



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



WESLEY FELIX DE OLIVEIRA

**NANOSSONDAS BASEADAS EM PONTOS QUÂNTICOS E LECTINAS PARA
APLICAÇÕES EM GLICOBIOLOGIA**

Recife
2021

WESLEY FELIX DE OLIVEIRA

**NANOSSONDAS BASEADAS EM PONTOS QUÂNTICOS E LECTINAS PARA
APLICAÇÕES EM GLICOBIOLOGIA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia e Bioinformática.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Co-orientadoras: Profa. Dra. Adriana Fontes e Profa. Dra. Mariana Paola Cabrera.

Recife
2021

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

Oliveira, Wesley Felix de

Nanossondas baseadas em pontos quânticos e lectinas para aplicações em glicobiologia / Wesley Felix de Oliveira. - 2021.

91 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia.

Coorientadora: Profa. Dra. Adriana Fontes.

Coorientadora; Profa. Dra. Mariana Paola Cabrera.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2021.

Inclui referências.

1. Carboidratos. 2. Nanopartículas. 3. Biologia molecular. I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orientadora). II. Fontes, Adriana (coorientadora). III. Cabrera, Mariana Paola. (coorientadora). Vi. Título.

572.8

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-012-2022

WESLEY FELIX DE OLIVEIRA

**NANOSSONDAS BASEADAS EM PONTOS QUÂNTICOS E LECTINAS PARA
APLICAÇÕES EM GLICOBIOLOGIA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
Departamento de Bioquímica – UFPE (Orientadora)

Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho
Departamento de Bioquímica – UFPE (Examinadora Interna)

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão
Departamento de Bioquímica – UFPE (Examinador Interno)

Dra. Carinna Nunes de Lima
Departamento de Biofísica e Radiobiologia – UFPE (Examinadora Externa)

Dra. Cássia Regina Albuquerque da Cunha
Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Pernambuco - LFDA/PE
(Examinadora Externa)

Aos meus pais, Marlene e Wellington,
bem como à minha irmã, Tarciana,
pelo amor, zelo e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas suas bênçãos, infinita bondade e misericórdia eterna.

À minha família, por todo zelo, amor e suporte. Sobretudo aos meus pais, Marlene e Wellington, por todo o incentivo fazendo o possível e impossível para eu alcançar meus ideais. À minha irmã Tarciana por todas as brincadeiras, momentos de descontração e torcida mútua pela vitória um do outro sempre. Ademais, com muito carinho, agradeço à minha avó Elizabete (*in memoriam*) que presenciou o início desse trabalho e depois seguiu para o plano maior seguindo o destino reservado por Deus.

À minha orientadora Profa. Dra. Tereza Correia, por acreditar no meu potencial ainda no primórdio de minha graduação e que tive a honra de seguir como seu aluno no mestrado e doutorado. Muito obrigado pelos valiosos ensinamentos, carinho e grande dedicação para minha progressão pessoal e científica.

À minha coorientadora Profa. Dra. Adriana Fontes, pela amizade, humildade além da maestria em nos passar sua sabedoria. Tenho muita admiração pelo exemplo de profissionalismo, confiança e liderança que a senhora é.

À minha coorientadora Profa. Dra. Mariana Cabrera, saiba que você é muito admirável para mim pelas suas palavras sempre tão gentis e educadas, além de toda calma em passar seu gigantesco aprendizado e esforço em atingir os objetivos.

Ao Prof. Dr. Paulo Euzébio pela bondade em transmitir seus conhecimentos e prestatividade em sempre querer ajudar, além, de claro, pelos momentos de descontrações que deixam o dia a dia no laboratório mais leve e por ser um grande amigo!

À Profa. Dra. Luana Coelho por toda paciência e dedicação para comigo, além de toda ajuda, carinho, amizade e valiosos conselhos de vida.

Aos colegas do Laboratório de Biofísica Química, em especial a esse respeitável grupo de pesquisa Nanotecnologia Biomédica. Sempre admirei todos pela preocupação em sempre ajudar o próximo na execução dos experimentos,

momentos descontraídos e, assim, pode tornar o ambiente mais tranquilo para se trabalhar. Agradeço sobretudo à Isabela Pereira, Tiago Henrique, Carinna Lima, Jéssika Fernanda, Camila Monteiro, Eduarda Carvalho, Natália Melo, João Victor, Bruno Raposo, Abdênego Rodrigues, Rafael Bastos, Rennan Mano, Rafaella Lima e Sueden Souza.

Ao Laboratório de Bioquímica de Proteínas, em especial ao Prof. Dr. Thiago Napoleão e à Profa. Patrícia Paiva por terem aceitado colaborar em análises tão importantes para enriquecer este trabalho.

Aos amigos conquistados ao longo dessa jornada acadêmica que foi fundamental para um dar apoio moral ao outro nas dificuldades diárias e por poder compartilhar de momentos para desopilar, vide festas. Agradeço, assim, a Tiago Souza, Lucas Lima, Luiz Maia, José Roberto, Lucas Siqueira, Jocimar Santos, Andrezza Lins e Dayvid Batista. Claro, também aos momentos descontraídos, conselhos de vida e memes que também foram compartilhados para aliviar a rotina com Ruany Cristyne, Rebeca Lemos, Fabiana Felix, Carolina França e Priscyla Praxedes, que puderam atenuar o turbilhonamento diário.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas e à Universidade Federal de Pernambuco cuja estrutura física foi necessária para a realização do trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Aos meus parentes e amigos de longa data que tanto torceram e torcem pelas minhas conquistas, além de todo companheirismo e momentos de lazer.

A todos aqueles que porventura não foram mencionados aqui, mas que contribuíram de alguma maneira na minha vida e/ou na execução deste trabalho, meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

Os carboidratos são considerados "a terceira letra do alfabeto molecular", participando de inúmeros processos biológicos em todas as formas de vida. Esses sacarídeos podem ser estudados empregando lectinas, proteínas capazes de reconhecê-los especificamente, associadas a nanopartículas (NPs) fluorescentes de semicondutores com alta fotoestabilidade, os pontos quânticos (PQs). Os PQs podem ainda ser aliados a NPs de óxido de ferro (SPIONs), formando sistemas bimodais com propriedades óptico-magnéticas (BNPs). Esta tese objetivou obter conjugados de diferentes glicospecificidades com as lectinas BmoLL e Cramoll, PQs-BmoLL (galactose) e PQs-Cramoll (glicose/manose), bem como desenvolver um sistema multimodal (BNPs-Cramoll), e aplicá-los em estudos glicobiológicos. Eritrócitos ABO foram incubados com PQs-BmoLL e uma marcação preferencial de eritrócitos B ($71,7 \pm 5,9\%$) foi revelada por citometria de fluxo, uma vez que antígenos B apresentam resíduos de galactose. Essa marcação foi reduzida após a inibição prévia com a galactose ($5,8 \pm 1,0\%$), mostrando especificidade. O conjugado PQs-Cramoll foi aplicado no estudo do perfil de glicose/manose de leveduras de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*) e tecidos da mama (normal, fibroadenoma - FB e carcinoma ductal invasivo - CDI). Uma intensa marcação da parede celular fúngica foi observada e mais de 90% das células foram positivas na citometria de fluxo. Mesmo após a inibição do conjugado com metil- α -D-manopiranosídeo, *C. parapsilosis* foi marcada (78%), indicando ter maior expressão de glicose-manose. O conjugado PQs-Cramoll marcou células ductais de tecidos normais e FB, enquanto no CDI, células e estroma foram marcados. Ademais, um maior nível de resíduos de glicose/manose foi quantificado no CDI pelo ensaio fluorescente em microplaca. PQs foram covalentemente ligados às SPIONs e à Cramoll, formando BNPs-Cramoll. Cerca de 90% de leveduras (*C. albicans*) foram marcadas por BNPs-Cramoll, reduzindo em ca. 3x após a inibição com metil- α -D-manopiranosídeo. A intensidade de fluorescência de BNPs-Cramoll diminuiu após incubação com diferentes concentrações de fetuína (0,675 - 10,8 mg/mL), o que não foi observado para albumina de soro bovino. Assim, PQs-BmoLL e PQs-Cramoll mostraram ser ferramentas versáteis para glicobiologia; e BNPs-Cramoll se mostrou uma nanossonda específica, promissora para detecção e separação da fetuína.

PALAVRAS-CHAVE: carboidratos; Cramoll; BmoLL; fluorescência; nanopartículas magnéticas; fetuína.

ABSTRACT

Carbohydrates are considered "the third letter of the molecular alphabet", participating in countless biological processes in all the forms of life. These saccharides can be studied using lectins, proteins capable of specifically recognizing them, associated with fluorescent semiconductor nanoparticles (NPs) with high photostability, the quantum dots (QDs). QDs can also be combined with iron oxide NPs (SPIONs), forming bimodal systems with optical-magnetic properties (BNPs). This thesis aimed to obtain conjugates of different glycospecificities with the BmoLL and Cramoll lectins, QDs-BmoLL (galactose) and QDs-Cramoll (glucose/mannose), as well as to develop a multimodal system (BNPs-Cramoll), and apply them in glycobiological studies. ABO erythrocytes were incubated with QDs-BmoLL and preferential labeling of B erythrocytes ($71.7 \pm 5.9\%$) was revealed by flow cytometry, since B antigens have galactose residues. This labeling was reduced after previous inhibition with galactose ($5.8 \pm 1.0\%$), showing specificity. The QDs-Cramoll conjugate was applied in the study of the glucose/mannose profile of *Candida* yeasts (*C. albicans*, *C. glabrata*, and *C. parapsilosis*) and breast tissues (normal, fibroadenoma - FB and invasive ductal carcinoma - IDC). Intense labeling of the fungal cell wall was observed and more than 90% of the cells were positive by flow cytometry. Even after the inhibition of the conjugate with methyl- α -D-mannopyranoside, *C. parapsilosis* was labeled (78%), indicating a higher expression of glucose-mannose. The conjugate PQs-Cramoll labeled ductal cells from normal tissues and FB, while, in IDC, cells and stroma were labeled. Furthermore, a higher level of glucose/mannose residues was quantified in the IDC by fluorescent microplate assay. QDs were covalently bounded to SPIONs and Cramoll, forming BNPs-Cramoll. About 90% of yeasts (*C. albicans*) were labeled by BNPs-Cramoll, reducing by ca. 3x after inhibition with methyl- α -D-mannopyranoside. The fluorescence intensity of BNPs-Cramoll decreased after incubation with different concentrations of fetuin (0.675 - 10.8 mg/mL), which not observed with bovine serum albumin. Thus, QDs-BmoLL and QDs-Cramoll showed to be versatile tools for glycobiology; and BNPs-Cramoll proved to be a specific, promising nanoprobe for detection and separation of fetuin.

KEYWORDS: carbohydrates; Cramoll; BmoLL; fluorescence; magnetic nanoparticles; fetuin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DO REFERENCIAL TEÓRICO

- Figura 1 – Diagrama da energia para um semicondutor. E_g = energia do *bandgap*. 22
- Figura 2 – Representação esquemática das mudanças energéticas vs. tamanho de PQs, sob confinamento quântico. O painel inferior mostra suspensões coloidais de PQs de CdSe de diferentes tamanhos sob excitação à luz UV. 23
- Figura 3 – Esquema da estrutura básica dos PQs e sua conjugação com biomolécula. 24
- Figura 4 – Propriedades ópticas dos PQs de CdTe passivados com glutathione. (a) Imagem da fluorescência dos PQs sob luz UV, $\lambda_{exc} = 312$ nm, (b) espectros de emissão e (c) espectros de absorção das amostras retiradas nos horários indicados após o início da síntese. 25
- Figura 5 – Estratégias para conjugação de PQs com biomoléculas e nanopartículas. QD – *quantum dot* e NPs – nanopartículas. 26
- Figura 6 – Alinhamento dos momentos magnéticos na ausência e presença de campo magnético externo em materiais magnéticos. H – campo magnético externo aplicado. 28
- Figura 7 – Ilustração esquemática de curvas de histerese de materiais ferro e ferri magnéticas (a) e curva M-H típica de materiais superparamagnéticos (b). M – magnetização da partícula; H – campo magnético externo aplicado; M_s – magnetização de saturação; M_R – magnetização remanescente; H_c – campo coercivo. 29
- Figura 8 – Representação esquemática da relação entre a coercividade (campo necessária para remover a magnetização remanescente) e o tamanho das nanopartículas magnéticas. (a) 30

Região de domínios magnéticos (MD) (tamanho de $\text{Fe}_3\text{O}_4 > \text{ca. } 80 \text{ nm}$), (d) região de domínio único (SD) ($\text{ca. } 10 \text{ nm} < \text{tamanho de } \text{Fe}_3\text{O}_4 < 80 \text{ nm}$) e (e) região de superparamagnetismo (SP) (tamanho de $\text{Fe}_3\text{O}_4 < \text{ca. } 15\text{--}20 \text{ nm}$).

- Figura 9 – Aplicações biomédicas das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro. Força magnética gerada por um campo magnético externo utilizada na separação de componentes (a), MNPs podem atuar como agentes de contraste na ressonância magnética (RM) influenciando na relaxividade dos prótons da água (b) e aquecimento magnético gerado em um campo magnético alternado para hipertermia (c). 31
- Figura 10 – Nanossistema multimodal baseado em BNPs-transferrina. Avaliação visual de BNPs (1 - esquerda) e BNPs-transferrina (2 - direita). (a) imagens das suspensões, (b) fluorescência das suspensões das nanossondas e em (c) NPs fluorescendo e sendo atraídas por um campo magnético externo (ímã) – em (b) e (c) excitação por luz UV ($\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$). Em (d) é mostrado através de uma imagem de microscopia de fluorescência confocal as células de carcinoma epitelial cervical humano (HeLa) incubadas com BNPs-transferrina; em azul o núcleo marcado por Hoechst e em vermelho as vesículas após endocitose dos nanossistemas pelos receptores de transferrina. Barra de escala = $10 \mu\text{m}$. 34
- Figura 11 – Estágios da purificação de lectina a partir de uma planta. O processo começa com a obtenção do tecido da planta (a) que é submetido à extração para adquirir o extrato bruto (b). O ensaio da atividade hemaglutinante (c) é realizado para identificar a presença da lectina e a sua inibição (d) é feita para determinar o carboidrato específico ligante da lectina. A purificação geralmente ocorre após o fracionamento do extrato bruto, quando a fração protéica é submetida à coluna cromatográfica (e) e então a lectina pura é eluída da coluna através de um 40

eluente específico (f).

- Figura 12 – Folhas de *Bauhinia monandra*. 42
- Figura 13 – Planta (a), vagens (b) e sementes (c) de *Cratylia mollis*. 43
- Figura 14 – Processo de purificação das isoformas das lectinas de *Cratylia mollis*. 44
- Figura 15 – Oligomerização dos monômeros da Cramoll 1 dependendo do pH. Folhas β no monômero: *back* - posterior, *front* - frontal e *top* - superior. 45
- Figura 16 – Imagens de microscopia confocal de suspensões celulares e biofilme de *Candida albicans* marcados por conjugados de PQs-Con A. Células de hifas (seta) e leveduras (*) das suspensões celulares (a). Marcação de hifas (setas) cercadas por matriz extracelular (*) no biofilme (b). Barras de escala: 10 μm em a e 30 μm em b. 48
- Figura 17 – Detecção e separação magnética de *Staphylococcus aureus* em amostras de sangue. Representação esquemática do processo de detecção onde primeiramente a WGA biotinizada liga-se à superfície de *S. aureus* e posteriormente as MNPs com estreptavidina (SA) se complexam à lectina com a biotina (a). Imagem de microscopia eletrônica de varredura do complexo formado na superfície das células bacterianas separadas magneticamente (b). Barra de escala: 1 μm . 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificações das lectinas de plantas.

39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS DO REFERENCIAL TEÓRICO

$\vec{\mu}$	Momento magnético
AMS	Ácido mercaptosuccínico
APTES	3-aminopropiltriétoxisilano
BC	Banda de condução
BmoLL	Lectina de <i>Bauhinia monandra</i>
BNPs	Nanossondas bimodais (do inglês <i>bimodal nanoprobes</i>)
BoNT/A	Neurotoxina botulínica tipo A
BV	Banda de valência
Cd(ClO ₄) ₂	Perclorato de cádmio
CdTe	Telureto de cádmio
Con A	Concanavalina A, lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>
Cramoll	Lectina de <i>Cratylia mollis</i>
CRD	Domínio de reconhecimento a carboidratos
CT	Tomografia computadorizada de raios X
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
E _g	Energia do <i>bandgap</i>
eV	Elétron-volt
Fab	Fragmento de ligação ao antígeno
FCS	Espectroscopia de correlação de fluorescência (FCS, do inglês <i>fluorescence correlation spectroscopy</i>)
γ -Fe ₂ O ₃	Maghemita
GFP	Proteína fluorescente verde, do inglês <i>green fluorescent protein</i>
Fe ₃ O ₄	Magnetita
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
H	Campo magnético externo aplicado
h ⁺	Buraco deixado pelo elétron
H _c	Campo coercivo
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente
IRM	Imagens por ressonância magnética
K _d	Constante de afinidade de ligação
M	Magnetização da partícula
MA	Lectina de <i>Maackia amurensis</i>

MALDI-MS	Espectrometria de massa por dessorção/ionização a laser assistida por matriz
MNPs	Nanopartículas magnéticas
M _R	Magnetização remanescente
M _s	Magnetização de saturação
NaBH ₄	Borohidreto de sódio
NdFeB	Ímã de neodímio
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
NPs	Nanopartículas
PET	Tomografia de emissão de pósitrons
PQs	Pontos quânticos (do inglês QDs - <i>quantum dots</i>)
RCA ₁₂₀	Aglutinina I de <i>Ricinus communis</i>
RM	Ressonância magnética
SEB	Enterotoxina estafilocócica B
SiO ₂	Dióxido de silício
SPIONs	Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro
Sulfo-NHS	<i>N</i> -hidroxisulfosuccinimida
TRIS base	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
UEA I	Lectina de <i>Ulex europaeus</i> I
WGA	Aglutinina de germe de trigo
WSMoL	Lectina solúvel em água de sementes de <i>Moringa oleífera</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1 FUNDAMENTOS DOS PONTOS QUÂNTICOS	20
3.2 INTRODUÇÃO ÀS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS	27
3.3 NANOSSISTEMAS BIMODAIS E MULTIMODAIS BASEADOS EM PONTOS QUÂNTICOS E NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS	33
3.4 LECTINAS	37
3.4.1 Lectinas de <i>Bauhinia monandra</i>	41
3.4.2 Lectinas de <i>Cratylia mollis</i>	43
3.5 APLICAÇÕES NANOTECNOLÓGICAS (FLUORESCENTES E/OU MAGNÉTICAS) ENVOLVENDO LECTINAS	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 ARTIGO 1: <i>Bauhinia monandra</i> leaf lectin (BmoLL) conjugated with quantum dots as fluorescent nanoprobe for biological studies: application to red blood cells	50
4.2 ARTIGO 2: Evaluating glucose and mannose profiles in <i>Candida</i> species using quantum dots conjugated with Cramoll lectin as fluorescent nanoprobe	51
4.3 ARTIGO 3: Evaluating the glycophenotype on breast cancer tissues with quantum dots-Cramoll lectin conjugates	53
4.4 CAPÍTULO DE REVISÃO: Revealing Glycobiology by Quantum Dots Conjugated to Lectins or “Borono-Lectins”	54
4.5 ARTIGO 4: Nanossonda Multimodal para Estudos em Glicobiologia – Aplicações na Detecção da Fetuína	56
5 CONCLUSÕES	74
6 SÚMULA CURRICULAR	75
REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia biomédica é dedicada à exploração de materiais nanoestruturados para serem aplicados em ciências da vida. Assim, as contribuições significativas do estado da arte da Nanobiotecnologia compreendem, entre outros fatores, a elaboração de plataformas em nanoescala com características ajustáveis e especificidade bioquímica para elucidar processos como a interação de biomoléculas (KAUSHIK, 2019). Um nanomaterial muito empregado em ensaios bioanalíticos, com grande interesse para as ciências da vida, é o ponto quântico (PQ), também denominado *quantum dot* (QD), o qual foi preparado pela primeira vez em 1980 pelo físico russo Alexei Ekimov e vem sendo cada vez mais aplicado nos anos recentes (KEÇILI; BÜYÜKTIRYAKIA; HUSSAINB, 2019).

Os PQs são nanocristais de semicondutores e surgiram como ferramentas versáteis na pesquisa biomédica (JHA et al., 2018). Os PQs apresentam propriedades ópticas e físico-químicas únicas (JHA et al., 2018). Essas propriedades incluem: (i) emissão de luz sintonizável com o tamanho, ou composição; (ii) alto rendimento quântico fluorescente tornando-os excepcionalmente brilhantes; (iii) estreito espectro de emissão de fluorescência e amplo espectro de absorção; (iv) alta resistência à fotodegradação e (v) superfície ativa com grupamentos químicos que permitem sua funcionalização com biomoléculas e/ou nanopartículas (NPs) (YAO et al., 2017; PEREIRA et al., 2019).

Lectinas são proteínas ubíquas na natureza com capacidade de ligação seletiva e específica a sacarídeos livres ou presentes em glicoconjugados (CARVALHO et al., 2018). As interações entre proteínas e carboidratos compreendem uma parte das vias de sinalização mais eficientes que ocorrem nos organismos vivos ou entre eles e seu ambiente. De fato, diversos eventos de comunicação entre células são mediados por interações entre carboidratos da superfície celular e lectinas. Mudanças no perfil de glicosilação estão envolvidas em muitos processos fisiopatológicos, as quais podem acarretar alterações na expressão dos glicídios ligados a proteínas e lipídios nos glicoconjugados (SILVA et al., 2019). As lectinas já vêm sendo utilizadas na elaboração de ferramentas fluorescentes ao serem conjugadas com PQs para estudos glicobiológicos de diferentes estruturas (CUNHA et al., 2018a). Por exemplo, um bioconjugado fluorescente específico para glicose e manose foi obtido a partir da conjugação com

a Cramoll, uma lectina purificada das sementes de *Cratylia mollis* e com amplas aplicações biotecnológicas (CUNHA et al., 2018b). Ademais, outras gliconanossondas podem ser elaboradas empregando-se lectinas com diferentes especificidades, a exemplo da lectina galactose-específica extraída das folhas de *Bauhinia monandra*, conhecida como BmoLL e que apresenta propriedades terapêuticas (CAMPOS et al., 2016) e pode ser utilizada para funcionalizar PQs, gerando nanossondas aplicáveis em estudos envolvendo a expressão de galactose nos sistemas biológicos.

A fusão de componentes de dupla natureza, com propriedades ópticas e magnéticas, em regime de nanoescala, pode também permitir novos avanços no desenvolvimento de nanocompósitos híbridos para aplicações biológicas. Deste modo, a propriedade óptica dos PQs pode ser aliada ao comportamento magnético de NPs magnéticas (MNPs). Nesses nanomateriais bimodais, além de se poder acompanhar a interação com o sistema biológico pela fluorescência dos PQs, quando o comportamento magnético é adicionado aos mesmos, novas vantagens à nanossonda podem ser ofertadas, tais como melhorar o contraste de imagens por ressonância magnética (IRM) (AHMED et al., 2013) e promover separação magnética, interessante para o desenvolvimento de plataformas biossensoras (WANG et al., 2019). Devido ao alto potencial de modificação da superfície e rápida resposta magnética, as NPs de óxido de ferro são consideradas excelentes candidatas magnéticas no desenvolvimento de sistemas a serem aplicados em Biomedicina. Essas MNPs geralmente demonstram propriedades superparamagnéticas em condições ambientes, ou seja, são capazes de serem manipuladas por um campo magnético externo (MUNASINGHE; ATHTHAPATHTHU; JAYARATHNE, 2019).

Ademais, a especificidade dessas nanossondas bimodais magneto-fluorescentes pode ser conferida conjugando-se uma biomolécula, tal como um peptídeo (CHANG et al., 2019), anticorpo (RONG et al., 2019) ou lectina (CHOWDHURY et al., 2018). Diante disso, as lectinas também constituem uma classe de proteínas com potencial para ser empregada na elaboração de nanossistemas multimodais, ou seja, nanomateriais fluorescente-magnéticos com especificidade bioquímica propiciadas pela biomolécula conjugada. Além disso, não há muitos trabalhos envolvendo a conjugação de lectinas em sistemas bimodais óptico-fluorescentes o que pode promover uma nova forma de explorar o

glicofenótipo de sistemas biológicos.

Portanto, a presente tese apresentará os seguintes trabalhos: (i) um artigo publicado na revista *Methods and Applications in Fluorescence*, o qual revela o desenvolvimento de uma nova nanossonda fluorescente galactose-específica obtida pela conjugação da lectina BmoLL aos PQs; (ii) dois artigos que englobam aplicações de PQs funcionalizados com a lectina Cramoll para estudar o perfil de glicose e manose em diferentes espécies de *Candida* e em tecidos de mama normal, fibroadenoma e carcinoma ductal invasivo, que foram publicados nos periódicos *Microbiological Research* e *International Journal of Biological Macromolecules*, respectivamente; (iii) um capítulo de revisão aceite que é focado em aplicações de PQs conjugados a lectinas ou "borono-lectinas", moléculas sintéticas capazes de reconhecer carboidratos sob certas condições. Além disso, serão apresentados os resultados de um artigo experimental em preparação sobre o desenvolvimento de uma nova nanossonda multimodal baseada em PQs, MNPs de óxido de ferro e Cramoll. Objetivou-se, assim, obter um nanossistema óptico-magnético que seja glicose/manose específico com funcionalidades complementares. Esse nanossistema foi avaliado para a detecção da glicoproteína fetuína.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver nanossistemas baseados em PQs carboxilados e lectinas Cramoll ou BmoLL e aplicá-los em estudos em Glicobiologia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar Cramoll a partir das sementes de *Cratylia mollis* e BmoLL das folhas de *Bauhinia monandra*;
- Sintetizar os PQs de CdTe carboxilados e realizar sua caracterização óptica;
- Conjuguar BmoLL e Cramoll aos nanocristais;
- Caracterizar os conjugados PQs-lectinas quanto a parâmetros ópticos e biológicos;
- Avaliar a conjugação dos PQs a BmoLL utilizando eritrócitos ABO como modelos biológicos;
- Investigar e comparar a expressão de glicose e manose em diferentes espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*) aplicando o conjugado de PQs-Cramoll;
- Estudar o perfil de glicose e manose em tecidos normais da mama, fibroadenoma e carcinoma ductal invasivo por meio da marcação com o conjugado de PQs-Cramoll;
- Preparar as MNPs de óxido de ferro e funcionalizá-las com grupamentos amina;
- Obter NPs bimodais (BNPs) por meio da conjugação covalente de PQs carboxilados com MNPs-APTES;
- Funcionalizar as BNPs com a lectina Cramoll;
- Realizar caracterização óptica e físico-química do nanossistema multimodal BNPs-Cramoll;
- Avaliar a efetividade do sistema BNPs-Cramoll no reconhecimento de resíduos de glicose e manose em leveduras de *C. albicans*;
- Aplicar o nanossistema BNPs-Cramoll para a detecção da glicoproteína fetuína.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 FUNDAMENTOS DOS PONTOS QUÂNTICOS

Compreender o funcionamento de processos biológicos ao nível molecular é de grande importância. Assim, uma variedade de ferramentas analíticas vem sendo desenvolvidas na tentativa de investigar a dinâmica das interações biológicas (SUZUKI; YOKOYAMA, 2015). Dados de sistemas biológicos podem ser extraídos empregando-se métodos sofisticados e dispendiosos, tais como ablação a laser associada com um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e espectrometria de massa por dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI-MS). No entanto, muitos desses métodos podem comprometer a qualidade do material analisado ou necessitam de uma laboriosa preparação das amostras, tornando-os limitados para aplicação em sistemas vivos ou tecidos intactos (WOLFBEIS, 2015). Em contrapartida, as técnicas baseadas em fluorescência têm sido consideradas de alta sensibilidade e vêm sendo exploradas em várias modalidades, desde aquisição de imagens, avaliação espectral de substâncias fluorescentes e em fluoroensaios, por exemplo. A alta sensibilidade da fluorescência permite se obter informações provenientes de pequenos conjuntos de moléculas e estimula o desenvolvimento de sondas fluorescentes altamente funcionais e específicas (SUZUKI; YOKOYAMA, 2015).

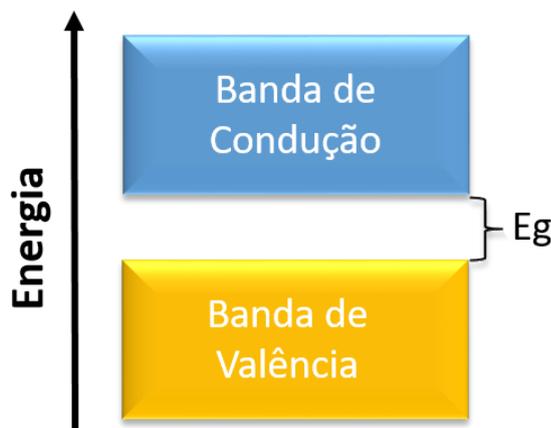
Ao longo das décadas, o desenvolvimento de novas sondas fluorescentes para aplicações nas ciências da vida tem auxiliado consideravelmente na melhor compreensão da complexa interação das moléculas nos sistemas biológicos. Em 1856 foi descoberto acidentalmente o primeiro corante orgânico, chamado mauveína. Em seguida, o cientista alemão, Adolf von Baeyer, sintetizou em 1871 a fluoresceína, um fluoróforo ainda muito utilizado na atualidade. Após a sua descoberta, a fluoresceína tornou-se um substrato para a preparação de outros corantes. Por exemplo, com a bromação da fluoresceína conseguiu-se obter o corante eosina em 1874; a iodação de fluoresceína em 1876 produziu eritrosina; e, a iodação da dicloro-fluoresceína em 1887 forneceu o corante Rosa Bengala. Em 1941, Albert Coons marcou anticorpos com isotiocianato de fluoresceína (FITC), feito que simboliza o início do campo da imunofluorescência. A descoberta da proteína fluorescente verde (GFP, do inglês *green fluorescent protein*) na água-viva

Aequorea victoria em 1962 por Shimomura, Johnson e Saiga promoveu grande contribuição para as pesquisas em Biologia Celular e molecular as quais, inclusive, proporcionaram aos descobridores o Nobel de Química em 2008. Da mesma forma, a síntese de PQs na década de 80 promoveu grande impacto nas aplicações em pesquisas biológicas utilizando sondas fluorescentes (BEREZIN; ACHILEFU, 2010; WARRIER; KHARKAR, 2014). O físico russo Ekimov sintetizou os PQs em uma matriz de vidro, anos depois em 1985 um pesquisador chamado Brus preparou essas nanoestruturas também em meio coloidal. Mas só em 1988 o cientista Reed cunhou o termo "*quantum dot*" (XU; ZHENG, 2019).

PQs ou QDs são nanocristais, formados por materiais semicondutores, que possuem tipicamente diâmetros entre 2 e 10 nm, cujas propriedades ópticas podem ser moduladas de acordo com seu tamanho (PEREIRA et al., 2019). Devido às suas composições e tamanhos, os PQs se beneficiam do confinamento quântico, o qual não é experimentado por estruturas macroscópicas (*bulk*), e até mesmo microscópicas, preparadas a partir dos mesmos semicondutores (H. R; SCHIFFMAN; BALAKRISHNA, 2018). O confinamento quântico tridimensional nos PQs restringe o movimento dos elétrons, levando ao surgimento de níveis discretos de energia eletrônica e por isso são também conhecidos como átomos artificiais (RANJBAR-NAVAZI et al., 2019).

Os materiais sólidos semicondutores possuem uma estrutura energética composta por uma banda de valência (BV) e uma banda de condução (BC). A diferença de energia entre BV e BC é denominada de *bandgap* (E_g), expressa em elétron-volt (eV) que, por sua vez, determina a energia mínima necessária para o elétron acessar a BC, como ilustrado na Figura 1 (RESHMA; MOHANAN, 2019). Nos semicondutores, a diferença entre as bandas é pequena e os elétrons podem alcançar a BC após absorver energia, como por exemplo em forma radiação eletromagnética. Energias de apenas 1 eV podem ser suficientes para impulsionar um elétron da banda BV para a BC (MAHATO; ANSARI; CHO, 2015).

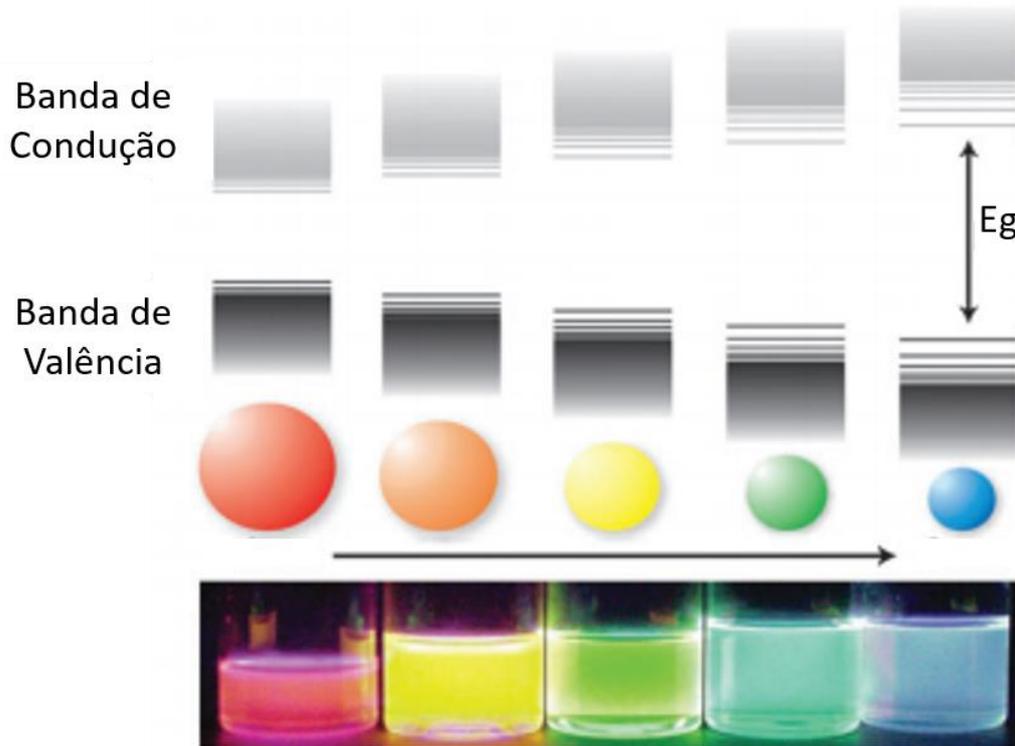
Figura 1 – Diagrama da energia para um semicondutor. E_g = energia do *bandgap*.



Fonte: O Autor (2021).

Um elétron na BV pode ganhar energia, por exemplo pela absorção de um fóton e ser promovido para a BC, levando à formação de um buraco (h^+) na BV. Quando o elétron retorna à BV, o excesso de energia pode ser liberado com emissão de fóton, em um processo conhecido como fluorescência. O par elétron-buraco é denominado de "éxciton" e a distância entre estes é conhecida como raio do éxciton de Bohr. Os PQs são obtidos quando um material semicondutor é reduzido a um tamanho nanométrico menor que o raio de Bohr, estando então em regime de confinamento quântico, e impondo ao par elétron-buraco uma nova distância (RESHMA; MOHANAN, 2019). Por exemplo, o raio do éxciton de Bohr para o telureto de cádmio (CdTe) é de aproximadamente 7,3 nm e os PQs de CdTe, muito utilizados em aplicações biológicas, têm diâmetros consideravelmente inferiores a 7,3 nm possuindo, assim, um forte confinamento quântico (LI et al., 2017). Como consequência do confinamento quântico, há uma mudança na E_g . Assim, quanto menor o tamanho dos PQs sintetizados, maior a E_g . Inclusive, o comprimento de onda de emissão do PQ será inversamente proporcional à E_g (PEREIRA et al., 2019), assim como pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 – Representação esquemática das mudanças energéticas vs. tamanho de PQs, sob confinamento quântico. O painel inferior mostra suspensões coloidais de PQs de CdSe de diferentes tamanhos sob excitação à luz UV.



Fonte: Adaptado de DONEGÁ (2011).

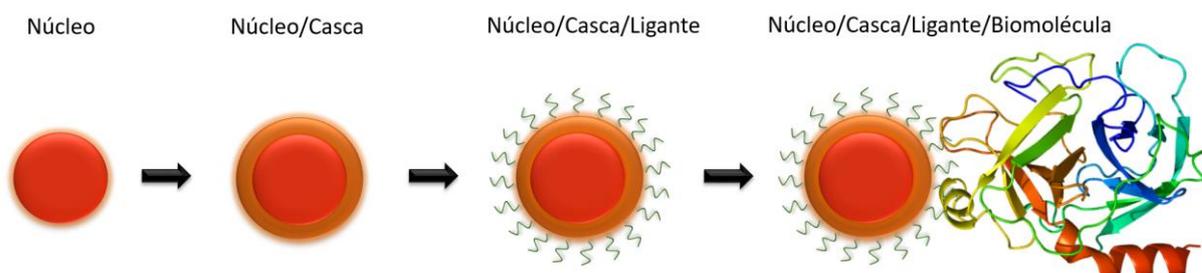
Estruturalmente, os PQs possuem um núcleo (*core*) cristalino que, dependendo de sua composição e especialmente tamanho, confere o perfil de fluorescência que eles vão emitir. Esse núcleo é revestido por uma casca (*shell*), chamada de camada de passivação que é formada por um segundo semicondutor, geralmente com maior E_g , a qual reduz os eventos de recombinação não-radiativas e melhora a eficiência da luminescência (JHA et al., 2018; PEREIRA et al., 2019).

Esses nanocristais geralmente são resultantes de combinações binárias dos átomos pertencentes aos grupos II-VI, III-V e IV-VI da tabela periódica, por exemplo, PQs de CdTe, InP e PbSe, respectivamente. Ademais, novos tipos de PQs ternários e quaternários têm sido sintetizados, por exemplo, CuInS (CIS), CuInSe (CISE), CuZnInS (CZIS), ZnAgInSe (ZAISE) e ZnAgInS (ZAIS) (PEREIRA et al., 2019). Assim, esses precursores podem ser utilizados para a síntese dos PQs empregando-se duas metodologias: (i) *top-down*, na qual o material em escala *bulk* é reduzido à escala nanométrica e inclui técnicas de processamento como epitaxia de feixe molecular e litografia por feixe de elétrons, ou (ii) *bottom-up*, em que os

materiais precursores passam por uma auto-montagem, na qual os átomos são agrupados em solução para produzir os PQs coloidais. PQs empregados em aplicações biológicas geralmente são sintetizados pelo método *bottom-up* em meios aquosos ou orgânicos (WAGNER et al., 2019).

A camada de passivação dos PQs preparados em meio aquoso é obtida com o uso de moléculas contendo grupos tiol, que também atuam como agentes estabilizantes promovendo a estabilidade coloidal. Esses ligantes são bifuncionais, ou seja, além do grupo tiol, possuem grupos amina e/ou carboxila, funcionalizando os PQs para uso na conjugação com biomoléculas (Figura 3). Os ligantes também são os parâmetros-chave para modular a distribuição do tamanho das partículas e conferir carga de superfície para o nanocristal (RESHMA; MOHANAN, 2019).

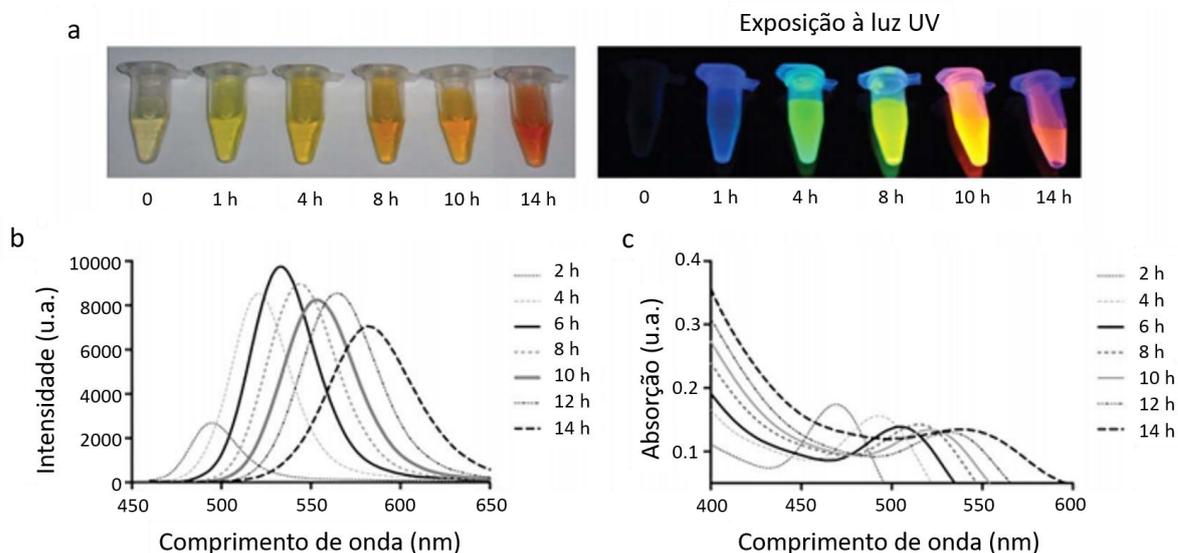
Figura 3 – Esquema da estrutura básica dos PQs e sua conjugação com biomolécula.



Fonte: O Autor (2021).

Os PQs possuem propriedades fotofísicas únicas que os tornam excelentes candidatos para serem utilizados em aplicações biológicas. Por exemplo, seu espectro de cores (fluorescência) é sintonizável com o tamanho, ou seja, PQs emitindo em diferentes comprimentos de onda podem ser sintetizados a partir de um mesmo material com variação do tempo de síntese como a Figura 4a ilustra. Além disso, os PQs possuem um estreito espectro de emissão (Figura 4b) e ampla banda de absorção (Figura 4c), ou seja, uma única fonte de luz pode excitar simultaneamente diferentes PQs exibindo fluorescência em comprimentos de ondas diferentes. Os PQs também apresentam alta resistência à fotodegradação e esses nanocristais apresentam vantagens frente aos corantes orgânicos convencionais para atuarem como sondas fluorescentes no que tange às aplicações biomédicas (LIU et al., 2019).

Figura 4 – Propriedades ópticas dos PQs de CdTe passivados com glutaciona. (a) Imagem da fluorescência dos PQs sob luz UV, $\lambda_{exc} = 312$ nm, (b) espectros de emissão e (c) espectros de absorção das amostras retiradas nos horários indicados após o início da síntese.



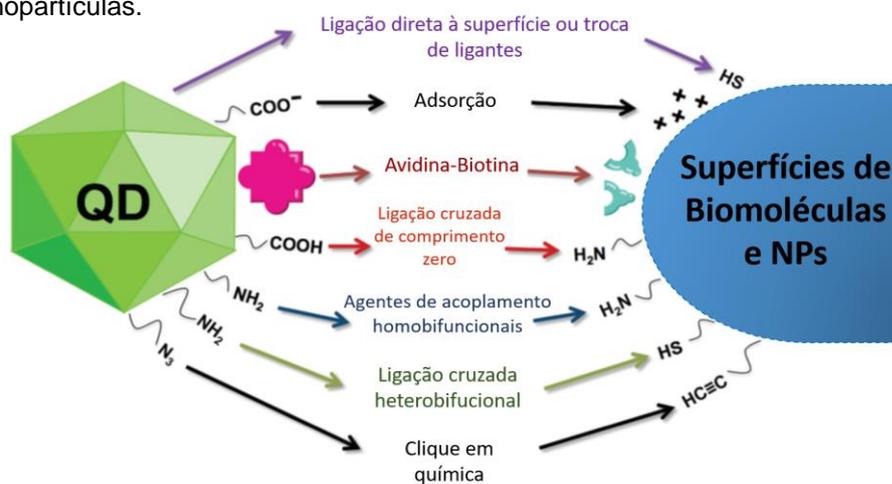
Fonte: Adaptado de PÉREZ-DONOSO et al. (2012).

No que se refere a aplicações biológicas, a toxicidade dos PQs é ainda um ponto em estudo e é particular para cada sistema biológico, concentrações e tempos de análise utilizados. E ainda, independente da constituição das NPs, a estabilidade coloidal e a subsequente formação de agregados em escala micrométrica podem ocorrer e também devem ser avaliadas (ZHANG et al., 2019). Mas a direcionalidade e especificidade dos PQs para estudos biológicos podem ser alcançadas conjugando-se essas nanoestruturas a biomoléculas, tais como proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. Essa bioconjugação pode se processar basicamente através de duas estratégias: ligações covalentes e interações não covalentes, assim como pode-se observar na Figura 5.

A abordagem covalente para conjugar biomoléculas aos PQs requer agentes de acoplamento, os quais podem ser classificados em três categorias: reticuladores de comprimento zero, homobifuncionais e heterobifuncionais. Os agentes de acoplamento de comprimento zero medeiam a reação entre dois grupos funcionais, formando uma nova ligação sem átomos adicionais; no entanto, os reticuladores homobifuncionais e heterobifuncionais possuem um braço espaçador entre os sítios reativos (PEREIRA et al., 2019). Por exemplo, carbodiimidas são agentes de acoplamento de comprimento zero, assim como os reagentes 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e *N*-hidroxisuccinimida (NHS) que podem

promover a interação dos grupos carboxílicos de PQs com as aminas da biomolécula, ou vice-versa, levando a uma ligação amida (H. R; SCHIFFMAN; BALAKRISHNA, 2018). Os agentes homobifuncionais, tal como o glutaraldeído, permitem a conjugação entre dois grupos funcionais idênticos, por exemplo, uma amina na superfície de PQs e outra amina na superfície da molécula. Enquanto os reticuladores heterobifuncionais têm dois sítios reativos diferentes que podem estabelecer uma ligação covalente com dois grupos funcionais distintos, por exemplo, o agente succinimidil-4-(*N*-maleimidometil)ciclo-hexano-1-carboxilato, que promove a conjugação de PQs aminados com o grupo tiol dos resíduos de cisteína de proteínas. Além dessas, uma outra possibilidade de reação covalente que pode ocorrer entre biomoléculas e PQs é pela estratégia bioortogonal, na qual ocorre a cicloadição de azidas e alcinos terminais, podendo ser chamada de reação *click-chemistry* (PEREIRA et al., 2019).

Figura 5 – Estratégias para conjugação de PQs com biomoléculas e nanopartículas. QD – *quantum dot* e NPs – nanopartículas.



Fonte: Adaptado de PEREIRA et al. (2019).

A bioconjugação não-covalente pode ser realizada através da ligação direta de uma biomolécula à superfície dos PQs, por adsorção e pela afinidade da avidina (ou estreptavidina) com a biotina. A ligação direta dos compostos bioativos aos PQs pode ser mediada por interações dativas, geralmente por interações tiol ou coordenação de afinidade com metais. Na adsorção, várias interações podem estar envolvidas, tais como as hidrofóbicas e eletrostáticas (PEREIRA et al., 2019). Quase qualquer biomolécula também pode ser biotinizada e pode se ligar aos PQs

funcionalizados com avidina ou estreptavidina, os quais já estão disponíveis comercialmente (PETRYAYEVA; ALGAR; MEDINTZ, 2013).

Assim como pode-se verificar na Figura 5, os PQs também podem ser ligados a outras NPs. Por exemplo, um biossensor foi fabricado com NPs de ouro funcionalizadas com o ácido 11-mercaptopundecanóico, o qual forneceu grupamentos carboxílicos às NPs que se ligaram aos grupamentos amina de PQs de CdSeTeS revestidos com L-cisteína e ligados a um anticorpo, utilizando os agentes de acoplamento EDC/NHS (NASRIN et al., 2018). Com esta possibilidade de conjugação, a propriedade fluorescente dos PQs pode ser somada à característica intrínseca de outra NP, tal como a propriedade magnética das MNPs para produzir sondas fluorescente-magnéticas (CABRERA et al., 2017).

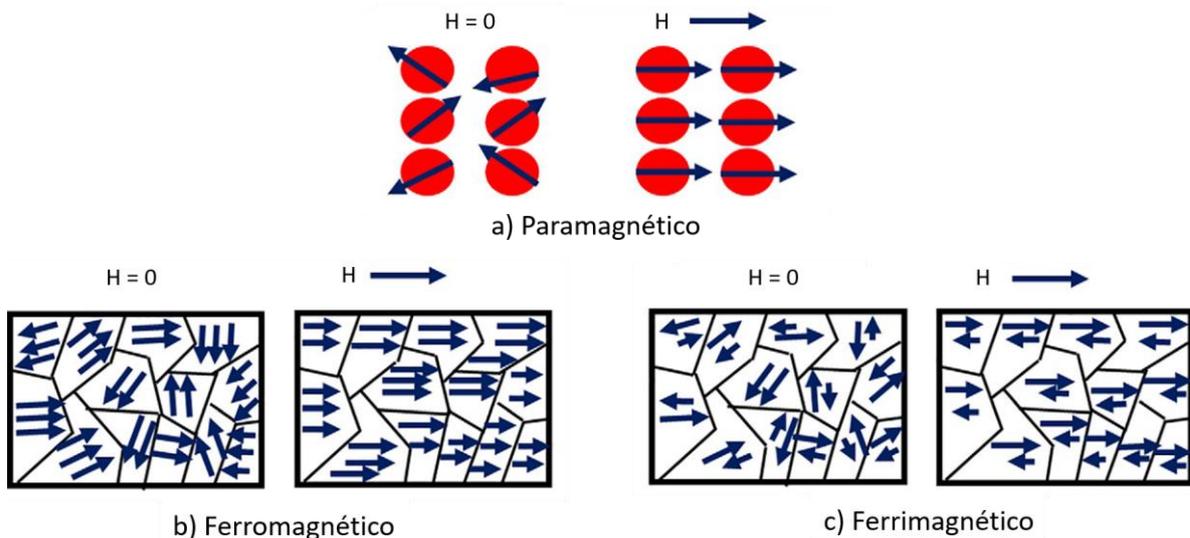
3.2 INTRODUÇÃO ÀS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Os materiais podem ser categorizados quanto às suas características magnéticas (SINNECKER, 2000). De uma forma intuitiva pode-se compreender um pouco sobre as propriedades magnéticas dos materiais associando os elétrons e prótons dos átomos a pequenos ímãs ou dipolos magnéticos. Cada dipolo magnético apresenta um momento magnético ($\vec{\mu}$), o qual pode ser utilizado para caracterizar os materiais quanto às suas propriedades magnéticas. Assim, quando o $\vec{\mu}$ é igual a zero, temos materiais diamagnéticos e quando é diferente de zero podemos ter os materiais paramagnéticos, ferromagnéticos, ferrimagnéticos e antiferromagnéticos. Vale ressaltar que nesses últimos a temperatura exerce um papel importante na determinação do perfil magnético do material (FRANCISQUINI; SCHOENMAKER; SOUZA, 2014).

Focando agora nos materiais que tem $\vec{\mu}$ diferente de zero. Quando há um campo magnético externo, há um fraco alinhamento dos momentos magnéticos paralelamente ao campo nos materiais paramagnéticos (Figura 6a). Exemplos desses materiais paramagnéticos incluem alumínio, titânio e ligas de cobre. Já nos materiais ferromagnéticos há um forte alinhamento do momento magnético na direção do campo (Figura 6b), e nos ferrimagnéticos há momentos magnéticos alinhados paralela e antiparalelamente ao campo (Figura 6c), porém uma resultante intensa e paralela a este ainda prevalece. Ferro, níquel e cobalto são exemplos de materiais ferromagnéticos. Quanto aos ferrimagnéticos, também chamados de

ferritas, temos como exemplo a magnetita, um material de interesse especial por ter comportamento ferrimagnético em temperatura ambiente (SECHOVSKÝ, 2001; IDA, 2015).

Figura 6 – Alinhamento dos momentos magnéticos na ausência e presença de campo magnético externo em materiais magnéticos. H – campo magnético externo aplicado.

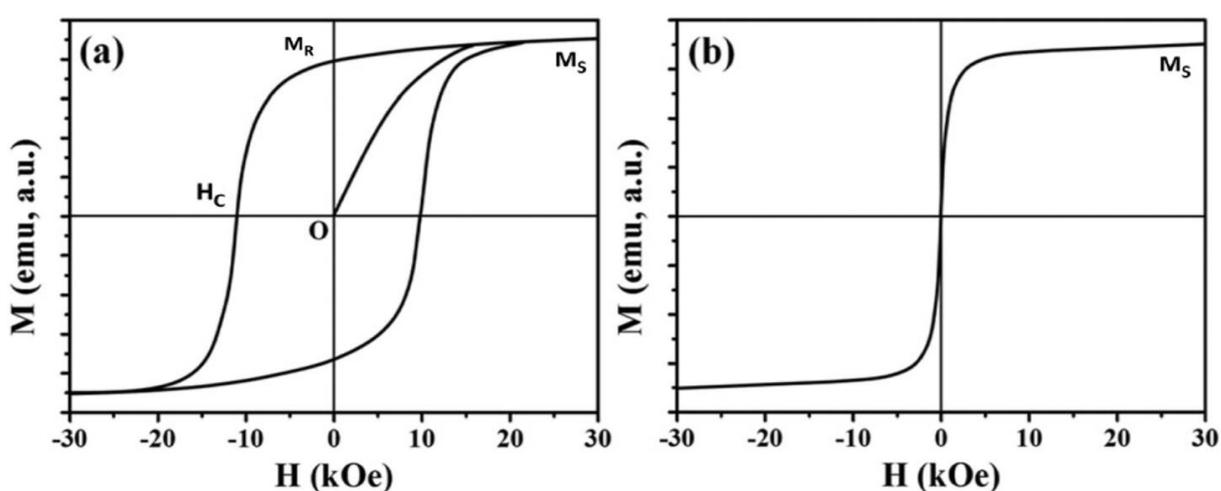


Fonte: Adaptado de MONTAZER; HARIFI (2018).

Particularizando agora para materiais sólidos e macroscópicos ferro e ferrimagnéticos, ainda de forma intuitiva, pode-se dizer que existem regiões microscópicas chamadas domínios magnéticos nesses materiais cujos $\vec{\mu}$ atuam de forma colaborativa levando a um $\vec{\mu}$ resultante, assim como ilustra as Figuras 6b e 6c. Por essa razão, esses materiais possuem multidomínios magnéticos. A resposta macroscópica desses domínios sob ação de um campo magnético externo é avaliada em termos da magnetização. Como os materiais ferro e ferrimagnéticos apresentam magnetização espontânea (ou seja, podem permanecer com uma magnetização resultante por um determinado tempo após cessar o campo externo), a resposta da magnetização induzida no material (M) em função do campo magnético externo aplicado (H) apresenta um perfil de histerese (Figura 7). Na curva de histerese desses materiais (Figura 7a), com a aplicação de H, esses domínios começam a se alinhar na direção do campo aplicado e, quando completamente alinhados, atingem a magnetização máxima chamada da magnetização de saturação (M_s). Mesmo quando o campo é removido (reduzido a zero), o material ainda retém um grau considerável de magnetização, a chamada magnetização

remanescente (M_R). Para trazer de volta a magnetização do material para zero, é necessário aplicar um campo extra na direção oposta. O campo magnético necessário para desmagnetizar o material até zero é chamado de campo coercivo (H_C) (MONTAZER; HARIFI, 2018; WALLYN; ANTON; VANDAMME, 2019).

Figura 7 – Ilustração esquemática de curvas de histerese de materiais ferro e ferri magnéticas (a) e curva M-H típica de materiais superparamagnéticos (b). M – magnetização da partícula; H – campo magnético externo aplicado; M_S – magnetização de saturação; M_R – magnetização remanescente; H_C – campo coercivo.

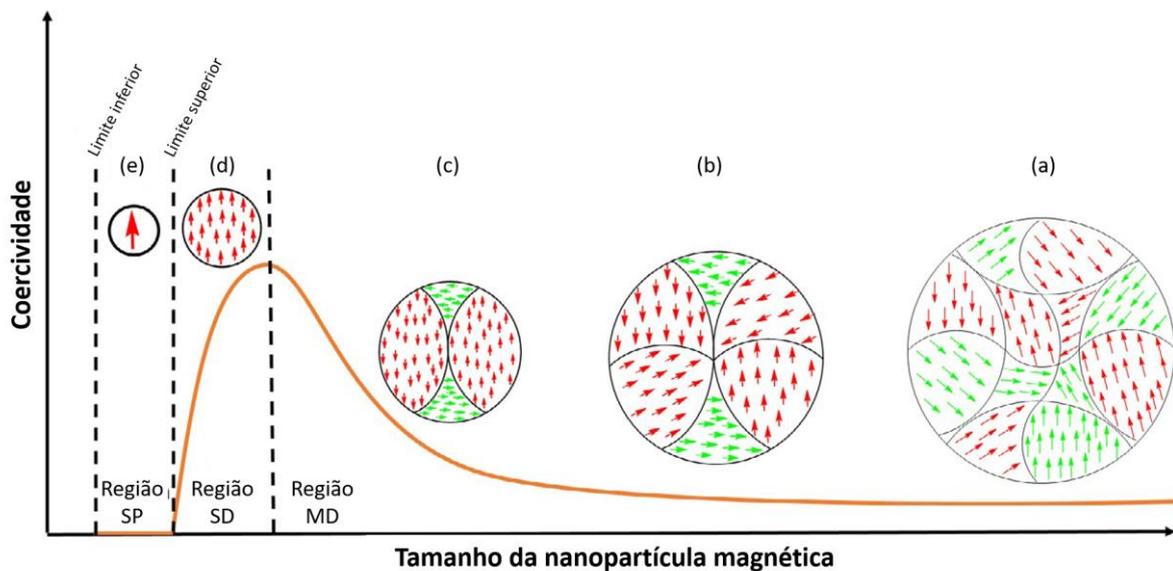


Fonte: DONG et al. (2018).

As MNPs compostas de óxidos de ferro, tais como a magnetita (Fe_3O_4) e maghemita ($\gamma-Fe_2O_3$), têm sido muito usadas no campo biomédico, devido a sua resposta magnética singular e intensa magnetização em temperatura ambiente. As propriedades magnéticas das MNPs de magnetita e maghemita são distintas daquelas dos materiais *bulk* devido aos efeitos quânticos exclusivos da nanoescala (TONG; ZHU; BAO, 2019). O magnetismo dos materiais ferro e ferrimagnéticos é influenciado pelo seu tamanho. Quando esses materiais são reduzidos à nanoescala podem adquirir novas propriedades valiosas e uma dessas propriedades dependente do tamanho é chamada superparamagnetismo (MONTAZER; HARIFI, 2018). Como mencionado anteriormente, a estrutura *bulk* desses materiais é formada por domínios magnéticos (Figura 8a). Porém, quando os materiais magnéticos vão diminuindo de tamanho (Figura 8b - e), os domínios magnéticos começam a reduzir até um domínio único. O tamanho que define o “limite de domínio único” e, como consequência quando o comportamento das MNPs será

superparamagnético, depende do tipo de material magnético usado (TAPEINOS, 2018). Vale lembrar que esse comportamento é também dependente da temperatura. Assim, quando o tamanho da nanoestrutura for suficientemente reduzido, cada MNP monodomínio, se comportará como um único ímã se alinhando na direção do campo externo, assim como átomos se comportam em materiais paramagnéticos, porém a magnetização de saturação será cerca de 10^4 maior, e por isso se diz que essas MNPs são superparamagnéticas. Adicionalmente, nessa condição as MNPs não permanecem magnetizadas quando o campo externo é interrompido (TAPEINOS, 2018; MONTAZER; HARIFI, 2018). Portanto, nessas NPs superparamagnéticas o campo coercivo é zero e há uma alta magnetização de saturação assim como demonstra a Figura 7b (TAPEINOS, 2018).

Figura 8 – Representação esquemática da relação entre a coercividade (campo necessária para remover a magnetização remanescente) e o tamanho das nanopartículas magnéticas. (a) Região de domínios magnéticos (MD) (tamanho de $\text{Fe}_3\text{O}_4 > \text{ca. } 80 \text{ nm}$), (d) região de domínio único (SD) ($\text{ca. } 10 \text{ nm} < \text{tamanho de } \text{Fe}_3\text{O}_4 < 80 \text{ nm}$) e (e) região de superparamagnetismo (SP) (tamanho de $\text{Fe}_3\text{O}_4 < \text{ca. } 15\text{--}20 \text{ nm}$).

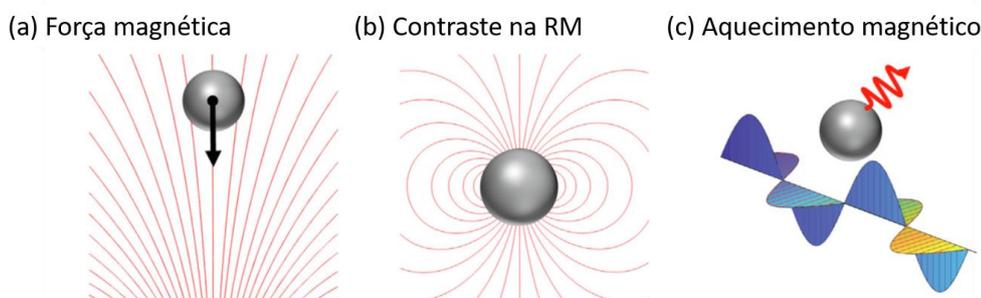


Fonte: Adaptado de TAPEINOS (2018).

Devido a essas propriedades únicas, as MNPs superparamagnéticas são amplamente utilizadas no campo biomédico (GUL et al., 2019) e as aplicações podem ser divididas em três categorias: (i) as MNPs podem ser atraídas por um campo magnético externo de um ímã (Figura 9a) e promover a separação de biomoléculas e células, além de promover um direcionamento de drogas *in vivo*; (ii)

o campo magnético local não uniforme gerado por MNPs (Figura 9b) pode ser aproveitado para atuação dessas nanoestruturas como agentes contraste nas imagens por IRM; (iii) a conversão de energia eletromagnética em energia térmica (Figura 9c), um fenômeno de hipertermia, é de grande interesse para o tratamento de tumores (TONG; ZHU; BAO, 2019).

Figura 9 – Aplicações biomédicas das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro. Força magnética gerada por um campo magnético externo utilizada na separação de componentes (a), MNPs podem atuar como agentes de contraste na ressonância magnética (RM) influenciando na relaxividade dos prótons da água (b) e aquecimento magnético gerado em um campo magnético alternado para hipertermia (c).



Fonte: Adaptado de TONG; ZHU; BAO (2019).

Essas MNPs vêm sendo aplicadas em abordagens teranósticas ao poder aliar aplicações de diagnóstico com terapia, por exemplo, podem atuar para o melhoramento do contraste em IRM e promover hipertermia. Na IRM, por exemplo, os prótons de hidrogênio abundantes no corpo humano comportam-se como pequenos ímãs devido ao movimento de giro (*spin*) em torno de seu próprio eixo. Na ausência de um campo magnético externo forte, os *spins* dessas “barras magnéticas” estão desalinhados, mas quando são submetidos a um campo magnético externo acima de 0,5 Tesla, por exemplo, a maioria desses pequenos ímãs se alinham em direção ao campo, criando, assim, uma magnetização resultante, paralela ao campo magnético aplicado (comportamento paramagnético) (BERGER, 2002). Esses pequenos ímãs também precessionam como piões, numa frequência específica, associada ao campo aplicado, chamada de frequência de Larmor. Dessa forma, quando um pulso de radiofrequência na mesma frequência de Larmor é gerado pelo equipamento, essa magnetização poderá ser desviada para um plano perpendicular ao do campo magnético aplicado. Posteriormente, os *spins* retornam ao seu estado inicial liberando energia em um processo denominado

relaxação. Assim, durante a análise, as IRMs são construídas pela estimulação e relaxação dos *spins* (HAGE; IWASAKI, 2009). Logo, a intensidade do sinal na RM está relacionada aos tempos de relaxação longitudinal (T_1) e transversal (T_2), que variam de acordo com as características físico-químicas do meio que estão inseridos (FATIMA; KIM, 2018). Enquanto os agentes de contraste à base de gadolínio atuam diminuindo o T_1 dos prótons de hidrogênio nos tecidos (contraste positivo), as MNPs de óxido de ferro atuam diminuindo T_2 (contraste negativo) (SAVLA; MINKO, 2017). Quando menor for o tempo de relaxação, melhor o agente de contraste. No entanto, a avaliação da toxicidade é relevante no desenvolvimento de nanoformulações baseadas em MNPs uma vez que sua distribuição nos sistemas biológicos depende de algumas características desses nanomateriais, tais como superfície, tamanho e dose aplicada (JIANG et al., 2019).

Já um efeito terapêutico que pode ser obtido com as NPs superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs) é a geração de calor localizado quando estimuladas por um campo magnético externo alternado, o qual induz aquecimento pela rotação das nanoestruturas e pelo efeito de Néel (a posição das NPs permanece fixa, enquanto os $\vec{\mu}$ se rearranjam dentro da estrutura cristalina do material provocando a dissipação da energia térmica). Uma vez que as células de câncer são mais termosensíveis do que as células normais, em temperaturas da ordem de 42 °C atingidas pela hipertermia, as células de câncer desenvolvem danos estruturais e funcionais (por exemplo, danos a proteínas, membranas e ácidos nucleicos) que podem levar à morte celular (LI; NEJADNIK; DALDRUP-LINK, 2017; RYBKA, 2019).

Vários métodos de síntese vêm sendo desenvolvidos ao longo dos anos para obter MNPs, sobretudo as de magnetita e maghemita, com satisfatória distribuição de tamanho (CARDOSO et al., 2018). Os métodos mais comumente empregados são: decomposição térmica, processo hidrotermal, microemulsão e coprecipitação. A síntese hidrotérmica envolve reações químicas em soluções aquosas sob condições de alta temperatura (130–250 °C) e alta pressão de vapor (0,3–4 MPa). Na decomposição térmica, os precursores organometálicos são decompostos dentro de um solvente apolar em ebulição com a presença de um surfactante estabilizador em alta temperatura (200–300 °C). O método da microemulsão é baseado em sistemas isotrópicos e termodinamicamente estáveis de dois líquidos imiscíveis (água e óleo na presença de surfactantes). A técnica de coprecipitação é uma das vias químicas

mais adotadas, principalmente para preparar óxidos de ferro que envolvem a reação química entre os sais ferroso (Fe^{2+}) e férrico (Fe^{3+}) em uma solução altamente alcalina (CARDOSO et al., 2018; QIAO et al., 2019).

Uma vez que as MNPs são materiais inorgânicos, visando aplicações biomédicas das mesmas, a funcionalização desses nanomateriais torna-se fundamental. Assim, as MNPs podem ser funcionalizadas com moléculas e outros nanomateriais que podem conferir novas propriedades às partículas. Estes processos de funcionalização podem incluir revestimentos com compostos hidrofóbicos e hidrofílicos, biomoléculas e fluoróforos. Assim, MNPs podem conseguir detectar ou purificar espécies biológicas específicas através de funcionalizações com biomoléculas. Além disso, a associação de MNPs com outras NPs, tal como PQs, gerando um nanocompósito, pode fornecer novos nanomateriais multifuncionais com propriedades multimodais magneto-ópticas únicas, abrindo interessantes perspectivas de aplicações biotecnológicas (GAO; GU; XU, 2009; CABRERA et al., 2017; STAFFORD; GARCIA; GUN'KO, 2018).

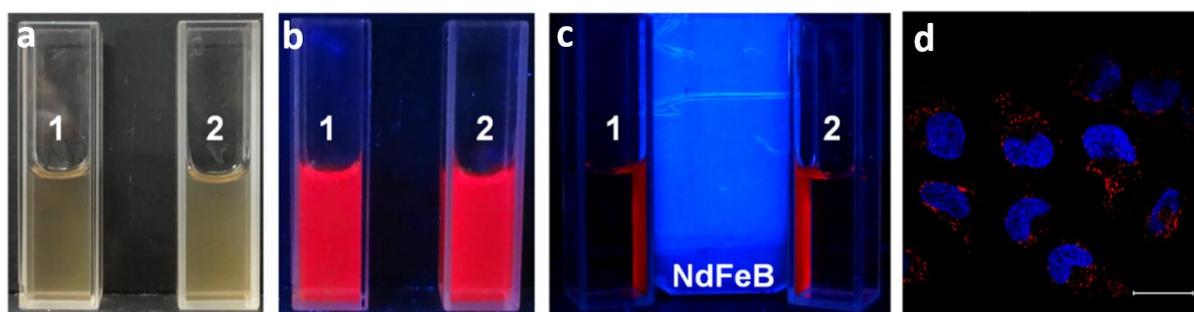
3.3 NANOSSISTEMAS BIMODAIS E MULTIMODAIS BASEADOS EM PONTOS QUÂNTICOS E NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

No campo biomédico, os PQs são amplamente empregados para estudar a dinâmica molecular à nível celular e tecidual, mas também podem ser aplicados em fluoroimunoensaios e na aquisição de imagens fluorescentes *in vivo*. Com o crescente interesse nas aplicações biológicas desses nanocristais na última década, a síntese de PQs avançou significativamente, permitindo que os mesmos possam ser usados em forma de nanomateriais híbridos mais complexos (WAGNER et al., 2019). Assim, a combinação de PQs e MNPs, sobretudo com as SPIONs, tem motivado cada vez mais o interesse dos pesquisadores na elaboração de materiais com propriedades magnética e luminescentes, também chamados de NPs bimodais (BNPs) (CABRERA et al., 2017). Esses nanossistemas óptico-magnéticos podem, especialmente quando combinados com biomoléculas, permitir: (i) aquisição de imagens com especificidade bioquímica propiciada pela fluorescência associada à localização espacial, com maior contraste, da IRM; (ii) acompanhamento de terapia por hipertermia, gerada pelas propriedades magnéticas, por meio das propriedades fluorescentes e (iii) separação de moléculas/células de interesse em fluidos

complexos por campo magnético e detecção simultânea por fluorescência no biossensoriamento (MARCELO et al., 2020).

BNPs já foram preparadas utilizando SPIONs funcionalizadas com 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES), contendo grupamentos amina, conjugadas a PQs de CdTe carboxilados utilizando os agentes de acoplamento EDC/*N*-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS) (CABRERA et al., 2017). A especificidade dessas BNPs foi atribuída por meio da conjugação com a transferrina, uma proteína que tem seu receptor superexpresso em alguns tipos de câncer, obtendo-se, assim, uma nanossonda multimodal magneto-fluorescente (Figura 10a-c) capaz de promover marcações celulares específicas (Figura 10d). O sinal fluorescente propiciou o estudo do mecanismo de captação da transferrina pelo seu receptor através da aquisição de imagens e quantificação por citometria de fluxo. Por outro lado, análises por relaxometria também mostraram que este mesmo material híbrido se apresentou como um promissor agente de contraste para IRM ponderada em T_2 (CABRAL FILHO et al., 2018).

Figura 10 – Nanossistema multimodal baseado em BNPs-transferrina. Avaliação visual de BNPs (1 - esquerda) e BNPs-transferrina (2 - direita). (a) imagens das suspensões, (b) fluorescência das suspensões das nanossondas e em (c) NPs fluorescendo e sendo atraídas por um campo magnético externo (ímã) – em (b) e (c) excitação por luz UV ($\lambda_{exc} = 365\text{ nm}$). Em (d) é mostrado através de uma imagem de microscopia de fluorescência confocal as células de carcinoma epitelial cervical humano (HeLa) incubadas com BNPs-transferrina; em azul o núcleo marcado por Hoechst e em vermelho as vesículas após endocitose dos nanossistemas pelos receptores de transferrina. Barra de escala = 10 μm .



Fonte: Adaptado de CABRAL FILHO et al. (2018).

Outros sistemas multimodais têm sido desenvolvidos com diferentes biomoléculas. Por exemplo, o fragmento de ligação ao antígeno (Fab) de anticorpos hCC49 (anticorpo monoclonal humanizado - CC49) foi conjugado a BNPs baseadas

em NPs de Fe_3O_4 e PQs de CdTe, formando um sistema multimodal com afinidade à cadeia de açúcar sialisada presente na glicoproteína-72, associada a tumores no câncer. Assim, as imagens por fluorescência mostraram que os nanocompósitos acumularam-se uniformemente na superfície das células de carcinoma do cólon. Além disso, foi verificado uma grande magnetização de saturação e nenhum magnetismo permaneceu sem o campo magnético externo o que torna este nanomaterial uma ferramenta útil para separação em sistemas fluídicos (AHMED et al., 2013).

O folato é outra biomolécula cujo receptor pode estar em grande quantidade na superfície de células neoplásicas, assim, o ácido fólico foi também utilizado na elaboração de outros nanossistemas multimodais baseados em PQs de CdSe/ZnS com NPs superparamagnéticas de óxido de ferro e manganês (DI CORATO et al 2011) e PQs de CdTe/ZnS com NPs de Fe_3O_4 (DING et al., 2018). Em ambos os estudos, a captação celular dos nanocompósitos via endocitose mediada por receptor de folato foi acompanhada pela fluorescência das nanossondas em imagens de microscopia confocal enquanto a magnetização desses materiais foi capaz de permitir a separação magnética das células.

Uma estrutura híbrida magneto-fluorescente foi elaborada através de um núcleo composto por PQs de CdSe/CdS revestido por uma casca de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Essas BNPs foram internalizadas por células embrionárias de rato em cultura celular 3D, assim como observado por microscopia de fluorescência, e também melhoraram o contraste nas IRM dessas células (PAHARI et al., 2018). Em outra estratégia para a preparação desses nanocompósitos, NPs de óxido de ferro foram utilizadas como núcleo que foi revestido por sílica mesoporosa. A propriedade fluorescente para elaborar o sistema bimodal foi propiciada pelos PQs de CdSe/ZnS, os quais foram alocados no interior dos poros do compósito magnético. Além disso, para evitar a opsonização, esses BNPs receberam um revestimento de albumina humana. Assim, o nanocompósito obtido foi aplicado para a aquisição de imagens fluorescentes de células de carcinoma epitelial cervical humano (HeLa) e a avaliação das relaxividades longitudinal e transversal com as BNPs confirmou seu papel como agente de contraste para IRM, além de ter sido aplicado com sucesso no tratamento de hipertermia magnética nas células HeLa (PERTON et al., 2019).

Em outro estudo, NPs de MnFe_2O_4 foram utilizadas como núcleo e PQs de ZnS como a casca de um material heteroestrutural bifuncional. A presença dos

nanocristais no material híbrido melhorou a magnetização do mesmo uma vez que houve mudanças no rearranjo das estruturas cristalinas do nanocompósito devido à substituição de íon Mn^{2+} por Zn^{2+} e possibilitou uma curva de aquecimento estável atingindo a temperatura hipertérmica (ca. 45,7 °C) em concentrações menores em comparação às NPs de $MnFe_2O_4$ sozinhas (MONDAL et al., 2019). Isso indica que as BNPs baseadas em PQs, além de fornecerem a fluorescência ao bimodal nessa situação, ajudaram a melhorar as propriedades de magnetização das MNPs.

Uma outra aplicação desses nanocompósitos magneto-fluorescentes é a capacidade de poder detectar e isolar células tumorais circulantes numa determinada amostra biológica. Por exemplo, PQs de $ZnS:Mn^{2+}$ e NPs de Fe_3O_4 foram encapsulados em nanoesferas de dióxido de silício (SiO_2), as quais foram bioconjugadas ao anticorpo anti-EpCAM tumor-específico. O sistema obtido teve uma resposta magnética rápida capaz de capturar células tumorais circulantes no sangue de pacientes em minutos e o reconhecimento dos complexos células-imunonanocompósitos foi realizado pela fluorescência emitida pelos PQs (CUI et al., 2019). Assim, essa capacidade de separação magnética também pode ser útil para o isolamento específico de biomoléculas que podem estar expressas em diferentes desordens, as quais podem ainda ser quantificadas por meio das diferenças na resposta fluorescente.

Dois nanocompósitos multifuncionais foram preparados para a detecção de neurotoxina botulínica tipo A (BoNT/A) e enterotoxina estafilocócica B (SEB), toxinas proteicas contaminantes de alimentos e água. Os sistemas multimodais tiveram a mesma base bimodal, a qual foi construída a partir da conjugação de PQs de $CdSe/ZnS$ carboxilados na superfície de NPs Fe_3O_4 modificadas com polietilenoimina. Em seguida, esses BNPs resultantes foram conjugados a anticorpos monoclonais anti-BoNT/A ou anti-SEB. Por fim, a detecção das toxinas foi realizada por meio de um ensaio de fluxo lateral, no qual uma membrana de nitrocelulose com os sistemas detectores impregnados teve o sinal de fluorescência determinado (WANG et al., 2019).

Diante das inúmeras aplicações biotecnológicas que os nanossistemas magneto-fluorescentes podem ofertar, outras biomoléculas também podem ser úteis para conceder especificidade. Assim, proteínas capazes de reconhecer específica e seletivamente os carboidratos, denominadas lectinas, podem ser empregadas nesses nanossistemas para investigações em Glicobiologia.

3.4 LECTINAS

Lectinas são proteínas com capacidade de reconhecer e se ligar a carboidratos. Essas proteínas foram descobertas em plantas e pesquisas pioneiras com as mesmas demonstraram sua capacidade de aglutinar eritrócitos, por isso elas foram denominadas inicialmente de fitohemaglutininas. A primeira lectina, relatada por Peter Hermann Stillmark em 1888, foi isolada de extratos de sementes da mamona, *Ricinus communis*, a qual foi denominada de ricina. No entanto, quando se descobriu que algumas hemaglutininas aglutinavam grupos sanguíneos específicos, foi cunhado o termo lectina, proveniente da palavra latina *legere* que significa selecionar (COELHO et al., 2019).

Portanto, lectinas constituem uma classe de proteínas que possuem pelo menos um domínio não-catalítico que se liga a um carboidrato específico, normalmente denominado domínio de reconhecimento a carboidratos (CRD, *carbohydrate recognition domain*) (SCHUTTER; VAN DAMME, 2015). Logo, elas são estritamente diferenciadas dos anticorpos de ligação ao açúcar, das enzimas que processam glicanos como substratos e das proteínas sensoras/transportadoras de mono- e oligossacarídeos livres (LUDWIG et al., 2019). A presença do CRD nas lectinas propicia a ligação dessas proteínas a carboidratos em solução ou à porção de açúcar presente em glicoproteínas e glicolipídios (CUMMINGS et al., 2017).

Essas proteínas podem ser encontradas na forma de monômeros, homo- e heterodímeros e até como moléculas homo- e heterotetraméricas (DIAS et al., 2015). A constante de afinidade de dissociação (K_d) de lectinas para monossacarídeos encontra-se na faixa de 10^{-3} M, enquanto a ligação dessas proteínas bioativas com oligossacarídeos ou glicanos complexos por meio de interações multivalentes resulta em um aprimoramento considerável na afinidade, levando a um valor de K_d na faixa de 10^{-6} a 10^{-8} M (BHUTIA et al., 2019). Essa multivalência da lectina é também chamada de efeito *cluster*. Adicionalmente, a orientação espacial dos resíduos glicídios também pode influenciar na ligação da lectina a essas estruturas (MÜLLER; DESPRAS; LINDHORST, 2016). As interações entre lectinas e seus ligantes são governadas principalmente por uma rede de pontes de hidrogênio com contribuições adicionais da força Van der Waals e interações hidrofóbicas. A especificidade das lectinas aos carboidratos é determinada por locais de ligação no perfil de aminoácidos conservado da sua estrutura tridimensional. Assim, a estabilidade de

uma lectina é influenciada pela sua estrutura terciária ou quaternária (GAUTAM et al., 2020).

Lectinas são onipresentes na natureza e podem ser isoladas desde vírus até mamíferos. Em todos os organismos, essas proteínas participam de mecanismos relacionados à sobrevivência, regulação do sistema imune e estocagem de carboidratos (FIGUEIRÔA et al., 2017). As lectinas oriundas do reino vegetal são as mais estudadas, com cerca de centenas já isoladas e caracterizadas. Em plantas, as lectinas estão distribuídas em vários tecidos, por exemplo, folhas, sementes, entrecascas, bulbos, tubérculos, raízes, rizomas e flores. A maioria das lectinas vegetais conhecidas foi isolada de plantas pertencentes à família Leguminosae (Fabaceae) (DIAS et al., 2015; CAGLIERI; KREMER; PINTO, 2018).

As classificações das lectinas de plantas estão sumarizadas na Tabela 1. De acordo com a arquitetura geral e CRD, essas lectinas podem ser classificadas em merolectinas, hololectinas, superlectinas e quimerolectinas. Merolectinas possuem apenas um único CRD e por serem monovalentes são incapazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Hololectinas são compostas de dois CRDs idênticos ou muito homólogos que se ligam ao mesmo carboidrato ou carboidratos com elevada homologia estrutural, tornando-as capazes de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados porque são encontradas na natureza como divalentes ou multivalentes. Superlectinas possuem ao menos dois CRDs que se ligam a carboidratos estruturalmente não relacionados. Quimerolectinas apresentam um ou mais CRDs e outro domínio que possui atividade biológica não ligante a carboidrato, como atividade catalítica, e atua independentemente do CRD (MISHRA et al., 2019).

Baseando-se na especificidade de ligação a carboidratos, as lectinas oriundas de plantas podem ser classificadas em seis famílias (JOHN; TABBASUM; RAO, 2013), assim como mostra a Tabela 1. Além disso, assim como pode-se ver nessa mesma Tabela, o estudo da sequência de polipeptídeos das lectinas vegetais e da estrutura de seus CRDs, possibilitado com o advento das análises de genoma e transcriptoma das plantas, permitiram a classificação dessas lectinas em doze famílias de acordo com suas especificidades a carboidratos (JOHN; TABBASUM; RAO, 2013; BHUTIA et al., 2019).

Tabela 1 – Classificações das lectinas de plantas.

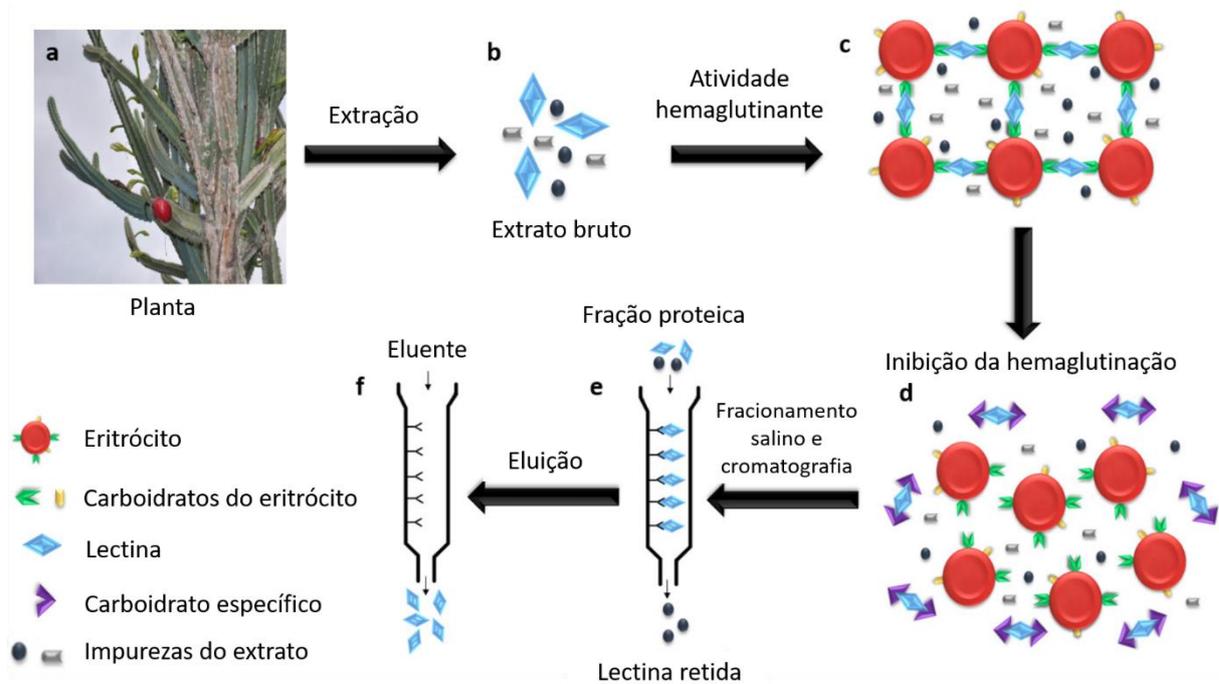
Arquitetura geral e domínio de reconhecimento a carboidratos	Especificidade de ligação a carboidrato	Sequência e homologia estrutural
Merolectinas	Manose e manose/glicose	Homólogos da aglutinina de <i>Agaricus bisporus</i>
Hololectinas	Manose/maltose	Amarantinas
Superlectinas	Galactose/ <i>N</i> -acetilglicosamina	Homólogos de quitinase classe V com atividade de lectina
Quimerolectinas	<i>N</i> -acetilglicosamina/(<i>N</i> -acetilglicosamina) _n	Cianovirina
	Fucose	A aglutinina de <i>Euonymus europaeu</i>
	Ácido siálico	Família da aglutinina de <i>Galanthus nivalis</i>
		Proteínas com domínio de heveína
		Jacalina
		Leguminosas
		Domínios motivo de lisina
		Nictaba
		Ricina-B

Fonte: O Autor (2021).

A purificação de lectinas de plantas é iniciada com a extração do tecido ou órgão vegetal (Figura 11a). Na investigação da presença de lectinas em um extrato de planta (Figura 11b) é comum se fazer o ensaio da hemaglutinação como ilustra a Figura 11c, pois essas proteínas interagem com porções de açúcar na superfície dos eritrócitos interligando-os e formando uma rede ou malha de hemácias, fenômeno conhecido como hemaglutinação (ADAMOVIĆ; MALINOVSKÁ; WIMMEROVÁ, 2014). Para confirmar a presença e indicar a especificidade da lectina a ser purificada se faz necessário realizar um ensaio chamado de inibição da hemaglutinação conforme

indica a Figura 11d. Neste ensaio são utilizados carboidratos livres em diferentes concentrações capazes de impedir a aglutinação e assim, poder fazer uma prévia avaliação semiquantitativa da afinidade e especificidade da lectina de interesse (VAN DAMME, 2014).

Figura 11 – Estágios da purificação de lectina a partir de uma planta. O processo começa com a obtenção do tecido da planta (a) que é submetido à extração para adquirir o extrato bruto (b). O ensaio da atividade hemaglutinante (c) é realizado para identificar a presença da lectina e a sua inibição (d) é feita para determinar o carboidrato específico ligante da lectina. A purificação geralmente ocorre após o fracionamento do extrato bruto, quando a fração protéica é submetida à coluna cromatográfica (e) e então a lectina pura é eluída da coluna através de um eluente específico (f).



Fonte: Adaptado de OLIVEIRA et al. (2018a).

Geralmente, o extrato bruto contendo a lectina sofre fracionamento preliminar, por exemplo, por precipitação com sulfato de amônio, a fim de obter uma fração proteica desprovida de componentes indesejáveis, como polissacarídeos. A purificação final é realizada por um método de cromatografia (Figura 11e), tal como a cromatografia de afinidade (NASCIMENTO et al., 2012). Então um eluente específico é adicionado e a lectina pura é obtida (Figura 11f) (OLIVEIRA et al., 2018a).

Os carboidratos são moléculas orgânicas que atuam como mediadores em distintos processos biológicos, tais como interações célula-célula, diferenciação e proliferação celular, seja em situações fisiológicas ou patológicas (CAVADA et al., 2019). Por conseguinte, a variedade de propriedades biológicas apresentada pelas lectinas é devido à capacidade dessas proteínas atuarem como moléculas de reconhecimento dos carboidratos e glicanos nas células, tecidos e fluidos biológicos. Sendo assim, essas proteínas podem ser consideradas valiosas ferramentas aplicadas em Biotecnologia incluindo aplicações diagnósticas, farmacológicas e terapêuticas (COELHO et al., 2017).

As aplicações das lectinas na investigação de atividades biológicas incluem mecanismos antipatogênicos, por exemplo, ações antiviral (HUANG et al., 2018), inseticida (SANTOS et al., 2020), bactericida (SILVA et al., 2019) e fungicida (RIO et al., 2019). Em células humanas, as lectinas podem exercer desde ação imunomoduladora induzindo a proliferação de linfócitos (ZENG et al., 2019) até e atividade citotóxica em células tumorais (LALITHA et al., 2020). Capacidades anti-inflamatória e antinociceptiva (CAMPOS et al., 2016) dessas proteínas também são reportadas. O potencial biotecnológico das lectinas também é encontrado na imobilização dessas moléculas bioativas em colunas cromatográficas para isolamento de glicoproteínas (DE-SIMONE et al., 2018). A utilização de lectinas como carreadoras de drogas também vem sendo investigada, por exemplo, no transporte de agentes quimioterápicos (BONDE; TAMBE, 2019).

3.4.1 Lectinas de *Bauhinia monandra*

O gênero *Bauhinia*, pertencente à família Fabaceae, contém cerca de 60 espécies distribuídas no território brasileiro e a espécie *Bauhinia monandra*, conhecida popularmente no Brasil como "pata-de-vaca", é amplamente aplicada na medicina popular, por exemplo como agente hipoglicemiante (ARAUJO-MELO et al., 2017). Das folhas de *B. monandra* (Figura 12) foi obtida uma lectina galactose-específica chamada de BmoLL. Esta lectina contém duas cadeias polipeptídicas, uma glicosilada de 33 kDa e outra não-glicosilada de 26 kDa. A BmoLL é estável com capacidade hemaglutinante numa ampla faixa de pH (4,5-9) e em temperaturas até 50 °C (COELHO; SILVA, 2000). Outra lectina ligadora de galactose foi purificada de *B. monandra*, mas de suas raízes, e foi denominada (BmoRoL) à qual apresenta

um único polipeptídeo glicosilado de 26 kDa, termoestabilidade até 60 °C e ativa numa estreita faixa de pH (6,5-7,5). A BmoRoL promoveu ação antifúngica contra espécies fitopatogênicas de *Fusarium* e atividade termiticida em *Nasutitermes corniger* (SOUZA et al., 2011). Embora até o presente momento essas duas lectinas tenham sido purificadas de *B. monandra*, distintas propriedades biológicas foram atribuídas à BmoLL.

Figura 12 – Folhas de *Bauhinia monandra*.



Fonte: O Autor (2021).

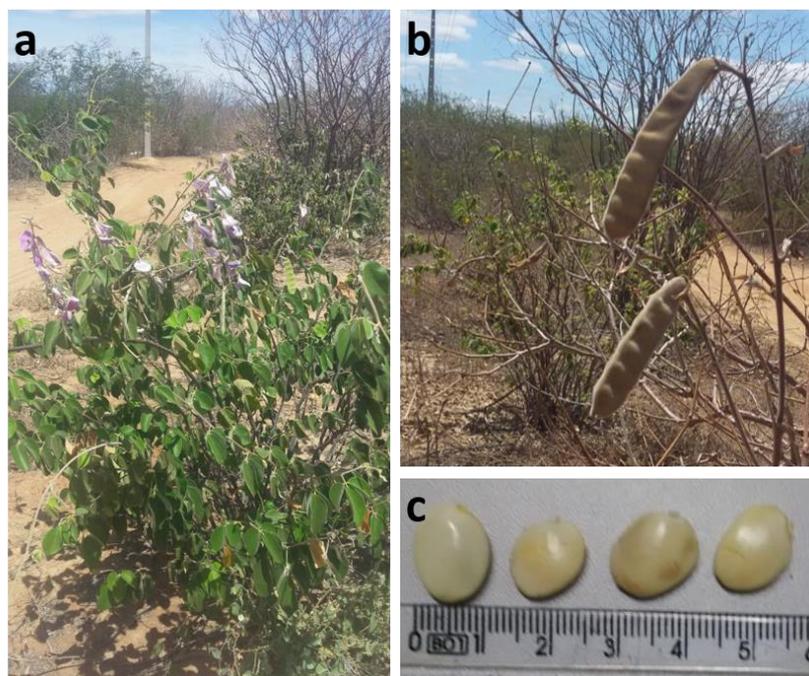
A BmoLL apresentou ação inseticida contra pragas que afetam a agricultura (*Callosobruchus maculatus*, *Zabrotes subfasciatus* e *Anagasta kuehniella*) (MACEDO et al., 2007). Moléculas promissoras para serem aplicadas como fitoterápicos precisam ser submetidas a testes para avaliar sua toxicidade e assegurar seu uso medicinal. Assim, foi determinado que a BmoLL foi incapaz de promover citotoxicidade e mutagenicidade em cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* (SISENANDO et al., 2009). Esta lectina também mostrou ação anti-inflamatória e antinociceptiva *in vivo* uma vez que a BmoLL inibiu o edema de pata induzido por carragenina e reduziu significativamente tanto a migração leucocitária quanto na contorção induzida pela administração de ácido acético (CAMPOS et al., 2016). Diferentes estudos foram realizados para incorporar a BmoLL em sistemas de entrega de fármaco. A BmoLL foi adsorvida à superfície de NPs constituídas pelos copolímeros policaprolactona e dextrana e a lectina

conservou sua atividade hemaglutinante após a conjugação, sugerindo, assim, uma possível aplicação deste tipo de NPs modificadas na superfície para administração oral direcionada (RODRIGUES et al., 2003). Levando em consideração o uso promissor como hipoglicemiante desta lectina, Rosilio et al. (2004) promoveram a penetração da BmoLL carregada negativamente em monocamadas constituídas por uma mistura do fosfolípido dioleilfosfatidilcolina com o reagente octadecilamina carregado positivamente.

3.4.2 Lectinas de *Cratylia mollis*

Cratylia mollis é uma forrageira (Figura 13a), popularmente conhecida como feijão camaratu ou camaratuba, nativa do semiárido pernambucano. Esta leguminosa pertence à tribo Phaseoleae, subgrupo Dioclineae que inclui também o gênero *Canavalia*, botanicamente relacionado à *C. mollis*, sendo a espécie *Canavalia ensiformes* a fonte da Concanavalina A (Con A), lectina mais amplamente estudada (CORREIA; COELHO, 1995; SILVA et al., 2014).

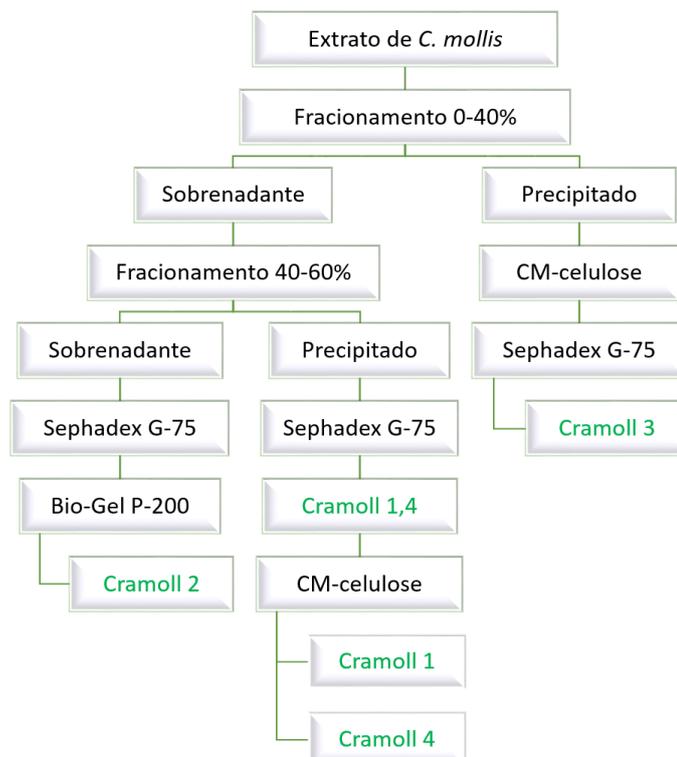
Figura 13 – Planta (a), vagens (b) e sementes (c) de *Cratylia mollis*.



Fonte: O Autor (2021).

Nas vagens (Figura 13b) de *C. mollis* são encontradas suas sementes (Figura 13c) que por sua vez albergam quatro diferentes formas moleculares de lectinas (Cramoll), denominadas isoformas ou isolectinas Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 e Cramoll 4. As isoformas 1, 2 e 4 são glicose/manose específicas e a Cramoll 3 é uma glicoproteína reconhecadora de galactose. Para realizar a purificação dessas isoformas de Cramoll (Figura 14), primeiramente o extrato das sementes de *C. mollis* é submetido ao fracionamento salino com sulfato de amônio (F0-40%) seguido de uma centrifugação. O precipitado obtido pode ser utilizado para o isolamento da Cramoll 3, enquanto o sobrenadante passa por um novo fracionamento salino (F40-60%) seguido de posterior centrifugação. O sobrenadante adquirido contém a Cramoll 2 e o precipitado pode ser submetido à cromatografia de afinidade em Sephadex G-75 para a obtenção de uma preparação contendo as isoformas 1 e 4 (Cramoll 1,4), as quais podem ser separadas por cromatografia de troca iônica numa coluna de CM-celulose (PAIVA; COELHO; 1992; CORREIA; COELHO, 1995).

Figura 14 – Esquema do processo de purificação das isoformas das lectinas de *Cratylia mollis*.

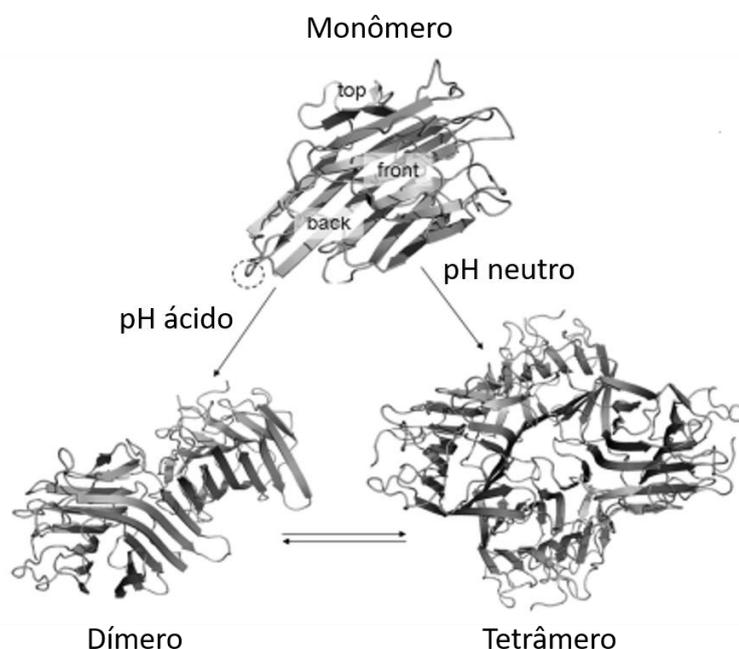


Fonte: O Autor (2021).

A Cramoll 1 tem uma banda principal de 31 kDa, de caráter básico com ponto isoeletrico em torno de 8,6 e apresenta uma termoestabilidade até 80 °C,

(CORREIA; COELHO, 1995). Tal isoforma possui 236 resíduos de aminoácidos, sua estrutura terciária tem três folhas β (posterior, frontal e superior), tal como demonstrada na estrutura terciária monomérica na Figura 15, que ficam conectadas por *loops*. Além disso, essa lectina apresenta 82% de homologia com a Con A, a qual tem sítios idênticos de ligação ao metil- α -D-manopiranosídeo, cálcio e manganês (SOUZA et al., 2003). A oligomerização desta lectina depende do pH assim como pode-se observar na Figura 15, uma vez que a Cramoll 1 forma dímero em pH 5,0 e tetrâmero em pH 7,0 (VAREJÃO, CORREIA; FOGUEL, 2011).

Figura 15 – Oligomerização dos monômeros da Cramoll 1 dependendo do pH. Folhas β no monômero: *back* - posterior, *front* - frontal e *top* - superior.



Fonte: Adaptado de VAREJÃO et al. (2011).

Vários estudos vêm sendo realizados tanto com a isoforma 1 quanto com a preparação contendo as isoformas 1 e 4 (Cramoll 1,4) e cada vez mais estão demonstrando a versatilidade nas aplicações biotecnológicas para essas lectinas (SILVA et al., 2014). A Cramoll 1,4 tem sido empregada para a elaboração de biossensores, por exemplo ao ser imobilizada por interações eletrostáticas em um nanocompósito híbrido composto por NPs de ouro e polianilina para diferenciar glicoproteínas anormais em soros de pacientes com os sorotipos 1, 2 e 3 da dengue (AVELINO et al., 2014). Ela também foi imobilizada em nanotubos de carbono carboxilados com poli-L-lisina para distinguir soros de pacientes com hiperplasia

prostática benigna e câncer de próstata (SILVA et al., 2016). Propriedades terapêuticas também foram relatadas ao incorporar a Cramoll 1,4 em determinados nanomateriais, por exemplo, foi determinado o potencial antitumoral contra sarcoma 180 dessa lectina recombinante encapsulada em lipossomas furtivos (CUNHA et al., 2016). Além disso, a Cramoll 1,4 imobilizada em nanotubos de dióxido de titânio revestidos com dois polieletrólitos de cargas opostas favoreceu a proliferação e adesão de células semelhantes à osteoblastos mostrando um uso promissor para o aprimoramento de implantes metálicos (OLIVEIRA et al., 2018b).

Diante da diversidade de aplicabilidades que as lectinas podem exercer, elas também podem ser utilizadas em sistemas nanoestruturados com propriedades ópticas e/ou magnéticas para distintos estudos que envolvem a participação de sacarídeos.

3.5 APLICAÇÕES NANOTECNOLÓGICAS (FLUORESCENTES E/OU MAGNÉTICAS) ENVOLVENDO LECTINAS

Com o rápido desenvolvimento nanotecnológico, a associação entre proteínas e nanoestruturas oferece a oportunidade de combinar propriedades físico-químicas dos nanomateriais e funções das proteínas e assim aprimorar e complementar a atuação biológica desses nanossistemas (ZHANG et al., 2020). Assim, lectinas vêm sendo associadas a sistemas nanoestruturados para desenvolver gliconanopartículas capazes de serem utilizadas em estudos glicobiológicos (CUNHA et al., 2018a).

No campo da biofotônica, bioconjugados baseados em PQs-lectinas vêm apresentando eficiência na investigação da expressão de glicídios em diferentes sistemas biológicos. A Cramoll foi conjugada eficientemente por adsorção a PQs de CdTe (PQs-Cramoll) em pH 7,0. A especificidade do conjugado foi determinada pela marcação > 90% de células de *C. albicans*, uma vez que sua parede celular expressa glicose e manose, associada à diminuição da marcação após incubação com a inibição dos sítios da lectina conjugada pelo metil- α -D-manopiranosídeo (CUNHA et al., 2018b). Dois bioconjugados baseados em PQs de CdTe/AMS com especificidades distintas a carboidratos foram também obtidos: um pela ligação covalente com a lectina UEA I (*Ulex europaeus* I) e outro pela adsorção da Con A resultando nos sistemas PQs-UEA I e PQs-Con A com capacidade de ligação à L-

fucose e glicose/manose, respectivamente. Esses bioconjugados foram aplicados para estudar a expressão dos monossacarídeos específicos de cada lectina em tecidos normais de mama, com fibroadenoma e de carcinoma ductal invasivo. Assim, o estudo mostrou que enquanto o estroma de todos os tecidos foi marcado intensamente por PQs-Con A; as células ductais, sobretudo de tecidos normais e com carcinoma ductal invasivo, foram preferencialmente marcadas por PQs-UEA I (ANDRADE et al., 2013).

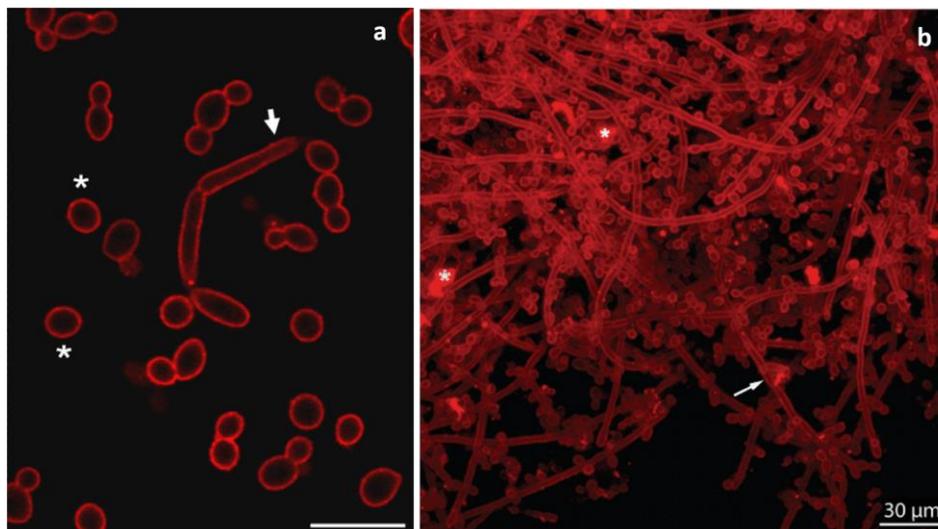
O conjugado de PQs-UEA I também foi útil para estudar a expressão de antígenos H em subgrupos A pela detecção da L-fucose por citometria de fluxo. O antígeno H é o precursor dos antígenos A e B eritrocitários. Os resultados indicaram, por exemplo, que eritrócitos A_x e A_{el} possuem pouca quantidade de antígenos A e H (marcação pelo conjugado PQs-UEA I de 30%), mas possuem mais A_1 (marcação de 30%) (CABRAL FILHO et al., 2015).

Ademais, a lectina jacalina, purificada das sementes da jaca (*Artocarpus integrifolia*), foi conjugada a PQs de CdS e o bioconjugado obtido foi aplicado para estudar o perfil de galactose presente na estrutura do antígeno-T em células da linhagem de leucemia mielóide crônica K562. As análises de microscopia de fluorescência mostraram que o conjugado promoveu a marcação das células K562 sem marcar linfócitos periféricos humanos saudáveis (AHMED et al., 2017).

A atividade da lectina ligadora de quitina chamada WSMoL, lectina solúvel em água de sementes de *Moringa oleífera*, contra larvas de *Aedes aegypti* foi investigada utilizando bioconjugados luminescentes de WSMoL conjugados a PQs de CdTe estabilizados/funcionalizados por L-glutationa. Através de imagens de microscopia, os conjugados PQs-WSMoL foram detectados ao longo de todo o trato intestinal sugerindo uma forte interação entre a lectina e a quitina presente na camada semipermeável que protege o tecido intestinal das larvas, a chamada matriz peritrófica (ARRUDA et al., 2020).

Em outro estudo, conjugados de PQs-Con A além de promover a marcação de células leveduriformes e hifas de *C. albicans* (Figura 16a), também foram capazes de penetrar e se difundir por toda a espessura do biofilme desse fungo, marcando células e matriz celular (Figura 16b), o que indica o potencial desta nanossonda para ser aplicada em investigações de infecções microbianas, imagem molecular e perfil de sacarídeos (TENÓRIO et al., 2015).

Figura 16 – Imagens de microscopia confocal de suspensões celulares e biofilme de *Candida albicans* marcados por conjugados de PQs-Con A. Células de hifas (seta) e leveduras (*) das suspensões celulares (a). Marcação de hifas (setas) cercadas por matriz extracelular (*) no biofilme (b). Barras de escala: 10 μm em a e 30 μm em b.



Fonte: Adaptado de TENÓRIO et al. (2015).

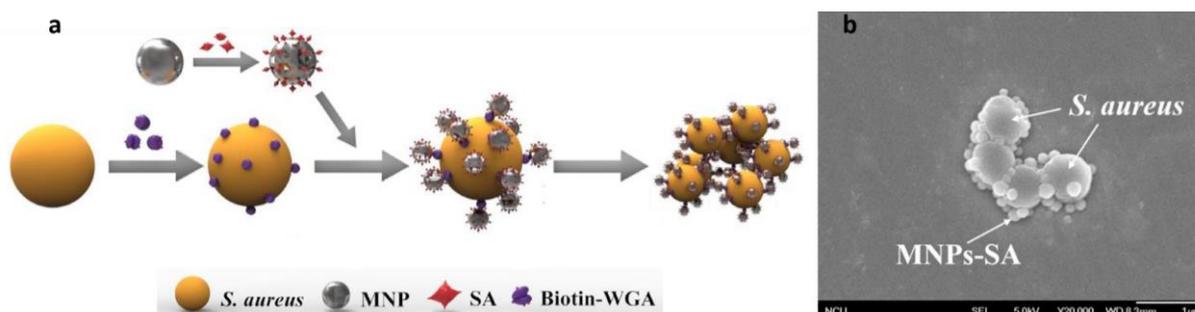
Nanoplataformas magnéticas baseados em lectinas também podem ser obtidas. NPs com núcleo de Fe_2O_3 e casca de ouro foram revestidas covalentemente por Con A, WGA e RCA_{120} (aglutinina I de *Ricinus communis* que reconhece galactose) e os nanocompósitos gerados foram empregados como agentes de contraste de dupla modalidade para RM e tomografia computadorizada de câncer colorretal *in vivo*. As NPs aprimoraram o sinal da tomografia computadorizada da área tumoral e da IRM, nessa última devido aos efeitos dessas NPs nos tempos de relaxação T_2 dos prótons da água no local do tumor (HE et al., 2014).

A capacidade de separação magnética das MNPs aliada à especificidade glicídica das lectinas foi também aproveitada para gerar nanossondas capazes de isolar compostos glicosilados. MNPs de óxido de ferro foram revestidas com lectinas de diferentes especificidades, separadamente: Con A, WGA (aglutinina de germe de trigo, ligadora de *N*-acetil-D-glicosamina e ácido siálico) e MA (lectina de *Maackia amurensis*, a qual detém a afinidade por glicanos que exibem porções de ácido siálico na posição α -2,3). Esses nanocompósitos foram úteis para capturar 180 proteínas em fluidos corporais humanos (soro, saliva e urina), as quais foram identificadas por nano-HPLC-MALDI-TOF/TOF e verificou-se que 90% eram proteínas glicosiladas. Um baixo nível de moléculas não glicosiladas foi detectado

por interações inespecíficas, correspondente a proteínas de baixo peso molecular e peptídeos (FERREIRA et al., 2011).

A Con A também foi incorporada em MNPs funcionalizadas com dopamina para a imobilização de uma cepa recombinante de *Escherichia coli* expressando a enzima glicerol desidrogenase. Foi constatado que as células imobilizadas exibiram alta atividade específica da enzima e boa reutilização devido ao método de recuperação magnética e, portanto, o sistema com células imobilizadas foi promissor para uso em biocatálises (ZHUANG et al., 2017). Outra bactéria, *Staphylococcus aureus* foi segregada em amostras de sangue da seguinte forma: WGA biotinizada foi aplicada para capturar *S. aureus* pela interação com *N*-acetilglicosamina na superfície bacteriana e o complexo com a bactéria foi magneticamente isolado usando MNPs ligadas à estreptavidina assim como está esquematizado na Figura 17a. Por conseguinte, o aquecimento a 90 °C do complexo contendo MNPs, WGA e *S. aureus* (Figura 17b) levou à separação da bactéria cujo DNA genômico foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e os DNA de fita dupla (dsDNA) originados foram quantificados por um método colorimétrico usando NPs de ouro (AuNPs). Essas AuNPs se agregaram com o ácido nucleico bacteriano, as mudanças na absorção das suspensões contendo esses agregados foram proporcionais à concentração de dsDNA e conseqüentemente da bactéria. Assim, a plataforma elaborada mostrou-se uma estratégia rápida e econômica para a separação e detecção quantitativa de *S. aureus* em amostras de sangue que pode tornar o diagnóstico de sepse mais rápido (YANG et al., 2019).

Figura 17 – Detecção e separação magnética de *Staphylococcus aureus* em amostras de sangue. Esquema da detecção, primeiramente a WGA biotinizada liga-se à superfície de *S. aureus* e posteriormente as MNPs com estreptavidina (SA) se complexam à lectina com a biotina (a). Imagem de microscopia eletrônica de varredura do complexo formado na superfície das células bacterianas separadas magneticamente (b). Barra de escala: 1 µm.



Fonte: Adaptado de YANG et al. (2019).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dessa tese estão apresentados na forma de 3 artigos publicados, um capítulo de livro e um artigo em preparação para submissão e publicação.

4.1 ARTIGO 1: *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) conjugated with quantum dots as fluorescent nanoprobe for biological studies: application to red blood cells

O artigo “***Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) conjugated with quantum dots as fluorescent nanoprobe for biological studies: application to red blood cells**” foi publicado no periódico “*Methods and Applications in Fluorescence*”, v. 8, n. 3, p. 035009, 2020. DOI: 10.1088/2050-6120/ab9694. Link de acesso: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/2050-6120/ab9694>.

***Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) conjugated with quantum dots as fluorescent nanoprobe for biological studies: application to red blood cells**

Wesley F Oliveira^{1,2}, Natália R M Santos^{1,2}, Mariana P Cabrera², Sílvio A O Ferreira¹, Bruno L Raposo², Thiago H Napoleão¹, Patrícia M G Paiva¹, Luana C B B Coelho¹, Paulo E Cabral Filho², Adriana Fontes², Maria T S Correia¹

¹Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

²Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

Resumo

Os carboidratos desempenham funções fisiológicas importantes nas células eucarióticas e procarióticas. De fato, alterações nos padrões de glicanos podem estar associadas a doenças. A análise desses açúcares pode ser alcançada usando nanossondas compostas por lectinas associadas a nanopartículas fluorescentes. Este estudo relata a conjugação de uma lectina ligadora de galactose (BmoLL)

isolada das folhas de *Bauhinia monandra* com pontos quânticos (PQs) por adsorção. Os conjugados PQs-BmoLL mostraram intensa fluorescência e o ensaio de hemaglutinação revelou que a lectina preservou sua capacidade de ligação a carboidratos após a conjugação. Para avaliar a eficiência/especificidade do bioconjugado, hemácias do sistema ABO foram usadas como modelos biológicos e a marcação foi analisada por citometria de fluxo. Entre os grupos sanguíneos ABO, alta marcação ($71,7 \pm 5,9\%$) foi detectada para hemácias do tipo B, cujos antígenos têm galactose em sua estrutura. A especificidade da marcação foi confirmada uma vez que as hemácias dos tipos A e O incubadas com PQs-BmoLL, bem como células do tipo B incubadas com os conjugados previamente inibidos com galactose, foram marcadas abaixo de 6%. Nas hemácias do tipo AB, que possuem simultaneamente os antígenos B e A (*N*-acetilgalactosamina) em sua membrana, a marcação foi ca. $14,1 \pm 4,8\%$. Portanto, uma conjugação bem sucedida foi alcançada e os conjugados PQs-BmoLL podem ser considerados nanossondas fluorescentes promissoras para investigações biológicas.

Palavras-chave: Nanopartículas; Eritrócitos; Glicobiologia; Fluorescência.

4.2 ARTIGO 2: Evaluating glucose and mannose profiles in *Candida* species using quantum dots conjugated with Cramoll lectin as fluorescent nanoprobe

O artigo “***Evaluating glucose and mannose profiles in Candida species using quantum dots conjugated with Cramoll lectin as fluorescent nanoprobe***” foi publicado no periódico “*Microbiological Research*”, v. 230, p. 126330, 2020. DOI: 10.1016/j.micres.2019.126330. Link de acesso: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501319308122?via%3Dihub>.

Evaluating glucose and mannose profiles in *Candida* species using quantum dots conjugated with Cramoll lectin as fluorescent nanoprobe

Wesley F. Oliveira^{a,b}, Mariana P. Cabrera^b, Natália R.M. Santos^{a,b}, Thiago H. Napoleão^a, Patrícia M.G. Paiva^a, Rejane P. Neves^c, Márcia V. Silva^a, Beate S. Santos^d, Luana C.B.B. Coelho^a, Paulo E. Cabral Filho^b, Adriana Fontes^b, Maria T.S. Correia^a

^aDepartamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^bDepartamento de Biofísica e Radiobiologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^cDepartamento de Micologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^dDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

Resumo

Os glicoconjugados encontrados nas paredes celulares de espécies de *Candida* são fundamentais para sua patogenicidade. Técnicas laboriosas têm sido empregadas para investigar a composição de açúcares desses microrganismos. Neste trabalho, preparamos uma nanoferramenta, baseada na fluorescência de pontos quânticos (PQs) combinada com a especificidade da lectina Cramoll, para avaliar perfis de glicose/manose em três espécies de *Candida*. Os conjugados PQs-Cramoll apresentaram especificidade e intensa emissão de fluorescência. A lectina preservou sua atividade biológica após o processo de conjugação mediado por interações de adsorção. A marcação das espécies de *Candida* foi analisada por microscopia de fluorescência e quantificada por citometria de fluxo. Análises morfológicas das leveduras marcadas com conjugados PQs-Cramoll indicaram que *C. glabrata* (2,7 μm) foi menor quando comparada à *C. albicans* (4,0 μm) e *C. parapsilosis sensu stricto* (3,8 μm). Além disso, a população de *C. parapsilosis* foi heterogênea, apresentando blastoconídios em forma de bastonete. Mais de 90% das células das três espécies foram marcadas pelos conjugados. Ensaio de inibição e saturação indicaram que *C. parapsilosis* apresentou maior teor de glicose/manose expostos do que as outras duas espécies. Portanto, os conjugados PQs-Cramoll demonstraram ser nanossondas fluorescentes eficazes para avaliação da constituição de glicose/manose nas paredes celulares de espécies fúngicas frequentemente envolvidas em candidíase.

Palavras-chave: Nanocristais de semicondutores; *Candida*; Bioconjugação; Lectina; *Cratylia mollis*.

4.3 ARTIGO 3: Evaluating the glycophenotype on breast cancer tissues with quantum dots-Cramoll lectin conjugates

O artigo “***Evaluating the glycophenotype on breast cancer tissues with quantum dots-Cramoll lectin conjugates***” foi publicado no periódico “***International Journal of Biological Macromolecules***”, v. 138, p. 302-308, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.088. Link de acesso: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813019336517?via%3Dihub>.

Evaluating the glycophenotype on breast cancer tissues with quantum dots-Cramoll lectin conjugates

Maria Eduarda T. Carvalho^{a,b}, Wesley F. Oliveira^{a,b}, Cássia R.A. Cunha^c, Luana C.B.B. Coelho^b, Márcia V. Silva^b, Luiz B. Carvalho Junior^d, Beate S. Santos^e, Paulo E. Cabral Filho^a, Adriana Fontes^a, Maria Tereza S. Correia^b

^aDepartamento de Biofísica e Radiobiologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^bDepartamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^cLaboratório Federal de Defesa Agropecuária em Pernambuco – LFDA, Recife, PE, Brazil

^dLaboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^eDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

Resumo

Durante a carcinogênese, alterações na glicosilação podem modular muitos

processos biológicos. Assim, o interesse em explorar e compreender os papéis dos carboidratos como biomarcadores do câncer vem aumentando. As lectinas têm sido aplicadas como ferramentas úteis em glicobiologia, especialmente quando associadas a repórteres fluorescentes. Portanto, para aproveitar as propriedades físico-químicas dos pontos quânticos (PQs), aqui, conjugamos Cramoll, uma lectina que reconhece resíduos de glicose/manose, com essas nanopartículas. Aplicamos os conjugados para investigar o glicocódigo de tecidos mamários humanos normais, fibroadenoma (FB) e carcinoma ductal invasivo (CDI). Além disso, propusemos um método para avaliar quantitativamente a intensidade de marcação do tecido por um ensaio fluorescente em microplaca (EFM). Os conjugados mostraram intensa fluorescência e especificidade. A atividade da lectina e a estrutura secundária também foram preservadas após a conjugação com os PQs. Além disso, as imagens de fluorescência mostraram que as células ductais de tecidos normais e FB foram preferencialmente marcadas pelos conjugados, enquanto tanto as células quanto o estroma foram fortemente marcados no CDI. O EFM mostrou de forma quantitativa, prática e sensível que o nível de resíduos de glicose/manose expostos aumentou de acordo com o grau de malignidade da amostra. Em conclusão, os conjugados PQs-Cramoll podem ser considerados sondas eficazes, específicas e versáteis para avaliar perfis de glicanos em tecidos normais e transformados, por microscopia de fluorescência bem como pela quantificação por EFM. Além disso, o EFM mostrou ser um método potencial que pode ser aplicado com outros conjugados fluorescentes.

Palavras-chave: Nanocristais de semicondutores; Fluorescência; Proteínas; Carboidratos.

4.4 CAPÍTULO DE REVISÃO: Revealing Glycobiology by Quantum Dots Conjugated to Lectins or “Borono-Lectins”

O capítulo de revisão “***Revealing Glycobiology by Quantum Dots Conjugated to Lectins or “Borono-Lectins”***” foi aceito para ser publicado no livro intitulado “*Nanotechnology for Biomedical Applications*”. Neste capítulo foi abordado fundamentos gerais dos PQs bem como as características biológicas de lectinas e “borono-lectinas”. Ademais, o foco principal foi compilar e discutir a conjugação e

aplicações glicobiológicas dos conjugados de PQs-lectinas e PQs-“borono-lectinas” de trabalhos publicados no período de 2015-2020.

Revealing Glycobiology by Quantum Dots Conjugated to Lectins or “Borono-Lectins”

Wesley F. Oliveira^{a, #}, Camila P. Monteiro^{b, #}, Cássia R. A. Cunha^{c, #}, Carinna N. Lima^{b, #}, Mariana P. Cabrera^{d, #}, Beate S. Santos^{e, #}, Luana C. B. B. Coelho^{a, #}, Maria T. S. Correia^{a, #}, Paulo E. Cabral Filho^{b, #}, Adriana Fontes^{b, *, #}

^aDepartamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, PE, Brazil

^bDepartamento de Biofísica e Radiobiologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, PE, Brazil

^cLaboratório Federal de Defesa Agropecuária em Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^dDepartamento de Química Fundamental, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, PE, Brazil

^eDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, PE, Brazil

Biomedical Nanotechnology Research Group – UFPE.

Resumo

Os pontos quânticos (PQs) são nanocristais de semicondutores fluorescentes com propriedades ópticas e físico-químicas vantajosas para estudos glicobiológicos. Os glicanos estão envolvidos em inúmeros eventos biológicos, incentivando investigações sobre suas funções e seu potencial como alvos para novas abordagens diagnósticas e/ou terapêuticas. A conjugação de PQs a lectinas ou ácidos fenilborônicos (FBAs) tem sido explorada com sucesso nesta área, fornecendo nanoferramentas glico-específicas sensíveis e versáteis para desvendar os papéis dos glicanos. Lectinas são proteínas capazes de reconhecer açúcares através de seu domínio de reconhecimento a carboidratos. Os conjugados PQ-lectina têm sido aplicados para estudar glicanos em células e tecidos de mamíferos,

avaliar a expressão de sacarídeos em microrganismos, investigar a ação da lectina em patógenos e até desenvolver biossensores. Por outro lado, os FBAs são moléculas sintéticas que também apresentam afinidade com carboidratos, por isso foram chamados de “borono-lectinas”. FBAs conjugados a PQs têm sido aplicados em estudos de glicobiologia com glóbulos vermelhos, células cancerígenas e biossensoriamento. Nesse sentido, o presente capítulo tem como objetivo descrever as principais aplicações biológicas de PQs combinados com lectinas ou “borono-lectinas” relatadas na literatura nos últimos cinco anos. A revisão também oferece um breve histórico sobre PQs, lectinas e “borono-lectinas”, bem como uma visão geral da conjugação baseada em PQ. Os autores esperam que este capítulo possa subsidiar futuros estudos neste campo interdisciplinar.

Palavras-chave: Nanocristal; Fluorescência; Carboidrato; Lectina; Ácido fenilborônico.

4.5 – ARTIGO 4: *Nanossonda Multimodal para Estudos em Glicobiologia – Aplicações na Detecção da Fetuína*

O manuscrito intitulado “**Nanossonda Multimodal Óptico-Magnética Funcionalizada com a Lectina Cramoll – Aplicações na Detecção da Fetuína**” encontra-se em etapa de preparação para submissão e publicação.

Resumo

Muitas pesquisas estão buscando desenvolver nanomateriais inteligentes devido à diversidade de potenciais aplicações. As nanossondas bimodais (BNPs) têm ganhado atenção, principalmente aquelas compostas por pontos quânticos (PQs) e nanopartículas de óxido de ferro (SPIONs), devido à possibilidade de combinar a vantajosa resposta superparamagnética das SPIONs e as propriedades ópticas singulares dos PQs. Além disso, para serem bioespecíficas, as BNPs podem ser conjugadas com biomoléculas, como a lectina Cramoll, uma proteína ligadora de glicose/manose purificada a partir das sementes de *Cratylia mollis*. Assim, o objetivo desse estudo foi desenvolver um sistema multimodal (BNPs-Cramoll) e aplicá-lo para detectar a glicoproteína fetuína cujos níveis podem estar alterados em

patologias, tal como em alguns tipos de câncer. Para tanto, PQs carboxilados foram covalentemente combinados com SPIONs aminadas e, em seguida, as BNPs foram conjugadas com Cramoll. As propriedades ópticas e o potencial zeta dos nanossistemas foram determinados. Leveduras de *Candida albicans* foram incubadas com BNPs-Cramoll e analisadas por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo para avaliação da especificidade e eficiência da nanossonda. A detecção da fetuína foi realizada por fluorimetria. A banda de absorção dos PQs estava ausente no sobrenadante de BNPs, indicando conjugação eficaz com SPIONs. Houve um desvio para o vermelho na emissão máxima de BNPs em comparação com os PQs sozinhos; entretanto, a conjugação da lectina não causou uma mudança espectral. As BNPs-Cramoll tiveram uma carga superficial menos negativa do que as BNPs. Aproximadamente 90% das leveduras foram homogeneamente marcadas por BNPs-Cramoll e após a inibição com metil- α -D-manopiranosídeo, uma redução da marcação de ca. 3x foi observada. Quando incubado com diferentes concentrações de fetuína (0,675 - 10,8 mg/mL), um decaimento linear na fluorescência de BNPs-Cramoll foi identificado. A incubação com albumina de soro bovino (controle) não diminuiu significativamente a fluorescência indicando a especificidade do sistema multimodal. Assim, o multimodal BNPs-Cramoll se mostrou uma nanossonda fluorescente-magnética específica capaz de detectar a fetuína, promissora para o biossensoriamento dessa glicoproteína.

Palavras-chave: pontos quânticos; nanopartículas magnéticas; fluorescência; *Candida albicans*; glicoproteína.

1 Introdução

A sensibilidade e especificidade bioquímica das técnicas fluorescentes estão intrinsecamente relacionadas às sondas ópticas empregadas. Sondas fluorescentes podem ser ferramentas poderosas quando associadas a biomoléculas para reconhecimento molecular específico, pois o sinal luminescente pode ser utilizado para localizar e quantificar estruturas biológicas alvo (ZOU et al., 2020). Os pontos quânticos (PQs) são sondas fluorescentes que vêm recebendo destaque nas ciências da vida. Essas nanoestruturas possuem vantajosas características ópticas, incluindo estreitos espectros de emissão, fluorescência (“cor”) ajustável ao tamanho,

amplo espectro de absorção, brilho intenso e, principalmente, alta resistência à fotodegradação (RANJBAR-NAVASI et al., 2019). Além desses fatores, os PQs possuem superfície altamente ativa, promovendo a conjugação a biomoléculas ou até mesmo a outros nanomateriais (PEREIRA et al., 2019).

Nos últimos anos, o desenvolvimento de nanomateriais com mais de uma propriedade funcional tem ganhado destaque para aplicações biológicas, sobretudo os que combinam propriedades fluorescentes e magnéticas em um único sistema, resultando em nanocompósitos bimodais exclusivos (GARCÍA; STAFFORD; GUN'KO, 2018). Dessa forma, nanopartículas (NPs) híbridas vêm surgindo como interessantes candidatas para inovar e complementar aplicações biomédicas, destacando-se, por exemplo, as nanossondas que associam as singulares propriedades ópticas dos PQs e magnéticas das NPs de óxido de ferro (MARCELO et al., 2020). As NPs de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e magnetita (Fe_3O_4) têm sido as mais empregadas na elaboração de nanomateriais óptico-magnéticos para estudos em sistemas biológicos (ELRAHMAN; MANSOUR, 2019).

Quando aliadas à fluorescência e biomoléculas, as nanopartículas magnéticas (MNPs) podem propiciar uma variedade de aplicações biológicas, incluindo a manipulação do nanocompósito por um campo magnético externo, o que é útil para aplicação em processos de biosseparação/detecção de forma simultânea (YANG et al., 2020). Além disso, esses sistemas multifuncionais podem atuar como agentes de contraste para a obtenção de imagens aprimoradas por ressonância magnética (RM), com especificidade bioquímica propiciada pela fluorescência. Por fim, terapia por hipertermia pode ser realizada com MNPs e a fluorescência pode ser aplicada no monitoramento desse tratamento em estudos *in vitro* e *in vivo* com pequenos animais (SHENG et al., 2018).

Biomoléculas de particular interesse para associação com nanossondas bimodais (BNPs) são as lectinas. Essas proteínas são capazes de se ligar específica e reversivelmente a carboidratos e podem ser associadas com materiais nanoestruturados para a realização de estudos glicobiológicos (CUNHA et al., 2018a). Nanocompósitos baseados em NPs fluorescentes de grafeno, MNPs e a lectina Con A, por exemplo, já foram empregados na detecção de células de câncer e em aplicações teranósticas (CHOWDHURY et al., 2018).

A Cramoll 1,4 (Cramoll) é uma lectina extraída das sementes de uma leguminosa nativa do nordeste brasileiro, a *Cratylia mollis*, que se liga à glicose e

manose (CORREIA E COELHO, 1995), e é uma candidata interessante para o desenvolvimento de nanoferramentas multifuncionais. Diferentes propriedades terapêuticas de Cramoll foram relatadas, por exemplo, potencial antiparasitário contra epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (FERNANDES et al., 2010), ação cicatrizante em feridas de ratos ao ser imobilizada em filme de galactomanana (ALBUQUERQUE et al., 2017) e efeito imunomodulador em ratos infectados por *Cryptococcus gattii* (JANDÚ et al., 2017). O potencial biotecnológico dessa lectina também já foi explorado em aplicações nanotecnológicas, tais como sua imobilização em matrizes nanotubulares de dióxido de titânio para estimular a proliferação e adesão de osteoblastos (OLIVEIRA et al., 2018), também foi aplicada para promover a funcionalização de nanotubos de carbono no desenvolvimento de plataforma biossensora capaz de distinguir hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata (SILVA et al., 2016) e encapsulada em lipossomas para promover atividade antitumoral contra sarcoma 180 (CUNHA et al., 2016). Além disso, uma nanossonda fluorescente foi obtida a partir de sua conjugação com PQs (CUNHA et al., 2018b) para estudar a expressão de glicose e manose em tecidos normais da mama, fibroadenoma e carcinoma ductal invasivo (CARVALHO et al., 2019), bem como em diferentes espécies de *Candida* (OLIVEIRA et al., 2020).

Assim, neste trabalho vamos apresentar a preparação de uma ferramenta multimodal com propriedades ópticas e magnéticas aliadas à capacidade de reconhecer resíduos de glicose/manose da Cramoll para conferir complementariedade e versatilidade aos estudos glicobiológicos. Para tal finalidade, a seguir apresentamos a preparação de BNPs constituídas por PQs de CdTe e MNPs de óxido de ferro e sua funcionalização com a lectina Cramoll, bem como a avaliação da eficiência dessa nanossonda pela marcação de células de *Candida albicans* que foram utilizadas como prova de conceito. Por fim, foi avaliada também a capacidade desse nanossistema multimodal de detectar a glicoproteína fetuína, cujos níveis séricos podem estar alterados em algumas patologias, pelas diferenças nos sinais fluorescentes para demonstrar sua potencialidade como biossensor.

2 Procedimentos Experimentais

2.1 Síntese dos PQs

PQs de CdTe foram sintetizados em meio aquoso utilizando o ácido mercaptossuccínico (AMS) como agente estabilizante/funcionalizante, segundo metodologia previamente descrita (CABRAL FILHO et al., 2016). Primeiramente, foi preparada uma solução de perclorato de cádmio [$\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$] contendo AMS em água ultrapura e em $\text{pH} > 10,5$. Concomitantemente, o telúrio metálico (Te^0) foi reduzido para Te^{2-} usando o borohidreto de sódio (NaBH_4) em atmosfera inerte, em seguida, os íons Te^{2-} foram adicionados à solução de $\text{Cd}^{2+}/\text{AMS}$ para a obtenção dos nanocristais. A razão molar utilizada foi de 5:1:6 (Cd:Te:AMS) e a síntese se processou por aproximadamente 8 h até a obtenção de PQs com emissão na região espectral do vermelho.

2.2 Síntese e Funcionalização das SPIONs

Uma suspensão de ferrofluido foi produzida pelo método de co-precipitação alcalina dos sais de Fe^{2+} e Fe^{3+} e as MNPs obtidas com ca. 15 nm tiveram suas superfícies funcionalizadas com grupamentos aminos, segundo Cabrera et al. (2017). Resumidamente, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (razão molar 2:3) foram dissolvidos numa solução aquosa de HCl (2 M), a qual ficou sob agitação vigorosa em temperatura ambiente ($\text{TA} \sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$). Em seguida, foram adicionados 50 mL de hidróxido de amônio (7 M). A preparação foi então aquecida a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ em banho de ultrassom durante 30 min. A suspensão resultante foi arrefecida até a temperatura ambiente e lavada com água ultrapura por meio da separação magnética usando o ímã de neodímio (NdFeB).

A funcionalização das MNPs foi feita com o 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES). Uma alíquota das MNPs ($\sim 625 \text{ } \mu\text{L}$) foi tratada com o agente silano (25 mL preparado em acetona, 2,5% v/v de APTES) e a suspensão ficou sob agitação por 2 h em temperatura ambiente. Em seguida o sistema MNPs-APTES (abreviado aqui como MNPs) foi submetido a lavagens em água ultrapura utilizando o ímã de neodímio (NdFeB) e ressuspendido para uma concentração ca. $0,22 \text{ } \mu\text{M}$.

2.3 Purificação da Lectina Cramoll

Extratos de sementes de *C. mollis* (10% p/v em NaCl 0,15 M) foram fracionados por saturação com sulfato de amônio (40-60% p/v) e a fração obtida foi submetida à cromatografia de afinidade em Sephadex G-75. A Cramoll foi

bioseletivamente eluída com solução de D-glicose 0,3 M em NaCl 0,15 M, seguida por diálises com NaCl 0,15 M durante 24 h (CORREIA; COELHO, 1995).

2.4 Preparação das BNPs

Os nanocristais fluorescentes foram ligados covalentemente às MNPs-APTES para a obtenção do sistema bimodal através de uma adaptação da metodologia proposta por Cabrera et al. (2017). Primeiramente, os grupos carboxílicos dos PQs (2 mL a 0,9 μ M e em pH 5,5) foram ativados com 1 mL de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC, concentração inicial de 23 mM) e 1 mL de *N*-hidroxisuccinimida (NHS) (concentração inicial de 48 mM). Em seguida, uma alíquota (2 mL) de MNPs-APTES foi diluída ca. 2 vezes em água ultrapura para chegar na concentração de 0,1 μ M e adicionada ao sistema anterior. Por conseguinte, o sistema magneto-fluorescente resultante foi incubado *overnight* em TA e sob agitação constante. Como o mesmo núcleo magnético preparado por Cabrera et al. (2017) foi utilizado, é esperado que as BNPs produzidas apresentem também uma estrutura predominante de magnetita, com comportamento superparamagnético.

2.5 Conjugação da Cramoll às BNPs

Para a obtenção do sistema multimodal (BNPs-Cramoll), primeiramente uma alíquota de BNPs (3 mL) foi separada com ajuda do NdFeB e o sobrenadante da separação foi guardado. Em seguida, BNPs foram concentradas três vezes pela sua ressuspensão em 1 mL do sobrenadante separado previamente. Então, esse sistema foi agitado em banho ultrassônico por 5 min e incubado com a Cramoll na concentração final de 123,5 μ g/mL. A incubação foi realizada sob agitação por 2 h em TA e o sistema BNPs-Cramoll foi armazenado a 4 °C até as posteriores aplicações.

2.6 Caracterização dos Sistemas

2.6.1 Propriedades Ópticas

Os diferentes sistemas fluorescentes (PQs, BNPs e BNPs-Cramoll) foram caracterizados opticamente por espectroscopia de emissão utilizando um espectrofluorímetro LS 55 (*PerkinElmer*) em $\lambda_{exc} = 488$ nm. Ademais, tanto os PQs

quanto os sobrenadantes das BNPs e BNPs-Cramoll tiveram a absorção eletrônica analisada no espectrômetro UV-Vis 1800 (*Shimadzu*). Através das análises espectroscópicas, pode-se estimar o diâmetro médio (DAGTEP et al., 2007) e concentração dos nanocristais na suspensão (YU et al. 2003).

2.6.2 Potencial Zeta

A medição do potencial zeta das BNPs e BNPs-Cramoll foi realizada em TA usando o equipamento NanoZS (*Malvern Instruments Inc. USA*). Todas as amostras foram lavadas e ressuspendidas em água ultrapura, pH 6,0.

2.6.3 Marcação da *Candida albicans*

Para avaliar a efetividade e especificidade do sistema multimodal BNPs-Cramoll, leveduras de *C. albicans* (ATCC 10231) foram utilizadas como modelo. As células foram cultivadas primeiramente em ágar dextrose Sabouraud por 24 h a 37 °C, seguido do repique de colônias desse meio para o caldo dextrose Sabouraud, onde a levedura ficou incubando sob as mesmas condições. Para a incubação com o sistema multimodal, as células fúngicas foram centrifugadas em 1680 $\times g$ por 1 min e, em seguida, o sedimento foi ressuspenso em solução de NaCl 0,15 M para obter cerca de 6×10^7 UFC/mL (ajustado pela densidade óptica a 540 nm).

Antes da incubação com as células de *C. albicans*, os grupos carboxílicos ativos do sistema BNPs-Cramoll foram bloqueados usando 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (TRIS Base) a 0,1 mM na proporção de 5:1 (BNPs-Cramoll:TRIS, v/v), sendo mantido sob agitação constante em TA por 2 h. Em seguida, uma alíquota de 50 μL da suspensão celular foi incubada com 50 μL do sistema multimodal por 30 min, sob agitação constante. Após a incubação, as amostras foram lavadas duas vezes utilizando NaCl 0,15 M por meio de centrifugação 1200 $\times g$ por 30 s. A especificidade de ligação do sistema BNPs-Cramoll foi avaliada com uma incubação prévia desse sistema com metil- α -D-manopiranosídeo (0,4 M) por 30 min antes de adicionar a *C. albicans*.

As células marcadas foram analisadas no microscópio de fluorescência (Leica, DMI 4000B), utilizando-se o filtro de excitação BP 560/40 nm e o filtro de emissão BP 645/75 nm. Além disso, as células incubadas com os sistemas BNPs-Cramoll e BNPs-Cramoll inibido foram também analisadas por citometria de fluxo (Accuri - C6 Becton Dickinson). Para tanto, foram adquiridos 20.000 eventos e a

fluorescência foi excitada em 488 nm e captada no filtro FL4-H (630/30 nm). Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos como média \pm desvio padrão.

2.7 Detecção de Fetuína

Para demonstrar a capacidade de utilizar o sistema BNPs-Cramoll para biossensoriamento foi utilizada a glicoproteína fetuína como analito de reconhecimento. Primeiramente, uma alíquota de BNPs-Cramoll foi separada com o ímã para remover possíveis moléculas de Cramoll não conjugadas, foi realizada a troca do sobrenadante com água ultrapura, seguida de uma agitação em banho ultrassônico por 15 min para então ser feito o bloqueio com TRIS-base por 2 h em TA, seguindo a mesma proporção relatada no tópico anterior. Posteriormente, 1 mL do sistema BNPs-Cramoll (cuja lectina encontrava-se na concentração de 35 $\mu\text{g/mL}$) foi incubado durante 30 min, sob agitação constante e em TA, com diferentes massas de fetuína para atingir as concentrações finais dessa glicoproteína de 0,675 - 10,8 mg/mL, sendo utilizado o mesmo volume final para todas as avaliações. Por conseguinte, as diferenças nas intensidades de emissão da fluorescência após as incubações foram analisadas por espectroscopia de emissão utilizando um espectrofluorímetro LS 55 (*PerkinElmer*) em $\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm para realizar a detecção com excitação similar à proporcionada por ensaio fluorescente em microplaca (EFM). Para tanto, 100 μL dos sistemas após a incubação com a fetuína foram transferidos para uma microplaca e os sinais fluorescentes foram determinados usando o filtro passa-banda de excitação e emissão de 405/4 nm e 595/30 nm, respectivamente, em um leitor de placas WALLAC 1420 equipado com o *software* Victor² (*PerkinElmer*). Para determinar a especificidade da resposta fluorescente de BNPs-Cramoll, foi feito um EFM, tanto com a fetuína como para a albumina de soro bovino (BSA), em concentração final de 2,7 mg/mL seguindo as mesmas condições de incubação.

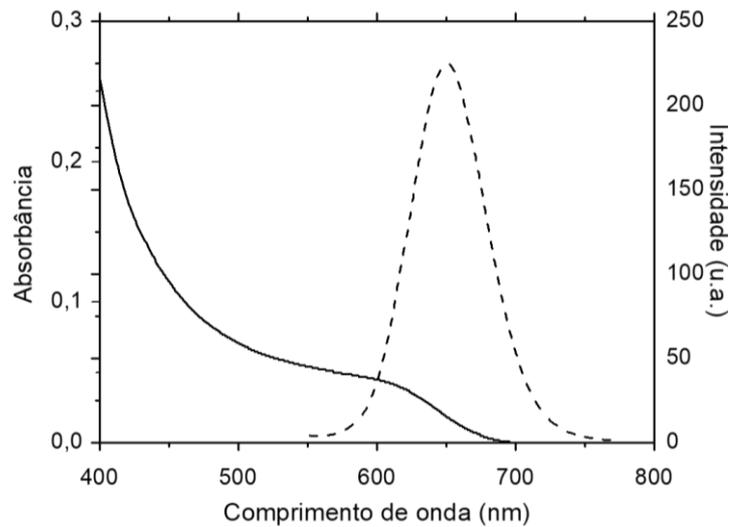
3 Resultados e Discussão

3.1 Caracterização Óptica

Os espectros de absorção e emissão dos PQs são mostrados na Figura 1. O perfil do espectro de absorção da suspensão de PQs indicou um primeiro máximo de absorção em 603 nm. Os PQs apresentaram um tamanho médio de

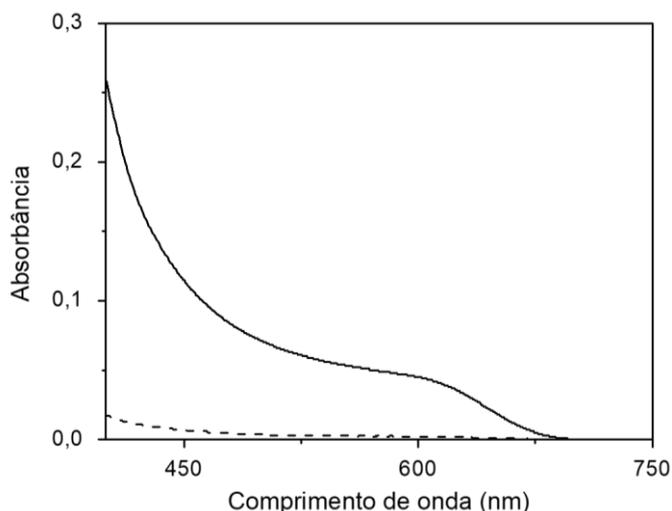
aproximadamente 3,6 nm e concentração de ca. 3,0 μM . O espectro de emissão dos PQs evidenciou um pico máximo de emissão em 650 nm (Figura 1) e uma largura à meia altura (FWHM - *Full Width at Half Maximum*) de 64 nm.

Figura 1 – Espectros de absorção (linha contínua) e emissão (linha tracejada) dos PQs de CdTe, $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$.



Com o intuito de avaliar a estratégia de conjugação proposta, após a conjugação dos PQs com as MNPs funcionalizadas com APTES, uma alíquota do sobrenadante do sistema das BNP foi retirada e analisada por espectroscopia de absorção eletrônica. Os resultados obtidos evidenciaram a ausência da banda característica dos PQs sozinhos em 603 nm (Figura 2) na amostra do sobrenadante sugerindo que todos os nanocristais ofertados foram conjugados na superfície das MNPs, reproduzindo o comportamento observado por Cabrera et al (2017). Inclusive, é estimado que o nanossistema bimodal resultante no presente trabalho seja composto de ca. 9 PQs por MNP.

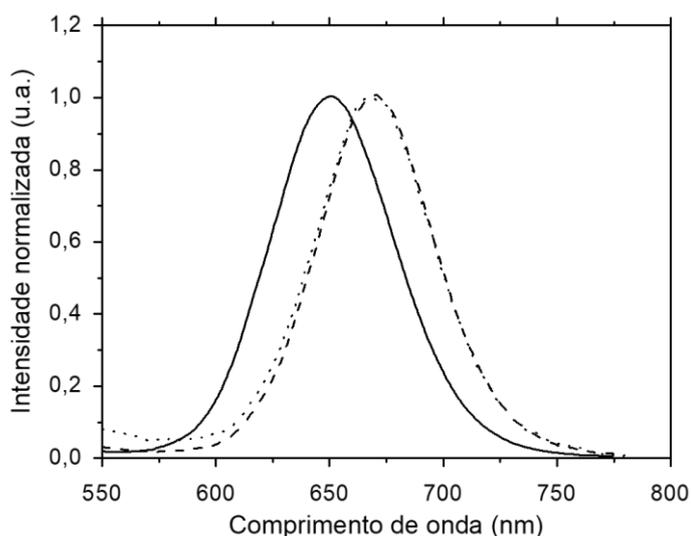
Figura 2 – Espectros de absorção dos PQs de CdTe (linha contínua) e do sobrenadante do sistema bimodal (linha tracejada).



A Figura 3 exibe o perfil dos espectros de emissão dos PQs de CdTe, do sistema bimodal (BNP) e do sistema multimodal (BNPs-Cramoll). As BNPs e BNPs-Cramoll apresentaram-se fluorescentes após as etapas de conjugação. Primeiramente, é possível observar que ocorreu um deslocamento espectral para a direita (*redshift*) de aproximadamente 20 nm para as BNPs em comparação aos PQs sozinhos ($\lambda_{em} = 650$ nm). Esse mesmo comportamento foi observado em trabalho anterior do nosso grupo, no qual o sistema BNPs apresentou um *redshift* de ca. 30 nm, o que sugere modificações na superfície dos PQs pela ligação covalente com as MNPs-APTES (CABRERA et al., 2017). Nesse trabalho, os autores utilizaram os agentes de acoplamento EDC e sulfo-NHS (*N*-hidroxissulfosuccinimida). Portanto, os resultados do presente trabalho indicam que o reagente NHS foi também eficiente para promover a ligação entre PQs de CdTe carboxilados e MNPs-APTES aminadas. Além do *redshift* observado, o sinal fluorescente se manteve intenso, mesmo após a conjugação do sistema com a proteína.

Após a conjugação da lectina ao sistema bimodal não foi observada uma mudança no comprimento de onda máximo de emissão (ca. 670 nm). Esse resultado sugeriu que a adição da biomolécula não contribuiu com defeitos na superfície das BNPs, o que corrobora com o estudo de Cabral Filho et al. (2018), no qual os autores verificaram perfil espectral similar após conjugação das BNPs com a proteína transferrina.

Figura 3 – Espectros de emissão dos PQs de CdTe sozinhos (linha contínua), sistema bimodal (linha tracejada) e sistema multimodal (linha pontilhada), $\lambda_{exc} = 488$ nm.



3.2 Potencial Zeta

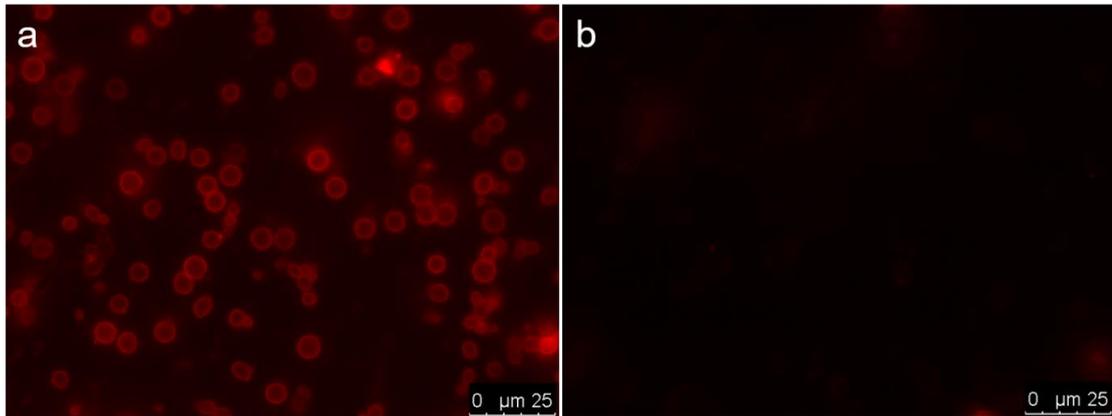
A carga superficial dos nanossistemas magneto-ópticos foi também investigada por medidas de potencial zeta com o objetivo de evidenciar a modificação de superfície das MNPs-APTES após a conjugação dos PQs e a lectina. Em concordância com o resultado publicado por Cabrera et al. (2017), as BNPs produzidas nesse trabalho apresentaram um potencial zeta de -25,6 mV. Este comportamento foi atribuído à presença dos grupos carboxílicos do AMS na superfície dos PQs. A conjugação de Cramoll nas BNPs levou a um potencial zeta menos negativo (-19,5 mV) uma vez que a biomolécula possui um ponto isoelétrico de 8,6 (CORREIA; COELHO, 1995) e a avaliação do potencial zeta foi em pH de ca. 6,0.

3.3 Marcação de *C. albicans*

A parede celular das espécies de *Candida* contém os polissacarídeos quitina, β -(1,3;1,6)-glucano e manana que ficam organizados em duas camadas: uma camada esquelética interna composta por quitina e β -glucanos e a camada mais externa composta por proteínas com *N*- e *O*-manosilações (GRAUS et al., 2018). Assim, células de *C. albicans* possuem carboidratos específicos para a ligação da Cramoll no multimodal. A análise por microscopia de fluorescência permitiu observar uma marcação eficiente (Figura 4a) de *C. albicans* por BNPs-Cramoll. Após a inibição desse sistema com o metil- α -D-manopiranosídeo, não foi possível observar

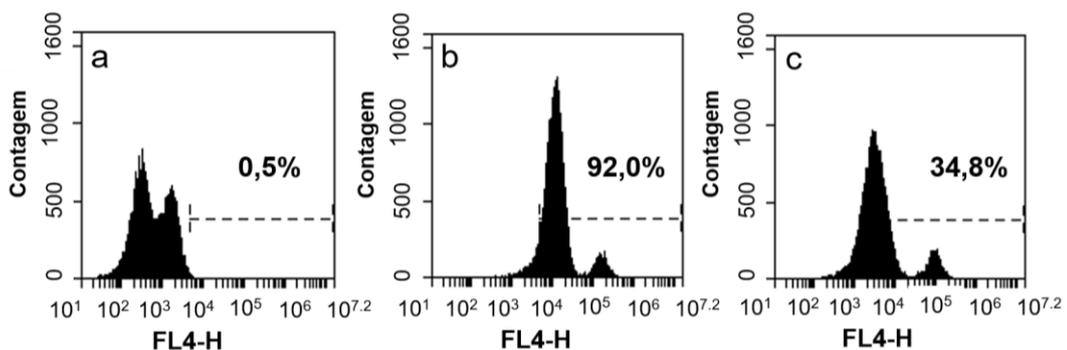
uma marcação das leveduras (Figura 4b) mostrando que essa nova nanossonda é específica.

Figura 4 – Células de *Candida albicans* após incubação com (a) BNPs-Cramoll e (b) BNPs-Cramoll inibido com o metil- α -D-manopiranosídeo. Barras de escala = 25 μ m.



A fim de quantificar a marcação, foi realizada a citometria de fluxo (Figura 5). As células controle (só *C. albicans*) não exibiram fluorescência considerável no filtro FL4-H assim como observado na Figura 5a. Já após incubação com o nanossistema BNPs-Cramoll, (89,7 \pm 2,3)% das células foram marcadas (Figura 5b). Uma alta marcação próxima à obtida também foi alcançada para *C. albicans* com conjugados de PQs-Cramoll em trabalhos anteriores (CUNHA et al., 2018b; OLIVEIRA et al., 2020). O ensaio de inibição também se mostrou satisfatório, visto que a porcentagem de marcação de células diminuiu ca. 3x (35,3 \pm 0,5)% como mostrado na Figura 5c, corroborando com o perfil de marcação visualizado na microscopia de fluorescência da Figura 4. A presença de dois picos pode indicar a presença de uma população celular heterogênea com algumas hifas, brotamentos e/ou alguns agregados (TENÓRIO et al., 2015).

Figura 5 – Histogramas representativos de leveduras de *C. albicans* controle (a), incubadas com BNPs-Cramoll (b) e incubadas com BNPs-Cramoll após inibição com metil- α -D-manopiranosídeo (c).

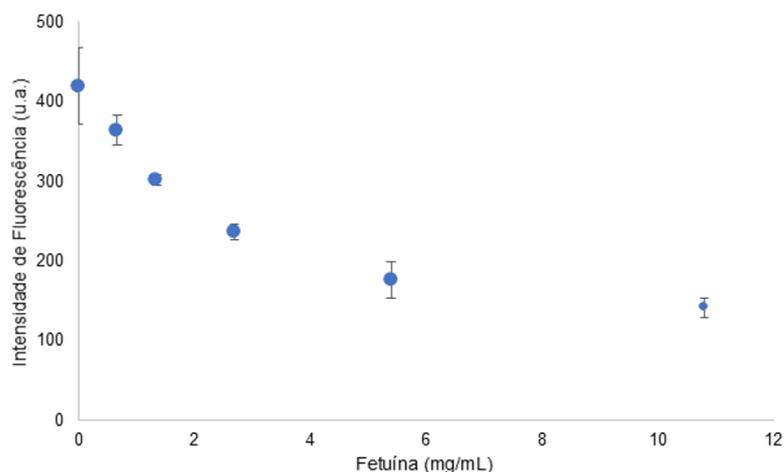


3.4 Detecção da Fetuína

A fetuína é uma glicoproteína que vem sendo utilizada como biomarcador em diferentes doenças devido às alterações nos seus níveis séricos, por exemplo, no câncer de próstata (GÜZEL et al., 2021). Além disso, o perfil de glicosilação da fetuína também pode estar alterado em algumas desordens, tal como verificou-se um aumento no teor de manose na fetuína extraída de tecido de adenocarcinoma de pulmão em comparação ao tecido normal (RHO et al., 2009). Além da importância clínica como biomarcador, a fetuína foi escolhida como modelo de glicoproteína para ser reconhecida por Cramoll no sistema multimodal uma vez que a capacidade dessa lectina reconhecer a fetuína já foi demonstrada em estudos com Cramoll imobilizada em outros sistemas nanoestruturados, tais como em nanopartículas de Fe_3O_4 (OLIVEIRA et al., 2011) e em nanotubos de carbono (SILVA et al., 2016).

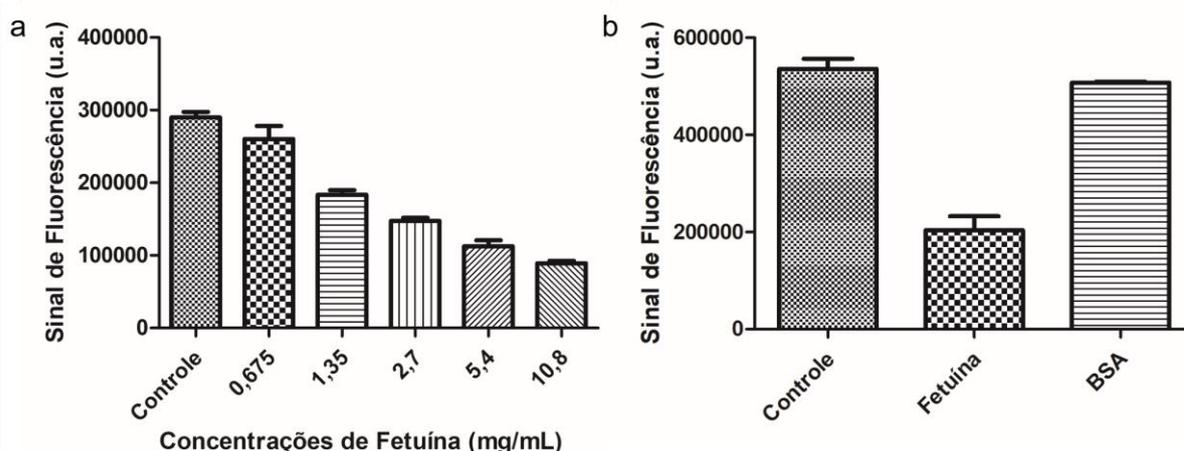
Observa-se na Figura 6 que houve uma redução na intensidade de fluorescência proporcional ao aumento da concentração da fetuína, ocorrendo um indício de saturação dos sítios para a maior concentração. Um comportamento similar foi encontrado por Tran e Park (2021) utilizando conjugados de PQs com anti-NS1 (NS1 - proteína não-estrutural 1) do vírus da dengue e a ligação com o antígeno NS1 promoveu uma redução da fluorescência do conjugado proporcional ao aumento da concentração de NS1. Outros estudos reportaram a detecção da fetuína por luminescência, tal como Vashist (2013) que desenvolveu um imunensaio quimioluminescente em microplaca, imobilizando, no entanto, um anticorpo, anti-fetuína A humana.

Figura 6 – Comparação da intensidade de fluorescência do sistema BNPs-Cramoll após a sua incubação com diferentes concentrações de fetuína. Os pontos correspondem à média e as barras indicam o erro da média.



Para corroborar com a análise realizada no espectrofluorímetro, o EFM também foi realizado até mesmo para ser uma alternativa na utilização de menor volume de amostra e tornar o ensaio mais prático pela possibilidade de investigar a detecção da fetuína em diferentes amostras ao mesmo tempo. Assim como pode-se analisar na Figura 7a, também houve uma diminuição do sinal fluorescente à medida que houve um aumento na concentração da fetuína. Além disso, a especificidade de detecção foi mensurada utilizando a BSA uma vez que a albumina é a proteína plasmática mais abundante. Logo, este ensaio foi realizado utilizando uma concentração final fixa tanto de fetuína quanto BSA em 2,7 mg/mL quando incubada com BNPs-Cramoll e as mudanças fluorescentes foram também acompanhadas pelo EFM. Como está demonstrado na Figura 7b, não houve redução considerável após a incubação com a BSA, enquanto que com a fetuína a mudança no sinal ocorreu como esperado, mostrando assim a especificidade da nanossonda.

Figura 7 – Ensaio fluorescente em microplaca de BNPs-Cramoll antes e após incubações com biomoléculas. (a) Comparação dos sinais de fluorescência do sistema BNPs-Cramoll antes e após a sua incubação com diferentes concentrações de fetuína. (b) Sinal de fluorescência de BNPs-Cramoll antes e após incubação com fetuína e albumina de soro bovino (BSA), ambas na concentração de 2,7 mg/mL. Controle utilizado foi BNPs-Cramoll. As colunas correspondem aos valores da média e as barras indicam o desvio padrão.



4 Conclusões

Os resultados evidenciam que PQs de CdTe carboxilados foram eficientemente conjugados com MNPs-APTES utilizando os agentes de acoplamento EDC e NHS. Além disso, a lectina Cramoll foi conjugada ao sistema bimodal, obtendo-se, assim, uma nanossonda magneto-fluorescente específica para ser

empregada em estudos glicobiológicos envolvendo resíduos de glicose e manose. Ademais, o sistema BNPs-Cramoll mostrou-se eficaz e específico para detectar a fetuína através de mudanças na fluorescência e a propriedade magnética da nanossonda abre perspectiva para um uso potencial em processos de biosseparação.

Agradecimentos

O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) é reconhecido pelas bolsas (LCBBC, BSS, PECF, AF, MTSC). Este trabalho também foi apoiado pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). O Instituto Nacional de Fotônica também é reconhecido.

Referências

ALBUQUERQUE, P. B. S. et al. Healing activity evaluation of the galactomannan film obtained from *Cassia grandis* seeds with immobilized *Cratylia mollis* seed lectin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 749–757, 2017.

CABRAL FILHO, P. E. et al. CdTe quantum dots as fluorescent probes to study transferrin receptors in glioblastoma cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1860, n. 1, p. 28–35, 2016.

CABRAL FILHO, P. E. et al. Multimodal highly fluorescent-magnetic nanoplatform to target transferrin receptors in cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1862, n. 12, p. 2788–2796, 2018.

CABRERA, M. P. et al. Highly fluorescent and superparamagnetic nanosystem for biomedical applications. **Nanotechnology**, v. 28, n. 28, p. 285704, 2017.

CARVALHO, M. E. T. et al. Evaluating the glycophenotype on breast cancer tissues with quantum dots-Cramoll lectin conjugates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 138, p. 302–308, 2019.

CHOWDHURY, A. D. et al. Multifunctional GQDs-Concanavalin A@Fe₃O₄ nanocomposites for cancer cells detection and targeted drug delivery. **Analytica Chimica Acta**, v. 1027, p. 109–120, 2018.

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

CUNHA, C. R. A. et al. Biomedical applications of glyconanoparticles based on quantum dots. **BBA - General Subjects**, v. 1862, n. 3, p. 427–439, 2018a.

CUNHA, C. R. A. et al. Encapsulation into stealth liposomes enhances the antitumor action of recombinant *Cratylia mollis* lectin expressed in *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–11, 2016.

CUNHA, C. R. A. et al. Quantum dot–Cramoll lectin as novel conjugates to glycobiology. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 178, p. 85–91, 2018b.

DAGTEPE, P. et al. Quantized growth of CdTe quantum dots; observation of magic-sized CdTe quantum dots. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 41, p. 14977–14983, 2007.

ELRAHMAN, A. A. B.; MANSOUR, F. R. Targeted magnetic iron oxide nanoparticles: Preparation, functionalization and biomedical application. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 52, p. 702–712, 2019.

FERNANDES, M. P. et al. *Cratylia mollis* seed lectin induces membrane permeability transition in isolated rat liver mitochondria and a cyclosporine a-insensitive permeability transition in *Trypanosoma cruzi* mitochondria. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 381–388, 2014.

GARCÍA, R. S.; STAFFORD, S.; GUN'KO, Y. K. Recent progress in synthesis and functionalization of multimodal fluorescent-magnetic nanoparticles for biological applications. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 8, n. 2, p. 12–16, 2018.

GRAUS, M. S. et al. Mannan molecular substructures control nanoscale glucan exposure in *Candida*. **CellReports**, v. 24, n. 9, p. 2432- 2442, 2018.

GÜZEL, O. et al. The Role of pentraxin-3, fetuin-A and sirtuin-7 in the diagnosis of prostate cancer. **Urology Journal**, p. 6626, 2021.

JANDÚ, J. J. et al. Treatment with pCramoll alone and in combination with fluconazole provides therapeutic benefits in *C. gattii* infected mice. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 1–11, 2017.

MARCELO, G. A. et al. Magnetic, fluorescent and hybrid nanoparticles: From synthesis to application in biosystems. **Materials Science and Engineering C**, v. 106, p. 110104, 2020.

OLIVEIRA, M. D. L. et al. Detection of dengue virus serotypes on the surface of gold electrode based on *Cratylia mollis* lectin affinity. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 155, n. 2, p. 789-795, 2011.

OLIVEIRA, W. F. et al. Titanium dioxide nanotubes functionalized with *Cratylia mollis* seed lectin, Cramoll, enhanced osteoblast-like cells adhesion and proliferation. **Materials Science and Engineering C**, v. 90, p. 664–672, 2018.

OLIVEIRA, W. F. et al. Evaluating glucose and mannose profiles in *Candida* species using quantum dots conjugated with Cramoll lectin as fluorescent nanoprobe. **Microbiological Research**, v. 230, p. 126330, 2020.

RANJBAR-NAVAZI, Z. et al. Cadmium-free quantum dot-based theranostics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 386–400, 2019.

RHO, J.-H. et al. Glycoproteomic analysis of human lung adenocarcinomas using glycoarrays and tandem mass spectrometry: differential expression and glycosylation patterns of vimentin and fetuin A isoforms. **The Protein Journal**, v. 28, p. 148–160, 2009.

SHENG, Y. et al. Fluorescent magnetic nanoparticles as minimally-invasive multi-functional theranostic platform for fluorescence imaging, MRI and magnetic hyperthermia. **Materials Chemistry and Physics**, v. 204, p. 388–396, 2018.

SILVA, P. M. S. et al. *Cratylia mollis* lectin nanoelectrode for differential diagnostic of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia based on label-free detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 85, p. 171–177, 2016.

TENÓRIO, D. P. L. A. et al. CdTe quantum dots conjugated to concanavalin A as

potential fluorescent molecular probes for saccharides detection in *Candida albicans*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 142, p. 237–243, 2015.

TRAN, L.; PARK, S. Highly sensitive detection of dengue biomarker using streptavidin-conjugated quantum dots. **Scientific Reports**, v. 11, p. 15196, 2021.

VASHIST, S. K. sub-picogram sensitive rapid chemiluminescent immunoassay for the detection of human fetuin A. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 40, n. 1, p. 297-302, 2013.

YANG, Q. et al. Design of functional magnetic nanocomposites for bioseparation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 191, p. 111014, 2020.

YU, W. W. et al. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. **Chemistry of Materials**, v. 15, n. 14, p. 2854–2860, 2003.

ZOU, Z. et al. Photoactivatable fluorescent probes for spatiotemporal-controlled biosensing and imaging. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 125, p. 115811, 2020.

5 CONCLUSÕES

- A lectina BmoLL foi conjugada por adsorção aos PQs e o conjugado PQs-BmoLL mostrou ser uma nanossonda fluorescente galactose-específica efetiva para ser aplicado em ensaios glicobiológicos, uma vez que promoveu alta marcação de eritrócitos B, cujos antígenos possuem na sua estrutura o monossacarídeo específico para a ligação deste conjugado;
- A Cramoll foi eficientemente conjugada aos PQs com emissão na região espectral do verde e este bioconjugado foi prático e efetivo na quantificação do perfil de glicose e manose por citometria de fluxo, evidenciando uma maior expressão dos resíduos desses carboidratos em *C. parapsilosis* em comparação a *C. albicans* e *C. glabrata*;
- O conjugado de PQs-Cramoll indicou que células ductais e estroma dos tecidos oriundos de carcinoma ductal invasivo apresentam maior expressão de resíduos de glicose e manose em comparação aos tecidos normais e de fibroadenoma empregando-se tanto microscopia de fluorescência para revelar a localização da marcação como ensaio de fluorescência em microplaca para a quantificação;
- Sistemas bimodais magnéticos-fluorescentes constituídos por PQs de CdTe carboxilados e MNPs-APTES foram conjugados à lectina Cramoll de forma efetiva, marcando eficientemente e especificamente leveduras de *C. albicans*.
- O nanossistema multimodal (BNPs-Cramoll) mostrou potencial de detecção da fetuína. A diminuição da fluorescência foi associada ao aumento da concentração de fetuína e o sistema não reconheceu BSA indicando a especificidade da nanossonda. É relevante, no entanto, avaliar também essa detecção da fetuína em amostras mais complexas, tais como soro sanguíneo bem como estimar a fetuína separada pelo sistema uma vez que sua capacidade magnética pode promover biosseparação.

6 SÚMULA CURRICULAR

Atividades acadêmicas e científicas realizadas durante o doutorado:

1 Artigos completos publicados em periódicos

- DA SILVA, ABDÊNIGO RODRIGUES; **DE OLIVEIRA, WESLLEY FELIX**; DA SILVA, POLLYANNA MICHELLE; DE SIQUEIRA PATRIOTA, LEYDIANNE LEITE; DE VASCONCELOS ALVES, ROBSON RAION; DE OLIVEIRA, ANA PATRÍCIA SILVA; DOS SANTOS CORREIA, MARIA TEREZA; PAIVA, PATRÍCIA MARIA GUEDES; VAINSTEIN, MARILENE HENNING; FILHO, PAULO EUZÉBIO CABRAL; FONTES, ADRIANA; NAPOLEÃO, THIAGO HENRIQUE. Quantum dots conjugated to lectins from *Schinus terebinthifolia* leaves (SteLL) and *Punica granatum* sarcotesta (PgTeL) as potential fluorescent nanotools for investigating *Cryptococcus neoformans*. INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES, v. 192, p. 232-240, 2021.
- ALBUQUERQUE, PRISCILLA BARBOSA SALES; **DE OLIVEIRA, WESLLEY FELIX**; DOS SANTOS SILVA, PRISCILA MARCELINO; DOS SANTOS CORREIA, MARIA TEREZA; KENNEDY, JOHN F.; COELHO, LUANA CASSANDRA BREITENBACH BARROSO. Skincare application of medicinal plant polysaccharides - A review. CARBOHYDRATE POLYMERS, v. 277, p. 118824, 2021.
- SILVA, L. C. N.; MENDONCA, J. S. P.; **OLIVEIRA, W. F.**; BATISTA, K. L. R.; ZAGMIGNAN, A.; VIANA, I. F. T.; CORREIA, M. T. S.. Exploring lectin-glycan interactions to combat COVID-19: lessons acquired from other enveloped viruses. Glycobiology, v. 2020, p. cwaa099, 2020.
- **OLIVEIRA, WESLLEY F.**; SANTOS, N. R. M.; CABRERA, M. P.; FERREIRA, S. A. O.; RAPOSO, B. L.; NAPOLEAO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B.; CABRAL FILHO, P. E.; FONTES, A.; CORREIA, M. T. S.. *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) conjugated with quantum

dots as fluorescent nanoprobe for biological studies: application to red blood cells. *Methods and Applications in Fluorescence*, v. 8, p. 035009, 2020.

- ALBUQUERQUE, PRISCILLA BARBOSA SALES; **DE OLIVEIRA, WESLEY FELIX**; DOS SANTOS SILVA, PRISCILA MARCELINO; DOS SANTOS CORREIA, MARIA TEREZA; KENNEDY, JOHN F.; COELHO, LUANA CASSANDRA BREITENBACH BARROSO. Epiphanies of well-known and newly discovered macromolecular carbohydrates - A review. *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*, v. 156, p. 51-66, 2020.
- **OLIVEIRA, WESLEY F.**; CABRERA, MARIANA P.; SANTOS, NATÁLIA R.M.; NAPOLEÃO, THIAGO H.; PAIVA, PATRÍCIA M.G.; NEVES, REJANE P.; SILVA, MÁRCIA V.; SANTOS, BEATE S.; COELHO, LUANA C.B.B.; CABRAL FILHO, PAULO E.; FONTES, ADRIANA; CORREIA, MARIA T.S. Evaluating glucose and mannose profiles in *Candida* species using quantum dots conjugated with Cramoll lectin as fluorescent nanoprobe. *MICROBIOLOGICAL RESEARCH*, v.230, p.126330, 2020.
- **DE OLIVEIRA, WESLEY FELIX**; DOS SANTOS SILVA, PRISCILA MARCELINO; COELHO, LUANA CASSANDRA BREITENBACH BARROSO; DOS SANTOS CORREIA, MARIA TEREZA. Biomarkers, Biosensors and Biomedicine. *CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY*, v.26, p.1-14, 2019.
- CARVALHO, MARIA EDUARDA T.; **OLIVEIRA, WESLEY F.**; CUNHA, CÁSSIA R.A.; COELHO, LUANA C.B.B.; SILVA, MÁRCIA V.; CARVALHO JUNIOR, LUIZ B.; SANTOS, BEATE S.; CABRAL FILHO, PAULO E.; FONTES, ADRIANA; CORREIA, MARIA TEREZA S. Evaluating the glyco-phenotype on breast cancer tissues with quantum dots-Cramoll lectin conjugates. *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*, v.138, p.302-308, 2019.

- DOS SANTOS SILVA, PRISCILA MARCELINO; ALBUQUERQUE, PRISCILLA BARBOSA SALES; **DE OLIVEIRA, WESLEY FELIX**; COELHO, LUANA CASSANDRA BREITENBACH BARROSO; DOS SANTOS CORREIA, MARIA TEREZA. Glycosylation products in prostate diseases. CLINICA CHIMICA ACTA, v.498, p.52-61, 2019.
- DOS SANTOS SILVA, PRISCILA MARCELINO; **DE OLIVEIRA, WESLEY FELIX**; ALBUQUERQUE, PRISCILLA BARBOSA SALES; DOS SANTOS CORREIA, MARIA TEREZA; COELHO, LUANA CASSANDRA BREITENBACH BARROSO. Insights into anti-pathogenic activities of mannose lectins. INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES, v.140, p.234-244, 2019.
- PESSOA, R. B. G.; **OLIVEIRA, W. F.**; MARQUES, D. S. C.; CORREIA, M. T. S.; CARVALHO, E. V. M. M.; COELHO, L. C. B. B. The genus *Aeromonas*: A general approach. MICROBIAL PATHOGENESIS, v.130, p.81-94, 2019.
- BREITENBACH BARROSO COELHO, L.C.; MARCELINO DOS SANTOS SILVA, P.; **FELIX DE OLIVEIRA, W.**; DE MOURA, M.C.; VIANA PONTUAL, E.; SOARES GOMES, F.; GUEDES PAIVA, P.M.; NAPOLEÃO, T.H.; DOS SANTOS CORREIA, M.T. Lectins as antimicrobial agents. JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, v.125, p.1238-1252, 2018.
- CARVALHO, E. V. M. M.; **OLIVEIRA, W. F.**; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S. Lectins as mitosis stimulating factors: Briefly reviewed. LIFE SCIENCES, v.207, p.152-157, 2018.
- **DE OLIVEIRA, WESLEY FELIX**; DOS SANTOS SILVA, PRISCILA MARCELINO; BARROSO COELHO, LUANA CASSANDRA BREITENBACH; DOS SANTOS CORREIA, MARIA TEREZA. Plant

Antioxidants and Mechanisms of Action. Letters in Drug Design & Discovery, v.15, p.1103-1115, 2018.

2 Capítulos de livros publicados

- **OLIVEIRA, W. F.**; ALBUQUERQUE, P. B. S.; SILVA, P. M. S.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S.. Gums. In: Oliveira, Joaquim; Radhouani, Hajer; Reis, Rui L. (Org.). Polysaccharides of Microbial Origin. Biomedical Applications. 1ed.: Springer, 2020.
- Magalhães, Abigail Eduarda de Miranda; Silva, Julia Carla Barros da; Lins, Hévellin Talita Sousa; Macêdo, Larissa Silva de; Siqueira, Lucas Cristiano da Silva; Lima, Lucas Eduardo Bezerra de; Nascimento, Lucas Matheus Silva; Melo, Tayonara dos Santos; Melo, Tuane dos Santos; **Oliveira, Wesley Felix de**; Souza, Tiago Henrique dos Santos. O CARCINOMA MAMÁRIO: DIAGNÓSTICO, TRATAMENTO E PROFILÁXIA. Medicina: Progresso científico, tecnológico, econômico e social do país 2. 2ed.: Atena Editora, 2021, v. , p. 133-145.
- PEREIRA, M. I. A.; MONTEIRO, C. A. P.; **OLIVEIRA, W. F.**; SANTOS, BEATE S.; FONTES, A.; CABRAL FILHO, P. E.. Resazurin-based Assay to Evaluate Cell Viability after Quantum Dot Interaction. Quantum Dots: Applications in Biology. 3ed.New York: Springer, 2020, v. 2135, p. 213-221.
- COELHO, L. C. B. B.; SILVA, P. M. S.; **OLIVEIRA, W. F.**; MOURA, M. C.; GOMES, F. S.; CORREIA, M. T. S. Assays Involving Hemagglutinins: Use in Studying the Mechanisms of Action of Lectins In: Hemagglutinins: Structures, Functions and Mechanisms. 2019.
- **OLIVEIRA, W.F.**; SILVA, A. G.; OLIVEIRA, L. M. S.; ARAUJO, D. R. C.; SILVA, J. W. L. M.; VIEIRA, P. B.; TASCA, T.; COELHO, L. C. B. B.; SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. S. Cactaceae antimicrobials from Seasonally Dry Tropical Forests (Caatinga) in Northeast Brazil In: Understanding Microbial

Pathogens: Current Knowledge and Educational Ideas on Antimicrobial Research.7, 2018, p. 92-98.

- ALBUQUERQUE, P. B. S.; **OLIVEIRA, W. F.**; SILVA, P. M. S.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Flocculant Polysaccharides Mainly from Plants In: Flocculation: Processes and Applications. Ed .New York: Nova Science Publishers, 2018, p. 1-60.
- SILVA, A. G.; VERAS, B. O.; DINIZ, K. M.; NASCIMENTO, W.; SANTOS, R. F. B.; **FÉLIX, W.**; TASCA, T.; SANTOS, Y. Q.; CORREIA, M. T. S.; MACEDO, A. J.; SILVA, M. V. Natural Products from Sponge and Sponge-Associated Microbes as Antimicrobial Compounds In: Understanding Microbial Pathogens: Current Knowledge and Educational Ideas on Antimicrobial Research.7, 2018, p. 218-225.

3 Premiações

- Poster Award pelo trabalho "Fetuin detection by a promising optical-magnetic multimodal nanoprobe functionalized with Cramoll lectin", 20th International Union for Pure and Applied Biophysics (IUPAB). 2021.
- Menção Honrosa pela apresentação oral do Trabalho intitulado: Lectina isolada do suco da romã (*Punica granatum*) conjugada a pontos quânticos - Uma nova nanoferramenta para estudos nanobiotecnológicos, I Congresso Brasileiro de Nanobiotecnologia - COBIONTEC. 2021.
- Travel Award para apresentação oral no Simpósio Jovem Cientista SBBq-Conesul, 48th Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology – SBBq. 2019.

4 Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

- **OLIVEIRA, W. F.**; CABRERA, M. P.; LIMA, J. V. A.; COELHO, L. C. B. B.; PEREIRA, G. A. L.; SANTOS, B. S.; CABRAL FILHO, P. E.; CORREIA, M. T. S.; FONTES, A.. FETUIN DETECTION BY A PROMISING OPTICAL-MAGNETIC MULTIMODAL NANOPROBE FUNCTIONALIZED WITH CRAMOLL LECTIN. In: 20th International Union for Pure and Applied Biophysics (IUPAB), 2021. IUPAB-SBBf-SBBq, 2021.
- SANTOS, N. R. M.; **OLIVEIRA, W. F.**; CABRERA, M. P.; BEZERRA FILHO, C. M.; OLIVA, M. L. V.; CABRAL FILHO, P. E.; FONTES, A.; CORREIA, M. T. S.. HIGHLY FLUORESCENT NANOPROBE BASED ON QUANTUM DOTS AND ENTEROLOBIUM CONTORTISILYQUUM TRYPSIN INHIBITOR (ECTI). In: 20th International Union for Pure and Applied Biophysics (IUPAB), 2021. IUPAB-SBBf-SBBq.
- SANTOS, NATÁLIA REGINA MÉLO; **OLIVEIRA, WESLEY FELIX DE; CABRERA,** MARIANA PAOLAFERREIRA; NAPOLEÃO, THIAGO HENRIQUE; PAIVA, PATRÍCIA MARIA GUEDES; SILVA, MÁRCIA VANUSA DA; COELHO, LUANA CASSANDRA B. B. C. F.; FONTES, ADRIANA; CORREIA, MARIA TEREZA DOS SANTOS. BIOCONJUGAÇÃO DE PONTOS QUÂNTICOS COM LECTINA DE *Bauhinia monandra* PARA APLICAÇÕES BIOLÓGICAS In: Encontro Anual da Biofísica 2019, 2019, Recife. Blucher Biophysics Proceedings, 2019. p.212.
- **OLIVEIRA, W. F.**; CABRERA, M. P.; SANTOS, N. R. M.; FERREIRA, S. A. O.; NAPOLEAO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; NEVES, R. P.; SILVA, M. V.; COELHO, L. C. B. B.; CABRAL FILHO, P. E.; FONTES, A.; CORREIA, M. T. S. CRAMOLL AND BmoLL LECTINS CONJUGATED TO QUANTUM DOTS FOR GLYCOBIOLOGICAL STUDIES In: 48a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Águas de Lindoia. 48th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2019.

- LOPES, ISABELA SANTOS; **OLIVEIRA, WESLEY FELIX DE**; CABRAL FILHO, PAULO EUZÉBIO; PEREIRA, GIOVANNIA ARAUJO DE LIMA; FONTES, ADRIANA; CABRERA, MARIANA PAOLA. NANOSSONDAS MAGNETO-FLUORESCENTES PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS In: Encontro Anual da Biofísica 2019, 2019, Recife. Blucher Biophysics Proceedings. São Paulo: Editora Blucher, 2019. p.222.

5 Participação em Bancas de Trabalhos de Conclusão de Curso

- **OLIVEIRA, W. F.**. Participação em banca de Diógenes Oliveira, Giordânio Vasconcelos e Maria Silva. A importância do farmacêutico no gerenciamento de diabetes mellitus. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Centro Universitário Brasileiro.
- **OLIVEIRA, W. F.**. Participação em banca de Agnes Garces, Sandra Ferreira e Talita Souza. Automedicação em idosos e importância da atuação do farmacêutico. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Centro Universitário Brasileiro.
- CABRAL FILHO, P. E.; SOUZA, T. H. S.; **OLIVEIRA, W. F.**. Participação em banca de João Victor Costa de Lima. Aplicação de pontos quânticos em imuno-hematologia. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco.
- FONTES, A.; **OLIVEIRA, W.F.**; RIBEIRO, J. F. F.. Participação em banca de Rennan Ribeiro Mano de Lima. Bioconjugados de pontos quânticos para o estudo dos receptores de folato em células cancerosas. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco.
- FONTES, A.; CUNHA, C. R. A.; **OLIVEIRA, WESLEY F.**. Participação em banca de Rafaella Bezerra de Lima Henrique. Esferoides como um modelo biológico tridimensional para estudos com pontos quânticos. 2019. Trabalho

de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco.

- COELHO, L. C. B. B.; **OLIVEIRA, W. F.**; FONTES, A.. Participação em banca de Rafael Bastos Gonçalves Pessoa. Caracterização molecular e avaliação do potencial de virulência de cepas de *Aeromonas* spp. isoladas do peixe tambaqui (*Colossoma macropomum*). 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco.

6 Orientações e supervisões concluídas

- Natália Regina Melo Santos. Lectina das folhas de *Bauhinia monandra* (BmoLL) conjugada a pontos quânticos para estudos biológicos: aplicação em hemácias. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco. Orientador: **Wesley Felix de Oliveira**.

REFERÊNCIAS

- ADAMOVIĆ, L.; MALINOVSKÁ, L.; WIMMEROVÁ, M. New sensitive detection method for lectin hemagglutination using microscopy. **Microscopy Research and Technique**, v. 77, p. 841–849, 2014.
- AHMED, K. B. A. et al. Interaction of cadmium sulfide quantum dots with jacalin for specific recognition of cancer cells. **Journal of Luminescence**, v. 182, p. 283–288, 2017.
- AHMED, S. R. et al. Quantum dots incorporated magnetic nanoparticles for imaging colon carcinoma cells. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2013.
- ANDRADE, C. G. et al. Evaluation of glyco-phenotype in breast cancer by quantum dot-lectin histochemistry. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 4623–4629, 2013.
- ARAUJO-MELO, R. D. O. et al. Isolation and identification of endophyte microorganisms from *Bauhinia monandra* leaves, mainly actinobacteria. **Biotechnology Journal International**, v. 17, n. 4, p. 1–12, 2017.
- ARRUDA, C. C. L. et al. CdTe-GSH as luminescent biomarker for labeling the larvicidal action of WSMoL lectin in *Aedes aegypti* larvae. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 187, p. 110672, 2020.
- AVELINO, K. Y. P. S. et al. Biosensor based on hybrid nanocomposite and CramoLL lectin for detection of dengue glycoproteins in real samples. **Synthetic Metals**, v. 194, p. 102–108, 2014.
- BEREZIN, M. Y.; ACHILEFU, S. Fluorescence lifetime measurements and biological imaging. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 5, p. 2641–2684, 2010.
- BERGER, A. Magnetic resonance imaging. **BMJ (Clinical Research ed.)**, v. 324, n. 7328, p. 35, 2002.
- BHUTIA, S. K. et al. Plant lectins in cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death. **Pharmacological Research**, v. 144, p. 8–18, 2019.
- BONDE, S.; TAMBE, K. Lectin coupled liposomes for pulmonary delivery of salbutamol sulphate for better management of asthma: Formulation development using QbD approach. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 54, p. 101336, 2019.
- CABRAL FILHO, P. E. et al. Blood group antigen studies using CdTe quantum dots and flow cytometry. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 4393–4404, 2015.
- CABRAL FILHO, P. E. et al. Multimodal highly fluorescent-magnetic nanoplatfom to target transferrin receptors in cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1862, n. 12, p. 2788–2796, 2018.

CABRERA, M. P. et al. Highly fluorescent and superparamagnetic nanosystem for biomedical applications. **Nanotechnology**, v. 28, n. 28, p. 285704, 2017.

CAGLIARI, R.; KREMER, F. S.; PINTO, S. *Bauhinia* lectins: Biochemical properties and biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 811–820, 2018.

CAMPOS, J. K. L. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Bauhinia monandra* leaf lectin. **Biochimie Open**, v. 2, p. 62–68, 2016.

CARDOSO, V. F. et al. Advances in magnetic nanoparticles for biomedical applications. **Advanced Healthcare Materials**, v. 7, n. 5, p. 1–35, 2018.

CARVALHO, E. V. M. M. et al. Lectins as mitosis stimulating factors: Briefly reviewed. **Life Sciences**, v. 207, 2018.

CAVADA, B. S. et al. One century of ConA and 40 years of ConBr research: A structural review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 134, p. 901–911, 2019.

CHANG, C. H. et al. A theranostic approach to breast cancer by a quantum dots- and magnetic nanoparticles-conjugated peptide. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 97, p. 88–95, 2019.

CHOWDHURY, A. D. et al. Multifunctional GQDs-Concanavalin A@Fe₃O₄ nanocomposites for cancer cells detection and targeted drug delivery. **Analytica Chimica Acta**, v. 1027, p. 109–120, 2018.

COELHO, L. C. B. B. et al. Lectins , interconnecting proteins with biotechnological / pharmacological and therapeutic applications. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1–22, 2017.

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

COELHO, L. C. B. B. et al. Assays Involving Hemagglutinins: Use in Studying the Mechanisms of Action of Lectins. *In*: Ng, T. B. et al. **Hemagglutinins: Structures, Functions and Mechanisms**. Nova Iorque: Nova Science Publishers, Inc., 2019. Cap. 1, p. 1–34.

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

CUI, H. et al. Rapid and efficient isolation and detection of circulating tumor cells based on ZnS:Mn²⁺ quantum dots and magnetic nanocomposites. **Talanta**, v. 202, p. 230–236, 2019.

CUMMINGS, R. D. Glycan-Recognizing Probes as Tools. *In*: Varki, A. et al.

Essentials of Glycobiology. Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2019. Cap. 48.

CUNHA, C. R. A. et al. Biomedical applications of glyconanoparticles based on quantum dots. **BBA - General Subjects**, v. 1862, n. 3, p. 427–439, 2018a.

CUNHA, C. R. A. et al. Encapsulation into stealth liposomes enhances the antitumor action of recombinant *Cratylia mollis* lectin expressed in *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–11, 2016.

CUNHA, C. R. A. et al. Quantum dot – Cramoll lectin as novel conjugates to glycobiology. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 178, p. 85–91, 2018b.

DE-SIMONE, S. G. et al. Purification of equine IgG3 by lectin affinity and an interaction analysis via microscale thermophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 561–562, n. September, p. 27–31, 2018.

DI CORATO, R. et al. Multifunctional nanobeads based on quantum dots and magnetic cell targeting and sorting. **ACS Nano**, v. 5, n. 2, p. 1109–1121, 2011.

DIAS, R. D. O. et al. Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. **Molecules**, v. 20, p. 519–541, 2015.

DING, Y. et al. Carboxymethyl chitosan based nanocomposites containing chemically bonded quantum dots and magnetic nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 433, p. 188–196, 2018.

DONG, Q. et al. A molecular approach to magnetic metallic nanostructures from metallopolymer precursors. **Chemical Society Reviews**, v. 47, n. 13, p. 4934–4953, 2018.

DONEGÁ, C. M. Synthesis and properties of colloidal heteronanocrystals. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 3, p. 1512–1546, 2011.

FATIMA, H.; KIM, K. S. Iron-based magnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging. **Advanced Powder Technology**, v. 29, n. 11, p. 2678–2685, 2018.

FERREIRA, J. A. et al. Synthesis and optimization of lectin functionalized nanoprobes for the selective recovery of glycoproteins from human body fluids. **Analytical Chemistry**, v. 83, p. 7035–7043.

FIGUEIROA, E. O. et al. Lectin-Carbohydrate Interactions: Implications for the Development of New Anticancer Agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 34, p. 1–14, 2017.

FRANCISQUINI, E.; SCHOENMAKER, J. SOUZA, J.A. Nanopartículas Magnéticas e suas Aplicações. *In*: ADILSON, B.; WENDEL ANDRADE, A. **Química Supramolecular e Nanotecnologia**. 1a ed. São Paulo: Atheneu, 2014. Cap. 14, v. 10 p. 269–289.

GAO, J.; GU, H; XU, B. Multifunctional magnetic nanoparticles: design, synthesis, and biomedical applications. **Accounts of Chemical Research**, v. 42, n. 8, p. 1097–1107, 2009.

GAUTAM, A. K. et al. Legume lectins: Potential use as a diagnostics and therapeutics against the cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 142, p. 474–483, 2020.

GUL, S. et al. A comprehensive review of magnetic nanomaterials modern day theranostics. **Frontiers in Materials**, v. 6, p. 1–15, 2019.

H. R, C.; SCHIFFMAN, J. D.; BALAKRISHNA, R. G. Quantum dots as fluorescent probes: Synthesis, surface chemistry, energy transfer mechanisms, and applications. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 258, p. 1191–1214, 2018.

HAGE, M. C. F. N. S.; IWASAKI, M. Imagem por ressonância magnética: Princípios básicos. **Ciencia Rural**, v. 39, n. 4, p. 1287–1295, 2009.

HE, X. et al. Lectin-conjugated Fe₂O₃@Au core@shell nanoparticles as dual mode contrast agents for *in vivo* detection of tumor. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, n. 3, p. 738–745, 2014.

HUANG, X. et al. Novel L-type lectin from fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii* participates in antibacterial and antiviral immune responses. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 77, p. 304–311, 2018.

IDA, N. Magnetic Materials and Properties. *In: Engineering Electromagnetics*. Londres: Springer, 2015. Cap. 9, p. 427–513.

JHA, S. et al. Pharmaceutical potential of quantum dots. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 46, p. 57–65, 2018.

JIANG, Z. et al. Toxic effects of magnetic nanoparticles on normal cells and organs. **Life Sciences**, v. 220, p. 156–161, 2019.

JOHN, F. C.; TABBASUM, K.; RAO, C. P. In: Chemico-biological aspects of plant lectins with a preference to legume lectins. *In: ATTA-UR-RAHMAN. Studies in natural products chemistry*. Amsterdã: Elsevier, 2013. Cap. 10, v. 40 p. 359–381.

KAUSHIK, A. Biomedical nanotechnology related grand challenges and perspectives. **Frontiers in Nanotechnology**, v. 1, p. 1–4, 2019.

KEÇILI, R.; BÜYÜKTIRYAKI, S.; HUSSAIN, C. M. Advancement in bioanalytical science through nanotechnology: Past, present and future. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 110, p. 259–276, 2019.

LALITHA, L. J. et al. In-vitro phytopharmacological and anticancer activity of *Loranthus Longiflorus* Desv. Var. *Falcatuskurz* against the human lung cancer cells. **Journal of King Saud University - Science**, v. 32, n. 1, p. 1246–1253, 2020.

- LI, J. et al. Quantum dot-induced improved performance of cadmium telluride (CdTe) solar cells without a Cu buffer layer. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 5, n. 10, p. 4904–4911, 2017.
- LI, K.; NEJADNIK, H.; DALDRUP-LINK, H. E. Next-generation superparamagnetic iron oxide nanoparticles for cancer theranostics. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 9, p. 1421–1429, 2017.
- LIU, B. et al. Semiconductor quantum dots in tumor research. **Journal of Luminescence**, v. 209, p. 61–68, 2019.
- LUDWIG, A. K. et al. Lectinology 4.0: Altering modular (ga)lectin display for functional analysis and biomedical applications. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1863, n. 5, p. 935–940, 2019.
- MACEDO, M. L. R. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 146, p. 486–498, 2007.
- MAHATO, N.; ANSARI, M. O.; CHO, M. H. Production of utilizable energy from renewable resources: mechanism, machinery and effect on environment. **Advanced Materials Research**, v. 1116, p. 1–32, 2015.
- MARCELO, G. A. et al. Magnetic, fluorescent and hybrid nanoparticles: From synthesis to application in biosystems. **Materials Science and Engineering C**, v. 106, p. 110104, 2020.
- MISHRA, A. et al. Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 134, p. 110827, 2019.
- MONDAL, D. K. et al. Improved heating efficiency of bifunctional MnFe₂O₄/ZnS nanocomposite for magnetic hyperthermia application. **Physica B: Condensed Matter**, v. 567, p. 122–128, 2019.
- MONTAZER, M.; HARIFI, T. Magnetic nanofinishes for textiles. **Nanofinishing of Textile Materials**, p. 225–240, 2018.
- MÜLLER, C.; DESPRAS, G.; LINDHORST, T. K. Organizing multivalency in carbohydrate recognition. **Chemical Society Reviews**, v. 45, n. 11, p. 3275–3302, 2016.
- Munasinghe, E.; Aththapaththu, M.; Jayarathne. Magnetic and Quantum Dot Nanoparticles for Drug Delivery and Diagnostic Systems. *In*: Karakus, S. **Colloid Science in Pharmaceutical Nanotechnology**. Londres: IntechOpen, 2020.
- NASRIN, F. et al. Single-step detection of norovirus tuning localized surface plasmon resonance-induced optical signal between gold nanoparticles and quantum dots. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 122, p. 16–24, 2018.

- OLIVEIRA, W. F. et al. Cactaceae antimicrobials from seasonally dry tropical forests (Caatinga) in northeast Brazil. In: TORRES-HERGUETA, E.; MÉNDEZ-VILAS, A. **Understanding microbial pathogens: current knowledge and educational ideas on antimicrobial research**. Badajoz: Formatex Research Center, 2018a. p. 92–98.
- OLIVEIRA, W. F. et al. Titanium dioxide nanotubes functionalized with *Cratylia mollis* seed lectin, Cramoll, enhanced osteoblast-like cells adhesion and proliferation. **Materials Science and Engineering C**, v. 90, p. 664–672, 2018b.
- PAHARI, S. K. et al. Magneto-fluorescent yolk-shell nanoparticles. **Chemistry of Materials**, v. 30, n. 3, p. 775–780, 2018.
- PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* mart. (camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 113–118, 1992.
- PEREIRA, G. et al. (Bio)conjugation strategies applied to fluorescent semiconductor quantum dots. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 12, p. 2536–2560, 2019.
- PÉREZ-DONOSO, J. M. et al. Biomimetic, mild chemical synthesis of Cdte-GSH quantum dots with improved biocompatibility. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. e30741, 2012.
- PERTON, F. et al. Fluorescent and magnetic stellate mesoporous silica for bimodal imaging and magnetic hyperthermia. **Applied Materials Today**, v. 16, p. 301–314, 2019.
- PETRYAYEVA, E.; ALGAR, W. R.; MEDINTZ, I. L. Quantum dots in bioanalysis: A review of applications across various platforms for fluorescence spectroscopy and imaging. **Applied Spectroscopy**, v. 67, n. 3, p. 215–252, 2013.
- QIAO, K. et al. Application of magnetic adsorbents based on iron oxide nanoparticles for oil spill remediation: A review. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 97, p. 227–236, 2019.
- RANJBAR-NAVAZI, Z. et al. Cadmium-free quantum dot-based theranostics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 386–400, 2019.
- RESHMA, V. G.; MOHANAN, P. V. Quantum dots: Applications and safety consequences. **Journal of Luminescence**, v. 205, p. 287–298, 2019.
- RIO, M. D. et al. Effects of the binding of a *Helianthus annuus* lectin to *Candida albicans* cell wall on biofilm development and adhesion to host cells. **Phytomedicine**, v. 58, p. 152875, 2019.
- RODRIGUES, J. S. et al. Novel core (polyester)-shell (polysaccharide) nanoparticles: protein loading and surface modification with lectins. **Journal of Controlled Release**, v. 92, p. 103–112, 2003.

RONG, Z. et al. Dual-color magnetic-quantum dot nanobeads as versatile fluorescent probes in test strip for simultaneous point-of-care detection of free and complexed prostate-specific antigen. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 145, p. 111719, 2019.

ROSILIO, V. et al. Interaction of *Bauhinia monandra* lectin (BmoLL) with lipid monolayers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 250, n. 1–3, p. 491–497, 2004.

RYBKA, J. D. Radiosensitizing properties of magnetic hyperthermia mediated by superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) on human cutaneous melanoma cell lines. **Reports of Practical Oncology and Radiotherapy**, v. 24, n. 2, p. 152–157, 2019.

SANTOS, N. D. L. et al. Effect of gamma irradiation of *Moringa oleifera* seed lectin on its larvicidal, ovicidal, and oviposition-stimulant activities against *Aedes aegypti*. **South African Journal of Botany**, v. 129, p. 3–8, 2020.

SAVLA, R.; MINKO, T. Nanoparticle design considerations for molecular imaging of apoptosis: Diagnostic, prognostic, and therapeutic value. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 113, p. 122–140, 2017.

SECHOVSKÝ, V. Magnetism in solids: general introduction. **Encyclopedia of Materials: Science and Technology**, p. 5018–5032, 2001.

SCHUTTER, K.; VAN DAMME, E. J. M. Protein-carbohydrate interactions as part of plant defense and animal immunity. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 9029–9053, 2015.

SILVA, L. C. N. et al. *Cratylia mollis* lectin: A versatile tool for biomedical studies. **Current Bioactive Compounds**, v. 10, n. 1, p. 44–54, 2014.

SILVA, P. M. S. et al. *Cratylia mollis* lectin nanoelectrode for differential diagnostic of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia based on label-free detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 85, p. 171–177, 2016.

SILVA, P. M. S. et al. Insights into anti-pathogenic activities of mannose lectins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 140, p. 234–244, 2019.

SINNECKER, J. P. Materiais Magnéticos Doces e Materiais Ferromagnéticos Amorfos. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 22, n. 3, p. 396–405, 2000.

SISENANDO, H. A. A. C. N. et al. Evaluation of the genotoxic potential of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL). **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 2, p. 303–308, 2009.

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

SOUZA, J. D. et al. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 696–702, 2011.

STAFFORD, S.; GARCIA, R. S.; GUN'KO, Y. K. Multimodal magnetic-plasmonic nanoparticles for biomedical applications. **Applied Sciences**, v. 8, n. 97, p. 1–16, 2018.

SUZUKI, Y.; YOKOYAMA, K. Development of functional fluorescent molecular probes for the detection of biological substances. **Biosensors**, v. 5, n. 2, p. 337–363, 2015.

TAPEINOS, C. Magnetic Nanoparticles and Their Bioapplications. In: CIOFANI, G. **Smart Nanoparticles for Biomedicine**. Amsterdã: Elsevier, 2018. Cap. 9, p. 131–142.

TENÓRIO, D. P. L. A. et al. CdTe quantum dots conjugated to concanavalin A as potential fluorescent molecular probes for saccharides detection in *Candida albicans*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 142, p. 237–243, 2015.

TONG, S.; ZHU, H.; BAO, G. Magnetic iron oxide nanoparticles for disease detection and therapy. **Materials Today**, v. 31, p. 86–99, 2019.

VAN DAMME, E. J. M. History of plant lectin research. In: HIRABAYASHI, J. **Lectins: methods and protocols, methods in molecular biology**. Nova Iorque: Springer, 2014. Cap. 1, v. 1200, p. 3–13.

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

WALLYN, J.; ANTON, N.; VANDAMME, T. F. Synthesis, principles, and properties of magnetite nanoparticles for *in vivo* imaging applications—A review. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 11, p. 1–29, 2019.

WANG, C. et al. Magnetic quantum dot based lateral flow assay biosensor for multiplex and sensitive detection of protein toxins in food samples. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 146, p. 111754, 2019.

WAGNER, A. M. et al. Quantum dots in biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, v. 94, p. 44–63, 2019.

WANG, C. et al. Magnetic quantum dot based lateral flow assay biosensor for multiplex and sensitive detection of protein toxins in food samples. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 146, p. 111754, 2019.

WARRIER, S.; KHARKAR, P. S. Fluorescent probes for biomedical applications (2009-2014). **Pharmaceutical patent analyst**, v. 3, n. 5, p. 543–560, 2014.

WOLFBEIS, O. S. An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 14, p. 4743–4768, 2015.

XU, J.; ZHENG, J. Quantum dots and nanoclusters. *In*: LI, G. **Nano-inspired biosensors for protein assay with clinical applications**. Amsterdã: Elsevier, 2019. Cap. 3, p. 67–90.

YANG, G. et al. 2-Step lectin-magnetic separation (LMS) strategy combined with AuNPs-based colorimetric system for *S. aureus* detection in blood. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 279, p. 87–94, 2019.

YAO, J. et al. Quantum dots: From fluorescence to chemiluminescence, bioluminescence, electrochemiluminescence, and electrochemistry. **Nanoscale**, v. 9, n. 36, p. 13364–13383, 2017.

ZENG, Q. et al. Purification and characterization of a novel immunomodulatory lectin from *Artocarpus hypargyreus Hance*. **International Immunopharmacology**, v. 71, p. 285–294, 2019.

ZHANG, L. et al. Integration and synergy in protein-nanomaterial hybrids for biosensing: Strategies and in-field detection applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 154, p. 112036, 2020.

ZHANG, M. et al. Quantum dot cellular uptake and toxicity in the developing brain: Implications for use as imaging probes. **Nanoscale Advances**, v. 1, n. 9, p. 3424–3442, 2019.

ZHUANG, M. Y. et al. Using concanavalinA as a spacer for immobilization of *E. coli* onto magnetic nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 63–69, 2017.