaniotakes, 2010.

Quando sintetizados, os pontos quânticos são inerentemente de natureza hidrofóbica, sendo solúveis somente em solventes apolares por causa da sua camada de superfície hidrofóbica. Dessa forma, os nanocristais não são úteis biologicamente (HARDMAN, 2006; ALIVISATOS, GU, LARABELL, 2005). Para torná-los biologicamente ativos, esses devem ser funcionalizados, em um procedimento onde são adicionados de revestimentos secundários ou grupos funcionais, o que melhora sua solubilidade em água. Tal funcionalização pode ser alcançada através de interações eletrostáticas, adsorção, quelação polivalente, ou ligação covalente, o que lhes atribui características físico-químicas importantes quando se considera sua durabilidade e estabilidade na reatividade *in vivo* (HARDMAN, 2006).

No entanto, para sua utilização como sondas *in vivo* ou outras aplicações biológicas, os pontos quânticos precisam ser, ainda, conjugados com moléculas biológicas, mas sem perturbar a função biológica destas (ALIVISATOS, GU, LARABELL, 2005). A funcionalização dos pontos quânticos pode lhes dar alta especificidade de ação, podendo serem utilizados além do imageamento, como na terapêutica, mediando a entrega de uma droga ou fármaco. Muitas estratégias podem ser utilizadas para promover a ligação de pontos quânticos a biomoléculas, como ligações a grupos tiol ou coordenação por afinidade a metal, onde esses ligantes interagem posteriormente com grupos funcionais ou biomoléculas de modos diversos, como interações eletrostáticas, ligações covalentes ou ligações químicas por afinidade. A Figura 20a apresenta algumas das possíveis formas de conjugação de pontos quânticos.

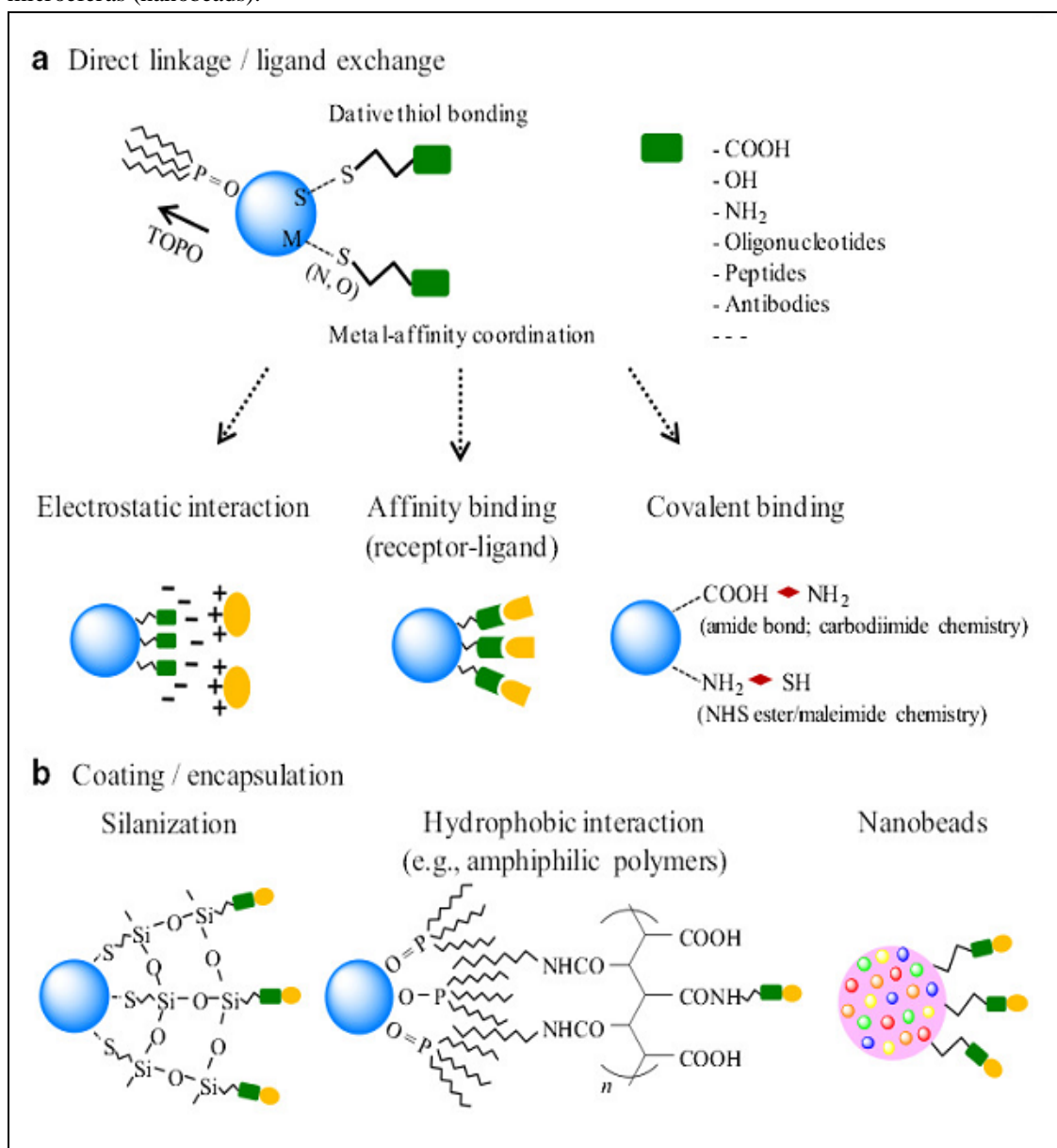
Outra estratégia para utilização de pontos quânticos consiste no encapsulamento desses em matrizes poliméricas, o que rende aos pontos quânticos solubilidade em água, estabilidade química e biocompatibilidade em meio fisiológico. Exemplos de encapsulamento são vistos na Figura 20b, como os envólucros de sílica, de polímeros afifílicos e a formação de micelas ou microesferas (nanobeads).

Erogbogbo *et al.* (2010) elaboraram uma sonda multimodal, que combina as propriedades ópticas de pontos quânticos de silício com as propriedades superparamagnéticas das nanopartículas de óxido de ferro para criar nanosondas magnetofluorescentes biocompatíveis. Nanopartículas múltiplas de cada tipo foram coencapsuladas dentro do núcleo hidrofóbico de micelas biocompatíveis de polietilenoglicol. Sua estabilidade de luminescência em um microambiente modelo para estudo de câncer de próstata foi demonstrado *in vivo* em ratos, abrindo precedentes para o uso destas sondas no imageamento e entrega de drogas em locais específicos. Gao *et al.* (2004), estudando também o uso dessas nanopartículas em células alvo de câncer de próstata, descreveram o desenvolvimento de sondas multifuncionais baseadas em pontos quânticos semicondutores para ligação nas células cancerosas e imageamento em animais vivos. Para tanto, pontos quânticos luminescentes foram encapsulados com um copolímero e ligados a receptores no tumor alvo a fim de entrega de drogas.

Apesar de todos os pontos positivos atribuídos a essas nanopartículas, estudos específicos para avaliação toxicológica (por exemplo, dose, duração, frequência de exposição, mecanismos de ação) ainda são poucos. O comprometimento do revestimento pode revelar o núcleo metalóide, que pode ser tóxico, tanto na forma original de composição, como o Cd/Te, como na forma de seus metais constituintes, a exemplo do Cd elementar. A degradação do revestimento também pode resultar em reações indesejáveis não previsíveis *in vivo*.

É difícil mensurar a toxicidade de pontos quânticos, dada a sua diversidade. Cada tipo individual de ponto quântico possui suas próprias propriedades físico-químicas, que são determinantes para seu grau de toxicidade. A toxicidade depende de múltiplos fatores derivados tanto das propriedades físico-químicas individuais dos pontos quânticos como das condições ambientais a que estão sujeitos: tamanho, carga, concentração, revestimento exterior, grupos funcionais e estabilidade fotolítica e oxidativa.

Figura 20 - Diferentes estratégias utilizadas para ligação de pontos quânticos a biomoléculas. Em a, ligações a grupos tiol ou a metal, com posterior interação a biomoléculas, como interações eletrostáticas, ligações covalentes ou ligações químicas por afinidade; em b, o encapsulamento das nanopartículas em matrizes poliméricas, como o envólucro de sílica, de polímeros anfifílicos e a formação de micelas ou microfibras (nanobeads).



Fonte: Frisco, 2010.

1.4 Espectroscopia de Infravermelho

O infravermelho e demais métodos espectroscópicos modernos como a ressonância magnética nuclear, espectroscopia na região do ultravioleta-visível e espectrometria de massas constituem hoje os principais recursos para a identificação e elucidação estrutural de substâncias orgânicas (LOPES, FASCIO, 2004). A espectroscopia de infravermelho é aplicada às determinações qualitativa e quantitativa

de vários tipos de espécies moleculares, especialmente compostos orgânicos e espécies de interesse em bioquímica.

Os espectros de absorção, emissão e reflexão no infravermelho de espécies moleculares se originam de diversas variações de energia produzidas por transições de moléculas de um estado de energia vibracional ou rotacional para outro (HOLLER, SKOOG, CROUCH, 2009). Para absorver radiação infravermelha, uma molécula deve sofrer variação no seu momento de dipolo durante seu movimento rotacional ou vibracional. Somente dessa forma o campo elétrico da radiação pode interagir com a molécula e causar variações na amplitude de seus movimentos (HOLLER, SKOOG, CROUCH, 2009).

Por exemplo, a distribuição de carga ao longo de uma molécula composta por átomos de diferentes densidades eletrônicas, ou seja, uma molécula polar, é assimétrica, logo, existe um momento de dipolo. Quando tal molécula vibra ou faz movimento de rotação em torno dos seus centros de massa, ocorre uma oscilação regular em seu momento dipolo, gerando um campo que pode interagir com o campo elétrico associado à radiação. Se a frequência da radiação é exatamente igual à frequência natural da molécula, ocorre absorção de radiação causando variação na amplitude da vibração molecular. Em contraposição, moléculas homonucleares, como O_2 ou Cl_2 , não absorvem radiação no infravermelho, pois não possuem um momento dipolo durante seus movimentos de vibração ou rotação (HOLLER, SKOOG, CROUCH, 2009).

1.4.1 Instrumentação no Infravermelho

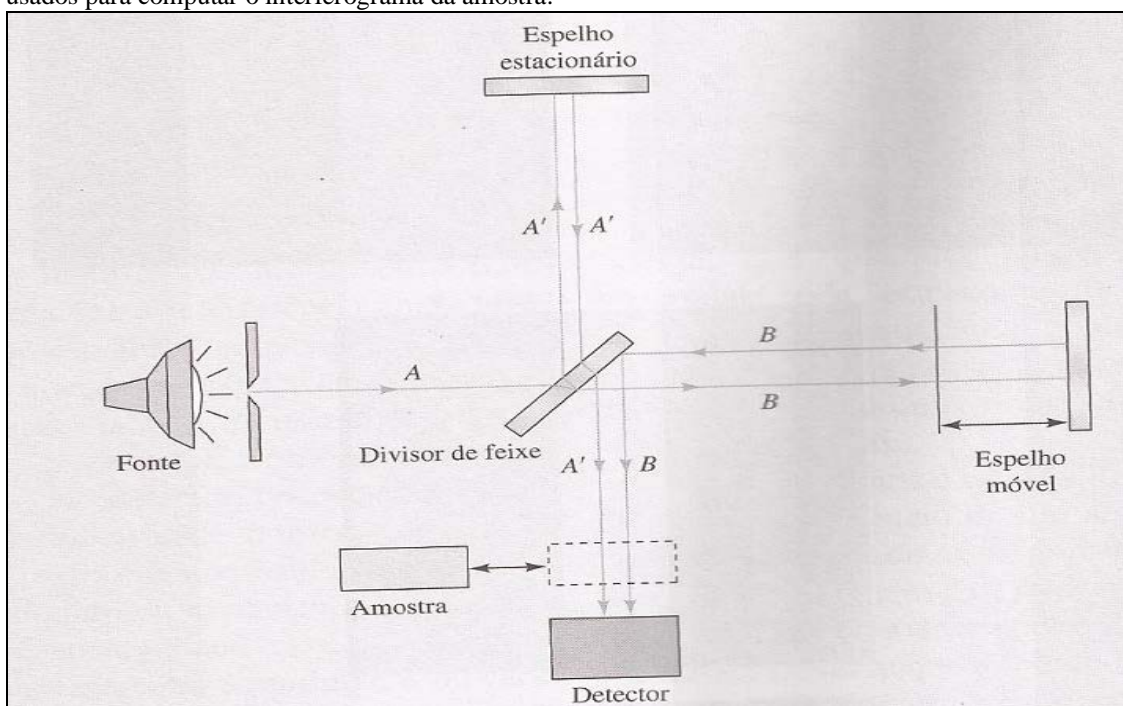
Para efetuar medidas de absorção no infravermelho estão disponíveis três tipos de instrumentos: espectrofotômetros dispersivos; espectrofotômetros com transformada de Fourier (FTIR, do inglês: *Fourier Transformed Infrared*) e fotômetros não-dispersivos. Até os anos 1980, os instrumentos mais amplamente empregados para medida no infravermelho eram os fotômetros dispersivos. Atualmente, estes tem sido substituídos principalmente por espectrômetros com transformada de Fourier devido a sua velocidade, melhor relação sinal/ruído, confiabilidade e conveniência (HARRIS, 2005; HOLLER, SKOOG, CROUCH, 2009; SKOOG *et al.*, 2008).

O espectrômetro com transformada de Fourier utiliza um dispositivo denominado interferômetro de Michelson, onde a fonte de radiação é dividida em dois feixes que percorrem caminhos ópticos variados e convergem sobre um mesmo

detector. Essa variação dos feixes forma um padrão de interferência, chamado de interferograma. A Figura 21 mostra um diagrama do funcionamento de um interferômetro (SKOOG *et al.*,2008).

Antes da análise da amostra, é obtido um interferograma, chamado de interferograma de referência. Em seguida, a amostra é inserida no equipamento e é, então, obtido o interferograma da amostra. Os dois interferogramas são empregados para computar o espectro de absorção da amostra (HOLLER, SKOOG, CROUCH, 2009; SKOOG *et al.*,2008).

Figura 21 – Diagrama de um interferômetro de Michelson. Um feixe da fonte de luz (A) é dividido em dois feixes (A' e B) que percorrem caminhos separados e convergem, em seguida, para o detector. Um padrão de interferência é registrado e chamado de interferograma de referência. Uma amostra é adicionada ao equipamento e um novo interferograma é obtido. Os dois interferogramas são, então, usados para computar o interferograma da amostra.



Fonte: SKOOG *et al.*,2008.

1.4.2 Aplicações da espectrofotometria de absorção no infravermelho

A espectrometria de infravermelho tem alta relevância na determinação da pureza e quantificação de substâncias orgânicas, bem como no controle e acompanhamento de reações e processos de separação. A espectroscopia na região do infravermelho tem sido, também, amplamente utilizada em linhas de produção, no controle de processos industriais (LOPES, FASCIO, 2004).

As aplicações da espectrometria no infravermelho ocorrem em três categorias principais, baseadas nas suas três regiões espectrais: infravermelho próximo, infravermelho médio e infravermelho distante. A região mais amplamente utilizada é a do infravermelho médio, que se estende de 670 a 4000 cm^{-1} . Nesse caso, espectros de absorção, reflexão e emissão são empregados tanto para análise qualitativa como quantitativa (HOLLER, SKOOG, CROUCH, 2009).

As espectrometrias de absorção e reflexão no infravermelho médio são as ferramentas mais importantes para a determinação de estruturas de espécies orgânicas e bioquímicas. O amplo uso de espectrometria no infravermelho para identificar compostos orgânicos começou nos anos de 1950 e revolucionou a forma dos químicos identificarem espécies orgânicas, inorgânicas e biológicas (HOLLER, SKOOG, CROUCH, 2009).

A identificação de um composto orgânico a partir de um espectro desse tipo é um processo de duas etapas. A primeira consiste na determinação dos grupos funcionais mais prováveis de estarem presentes observando-se a região de frequência dos grupos. A segunda etapa envolve uma comparação detalhada do espectro do composto desconhecido com os espectros dos compostos puros que contém todos os grupos funcionais encontrados na primeira etapa. A frequência aproximada na qual um grupo funcional orgânico (N-H, O-H, C-N, entre outros) absorve radiação infravermelha pode ser calculada a partir das massas dos átomos e da constante de força de ligação entre os mesmos. Essas frequências, chamadas de frequências de grupos, são raramente invariantes devido às interações com outras vibrações associadas com um ou ambos os átomos que constituem o grupo. Na Figura 22 pode-se visualizar as frequências de grupos de vários grupos funcionais comuns (HOLLER, SKOOG, CROUCH, 2009).

Figura 22 – Frequências de grupos para as principais funções orgânicas.

Ligação	Tipo de composto	Intervalo de frequência, cm^{-1}
C—H	Alcanos	2850–2970
C—H	Alquenos (>C=C<H)	1340–1470 3010–3095
C—H	Alquinos ($\text{—C}\equiv\text{C—H}$)	675–995 3300
C—H	Anéis aromáticos	3010–3100 690–900
O—H	Álcoois e fenóis monoméricos	3590–3650
	Álcoois e fenóis com ligações de hidrogênio	3200–3600
	Ácidos carboxílicos monoméricos	3500–3650
	Ácidos carboxílicos com ligações de hidrogênio	2500–2700
N—H	Aminas, amidas	3300–3500
C=C	Alquenos	1610–1680
C=C	Anéis aromáticos	1500–1600
C≡C	Alquinos	2100–2260
C—N	Aminas, amidas	1180–1360
C≡N	Nitrilas	2210–2280
C—O	Álcoois, éteres, ácidos carboxílicos, ésteres	1050–1300
C=O	Aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres	1690–1760
NO ₂	Nitro compostos	1500–1570 1300–1370

Fonte: Holler, Skoog e Crouch (2009).

A espectrometria de reflexão no infravermelho apresenta várias aplicações, especialmente em amostras sólidas, que são de difícil manipulação, como filmes e fibras de polímeros, borrachas, produtos agrícolas e muitos outros. Os espectros de reflexão no infravermelho médio, embora não sejam idênticos aos espectros de absorção, são similares na aparência geral. Os espectros de reflectância podem ser empregados tanto para análises qualitativas quanto quantitativas (HOLLER, SKOOG, CROUCH, 2009).

A reflexão da radiação pode ser de quatro tipos: especular, difusa, interna e reflexão total atenuada, sendo mais amplamente usados os espectros de reflexão difusa e reflexão total.

A espectrometria de infravermelho de reflectância difusa com transformada de Fourier é um meio eficaz de se obter diretamente espectros infravermelhos de amostras em pó com um mínimo de preparo da amostra. A espectroscopia de reflexão interna (ATR, do inglês: *attenuated total reflectance*), cujo equipamento está ilustrado na Figura 23, é uma técnica para a obtenção de espectros infravermelhos de amostras que são difíceis de serem manipuladas, como sólidos de solubilidade limitada, filmes, fios, pastas, adesivos e pós (HOLLER, SKOOG, CROUCH, 2009).

Figura 23 - Espectrômetro de reflexão interna (ATR, do inglês: *attenuated total reflectance*).



Fonte: <http://www.bruker.com/products/molecular-vibrational-spectroscopy/fir/alpha/technical-details.html>.

1.4.2.1 Espectroscopia de infravermelho no estudo da estrutura secundária de proteínas

Diversos autores tem relatado o uso de espectroscopia no infravermelho na obtenção de informações acerca da estrutura secundária de proteínas (JACKSON, MANTSCH, 1995; CARBONARO, NUCARA, 2010; CARBONARO, MASELLI, NUCARA, 2012; DEMBERELDORJ *et al.*, 2012; BAIZ *et al.*, 2012).

Na região do infravermelho, existem nove bandas amida para a absorção de proteínas e peptídeos (BARTH, 2007 *apud* CARBONARO, NUCARA, 2010): bandas A e B; e bandas amida I a VII. As bandas I, II e III são geralmente mais empregadas no estudo da estrutura de proteínas.

A absorção na região amida I do infravermelho é a mais utilizada para o estudo de estruturas secundárias de proteínas. A frequência vibracional observada para estruturas secundárias na banda amida I varia de 1630 a 1685 cm^{-1} (ANDERLE, MENDELSON, 1987), e contribuem para a absorção nessa banda as vibrações de estiramento das ligações C=O e C–N dos grupamentos amina. As vibrações oriundas da ligação C=O contribuem em maior proporção para a absorção na banda amida I, cerca de 80% (JACKSON, MANTSCH, 1995).

A banda amida II é observada na faixa de 1520 a 1560 cm^{-1} (ANDERLE, MENDELSON, 1987). Nessa banda contribuem as vibrações de dobramento de N–H e as de estiramento de C–N. Esta banda é considerada menos pura, visto que as

proporções da influência das vibrações na absorção tem proporções de 60% de ligações N–H e 40% de ligações C–N.

Na banda amida III, a absorção é normalmente fraca e ocorre em uma região de vibrações mistas, como as do CH₂ das cadeias laterais, que em geral não estão relacionadas com a estrutura secundária de proteínas (JACKSON, MANTSCH, 1995; CARBONARO, NUCARA, 2010). Por se tratar de uma banda menos definida que as bandas I e II, a banda amida III no estudo de estrutura secundária de proteínas foi durante um bom tempo negligenciada. A faixa de frequências vibracionais nesta banda situa-se entre 1230 e 1300 cm⁻¹(ANDERLE, MENDELSON, 1987). Nesta banda contribuem predominantemente vibrações de estiramento de C–N juntamente com vibrações de dobramento de N–H no plano; e fraca contribuição de vibrações de estiramento de C–C e de dobramento de C=O (JACKSON, MANTSCH, 1995).

Apesar de menos usada, a banda amida III tem apresentado bons resultados na determinação de α -hélices e folhas β . Um ponto positivo dessa banda em relação às bandas amida I e II é que esta não sofre interferência de água tanto no estado líquido como gasoso, diferentemente das outras duas. Para contornar tal interferência, soluções analisadas nas frequências das bandas amida I e II devem ser elaboradas com água deuterada (D₂O) (ANDERLE, MENDELSON, 1987).

1.5 Objetivos

Este trabalho objetivou obter informações sobre as alterações na atividade biológica e na estrutura secundária de ConBr nativa (não conjugada com FITC) e ConBr conjugada com marcadores de interesse em medicina e em biotecnologia.

1.5.1 Objetivos específicos

- Verificar a influência do marcador FITC na estrutura secundária da proteína ConBr.
- Verificar a influência da utilização de pontos quânticos como marcadores na estrutura secundária da proteína ConBr;

- Realizar análises espectrométricas de infravermelho com transformada de Fourier na investigação da estrutura secundária da lectina ConBr nativa, conjugada com FITC, e misturada com FITC;
- Realizar ensaios de atividade hemaglutinante específica com ConBr nativa, conjugada com FITC, misturada com FITC e conjugada com pontos quânticos.

2. METODOLOGIA

2.1 Material vegetal e descrição das amostras

Nesse estudo foi utilizada a lectina de *Canavalia brasiliensis* Mart. Ex Benth, a ConBr (Concanavalina Br).

As amostras da proteína foram divididas da seguinte forma:

- ConBr não conjugada com FITC: ConBr nativa;
- ConBr conjugada com FITC: ConBr-FITC (2%);
- ConBr submetida a todas as etapas do protocolo de conjugação, mas sem a inclusão de FITC: ConBr-
- ConBr misturada com FITC na proporção de 2%: ConBr/FITC (2%);
- ConBr misturada com FITC na proporção de 20%: ConBr/FITC (20%);
- ConBr conjugada com pontos quânticos de Zn/Cd: ConBr-QD Zn/Cd.

2.2 Experimentos com FITC

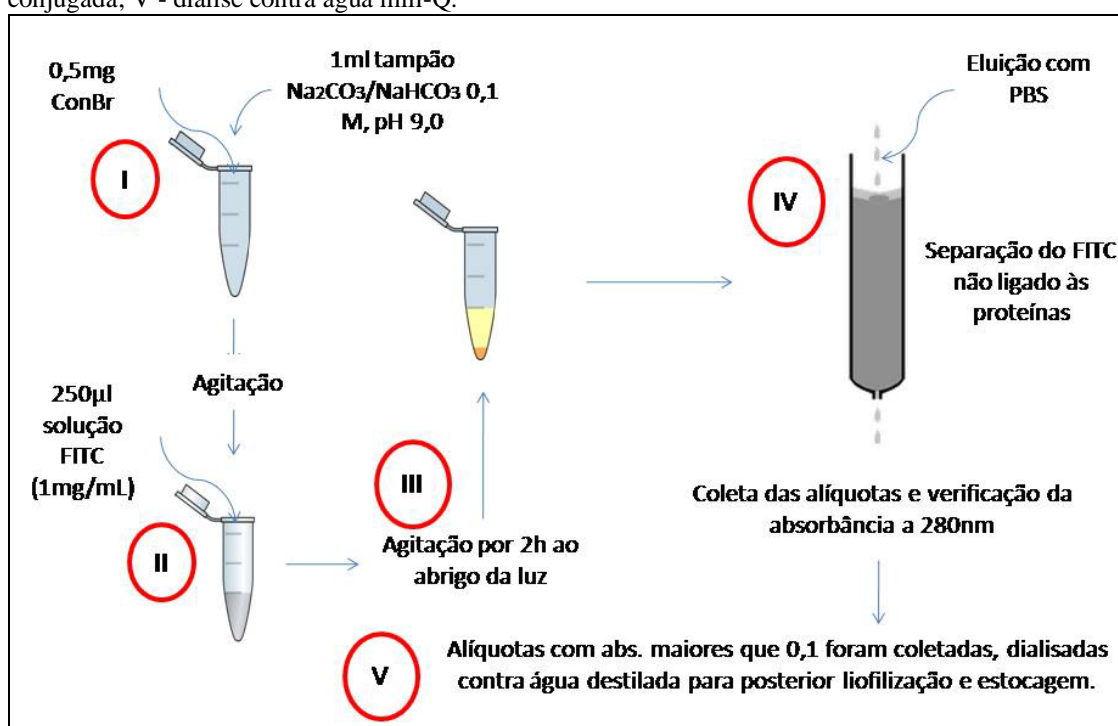
2.2.1 Marcação da lectina com FITC

O processo de marcação de lectinas, indicado no esquema da Figura 24, foi realizado utilizando o protocolo de marcação do kit de marcação de anticorpos “Fluorotagt Fit Conjugation Kit” Stock No. FITC-1 da Sigma Chemical Company. As lectinas foram dissolvidas em 1mL de tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,1M pH 9,0 na concentração de 5mg/mL (Figura 24 – etapa I). Em seguida, adicionou-se glicose 0,1M por 30 minutos, a 37°C.

Após rápida agitação foram adicionados 250µL de uma solução de FITC (1mg/mL) sendo submetida à agitação constante por 2h ao abrigo da luz (Figura 24 – etapas II e III). Após incubação, a fração contendo lectina conjugada com FITC foi separada da não conjugada com FITC por meio de cromatografia de exclusão molecular em coluna PD 10 (Pharmacia LKB – 9,0mL), previamente equilibrada com 30 mL de tampão fosfato salina 0,01M (contendo ainda 27 mM de KCl e : 150 mM de NaCl) pH 7,4 e com fluxo contínuo mantido por força da gravidade.

A amostra contendo lectina e FITC foi aplicada à coluna e eluída em 10 mL de PBS, coletando alíquotas de 1 mL, sendo monitorada a absorvância de cada alíquota a 280nm e 495 nm em espectrofotômetro (Figura 24 – etapa IV). Após as leituras, as alíquotas com absorvância maior que 0,1 foram coletadas e dialisadas contra HCl 0,1M e em seguida contra água mili-Q, para posterior liofilização e estocagem do material para uso (Figura 24 – etapa V).

Figura 24 – Esquema do processo de marcação de ConBr com FITC. I - as lectinas foram dissolvidas em 1mL de tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,1M; II - adição de 250µL de uma solução de FITC (1mg/mL) e III - agitação constante por 2h ao abrigo da luz; IV - Separação por cromatografia de exclusão molecular, em coluna PD 10, das frações contendo lectina conjugada com FITC e não conjugada; V - diálise contra água mili-Q.



Fonte: Ilustração elaborada pelo autor.

2.2.2 Preparação das soluções, determinação e verificação da concentração de proteínas solúveis

Inicialmente foi preparada uma solução de ConBr conjugada com FITC (ConBr-FITC (2%)). Essa solução teve sua quantidade de proteínas determinada por equações oriundas do protocolo Sigma para conjugação de FITC (SIGMA, Fluorescein isothiocyanate, Saint Louis, USA), que será descrita no próximo tópico.

Com base na concentração real de proteína ConBr encontrada na solução de ConBr-FITC (2%), foram preparadas as soluções de ConBr nativa (não conjugada com

FITC), ConBr processada mas não conjugada com FITC (ConBr-) e ConBr misturada com FITC (ConBr/FITC (2%)). As soluções de cada uma dessas amostras foram preparadas com iguais concentrações de proteínas, em miligramas, adicionadas a 1ml de tampão Tris HCl/NaCl. As mesmas concentrações de proteína entre as diferentes amostras foram garantidas através dos procedimentos descritos a seguir.

2.2.2.1 Determinação da fração de FITC/proteína (F/P)

Para garantir que as amostras de ConBr nativa e conjugada com FITC tivessem a mesma concentração de proteínas, foi necessário se estabelecer a proporção entre FITC e proteína, ou seja, a fração FITC/proteína dentro da amostra de ConBr conjugada com o fluoróforo.

A fração molar entre FITC e proteína é definida como a fração de mols de FITC por mols de proteína no conjugado. Para determinar essa fração, uma amostra de ConBr conjugada com FITC, com concentração de 1mg/ml foi posta em cuveta de quartzo e então determinou-se as absorvâncias a 280nm (A_{280}) e a 495nm (A_{495}) por espectrofotometria UV-VIS.

A seguinte equação foi utilizada para determinação da fração entre FITC e proteína (SIGMA, Fluorescein isothiocyanate, Saint Louis, USA):

$$F/P = \frac{PM \times A_{495}/195}{389 \times [A_{280} - (0,35 \times A_{495})] / E^{0,1\%}} = \frac{A_{495} \times C}{[A_{280} - (0,35 \times A_{495})]}$$

onde: $C = \frac{PM \times E^{0,1\%}_{280}}{389 \times 195}$, constante para uma dada proteína;

PM é o peso molecular da proteína.

389 é o peso molecular do FITC.

195 é a absorção $E^{0,1\%}$ de FITC ligado a 490 nm, em pH 13.0.

$(0,35 \times A_{495})$ é o factor de correcção, devido à absorção de FITC a 280 nm.

$E^{0,1\%}_{280}$ é a absorção a 280 nm de uma proteína de 1,0 mg/ml.

A equação ofereceu a proporção molar de FITC e de proteína existente na amostra. Foi obtida uma razão molar de FITC/Proteína de 0,17/0,14, ou seja, para cada 0,17 mols de FITC na amostra havia 0,14 mols de lectina. A partir da massa molar do FITC e da lectina ConBr, que são, respectivamente, 389 e 25000 g/mol, encontrou-se, em massa, uma proporção de 66,13g de FITC para 3500g de ConBR, como abaixo:

1 mol FITC -->389g, logo, 0,17mol --> 66,13g

1 mol ConBr --> 25000g, logo, 0,14 --> 3500g.

Assim, encontrou-se, em mols, uma proporção de 55% de FITC para 45% de ConB, Em massa, essa proporção foi de 98% de ConBR para apenas 2% de FITC.

Para obter a concentração em mg/ml de proteína ConBr contida na amostra, usou-se a seguinte equação:

$$[\text{ConBr nativa}] \text{ (mg/ml)} = \frac{A_{280} - (0,35 \times A_{495})}{1,080}$$

onde 1,080 é a absorvância da solução de ConBr a uma concentração de 1 mg/ml em pH 7,0.

Foi verificado que a solução inicialmente preparada com concentração de 1mg/ml de ConBr conjugada com FITC possuía uma concentração proteica de ConBr de 0,13mg/ml.

2.2.2.2 *Verificação da concentração de proteína nas amostras de ConBr nativa e ConBr-*

Com base na quantidade real de proteína existente na solução de ConBr conjugada com FITC foram preparadas soluções de ConBr nativa e ConBr-, cujas concentrações foram de 0,13mg/ml, a mesma quantidade de proteína encontrada na solução de ConBr conjugada com FITC. Em seguida, essa solução foi analisada em espectrofotômetro UV-VIS a um comprimento de onda de 280nm. Os resultados de absorvância obtidos foram verificados comparando-os com a absorvância da solução da proteína ConBr à concentração de 1mg/ml, que é de 1080, certificando-se que a concentração era exatamente a desejada.

2.2.2.3 Verificação da concentração de proteína nas amostras de ConBr misturada com FITC)

FITC e ConBr nativa foram adicionados em solução aquosa, a uma proporção em massa de 2% de FITC e 98% de ConBr. A solução foi preparada com concentração de proteínas de 0,13mg/ml, que foi garantida através da medida de absorbância da solução.

2.2.3 Ensaio de atividade hemaglutinante específica

A atividade hemaglutinante específica nas amostras foi determinada segundo o método descrito por Moreira & Perrone (1977), adaptado por Ramos *et al.* (1996), usando-se suspensões de hemácias de coelho a 3%. Em cada poço da placa de microtitulação adicionou-se 100µL de Tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,6 c/ NaCl 0,15M. No primeiro poço de cada série foi colocado 100µL da amostra, de onde foram transferidos 100µL para o tubo seguinte, repetindo esse procedimento até a última diluição requerida, sempre homogeneizando bem de um tubo para o outro.

A cada um dos poços, exceto os últimos de cada série, foram adicionados 100µL de eritrócitos a 3%. O ensaio foi incubado a 37°C por 30 minutos, em seguida deixou-se em repouso por mais 30 minutos a temperatura ambiente. Um branco foi elaborado com 100µL de Tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,6 c/ NaCl 0,15M e 100µL de eritrócitos a 3%. Os resultados são observados após uma hora e após 12 horas.

Foram realizados testes de atividade específica com as amostras de ConBr nativa, ConBr-FITC (2%), ConBr/FITC (2%) e ConBr-. Foram, ao todo, 12 repetições de cada amostra. A atividade hemaglutinante específica foi expressa como unidade de hemaglutinação: U.H./mg⁻¹, e seu valor foi expresso por meio da mediana.

A análise estatística para a verificação da existência ou não de diferenças significativas entre as medianas dos ensaios com ConBr-FITC (2%), ConBr-, ConBr/FITC (2%) em relação a ConBr nativa foram realizados por meio do teste não-paramétrico Mann-Whitney com $p < 0.01$.

2.2.4 Análises no FTIR

Os espectros no infravermelho das amostras liofilizadas de ConBr nativa, ConBr-FITC (2%), ConBr/FITC (2%), ConBr/FITC (20%) e ConBr- (10 espectros por amostra) foram obtidas em Espectrômetro Alpha-P da Bruker, em modo ATR (reflectância total atenuada), no intervalo de 1300 a 1200 cm^{-1} (região amida III) com resolução de 0.8 cm^{-1} e 40 varreduras. O resultado das medidas do FTIR foi expresso por meio de seus espectros médios (média aritmética dos espectros e cada amostra)

2.3 Experimentos com pontos quânticos

2.3.1 Conjugação dos pontos quânticos

O método para a conjugação dos pontos quânticos com a proteína foi executado de acordo com o protocolo de conjugação de pontos quânticos “Chemical linkage of Type 1 EviTags to streptavidin using ultracentrifugation” (Evident Technologies, New York, USA,) onde 2ml de EviTag (pontos quânticos), 0,4 ml de tampão fosfato de sódio, 20mg de EDC (1-etil-3(3-dimetilaminopropil) e 15mg de sulfo-NHS foram combinados e incubados à temperatura ambiente durante 30 minutos sob agitação suave. Em seguida, foi realizada ultracentrifugação a 40.000 rpm durante 40 minutos. O sobrenadante foi aspirado e descartado. Os pellets restantes foram lavados duas vezes com 2 ml de água destilada. A proteína de interesse foi então adicionada, junto com 0,5 ml de estreptavidina a 10mg/ml, 1,5 ml de água destilada e 0,4 ml de tampão borato de sódio. Tudo foi incubado à temperatura ambiente em banho ultra-sônico até o precipitado ser dissolvido.

Posteriormente, transferiu-se a amostra para frasco de 18ml, e agitou-se à temperatura ambiente durante 2 horas. A amostra foi armazenada a 4 °C *overnight* e centrifugada a 40.000 rpm por 80 minutos. O sobrenadante foi aspirado e descartado e os pellets restantes foram dissolvidos em 5 ml de água destilada. Centrifugou-se novamente a amostra a 40.000 rpm por 80 minutos, descartou-se o sobrenadante e dissolveu-se os pellets em 5 ml de água destilada. Realizou-se nova centrifugação a 40.000 rpm por 80 minutos, com retirada do sobrenadante e dissolução do sedimento final em 2 ml de água destilada, liofilização e armazenamento em recipiente fechado e no escuro.

2.3.2 Preparação da solução de ConBr-QD Zn/Cd

Foi preparada uma solução com concentração de 1mg/ml de ConBr-QD Zn/Cd, no entanto, diferente das amostras anteriores, ela não teve sua concentração de proteínas determinada.

2.3.3 Ensaio de atividade hemaglutinante específica

Assim como nas amostras anteriormente citadas, a atividade hemaglutinante específica para a amostra de ConBr-QD Zn/Cd foi determinada segundo o método descrito por Moreira & Perrone (1977), adaptado por Ramos *et al.* (1996). Foram, ao todo, 12 repetições de cada amostra e a atividade hemaglutinante específica foi expressa como unidade de hemaglutinação: U.H./mg⁻¹, e seu valor foi expresso por meio da mediana.

A análise estatística para a verificação da existência ou não de diferenças significativas entre as medianas dos ensaios com ConBr-QD Zn/Cd em relação a ConBr nativa foram realizados por meio do teste não-paramétrico Mann-Whitney com $p < 0.01$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análises no FTIR

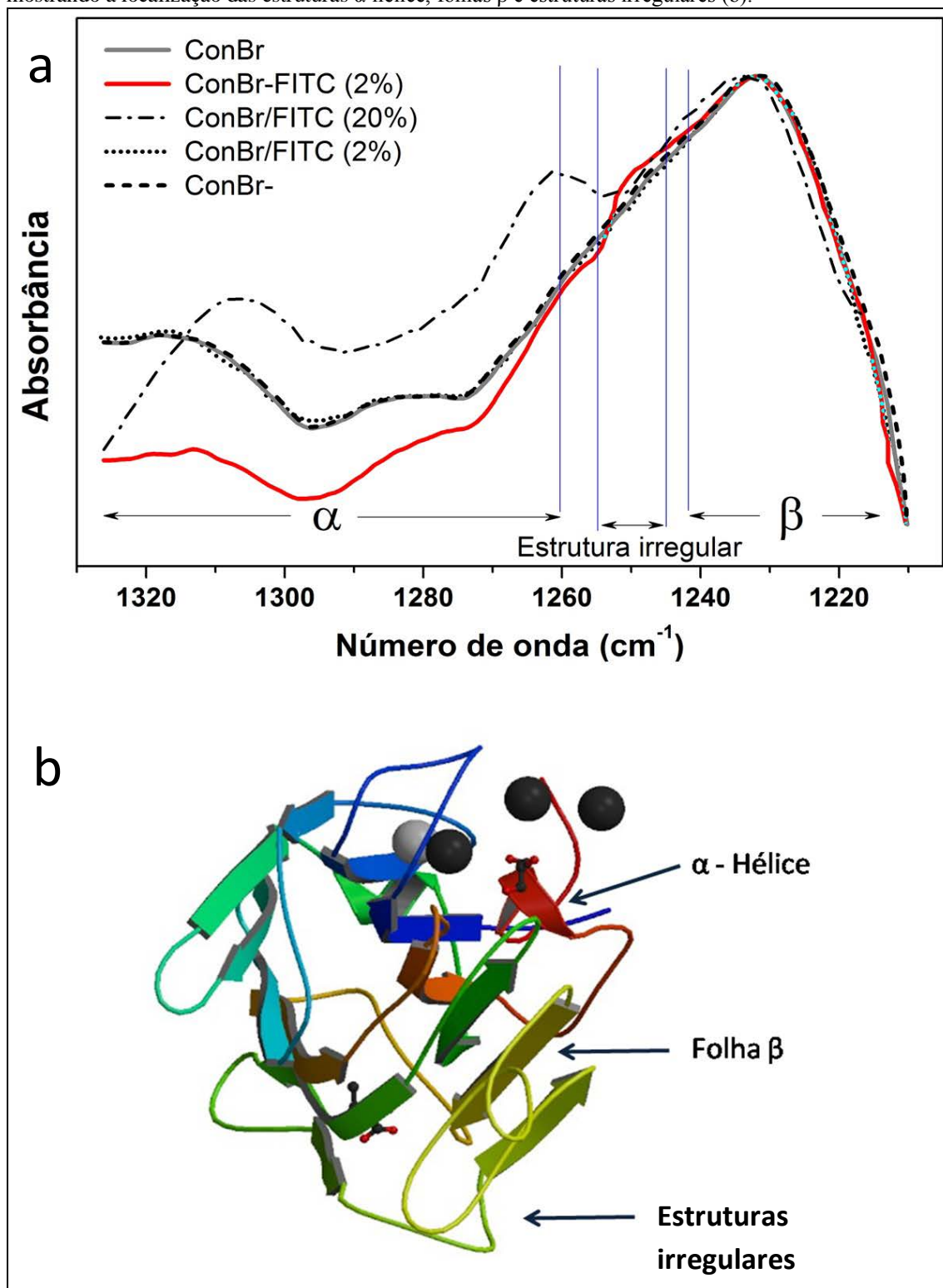
3.1.1 *ConBr conjugada com FITC*

Os resultados obtidos na análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) através da técnica de reflectância total atenuada (ATR) são apresentados a seguir. Observou-se que os espectros da lectina ConBr nativa (não marcada com FITC) e ConBr-FITC (2%) apresentaram-se diferentes na região amida III do infravermelho, destacando a importância do estudo desta região no estudo de estrutura secundária de proteínas.

A Figura 25 mostra detalhadamente a banda amida III e as diferenças entre os espectros de ConBr nativa, misturada com FITC a 2%, misturada com FITC a 20%, processada para marcação com FITC e conjugada com FITC numa proporção em massa de 2%.

A primeira amostra analisada, ConBr em sua forma nativa, cujo espectro corresponde à linha cinza na Figura 25a, apresentou vibrações na banda amida III ($1320 - 1210 \text{ cm}^{-1}$). De acordo com Anderle e Mendelsohn (1987), a região de 1315 a 1260 cm^{-1} é atribuída à presença de estruturas α -hélice; a banda entre 1242 e 1230 cm^{-1} representaria uma estrutura protéica em folhas β ; e a região entre 1255 e 1245 cm^{-1} corresponderia a estruturas irregulares. Como se pode observar na Figura 25, a proteína nativa apresentou dois picos dentro da região correspondente às estruturas em α -hélice, e um pico mais intenso na região de 1240 a 1210 cm^{-1} , mostrando a maior proporção de estruturas β em relação a α -hélice. Detalhes da localização das estruturas α -hélice, folhas β e estruturas irregulares, que serão citadas posteriormente, são apresentados na Figura 25b, uma imagem 3D de um monômero de ConBr. É possível notar a maior proporção de estruturas β e estruturas irregulares, e uma quantidade pequena de α -hélices.

Figura 25 - Gráfico da banda amida III mostrando as diferenças entre os espectros médios da ConBr nativa, misturada com FITC a 2%, misturada com FITC a 20%, processada para marcação com FITC e conjugada com FITC numa proporção em massa de 2% (a); estrutura 3D do monômero de ConBr mostrando a localização das estruturas α -hélice, folhas β e estruturas irregulares (b).



Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (Figura a) e adaptada de PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=3ju9>) (Figura b).

Quando os espectros da lectina nativa e da lectina marcada com o FITC foram comparados, observou-se que o pico de absorção da lectina nativa com frequência de

aproximadamente 1230 cm^{-1} , que equivale às estruturas de folhas β , não sofreu qualquer modificação quando a proteína foi conjugada com FITC, indicando uma possível integridade dessas estruturas. No entanto, notou-se uma diferença entre os dois espectros nas regiões com frequência aproximada de 1320 a 1260 cm^{-1} . Houve uma diminuição da intensidade nessa região em ConBr-FITC (2%), o que permite inferir uma redução da quantidade de estruturas em α -hélice, ou seja, houve alterações nas vibrações de algumas das ligações na região amida III (vibrações de estiramento de C–N; vibrações de dobramento de N–H no plano; vibrações de estiramento de C–C; e de dobramento de C=O (JACKSON, MANTSCH, 1995)). Anderle e Mendelsohn (1987) estudaram os efeitos da desnaturação térmica de proteínas globulares através de espectros FTIR de alta qualidade para a região amida III dessas proteínas nas suas formas nativas e termicamente desnaturadas em solução aquosa. Comparando os dois espectros, os autores demonstraram que a desnaturação térmica produziu mudanças extensas na região amida III para o quimotripsinogênio. O pico em 1.281 cm^{-1} é reduzido em intensidade, um indicativo de perda de estrutura em hélice, efeito observado também nos espectros de ConBr supracitados.

Ainda referindo-se aos espectros da lectina nativa e da lectina marcada com o FITC, observou-se que em torno da frequência de 1250 cm^{-1} houve um aumento de intensidade, possivelmente devido ao aparecimento de estruturas irregulares. Anderle e Mendelsohn (1987) relataram o aparecimento de um pico com frequência de 1.250 cm^{-1} no espectro de albumina bovina sérica submetida à desnaturação térmica, e atribuíram tal resultado ao aparecimento de estruturas irregulares. Chen, Lord e Mendelsohn (1974) utilizaram espectrometria Raman para estudarem alterações na estrutura secundária da lisozima causadas por agentes desnaturantes diversos, como o SDS, o brometo de lítio e a clivagem redutora de ligação S-S com subsequente cianoetilação de grupos sulfidríla. Este último agente, por exemplo, promoveu o surgimento de estruturas irregulares na proteína, que ficou evidenciado pelo aparecimento de um pico em 1243 cm^{-1} . O resultado obtido no presente trabalho é similar aqueles encontrados por Anderle e Mendelsohn (1987) e Chen, Lord e Mendelsohn (1974), porém, o aumento na intensidade das estruturas irregulares foi bem mais discreto.

Tais divergências entre os espectros de ConBr nativa e ConBr-FITC (2%) sugeriram que a ligação ao fluoróforo poderia ter modificado o espectro de ConBr e sua estrutura secundária, entretanto, poderia se supor que essas modificações também

poderiam ser ocasionadas pelas etapas do processo de marcação com o FITC e não necessariamente pela ligação com este.

Para elucidar esta suposição, foi obtido o espectro de ConBr submetida ao mesmo processo de marcação com FITC, porém, sem adicionar o marcador (ConBr-). Ao confrontar os espectros de ConBr nativa e ConBr-, notou-se que estes também são praticamente sobrepostos, não demonstrando alterações de estrutura secundária. Assim, fica reforçada a idéia de que é a ligação do FITC à lectina quem altera sua estrutura secundária, e não o processo de marcação.

No intuito de comprovar que não foi a simples presença do FITC na amostra o motivo da alteração do espectro, foram também produzidos um gráfico de ConBr misturada com o FITC na proporção em massa de 2% (ConBr/FITC (2%)), a mesma proporção do fluoróforo que ligou-se à proteína na primeira amostra analisada; e um gráfico de ConBr misturada com FITC na proporção de 20% de FITC (ConBr/FITC (20%)). O gráfico de ConBr/FITC (2%) praticamente se sobrepõe ao de ConBr nativa na banda amida III do infravermelho, indicando que a simples presença de FITC na mesma proporção do FITC conjugado não é responsável pela alteração observada na estrutura secundária.

O espectro de ConBr/FITC (20%) foi obtido para demonstrar que o aumento de FITC na amostra também não causaria a alteração observada, visto que o incremento de FITC misturado com a proteína deslocou o espectro para cima, aumentando a intensidade em determinada região do espectro, e não diminuindo, como foi observado para ConBr-FITC (2%).

3.2 Testes de atividade hemaglutinante específica

3.2.1 ConBr conjugada com FITC

As lectinas são capazes de promover aglutinação resultante da interação entre seus sítios ligantes a carboidratos e os carboidratos presentes em um determinado substrato. Essa atividade pode ser afetada de diversas formas, como através de tratamento térmico (CHEN, LORD, 1976; SILVA, SILVA, 2000) e inibição por ligação a açúcares e glicoproteínas (DRESCH *et al.*, 2005). Efeitos da presença de grupos que se liguem a essas proteínas, como o FITC, devem ser testados, a fim de verificar o potencial do fluoróforo como inibidor de atividade específica. Testes de atividade

hemaglutinante específica foram, então, realizados e comparados com os resultados obtidos em espectrometria de infravermelho, e são apresentados na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1 – Teste estatístico de Mann-Whitney aplicado aos resultados obtidos nos ensaios de atividade hemaglutinante específica, em UH/mg.

Ensaio	UH/mg(Mediana)
ConBr	984.61538
ConBr/FITC (2%)	984.61538
ConBr-	984.61538
ConBr-FITC (2%)	246.15385**
ConBr-QD Zn/Cd	20**

ConBr = lectina nativa

ConBr/FITC (2%) = lectina com 2% de FITC (sem conjugação)

ConBr- =lectina submetida a todas as etapas do protocolo de conjugação da Sigma mas sem a inclusão de FITC.

ConBr-FITC (2%) = lectina conjugada com 2% de FITC

ConBr-QD Zn/Cd = lectina conjugada com pontos quânticos de Zn/Cd

**Diferença estatisticamente significativa ($P < 0.01$) entre as medianas quando comparadas com a lectina nativa, conforme teste não-paramétrico Mann-Whitney.

Total de repetições por grupo: 11

Nos testes de atividade específica de ConBr nativa e ConBr-FITC (2%) houve uma diminuição da atividade hemaglutinante específica para esta última em relação a primeira. Os resultados demonstraram diferença estatisticamente significativa entre as atividades de ambas as amostras. Duas possíveis explicações poderiam ser sugeridas para explicar a redução da atividade hemaglutinante. Na primeira, o FITC estaria se ligando a resíduos presentes no sítio ativo na proteína, como resíduos de lisina. A ligação do FITC impediria, então, a capacidade de hemaglutinação por ocupar o sítio ativo da proteína. No entanto, os sítios ativos foram protegidos antes da ligação com o FITC, e após o processo de conjugação foram liberados novamente por meio de diálises. Ainda assim, poder-se-ia questionar tal explicação pela fragilidade da interação entre os carboidratos e a proteína no momento da proteção dos sítios ativos: os açúcares poderiam ser liberados com certa facilidade de seus sítios ativos, que seriam logo ocupados com o FITC.

Porém, se confrontados com os resultados obtidos nas análises de espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier, a redução da atividade hemaglutinante específica poderia ter sido ocasionada por possíveis alterações na estrutura secundária

da proteína. Não é possível afirmar com total certeza que são as alterações na estrutura secundária da proteína ou a possível interação do FITC com sítios ativos desprotegidos o que estaria causando a baixa na atividade hemaglutinante.

Os testes de ConBr nativa e ConBr- não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si. Mesmo com o possível desgaste sofrido pela proteína durante o processo de conjugação com fluoróforo, sua estrutura secundária manteve-se íntegra. Da mesma forma, a atividade de ConBr/FITC (2%) também não apresentou diferenças estatísticas em relação à ConBr nativa.

Os resultados obtidos nos testes de atividade hemaglutinante específica concordam com os resultados obtidos na espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier, apesar de ambos não estarem, necessariamente, relacionados entre si. Em conjunto, estes resultados contribuem e reforçam a proposição de que é a ligação do FITC à proteína que promove a alteração estrutural na região de α -hélices e estruturas irregulares.

3.2.2 ConBr conjugada com pontos quânticos

Os pontos quânticos vêm ganhando espaço na construção de sondas biologicamente ativas que possam oferecer diagnóstico de doenças por imageamento ou serem úteis na entrega de drogas e/ou fármacos em órgãos específicos. No entanto, os efeitos do uso dessas nanopartículas não estão bem estudados.

Na sessão anterior foi mostrado que a ligação do marcador FITC à lectina ConBr trouxe a esta um discreto incremento de estruturas irregulares, enquanto reduziu a quantidade de α -hélices presentes em sua estrutura secundária. Uma alternativa ao uso desse marcador seria os pontos quânticos.

A atividade específica de ConBr conjugada com pontos quânticos diminuiu drasticamente quando comparada com a atividade de ConBr nativa, apresentando diferença estatisticamente significativa entre estas amostras. Tal resultado implicaria dizer que a ligação do ponto quântico à proteína poderia estar afetando sua atividade específica.

No entanto, os testes realizados com pontos quânticos foram bastante preliminares e não oferecem segurança, pois não foi estabelecida previamente uma proporção entre a quantidade de proteínas e pontos quânticos nas amostras. Dessa forma, não se pode prever se a redução da atividade específica de ConBr se deu

realmente devido à ligação dos pontos quânticos a ela ou se pela presença diminuta desta proteína na amostra em relação à quantidade de pontos quânticos.

4. CONCLUSÕES

Pôde-se observar nesse trabalho que quando marcada com o FITC, a proteína ConBr apresentou uma diminuição da intensidade do espectro de infravermelho na região correspondente à α -hélices e um pequeno aumento na intensidade na região de estruturas irregulares.

O espectro de ConBr submetida ao processo de marcação com FITC, porém, sem adição do marcador; e o espectro de ConBr apenas misturada com o marcador na proporção de 2% não apresentaram diferenças em relação ao espectro de ConBr nativa, o que permite concluir que o processo de marcação e o simples contato da lectina com o fluoróforo não são os responsáveis pelas alterações na estrutura secundária da proteína.

Os testes de atividade hemaglutinante analisados sob a ótica estatística demonstraram diferenças significativas entre as amostras.

Em conjunto, os dados obtidos na espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier e testes de atividade específica oferecem uma forte evidência de que a ligação com o FITC provoca alteração na estrutura secundária da proteína analisada, no entanto, não são suficientes para sustentar essa afirmação, visto que ainda há chance de os sítios ativos de ConBr terem sido expostos pela perda da interação fraca entre a proteína e o açúcar utilizado para proteção dos sítios durante a marcação com o FITC.

Quanto aos pontos quânticos como marcadores, este estudo foi bastante preliminar, não permitindo conclusões sobre sua influência na atividade da proteína em questão.

Outros testes devem ser realizados para confirmação da hipótese.

5. PERSPECTIVAS

Este trabalho oferece resultados que fazem surgir uma série de questionamentos sobre o uso de um importante marcador utilizado em procedimentos médicos e biotecnológicos, o FITC. Apesar de não conclusivos, os resultados aqui obtidos sugerem que este marcador tenha influência na estrutura secundária da proteína ConBr, evidenciano assim, a necessidade de novos estudos relacionados que possam elucidar a real interferência do FITC na estrutura proteica.

Análises em dicroísmo circular e testes biológicos são procedimentos que podem colaborar para o entendimento das alterações na estrutura secundária de proteínas causadas pela conjugação com o marcador FITC.

Os pontos quânticos já estão sendo amplamente estudados como marcadores em sistemas biológicos, oferecendo uma alternativa aos marcadores utilizados atualmente. Trabalhos futuros que demonstrem a influências dessas nanopartículas na estrutura secundária das proteínas, como análises em espectroscopia de infravermelho e dicroísmo circular, são bem quistos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIVISATOS, A. P.; GU, W.; LARABELL, C. Quantum dots as cellular probes. **Annu. Rev. Biomed. Eng.** v. 7, p. 55–76, 2005.

ANDERLE, G.; MENDELSON, R. Thermal denaturation of globular proteins: Fourier transform-infrared studies of the amide III spectral region. **Biophys. J.**, v. 52, p. 69-74, jul. 1987.

BAIZ, C. R. *et al.* Coherent two-dimensional infrared spectroscopy: quantitative analysis of protein secondary structure in solution. **Analyst**, v. 137, p. 1793 – 1799, 2012.

BANKS, P. R. Fluorescent derivatization for low concentration protein analysis by capillary electrophoresis. **Trends in analytical chemistry**, v.17, n.10, 1998.

BARAUNA, S. C. *et al.* Antidepressant like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 85, p. 160–169, 2006.

BARBOSA, T. *et al.* *In Vivo* Lymphocyte Activation and Apoptosis by Lectins of the Diocleinae Subtribe. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96(5), p. 673-678, jul. 2001.

BARONDES, S. H. *et al.* Galectins: structure and function of a large family of animal lectins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 33, p. 20807 – 2-810, ago. 1994.

BARRAL-NETTO, M. *et al.* In vivo protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. **Acta Tropica**, v. 60, p. 237-250, 1996.

BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1767, p. 1073 – 1101, 2007.

BEZERRA, E. H. S. **Análise estrutural do domínio de reconhecimento à carboidrato da lectina de *Canavalia brasiliensis* e sua relação na indução da produção de óxido nítrico.** 2011. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

BIES, C., LEHR, C. M., WOODLEY, J. F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 56, p.425-435, mar. 2004.

CANAVALLIA *Brasiliensis*. Disponível em:
<<http://www.tropicalforages.info/Multiproposito/key/Multiproposito/Media/Html/Canavalia%20brasiliensis%20Mart.htm>>. Acesso em: mar. 2013.

CAO, X. *et al.* Purification of lectin from larvae of the fly, *Musca domestica*, and in vitro anti-tumor activity in MCF-7 cells. **J. Insect Sci.**, v. 10, p. 164-169, mai. 2010.

CARBONARO, M.; MASELLI, P.; NUCARA, A. Relationship between digestibility and secondary structure of raw and thermally treated legume proteins: a Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic study. **Amino Acids**, v. 43, p. 911 – 921, 2012.

CARBONARO, M., NUCARA, A. Secondary structure of food proteins by Fourier transform spectroscopy in the mid-infrared region. **Amino Acids**, v. 38, p. 679 – 690, 2010.

CARNEIRO, V. A. **Efeito do um metabólito bioativo e de lectinas vegetais sobre o crescimento de microrganismos patogênicos.** 2011. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Centro de Ciências - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

CARRINGTON, D. M.; AUFFRET, A.; HANKE, D. E. Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of concanavalin A. **Nature**, v. 313, n. 5997, p. 64-7, jan. 1985.

CAVADA, B. S. *et al.* 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.

CAVALCANTE, T. T. A. *et al.* Effect of Lectins from Diocleinae Subtribe against Oral *Streptococci*. **Molecules**, v.16, p. 3530-3543, 2011.

CHEN, M. C.; LORD, R. C.; MENDELSON, R. Laser-Excited Raman Spectroscopy of Biomolecules. V. Conformational Changes Associated with the Chemical Denaturation of Lysozyme. *Journal of the American Chemical Society*, v. 96, n. 10, p. 3038 – 3042, mai., 1974.

CHEN, M. C.; LORD, R. C. Laser Raman Spectroscopic Studies of the Thermal Unfolding of Ribonuclease AT. **Biochemistry**, v. 15, n. 9, p. 1889 – 1897, 1976.

COLOMBO, A. V. *et al.* Corynebacterium diphtheriae surface proteins as adhesins to human erythrocytes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 197, p. 235-239, abr. 2001.

DEMBERELDORJ, U. *et al.* Conformational changes of proteins adsorbed onto ZnO nanoparticle surfaces investigated by concentration-dependent infrared spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 59, p. 23–28, 2012.

DRESCH, R. R. *et al.* Detecção de atividade lectínica e atividade hemolítica em extratos de esponjas (Porifera) nativas da costa atlântica do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 15, n. 1, p. 16-22, jan./mar., 2005.

EROGBOGBO, F. *et al.* Biocompatible magnetofluorescent probes: luminescent silicon quantum dots coupled with superparamagnetic iron (iii) oxide. **Acs Nano**, v. 4, n. 9, p. 5131–5138, 2010.

ESKO, J. D.; SHARON, N. Microbial Lectins: Hemagglutinins, Adhesins, and Toxins. In: **Essentials of Glycobiology**. 2ndeds. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.

EVIDENT Technologies. Recipe Book. EviTag Conjugation Protocols. **Chemical linkage of Type 1 EviTags to streptavidin using ultracentrifugation**. New York, USA.

FORD, W. W. The distribution of haemolysins agglutinins and poisons in fungi, especially the Amanitas, the Entolomas, the Lactarius and Inocybes. **JPET**, v. 2, n. 4, p. 285-318, mar. 2011.

FRASCO, M. F.; CHANIOOTAKIS, N. Bioconjugated quantum dots as fluorescent probes for bioanalytical applications. **Anal Bioanal Chem**, v. 396, p. 229 – 240, 2010.

FREITAS, C. D. T. *et al.* Correlações entre atividade inseticida e resistência a proteólise de duas lectinas vegetais glicose/manose. **Comunicata Scientiae**, v. 2, n. 1, p. 34-41, 2011.

GAO, X. *et al.* *In vivo* cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 8, p. 969 – 976, ago 2004.

GAO, J.; CHEN, X.; CHENG, Z. Near-infrared quantum dots as optical probes for tumor imaging. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 1147-1157, 2010.

GARTNER, T. K.; OGILVIE, M. L. Isolation and caractetization of three Ca²⁺ dependent beta-galactose-specific lectins from snake venoms. **Biochem. J.**, v. 224, p. 301-307, 1984.

GOMES, M. M. *et al.* Recognition of galactose-deficient O-glycans in the hinge region of IgA1 by N-acetylgalactosamine-specific snail lectins: a comparative binding study. **Biochemistry.**, v. 49, p. 5671-5682, jul. 2010.

GOMES, B. S. *et al.* Antifungal activity of lectins against yeast of vaginal secretion. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 770-778, 2012.

GORELIK, E.; GALILI, U.; RAZ, A. On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. **Cancer Metastasis Rev**20, 245–77, 2001.

GUILLOT, J.; KONSKA, G. Lectins in Higher Fungi. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 25. n. 3, p. 203-230, 1997.

GUPTA, G.; SUROLIA, A.; SAMPATHKUMAR, S. G. Lectin microarrays for glycomic analysis. **OMICS.**, v. 14, p. 419-436, ago. 2010.

HARDMAN, K. D. *et al.* Structure of Concanavalin A at 4.25-ångström resolution. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 68, p. 1393-1397, jul. 1971.

HARDMAN, R. A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. **Environmental Health Perspectives**, v. 14, n. 2, fev 2006.

HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.

HE, X. *et al.* Low Molecular Weight Hydroxyethyl Chitosan-Prednisolone Conjugate for Renal Targeting Therapy: Synthesis, Characterization and *In Vivo* Studies. **Theranostics**, v. 2, n. 11, p. 1054-1063, 2012.

HOFFMANN, A. *et al.* High and Low Molecular Weight Fluorescein Isothiocyanate (FITC) – Dextrans to Assess Blood-Brain Barrier Disruption: Technical Considerations. **Transl. Stroke Res.** v. 2, p. 106–111, 2011.

HOLANDA, M. L. *et al.* Differential activity of a lectin from *Solieria filiformis* against human pathogenic bacteria. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 38, p. 1769-1773, dez. 2005.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D.A.; CROUCH, S.R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6 ed., Porto Alegre: Bookman, 2009.

HU, C. *et al.* Influence of charge on FITC-BSA-loaded chondroitin sulfate-chitosan nanoparticles upon cell uptake in human Caco-2 cell monolayers. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 4861–4872, 2012.

JACKSON, M.; MANTSCH, H. H. The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, n. 2, p. 95-120, 1995.

JACQUES, A. V. *et al.* Lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) protects hippocampal slices against glutamate neurotoxicity in a manner dependent of PI3K/Akt pathway. **Neurochemistry International**, v. 62, p. 836–842, 2013.

KAIRDOLF, B. A. *et al.* Semiconductor quantum dots for bioimaging and biodiagnostic applications. **Annu. Rev. Anal. Chem.**, v. 6, p.143–162, mar 2013.

LAM, S. K.; NAG, T. B. Isolation and characterization of a French bean hemagglutinin with antitumor, antifungal, and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities and an exceptionally high yield. **Phytomedicine**, v. 17, p. 457-462, mai. 2010.

LI, S. *et al.* Retro-orbital injection of FITC-dextran is an effective and economical method for observing mouse retinal vessels. **Molecular Vision**, v. 17, p. 3566-3573, 2011.

LIAO, W. R. Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine vibrios. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 7, p. 433 – 439, jul. 2003.

- LIU, B. *et al.* Molecular mechanisms of *Polygonatum cyrtoneuma* lectin-induced apoptosis and autophagy in cancer cells. **Landes Bioscience**, v.5, n. 2, p. 253 – 255, fev. 2009.
- LIU, B.; BIAN, H.; BAO, J. Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic. **Cancer Letters**, v. 287, p. 1–12, 2010.
- LOBSANOV, Y. D. *et al.* X-ray crystal structure of the human dimeric S-Lac lectin, L-14-II, in complex with lactose at 2.9-Å resolution. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 27034–27038, dez. 1993.
- LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do Infravermelho. **Quim. Nova**, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.
- MEDINTZ, I. L. *et al.* Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. **Nature Materials**, v. 4, p. 435 – 446, 2005.
- MICHALET, X. *et al.* Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics. **Science**, v. 307, p. 538 – 544, 2005.
- MINKO, T. Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 4, p. 491 – 509, mar 2004.
- MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (MART.). Isolation, characterization and behavior during germination. **Biologia Plantarum (PRAHA)**, v. 26, n. 2, p. 113-120, 1984.
- MOREIRA, R. Z.; PERRONE, J. C. Purification and Partial Characterization of a Lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiol.**, v. 59, p. 783-787, 1997.
- MOURA, G. E. D. D. **Avaliação do efeito citotóxico da lectina da esponja marinha *Cliona varians* contra células de leucemia mieloide crônica**. 2007. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007.
- NA, Y. J. *et al.* A novel lectin isolated from the hemolymph of the marine hair crab *Erimacrus isenbeckii*. **Protein Pept. Lett.**, v. 14, p. 800-803, jan. 2007.
- NARAYANAN, S. *et al.* Ribosome inactivating proteins and apoptosis. **Febs Letters**, v. 579, n. 6, p. 1324–1331, fev. 2005.
- OLIVEIRA, C. H. **Avaliação das características do espermatozóide equino congelado submetido a inclusão e remoção do colesterol das membranas**. 2007. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 2007.
- PEUMANS, W. J.; HAO, Q.; VAN DAMME, E. J. Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? **FASEB J.**, v. 15, p. 1493-1506, jul. 2001.

PEUMANS, W. J., HAUSE, B., VAN DAMME E. J. The galactose-binding and mannose-binding jacalin-related lectins are located in different sub-cellular compartments. **FEBS Lett.**, v. 477, p. 186-192, jul. 2000.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.**, v. 109, p.347-352, 1995.

POIROUX, G. *et al.* Morniga G: A plant lectin as an endocytic ligand for photosensitizer molecule targeting toward tumor-associated T/Tn antigens. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 2, p. 370–377, mar/abr 2011.

PRODUCT Block. **Goat anti-rat IgG-FITC data.** Disponível em: <<http://tinyurl.com/astlv3t>>. Acesso em: março de 2013.

PROTEIN data bank. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=3ju9>>. Acesso em: 28 de março de 2013.

RAMOS, M. V. *et al.* Interaction of lectins from the sub-tribe Diocleinae with specific ligands. **R.Bras.Fisiol.Veg.**, v. 8, n. 3, p. 193-199, 1996.

RÜDIGER, H. Plant Lectins – More than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. **Acta. Anat.**, v. 161, n. 1, p. 130–152, 1998.

RUSSI, M. *et al.* ConBr, a lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds, protects against quinolinic acid-induced seizures in mice. **Neurochem Res**, v. 37, p. 288 – 297, 2012.

SAARELA, S. *et al.* The *Escherichia coli* G-fimbrial lectin protein participates both in fimbrial biogenesis and in recognition of the receptor-acetyl-D-glucosamine. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 6, p. 1477–1484, mar. 1995.

SAFFER, L. D.; PETRY, W. A. J. Role of the galactose lectin *Entamoeba histolytica* adherence-dependent killing of mammalian cells. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 12, p. 4681-4683, 1991.

SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J. A galactose-specific lectin from the red marine alga *Ptilota ficilina*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 5, p. 765-769, 1998.

SANTANA, M. A. **Isolamento, propriedades bioquímicas e estudos biológicos da lectina de sementes da *Macrotyloma axillare* (E. Meyer).** 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Departamento de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Ouro Preto, 2004.

SANZ-APARICIO, J. *et al.* 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, p. 114-118, 1997.

SCHOUPPE, D. *et al.* Interaction of the Tobacco Lectin with Histone Proteins. **Plant Physiology**, v. 155, n. 3, p. 1091-1102, mar., 2011.

SCHUMACHER, K. *et al.* Influence of postoperative complementary treatment with lectin-standardized mistletoe extract on breast cancer patients. A controlled epidemiological multicentric retrospective cohort study. **Anticancer Research**, v. 23, n. 23, p. 5081-5087, 2003.

SHARON, N.; LIS, H. **Lectins, Chapman and Hall**. London. 126 p, 1989.

SHIBUYA, N. *et al.* Binding properties of a mannose-specific lectin from snowdrop (*Galantus nivalis*) bulb. **J. Biol. Chem.**, v. 263, n. 2, p. 728-734, 1988.

SIGMA. Product Information. **Fluorescein isothiocyanate**. Saint Louis, Missouri, USA.

SIGMA. Product Information. **FluoroTag FITC Conjugation Kit**. Saint Louis, Missouri, USA.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. **Rev. Nutr.**, v. 13, n. 1, p. 3-9, Campinas, jan/abr, 2000.

SILVA, F. O. *et al.* Immunostimulatory activity of ConBr: a focus on splenocyte proliferation and proliferative cytokine secretion. **Cell Tissue Res**, v. 346, p. 237 – 244, 2011.

SKOOG, D.A *et al.* **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2008.

SOJAR, H. T., SHARMA, A., GENCO, R. J. Porphyromonas gingivalis fimbriae binds to neoglycoproteins: evidence for a lectin-like interaction. **Biochimie**. v. 86, p. 245-249, mai. 2004.

SONG, K. K. *et al.* Cloning and characterization of three novel WSSV recognizing lectins from shrimp *Marsupenaeus japonicus*. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 28, p. 596-603, abr. 2010.

ŠULÁK, O. *et al.* A TNF-like trimeric lectin domain from Burkholderia cenocepacia with specificity for fucosylated human histo-blood group antigens. **Structure**, v. 18, n. 1, p. 59–72, jan. 2010.

SUZUKI, M., HISAMATSU, T., PODOLSKY, D. K. Gamma interferon augments the intracellular pathway for lipopolysaccharide (LPS) recognition in human intestinal epithelial cells through coordinated up-regulation of LPS uptake and expression of the intracellular toll-like receptor 4-MD-2 complex. **Infect. and Immunity**, v. 71, p. 3503-3511, jun. 2003.

TAKEBE, Y *et al.* Antiviral lectins from red and blue-green algae show potent in vitro and *in vivo* activity against Hepatitis C virus. **Planta Med.**, v. 78, 2012.

TEIXEIRA, E. H. *et al.* *In vitro* inhibition of Streptococci binding to enamel acquired pellicle by plant lectins. **J Appl Microbiol.**, v. 101, p. 111-116, jul. 2006.

TEIXEIRA, E. H. et al. **Biological Applications of Plants and Algae Lectins: An Overview**. In: Chang, C. (org.) **Carbohydrates – Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology**. Cap. 23, p. 533 – 558, nov. 2012. Disponível em: <http://cdn.intechopen.com/pdfs/41109/InTechBiological_applications_of_plants_and_algae_lectins_an_overview.pdf>. Acesso em: 26 mar. 2013.

VAN DAMME, E. J. M. *et al.* Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 17, n. 6, p. 575-692, 1998.

VEELDERS, M. *et al.* Structural basis of flocculin-mediated social behavior in yeast. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, v. 101, p. 1-6, nov. 2010.

VIGERUST, D. J.; SHEPHERD, V. L. Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. **TRENDS in Microbiology**, v.15, n.5, p. 211 – 217, 2007.

VIRGILIO, M. *et al.* Ribosome-Inactivating Proteins: from plant defense to tumor attack. **Toxins**, v. 2, p. 2699-2737, 2010.

WAGNER, M. K.; LI, F.; LI, J. Use of quantum dots in the development of assays for cancer biomarkers. **Anal Bioanal Chem**, v. 397, p. 3213 – 3224, 2010.

WANG, X. *et al.* A novel lectin with a fibrinogen-like domain and its potential involvement in the innate immune response of *Armigeres subalbatus* against bacteria. **Insect Mol. Biol.** v. 13, p. 273-282, jun. 2004.

WONG, J. H. *et al.* Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 87, p. 1221-1235, jun. 2010.

WOOTTON, E. C. et al. Biochemical prey recognition by planktonic protozoa. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 216–222, jan. 2007.

YAMAJI, Y. *et al.* Lectin-Mediated Resistance Impairs Plant Virus Infection at the Cellular Level. **The Plant Cell**, v. 2, o. 2, p. 778-793, fev. 2012.

ZHANG, Y. *et al.* Apoptosis progression in the hair cells in the organ of corti of GJB2 conditional knockout mice. **Clinical and Experimental Otorhinolaryngology**, v. 5, n. 3, p. 132-138, set 2012.