



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

PEDRO GAMALIEL SOARES BISPO PAULINO

NANOPLATAFORMA MULTIMODAL ÓPTICO-MAGNÉTICA
BASEADA NA LECTINA LIGADORA DE MANOSE

Recife

2022

PEDRO GAMALIEL SOARES BISPO PAULINO

**NANOPLATAFORMA MULTIMODAL ÓPTICO-MAGNÉTICA
BASEADA NA LECTINA LIGADORA DE MANOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Área de concentração: Bioengenharia

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Adriana Fontes

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Mariana Paola Cabrera

Recife

2022

Catálogo na fonte
Bibliotecário Gabriel Luz CRB-4 / 2022

P328n Paulino, Pedro Gamaliel Soares Bispo.
Nanoplataforma multimodal óptico-magnética baseada na lectina ligadora de manose / Pedro Gamaliel Soares Bispo Paulino. 2022.
60 f: figs., tabs., abrev. e simbols.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Fontes.
Coorientadora: Profa. Dra. Mariana Paola Cabrera.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, Recife, 2022.
Inclui referências.

1. Engenharia biomédica. 2. Carboidratos. 3. *Candida albicans*. 4. Nanopartícula de óxido de ferro. 5. Pontos quânticos. I. Fontes, Adriana (Orientadora). II. Cabrera, Mariana Paola (Coorientadora). III. Título.

UFPE

610.26 CDD (22. ed.)

BCTG / 2022 - 362

PEDRO GAMALIEL SOARES BISPO PAULINO

**NANOPLATAFORMA MULTIMODAL ÓPTICO-MAGNÉTICA
BASEADA NA LECTINA LIGADORA DE MANOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Aprovado em: 16/05/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Adriana Fontes (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Emery Cleiton Cabral Correia Lins (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Carinna Nunes de Lima (Examinadora externa)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me guiado nesse caminho, que foi muito difícil. E é sempre nos momentos mais difíceis que ele se faz mais presente, mesmo quando eu não via.

À minha família, meu mais sincero obrigado. Vocês se mantêm constantes e me apoiando como sempre, mesmo nas vezes que eu não merecia muito. Ao meu amor, agradeço pelo seu amor incondicional.

Aos meus amigos, obrigado por não desistirem de mim por causa dos meus horários invertidos, sei que vocês sofreram um pouco sem mim... mas no final deu tudo certo pra todos.

Aos meus colegas de laboratório, muitíssimo obrigado. Sem vocês esse trabalho não seria possível. Obrigado por me ajudarem todos os dias e entenderem minhas limitações e me ajudarem incansavelmente, todos os dias que eu precisei. E vocês sabem que eu precisei muito.

Aos meus professores, agradeço profundamente pela compreensão e ajuda. Obrigado por me aturarem, me entenderem e perdoarem as minhas falhas por todos estes anos.

Nesse tempo de pandemia, foi muito difícil para o mundo todo. Apesar das dificuldades, estou feliz de ter vivido e sobrevivido ao lado de todos vocês, e queria dizer a todos que juntos estamos fazendo um bom trabalho. Seja apenas sobrevivendo, trabalhando ou estudando, a vida é um presente. E só por existir, por conseguir respirar, somos grandemente abençoados, e é importante sermos grato por isso.

Este trabalho eu dedico a todos vocês, tão presentes em minha vida. Todos vocês me ajudaram de alguma forma, então eu só tenho a agradecer. Sem vocês não seria possível.

RESUMO

Os pontos quânticos (PQs) são nanocristais de semicondutores que possuem propriedades ópticas e físico-químicas únicas, como fluorescência com alta resistência à fotodegradação e superfície altamente ativa para conjugações com (bio)moléculas. Por outro lado, as nanopartículas magnéticas (MNPs) apresentam potencialidades para: (i) separação e detecção de células e (bio)moléculas; (ii) atuação como agentes de contraste para imageamento por ressonância magnética e (iii) aplicação para terapia por hipertermia, dentre outras. Assim, a união de PQs e MNPs, configurando uma única nanopartícula bimodal (BNP) com propriedades óptico-magnéticas, pode permitir novos avanços no campo biomédico, especialmente se combinada a (bio)moléculas. A lectina ligadora de manose (MBL) é uma proteína sérica importante do sistema imune humano que exerce funções na defesa do hospedeiro, participando de processos como: (i) reconhecimento de estruturas próprias do organismo que estão alteradas, (ii) ativação do sistema complemento, sinalizando a presença de patógenos para o organismo, (iii) modulação da inflamação e (iv) depuração de células apoptóticas. A MBL tem a capacidade de reconhecer resíduos de carboidratos que possuem hidroxilas nos carbonos 3 e 4 de hexoses, como a D-manose, *N*-acetil-D-glicosamina e L-fucose presentes nas superfícies celulares, pelo seu domínio de reconhecimento de carboidrato (DRC), na presença de íons Ca^{2+} . Nesse contexto, esta dissertação objetivou preparar uma nanossonda multimodal constituída por PQs de CdTe, MNPs de óxido de ferro e MBL. Para tanto, após as sínteses, os PQs carboxilados foram conjugados de forma covalente a MNPs funcionalizadas por grupos aminas, formando BNPs. Os sistemas bimodais foram então conjugados a uma MBL recombinante (rhMBL) em diferentes concentrações, formando as nanossondas BNPs-rhMBL-50 e BNPs-rhMBL-100. Todos os sistemas foram caracterizados por análise de potencial zeta. Os PQs, as BNPs e as nanossondas multimodais também foram caracterizadas opticamente por espectroscopias de absorção e emissão. Por fim, o potencial para aplicação biológica das BNPs-rhMBL foi avaliado por citometria de fluxo utilizando leveduras de *Candida albicans* como modelo biológico. As análises de potencial zeta indicaram que as MNPs foram eficientemente revestidas com grupos amina e que houve associação de PQs às MNPs, bem como da rhMBL às BNPs. A avaliação óptica confirmou a formação das BNPs. A espectroscopia de absorção indicou que *ca.* 80% dos PQs foram conjugados às MNPs e também foi observado um *redshift* de cerca de 20 nm no máximo de emissão de fluorescência após a conjugação entre as nanopartículas. Frente à marcação celular de *C. albicans* em solução salina enriquecida com Ca^{2+} , as BNPs-rhMBL-100 apresentaram melhor desempenho (*ca.* 86,0% de marcação com

mediana de fluorescência de 14.382,3). Ademais, as BNPs-rhMBL-100 marcaram *ca.* 25,9% das leveduras em salina sem Ca^{2+} e somente *ca.* 0,3% das células em salina suplementada com Ca^{2+} e EDTA (um quelante de Ca^{2+}). Essa diminuição na marcação celular, observada em ambos os ensaios, indicou que o sistema BNPs-rhMBL-100 apresentou especificidade, interagindo com as leveduras pelo DRC. Portanto, conclui-se que foi preparada uma nanossonda multifuncional (BNPs-rhMBL) efetiva e específica que apresenta grande potencial para estudos glicobiológicos.

Palavras-chave: carboidratos; *Candida albicans*; nanopartícula de óxido de ferro; pontos quânticos.

ABSTRACT

Quantum dots (QDs) are semiconductor nanocrystals that have unique optical and physicochemical properties, such as fluorescence with high resistance to photodegradation and a highly active surface for conjugations with (bio)molecules. On the other hand, magnetic nanoparticles (MNPs) have potential for: (i) separation and detection of cells and (bio)molecules; (ii) acting as contrast agents for magnetic resonance imaging, and (iii) application for hyperthermia therapy, among others. Thus, the union of QDs and MNPs, configuring a single bimodal nanoparticle (BNP) with optical-magnetic properties, may allow new advances in the biomedical field, especially if combined with (bio)molecules. Mannose-binding lectin (MBL) is an important serum protein of the human immune system that plays a role in host defense, participating in processes such as: (i) recognition of structures of the organism that are altered, (ii) activation of the complement system, signaling the presence of pathogens to the organism, (iii) modulation of inflammation, and (iv) clearance of apoptotic cells. MBL has the ability to recognize carbohydrate residues that have hydroxyls on carbons 3 and 4 of hexoses, such as D-mannose, *N*-acetyl-D-glucosamine, and L-fucose present on cell surfaces, by its carbohydrate recognition domain (CRD), in the presence of Ca²⁺ ions. In this context, this dissertation aimed to prepare a multimodal nanoprobe consisting of CdTe PQs, iron oxide MNPs, and MBL. Therefore, after the synthesis, carboxylated QDs were covalently conjugated to MNPs functionalized by amine groups, forming BNPs. The bimodal systems were then conjugated to a recombinant MBL (rhMBL) at different concentrations, forming the BNPs-rhMBL-50 and BNPs-rhMBL-100 nanoprobos. All systems were characterized by zeta potential analysis. QDs, BNPs, and multimodal nanoprobos were also optically characterized by absorption and emission spectroscopies. Finally, the potential for biological application of BNPs-rhMBL was evaluated by flow cytometry using *Candida albicans* yeasts as the biological model. Zeta potential analyzes indicated that MNPs were efficiently coated with amine groups and that QDs were associated with MNPs, as well as rhMBL with BNPs. Optical evaluation confirmed the formation of BNPs. The absorption spectroscopy indicated that *ca.* 80% of the QDs were conjugated to the MNPs and a redshift of about 20 nm in the maximum of fluorescence emission was also observed after the conjugation between the nanoparticles. Regarding the cellular labeling of *C. albicans* in saline solution enriched with Ca²⁺, the BNPs-rhMBL-100 showed better performance (*ca.* labeling of 86.0% with median fluorescence of 14,382.3). Furthermore, BNPs-rhMBL-100 labeled *ca.* 25.9% of the yeasts in saline without Ca²⁺ and only *ca.* 0.3% of cells in saline supplemented with Ca²⁺ and EDTA (a Ca²⁺ chelator).

This decrease in cell labeling, observed in both assays, indicated that the BNPs-rhMBL-100 system showed specificity, interacting with yeasts through the DRC. Therefore, an effective and specific multifunctional nanoprobe (BNPs-rhMBL) has been prepared that holds great potential for glycobiological studies.

Keywords: carbohydrates; *Candida albicans*; iron oxide nanoparticle; quantum dots.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Diferenças no E_g para diferentes classes de materiais sólidos..... 23
- Figura 2 -** Esquema da geração da fluorescência em semicondutores. Ao ser excitado por radiação eletromagnética ($h\nu$), o e^- passa da BV para a BC, levando à formação de um éxciton. Após relaxação e recombinação excitônica, é gerada a emissão de fluorescência ($h\nu'$). Onde: h^+ representa a lacuna formada na BV, pela excitação do e^- 23
- Figura 3 -** Sintonização do comprimento de onda de emissão (λ_{em}) dos PQs com seu tamanho. Também é ilustrado o aumento da energia de E_g para nanopartículas (NPs) menores e a discretização dos níveis energéticos..... 24
- Figura 4 -** Combinações possíveis de átomos que podem dar origem aos PQs. Cádmi (Cd), zinco (Zn), selênio (Se), enxofre (S) e telúrio (Te) são frequentemente usados na síntese de PQs. Vermelho – grupos 12-16; amarelo 13-15 e azul 14-16..... 25
- Figura 5 -** A camada de passivação nos PQs de estrutura “*core/shell*” (a) promove aprimoramento da emissão de fluorescência, por intensidade e estreitamento da largura do espectro de emissão à meia altura do máximo (FWHM, do inglês, *full width at half maximum*). Na ausência dessa camada (b), os elétrons interagem com “armadilhas” criadas pelos defeitos de superfície, comprometendo a qualidade da fluorescência. À direita, estão os espectros de absorção (linha cinza) e emissão (linha preta) 26
- Figura 6 -** Representação da estrutura química do ácido mercaptosuccínico (AMS, 1), ácido 3-mercaptopropiônico (AMP, 2), cisteína (3) e cisteamina (4). Em vermelho estão destacados os grupos tiol, cujo átomo de enxofre pode se ligar aos átomos livres do núcleo semiconductor do PQ. Em azul e verde estão destacados os grupos ácidos carboxílicos e aminas, respectivamente, sendo ambos os grupos mais explorados na conjugação dos PQs às (bio)moléculas e NPs..... 27
- Figura 7 -** Esquema de um PQ funcionalizado e conjugado a uma biomolécula para utilização como marcador fluorescente..... 28

- Figura 8 -** Esquema de conjugação covalente entre componentes carboxilados e aminados. O componente carboxilado é ativado por EDC/NHS para formar uma ligação amida com componente aminado. A carbodiimida do EDC reage com os ácidos carboxílicos formando a *o*-aciluréia, que possui curto tempo de meia vida. A hidroxila do NHS interage com o *o*-aciluréia formado anteriormente, formando o NHS éster, que reage com aminas primárias, promovendo a ligação amida e consolidando a conjugação..... **29**
- Figura 9 -** Representação de um EFM para a avaliação da conjugação de um PQ a uma proteína. Pode se observar que após os processos de incubação e lavagem, apenas o poço da placa de poliestireno que reteve o conjugado (terceira coluna, terceira linha) apresentou fluorescência. Isso acontece devido à afinidade da proteína ligada ao PQ pela microplaca de poliestireno. As proteínas não ligadas aos PQs (primeira coluna, terceira linha) têm afinidade à microplaca, mas não emitem fluorescência considerável nas condições avaliadas. Os PQs são removidos na lavagem, pois sozinhos não possuem afinidade pela micropla..... **30**
- Figura 10 -** Representação do comportamento apresentado pelos domínios magnéticos de diferentes materiais magnéticos frente a um **H** – campo magnético externo aplicado..... **31**
- Figura 11 -** Curva de histerese **M–H** de (a) materiais ferro e ferrimagnéticos e (b) de um material superparamagnético. **M** – magnetização da partícula; **H** – campo magnético externo aplicado; **M_s** – magnetização de saturação; **M_r** – magnetização remanescente; **H_c** – campo coercivo..... **33**
- Figura 12 -** Representação esquemática da relação entre a coercividade (campo magnético necessário para remover a magnetização remanescente) e o tamanho das nanopartículas magnéticas. (a) Região de domínios magnéticos (MD) (tamanho de Fe₃O₄ > ca. 80 nm), (b) e (c) região com número de domínios magnéticos em diminuição, (d) região de domínio único (SD) (ca. 20 nm < tamanho de Fe₃O₄ < 80 nm) e (e) região de superparamagnetismo (SP) (tamanho de Fe₃O₄ < ca. 15–20 nm) **33**

Figura 13 -	Representação das principais aplicações biomédicas das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro. (a) Força magnética gerada por um campo magnético externo utilizada na separação de componentes, (b) MNPs podem atuar como agentes de contraste na RMN, influenciando na relaxividade dos prótons da água e (c) aquecimento magnético gerado em um campo magnético alternado para hipertermia.....	35
Figura 14 -	Imagens de microscopia óptica (esquerda) e de fluorescência (direita) das linhagens de <i>S. agalactiae</i> (a) e <i>S. aureus</i> (b), nas quais pode-se verificar regiões de alta fluorescência na marcação da <i>S. agalactiae</i> pelas BNPs-anti-SG e ausência destas áreas para a linhagem <i>S. aureus</i>	37
Figura 15 -	Representação esquemática da estrutura do gene <i>MBL-2</i> , e os diferentes éxons que codificam as diferentes regiões da unidade monomérica da MBL.....	40
Figura 16 -	Representação esquemática das porções estruturais da MBL e formação do seu oligômero funcional.....	41
Figura 17 -	Esquema da preparação das nanopartículas bimodais (BNPs) constituídas por pontos quânticos (PQs) e nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (MNPs).....	45
Figura 18 -	Esquema da preparação das BNPs-rhMBL-50 e BNPs-rhMBL-100. Ambas preparações ocorreram de forma semelhante, sendo a diferença entre elas o volume de rhMBL adicionada às nanopartículas bimodais (BNPs).....	46
Figura 19 -	Espectro de absorção (linha tracejada) e espectro de emissão (linha contínua) dos PQs de CdTe. No espectro de emissão, os nanocristais foram excitados em 488 nm.....	48
Figura 20 -	Espectro de absorção de uma suspensão de PQs (na mesma diluição do sistema bimodal) e dos sobrenadantes das BNPs após um ou dois ciclos de centrifugação posteriores a separação magnética.....	49
Figura 21 -	Fluorescência dos (a) PQs sozinhos, (b) BNPs e c) BNPs-rhMBL-100 sob a luz UV. Na ilustração c), o sistema multimodal também está sendo atraído pelo ímã de neodímio	

	(NdFeB).....	50
Figura 22 -	Espectro da emissão (normalizado) da suspensão mãe de PQs e dos nanossistemas preparados. Pode se observar o efeito <i>red shift</i> em todos os nanossistemas óptico-magnéticos de forma semelhante, quando comparados com a suspensão mãe de PQs de CdTe. No espectro de emissão, os sistemas foram excitados em 488 nm.....	50
Figura 23 -	Histogramas representativos da análise por citometria de fluxo das células de <i>C. albicans</i> incubadas com os nanossistemas BNPs-rhMBL-50 (a) e BNPs-rhMBL-100 (b) em solução salina a 0,9% enriquecida com íons Ca^{2+} a $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. O controle foi ajustado para marcação de 1%.....	52
Figura 24 -	Histogramas representativos da marcação de <i>C. albicans</i> em meio com solução salina 0,9% (a) ou meio enriquecido com íons Ca^{2+} a $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e EDTA a $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (b). O controle foi ajustado para marcação de 1%.....	53

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Resultados da medição do potencial zeta (média e desvio padrão) das MNPs puras, dos MNPs-APTES, BNPs e BNPs-rhMBL-50 e BNPs-rhMBL-100..... **51**
- Tabela 2** - Percentual de marcação celular e mediana de intensidade de fluorescência (MIF) dos nanossistemas BNPs-rhMBL-50 e - BNPs-rhMBL-100 (média e erro padrão). Em ambas as marcações, foi utilizada solução salina 0,9% com íons Ca^{+2} a $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ **52**

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

NH ₂	grupo amina
A	absorbância
a _{exc}	raio de Bohr do éxciton
AMP	ácido 3-mercaptopropiônico
AMS	ácido mercaptosuccínico
APTES	3-aminopropiltriétoxissilano
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BC	banda de condução
BNPs	nanopartículas bimodais
BNPs-rhMBL	nanopartículas bimodais ligadas a MBL recombinante
BNPs-rhMBL-100	nanopartículas bimodais ligadas a MBL recombinante na concentração final de 100 µg·mL ⁻¹
BNPs-rhMBL-50	nanopartículas bimodais ligadas a MBL recombinante na concentração final de 50 µg·mL ⁻¹
BoNT/A	neurotoxina botulínica tipo A
<i>bulk</i>	crystal semiconductor macroscópico
BV	banda de valência
C	concentração molar
<i>ca.</i>	<i>circa</i> – “cerca de” ou aproximadamente
Cd	cádmio
CdCl ₂	cloreto de cádmio
CdS	sulfeto de cádmio
CdTe	telureto de cádmio
CFU·mL ⁻¹	Unidades formadoras de colônia por mililitro
CIS	pontos quânticos formados de cobre, índio e enxofre
CISe	pontos quânticos formados de cobre, índio e selênio
<i>core</i>	núcleo de uma nanopartícula
CZIS	pontos quânticos formados de cobre, zinco, índio e enxofre
d	diâmetro
DRC	domínio de reconhecimento de carboidratos

e^-	elétron
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EFM	ensaio de fluorescência em microplaca
E_g	<i>bandgap</i>
ELISA	ensaio imunabsorvente ligado à enzima
EpCAM	<i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i> - molécula de adesão celular epitelial
Fab	fragmento de ligação ao antígeno
Fe^{2+}	íon ferroso ou ferro II
Fe^{3+}	íon férrico ou ferro III
Fe_3O_4	magnetita
$FeCl_2$	cloreto ferroso ou cloreto de ferro II
$FeCl_3$	cloreto férrico ou cloreto de ferro III
FWHM	<i>Full Width at Half Maximum</i> - largura do espectro de emissão à meia altura do máximo
H	campo magnético externo aplicado
h^+	lacunas da banda de valência
H_c	campo coercitivo
hCC49	anticorpo monoclonal humanizado - CC49
HCl	ácido clorídrico
InP	fosfeto de índio
IRM	imageamento por ressonância magnética
kDa	quilodaltons
M	magnetização induzida no material
MBL	<i>mannose binding lectin</i> - lectina ligadora de manose
MD	<i>magnetic domains</i> - domínios magnéticos
MIF	mediana de intensidade de fluorescência
MNPs	<i>magnetic nanoparticles</i> - nanopartículas magnéticas
mol·L ⁻¹	mols por litro
MPa	megaPascal
M_r	magnetização remanescente

Ms	magnetização de saturação
NaBH₄	borohidreto de sódio
NdFeB	neodímio-ferro-boro
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
NP	nanopartícula
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Molecule Patterns</i> – padrões moleculares associados à patógenos
PbSe	seleneto de chumbo
PEG	polietilenoglicol
pH	potencial hidrogeniônico
PLGA	poli ácido láctico-co-ácido glicólico
PQ	ponto quântico
PSA	<i>Prostatic Specific Antigen</i> – antígeno prostático humano
PSA-C	antígeno prostático humano na forma complexada
PSA-L	antígeno prostático humano na forma livre
QD	<i>quantum dot</i>
rhMBL	lectina ligadora de manose humana recombinante
RMN	ressonância magnética nuclear
SG	<i>Streptococcus agalactiae</i>
SC	sistema complemento
SD	<i>single domain</i> – domínio magnético único
SEB	enterotoxina estafilocócica B
<i>shell</i>	casca de uma nanopartícula
SP	superparamagnetismo
sulfo-NHS	<i>N</i> -hidroxissulfosuccinimida
T₁	tempo de relaxação longitudinal
T₂	tempo de relaxação transversal
TA	temperatura ambiente
Te⁰	telúrio metálico
UV	ultravioleta
ZAIS	pontos quânticos formados de zinco, prata, índio e enxofre
ZAISe	pontos quânticos formados de zinco, prata, índio e selênio

ZnS	seleneto de zinco
ZnSe	seleneto de zínco
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	maghemita
ε	coeficiente de extinção molar
ζ	potencial zeta
λ	comprimento de onda
λ_{em}	comprimento de onda de emissão
μ	momento magnético resultante

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	Geral.....	21
2.2	Específicos	21
3	REFERENCIAL TEÓRICO	22
3.1	Pontos Quânticos.....	22
3.2	Métodos de Conjugação a Pontos Quânticos	28
3.3	Nanopartículas Magnéticas	31
3.4	Sistemas Multimodais Baseados em Nanopartículas de Óxido de Ferro e Pontos Quânticos e suas Aplicações Biológicas	36
3.5	Lectina Ligadora de Manose.....	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1	Síntese e Caracterização Óptica dos PQs.....	43
4.2	Síntese e Funcionalização das MNPs.....	44
4.3	Preparação e Caracterização Físico-Química das BNPs.....	44
4.4	Preparação e Caracterização Físico-Química das BNPs-rhMBL.....	45
4.5	Cultura Celular e Marcação de <i>C. albicans</i>	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	Caracterização Óptica dos PQs	48
5.2	Caracterização Óptica das BNPs e BNPs-rhMBL	48
5.4	Análise do Potencial Zeta (ζ)	51
5.5	Marcação de <i>C. albicans</i>	52
6	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

De uma forma geral, a bioengenharia vem contribuindo para a melhoria da qualidade de vida através do desenvolvimento de novas tecnologias para diagnóstico, terapia e compreensão biológica, ajudando assim a reduzir a incidência de doenças que no passado eram responsáveis por elevados índices de mortalidade (GANAU et al., 2018). A união de compostos que apresentam diferentes propriedades, como ópticas e magnéticas, em regime de nanoescala, pode permitir novos avanços com o desenvolvimento de nanoplataformas multifuncionais para aplicações biológicas, tanto com relação à análise celular como biossensoriamento. Nesse contexto, podemos destacar a associação de pontos quânticos com nanopartículas de óxido de ferro (CABRAL FILHO et al., 2018).

Os pontos quânticos (PQs), ou *quantum dots*, são nanocristais de semicondutores, com tamanhos entre 2 – 10 nm. Essas nanoestruturas têm atraído o interesse da Nanomedicina como uma nova classe de sonda fluorescente para aplicações biológicas *in vitro* com células, *in vivo* em pequenos animais, bem como em sensores ópticos e óptico-eletróquímicos (CABRAL FILHO et al., 2016; PEREIRA et al., 2016). Isso se deve às propriedades ópticas e físico-químicas únicas apresentadas pelos PQs, como: (i) excelente resistência à fotodegradação; (ii) emissão de luz sintonizável com o tamanho, permitindo que um PQ de um mesmo material poderá emitir em diferentes regiões do espectro eletromagnético (do ultravioleta próximo ao infravermelho, por exemplo); (iii) estreito espectro de emissão, que permite múltiplas marcações simultâneas e (iv) superfície ativa que viabiliza múltiplas e variadas conjugações a (bio)moléculas ou até mesmo a outras nanopartículas (PEREIRA et al., 2016).

Por outro lado, as nanopartículas magnéticas – MNPs, do inglês, *magnetic nanoparticles* (tais como magnetita – Fe_3O_4 ou maghemita – $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) também vêm sendo amplamente empregadas na nanomedicina, devido as suas notáveis propriedades, tais como o superparamagnetismo e versatilidade para receber diferentes revestimentos em sua superfície. As principais aplicações das MNPs incluem: (i) separação e detecção de células e biomoléculas; (ii) atuação como agentes de contraste para imageamento por ressonância magnética (IRM); (iii) utilização em biossensoriamento; (iv) sistemas de entrega de drogas, e (v) aplicação para terapia por hipertermia magnética (ARIAS et al., 2018).

Essas nanopartículas bimodais (BNPs) óptico-magnéticas constituída por PQs e MNPs apresentam versatilidade e aplicabilidade ainda maior quando exibem especificidade biológica, a qual pode ser conferida conjugando-as a (bio)moléculas, como por exemplo, um

peptídeo (CHANG et al., 2019), anticorpo (RONG et al., 2019) ou lectina (CHOWDHURY et al., 2018).

Lectinas são proteínas que têm a capacidade de se ligar reversivelmente a carboidratos (CARVALHO et al., 2019). A lectina ligadora de manose (*mannose binding lectin* – MBL) é uma glicoproteína sérica, componente do sistema imune inato, que desempenha um papel importante na defesa do hospedeiro, participando de processos como: (i) reconhecimento de patógenos e estruturas próprias do organismo que estão alteradas, (ii) ativação do sistema complemento (SC), (iii) opsonização, (iv) modulação da inflamação e (v) depuração de células apoptóticas (DOMMETT; KLEIN; TURNER, 2006; DOULAMI et al., 2021). A MBL pertence à classe das colectinas e tem a capacidade de se ligar a arranjos de glicoproteínas contendo carboidratos que possuem hidroxilas nos carbonos 3 e 4 de hexoses – tais como D-manose, L-fucose e *N*-acetilglucosamina – presentes na superfície de microorganismos, como a *Candida albicans*, bem como em células hospedeiras apoptóticas ou tumorais. Essa interação usualmente ocorre pelo seu domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC) (VELDHUIZEN; VAN EIJK; HAAGSMAN, 2011). Seu significado clínico tem sido estudado em vários tipos de doenças, tais como infecciosas e cânceres, dentre outras (DOULAMI et al., 2021). Portanto, esta capacidade de reconhecimento biológico torna esta proteína uma potencial candidata no desenvolvimento de nanoplataformas multimodais para aplicação em estudos envolvendo glicobiologia.

Assim, nesta dissertação apresentaremos as etapas do desenvolvimento de um nanossistema multimodal constituído por PQs, MNPs de óxido de ferro e MBL. Com o desenvolvimento dessa nanoplataforma espera-se poder realizar estudos posteriores usufruindo simultaneamente: (i) do comportamento magnético das MNPs para biosseparação e IRM, (ii) da superfície ativa para conjugação, excelente resistência à fotodegradação, e intensa/sintonizável fluorescência dos PQs e (iii) do potencial biológico da MBL.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver uma nanoplataforma multifuncional, com propriedades ópticas e magnéticas, constituída por PQs, MNPs e MBL para aplicações biológicas.

2.2 Específicos

- Sintetizar e caracterizar opticamente PQs carboxilados hidrofílicos;
- Sintetizar MNPs de óxido de ferro em meio aquoso e modificar sua superfície para conter grupos $-NH_2$ (amina);
- Conjuguar os PQs às MNPs, via ligação covalente, para a preparação de nanopartículas bimodais (BNPs) e realizar sua caracterização físico-química;
- Preparar a nanoplataforma multimodal, pela associação da MBL com as BNPs, e caracterizá-la físico-quimicamente;
- Avaliar a efetividade e especificidade do sistema multimodal para aplicação biológica utilizando leveduras de *C. albicans* como modelo biológico.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

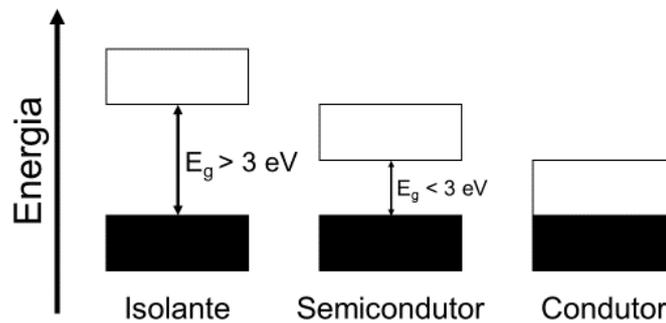
3.1 Pontos Quânticos

A nanotecnologia busca compreender e explorar as propriedades de materiais em dimensões reduzidas à escala nanométrica ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$), visando usufruir de propriedades adquiridas pela transposição de materiais macrométricos para esta escala (RENGERS; GAPONIK; EYCHMÜLLER, 2019). Os denominados “nanomateriais”, dispõem de aplicações em campos muito distintos, como a construção de células fotovoltaicas, monitoramento do metabolismo e processos bioquímicos celulares ou sistema de liberação controlada de fármacos (KUMAR; SINHA RAY, 2018). Dentro desta perspectiva, surgiram os PQs, ou *quantum dots* (QDs), que são nanocristais de semicondutores formados por centenas ou milhares de átomos em confinamento quântico com diâmetros típicos de 2 a 10 nm que apresentam fluorescência (KRISHNA et al., 2018; MARTINS; TRINDADE, 2012; PEREIRA et al., 2016; SMITH; GAO; NIE, 2004).

Os materiais sólidos, em termos energéticos, possuem uma banda de valência (BV), de menor energia, e uma banda de condução (BC), de maior energia. Essas bandas são separadas por uma região que não pode ser ocupada por elétrons (e^-), o *bandgap* (E_g). Para os e^- passarem da BV para a BC, é necessária uma mínima quantidade de energia igual ao E_g , normalmente expressa em eV (elétron-Volt) (SMITH; GAO; NIE, 2004). O E_g é utilizado para classificar os sólidos em relação a sua condutividade elétrica: caso o E_g de um sólido seja de energia superior a cerca de 3,0 eV, ele é considerado isolante, pois a alta energia de excitação dificulta a passagem dos e^- da BV à BC (Figura 1). Nos materiais condutores os e^- transitam com facilidade entre as bandas, devido à continuidade entre elas. Já os semicondutores apresentam um E_g considerado intermediário, sendo possível a utilização de radiação eletromagnética na região do UV-Vis e a temperatura ambiente para excitar os e^- da BV à BC (RENGERS; GAPONIK; EYCHMÜLLER, 2019; SMITH; GAO; NIE, 2004).

Nos semicondutores, após a passagem de elétrons da BV para a BC, são criadas lacunas (h^+) na BV. As lacunas formadas possuem cargas positivas, e os e^- são atraídos eletrostaticamente por elas, formando os “éxcitons”. O par elétron-lacuna é separado por uma distância chamada raio de Bohr do éxciton (a_{exc}), que é específica de cada material semicondutor. Quando os e^- excitados retornam à BV há emissão de fótons, num processo chamado de recombinação excitônica (Figura 2) (MICHALET; BENTOLILA; WEISS, 2008; SMITH; GAO; NIE, 2004).

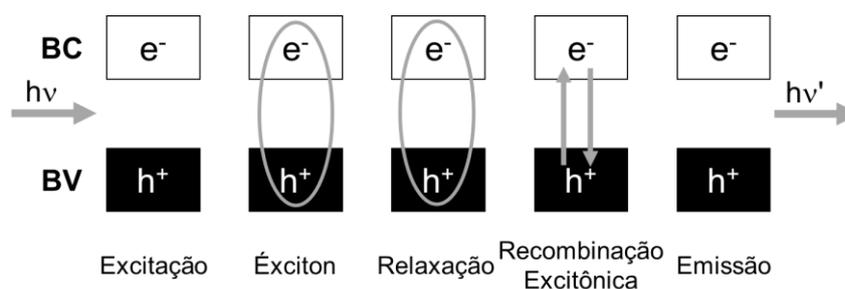
Figura 1 - Diferenças no E_g para diferentes classes de materiais sólidos



Fonte: Adaptada de RENGERS et al. (2019).

Num cristal semiconductor macroscópico (*bulk*), os e^- estão distribuídos em níveis energéticos contínuos, chamados de bandas. Isto não acontece quando as dimensões (x , y e z) de um nanocristal são menores que o a_{exc} de seu material semiconductor constituinte. O efeito causado por esse confinamento quântico leva a uma mudança na distribuição dos estados energéticos, formando níveis discretos de energia semelhante ao de um átomo, e por isto os PQs também são chamados de átomos artificiais (BRUS, 1984; MICHALET; BENTOLILA; WEISS, 2008).

Figura 2 - Esquema da geração da fluorescência em semicondutores. Ao ser excitado por radiação eletromagnética ($h\nu$), o e^- passa da BV para a BC, levando à formação de um éxciton. Após relaxação e recombinação excitônica, é gerada a emissão de fluorescência ($h\nu'$). Onde: h^+ representa a lacuna formada na BV, pela excitação do e^-

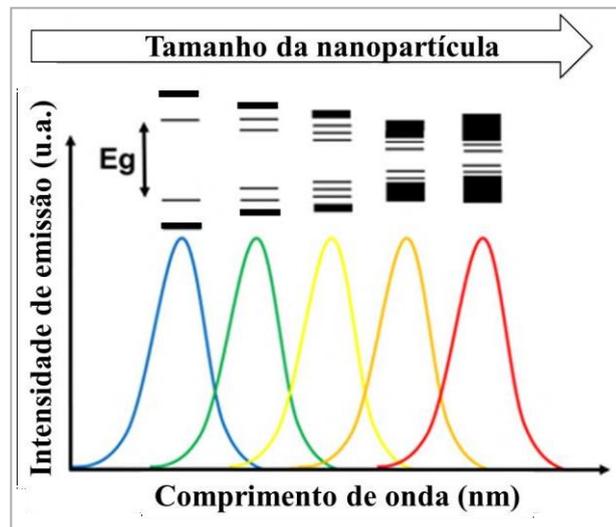


Fonte: Adaptada de PEREIRA (2014).

Adicionalmente, quanto menor for o diâmetro (d) do nanocristal, maior é a E_g , o que também leva a uma emissão com radiação eletromagnética de maior energia. Visto que o comprimento de onda (λ) da luz é inversamente proporcional a sua energia, a Figura 3 mostra que PQs com menor diâmetro terão λ de emissão (λ_{em}) mais próximo da região do azul, e PQs

maiores terão λ_{em} mais próximo da região do infravermelho (SANTOS; FARIAS; FONTES, 2008; SMITH; GAO; NIE, 2004).

Figura 3 - Sintonização do comprimento de onda de emissão (λ_{em}) dos PQs com seu tamanho. Também é ilustrado o aumento da energia de E_g para nanopartículas (NPs) menores e a discretização dos níveis energéticos



Fonte: Adaptada de CESAR (2014).

Os PQs podem ser sintetizados a partir de elementos semicondutores dos grupos 12-16, 13-15 e 14-16 da Tabela Periódica (Figura 4). Exemplos de nanocristais binários são o telureto de cádmio (CdTe) e o seleneto de zinco (ZnSe), pertencentes ao grupo 12-16, o fosfeto de índio (InP) do grupo 13-15 e o seleneto de chumbo (PbSe) do grupo 14-16. Atualmente, PQs com composição ternária e quaternária têm sido preparados, muitos deles baseados em cobre (Cu), índio (In) e prata (Ag). Exemplos destes PQs são Cu-In-S (CIS), Cu-In-Se (CISe), Cu-Zn-In-S (CZIS), Zn-Ag-In-S (ZAIS) e Zn-Ag-In-Se (ZAISe) (PEREIRA et al., 2019). Ultimamente, duas metodologias principais de síntese destes nanocristais são empregadas: (i) *top down*, que envolve técnicas de erosão controlada de materiais em *bulk* para a nanoescala, como a epitaxia de feixe molecular e litografia por feixe de elétrons, ou (ii) *bottom up*, na qual os materiais precursores se agrupam em solução, formando suspensões coloidais de PQs. Geralmente, os PQs para aplicações biológicas são sintetizados pelo método *bottom up* e em meio aquoso (WAGNER et al., 2019).

Figura 4 - Combinações possíveis de átomos que podem dar origem aos PQs. Cádmio (Cd), zinco (Zn), selênio (Se), enxofre (S) e telúrio (Te) são frequentemente usados na síntese de PQs. Vermelho – grupos 12-16; amarelo – grupos 13-15; e azul – grupos 14-16

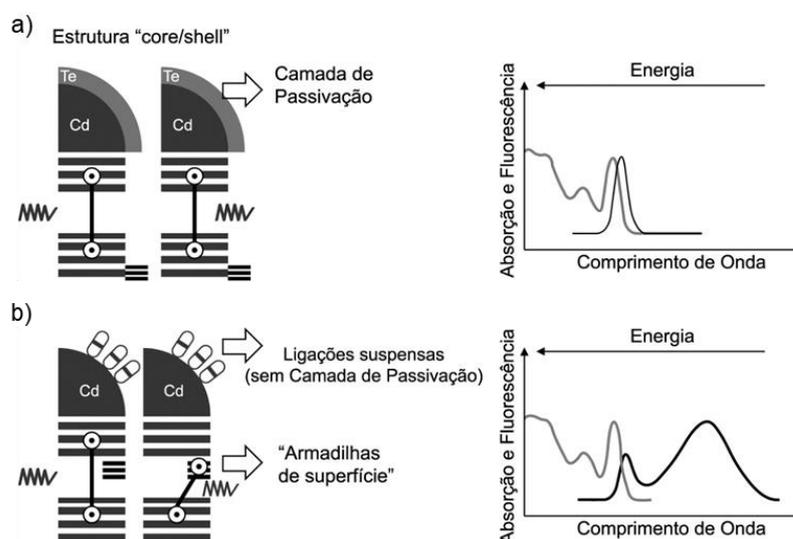
TABELA PERIÓDICA DOS ELEMENTOS

TABELA PERIÓDICA DOS ELEMENTOS																													
1 H hydrogen 1.00794																	2 He helium 4.0026												
3 Li lithium 6.941	4 Be beryllium 9.0122											13 B boron 10.806	14 C carbon 12.011	15 N nitrogen 14.007	16 O oxygen 15.999	17 F fluorine 18.998	18 Ne neon 20.180												
11 Na sodium 22.990	12 Mg magnesium 24.305											19 K potassium 39.098	20 Ca calcium 40.078	21 Sc scandium 44.956	22 Ti titanium 47.867	23 V vanadium 50.942	24 Cr chromium 51.996	25 Mn manganese 54.938	26 Fe iron 55.845	27 Co cobalt 58.933	28 Ni nickel 58.693	29 Cu copper 63.546	30 Zn zinc 65.38	31 Ga gallium 69.723	32 Ge germanium 72.630	33 As arsenic 74.922	34 Se selenium 78.971	35 Br bromine 79.904	36 Kr krypton 83.798
37 Rb rubidium 85.468	38 Sr strontium 87.62	39 Y yttrium 88.906	40 Zr zirconium 91.224	41 Nb niobium 92.906	42 Mo molybdenum 95.94	43 Tc technetium	44 Ru ruthenium 101.07	45 Rh rhodium 102.91	46 Pd palladium 106.42	47 Ag silver 107.87	48 Cd cadmium 112.41	49 In indium 114.82	50 Sn tin 118.71	51 Sb antimony 121.76	52 Te tellurium 127.60	53 I iodine 126.90	54 Xe xenon 131.29												
55 Cs caesium 132.91	56 Ba barium 137.33	57-71 lanthanoids	72 Hf hafnium 178.49	73 Ta tantalum 180.95	74 W tungsten 183.84	75 Re rhenium 186.21	76 Os osmium 190.23	77 Ir iridium 192.22	78 Pt platinum 195.08	79 Au gold 196.97	80 Hg mercury 200.59	81 Tl thallium 204.38	82 Pb lead 207.2	83 Bi bismuth 208.98	84 Po polonium	85 At astatine	86 Rn radon												
87 Fr francium	88 Ra radium	89-103 actinoids	104 Rf rutherfordium	105 Db dubnium	106 Sg seaborgium	107 Bh bohrium	108 Hs hassium	109 Mt meitnerium	110 Ds darmstadtium	111 Rg roentgenium	112 Cn copernicium	113 Nh nihonium	114 Fl flerovium	115 Mc moscovium	116 Lv livermorium	117 Ts tennessine	118 Og oganesson												
57 La lanthanum 138.91	58 Ce cerium 140.12	59 Pr praseodymium 140.91	60 Nd neodymium 144.24	61 Pm promethium	62 Sm samarium 150.36	63 Eu europium 151.96	64 Gd gadolinium 157.25	65 Tb terbium 158.93	66 Dy dysprosium 162.50	67 Ho holmium 164.93	68 Er erbium 167.26	69 Tm thulium 168.93	70 Yb ytterbium 173.05	71 Lu lutetium 174.97															
89 Ac actinium 227.03	90 Th thorium 232.04	91 Pa protactinium 231.04	92 U uranium 238.03	93 Np neptunium	94 Pu plutonium	95 Am americium	96 Cm curium	97 Bk berkelium	98 Cf californium	99 Es einsteinium	100 Fm fermium	101 Md mendelevium	102 No nobelium	103 Lr lawrencium															

Fonte: Adaptada de LEITE (2019).

Com a diminuição do tamanho dos cristais, as ligações não compartilhadas causadas pela interrupção do crescimento do nanocristal podem causar efeitos significativos nas propriedades ópticas, pois geram níveis de energia intermediários (armadilhas) entre a BV e a BC, o que diminui a intensidade de emissão e, conseqüentemente, o rendimento quântico do nanossistema (Figura 5b). Para garantir que os PQs tenham uma intensa fluorescência, é crescido ao redor do núcleo (*core*) uma casca (*shell*), chamada de camada de passivação, que é em geral constituída de outro semicondutor de maior E_g (Figura 5a). Este processo pode ser realizado durante a síntese dos PQs, com a adição de precursores que contenham átomos aptos a se ligar aos átomos não compartilhados presentes na superfície do nanocristal. O próprio agente estabilizante do sistema pode ser utilizado para compor uma fina e eficiente camada de passivação, por exemplo de CdS para os PQs de CdTe, se o agente estabilizante for tiolado, pois o enxofre se ligará aos átomos de Cd livres presentes na superfície do nanocristal (CESAR, 2014; LEITE, 2019; MARTINS; TRINDADE, 2012; SILVA et al., 2010).

Figura 5 - A camada de passivação nos PQs de estrutura “*core/shell*” (a) promove aprimoramento da emissão de fluorescência, por intensidade e estreitamento da largura do espectro de emissão à meia altura do máximo (FWHM, do inglês, *full width at half maximum*). Na ausência dessa camada (b), os elétrons interagem com “armadilhas” criadas pelos defeitos de superfície, comprometendo a qualidade da fluorescência. À direita, estão os espectros de absorção (linha cinza) e emissão (linha preta)

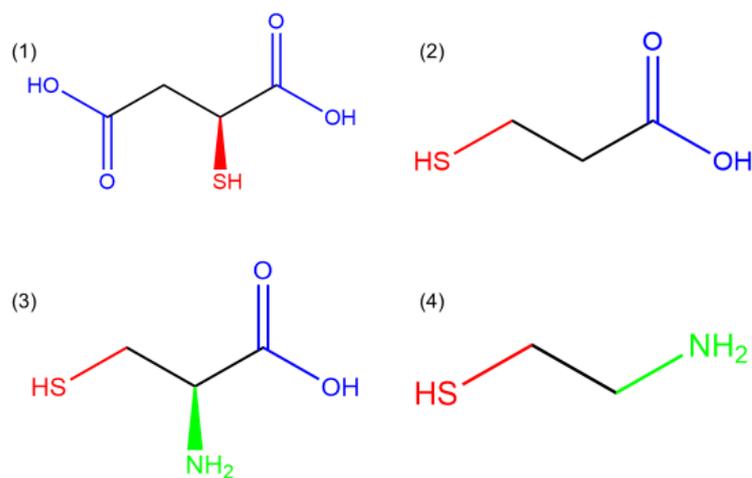


Fonte: Adaptada de MARTINS; TRINDADE (2012).

A literatura aponta o uso de ácido mercaptosuccínico (AMS), ácido 3-mercaptopropiônico (AMP), cisteína e cisteamina como os agentes estabilizantes que contribuem para a passivação (Figura 6). Os agentes estabilizantes podem propiciar cargas positivas ou negativas à superfície da NP, consequentemente contribuindo também para a estabilidade coloidal do nanossistema. Além disso, a conjugação com (bio)moléculas torna-se também possível pela presença de grupos funcionais presentes nos agentes estabilizantes. Aqueles que contêm grupos amina conferem carga positiva em pH próximo ao fisiológico e os que contêm grupos carboxílicos conferem carga negativa. Este método de síntese resulta na formação de uma estrutura nanocristalina semicondutora coberta por uma fina camada de passivação (CESAR, 2014; SILVA et al., 2010; WAGNER et al., 2019).

As características ópticas apresentadas pelos semicondutores ao serem manipulados na escala nanométrica possibilitam o uso de PQs como nanossondas fluorescentes versáteis no campo das ciências da vida, sendo principalmente utilizados para: (i) na detecção de analitos para diagnóstico molecular; (ii) bioensaios com células e tecidos; (iii) imageamento *in vivo*, com PQs que emitem fluorescência na região do infravermelho-próximo e (iv) terapia fotodinâmica, como agente fotossensibilizador (WAGNER et al., 2019).

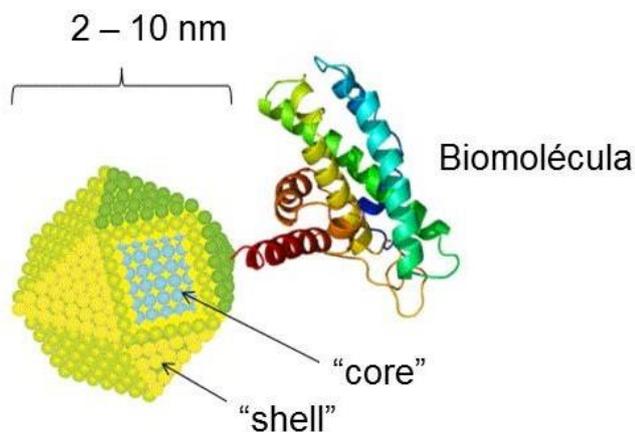
Figura 6 - Representação da estrutura química do ácido mercaptosuccínico (AMS, 1), ácido 3-mercaptopropiônico (AMP, 2), cisteína (3) e cisteamina (4). Em vermelho estão destacados os grupos tiol, cujo átomo de enxofre pode se ligar aos átomos livres do núcleo semiconductor do PQ. Em azul e verde estão destacados os grupos ácidos carboxílicos e aminas, respectivamente, sendo ambos os grupos mais explorados na conjugação dos PQs às (bio)moléculas e NPs



Fonte: O autor (2022).

Os PQs, quando usados como nanossondas fluorescentes no diagnóstico molecular, apresentam vantagens importantes quando comparados a marcadores fluorescentes orgânicos, como: (i) largo espectro de absorção, permitindo a excitação de uma amostra com apenas uma fonte de luz e espectro de emissão estreito, simétrico e sintonizável com o tamanho da NP permitindo múltiplas marcações simultâneas; (ii) alto rendimento quântico e (iii) resistência à fotodegradação superior aos corantes orgânicos convencionais, permitindo o monitoramento de eventos por tempos prolongados; (iv) possuem superfície quimicamente ativa, possibilitando a sua conjugação às (bio)moléculas (Figura 7), como aminoácidos, proteínas, vitaminas e fármacos e, conseqüentemente um direcionamento biológico específico ao PQ, bem como para sua associação com outras NPs (ESTEVE-TURRILLAS; ABAD-FUENTES, 2013; KAIRDOLF et al., 2013; WAGNER et al., 2019).

Figura 7 - Esquema de um PQ funcionalizado e conjugado a uma biomolécula para utilização como marcador fluorescente



Fonte: Adaptada de PEREIRA et al. (2016).

3.2 - Métodos de Conjugação a Pontos Quânticos

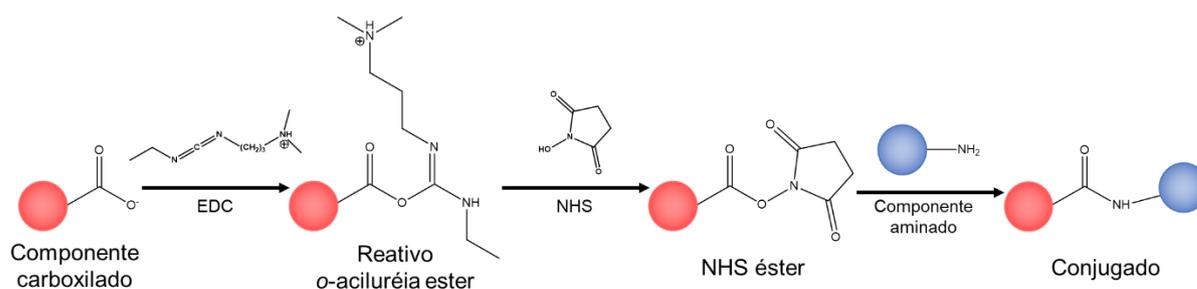
O processo de conjugação compreende a ligação de PQs com (bio)moléculas, outras NPs e até mesmo superfícies de eletrodos. Um dos principais fatores que determinam a estratégia de conjugação é a natureza química dos ligantes, e como este processo pode comprometer tanto a qualidade da fluorescência dos nanocristais, bem como a atividade dos componentes a serem conjugados, é importante escolher o método de conjugação mais apropriado para preservar tais qualidades. No geral, duas categorias de conjugação têm sido as mais utilizadas: covalente e não covalente (PEREIRA et al., 2019).

A conjugação não-covalente pode ser realizada pela ligação direta de uma (bio)molécula, por exemplo, à superfície dos PQs, por adsorção física ou química ou pela interação específica da avidina (ou estreptavidina) com a biotina, o seu ligante. Na adsorção, as interações envolvidas podem ser tanto as eletrostáticas ou envolver momento de dipolo entre os grupos funcionais, como também pode ocorrer pela interação de grupos apolares das espécies envolvidas na ligação (PEREIRA et al., 2019). Muitos compostos podem ser biotinizados, e se ligarem com PQs funcionalizados com estreptavidina, que estão disponíveis comercialmente. As ligações diretas podem acontecer na forma de ligações dativas, como as mediadas por grupos funcionais tiolados, ou pela coordenação por interação com metais, que é o caso da interação entre os grupos imidazólicos do aminoácido histidina com os metais catiônicos presentes na superfície dos PQs (PETRYAYEVA; ALGAR; MEDINTZ, 2013).

Já as técnicas de conjugação covalente envolvem agentes de acoplamento para ligar os PQs às (bio)moléculas ou NPs. Estes compostos podem ser categorizados em: reticuladores de

comprimento zero, homobifuncionais e heterobifuncionais. Os reticuladores de comprimento zero ligam grupos químicos diferentes sem adicionar átomos entre os compostos (PEREIRA et al., 2019; WANG et al., 2012). Já os reticuladores homo e heterobifuncionais fornecem um braço espaçador entre os sítios de ligação. Carbodiimidas são reticuladores de comprimento zero, e a 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), quando associada com a *N*-hidroxisuccinimida (NHS) ou *N*-hidroxissulfosuccinimida (sulfo-NHS), possibilitam a ligação entre um grupo amina e um grupo carboxílico (Figura 8), sendo utilizadas amplamente na literatura para unir PQs hidrofílicos a proteínas e outras NPs (CABRERA et al., 2017; PEREIRA et al., 2019; RIBEIRO et al., 2019).

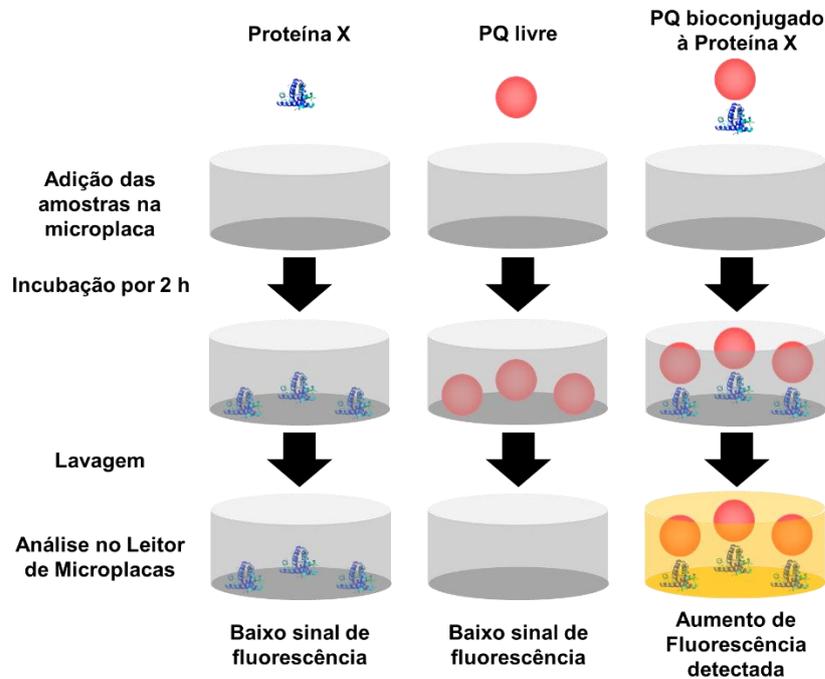
Figura 8 - Esquema de conjugação covalente entre componentes carboxilados e aminados. O componente carboxilado é ativado por EDC/NHS para formar uma ligação amida com componente aminado. A carbodiimida do EDC reage com os ácidos carboxílicos formando a *o*-aciluréia, que possui curto tempo de meia vida. A hidroxila do NHS interage com o *o*-aciluréia formado anteriormente, formando o NHS éster, que reage com aminas primárias, promovendo a ligação amida e consolidando a conjugação



Fonte: Adaptada de WANG et al. (2012).

Também é importante realizar estudos de avaliação do conjugado formado, para aperfeiçoar o processo e possibilitar a aplicação dos PQs nas diversas áreas do conhecimento. As técnicas de avaliação do conjugado formado dependem das características químicas e físicas apresentadas pela (bio)molécula ou outra NP ligada ao PQ. Para a avaliação da conjugação de algumas proteínas aos PQs, o ensaio de fluorescência em microplaca (EFM) pode ser utilizado, pois a afinidade dos poços de uma microplaca de poliestireno por essas proteínas conjugadas ao PQ imobiliza o conjugado na microplaca, e quanto maior o sinal de fluorescência detectado pelo equipamento em relação aos controles, melhor a conjugação (Figura 9). Os controles são os PQs sozinhos, que são removidos na lavagem por não terem afinidade com o poço, e as biomoléculas que possuem afinidade, mas não apresentam fluorescência significativa nas condições avaliadas (CARVALHO et al., 2014).

Figura 9 - Representação de um EFM para a avaliação da conjugação de um PQ a uma proteína. Pode se observar que após os processos de incubação e lavagem, apenas o poço da placa de poliestireno que reteve o conjugado (terceira coluna, terceira linha) apresentou fluorescência. Isso acontece devido à afinidade da proteína ligada ao PQ pela microplaca de poliestireno. As proteínas não ligadas aos PQs (primeira coluna, terceira linha) têm afinidade à microplaca, mas não emitem fluorescência considerável nas condições avaliadas. Os PQs são removidos na lavagem, pois sozinhos não possuem afinidade pela microplaca



Fonte: o autor (2022).

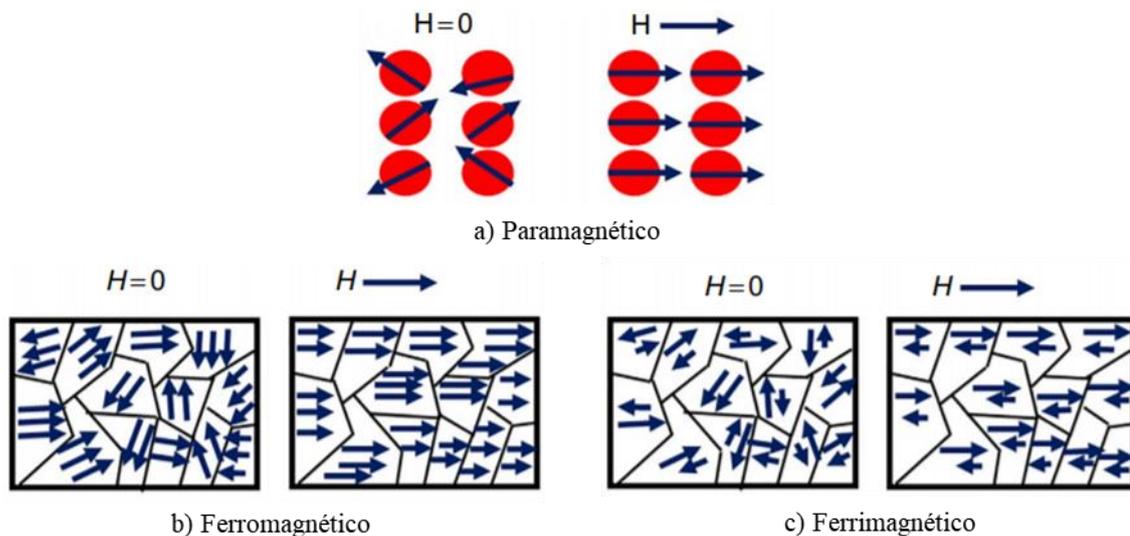
Técnicas bastante empregadas para inferir sobre a eficiência de conjugação são também as que avaliam alterações da carga superficial (potencial zeta), do raio hidrodinâmico (DLS – espalhamento dinâmico da luz e FCS - espectroscopia de correlação de fluorescência) e técnicas de separação por eletroforese. Após a conjugação, é importante também verificar se houve alguma alteração nas características ópticas dos nanocristais, que podem ser detectadas por espectroscopia de absorção e emissão (PEREIRA et al., 2019).

Além das técnicas que analisam a conjugação de forma mais direta, vale salientar a importância dos ensaios que avaliam a interação do nanossistema com os componentes biológicos a fim de evitar falsos negativos e falsos positivos das marcações fluorescentes. Essas análises incluem, por exemplo, ensaios de saturação envolvendo o sistema biológico e inibição do conjugado, dentre outros, que podem ser monitorados, por exemplo, por microscopia de fluorescência e/ou citometria de fluxo (PEREIRA et al., 2019).

3.3 - Nanopartículas Magnéticas

Os materiais podem ser classificados quanto a suas propriedades magnéticas em: diamagnéticos, quando o momento magnético resultante (μ) é igual a zero ou magnéticos, quando o μ é diferente de zero. Esta propriedade pode também ser influenciada pela temperatura em que o material se encontra (FRANCISQUINI; SCHOENMAKER; SOUZA, 2014; SINNECKER, 2000).

Figura 10 - Representação do comportamento apresentado pelos domínios magnéticos de diferentes materiais magnéticos frente a um \mathbf{H} – campo magnético externo aplicado



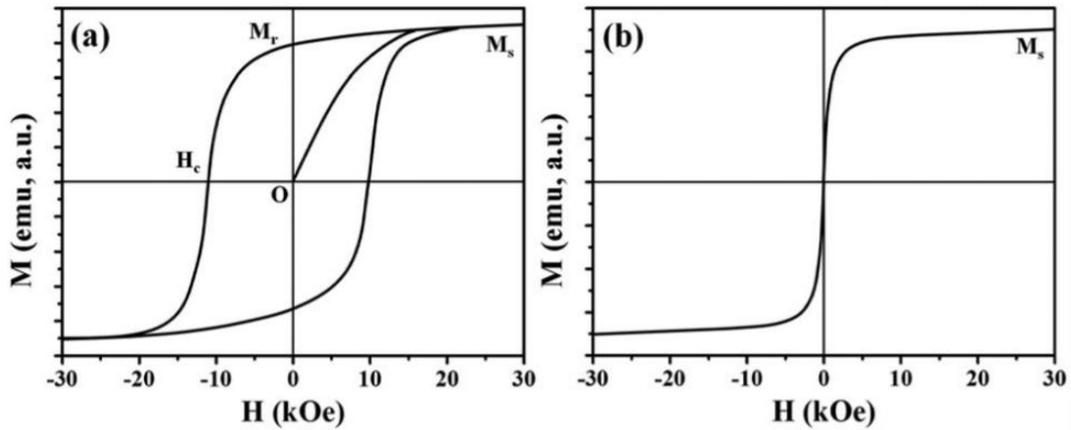
Fonte: Adaptado de MONTAZER; HARIFI (2018).

Entre os materiais magnéticos, existem subclassificações relacionadas ao seu comportamento frente a um campo magnético externo. Neste contexto, os materiais cujo momento magnético se alinha paralelamente ao campo magnético externo de maneira fraca são chamados de paramagnéticos (Figura 10a). Exemplos de materiais com esta característica são: alumínio, titânio e ligas de cobre. Quando há um forte alinhamento paralelo do momento magnético frente a um campo magnético externo, os materiais são classificados de ferromagnéticos (Figura 10b). Possuem essa característica o ferro, níquel e cobalto. No entanto, quando em um material existem momentos magnéticos alinhados, paralela e antiparalelamente a um campo magnético externo, mas ainda assim há uma intensa resultante paralela e alinhada ao campo magnético externo, o material é classificado como ferrimagnético (Figura 10c). A magnetita (Fe_3O_4), por exemplo, apresenta comportamento ferrimagnético em temperatura ambiente (IDA, 2021; MONTAZER; HARIFI, 2018; SECHOVSKÝ, 2001).

Os materiais ferro e ferrimagnéticos, quando em escala macrométrica (ou seja, *bulk*), possuem muitos domínios magnéticos. Estes, são regiões microscópicas dentro destes materiais, onde os átomos em conjunto produzem um μ . A presença de multidomínios magnéticos influencia a resposta destes materiais frente à magnetização (DONG et al., 2018). Nos materiais ferro e ferrimagnéticos é observado um μ após retirar o campo magnético externo, fenômeno chamado de magnetização espontânea. Isso resulta em um perfil de histerese em um gráfico que relaciona a resposta da magnetização induzida no material (M) em função do campo magnético externo aplicado (H). Com a aplicação de um H , os vários domínios do material começam a se alinhar a ele e, quando completamente alinhados, atingem a magnetização máxima chamada da magnetização de saturação (M_s). Quando o H é reduzido a zero, o material ainda retém um grau considerável de magnetização, que é chamado de magnetização remanescente (M_r), sendo necessário a exposição do material a outro campo na direção oposta para que a magnetização do material seja trazida de volta ao zero, sendo este campo chamado de coercitivo (H_c) (Figura 11a) (MONTAZER; HARIFI, 2018; WALLYN; ANTON; VANDAMME, 2019).

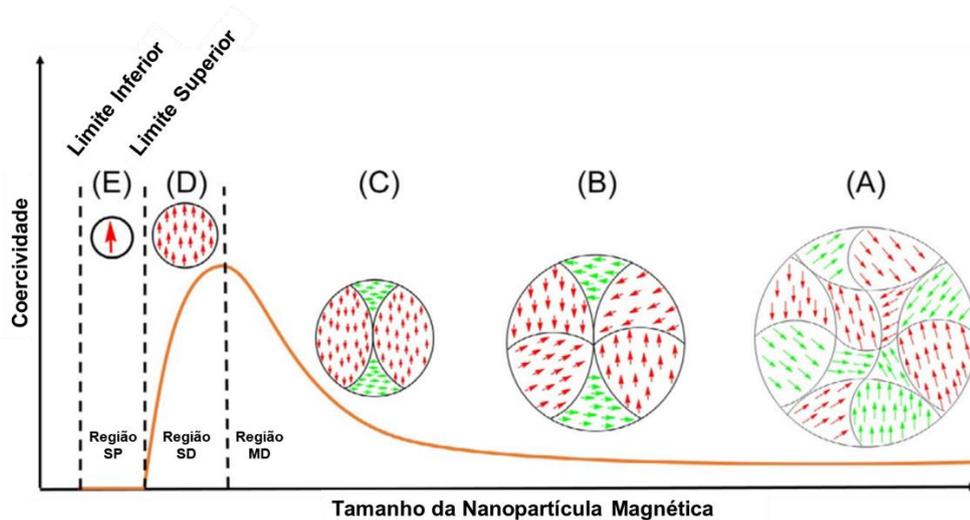
Assim como os PQs, os óxidos de ferro em escala *bulk* apresentam mudanças em suas propriedades quando reduzidos à escala nanométrica. Isto contribuiu para o uso da magnetita (Fe_3O_4) e maghemita ($\gamma-Fe_2O_3$) nas ciências da vida, pois esta transposição é responsável por conferir a estes materiais uma resposta magnética diferenciada e intensa em temperatura ambiente. Na escala nanométrica, os domínios magnéticos do material são reduzidos a um único domínio magnético, o qual age como um ímã se alinhando na direção do campo magnético externo. Estes materiais são chamados de superparamagnéticos e apresentam uma M_s cerca de 10^4 vezes maior quando comparada aos materiais paramagnéticos. Também é observando que estas MNPs não permanecem magnetizadas após a exposição a um campo magnético externo, ou seja, não há M_r (Figura 11b). Ainda, NPs superparamagnéticas se caracterizam por apresentar domínio único e H_c igual a zero (Figura 12). Além do tamanho e da natureza do material, o superparamagnetismo é dependente da temperatura (MONTAZER; HARIFI, 2018; TAPEINOS, 2018; WALLYN; ANTON; VANDAMME, 2019).

Figura 11 - Curva de histerese M–H de (a) materiais ferro e ferrimagnéticos e (b) de um material superparamagnético. **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.

Figura 12 - Representação esquemática da relação entre a coercividade (campo magnético necessário para remover a magnetização remanescente) e o tamanho das nanopartículas magnéticas. (a) Região de domínios magnéticos (MD) (tamanho de $\text{Fe}_3\text{O}_4 > \text{ca. } 80 \text{ nm}$), (b) e (c) região com número de domínios magnéticos em diminuição, (d) região de domínio único (SD) ($\text{ca. } 20 \text{ nm} < \text{tamanho de } \text{Fe}_3\text{O}_4 < 80 \text{ nm}$) 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).

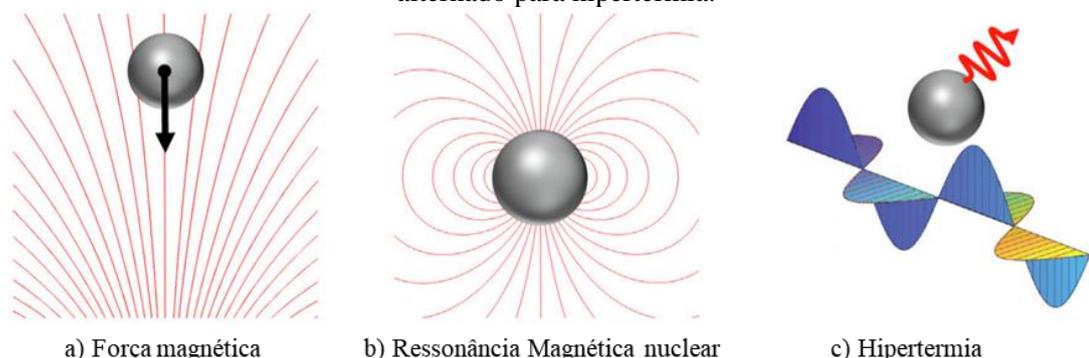
Com o passar dos anos, vários métodos de síntese das MNPs têm sido desenvolvidos, com o objetivo de obter nanossistemas com boa distribuição de tamanho, estabilidade química, formato e superfície química de boa qualidade, alta reprodutibilidade e características superparamagnéticas adequadas. Os principais métodos de preparação das MNPs são: coprecipitação de sais em meio alcalino, decomposição térmica, síntese hidrotérmica e microemulsão (CARDOSO et al., 2018). O método de decomposição térmica expõe precursores

organometálicos e um surfactante em um solvente apolar a altas temperaturas, produzindo assim NPs não dispersáveis em meio aquoso. Já o método da síntese hidrotérmica utiliza altas temperaturas (130 – 250 °C) e pressão (0,3 – 4 MPa) para catalisar reações químicas em soluções aquosas, produzindo NPs hidrofílicas. A síntese em microemulsão utiliza líquidos imiscíveis e um surfactante para produzir uma emulsão, geralmente do tipo “água em óleo”. O tamanho das nanogotas de água restringe o tamanho da NP formada. O método de coprecipitação é o mais utilizado na preparação das MNPs uma vez que, é simples e eficiente. Nesse método ocorre uma reação química entre os íons ferroso (Fe^{2+}) e férrico (Fe^{3+}) em meio aquoso e alcalino, produzindo NPs hidrofílicas com boa distribuição de tamanho (CABRERA et al., 2017; CARDOSO et al., 2018).

Devido às propriedades únicas das MNPs superparamagnéticas seu uso nas ciências da vida têm sido cada vez maior. No geral, suas aplicações podem ser divididas basicamente em três categorias: (i) concentração de analitos e transporte de substâncias e células através da aplicação de um campo magnético externo, que também pode trazer vantagens no contexto de biossensoriamento, por exemplo (Figura 13a); (ii) agentes de contraste em imagens obtidas por ressonância magnética nuclear (RMN) (Figura 13b); (iii) conversão de energia eletromagnética em energia térmica, chamado de hipertermia (Figura 13c) (TONG; ZHU; BAO, 2019).

Uma vantagem de utilizar as MNPs é a capacidade de concentrar o composto de interesse magneticamente, antes ou após do processo de análise. A modificação da superfície de MNPs possibilita a interação entre estas NPs e os sistemas biológicos de interesse, tais como (bio)moléculas, permitindo assim a sua concentração e separação de meios complexos, ampliando a capacidade de análise por diferentes técnicas. As MNPs vêm sendo utilizadas sozinhas ou em conjunto com outras nanoestruturas, por exemplo, no biossensoriamento de proteínas, material genético e outras (bio)moléculas (HOLZINGER; LE GOFF; COSNIER, 2014).

Figura 13 - Representação das principais aplicações biomédicas das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro. (a) Força magnética gerada por um campo magnético externo utilizada na separação de componentes, (b) MNPs podem atuar como agentes de contraste na RMN, influenciando na relaxividade dos prótons da água e (c) aquecimento magnético gerado em um campo magnético alternado para hipertermia.



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

Já o uso das MNPs no diagnóstico é devido ao melhoramento do contraste de imagens adquiridas utilizando os princípios da RMN, que são formadas a partir do monitoramento do comportamento magnético dos prótons de hidrogênio (^1H) presentes nas moléculas de água, possibilitando a visualização de estruturas corporais com alta definição anatômica. Os prótons de hidrogênio (^1H) agem como pequenos ímãs, pelo movimento de giro (*spin*) em seu próprio eixo e apresentam comportamento paramagnético frente a um campo \mathbf{H} . O tempo de relaxação longitudinal (T_1) e transversal (T_2) dos *spins* dos prótons de hidrogênio (^1H) posterior a uma estimulação, é afetado pelas características do meio e também por agentes de contraste. Nesse contexto, as MNPs agem como um agente de contraste negativo pela diminuição do T_2 (TONG; ZHU; BAO, 2019).

As MNPs também são exploradas em terapia por serem capazes de gerar calor quando estimuladas por um campo magnético externo alternado. O aquecimento ocorre quando este campo provoca uma rotação das nanoestruturas e o efeito de Néel, que é o processo de rearranjo dos μ dentro da estrutura cristalina do material, produzindo assim a dissipação da energia térmica. Devido a uma maior termossensibilidade das células de câncer, esta técnica oferece uma possível alternativa para o tratamento dessa doença, através dos danos funcionais e às estruturas celulares, podendo levar à morte celular (LI; NEJADNIK; DALDRUP-LINK, 2017; RYBKA, 2019).

Antes de aplicar as MNPs, torna-se necessária a modificação de superfície dessas NPs para atingir alguns propósitos específicos, como por exemplo: (i) o melhoramento da estabilidade coloidal, através do uso de surfactantes iônicos ou neutros; (ii) proteção contra a erosão mecânica ou degradação química devido a pHs extremos, pelo revestimento com

substâncias hidrofóbicas; (iii) capacidade de evadir o sistema imunológico pelo revestimento com polímeros biocompatíveis, como polietilenoglicol (PEG) e poli ácido láctico-co-ácido glicólico (PLGA) e (iv) fornecimento de grupos funcionais para ligação a fármacos, (bio)moléculas ou outras NPs (QIAO et al., 2019; WALLYN; ANTON; VANDAMME, 2019). No processo de funcionalização, diferentes compostos podem fornecer grupos funcionais para estas NPs, como a tiopronina, que fornece grupos carboxílicos, a polietilenoimina e o agente silano 3-aminopropiltrióxissilano (APTES), que fornece grupos amina (YOO et al., 2017).

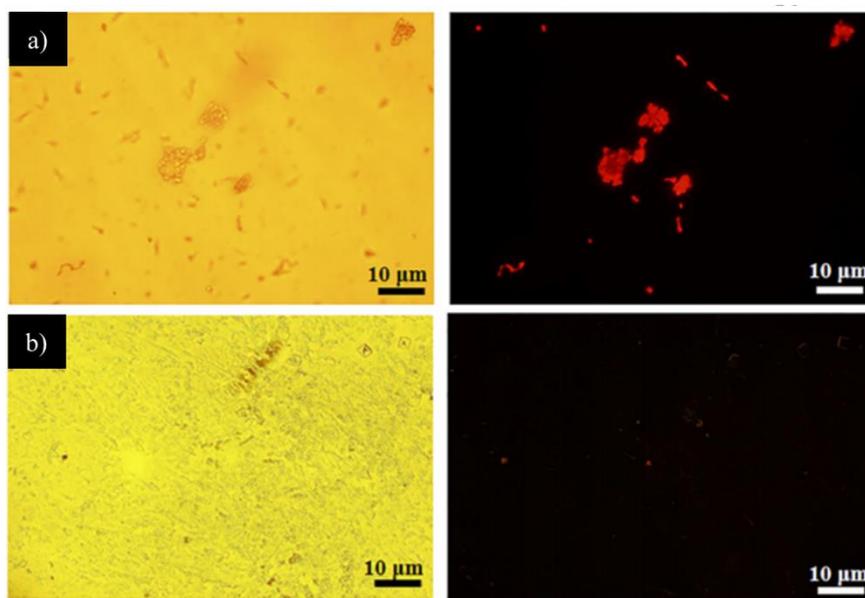
A funcionalização é um processo muito utilizado previamente à conjugação das MNPs a fármacos, (bio)moléculas e outras NPs. A ligação de MNPs a (bio)moléculas, além de poder conferir biocompatibilidade e a habilidade de escapar do sistema imune, é utilizada principalmente para permitir uma ligação específica a alvos selecionados. Já a associação de MNPs com outras NPs, como os PQs pode ser vantajosa, pois permite o aproveitamento das propriedades de ambos os nanomateriais, formando um único nanossistema bimodal com propriedades óptico-magnéticas, e a junção desses nanossistemas bimodais com (bio)moléculas pode fornecer especificidade para diversas aplicações biológicas (CABRERA et al., 2017; GAO; GU; XU, 2009; STAFFORD; GARCIA; GUN'KO, 2018).

3.4 - Sistemas Multimodais Baseados em Nanopartículas de Óxido de Ferro e Pontos Quânticos e suas Aplicações Biológicas

As aplicações dos PQs como nanossondas no campo biomédico envolvem tanto o estudo de interações a nível molecular, celular e tecidual como também em fluoroimunoensaios e na aquisição de imagens fluorescentes *in vivo* (LIMA et al., 2022). Os aprimoramentos na síntese de PQs também contribuiu para a união destes compostos com outras NPs, formando materiais híbridos mais complexos. As MNPs de óxido de ferro podem ser associadas aos PQs, desenvolvendo materiais com propriedades magnéticas e fluorescentes, chamados de nanossistemas ou NPs bimodais (BNPs – *bimodal nanoparticles*, do inglês). Estes nanossistemas podem permitir simultaneamente: (i) aquisição de imagens com especificidade bioquímica propiciada pela fluorescência associada à visualização anatômica, com maior contraste, da RMN; (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 (CABRERA et al., 2017; MARCELO et al., 2020; WAGNER et al., 2019).

Ghasemi e colaboradores (2019) prepararam um sistema multimodal a partir de MNPs de óxido de ferro recobertas com sílica e funcionalizadas com APTES e PQs de CdTe carboxilados. Para conferir especificidade ao sistema, foi utilizado um anticorpo anti *Streptococcus agalactiae* (SG), um agente etiológico de pneumonia e meningite que acomete recém nascidos. Através da microscopia de fluorescência foi possível observar marcação específica do sistema multimodal formado (BNPs-anti-SG) para o *S. agalactiae* e ausência de marcação para a linhagem *S. aureus*, que foi utilizada como controle negativo (Figura 14). O limite de detecção para o *S. agalactiae* neste estudo foi o de $10 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$, que, frente às $8 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ detectados por PCR no estudo de Bai e colaboradores (2013), além de oferecer semelhante sensibilidade, fornece ainda rapidez no ensaio, sendo concluído em menos de 30 min. As propriedades superparamagnéticas também foram úteis na separação do *S. agalactiae* em suspensão, sendo possível separar estas células em meio aquoso e também em matrizes biológicas mais complexas, como o leite, sem nenhum tipo de pré-tratamento (BAI et al., 2013; GHASEMI et al., 2019).

Figura 14 - Imagens de microscopia óptica (esquerda) e de fluorescência (direita) das linhagens de *S. agalactiae* (a) e *S. aureus* (b), nas quais pode-se verificar regiões de alta fluorescência na marcação da *S. agalactiae* pelas BNPs-anti-SG e ausência destas áreas para a linhagem *S. aureus*.



Fonte: Adaptado de Ghasemi et al., (2019).

Em um outro trabalho, foi utilizado o fragmento de ligação ao antígeno (Fab) de anticorpos hCC49 (anticorpo monoclonal humanizado - CC49) na preparação de MMNPs baseadas em NPs de Fe_3O_4 e PQs de CdTe, formando um nanossistema multimodal com

afinidade à cadeia de açúcar sialilada presente na glicoproteína-72, associada a tumores de câncer. Com a técnica de microscopia de fluorescência confocal, foi observado que os nanomateriais se acumularam uniformemente na superfície de células de adenocarcinoma de cólon, e também apresentaram grande magnetização de saturação, sem nenhum magnetismo remanescente após remoção do campo externo, evidenciando o potencial deste nanossistema na micro-separação em sistemas fluídicos (AHMED et al., 2013).

No estudo de Wang e colaboradores, dois nanossistemas multifuncionais foram preparados para a detecção de neurotoxina botulínica tipo A (BoNT/A) e enterotoxina estafilocócica B (SEB), toxinas proteicas bacterianas contaminantes de alimentos e água. Os sistemas multimodais foram preparados pela conjugação de PQs de CdSe/ZnS carboxilados na superfície de NPs de Fe₃O₄ funcionalizadas com polietilenoimina. Posteriormente, essas BNPs resultantes foram conjugadas a anticorpos monoclonais anti-BoNT/A ou anti-SEB. A separação magnética dos nanossistemas permitiu a concentração do analito e, conseqüentemente, a sua melhor detecção por emissão de fluorescência no ensaio de fluxo lateral com uma membrana de nitrocelulose. Foi possível obter um limite de detecção de 2,52 pg·mL⁻¹ para BoNT/A e 2,86 pg·mL⁻¹ para SEB, permitindo tanto a detecção em uma maior faixa de concentração como também uma análise 5 vezes mais sensível que a obtida por métodos de colorimetria, como por exemplo, ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) (WANG et al., 2019).

Através de um ensaio de fluxo lateral em uma membrana de nitrocelulose, com o uso de BNPs formadas a partir de MNPs e PQs emitindo fluorescência em dois comprimentos de onda diferentes, foi possível detectar em soro humano o antígeno prostático humano (PSA) em sua forma livre (PSA-L) e complexada (PSA-C). Para isto, foram sintetizados dois tipos de BNPs: uma com PQs que emitem na região do verde conjugados com o anticorpo anti-PSA-L, e outra com PQs que emitem na região do vermelho conjugados com o anticorpo anti-PSA-C. Ambos os sistemas foram adicionados a uma amostra de soro humano, e depois separados magneticamente, sendo ressuspensos em água e aplicados em uma membrana de nitrocelulose, que foi utilizada como base para o ensaio de fluxo lateral. O processo de concentração magnética dos analitos permitiu uma detecção mais sensível quando comparado com técnicas ópticas que não utilizam MNPs. Neste estudo, o limite de detecção para o PSA-C foi 0,087 ng·mL⁻¹, o que possibilitou não somente uma detecção mais sensível que os métodos tradicionais, como também um diagnóstico mais preciso, uma vez que é possível calcular a razão PSA-L/PSA-C. Essa razão é um parâmetro mais preciso do que a razão PSA-L/PSA-total, medido por Jiang e colaboradores (2014) através de técnicas envolvendo a ressonância plasmônica de superfície. As propriedades ópticas dos PQs, permitiram a detecção de

biomarcadores diferentes em apenas um ensaio, apresentando potencial em técnicas de diagnóstico rápido no local de coleta da amostra (JIANG et al., 2014; RONG et al., 2019).

MNPs recobertas uma camada de óxido de silício (SiO₂) decoradas de PQs e com a superfície conjugada a anticorpos anti-EpCAM (molécula de adesão celular epitelial) foram utilizadas para detectar e isolar células tumorais circulantes em uma amostra biológica. O nanocompósito híbrido foi capaz de separar magneticamente as células de câncer de mama de amostras sanguíneas de pacientes doentes, e a detecção pôde ser comprovada por imunofluorescência (CUI et al., 2019).

Outras biomoléculas também têm sido utilizadas no sensoriamento com NPs bimodais. Os receptores de folato, que podem ser superexpressos em células de câncer, também já foram alvo de estudo utilizando BNPs. O ácido fólico já foi utilizado para funcionalizar sistemas bimodais formados de PQs de CdTe e MNPs de óxido de ferro, como também de PQs de CdTe/ZnS e MNPs de óxido de ferro e manganês. Em ambos os estudos foi possível, acompanhar, por microscopia de fluorescência confocal, a endocitose destes nanossistemas através dos receptores de folato. Os nanossistemas foram também úteis na separação magnética das células (DI CORATO et al., 2011; DING et al., 2018).

Diante das promissoras aplicações biológicas dos nanossistemas multimodais, as lectinas são também biomoléculas de interesse potencial para sua preparação, uma vez que por possuírem capacidade de reconhecer carboidratos específicos, seu uso pode ser direcionado a estudos glicobiológicos.

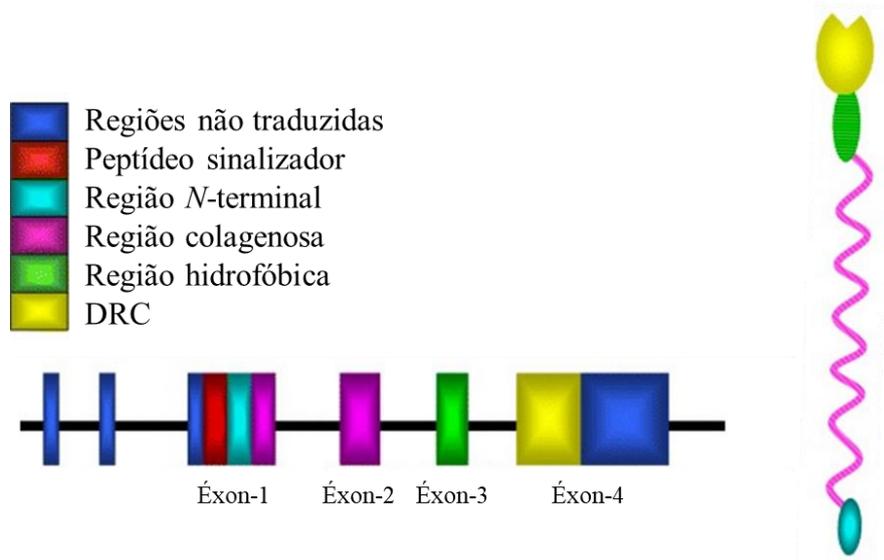
3.5 - Lectina Ligadora de Manose

A MBL é uma glicoproteína sérica que possui a capacidade de reconhecer principalmente resíduos de carboidratos que possuem hidroxilas nos carbonos 3 e 4 de hexoses, como a D-manose, *N*-acetil-D-glicosamina e L-fucose. Alguns destes carboidratos são expressos na superfície de microorganismos, células apoptóticas e lesadas, assim como em tecidos danificados. Esta proteína pertence à família das colectinas, sendo expressada principalmente no fígado e secundariamente em outros órgãos, tais como cérebro, baço, rins e coração (AURITI et al., 2017; LIMA et al., 2022).

Em humanos, a cadeia peptídica da MBL é codificada pelo gene *MBL2*, que é composto de 4 éxons intercalados por 3 íntrons. O éxon-1 codifica a região *N*-terminal rica em cisteína e a parte inicial da região semelhante ao colágeno, que é rica em glicina. O éxon-2 codifica o

restante da região de colágeno, o éxon-3 codifica a região hidrofóbica flexível, e o éxon-4 codifica o (DRC (Figura 15) (DOMMETT; KLEIN; TURNER, 2006).

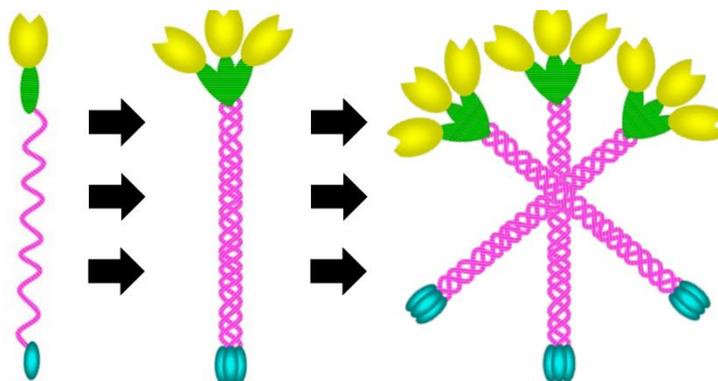
Figura 15 - Representação esquemática da estrutura do gene *MBL-2*, e os diferentes éxons que codificam as diferentes regiões da unidade monomérica da MBL.



Fonte: Adaptado de Dommet, Klein, Turner, (2006).

Três unidades monoméricas da MBL, de 32 kDa, se associam para formar a subunidade básica funcional, de 96 kDa, que possui estrutura helicoidal. O arranjo estrutural da MBL pode possuir de duas a seis unidades oligoméricas, podendo a estrutura final de uma MBL chegar até 600 kDa. As subunidades se ligam na região colagenosa DRCs sempre seguindo a mesma orientação direcional, dando origem a uma estrutura quaternária que lembra um “ramo de tulipas” (Figura 16). Esta estrutura é semelhante ao C1q, um receptor do sistema complemento (SC) (DOMMETT; KLEIN; TURNER, 2006; LIMA et al., 2022). O reconhecimento de carboidratos pelas lectinas envolve forças de van der Waals, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas dos aminoácidos localizados no DRC e os grupamentos presentes nos carboidratos. Oligossacarídeos e glicanos complexos oferecerem mais sítios de ligação aos DRCs das lectinas, proporcionando interações mais fortes entre o complexo lectina-carboidrato (BHUTIA et al., 2019; GAUTAM et al., 2020). Assim como todas as outras lectinas humanas séricas, a interação do DRC da MBL com os carboidratos é favorecida na presença do íon cálcio (Ca^{2+}), que faz ligações de coordenação com aminoácidos presentes numa alça externa dos DRCs (DOMMETT; KLEIN; TURNER, 2006; LIMA et al., 2022).

Figura 16 - Representação esquemática das porções estruturais da MBL e formação do seu oligômero funcional.



Fonte: Adaptado de Dommet, Klein, Turner, (2006).

A principal função da MBL no corpo humano está relacionada a imunidade inata, reconhecendo e se ligando a superfície de patógenos, além de ativar o SC e cooperar com outras moléculas na opsonização independente do complemento, modular a resposta inflamatória e também na remoção de células apoptóticas (JACK; KLEIN; TURNER, 2001; LIMA et al., 2022).

A capacidade de reconhecimento e sinalização fornecem a esta biomolécula diversas funções no corpo humano:

- a) **Sistema Complemento:** o complemento é um complexo sistema multiprotéico, sendo um dos mecanismos mais importantes da resposta imune inata e o principal mediador humoral do processo inflamatório junto aos anticorpos. Este sistema possui três vias de ativação: clássica, alternativa e das lectinas. A via das lectinas tem como um dos principais componentes a MBL, que ao se associar às serinoproteases MASP-1, MASP-2 e MASP-19, é capaz de reconhecer padrões moleculares associados à superfície de patógenos (*pathogen-associated molecule patterns* – PAMPs), sinaliza a presença de tais microrganismos para o sistema imune, ativando uma série de proteínas do sistema complemento (MERLE et al., 2015; SARMA; WARD, 2011; SEELEN et al., 2005).
- b) **Modulação da inflamação:** alguns estudos indicam que a MBL pode estimular a liberação de citocinas pró inflamatórias, como também se ligar aos peptídeos β -amiloides, que estão envolvidos na patogênese da doença de Alzheimer (JACK; KLEIN; TURNER, 2001; LARVIE et al., 2012; NETH et al., 2000).

c) **Oponofagocitose:** a MBL tem a capacidade de se ligar a superfície de diversos microorganismos, como algumas espécies de *Candida*, *Aspergillus fumigatus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* do grupo β -hemolítico através do reconhecimento dos PAMPs, com subsequente ativação do SC e morte celular (NETH et al., 2000). Mas também foi demonstrada a capacidade desta lectina mediar a oponofagocitose da *C. albicans* por neutrófilos independente da ativação do SC, pela presença de carboidratos que são reconhecidos pela MBL na superfície da parede celular deste fungo (LI et al., 2012). Esta proteína também é capaz de estimular a apoptose ao se ligar a células que perderam o recobrimento natural de ácido siálico dos glicanos na superfície celular, o que pode acontecer por infecções virais ou parasitárias (GARRED et al., 2003; LEIKINA et al., 2005).

A presença de polimorfismos na região estrutural ou promotora do gene *MBL2* pode resultar na síntese de proteínas instáveis que são rapidamente degradadas ou da ausência desta proteína na circulação. Esta deficiência na MBL está associada ao aumento da susceptibilidade a infecções, especialmente em crianças entre 6 e 18 meses de idade, pacientes imunodeprimidos e com doenças autoimunes (HEITZENEDER et al., 2012).

Lima et al. (2019), utilizando PQs de CdTe catiônicos sugeriram que a MBL pode também apresentar interação com eritrócitos saudáveis, uma vez que após incubação com essa lectina, a marcação fluorescente foi inibida. Ademais, os autores também sugeriram que a MBL possa ter um papel estabilizador da membrana eritrocitária, pois os eritrócitos se tornaram mais resistentes à lise após incubação com essa lectina.

Até a presente data poucos estudos associaram a MBL com os PQs (LIMA et al., 2019, 2022). Porém, a associação desta proteína com as MNPs ainda não foi reportada na literatura. Levando-se em conta as diversas funções da lectina, acreditamos que sua associação a nanossistemas bimodais apresenta grande potencial para investigações glicobiológicas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Síntese e Caracterização Óptica dos PQs

A síntese dos PQs de CdTe foi baseada no método descrito por Andrade et al. (2013) com adaptações de Cabral Filho et al. (2016). Primeiramente foi preparada uma solução contendo íons telúrio (Te^{2-}) a partir da redução de telúrio metálico Te^0 (*Sigma-Aldrich*) pelo NaBH_4 (*Sigma-Aldrich*) na razão molar 1:30 ($\text{Te}^0:\text{NaBH}_4$) em $\text{pH} > 10$ e atmosfera inerte de N_2 . Posteriormente, a solução contendo íons Te^{2-} foi adicionada a uma solução preparada a partir do CdCl_2 (*Sigma-Aldrich*) a $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em $\text{pH} > 10$ na presença do ácido mercaptosuccínico (AMS – *Sigma-Aldrich*), que atua como agente funcionalizante e estabilizante das nanopartículas, na razão molar 5:1:6 (Cd:Te:AMS). A reação permaneceu então em constante agitação e aquecimento a $90 \text{ }^\circ\text{C}$ por 6 h para se obter PQs fluorescentes na região espectral do laranja/vermelho.

A caracterização óptica dos PQs de CdTe foi feita por espectroscopias de absorção e emissão, utilizando-se respectivamente os equipamentos espectrofotômetro UV-Vis 1800 (Shimadzu) e o espectrofluorímetro LS55 (PerkinElmer). Na espectroscopia de emissão, as amostras foram excitadas em $\lambda = 488 \text{ nm}$.

O espectro de absorção obtido foi utilizado para estimar o diâmetro médio (d) dos nanocristais, calculado a partir do comprimento de onda (λ), segundo a Equação 1 (DAGTEPE et al., 2007):

$$d = \frac{1,38435 - 0,00066 \lambda}{1 - 0,00121 \lambda} \quad \text{Eq. 1}$$

Com o diâmetro estimado, o coeficiente de extinção molar (ϵ) dos PQs de CdTe foi calculado através da Equação 2, já descrita na literatura (YU et al., 2003):

$$\epsilon = 10043 \times d^{2,12} \quad \text{Eq. 2}$$

Após calcular o ϵ ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), a concentração dos PQs foi estimada aplicando-se a lei de Lambert-Beer, na Equação 3 abaixo:

$$A = \epsilon CL \quad \text{Eq. 3}$$

sendo A a absorbância encontrada no primeiro máximo de absorção, L o comprimento do percurso da luz pela amostra, que corresponde a largura da cubeta de quartzo utilizada na análise (1 cm) e C é a concentração molar ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) dos nanocristais (DAGTEPE et al., 2007).

A partir do espectro de emissão, foi caracterizada a região em que os PQs sintetizados emitem fluorescência, bem como a largura a meia altura (FWHM – *Full Width at Half-maximum*).

4.2 Síntese e Funcionalização das MNPs

A suspensão aquosa das MNPs foi preparada pelo método de co-precipitação alcalina de sais de Fe^{2+} e Fe^{3+} , segundo procedimentos descritos por Cabrera et al., 2017. Os compostos $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (na razão molar de 2:3) foram dissolvidos em uma solução de HCl ($2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) e submetidos à agitação em $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (temperatura ambiente – TA). Posteriormente, 50 mL de hidróxido de amônia ($7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) foi adicionado à solução contendo os cloretos de ferro, sob agitação constante. A preparação magnética foi aquecida a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ em um banho de ultrassom (Unique Ultra Cleaner USC 1400A) por 30 min. A suspensão resultante foi resfriada até atingir a TA e lavada com água ultrapura através da decantação magnética, utilizando um ímã de neodímio (NdFeB). A técnica permite obter MNPs compostas maioritariamente de magnetita e de tamanho médio de aproximadamente 15 nm (CABRERA et al., 2017).

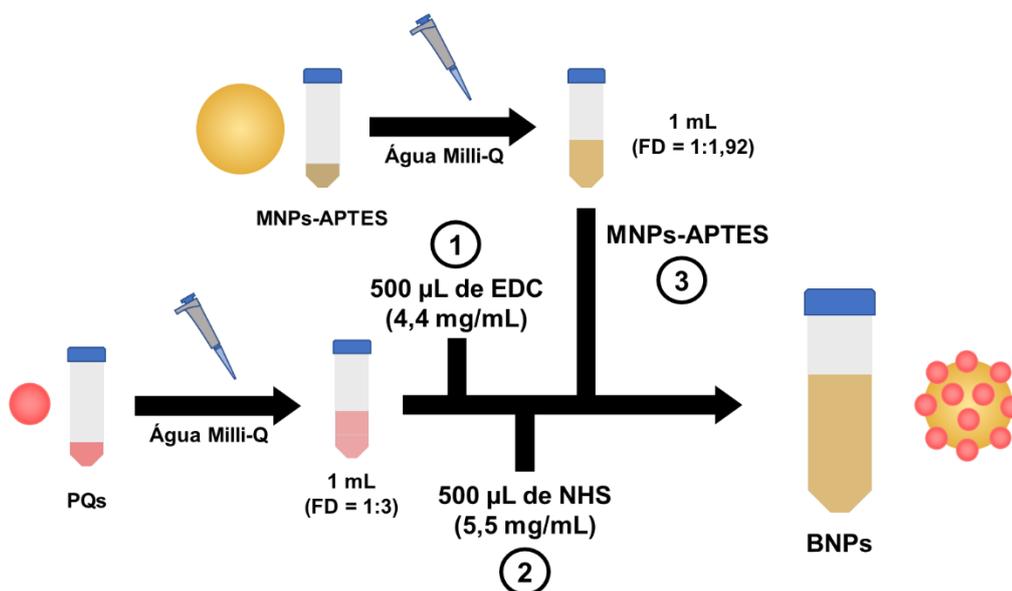
A funcionalização das MNPs sintetizadas foi feita com o agente silano APTES (3-aminopropiltriétoxissilano, *Sigma-Aldrich*), o qual propicia a adição de grupos amina ($-\text{NH}_2$) sobre a superfície das nanopartículas magnéticas. Para isto, a suspensão das MNPs preparada na concentração de $35 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, estimada segundo a técnica de espectroscopia de absorção atômica em chama, foi diluída 40 vezes. Esta suspensão diluída foi tratada com a solução de APTES (2,5 % v/v, preparada em acetona) sob agitação por 2 h em TA. Após este processo, as MNPs funcionalizadas com APTES (MNPs-APTES) foram lavadas três vezes com água ultrapura, como descrito anteriormente (CABRERA et al., 2017). Os sistemas MNPs e MNPs-APTES foram caracterizados por análise de potencial zeta para avaliar a carga superficial das MNPs. Essa análise foi realizada em TA no equipamento NanoZS (Malvern Instruments), após separação magnética, com ressuspensão da amostra em água ultrapura (pH 6,0).

4.3 Preparação e Caracterização Físico-Química das BNPs

Os sistemas foram preparados seguindo a metodologia proposta por Cabrera et al., (2017) com adaptações (Figura 17), sendo realizada a ativação dos grupos carboxílicos fornecidos pelo AMS da superfície dos PQs (1 mL) com EDC ($0,5 \text{ mL}$, $4,4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) e NHS ($0,5 \text{ mL}$, $5,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). Posteriormente à ativação, foi preparado 1 mL da suspensão de MNP-

APTES na concentração de $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (após a diluição da solução mãe em 1,92 vezes) e esse volume foi adicionado aos PQs. O sistema BNPs final permaneceu sob agitação magnética por aproximadamente 16 h (*overnight*) e, posteriormente foi armazenado a 4°C . Foram avaliadas concentrações de 0,8 e $1,6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ na preparação das BNPs, as quais também foram caracterizadas opticamente e por análise de potencial zeta seguindo procedimentos descritos nos tópicos 4.1 e 4.2.

Figura 17 - Esquema da preparação das nanopartículas bimodais (BNPs) constituídas por pontos quânticos (PQs) e nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (MNPs)



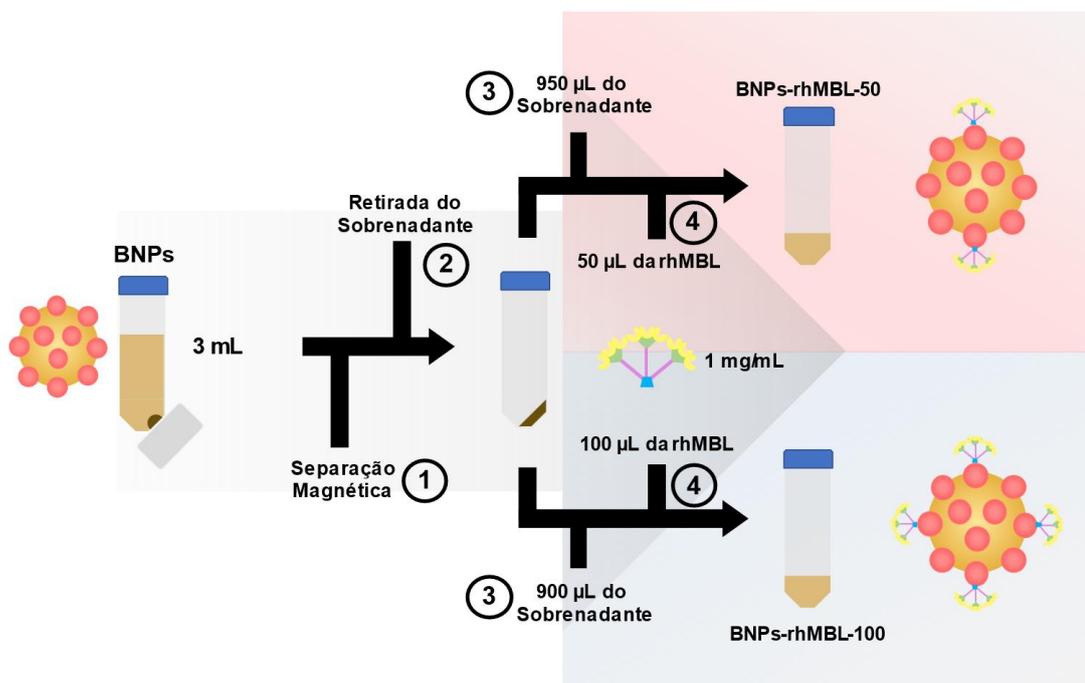
Fonte: o autor (2022).

4.4 Preparação e Caracterização Físico-Química das BNPs-rhMBL

Inicialmente, foram sintetizados dois sistemas contendo concentrações diferentes de MBL recombinante (rhMBL, *Enzon Pharmaceuticals*). Para isto, um ímã de NdFeB foi utilizado para concentrar em três vezes o volume das BNPs preparadas anteriormente. Para a preparação dos nanossistemas multimodais (Figura 18) baseados na rhMBL, foram testadas duas concentrações de lectina, utilizando a proporção de 1:20 e 1:10 (solução de rhMBL a $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$: BNPs concentradas) para formar nanossistemas com a concentração de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (BNPs-rhMBL-50) e $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ da lectina (BNPs-rhMBL-100). O processo de conjugação seguiu sem nova adição de agentes de acoplamento, visto que os grupos carboxílicos dos PQs já estavam ativos desde o processo de síntese das BNPs. Ambas as preparações permaneceram sob agitação por 2 h a TA num Mini Rotator Bio RS-24 (BioSan). Os nanossistemas preparados foram então

armazenados a 4 °C até o momento de serem usados, o que aconteceu pelo menos 4 dias após o processo de conjugação da lectina. Foi também realizada a caracterização dos sistemas por espectroscopia de emissão e potencial zeta, conforme já descrito anteriormente.

Figura 18 - Esquema da preparação das BNPs-rhMBL-50 e BNPs-rhMBL-100. Ambas preparações ocorreram de forma semelhante, sendo a diferença entre elas o volume de rhMBL adicionada às nanopartículas bimodais (BNPs)



Fonte: o autor (2022).

4.5 - Cultura Celular e Marcação de *C. albicans*

Foram utilizadas suspensões de *C. albicans* para avaliar a interação biológica dos nanossistemas. A alta quantidade de manose na parede celular deste fungo possibilita o seu uso como um importante modelo biológico na avaliação de nanossistemas produzidos com a rhMBL, visto que ela tem afinidade por este carboidrato (TENÓRIO et al., 2015). As células de *C. albicans* (ATCC – 10231) foram cultivadas em meio Sabouraud por 24 h, a 37 °C. Em seguida, um volume de 200 µL da suspensão celular com densidade óptica (em 540 nm) ajustada para aproximadamente 0,970 foi lavado por centrifugação ($775 \times g$, por 30 s) e ressuspendido em solução salina 0,9% enriquecida com cálcio ($1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), uma vez que a rhMBL é uma lectina cálcio-dependente (LIMA et al., 2022). Previamente a cada interação com as células, as terminações carboxílicas dos sistemas foram bloqueadas utilizando TRIS base ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), por 2 h, para evitar interações não específicas. As suspensões celulares foram

incubadas com os conjugados (BNPs-rhMBL-50 e BNPs-rhMBL-100) na proporção de 1:1 (25:25 μL), por 15 min, à TA.

Os sistemas foram centrifugados ($775 \times g$, por 30 s) e, ressuspensos em 100 μL da solução salina 0,9% enriquecida com cálcio ($1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) novamente, para preservar a interação do sistema multimodal aos carboidratos da superfície celular de *C. albicans*. A marcação celular foi avaliada quantitativamente por citometria de fluxo (BD Accuri™ C6, Becton Dickinson). A fluorescência nas células foi excitada em 488 nm e avaliada no filtro FL4 (675/25 nm) com a obtenção de 20.000 eventos e subsequente análise da porcentagem de marcação.

Para confirmar a especificidade do nanossistema que apresentou o melhor resultado de marcação, dois ensaios complementares foram realizados: (i) uma solução salina a 0,9% sem cálcio foi utilizada como tampão de ressuspensão das células na incubação com as BNPs-rhMBL e (ii) o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA – $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), um quelante de cálcio, foi adicionado ao tampão de ressuspensão celular (solução salina 0,9% enriquecida com cálcio), removendo os íons cálcio necessários para a interação da rhMBL com os carboidratos de superfície da *C. albicans*, antes do nanossistema ser adicionado a meio.

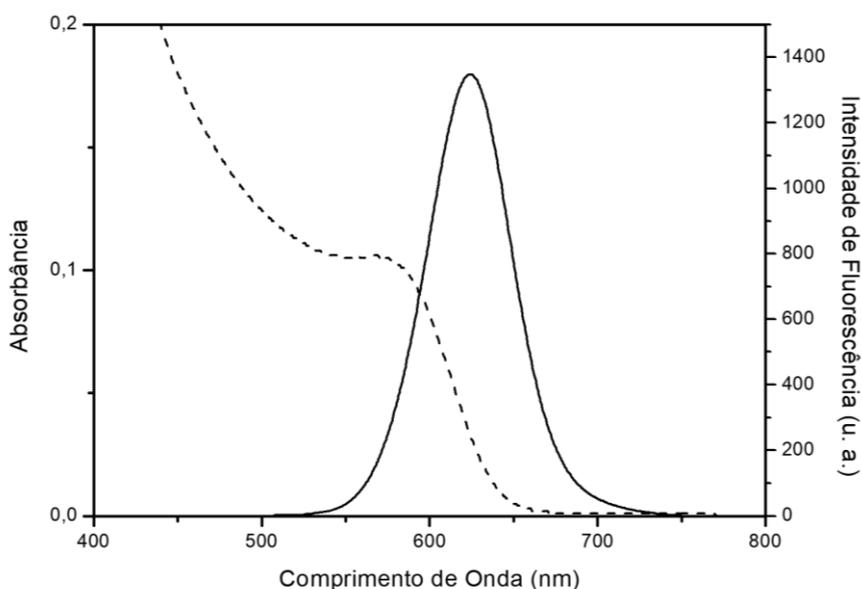
Todos os ensaios foram realizados pelo menos em triplicata. Nos ensaios de confirmação da especificidade no nanossistema foram mantidas as mesmas condições de tempo e temperatura de incubação utilizadas anteriormente. As células, após incubação em meio contendo EDTA ou salina 0,9%, foram centrifugadas ($775 \times g$, por 30 s) e, ressuspensas em 100 μL de seus respectivos tampões de ressuspensão utilizados previamente à incubação, para preservar assim as condições do ensaio. A análise da marcação celular foi realizada por citometria de fluxo, segundo procedimento já descrito.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização Óptica dos PQs

As caracterizações ópticas da suspensão aquosa dos PQs de CdTe sintetizados indicaram um primeiro máximo de absorção em $\lambda = 578$ nm, e um pico máximo de emissão em $\lambda = 613$ nm. O espectro de emissão mostrou-se estreito com uma FWHM de 56 nm, bem como indicou a presença de poucos defeitos na superfície dos nanocristais sintetizados (Figura 19). Utilizando a Eq. 1, proposta por Dagtepe et al. (2007), estimou-se um diâmetro para os nanocristais de aproximadamente 3,3 nm. Levando em consideração o diâmetro estimado, o primeiro máximo de absorção e a Eq. 2 proposta por Yu et al. (2003) para o cálculo do coeficiente de extinção molar de nanocristais de CdTe, a concentração dos PQs encontrada foi de $4,8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Figura 19 - Espectro de absorção (linha tracejada) e espectro de emissão (linha contínua) dos PQs de CdTe. No espectro de emissão, os nanocristais foram excitados em 488 nm



Fonte: o autor (2022).

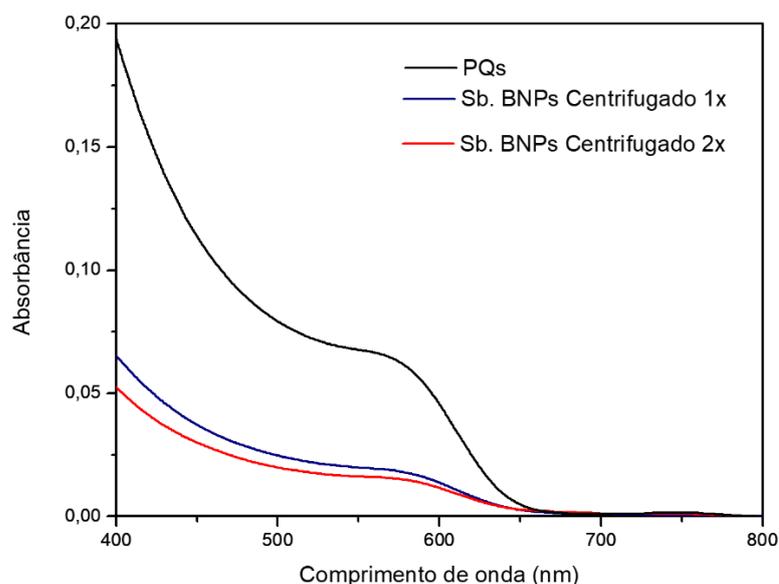
5.2 Caracterização Óptica das BNPs e BNPs-rhMBL

Dentre as duas preparações de BNPs sintetizadas foi possível observar que o sistema na proporção 1:16 (MNPs:PQs) mostrou-se o mais promissor, uma vez que preservou a propriedade fluorescente por até dois meses. Já o sistema bimodal na proporção de MNPs:PQs

igual a 1:8 manteve-se fluorescente por apenas duas semanas. Dessa forma, o sistema bimodal com maior número de PQs por MNPs (1:16) foi o escolhido para conjugar a lectina. A partir de agora a abreviação BNPs fará apenas referência a essa proporção (1:16) de MNPs e PQs.

Após a seleção do melhor sistema bimodal, foi realizada a análise do espectro de absorção do sobrenadante após a lavagem e posterior ciclos de centrifugação (um e dois) posteriores à separação magnética. A Figura 20 compara o perfil do espectro de absorção de uma suspensão de PQs livres (na concentração aplicada no sistema bimodal) com as amostras após o processo de lavagem com o objetivo de avaliar se haveria PQs livres após a conjugação. Nas amostras do sobrenadante pode-se observar que a absorbância do primeiro máximo diminuiu *ca.* 5 vezes indicando uma conjugação efetiva, visto *ca.* 80% dos PQs estariam ligados na superfície das nanopartículas magnéticas.

Figura 20 - Espectro de absorção de uma suspensão de PQs (na mesma diluição do sistema bimodal) e dos sobrenadantes (Sb.) das nanopartículas bimodais (BNPs) após um ou dois ciclos de centrifugação posteriores a separação magnética

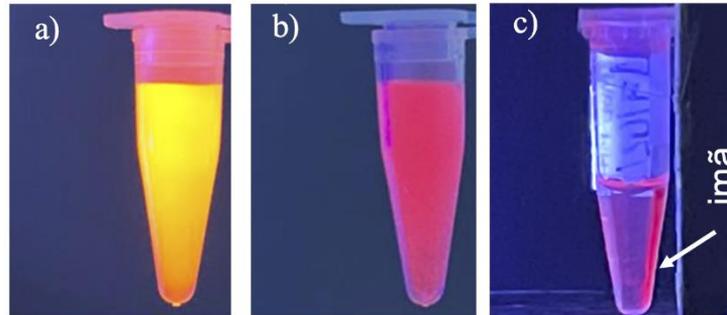


Fonte: o autor (2022).

Posteriormente à preparação das BNPs, foi possível observar sob a luz UV uma diferença visual na fluorescência emitida pelas BNPs quando comparadas com a suspensão mãe de PQs. A Figura 21a, ilustra a fluorescência amarelada-alaranjada emitida pelos PQs sozinhos, em contraste com a fluorescência emitida pelas BNPs (Figura 21b), que está na região do vermelho. Esta alteração visual da emissão de fluorescência indica uma alteração da superfície dos PQs provavelmente atribuída ao processo de conjugação com as MNPs de óxido de ferro.

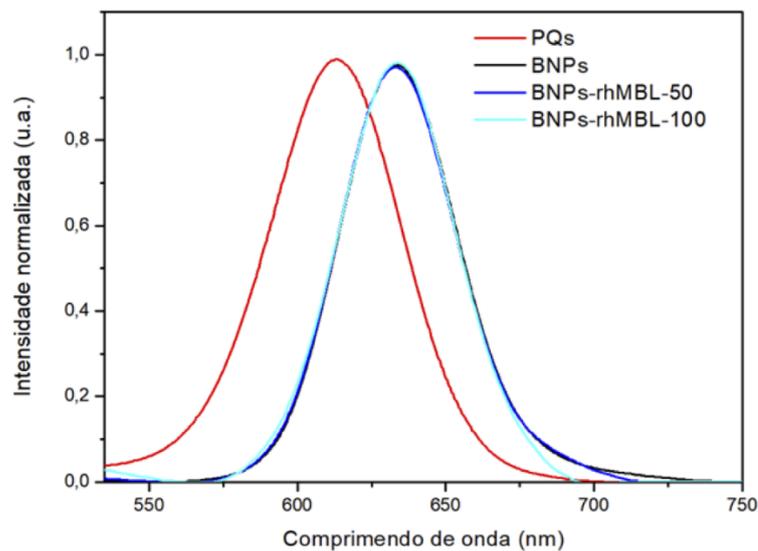
Chamado de *redshift*, este fenômeno pode ser associado a uma conjugação efetiva de PQs a (bio)moléculas e outras NPs (CABRAL FILHO et al., 2016; CABRERA et al., 2017).

Figura 21 - Fluorescência dos (a) PQs sozinhos, (b) BNPs e c) BNPs-rhMBL-100 sob a luz UV. Na ilustração c), o sistema multimodal também está sendo atraído pelo imã de neodímio (NdFeB)



Fonte: o autor (2022).

Figura 22 - Espectro da emissão (normalizado) da suspensão mãe de PQs e dos nanossistemas preparados. Pode se observar o efeito *red shift* em todos os nanossistemas óptico-magnéticos de forma semelhante, quando comparados com a suspensão mãe de PQs de CdTe. No espectro de emissão, os sistemas foram excitados em 488 nm



Fonte: o autor (2022).

Esse *redshift* espectral também foi observado nos espectros de emissão dos nanossistemas bimodais (Figura 22). Através da comparação dos espectros de emissão normalizados da suspensão mãe de PQs com os das BNPs, foi possível observar um *redshift* de aproximadamente 20 nm. Esse resultado sugere que houve conjugação dos PQs às MNPs-APTES. Com relação aos sistemas multimodais (Figura 22), não houve deslocamento espectral

em relação às BNPs, assim como visualmente observado na Figura 21c para o sistema BNPs-rhMBL-100. Um comportamento espectral semelhante foi observado no trabalho de Cabral Filho e colaboradores, (2018), no qual também não foram observadas alterações no comprimento de onda máximo da emissão após a conjugação das BNPs com a transferrina. A Figura 21c também ilustra o sistema BNPs-rhMBL-100 sendo atraído pelo imã de neodímio (NdFeB), ilustrando o comportamento magnético da nanossonda multimodal.

5.4 Análise do Potencial Zeta (ζ)

A Tabela 1 apresenta os resultados do ζ para as MNPs puras e MNPs-APTES e indicaram que a funcionalização com APTES foi efetiva, pois houve uma mudança na carga superficial das MNPs de um valor negativo ($\zeta = -23,0$ mV), para um valor positivo nas MNPs-APTES ($\zeta = +22,7$ mV). Portanto, as cargas positivas indicam a presença de grupos amina na superfície das MNPs-APTES. Por outro lado, quando as MNPs-APTES foram conjugadas com os PQs carboxilados de CdTe, este novo nanossistema apresentou ζ negativo ($\zeta = -26,6$ mV), indicando uma conjugação eficiente. Neste caso, as cargas negativas vêm dos grupos carboxílicos pertencentes ao AMS na superfície dos PQs. De acordo com a literatura quando o ζ é próximo ou superior a 20 mV (em módulo), os nanossistemas podem ser considerados coloidalmente estáveis (CABRERA et al., 2017).

Tabela 1 - Resultados da medição do potencial zeta (média e desvio padrão) das MNPs puras, dos MNPs-APTES, BNPs e BNPs-rhMBL-50 e BNPs-rhMBL-100.

Nanossistema	Potencial Zeta (mV)
MNPs	$-23,0 \pm 5,0$
MNPs-APTES	$+22,7 \pm 4,7$
BNPs	$-26,6 \pm 4,1$
BNPs-rhMBL-50	$-16,2 \pm 5,8$
BNPs-rhMBL-100	$-11,8 \pm 4,2$

Fonte: o autor (2022).

Quanto às BNPs-rhMBL, observou-se que com a conjugação da proteína na superfície das BNPs, houve um aumento de aproximadamente 10 mV na carga superficial. Este resultado pode ser atribuído tanto à presença de resíduos de aminoácidos positivos na superfície da proteína, como também pela ligação da proteína nos grupos carboxílicos negativos na superfície dos PQs dos nanossistema, através dos agentes de acoplamento. Também se observa que este aumento na carga superficial das BNPs-rhMBL é dependente da concentração da lectina, pois

houve um aumento no ζ quando a quantidade desta proteína foi maior (LIMA et al., 2022).

5.5 Marcação de *C. albicans*

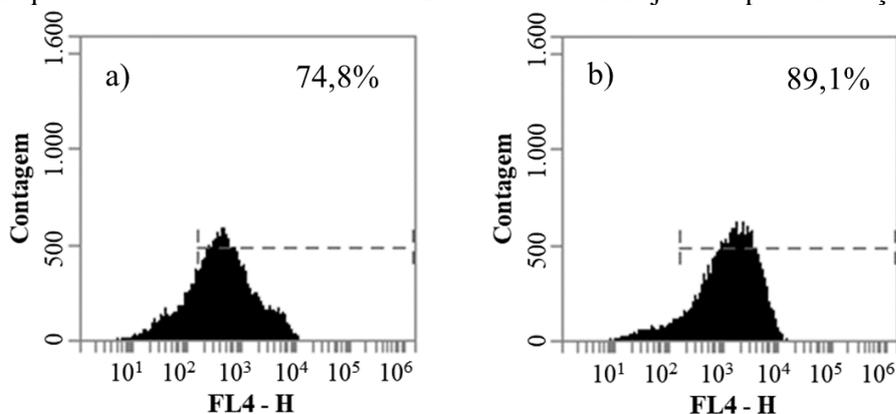
A primeira etapa das marcações celulares de *C. albicans* foi executada segundo os parâmetros indicados anteriormente e os resultados obtidos após a análise de citometria de fluxo estão organizados na Tabela 2 e Figura 23.

Tabela 2 - Percentual de marcação celular e mediana de intensidade de fluorescência (MIF) dos nanossistemas BNPs-rhMBL-50 e - BNPs-rhMBL-100 (média e erro padrão). Em ambas as marcações, foi utilizada solução salina 0,9% com íons Ca^{2+} a $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

Nanossistema	Marcação (%)	Mediana de Intensidade de Fluorescência (MIF) (u. a.)
BNPs-rhMBL-50	$74,1 \pm 5,7$	$8.187,7 \pm 1868,7$
BNPs-rhMBL-100	$86,0 \pm 4,9$	$14.382,3 \pm 2.687,0$

Fonte: o autor (2022).

Figura 23 - Histogramas representativos da análise por citometria de fluxo das células de *C. albicans* incubadas com os nanossistemas BNPs-rhMBL-50 (a) e BNPs-rhMBL-100 (b) em solução salina a 0,9% enriquecida com íons Ca^{2+} a $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. O controle foi ajustado para marcação de 1%.

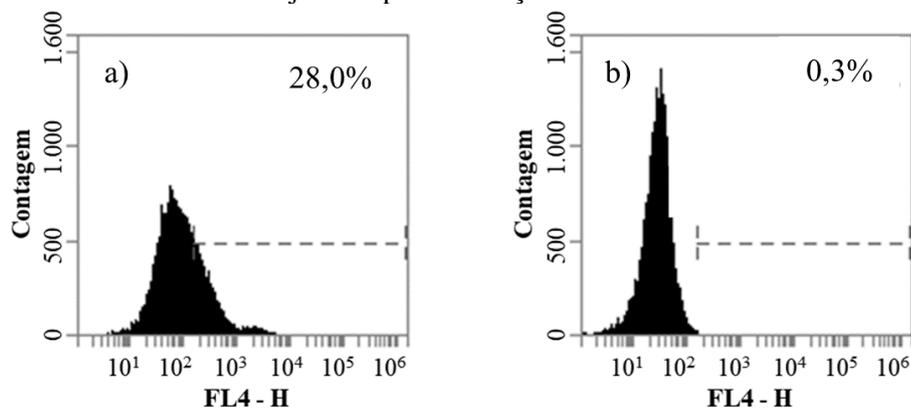


Fonte: o autor (2022).

A primeira etapa das marcações celulares teve o objetivo de avaliar a capacidade dos nanossistemas multimodais de marcar as células de *C. albicans* em condições favoráveis à interação da proteína (rhMBL) presente na superfície do nanossistema com os carboidratos da superfície na parede celular da levedura. Ambos os sistemas apresentaram potencial, mas as BNPs-rhMBL-100 apresentaram maior MIF e percentual de marcação, e também um histograma mais homogêneo. Dessa forma, o sistema BNPs-rhMBL-100 foi então escolhido

para seguir com os estudos de especificidade na marcação de *C. albicans*. Histogramas representativos desses ensaios podem ser visualizados na Figura 24.

Figura 24 - Histogramas representativos da marcação de *C. albicans* em meio com solução salina 0,9% (a) ou meio enriquecido com íons Ca^{2+} a $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e EDTA a $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (b). O controle foi ajustado para marcação de 1%.



Fonte: o autor (2022).

A Figura 24a revela uma diminuição no percentual médio de marcação celular quando o meio escolhido para a incubação não foi enriquecido com Ca^{2+} ($25,9 \pm 6,0\%$). Esse perfil pode ser explicado pela ausência do íon Ca^{2+} no meio utilizado, evidenciando assim que no ensaio anterior, a marcação celular do nanossistema multimodal era devido à interação entre os carboidratos presentes na superfície celular de *C. albicans* e a rhMBL do nanossistema (BNPs-rhMBL). Já era esperado que houvesse uma diminuição no percentual de marcação celular frente a estas condições, visto que o Ca^{2+} é um cofator enzimático para a interação da rhMBL com os carboidratos que tem afinidade (HARDISON; BROWN, 2012; LIMA et al., 2022). A Figura 24b mostra também uma baixa marcação celular em meio suplementado com EDTA ($0,3 \pm 0,0\%$). Este resultado corrobora com o descrito acima em relação à dependência da atividade da rhMBL com o íon Ca^{2+} , visto que o EDTA é um agente quelante de Ca^{2+} . Um resultado semelhante foi reportado por Lima et al. (2022), que também observaram uma diminuição considerável da marcação celular dos conjugados PQ-rhMBL na ausência de íons Ca^{2+} . Vale mencionar, que a presença do EDTA não afetou a propriedade fluorescente do nanossistema (BNPs-rhMBL), uma vez que após adição do agente quelante e na presença de uma lâmpada UV (365 nm) foi possível observar a fluorescência do BNPs-rhMBL.

Até onde sabemos, este é o único estudo que descreve a associação de MNPs, PQs e MBL. Lima et al. (2022) desenvolveram um conjugado a partir de PQs e rhMBL (PQ-rhMBL) com resultados satisfatórios (perto de 100%) para a marcação de células de *C. albicans*.

Considerando a complexidade dos nanossistemas multimodais desenvolvidos neste estudo e uma marcação celular promissora quando comparada com o trabalho de Lima et al. (2022), é possível suportar que o sistema BNPs-rhMBL apresenta potencial de marcação/detecção por fluorescência, e ainda se pode também usufruir das propriedades magnéticas destes nanossistemas possibilitando sua separação. Assim, a nanossonda BNPs-rhMBL pode proporcionar novos caminhos e alternativas para estudos em glicobiologia.

6 CONCLUSÃO

- Foram sintetizados PQs de CdTe estabilizados com AMS que apresentaram estabilidade coloidal e intensa fluorescência.
- Foram sintetizadas MNPs tipo magnetita que foram funcionalizadas efetivamente com o agente silano APTES, conferindo estabilidade coloidal e capacidade de conjugação por meio de grupos amina.
- Os PQs foram eficientemente conjugados às MNPs-APTES, formando um nanossistema bimodal óptico-magnético.
- Foram preparadas nanoplataformas óptico-magnéticas multimodais que apresentaram intensa fluorescência e resposta magnética.
- As BNPs-rhMBL apresentaram potencial de marcação fluorescente ao interagir com células de *C. albicans*, utilizadas como modelo.
- O nanossistema com maior quantidade de rhMBL apresentou marcação mais intensa das leveduras e especificidade, comprovada através de ensaios em meios sem íons Ca^{2+} .
- A nanossonda óptico magnética desenvolvida baseada na rhMBL apresenta grande potencial para estudos glicobiológicos, possibilitando análise por fluorescência e separação biológica.

REFERÊNCIAS

- AHMED, S. R. et al. Quantum dots incorporated magnetic nanoparticles for imaging colon carcinoma cells. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 11, p. 1–9, 2013.
- ARIAS, L. et al. Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications: A Perspective on Synthesis, Drugs, Antimicrobial Activity, and Toxicity. **Antibiotics**, v. 7, p. 1–32, 2018.
- AURITI, C. et al. Mannose-Binding Lectin: Biologic Characteristics and Role in the Susceptibility to Infections and Ischemia-Reperfusion Related Injury in Critically Ill Neonates. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, p. 1–11, 2017.
- BAI, Y. et al. A rapid method for the detection of foodborne pathogens by extraction of a trace amount of DNA from raw milk based on amino-modified silica-coated magnetic nanoparticles and polymerase chain reaction. **Analytica Chimica Acta**, v. 787, p. 93–101, 2013.
- BHUTIA, S. K. et al. Plant lectins in cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death. **Pharmacological Research**, v. 144, n. 1, p. 8–18, 2019.
- BRUS, L. E. Electron-electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state. **The Journal of Chemical Physics**, v. 80, n. 9, p. 4403–4409, 1984.
- CABRAL FILHO, P. E. et al. CdTe quantum dots as fluorescent probes to study transferrin receptors in glioblastoma cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, 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. 1–17, 2017.
- CARDOSO, V. F. et al. Advances in Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications. **Advanced Healthcare Materials**, v. 7, n. 5, p. 1–35, 2018.
- CARVALHO, K. H. G. et al. Fluorescence Plate Reader for Quantum Dot-Protein Bioconjugation Analysis. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 5, p. 3320–3327, 2014.
- 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.
- CESAR, C. L. Quantum Dots as Biophotonics Tools. In: FONTES, A.; SANTOS, B. S. (Ed.). **Quantum Dots: Applications in Biology**. 1. ed. Nova Iorque: Humana Press, 2014, v. 1199, p. 3–9.
- 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.

- 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.
- DAGTEPE, P. et al. Quantized Growth of CdTe Quantum Dots; Observation of Magic-Sized CdTe Quantum Dots. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 41, p. 14977–14983, 2007.
- DI CORATO, R. et al. Multifunctional Nanobeads Based on Quantum Dots and Magnetic Nanoparticles: Synthesis and Cancer Cell Targeting and Sorting. **ACS Nano**, v. 5, n. 2, p. 1109–1121, 2011.
- 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.
- DOMMETT, R. M.; KLEIN, N.; TURNER, M. W. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. **Tissue Antigens**, v. 68, n. 3, p. 193–209, 2006.
- 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.
- DOULAMI, C. et al. Mannose-Binding Lectin in Human Health and Disease. In: KISHORE, U.; MADAN, T.; SIM, R. B. (Ed.). **The Collectin Protein Family and Its Multiple Biological Activities**. 1. ed. Cham: Springer International Publishing, 2021, v. 1, p. 17–47.
- ESTEVE-TURRILLAS, F. A.; ABAD-FUENTES, A. Applications of quantum dots as probes in immunosensing of small-sized analytes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 41, n. 1, p. 12–29, 2013.
- FRANCISQUINI, E.; SCHOENMAKER, J.; SOUZA, J. A. Nanopartículas Magnéticas e suas Aplicações. In: ADILSO, B.; WENDEL ANDRADE, A. (Ed.). **Química Supramolecular e Nanotecnologia**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2014, v. 10p. 269–289.
- GANAU, M. et al. How Nanotechnology and Biomedical Engineering Are Supporting the Identification of Predictive Biomarkers in Neuro-Oncology. **Medicines**, v. 5, n. 1, p. 1–11, 2018.
- 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.
- GARRED, P. et al. Mannose-Binding Lectin Is a Disease Modifier in Clinical Malaria and May Function as Opsonin for *Plasmodium falciparum* - Infected Erythrocytes. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 9, p. 5245–5253, 2003.
- 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.
- GHASEMI, R. et al. Optical biosensing of Streptococcus agalactiae based on core/shell magnetic nanoparticle-quantum dot. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 411, n. 25, p. 6733–6743, 2019.
- HARDISON, S. E.; BROWN, G. D. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. **Nature Immunology**, v. 13, n. 9, p. 817–822, 2012.
- HEITZENEDER, S. et al. Mannan-binding lectin deficiency — Good news, bad news, doesn't matter? **Clinical Immunology**, v. 143, n. 1, p. 22–38, 2012.

- HOLZINGER, M.; LE GOFF, A.; COSNIER, S. Nanomaterials for biosensing applications: a review. **Frontiers in Chemistry**, v. 2, p. 1–10, 2014.
- IDA, N. Magnetic Materials and Properties. In: **Engineering Electromagnetics**. 4. ed. Cham: Springer International Publishing, 2021. v. 1, p. 419–487.
- JACK, D. L.; KLEIN, N. J.; TURNER, M. W. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. **Immunological Reviews**, v. 180, n. 1, p. 86–99, 2001.
- JIANG, Z. et al. The simultaneous detection of free and total prostate antigen in serum samples with high sensitivity and specificity by using the dual-channel surface plasmon resonance. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 62, p. 268–273, 2014.
- KAIRDOLF, B. A. et al. Semiconductor Quantum Dots for Bioimaging and Biodiagnostic Applications. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 143–162, 2013.
- KRISHNA, V. D. et al. Nanotechnology: Review of concepts and potential application of sensing platforms in food safety. **Food Microbiology**, v. 75, p. 47–54, 2018.
- KUMAR, N.; SINHA RAY, S. Synthesis and functionalization of nanomaterials. In: RAY, S. S. (Ed.). **Processing of Polymer-based Nanocomposites**. Cham: Springer International Publishing, 2018, v. 277, p. 15–55.
- LARVIE, M. et al. Mannose-Binding Lectin Binds to Amyloid Protein and Modulates Inflammation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1–12, 2012.
- LEIKINA, E. et al. Carbohydrate-binding molecules inhibit viral fusion and entry by crosslinking membrane glycoproteins. **Nature Immunology**, v. 6, n. 10, p. 995–1001, 2005.
- LEITE, B. O ano internacional da tabela periódica e o ensino da química: das cartas ao digital. **Química Nova**, v. 42, n. 6, p. 702–710, 2019.
- LI, D. et al. MBL-Mediated Opsonophagocytosis of *Candida albicans* by Human Neutrophils Is Coupled with Intracellular Dectin-1-Triggered ROS Production. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e50589, 2012.
- 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.
- LIMA, C. N. et al. Interactions of mannose binding-lectin with red blood cells by employing cationic quantum dots. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 125, p. 1168–1174, 2019.
- LIMA, C. N. et al. Mannose-binding lectin conjugated to quantum dots as fluorescent nanotools for carbohydrate tracing. **Methods and Applications in Fluorescence**, v. 10, p. 1–12, 2022.
- MARCELO, G. A. et al. Magnetic, fluorescent and hybrid nanoparticles: From synthesis to application in biosystems. **Materials Science and Engineering C**, v. 106, p. 1–31, 2020.
- MARTINS, M. A.; TRINDADE, T. Os Nanomateriais e a Descoberta de Novos Mundos na Bancada do Químico. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1434–1446, 2012.
- MERLE, N. S. et al. Complement System Part I: Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 1–30, 2015.

- MICHALET, X.; BENTOLILA, L. A.; WEISS, S. Molecular Imaging: Physics and Bioapplications of Quantum Dots. In: WOLBARST, A. B.; MMOSSMAN, K. L.; HENDEE, W. (Ed.). **Advances In Medical Physics**. 1. ed. Madison: Medical Physics Publishing, 2008, v. 1p. 111–127.
- MONTAZER, M.; HARIFI, T. Magnetic nanofinishes for textiles. In: **Nanofinishing of Textile Materials**. 1. ed. Sawston: Woodhead Publishing, v. 1p. 225–240, 2018.
- NETH, O. et al. Mannose-Binding Lectin Binds to a Range of Clinically Relevant Microorganisms and Promotes Complement Deposition. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 688–693, 2000.
- 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.
- PEREIRA, M. G. C. et al. Quantum Dots. In: SANCHEZ-DOMINGUEZ, M. C. R.-A. (Ed.). **Nanocolloids: A Meeting Point for Scientists and Technologists**. 1. ed. Nova Iorque: Elsevier, 2016, v. 1p. 131–158.
- 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. 215–262, 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.
- RENGERS, C.; GAPONIK, N.; EYCHMÜLLER, A. Quantum Dots and Quantum Rods. In: GEHR, P.; ZELLNER, R. (Ed.). **Biological Responses to Nanoscale Particles**. 1. ed. Cham: Springer International Publishing, 2019, v. 1, p. 29–51.
- RIBEIRO, J. F. F. et al. Quantum dots-based fluoroimmunoassay for anti-Zika virus IgG antibodies detection. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 194, p. 135–139, 2019.
- 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. 1–8, 2019.
- 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, B. S.; FARIAS, P. M. A.; FONTES, A. Semiconductor Quantum Dots for Biological Applications. In: MOHAMED HENINI (Ed.). **Handbook of Self Assembled Semiconductor Nanostructures for Novel Devices in Photonics and Electronics**1. 1. ed. Nova Iorque: Elsevier Science, 2008. v. 1, p. 773–798.
- SARMA, J. V.; WARD, P. A. The complement system. **Cell and Tissue Research**, v. 343, n. 1, p. 227–235, 2011.
- SECHOVSKÝ, V. Magnetism in Solids: General Introduction. In: BUSCHOW, K. H. J. et al. (Ed.). **Encyclopedia of Materials: Science and Technology**. 1. ed. Londres: Elsevier, 2001. v. 1, p. 5018–5032.

- SEELEN, M. A. et al. Functional analysis of the classical, alternative, and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA. **Journal of Immunological Methods**, v. 296, n. 1–2, p. 187–198, 2005.
- SILVA, F. O. et al. O estado da arte da síntese de semicondutores nanocristalinos coloidais. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1933–1939, 2010.
- SINNECKER, J. P. Materiais Magnéticos Doces e Materiais Ferromagnéticos Amorfos. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 22, n. 3, p. 396–405, 2000.
- SMITH, A. M.; GAO, X.; NIE, S. Quantum Dot Nanocrystals for In Vivo Molecular and Cellular Imaging. **Photochemistry and Photobiology**, v. 80, n. 3, p. 377–385, 2004.
- STAFFORD, S.; GARCIA, R. S.; GUN'KO, Y. K. Multimodal magnetic-plasmonic nanoparticles for biomedical applications. **Applied Sciences**, v. 8, p. 1–16, 2018.
- TAPEINOS, C. Magnetic Nanoparticles and Their Bioapplications. In: CIOFANI, G. (Ed.). **Smart Nanoparticles for Biomedicine**. 1. ed. Londres: Elsevier, 2018, v. 1p. 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.
- VELDHUIZEN, E. J. A.; VAN EIJK, M.; HAAGSMAN, H. P. The carbohydrate recognition domain of collectins. **FEBS Journal**, v. 278, n. 20, p. 3930–3941, 2011.
- WAGNER, A. M. et al. Quantum dots in biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, v. 94, n. 1, p. 44–63, 2019.
- WALLYN, J.; ANTON, N.; VANDAMME, T. F. Synthesis, principles, and properties of magnetite nanoparticles for in vivo imaging applications—A review. **Pharmaceutics**, v. 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. 1–8, 2019.
- WANG, J. et al. Studies on bioconjugation of quantum dots using capillary electrophoresis and fluorescence correlation spectroscopy. **Electrophoresis**, v. 33, n. 13, p. 1987–1995, 2012.
- YOO, D. et al. One pot synthesis of amine-functionalized and angular-shaped superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MR/fluorescence bimodal imaging application. **RSC Advances**, v. 7, p. 12876–12885, 2017.
- 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.