



Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



**Aluízio Gonçalves Brasil Júnior**

**Obtenção de bioconjugados anti-NS1 DENV com pontos quânticos fluorescentes como insumos para ensaios diagnósticos da dengue**

Recife – PE  
Julho, 2014



Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



**Aluízio Gonçalves Brasil Júnior**  
(Bolsista CAPES)

**Obtenção de bioconjugados anti-NS1 DENV com pontos quânticos fluorescentes como insumos para ensaios diagnósticos da dengue**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPE como parte dos requisitos necessários para a obtenção de título de doutor.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Beate Saegesser Santos

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Adriana Fontes

Recife-PE, Brasil  
Julho, 2014

Catálogo na Fonte  
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

B823o Brasil Júnior, Aluizio Gonçalves.  
Obtenção de bioconjugados anti-NS1 DENV com pontos quânticos fluorescentes como insumos para ensaios diagnósticos da dengue / Aluizio Gonçalves Brasil Júnior. – 2014.  
109 f: il.; tab.; 30 cm.

Orientador (a): Beate Saegesser Santos.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2014.  
Inclui referências e apêndices.

1. Dengue. 2. Pontos quânticos. 3. Diagnóstico. 4. Imunoensaio. I. Santos, Beate Saegesser (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2017-041)

ALUÍZIO GONÇALVES BRASIL JUNIOR

**OBTENÇÃO DE BIOCONJUGADOS ANTI-NS1 DENV COM PONTOS  
QUÂNTICOS FLUORESCENTES COMO INSUMOS PARA ENSAIOS  
DIAGNÓSTICOS DA DENGUE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 01/08/2014.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Beate Saegesser Santos (Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Dalci José Bondani (Examinadora Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marli Tenório Cordeiro (Examinadora Externa)  
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosa Amália Fireman Dutra (Examinadora Externa)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Júlio Santos Rebolças (Examinador Externo)  
Universidade Federal da Paraíba

*À minha esposa, Kilmara Higia Gomes Carvalho, por todo amor, paciência, estímulo, parceria e dedicação durante a realização deste trabalho.*

*À minha mãe, Alda Maria de Lima, pelas constantes demonstrações de amor, companheirismo, compreensão e pelos sábios ensinamentos.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas bênçãos concedidas, pelo direcionamento na carreira acadêmica e por dar-me forças durante a realização deste trabalho.

À professora Beate pela amizade, confiança, ensinamentos, compreensão e paciência durante estes anos de orientação. Um agradecimento em especial, pois sem o seu apoio e incentivo este trabalho seria apenas uma perspectiva.

À professora Adriana Fontes pelos ensinamentos, suporte e relevantes discussões.

À pesquisadora Dr<sup>a</sup> Marli Tenório pelos anticorpos, células C6/36, proteínas e principalmente pelas orientações valiosas nos ensaios de detecção da NS1.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas: Coordenador, Vice-coordenador, professores e secretárias por toda atenção e dedicação.

Aos colegas do laboratório de Biofísica-Química da UFPE.

Em especial a Cida, Anna Livia e Paulo pelo suporte nos experimentos de marcação de células C6/36.

A Tarcyla Andrade do Departamento de Física/UFPE pelo DRX.

A Universidade da Flórida pelas imagens de microscopia eletrônica de transmissão.

A CAPES pela bolsa concedida.

A minha esposa Kilmara, pelo amor, dedicação, compreensão e parceria durante o desenvolvimento do trabalho.

À minha mãe por todo carinho, amor e incentivo.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração deste trabalho.

Obrigado!

## RESUMO

O vírus do dengue (DENV) pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, possuindo RNA genômico de fita simples e apresentando quatro sorotipos antigenicamente relacionados (DENV 1-4). A identificação precoce dos casos de dengue é de vital importância para a tomada de decisões e implementação de medidas de maneira oportuna. No entanto, os métodos de eleição para o diagnóstico das infecções pelos DENV (ensaios imunoenzimáticos de captura de anticorpos das classes IgM e IgG) apesar de possibilitarem a análise rápida e reprodutível, apresentam a limitação da não detecção da enfermidade em sua fase inicial. Tendo por finalidade suplantar essa dificuldade, a obtenção de insumos que possam ser empregados em fluoroimunoensaios de detecção da proteína viral solúvel NS1, apresenta acentuada relevância. Pontos quânticos (PQs) fluorescentes de CdTe foram preparados em água com os estabilizantes, cisteamina (CTM) e ácido mercaptosuccínico (MSA). Os PQs obtidos exibiram elevada fluorescência e estabilidade coloidal, realizando-se a caracterização óptica (emissão/excitação/absorção) e estrutural (DRX/MET). Anticorpos monoclonais anti-NS1 DENV (Mab-anti NS1) específicos para os quatro sorotipos do DENV foram acoplados covalentemente aos PQs, via agentes de acoplamento. Microplacas negras de poliestireno foram previamente sensibilizadas com a proteína viral NS1 nativa, e os bioconjugados obtidos (PQs-Mab anti-NS1) foram utilizados em fluoroimunoensaios de detecção da proteína viral. Os bioconjugados de CdTe/MSA-anti-NS1 DENV para os quatro sorotipos apresentaram resultados promissores nos ensaios de detecção da proteína viral NS1, destacando-se o bioconjugado constituído pelo anticorpo monoclonal anti-NS1 DENV-2. Os bioconjugados foram empregados em ensaios de marcação de células fixadas e não fixadas clone C6/36 infectadas com DENV2, obtendo-se resultados satisfatórios para as células não fixadas.

Palavras-chave: Dengue. Pontos quânticos. Diagnóstico. Imunoensaio

## ABSTRACT

The dengue virus (DENV) belongs to the *Flavivirus* *g*ener, *Flaviviridae* family possessing a single-stranded RNA genome and 4 antigenic related serotypes (DENV1 – 4). The early dengue diagnosis is vital for the efficient medical intervention. The existing diagnostic methods for the DENV infections (immunoenzymatic antibody capture based methods of the IgM and IgG classes) although precise and fast still present limitations related to the diagnosis at early stages of the pathology. Aiming the development of new diagnostic products for the immunodetection of the NS1 soluble viral protein is still of great importance. Fluorescent CdTe quantum dots (QDs) were prepared in aqueous medium applying mercaptosuccinic acid (MSA) and cysteamine (CTM) as stabilizing agents and used to produce an immunodiagnostic tool for the DENV detection. The QDs showed high fluorescent yield and great colloidal stability and were characterized by X-ray diffractometry, Electronic transmission microscopy, zeta potential and spectroscopic measurements. Monoclonal anti-NS1 DENV (Mab-anti NS1) antibodies specific for the 4 serotypes were covalently attached to the QDs via coupling agents. Black polystyrene microplates were sensibilized with the viral NS1 native protein and the (QDs-Mab anti-NS1) bioconjugates were applied in immunoassays aiming the detection of the viral protein. The CdTe/MSA-anti-NS1 DENV bioconjugates applied for the four serotypes showed promising results in the detection assays of the viral NS1 protein, being the most efficient the bioconjugate that used the monoclonal anti-NS1 DENV-2. The bioconjugates were used in the staining of fixed and live cells of the clone C6/36 infected with DENV2. The results were satisfactory for the live cells.

Keywords: Dengue. Quantum dots. Diagnosis. Imunnoassay.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\epsilon$	Coeficiente de extinção molar
BC	Banda de condução
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> – Albumina sérica bovina
BV	Banda de valência
CdTe/CTM	Telureto de cádmio estabilizado pela cisteamina
CdTe/MSA	Telureto de cádmio estabilizado pelo ácido mercaptosuccínico
CF	<i>Complement fixation test</i> – Teste de fixação do complemento
CPS	<i>Counting Photons per Second</i> – Contagem de Fótons por Segundo
CTM	Cisteamina
DC	Dengue clássica
DENV	Dengue vírus
DG	Dengue grave
DRX	Difratometria de raios-X
DSA	Dengue com sinal de alarme
EDC	Cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
<i>Eg</i>	Barreira energética ou <i>band gap</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> - Ensaio de imunoadsorção ligado a enzima
FHD	Febre hemorrágica do dengue
FL <sub>relativa</sub> (%)	Fluorescência relativa
FWHM	<i>Full Width at Half Maximum</i> - Largura de banda à meia altura
HI	<i>Hemagglutination inhibition assay</i> – Ensaio de inibição da hemaglutinação
IFI	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina G humana
IgM	Imunoglobulina M humana
Mab	<i>Monoclonal antibody</i> - Anticorpo monoclonal
MBP	<i>Maltose binding protein</i> – Proteína ligante de maltose
mNS1	NS1 associada à membrana
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> – Multiplicidade de infecção
MSA	<i>Mercaptosuccinic acid</i> – Ácido mercaptosuccínico

NPs	Nanopartículas
NT	<i>Neutralization test</i> – Teste de neutralização
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> – Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pK <sub>COOH</sub>	Constante de acidez / ionização
PQs	Pontos Quânticos
rpm	Rotações por minuto
SCD	Síndrome do choque do dengue
SE	Semana epidemiológica
sNS1	NS1 secretada
Sulfo-NHS	<i>N</i> -hidroxisulfosuccinimida
Sulfo-SMCC	Sulfosuccinimidil 4-[ <i>N</i> -maleimidometil] ciclohexano-1-carboxilato
TCEP	<i>Tris</i> -2(carboxietil)fosfina
u.a.	Unidades arbitrárias
UV-Vis	Ultravioleta visível
$\lambda_{exc}$	Comprimento de Onda de Excitação

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1** – Dependência do tamanho de nanopartículas de materiais semicondutores quantizados com a diferença energética ( $E_g$ ) entre sua banda de valência e banda de condução. Fotografia de diferentes suspensões coloidais de CdSe/ZnS com diferentes diâmetros, evidenciando sua emissão sob excitação em  $\lambda = 365$  nm (adaptado de FORTINA, 2005).....23
- Figura 3.2** – Esquema de um sistema híbrido bioinorgânico típico empregando ponto quântico tipo *core-shell* (FONTES, 2012).....25
- Figura 3.3** – Esquema reacional do processo de bioconjugação entre o ponto quântico e a imunoglobulina G empregando o EDC (Cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) como agente de acoplamento (adaptado de HERMANSON, 2008).....28
- Figura 3.4** – Estrutura química da EDC [Cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida]. .....29
- Figura 3.5** – Estrutura da Sulfo-NHS (*N*-hidroxisulfosuccinimida).....29
- Figura 3.6** – Estrutura da Sulfo-SMCC - sulfosuccinimidil 4-[*N*-maleimidametil]ciclohexano-1-carboxilato.....30
- Figura 3.7** – Esquema reacional do processo de bioconjugação entre o ponto quântico e a imunoglobulina G empregando o Sulfo-SMCC como agente de acoplamento (adaptado de HERMANSON, 2008).....31
- Figura 3.8** – Número de casos de dengue por semana epidemiológica (adaptado de Boletim Epidemiológico SE-26 SVS/MS, 2014).....37
- Figura 3.9** – Perfil de expressão dos anticorpos e da NS1 durante a fase sintomática da dengue (adaptado de <http://www.retroscope.eu/wordpress/dengue-virus/>).....41
- Figura 4.1** – Fórmulas estruturais dos agentes estabilizantes/funcionalizantes empregados no processo de obtenção de pontos quânticos de CdTe, ácido mercaptosuccínico (A) e Cisteamina (B).....43
- Figura 4.2** - Esquema geral das etapas envolvidas no processo de obtenção das nanopartículas de CdTe em meio aquoso neste trabalho.....44
- Figura 4.3** – Aparato experimental empregado nas sínteses de CdTe em meio aquoso. ....45
- Figura 4.4** - Representação Esquemática do processo de detecção da proteína viral NS1 DENV-2 por análise de fluorescência em microplaca.....51
- Figura 5.1** – Esquema geral das etapas relacionadas à formação das nanopartículas de CdTe em meio coloidal. Cd-Est (Est = estabilizante) é o complexo inicialmente formado entre os íons  $Cd^{2+}$  e o agente estabilizante utilizado. ....54
- Figura 5.2** – Esquema ilustrativo do processo de passivação que ocorre na superfície dos PQs. BV = banda de valência; BC = banda de condução.....55
- Figura 5.3** – À esquerda observa-se uma imagem do resultado da obtenção de sistema coloidal contendo CdTe/MSA à direita uma imagem do mesmo sistema

sob excitação no UV ( $\lambda = 365$ nm). .....	57
<b>Figura 5.4</b> – Fotografia representativa dos sistemas obtidos evidenciando as diferenças ópticas com o tempo reacional. A esquerda observa-se a imagem de alíquotas de CdTe/CTM e a direita observa-se o mesmo sistema sob excitação no UV ( $\lambda = 365$ nm). .....	58
<b>Figura 5.5</b> – Fotografia da suspensão de CdTe/CTM utilizada para o desenvolvimento do fluoroimunoensaio. À esquerda observa-se o resultado direto da síntese e à direita observa-se o mesmo sistema sob excitação no UV ( $\lambda = 365$ nm). .....	59
<b>Figura 5.6</b> - Difratoograma de Raios-X de pó da amostra de PQs de CdTe/MSA.....	59
<b>Figura 5.7</b> – Microscopia eletrônica de transmissão representativa de NPs de CdTe/MSA (regiões mais elétrons densas da imagem). Barra = 10 nm.....	60
<b>Figura 5.8</b> – Espectros de absorção (em preto) e emissão (em vermelho) da suspensão de PQs de CdTe/MSA ( $\lambda_{exc} = 365$ nm). O primeiro máximo de absorção foi estimado em $\lambda = 550$ nm e o máximo de emissão ocorre em $\lambda = 602$ nm. Com FWHM = 51 nm.....	61
<b>Figura 5.9</b> - Difratoograma de Raios-X de pó da amostra de PQs de CdTe/CTM.....	63
<b>Figura 5.10</b> - Espectros de absorção da suspensão de PQs de CdTe/CTM em diferentes intervalos de tempo reacional (1h, 2h, 4h e 6h).....	64
<b>Figura 5.11</b> – Análise comparativa entre os resultados encontrados por Dagtepe (2007) e o presente trabalho, correlacionando o 1º máximo de absorção ao diâmetro médio dos PQs.....	65
<b>Figura 5.12</b> – Variação temporal dos espectros de emissão da suspensão de PQs de CdTe/CTM (1h, 2h, 4h e 6h), sob excitação em $\lambda = 420$ nm.....	66
<b>Figura 5.13</b> - Espectros de excitação da suspensão de PQs de CdTe/CTM com diferentes intervalos de tempo reacional ( $t = 1$ h, 2h, 4h e 6h) observando-se para cada espectro o máximo de emissão descrito na Figura 5.12.....	67
<b>Figura 5.14</b> – Espectros de absorção (preto) e emissão (vermelho) da suspensão de PQs de CdTe/CTM ( $\lambda_{exc} = 365$ nm). FWHM <sub>emissão</sub> = 45 nm.....	68
<b>Figura 5.15</b> - Espectro de excitação representativo da suspensão de PQs de CdTe/CTM obtida com tempo reacional $t = 4$ h, observando-se emissão em $\lambda = 605$ nm.....	69
<b>Figura 5.16</b> – À esquerda observam-se imagens dos bioconjugados CdTe/MSA-anti-NS1 DENV dos quatro sorotipos e à direita imagem dos mesmos sistemas sob excitação no UV ( $\lambda = 365$ nm). .....	71
<b>Figura 5.17</b> – Espectros de absorção e emissão da suspensão de PQs de CdTe/MSA e dos bioconjugados CdTe/MSA-anti-NS1 DENV-1 e DENV-2 ( $\lambda_{exc} = 365$ nm). .....	72
<b>Figura 5.18</b> – Espectros de absorção e emissão da suspensão de PQs de CdTe/MSA e dos bioconjugados CdTe/MSA-anti-NS1 DENV-3 e DENV-4 ( $\lambda_{exc} = 365$ nm). .....	72

<b>Figura 5.19</b> – Imagem dos bioconjugado CdTe/CTM-anti-NS1 DENV e do mesmo sistema sob excitação no UV ( $\lambda = 365\text{nm}$ ). .....	74
<b>Figura 5.20</b> – Espectros de emissão da suspensão de PQs de CdTe/CTM e dos bioconjugados CdTe/MSA-anti-NS1 DENV-1 e DENV-2 ( $\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$ ).....	75
<b>Figura 5.21</b> – Resultado das leituras feitas nos ensaios de fluorescência em microplacas obtidos para os conjugados CdTe/MSA-anti-NS1 (quatro diferentes sorotipos) e controles.....	78
<b>Figura 5.22</b> – Comparativo entre os valores da detecção inicial e os resultados obtidos com CdTe/MSA anti-NS1 DENV-2 e CdTe/MSA anti-NS1 DENV-3 após 30 dias de armazenamento em refrigerador.....	80
<b>Figura 5.23</b> – Resultados obtidos com os conjugados CdTe/CTM-anti-NS1 DENV-2, CdTe/CTM-anti-NS1 DENV-3 e controles.....	81
<b>Figura 5.24</b> – Resultados obtidos no experimento de marcação de células C6/36 não fixadas com o conjugado CdTe/MSA-anti-NS1 DENV-2 (séries A e B). As imagens da série C representam células não fixadas incubadas com PQs de CdTe/MSA não bioconjugados. As imagens com índice 1 representam imagens de contraste de fase, com índice 2 representam imagens de fluorescência e as de índice 3 são superposições das séries 1 e 2. Imagem D representam células infectadas por DENV-2 sem PQs.....	83

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 5.1** – Resultados da análise de detecção de fluorescência dos conjugados CdTe/MSA-anti-NS1 DENV (quatro sorotipos) em microplaca.  $FL_{rel}$  (%) corresponde ao aumento relativo da fluorescência do bioconjugado com relação ao sinal dos controles estimada pela Equação (5).....79
- Tabela 5.2** – Resultados da análise de detecção de fluorescência dos conjugados CdTe/MSA-anti-NS1 DENV (quatro sorotipos) em microplaca sensibilizada com BSA 4%.....80
- Tabela 5.3** – Resultados da análise de detecção de fluorescência dos conjugados CdTe/MSA-anti-NS1 DENV-2 e DENV-3, inicial e após 30 dias.  $FL_{rel}$  (%) corresponde ao aumento relativo da fluorescência do bioconjugado com relação ao sinal dos controles estimada pela Equação (5).....81
- Tabela 5.4** – Resultados da análise de detecção de fluorescência dos conjugados CdTe/CTM-anti-NS1 DENV-2 e DENV-3 em microplaca.  $FL_{rel}$  (%) corresponde ao aumento relativo da fluorescência do bioconjugado com relação ao sinal dos controles estimada pela Equação (5).....82

## LISTA DE EQUAÇÕES

(1) Equação empírica de Dagtepe.....	48
(2) Equação de determinação do coeficiente de extinção molar.....	48
(3) Equação da relação de Lambert-Beer.....	48
(4) Equação de Scherrer.....	49
(5) Equação de Fluorescência Relativa em percentual.....	77

## SUMÁRIO

1	Introdução.....	18
2	Objetivos.....	21
2.1	Objetivo geral.....	21
2.2	Objetivos específicos.....	21
3	Referencial teórico.....	22
3.1	Pontos quânticos.....	22
3.2	Bioconjugação.....	25
3.3	Compostos orgânicos utilizados em bioconjugação.....	27
3.3.1	Crosslinkers.....	27
3.3.2	Carbodiimida (EDC) .....	28
3.3.3	Sulfo-SMCC.....	29
3.4	Análise de bioconjugados em microplacas.....	31
3.5	Dengue.....	32
3.5.1	Vírus dengue.....	32
3.5.2	Aspectos históricos e dengue no Brasil.....	34
3.5.3	Resposta imune.....	37
3.5.4	Diagnóstico laboratorial da dengue.....	38
4	Materiais e métodos.....	42
4.1	Preâmbulo.....	42
4.2	Preparação das nanopartículas de CdTe em meio aquoso.....	43
4.3	Bioconjugação de NPs de CdTe/MSA com anticorpos monoclonais anti-NS1 DENV.....	45
4.4	Bioconjugação de NPs de CdTe/CTM com anticorpos monoclonais anti-NS1 DENV.....	46
4.5	Caracterização óptica dos bioconjugados e das NPs de CdTe/MSA e	

CdTe/CTM.....	47
4.6 Caracterização estrutural das NPs de CdTe/MSA e CdTe/CTM.....	48
4.7 Detecção da proteína viral NS1 por análise de fluorescência em microplacas.....	49
4.8 Marcação de células clone C6/36 com bioconjugado CdTe/MSA-anti-NS1 DENV-2.....	52
5 Resultados e Discussão.....	54
5.1 Preparação dos pontos quânticos de CdTe em meio aquoso – considerações sobre os processos de obtenção.....	54
5.1.1 Sistema estabilizado pelo ácido mercaptosuccínico.....	56
5.1.2 Sistema estabilizado pela cisteamina.....	57
5.2 Caracterização estrutural das NPs de CdTe/MSA.....	59
5.3 Propriedades ópticas das suspensões de CdTe/MSA.....	61
5.4 Caracterização estrutural das NPs de CdTe/CTM.....	63
5.5 Propriedades ópticas das suspensões de CdTe/CTM.....	64
5.6 Bioconjugação de NPs de CdTe/MSA com anticorpos monoclonais anti-NS1 DENV.....	69
5.7 Propriedades ópticas dos bioconjugados CdTe/MSA – anti-NS1 DENV.....	71
5.8 Bioconjugação de NPs de CdTe/CTM com anticorpos monoclonais Anti-DENV.....	73
5.9 Propriedades ópticas dos bioconjugados CdTe/CTM – anti-NS1 DENV.....	75
5.10 Detecção da proteína viral NS1 por análise de fluorescência em microplacas.....	76
5.11 Marcação de células C6/36 com bioconjugado CdTe/MSA-anti-NS1 DENV-2.....	82
6 Conclusões e Perspectivas.....	85
Referências.....	87
Apêndice.....	93
Apêndice A: Fluorescence Plate Reader for Quantum Dot-Protein Bioconjugation Analysis.....	94

Apêndice B: Quantum Dots: Applications in Biology (Methods in Molecular Biology, Book 1199).....	102
--	-----

# 1 INTRODUÇÃO

A dengue é uma das mais importantes arboviroses que infecta o homem, tendo se difundido muito rapidamente no Brasil e no mundo. Segundo a OMS, nos últimos 50 anos ocorreu um aumento de cerca de 30 vezes no número de casos registrados anualmente em todo mundo, com expansão do vírus em diferentes países e migração do perímetro urbano para zona rural. São estimados aproximadamente 50 milhões de casos a cada ano, com uma população de 2,5 bilhões de pessoas residindo em regiões endêmicas (OMS, 2009).

O vírus do dengue (DENV) pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, e apresenta quatro sorotipos antigenicamente relacionados (DENV 1-4), diferenciados por provas bioquímicas, sorológicas e por técnicas moleculares de amplificação do genoma viral, que têm evidenciado a existência de genótipos distintos pertencentes ao mesmo sorotipo (VEZZA, 1980). A infecção com um sorotipo confere imunidade protetiva permanente apenas contra este sorotipo (homóloga), ocorrendo apenas temporariamente a imunidade cruzada (heteróloga) (MARTINEZ, 2008; RODENHUIS-ZYBERT, 2010).

Os quatro sorotipos podem causar manifestações clínicas que variam desde infecções assintomáticas, passando pelo estado febril da dengue, podendo o paciente apresentar complicações adicionais como vômitos persistentes, sangramento de mucosas ou síndromes mais severas caracterizadas por hemorragia e choque hipovolêmico, denominadas respectivamente de dengue com sinais de alarme (DSA) e dengue grave (DG) (OMS, 2009).

Atualmente, várias vacinas específicas para dengue encontram-se em desenvolvimento, mas nenhuma ainda liberada para uso. Assim como, não há um tratamento antiviral específico para o DENV. Para que possa haver um tratamento eficaz que impeça a progressão da doença para a forma grave, a doença precisa ser diagnosticada ainda na fase inicial. Contudo, o diagnóstico precoce, preciso e rápido, realizado ainda na fase aguda da infecção apresenta algumas dificuldades inerentes à execução dos testes específicos que podem ser realizados. Por outro lado, os métodos mais utilizados, rotineiramente, para confirmar o caso agudo de dengue são os sorológicos, que detectam a presença de anticorpos IgM ou IgG, e não a presença do vírus ou da proteína NS1 (ARAÚJO, 2002).

Dentre os métodos sorológicos de rotina utilizados para detectar anticorpos

para os vírus dengue, podemos citar: o método imunoenzimático (ELISA), que detecta IgM e IgG; inibição da hemaglutinação (HI) que detecta anticorpos totais; o teste de neutralização (NT), que é específico para cada sorotipo (ARAÚJO, 2002). Essas metodologias apesar de serem as mais empregadas, em geral, apresentam a possibilidade de reações cruzadas com epítomos compartilhados entre os sorotipos e por outros patógenos da mesma família. Uma das principais limitações dos métodos diagnósticos de rotina reside no fato de que os anticorpos IgM anti-DENV somente são detectados a partir do quinto dia após o início dos sintomas, tornando-se, portanto, pouco precisos para um diagnóstico precoce (GUZMÁN, 1996).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é a técnica de escolha para detectar a presença do vírus no sangue do paciente. Contudo, o processo laborioso e o custo elevado desse método torna inviável o seu emprego em situações de surtos epidêmicos. A proteína não estrutural NS1 é uma glicoproteína liberada das células infectadas na fase de replicação do DENV, sendo encontrada em amostras da fase aguda do sangue de pacientes com infecções primárias ou secundárias. Esta proteína pode ser detectada antes da formação dos anticorpos IgM e IgG, pois em geral está presente no soro durante o início da sintomatologia clínica e se prolonga até o sexto dia após, tornando-se uma ferramenta útil no diagnóstico precoce da doença (GUZMAN, 2010; FUCHS, 2014).

Diante desse prognóstico, o desenvolvimento de técnicas sorológicas, não onerosas e de fácil execução, que possam ser empregadas na rotina dos laboratórios, tendo como objetivo detectar a proteína NS1 no soro de pacientes, apresenta grande relevância. Desse modo, a necessidade de métodos de detecção precoces e seletivos para o diagnóstico do vírus dengue, tem incentivado pesquisadores a desenvolverem abordagens diagnósticas inovadoras, destacando-se os ensaios imunológicos com emprego de sondas fluorescentes (BRUCHEZ, 1998; MEDINTZ, 2005). Inseridos nessa perspectiva, os pontos quânticos (PQs), do inglês *quantum dots*, se apresentam como sondas fluorescentes promissoras para emprego em imune ensaios para metodologias diagnósticas (MICHALET, 2005; BRUCHEZ, 2007).

Desde que foram descritos os primeiros experimentos desenvolvidos por Alivisatos e Nie sobre o emprego de PQs fluorescentes de semicondutores (*quantum dots*) como potenciais biomarcadores, os PQs têm se revelado eficazes como sondas fluorescentes em ensaios bioanalíticos (SANTOS, 2008). Esses marcadores

apresentam vantagens frente aos fluoróforos convencionais empregados em métodos de marcação celular e diagnóstico. Dentre elas podemos destacar: (i) emissão em diversos comprimentos de onda para um mesmo material, (ii) elevada fotoestabilidade, (iii) baixa citotoxicidade, (iv) diversas possibilidades de conjugação a biomoléculas, (v) marcação múltipla simultânea de diversos componentes e estruturas celulares em células vivas ou fixadas, além do fato de que (vi) os resultados podem ser obtidos com tempo de incubação da ordem de alguns minutos (BRUCHEZ, 2007).

Um fator determinante a ser considerado no emprego dos PQs em ensaios bioanalíticos é a etapa de bioconjugação. Durante o processo, a biomolécula é ligada covalentemente ao nanomarcador, sendo o processo viabilizado por agentes de acoplamento heterobifuncionais. Dentre os agentes de acoplamento heterobifuncionais existentes, a carbodiimida alifática *N*-substituída hidrossolúvel, cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), promove a ligação covalente entre grupamentos amina das proteínas e carboxilatos presentes na superfície de algumas NPs. O sulfosuccinimidil 4-[*N*-maleimidometil] ciclohexano-1-carboxilato (Sulfo-SMCC) contém os grupamentos *N*-hidroxisuccinimida (éster NHS) e maleimidias. O primeiro grupamento reage com aminas primárias em pH na faixa de 7-9 formando ligações amidas estáveis, enquanto o segundo reage com grupamentos sulfidrilas com pH entre 6,5 e 7,5 formando ligações tioéteres estáveis (HERMANSON, 2008). Para essa finalidade, faz-se necessário a síntese e emprego de PQs com grupamentos amina superficiais disponíveis, empregando-se o agente estabilizante cisteamina (CTM) durante a preparação.

Diante das perspectivas e desafios apresentados, este projeto tem por finalidade obter bioconjugados anti-NS1 DENV com pontos quânticos fluorescentes visando um futuro emprego em ensaios diagnósticos de detecção da proteína NS1 em soros de paciente, com emprego de microplacas de poliestireno.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Obter bioconjugados anti-NS1 DENV dos quatro sorotipos com pontos quânticos fluorescentes de telureto de cádmio (CdTe), com emprego em ensaios de detecção da proteína viral NS1 por análise de fluorescência em microplacas.

### 2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar pontos quânticos de telureto de cádmio (CdTe) em meio aquoso, empregando como agentes estabilizantes o ácido mercaptosuccínico (MSA) e a cisteamina (CTM).
- Realizar a caracterização óptica e estrutural dos pontos quânticos obtidos.
- Desenvolver e testar protocolos de conjugação entre os anticorpos monoclonais anti-NS1 DENV dos quatro sorotipos e pontos quânticos de CdTe estabilizados com MSA ou CTM.
- Analisar os bioconjugados obtidos por meio de técnicas de caracterização óptica.
- Otimizar os parâmetros dos ensaios de detecção da proteína viral NS1 por análise de fluorescência em microplacas.
- Realizar a marcação de células clone C6/36 com bioconjugado entre os pontos quânticos de CdTe e o anticorpo monoclonal anti-NS1 DENV-2.

## 3 REFERENCIAL TEÓRICO

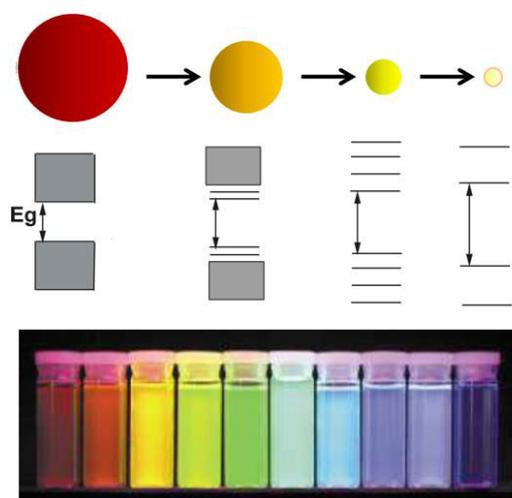
### 3.1 Pontos Quânticos

Pontos quânticos (PQs) são partículas inorgânicas obtidas de materiais semicondutores com tamanho médio variando entre 1 – 10 nm. Em virtude das dimensões reduzidas, esses materiais apresentam estados eletrônicos em regime de confinamento quântico, os quais permitem propriedades ópticas exclusivas. Dentre elas, destacam-se: o elevado rendimento quântico, espectro de emissão simétrico e relativamente estreito (largura de banda entre 20 – 50 nm), alta fotoestabilidade, amplo espectro de excitação e região de emissão dependente do tamanho do nanocristal (BRUCHEZ, 2007). Devido o efeito de confinamento quântico ocorre o processo de recombinação excitônica, originando fluorescência que pode ocorrer desde o ultravioleta próximo, passando pelo espectro visível e chegando até o infravermelho próximo dependendo da composição e do tamanho do material (BALLOU, 2004). Essa fluorescência apresentada pelos PQs decorre do processo de dissipação de energia por decaimento radiativo.

A alteração das dimensões dos PQs de mesma composição química permite que os sistemas nanoestruturados emitam fluorescência em diferentes comprimentos de onda do espectro eletromagnético visível (FRASCO, 2010; PETRYAYEVA, 2013). Este fenômeno é observado porque as diferenças entre os estados energéticos ( $E_g$ ), presentes nas duas bandas (banda de valência e de condução), variam de acordo com o tamanho da nanopartícula. Deste modo, quanto menor o tamanho da nanopartícula, maior será a diferença de energia entre as bandas ( $E_g$ ). Por isso partículas menores tendem a fluorescer em regiões mais energéticas (próximas ao azul), enquanto que as de dimensões maiores em geral exibem fluorescência nas regiões menos energéticas, próximas ao vermelho, como esquematizado na Figura 3.1.

Estes nanomateriais semicondutores são classificados de acordo com os diferentes grupos da tabela periódica em que estão inseridos os seus respectivos precursores, podendo ser do tipo II-VI, III-V e IV-VI, sobressaindo-se, em termos das mais variadas aplicações ópticas, composições do tipo II-VI (como por exemplo CdS, CdTe, CdSe e ZnSe).

Os PQs são formados, em geral, por uma combinação de dois semicondutores distintos, sendo o núcleo (*core*) constituído por um tipo de semicondutor e a camada externa que recobre, também denominada casca (*shell*), constituída por algumas monocamadas de outro material semicondutor. Esta camada externa, também conhecida na literatura como camada passivante (*shell*) pode ser obtida pela deposição controlada do segundo material ou pode ser formada continuamente a partir da hidrólise dos ligantes superficiais tiolados, reagindo com cátions presentes na superfície dos nanocristais. Esse sistema núcleo/casca promove minimização das vacâncias superficiais, traduzindo-se em maior estabilidade e elevação do rendimento quântico do nanomaterial (SANTOS, 2008; FRASCO, 2010; PETRYAYEVA, 2013).



**Figura 3.1** – Dependência do tamanho de nanopartículas de materiais semicondutores quantizados com a diferença energética ( $E_g$ ) entre sua banda de valência e banda de condução. Fotografia de diferentes suspensões coloidais de CdSe/ZnS com diferentes diâmetros, evidenciando sua emissão sob excitação em  $\lambda = 365$  nm (adaptado de FORTINA, 2005).

No setor de aplicações tecnológicas, esta nova classe de sondas fluorescentes destaca-se no emprego em dispositivos emissores de luz (LED), células fotovoltaicas, dispositivos optoeletrônicos, dentre outros. Em virtude do somatório de esforços de equipes multidisciplinares, sobretudo no que tange as metodologias inovadoras de síntese coloidal em meio aquoso e processos de bioconjugação, os PQs tem ocupado, nesta década, posição de destaque como marcadores fluorescentes em aplicações biomédicas, especialmente em marcação celular e no desenvolvimento de ensaios bioanalíticos (MEDINTZ, 2005; BRUCHEZ,

2007; SANTOS, 2008; FRASCO, 2010; CARVALHO, 2014). Menciona-se como um dos alicerces de seu crescente emprego em processos biotecnológicos, algumas vantagens que esses nanomateriais apresentam frente aos fluoróforos orgânicos convencionais, sobretudo a elevada fotoestabilidade, possibilidade de marcação de diferentes estruturas celulares empregando um único tipo de material, excitação simultânea de diferentes pontos quânticos com uma única fonte de luz, proporcionando minimização de fenômenos de auto-fluorescência em células e tecidos e baixo custo de obtenção (BRUCHEZ, 2007).

As metodologias iniciais de obtenção de nanocristais fluorescentes de semicondutores foram desenvolvidas por meio de sistemas químicos coordenados, nos quais se empregam precursores organometálicos e ligantes de origem orgânica (DANEK, 1996). A utilização de PQs oriundos das rotas organometálicas, demanda esforços adicionais para garantir a aplicabilidade do material em meio aquoso, sendo indispensável a substituição dos ligantes hidrofóbicos por agentes estabilizantes que apresentem hidrofiliidade. A elevada utilização dos PQs em biociências também está intimamente relacionada ao desenvolvimento, nos últimos 15 anos, de metodologias simples e reprodutíveis de síntese de PQs em meio aquoso. Estas metodologias empregam fundamentos de química coloidal e precursores hidrofílicos, viabilizando o processo de interação entre o material inorgânico e diferentes classes de biomoléculas (DE FARIAS, 2007).

Em virtude das dimensões reduzidas, a superfície dos pontos quânticos contribui de modo significativo nas propriedades ópticas e estruturais do material. Uma característica inerente a estes materiais é a possível ausência de uniformidade superficial, representada por descontinuidades do sistema cristalino provocando ligações insatisfeitas e uma grande energia livre superficial (DE FARIAS, 2007). Isto facilita de certa forma a associação de compostos que contenham átomos possíveis de se associarem a estas vacâncias. Quando obtidos em meio coloidal os PQs apresentam moléculas orgânicas ou inorgânicas como ligantes superficiais acoplados ao material inorgânico. Em particular, a presença de ligantes orgânicos superficiais, com seus grupamentos terminais específicos, promove alterações nas propriedades físico químicas dos materiais, maior estabilidade, possibilita a interação com biomoléculas e garante um processo de emissão satisfatório. Estas moléculas desempenham pelo menos três importantes funções na superfície dos PQs: (i) estabilização coloidal, devido à carga residual presente; (ii) passivação de superfície,

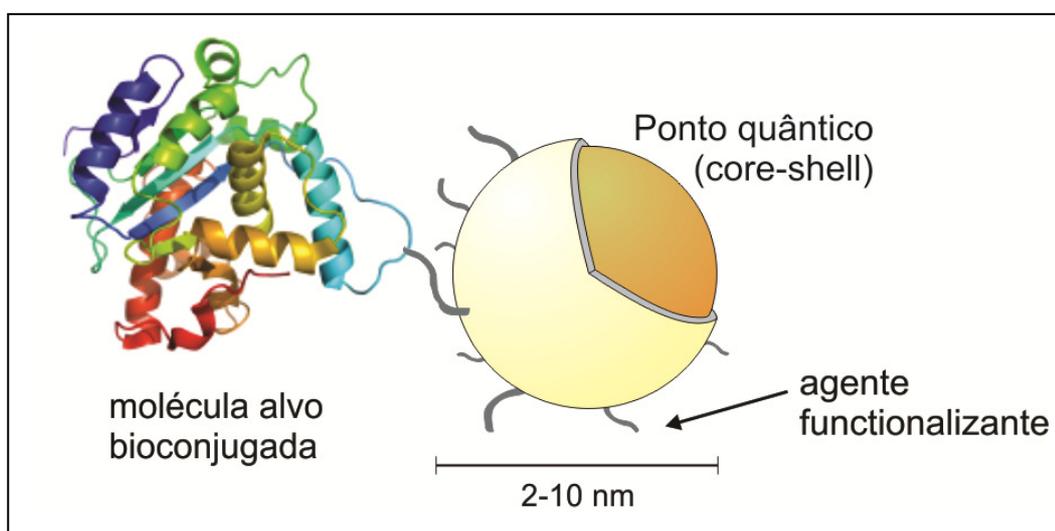
por minimizar as vacâncias superficiais oriundas da descontinuidade do retículo cristalino; e (iii) funcionalização das nanopartículas, por possibilitar uma possível interação com moléculas de origem biológica (DE FARIAS, 2007).

Os compostos orgânicos tiolados, em especial os ácidos mercaptoacético, mercaptopropiônico, mercaptosuccínico e o aminoácido cisteína, são amplamente empregados na síntese de pontos quânticos dispersos em meio aquoso com a função de ligantes superficiais. Uma abordagem mais aprofundada em conjunto com um estudo comparativo entre diferentes compostos orgânicos tiolados, foi realizada por Weller e colaboradores (GAPONIK, 2002)

### 3.2 - Bioconjugação

A Figura 3.2 exibe um sistema bioinorgânico híbrido. Esses sistemas são oriundos do processo de bioconjugação entre nanoestruturas de origem inorgânica e biomoléculas (proteínas, DNA, peptídeos). O bioconjugado ideal deve combinar as propriedades de ambos os materiais, mantendo as características físico-químicas e espectroscópicas dos pontos quânticos e as funções especializadas das biomoléculas (SAPSFORD, 2011).

Em particular, o acoplamento dos pontos quânticos a proteínas tem possibilitado aplicações em imagens, acompanhamento da vetorização de fármacos, catálise, avaliação da atividade protéica em meio externo, ensaios diagnósticos, dentre outros (SAPSFORD, 2011; PETRYAYEVA, 2013).



**Figura 3.2** – Esquema de um sistema híbrido bioinorgânico típico empregando ponto quântico tipo *core-shell* (FONTES, 2012).

Medintz e colaboradores demonstraram em seu trabalho que aproximadamente 15 – 20 proteínas ligantes de maltose (MBP,  $M_r \sim 44$  kDa) podem ser acopladas a um único ponto quântico de 6 nm de diâmetro (MEDINTZ, 2005). Contudo, esses sistemas bioinorgânicos não estão limitados apenas a aplicações biológicas, sendo utilizados também em outros campos, como ciências dos materiais, física, fotônica e no desenvolvimento de nanossensores (FONTES, 2012).

A extensão e o êxito do processo de bioconjugação dependem de alguns parâmetros estratégicos, como a escolha adequada do nanomaterial e da molécula biológica, o tipo de ligante superficial empregado, as condições físico-químicas do meio reacional, as dimensões dos sistemas envolvidos, o emprego ou não de reagentes de acoplamento, desenvolvimento de metodologia que não acarrete desnaturação protéica ou degradação do material inorgânico, dentre outras variáveis que devem ser cuidadosamente avaliadas. A função biológica do sistema híbrido é direcionada pela natureza, posicionamento e conformação da biomolécula acoplada, enfatizando que proteínas que apresentam o seu sítio específico próximo à superfície do ponto quântico poderão perder a habilidade de promover ligação com a molécula alvo (SAPSFORD, 2011; FONTES, 2012).

Dentre as abordagens rotineiras de conjugação química entre proteínas/peptídeos e os PQs, podemos destacar:

- (I) interação eletrostática, cargas opostas presentes nos ligantes superficiais e nas proteínas/peptídeos são utilizadas para mediar a ligação PQ-proteína;
- (II) ligação covalente, processo de conjugação mais empregado na rotina, promovido por reagentes de acoplamento, os quais viabilizam a formação de ligações covalentes, oriundas da interação entre grupamentos dos ligantes superficiais dos PQs e das biomoléculas;
- (III) interações secundárias, peptídeos, proteínas e anticorpos biotinizados interagem com elevada afinidade e especificidade com moléculas de estreptavidina, previamente acopladas, que se encontram na superfície dos PQs;
- (IV) ligação direta, se baseia em dois tipos de interações entre a superfície dos PQs e as proteínas/peptídeos. Biomoléculas tioladas, principalmente as que apresentam resíduos de cisteína, podem efetuar ligações dissulfeto com átomos de enxofre presentes na superfície do nanomaterial. Outro tipo é a afinidade que resíduos de polihistidina apresentam em formar complexos de coordenação com cátions  $Zn^{2+}$

presentes na superfície de alguns tipos de PQs, como ZnSe/ZnS por exemplo (SAPSFORD, 2011).

O avançar das pesquisas no campo de trabalhos nanobiotecnológicos e as limitações ainda presentes, sobretudo nas etapas de purificação e caracterização, tem impulsionado os pesquisadores a desenvolver metodologias inovadoras com a perspectiva de melhor compreender os fenômenos que envolvem os processos de acoplamento entre PQs e biomoléculas.

### **3.3 - Compostos orgânicos utilizados em Bioconjugação**

#### **3.3.1 – Crosslinkers**

*Crosslinkers* ou agentes de ligação cruzada possuem pelos menos dois grupos reativos, os quais possibilitam a interação com uma grande diversidade de grupamentos químicos presentes em biomoléculas ou nos mais variados compostos sintéticos (WALT, 1994). Estes reagentes promovem a formação de ligações covalentes entre duas ou mais moléculas. Em geral, os *crosslinkers* se ligam covalentemente a grupos funcionais como aminas primárias, carboxilatos e sulfidrilas.

A grande maioria das moléculas de origem biológica possui ao menos um destes grupos funcionais, o que acaba viabilizando a conjugação via *crosslinkers*. Esses reagentes são amplamente empregados no estudo da estrutura e função protéica, na ancoragem de proteínas em fase sólida, e mais recentemente na conjugação de biomoléculas a sistemas inorgânicos como quantum dots (MEDINTZ, 2005; LI, 2008; MAMEDOVA, 2001; CARVALHO, 2014).

Agentes de ligação cruzada podem ser divididos em dois grupos de acordo com a similaridade dos seus grupos reativos:

- Homobifuncionais possuem dois grupamentos terminais idênticos (por exemplo, o glutaraldeído);
- Heterobifuncionais possuem dois grupamentos terminais distintos (por exemplo, o sulfo-SMCC).

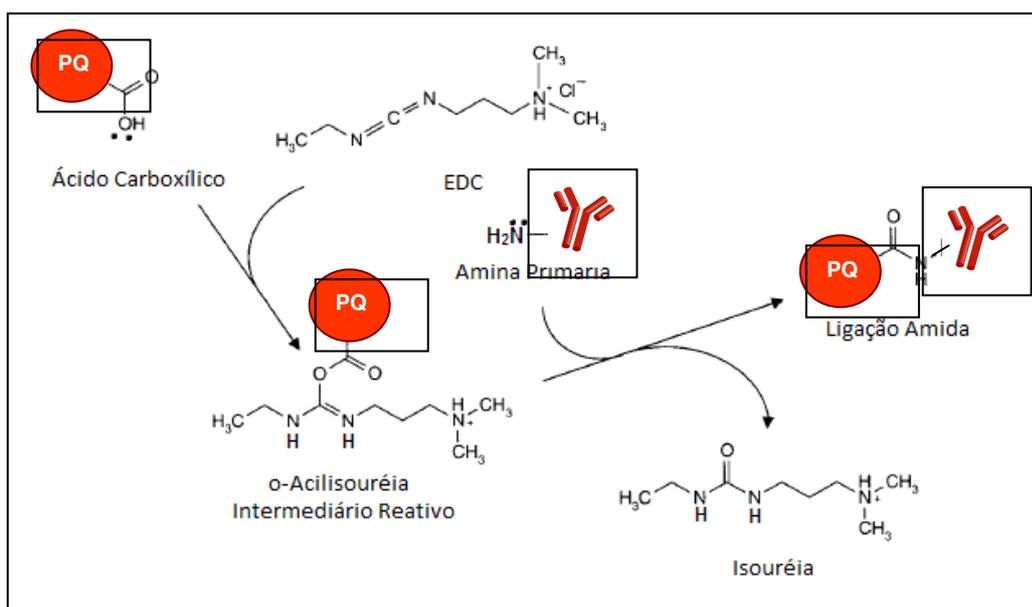
Os homobifuncionais são utilizados em reações de conjugação que possuem apenas uma ou duas etapas, enquanto que os heterofuncionais são utilizados em reações de duas ou mais etapas. Empregou-se durante a realização de protocolos

de conjugações abordados nesse trabalho, o *crosslinker* heterobifuncional sulfo-SMCC.

### 3.3.2 - Carbodiimida (EDC)

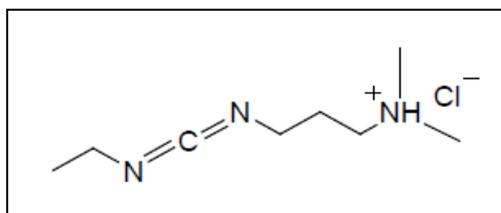
As carbodiimidas pertencem a uma classe de reagentes que são capazes de promover a ativação de grupamentos carboxilatos ou fosfatos, os quais podem interagir com aminas primárias presentes em inúmeros compostos de origem biológica. Indubitavelmente, elas são os agentes de “comprimento zero” mais empregados em processos de bioacoplamentos, devido à habilidade em formar conjugados entre duas proteínas, entre peptídeos e proteínas, e entre uma biomolécula e materiais inorgânicos biocompatíveis (HERMANSON, 2008).

As carbodiimidas são empregadas para mediar a formação de ligações amida ou fosforamidata, por meio da interação de grupamentos carboxilatos ou fosfatos com uma amina. Independentemente do tipo de carbodiimida utilizada, a reação resulta na formação do intermediário reativo o-acilisouréia. Como pode ser observado na Figura 3.3, este composto, que apresenta elevada reatividade, promove o ataque da amina nucleófila no grupamento carbonila do éster formado, resultando na formação da ligação amida.



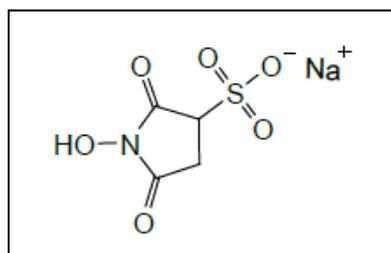
**Figura 3.3** – Esquema reacional do processo de bioconjugação entre o ponto quântico e a imunoglobulina G empregando o EDC [Cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida] como agente de acoplamento (adaptado de HERMANSON, 2008).

EDC [cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida] é o reagente mais comumente utilizado na conjugação de compostos que possuem grupos carboxílicos e/ou aminas, Figura 3.4.



**Figura 3.4** – Estrutura química da EDC [cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida].

Atualmente, EDC e Sulfo-NHS (*N*-hidroxisulfosuccinimida) em conjunto, são os agentes de “comprimento zero” mais empregados em processos de bioconjugação que envolvem compostos inorgânicos biocompatíveis, tais como PQs e complexos de íons terras raras (ULRICH, 2007). O Sulfo-NHS promove o aumento da solubilidade e estabilidade do intermediário reativo durante a reação, Figura 3.5.

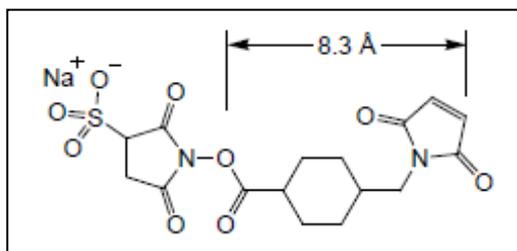


**Figura 3.5** – Estrutura da Sulfo-NHS (*N*-hidroxisulfosuccinimida).

### 3.3.3 - Sulfo-SMCC

O sulfo-SMCC – sulfosuccinimidil 4-[*N*-maleimidametil]ciclohexano-1-carboxilato, é um *crosslinker* heterobifuncional que contém em sua estrutura um éster *N*-hidroxisuccinimida (NHS) e um grupamento maleimida, permitindo a formação de ligações covalentes entre aminas e sulfidrilas. O primeiro grupamento reage com aminas primárias em pH na faixa de 7-9 formando ligações amidas estáveis, enquanto o segundo reage com grupamentos sulfidrilas com pH entre 6,5 e 7,5 formando ligações tioéteres estáveis. Por essas razões, conjugações empregando esse *crosslinker* são usualmente realizadas em pH 7,2-7,5, proporcionando condições menos danosas para os envolvidos no processo de

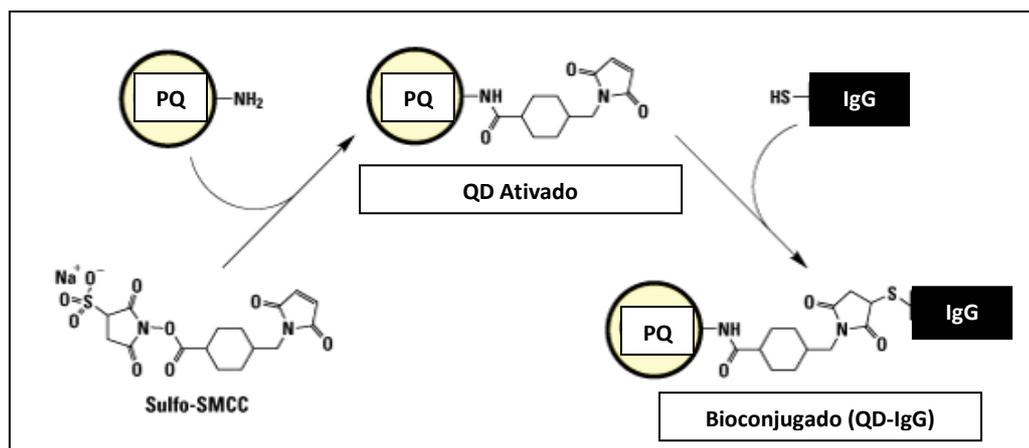
interação, sobretudo a proteína (SHIN, 2010; PEREIRA, 2008). A Figura 3.6 exibe a estrutura do sulfo-SMCC.



**Figura 3.6** – Estrutura do sulfo-SMCC - sulfosuccinimidil 4-[*N*-maleimidametil]ciclohexano-1-carboxilato.

O espaçamento proporcionado pelo ciclohexano minimiza o processo de hidrólise dos grupamentos maleimidas, quando comparado a reagentes que não apresentam esse anel. Em virtude da estabilidade ampliada dos grupamentos maleimidas, proteínas acopladas ao sulfo-SMCC podem ser liofilizadas e estocadas, para posterior etapa de conjugação com sulfidrilas oriundas de outro composto (HERMANSON, 2008). A maioria das proteínas maleimida-ativadas são preparadas desse modo.

Sulfo-SMCC é frequentemente empregado no preparo de conjugados anticorpos-enzimas e haptenos-proteínas carreadoras, utilizando protocolo reacional de duas etapas. Inicialmente, o composto alvo aminado reage com excesso do reagente, seguido pela remoção do excesso do sulfo-SMCC empregando dispositivo de diálise ou ultrafiltração. Por fim, o composto contendo grupamentos sulfidrilas é adicionado ao meio reacional, finalizando o processo de acoplamento (HERMANSON, 2008). A Figura 3.7 exibe o esquema reacional do processo de bioconjugação entre o ponto quântico e a imunoglobulina G empregando o Sulfo-SMCC como agente de acoplamento.



**Figura 3.7** – Esquema reacional do processo de bioconjugação entre o ponto quântico e a imunoglobulina G empregando o Sulfo-SMCC como agente de acoplamento (adaptado de HERMANSON, 2008).

### 3.4 - Análise de Bioconjugados em microplacas

Um dos problemas chave para utilizar os pontos quânticos com sucesso como sonda fluorescente é garantir a qualidade e a eficiência do processo de conjugação com proteínas ou outras biomoléculas e promover a interação do conjugado com sistemas biológicos. Uma conjugação não bem realizada resulta em aplicações mal sucedidas, por esta razão a caracterização e avaliação dos PQs bioconjugados é necessária independentemente da abordagem de conjugação aplicada (BRASIL JR., 2014).

Nas últimas décadas diferentes métodos de avaliar os PQs bioconjugados têm sido reportados na literatura. Sapsford e colaboradores, em artigo de revisão recente, classificou as diferentes abordagens mais empregadas na rotina de caracterização de diferentes nanomateriais em: técnicas de separação, técnicas por espalhamento de luz, microscopias e espectroscopia (SAPSFORD, 2011). No entanto, a falta de padronização para a interpretação dos resultados, o uso de equipamentos caros em conjunto com metodologias laboriosas representam desvantagens aos métodos atuais.

Dentre os métodos mais empregados, eletroforese é uma técnica laboriosa que pode ser aplicada na análise qualitativa de espécimes carregadas. Entretanto, se o conjugado obtido possui baixo ou médio peso molecular, esta técnica não é aconselhada, devido a migração excessiva durante a corrida eletroforética, fornecendo resultados inconclusivos (HUANG, 2006). O método de espalhamento de luz dinâmico (DLS) pode analisar qualitativamente um bioconjugado, baseando-se

no tamanho médio do sistema antes e após o processo de conjugação, contudo apresenta baixa resolução e analisa apenas uma amostra por vez (AL-JAMAL, 2009). A espectroscopia de correlação de fluorescência (FCS) embora apresente maior sensibilidade do que o DLS para distinguir sistemas de dimensões semelhantes, necessita de um microscópio confocal, que se trata de um equipamento caro e não muito encontrado nos laboratórios (SHAO, 2008).

Diante deste panorama, Carvalho e colaboradores desenvolveram uma técnica complementar semi-quantitativa para avaliar a eficiência do processo de bioconjugação entre PQs e proteínas, empregando ensaios de detecção com utilização de microplacas (CARVALHO, 2014). Nestes ensaios, microplacas negras de poliestireno são utilizadas como fase sólida, onde são formadas interações entre o polímero que as recobre e os resíduos hidrofóbicos da proteína em estudo. Contudo, os PQs não possuem a capacidade de interagir com o revestimento polimérico presente na fase sólida. Logo, apenas as proteínas que estão ligadas ao revestimento polimérico dos poços e acopladas aos PQs, apresentam fluorescência com intensidade significativa na região visível do espectro eletromagnético. Uma abordagem mais aprofundada pode ser encontrada em Carvalho, 2014.

### **3.5 – Dengue**

#### **3.5.1 - Vírus dengue**

A dengue é uma arbovirose transmitida por mosquitos do gênero *Aedes*, especialmente pelo *Aedes aegypti* e secundariamente pelo *Aedes albopictus* e *Aedes polynesiensis*. O vírus do dengue (DENV) pertence ao gênero *Flavivirus*, família Flaviviridae, possuindo RNA genômico de fita simples com aproximadamente 11 quilobases de comprimento. O DENV apresenta quatro sorotipos antigenicamente relacionados (DENV 1-4), diferenciados por provas bioquímicas, sorológicas e por técnicas moleculares de amplificação do genoma viral, possuindo também genótipos distintos pertencentes ao mesmo sorotipo (VEZZA, 1980). Os sorotipos DENV1-4 apresentam os mesmos ciclos de transmissão e causam respostas fisiopatológicas similares (CHAMBERS, 1990; FAUQUET, 2005).

A análise estrutural do DENV revelou que o vírus possui um envelope em formato icosaédrico e o nucleocapsídeo esférico medindo 40-60nm de diâmetro

(RODENHUIS-ZYBERT, 2010). O genoma é constituído por fita simples de RNA com polaridade positiva, de aproximadamente 11.000 nucleotídeos. Possui três proteínas estruturais: proteína C, localizada no nucleocapsídeo; proteína M da membrana e a proteína E do envelope, principal proteína estrutural. As principais propriedades biológicas do DENV estão relacionadas à proteína E, possibilitando a ligação do vírus aos receptores celulares (CHEN, 1996; ZHANG, 2003).

Várias cópias da proteína C (11 kDa) encapsulam o RNA genômico formando o nucleocapsídeo viral. O nucleocapsídeo é circundado por uma bicamada lipídica derivada de células do hospedeiro, na qual 180 cópias de proteínas M e E estão ancoradas (RODENHUIS-ZYBERT, 2010).

Após a entrada do vírus na célula e o descapsulamento do RNA genômico (abertura do nucleocapsídeo), a molécula de RNA é traduzida como uma única poliproteína, ocorrendo a síntese de três proteínas estruturais (C, M, E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), envolvidas no processo de replicação do genoma viral. As proteínas estruturais M e C e duas proteínas não estruturais NS1 e NS3, são também capazes de induzir resposta imunológica protetora em modelos animais (RODENHUIS-ZYBERT, 2010).

A NS1 é uma glicoproteína com cerca de 353 - 354 aminoácidos, que possui elevada quantidade de aminoácidos e nucleotídeos homólogos entre os *Flavivirus*. Não faz parte da estrutura da partícula viral, mas é liberada das células infectadas pelo DENV, sendo encontrada em amostras da fase aguda do sangue de pacientes com infecções primárias ou secundárias (YOUNG, 2000; ZAINAH, 2009).

Durante a etapa de replicação viral a proteína não estrutural NS1 está associada à membrana das células infectadas (mNS1) ou secretada no meio extracelular (sNS1), tendo acentuada reatividade cruzada entre os 4 sorotipos existentes. A função da NS1 na infecção pelo DENV ainda não foi totalmente esclarecida, contudo, alguns estudos correlacionam a gravidade da enfermidade com a quantidade dessa proteína no soro do paciente, pois ela está envolvida na replicação do RNA do DENV favorecendo a elevação da viremia (AVIRUTNAN, 2006).

Durante a infecção natural, células do sistema fagocítico mononuclear [monócitos (MO), macrófagos (Mφ) e células dendríticas (DCs)], incluindo as células de Langerhans residentes na pele, são os alvos primários para infecção do DENV. No início do processo infeccioso a elevada carga viral resulta em elevada ativação das células T, acarretando em acentuada liberação de citocinas e mediadores químicos,

podendo ocorrer danos às células endoteliais e subsequente extravasamento de plasma. Dentre outros fatores que podem influenciar na patogênese da doença podemos citar a virulência, origem étnica, idade do indivíduo e condições epidemiológicas específicas (GUZMÁN, 1996; RODENHUIS-ZYBERT, 2010).

A partir de janeiro de 2014, o Ministério da Saúde passou a adotar a nova classificação de casos de dengue preconizada pela OMS: dengue, dengue com sinais de alarme e dengue grave. Os quatro sorotipos podem causar manifestações clínicas que variam desde infecções assintomáticas, passando pelo estado febril da dengue anteriormente denominada dengue clássica (DC), podendo o paciente apresentar síndromes mais severas caracterizadas por hemorragia e choque hipovolêmico. Na dengue com sinais de alarme, anteriormente conhecida como síndrome do choque do dengue (SCD), o paciente além do estado febril e dos sintomas clássicos poderá apresentar complicações adicionais, tais como: dor abdominal intensa, vômitos persistentes, sangramento de mucosas, hipotensão postural, acúmulo de líquidos, dentre outros. No caso de dengue grave, denominada anteriormente de febre hemorrágica do dengue (FHD), o paciente apresenta uma ou mais das seguintes condições: extravasamento grave de plasma evidenciado por taquicardia, extremidades frias, pulso débil ou indetectável, acúmulo de líquidos, insuficiência respiratória, hemorragia severa e comprometimento grave de órgãos (OMS, 2009).

### **3.5.2 - Aspectos Históricos e Dengue no Brasil**

Os primeiros registros de epidemias de uma doença que possivelmente tratava-se de dengue datam de 1779 e 1780 e foram relatadas em três continentes, Ásia, África e América do Norte, porém há registros da ocorrência desta doença no século III. A “Enciclopédia Chinesa de Sintomas e Remédios das Doenças”, publicada inicialmente durante a Dinastia Chin entre 265 e 420 d.C. e reeditada pela Dinastia Tang em 610 d.C, descrevia os sintomas de uma enfermidade que os chineses denominaram “febre ou veneno da água”, associada a insetos voadores e água. Desde então, relatos de doença semelhante à dengue na Índia em 1635, no Panamá em 1699 e de grandes epidemias no período compreendido entre 1779 e 1980 (GUBLER, 1998; GUBLER, 2006).

A denominação dengue foi criada na Espanha sendo introduzida na literatura médica inglesa entre os anos de 1827 e 1828, durante uma epidemia de uma

enfermidade que causava artralgia e exantema ocorrida no caribe. O *London Royal College of Physicians* estabeleceu em 1869 esta nomenclatura para denominar essa enfermidade, conhecida na literatura até então como febre articular, febre quebra ossos, dinga, dentre outros (VEZZA, 1980).

A transmissão do DENV pelo mosquito foi sugerida em 1906 por Bancroft, sendo confirmada por pesquisas complementares alguns anos depois (SILER, 1926; ROSEN, 1954). A expansão do mosquito africano *Aedes aegypti* em áreas urbanas antes não infestadas, favoreceu em grande parte o estabelecimento definitivo do ciclo urbano do DENV. Os mosquitos evoluíram de forma a se adaptarem ao convívio humano em meio urbano, tornando-se eficientes vetores dos DENV e do vírus da febre amarela (FA) (GUBLER, 1998).

O mosquito transmissor da dengue é originário do Egito, continente africano, e vem se propagando pelas regiões tropicais e subtropicais do planeta desde o século 16, período das Grandes Navegações. Admite-se que o vetor foi levado para os demais continentes no período colonial, por meio de navios negreiros, tornando as epidemias de dengue mais frequentes e disseminadas (HOLMES, 1998).

Durante a Segunda Guerra Mundial, a destruição de grandes áreas florestais no sudeste da Ásia facilitou o aumento da transmissão de doenças transmitidas por mosquitos. Em seguida, o crescimento populacional, a urbanização descontrolada, a falta de programas efetivos para o controle do vetor, atrelados a co-circulação de vários sorotipos do vírus e o aumento das viagens comerciais contribuíram para a expansão geográfica do mosquito transmissor e do vírus, permitindo o estabelecimento de uma pandemia que persiste até hoje (GUBLER, 1998).

No Brasil existem registros de surtos de dengue que datam de meados do século XIX na área urbana da cidade do Rio de Janeiro, e que permaneceram ocorrendo em diferentes localidades do país durante as primeiras décadas do século XX (FIGUEIREDO, 2000).

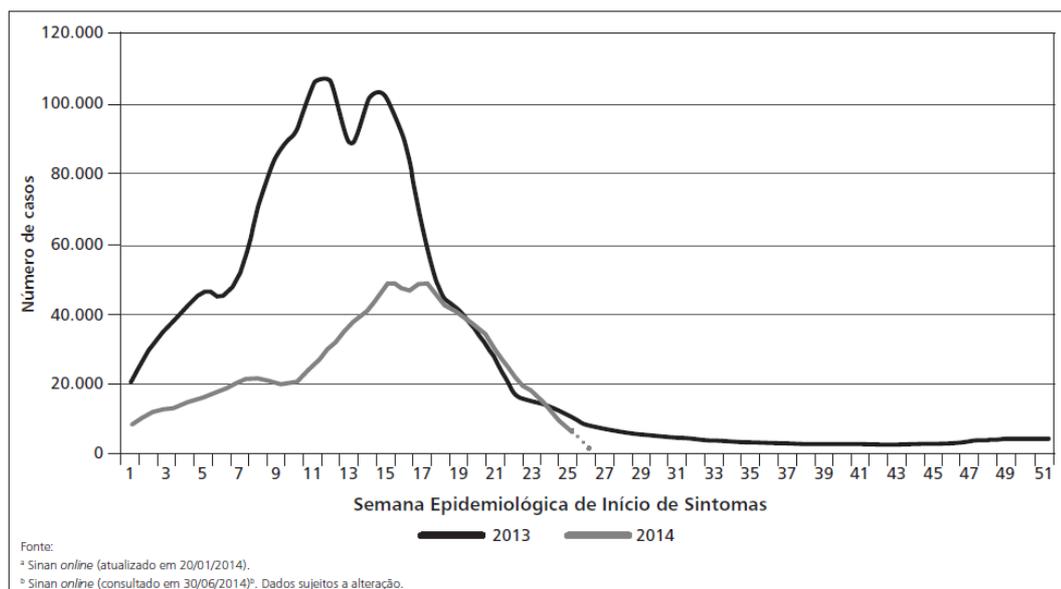
Entre os anos de 1950 e 1970, o risco de ocorrência de dengue no Brasil foi minimizado com o registro de erradicação do vetor em 1955 após intensa vigilância epidemiológica, em virtude da campanha iniciada em 1904 por Oswaldo Cruz. Estas ações de erradicação e controle do vetor promoveram a ausência de surtos de dengue entre 1923 a 1981 (FIGUEIREDO, 2000). Contudo, a reintrodução do mosquito *Aedes aegypti* no país na década de 70 foi inevitável, devido à ausência de continuidade das campanhas de erradicação do vetor (SCHATZMAYR, 2000).

A primeira descrição de surto epidêmico de dengue no Brasil, com casos confirmados laboratorialmente, ocorreu em 1981 na cidade de Boa Vista – Roraima, onde cerca de 11.000 foram infectadas, sendo identificados DENV dos sorotipos 1 e 4. Após esta epidemia, o vírus e o vetor se dispersaram pelo país e surtos de dengue passaram a ocorrer em todas as regiões brasileiras, sobretudo em áreas de elevada densidade populacional (NOGUEIRA, 2000).

Durante a década de 90, a incidência da dengue elevou-se em consequência da disseminação do *Aedes aegypti* no país, especialmente a partir de 1994. A dispersão do vetor foi seguida pela disseminação dos sorotipos DENV-1 e DENV-2 em vinte e sete Estados da Federação. No início do século XXI o sorotipo DENV-3 se dispersou rapidamente pelo território brasileiro, praticamente substituindo os sorotipos DENV-1 e DENV-2 das várias cidades nos anos seguintes e modificando a epidemiologia do dengue no Brasil, com características de hiperendemicidade (TEIXEIRA, 2005).

Em agosto de 2010, o primeiro caso do DENV-4 reintroduzido no Brasil foi registrado em Boa Vista – Roraima. Este sorotipo não circulava no Brasil há 28 anos, tendo como origem o DENV procedente da Venezuela, onde o DENV-4 circula de forma endêmica há muitos anos (ROCCO, 2012). De acordo com dados estáticos disponibilizados pela Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde (SVS/MS), por meio de Boletins Epidemiológicos, atualmente encontramos os quatro sorotipos no país, tendo o DENV-1 como prevalente (SVS/MS, 2014).

De acordo com o boletim epidemiológico de monitoramento até a Semana Epidemiológica (SE) 26 de 2014, foram registrados 638.404 casos no país até 28/06/14. A Figura 3.8 exhibe gráficos de acompanhamento do número de casos no Brasil em 2013 e até a semana 26/2014, observando-se redução na incidência da enfermidade. A região Sudeste teve o maior número de casos (372.269 casos; 58,3%) em relação ao total do país, seguida das regiões Centro-Oeste (117.718 casos; 18,4%), Nordeste (72.094 casos; 11,3%), Sul (44.875 casos; 7,0%) e Norte (31.448 casos; 4,9%). Na análise comparativa realizada pela SVS/MS em relação aos dados obtidos em 2013, observa-se redução de 53,8% dos casos no país.



**Figura 3.8** – Número de casos de dengue por semana epidemiológica (adaptado de Boletim Epidemiológico SE-26 SVS/MS, 2014).

De acordo com o Boletim Epidemiológico da SE-26, de janeiro a maio de 2014 foram enviadas aos laboratórios de referência 6.321 amostras suspeitas para realização do exame de isolamento viral. Destas amostras, 2.032 foram positivas (32,1% do total), tendo como proporções de sorotipos virais identificados, DENV-1 (80,1%), DENV-4 (17,7%), DENV-2 (1,8%) e DENV-3 (0,4%) (SVS/MS, 2014).

### 3.5.3 – Resposta Imune

A infecção com um sorotipo confere imunidade protetiva permanente apenas contra este sorotipo (homóloga), ocorrendo apenas temporariamente a imunidade cruzada (heteróloga) (MARTINEZ, 2008; RODENHUIS-ZYBERT, 2010). A fisiopatogenia da resposta imunológica à infecção aguda por dengue pode ser primária e secundária. A resposta primária ocorre em pessoas não expostas anteriormente ao flavivírus, e o título dos anticorpos se eleva lentamente. A resposta secundária ocorre em pessoas com infecção aguda por dengue, mas que tiveram infecção prévia por flavivírus, e o título de anticorpos se eleva rapidamente, atingindo níveis altos (GUZMÁN, 1996; RODENHUIS-ZYBERT, 2010).

Na verdade, alguns estudos anteriores demonstraram que uma infecção secundária com um sorotipo heterólogo configura como um fator de risco para o desenvolvimento da dengue grave (GUZMÁN, 1996). Além disso, recém nascidos de mães imunes ao DENV possuem o risco de desenvolver um quadro mais severo

durante a infecção primária. Isto demonstra que os anticorpos desempenham papel importante na evolução da doença (RODENHUIS-ZYBERT, 2010).

Na infecção primária predomina a imunoglobulina do isotipo IgM. A maioria dos pacientes a apresenta em níveis detectáveis a partir do sexto dia após o aparecimento dos primeiros sintomas (GUZMÁN, 1996). Os níveis de IgM aumentam rapidamente e atingem seu pico por volta de 15 dias, sendo estes anticorpos reconhecidos como indicadores de infecções recentes, tendo em vista que permanecem detectáveis por 2 a 3 meses no soro do paciente. Os anticorpos do isotipo IgG começam a surgir, em uma resposta primária, alguns dias após o início da produção de IgM, sendo detectáveis a partir do quinto dia de doença. A partir da primeira semana de infecção a concentração de IgG aumenta lentamente e permanece detectável ao longo da vida do paciente (GUZMÁN, 1996; RODENHUIS-ZYBERT, 2010).

A resposta secundária ocorre em indivíduos que apresentam imunidade prévia ao DENV ou a outro *Flavivirus*, ocorrendo rápida elevação dos títulos de IgG e acentuado risco de reações cruzadas com outros vírus do mesmo gênero. Já os níveis de IgM são mais baixos que os apresentados na resposta primária (GUZMÁN, 1996).

#### **3.5.4 Diagnóstico laboratorial da Dengue**

O diagnóstico da infecção por DENV pode ser realizado por diferentes métodos que incluem o isolamento do vírus em diversos tipos de cultura de células, como por exemplo, as de mosquito *Aedes albopictus*, clone C6/36, detecção de ácido nucléico por RT-PCR e detecção da glicoproteína não estrutural NS1, além dos testes sorológicos para pesquisa de anticorpos específicos. Tecidos infectados por DENV (casos de óbitos) podem ser analisados em ensaios de imunohistoquímica (MIAGOSTOVICH, 1996).

As células de mosquito, como as de *Aedes albopictus*, clone C6/36, têm sido as mais utilizadas no isolamento do DENV a partir de amostras obtidas de pacientes. Estas células são altamente sensíveis à infecção por DENV, apresentam replicação abundante do vírus, facilidade de cultivo e manutenção, pois crescem rápido em meio de cultura simples à temperatura ambiente (FIGUEIREDO, 1990). A presença do DENV pode ser detectada pelo efeito citopático evidenciado nas células

(GUBLER, 1984). A identificação dos vírus isolados pode ser realizada por imunofluorescência indireta (IFI), empregando-se anticorpos policlonais de camundongos infectados com DENV ou anticorpos monoclonais adquiridos comercialmente, permitindo a identificação do sorotipo isolado (GUZMÁN, 2010).

A sensibilidade, especificidade e detecção rápida em diminutas quantidades de amostras de pacientes, torna a PCR um método confiável para o diagnóstico da doença. Os resultados falso-positivos podem ocorrer, contudo, na maioria das vezes estão relacionados à preparação e manipulação inadequadas da amostra a ser avaliada. Além da utilidade da PCR como ferramenta diagnóstica pode ser empregada no estudo do genoma dos diferentes sorotipos do DENV, permitindo a análise da sequência de nucleotídeos do material genético (GUZMÁN, 1996).

Técnicas sorológicas para pesquisa de anticorpos específicos são amplamente utilizadas por laboratórios clínicos para diagnóstico da dengue. A técnica de Inibição da Hemaglutinação é um teste que requer aparato experimental simples, porém necessita de pessoal capacitado e possui várias etapas no seu procedimento. A técnica se baseia na capacidade do DENV de aglutinar hemácias de ganso, por interação com receptores superficiais dos eritrócitos promovendo aglutinação difusa, permitindo o desenvolvimento e aplicação do ensaio para o diagnóstico sorológico do dengue. Contudo, tem o inconveniente de necessitar de amostras pareadas de soro, fase aguda e convalescença. Este teste é ideal para estudos soroepidemiológicos e em detecção preliminar de anticorpos anti-DENV, contudo não é empregado na rotina devido à baixa eficácia (GUZMÁN, 1996).

O Teste de Neutralização é usado na pesquisa de anticorpos neutralizantes específicos para cada sorotipo do DENV e para outros flavivírus, assim como na avaliação da resposta à imunização. A neutralização viral é definida como a perda da infectividade através da reação dos vírus com o anticorpo específico. Anticorpos neutralizantes podem ser medidos por teste “*in vivo*” e “*in vitro*”, desde que um sistema de cultura de tecido susceptível seja obtido. Durante a realização do teste, são empregadas diluições seriadas da amostra do soro do paciente frente a uma concentração constante do vírus, sendo os resultados expressos em títulos de anticorpos neutralizantes (THOMAS, 2009).

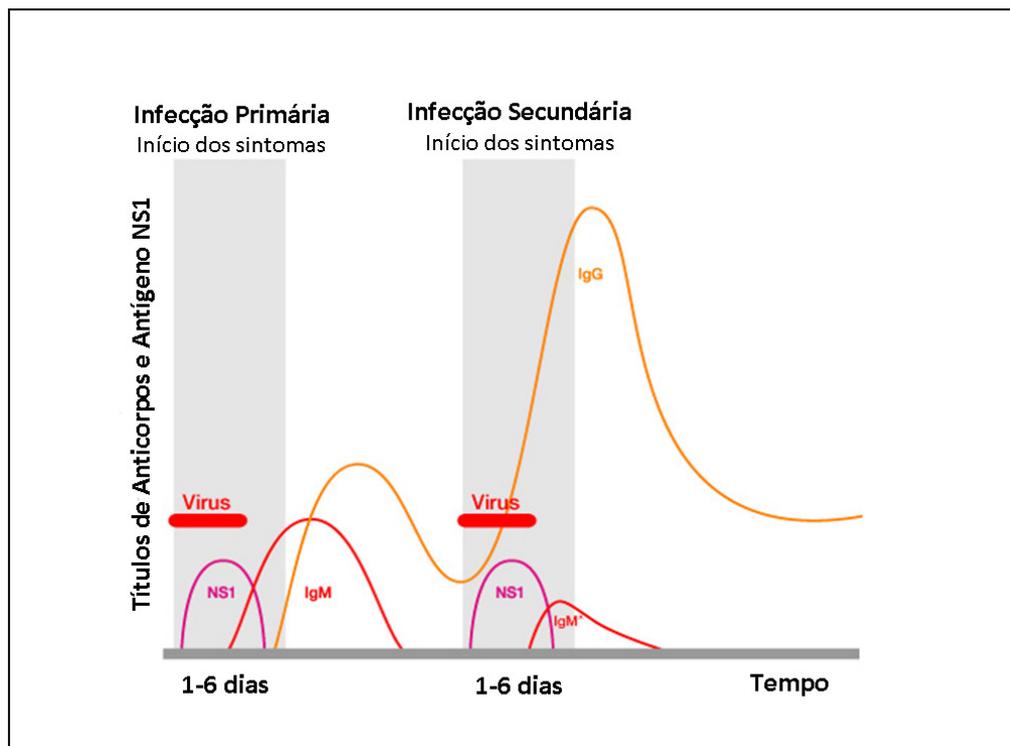
O ensaio imunoenzimático de captura de anticorpos da classe IgM (MAC-ELISA) tem sido, nas últimas décadas, o método de eleição para o diagnóstico do dengue. Anticorpos IgM anti-DENV são produzidos transitoriamente durante a

infecção primária ou secundária. A detecção de anticorpos IgM anti-DENV indica uma infecção ativa ou recente, sendo os mesmos detectados por volta do quinto dia da doença. Em média, os anticorpos IgM caem a níveis quase indetectáveis por volta de 30 a 60 dias após o início da enfermidade (GUZMÁN, 1996).

Kits contendo teste de captura de IgM e IgG estão amplamente disponíveis no mercado, possibilitando detecção rápida, eficiente e reproduzível sem a necessidade de equipamentos sofisticados. Também podem ser encontrados testes imunocromatográficos rápidos de triagem para determinação qualitativa de IgM/IgG em amostras de sangue total, soro ou plasma. Contudo, apesar das qualidades destes testes e dos avanços proporcionados, eles apresentam a limitação de não detectar a doença na fase inicial.

Para superar esta limitação, ensaios imunoenzimáticos para captura da proteína não estrutural viral NS1, bem como testes imunocromatográficos rápidos para determinação qualitativa de NS1 em amostras de sangue total, soro ou plasma estão disponíveis no mercado (DUSSART, 2008).

Nos últimos anos a NS1 tem sido empregada e avaliada como biomarcador em métodos diagnósticos visando à detecção precoce da infecção por DENV, devido à sua elevada concentração no soro de pacientes nos primeiros dias de infecção. Esta proteína pode ser detectada antes da formação dos anticorpos IgM e IgG, pois em geral está presente no soro durante o início do estado febril e se prolonga até o sexto dia após o início dos sintomas, tornando-se uma ferramenta útil no diagnóstico precoce da doença (GUZMÁN, 2010; FUCHS, 2014). A Figura 3.9 exibe o perfil de expressão dos anticorpos e da NS1 durante a fase sintomática da doença.



**Figura 3.9** – Perfil de expressão dos anticorpos e da NS1 durante a fase sintomática da dengue (adaptado de <http://www.retroscope.eu/wordpress/dengue-virus/>).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Preâmbulo

O telureto de cádmio (CdTe) é um semicondutor binário do tipo II<sup>B</sup>-VI<sup>A</sup>, que apresenta um *bandgap* de  $E_g = 1,5$  eV (826 nm). Neste trabalho o processo de obtenção de NPs deste semicondutor, dispersas em meio aquoso, foi realizado de modo simples, utilizando um método adaptado da literatura (ZHANG,2003; GAPONIK 2002) e implantado com êxito em nosso grupo de pesquisa ( DE MENEZES, 2005; SANTOS, 2008). Essas NPs dispersas em meio coloidal, sob condições ideais de síntese, apresentam fluorescência na região visível do espectro eletromagnético, permitindo o emprego como sondas fluorescentes (SANTOS, 2008; GAPONIK, 2002).

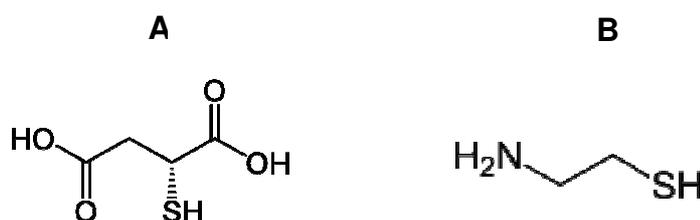
Imunoglobulinas conjugadas a NPs inorgânicas têm sido empregadas com êxito em processos de detecção ultrasensível, localização de componentes celulares específicos e no desenvolvimento de metodologias diagnósticas (FRASCO, 2010; SAPSFORD, 2011). O processo de bioconjugação envolve o acoplamento de duas ou mais moléculas, formando um sistema híbrido que possui a combinação das propriedades de seus componentes individuais. Dentre as abordagens rotineiras de conjugação química, destacam-se os processos que envolvem ligações covalentes, sendo promovidas por reagentes de acoplamento como o EDC, sulfo-NHS e sulfo-SMCC, por exemplo (HERMANSON, 2008).

Na Seção 4.2 são descritas as metodologias de obtenção de NPs de CdTe dispersas em água e estabilizadas pelos alquil-tióis MSA e CTM. As NPs foram preparadas empregando-se fundamentos de química coloidal, com crescimento *in situ* (*bottom-up*) e utilização de precursores hidrossolúveis. Ao final são apresentadas as metodologias envolvidas nas etapas de bioacoplamento entre os PQs e os anticorpos anti-NS1 DENV, purificação dos conjugados, detecção da proteína viral NS1 em microplacas negras de poliestireno, caracterização espectroscópica e estrutural dos materiais obtidos e ensaios marcação de células do mosquito *Aedes albopictus* C6/36 com bioconjugado CdTe/MSA-anti-NS1 DENV2.

## 4.2 Preparação das nanopartículas de CdTe em meio aquoso

Nas etapas de preparação das NPs de CdTe em meio aquoso empregaram-se como agentes estabilizantes/funcionalizantes os alquiltióis, ácido mercaptosuccínico (MSA) e cisteamina (CTM) utilizando-se métodos da literatura já estabelecidos

(WEY, 2014; WANG, 2012; ZHANG, 2009; CHEN, 2007). A Figura 4.1 exibe as fórmulas estruturais dos agentes estabilizantes/funcionalizantes empregados.



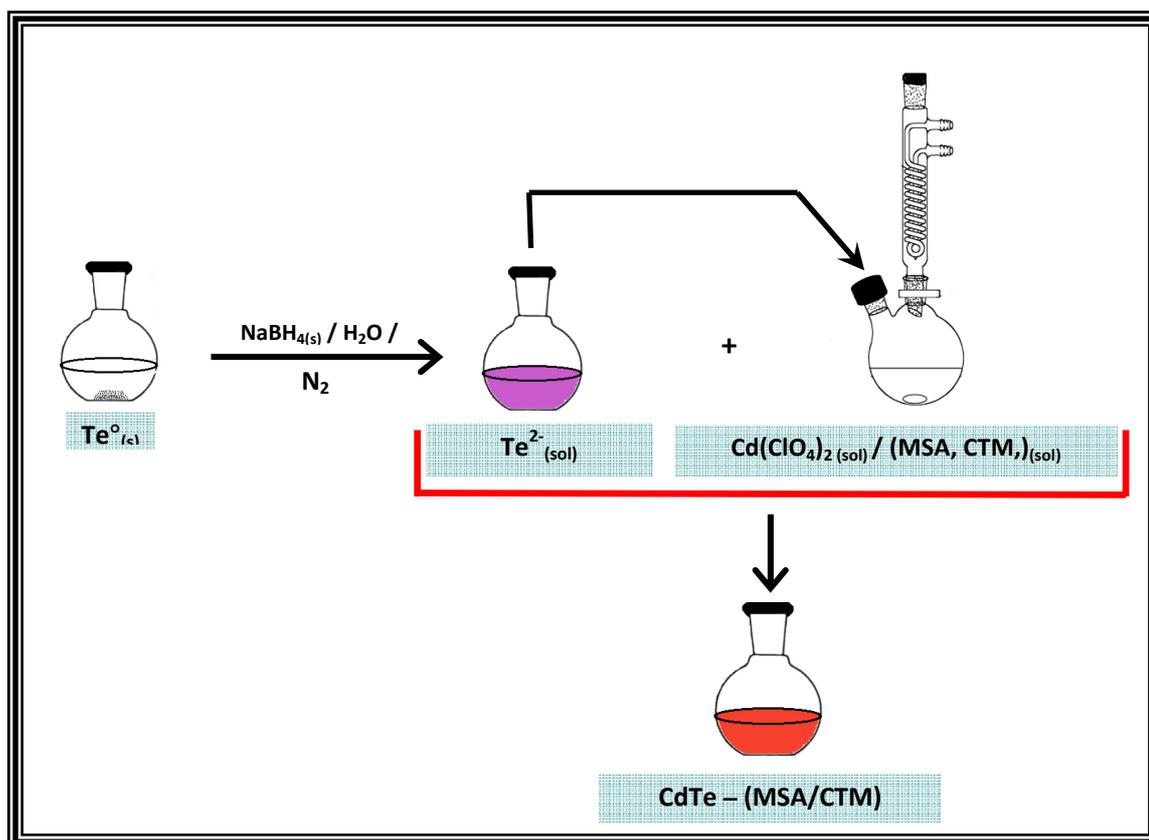
**Figura 4.1** Fórmulas estruturais dos agentes estabilizantes/funcionalizantes empregados no processo de obtenção de pontos quânticos de CdTe, ácido mercaptosuccínico (A) e Cisteamina (B).

Todas as sínteses foram realizadas empregando-se água ultrapura desionizada, sob atmosfera não oxidativa (emprego de nitrogênio pureza 99,99%) e utilização de reagentes sem purificação adicional.

A Figura 4.2 exibe o esquema geral das etapas envolvidas no processo de obtenção das NPs de CdTe em meio aquoso.

As NPs de CdTe empregando ácido mercaptosuccínico (MSA) como estabilizante/funcionalizante foram preparadas com a razão molar **Cd<sup>2+</sup>:Te<sup>2-</sup>:Estabilizante** de **2:1:6**. Inicialmente, durante a etapa de síntese adicionou-se em um balão  $1 \times 10^{-4}$  mol de telúrio elementar (pó, 200 mesh, 99,8%, Aldrich), 400  $\mu$ L de solução de NaOH  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  e  $3,8 \times 10^{-3}$  mol do agente redutor NaBH<sub>4</sub> (Venpure AF granules, 98+%, Sigma-Aldrich), sob temperatura de 70°C, obtendo-se após a etapa de redução, uma solução fonte de íons Te<sup>2-</sup>. Em seguida, após a completa redução do Te<sup>0</sup>, adicionou-se a solução de íons Te<sup>2-</sup> a um outro balão contendo  $6 \times 10^{-4}$  mol de ácido mercaptosuccínico (97%, Aldrich) e  $2 \times 10^{-4}$  mol de Cd<sup>2+</sup> proveniente do reagente Cd(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (99%, Sigma-Aldrich), sendo todos os reagentes previamente solubilizados em água ultrapura desionizada (volume total de 20 mL) e pH ajustado para 10,5 com emprego de NaOH  $1 \text{ mol.L}^{-1}$ . Submeteu-se o

sistema à agitação constante e aquecimento de 90°C por 120 minutos. Posteriormente, após resfriamento para temperatura ambiente, armazenou-se a suspensão de NPs em refrigerador (2 – 8 °C).



**Figura 4.2** - Esquema geral das etapas envolvidas no processo de obtenção das nanopartículas de CdTe em meio aquoso neste trabalho.

Na síntese de CdTe empregando cisteamina (CTM) como estabilizante/funcionalizante empregou-se a razão molar  $\text{Cd}^{2+}:\text{Te}^{2-}:\text{Estabilizante}$  de **1:0,1:2,42**. Inicialmente, durante a etapa de síntese adicionou-se em um balão 4,6 x 10<sup>-4</sup> mol de telúrio elemental (pó, 200 mesh, 99,8%, Aldrich), 400 µL de solução de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup> e 2,5 x 10<sup>-3</sup> mol do agente redutor NaBH<sub>4</sub> (Venpure AF granules, 98+%, Sigma-Aldrich), sob temperatura de 70°C, obtendo-se após a etapa de redução uma solução fonte de íons Te<sup>2-</sup>. Em seguida, após a completa redução do Te<sup>0</sup>, adicionou-se a solução de íons Te<sup>2-</sup> em outro balão contendo 5,7 x 10<sup>-3</sup> mol de cisteamina (98%, Aldrich) e 4,7 x 10<sup>-3</sup> mol de Cd<sup>2+</sup> proveniente do reagente Cd(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (99%, Sigma-Aldrich), sendo todos os reagentes previamente solubilizados em água ultrapura desionizada (volume total de 125 mL) e pH ajustado

para 5,8 com emprego de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup>. Submeteu-se o sistema a agitação constante e aquecimento a 90°C com coleta de alíquotas em diferentes tempos (1h, 2h, 4h e 6h). Posteriormente, após resfriamento para temperatura ambiente, reajustou-se o pH do material para 5,80 com solução de cisteamina 0,5 x 10<sup>-1</sup> mol.L<sup>-1</sup> e armazenou-se a suspensão de NPs em refrigerador (2 – 8 °C) sob atmosfera de nitrogênio (WANG,2012; CHEN, 2007).

Na Figura 4.3 é exibido o aparato experimental empregado nas sínteses de CdTe em meio aquoso com os diferentes estabilizantes.



**Figura 4.3** – Aparato experimental empregado nas sínteses de CdTe em meio aquoso.

### **4.3 Bioconjugação de NPs de CdTe/MSA com Anticorpos Monoclonais Anti-NS1 DENV**

Realizaram-se protocolos de conjugação entre NPs de CdTe/MSA com anticorpos anti-NS1 DENV (concentração média de 8 g.L<sup>-1</sup>) para os quatro sorotipos (DENV-1, 2, 3, 4), empregando os agentes de comprimento-zero EDC e sulfo-NHS (CARVALHO, 2014; HERMANSON, 2008). Os anticorpos monoclonais empregados nos ensaios foram disponibilizados pela pesquisadora Dr<sup>a</sup> Marli Tenório Cordeiro do Laboratório de Virologia e Terapia Experimental do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (LaVITE/CPqAM).

Inicialmente as NPs foram submetidas a um processo de purificação empregando dispositivos de ultrafiltração por força centrífuga (Thermo Scientific, pierce concentrator 20MWCO), a 2000 rpm por 3 minutos, com três repetições. Em seguida, retirou-se do CdTe/MSA ( $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) purificado uma alíquota de 4 mL que foi submetida a ajuste de pH para 5,5 com emprego de solução de MSA  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ . Após a etapa de ajuste do pH, adicionou-se 0,0016 g de EDC (98%, Sigma-Aldrich) e 0,0044 g de Sulfo-NHS (98%, Sigma-Aldrich), estando os reagentes em concentração final de aproximadamente  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  e  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$ , respectivamente. Após a adição dos reagentes a amostra foi submetida a agitação orbital em temperatura ambiente por 15 minutos, visando promover a ativação dos grupamentos carboxílicos presentes na superfície das NPs. Decorridos 15 minutos de ativação das NPs, realizou-se uma purificação adicional com dispositivo de ultrafiltração (com parâmetros idênticos ao inicial) tendo como finalidade a eliminação de EDC e Sulfo-NHS residual. Ajustou-se o pH das NPs ativadas e purificadas para 7,2 utilizando aproximadamente 500  $\mu\text{L}$  de PBS 1X (pH=7,2), minimizando condições desfavoráveis aos anticorpos.

Preparam-se quatro conjugados distintos, por meio da adição de 990  $\mu\text{L}$  das NPs ativadas e purificadas mais 10  $\mu\text{L}$  de anticorpo anti-NS1 DENV para cada sorotipo, ficando os quatro bioconjugados com concentração final média de anticorpo equivalente a  $0,08 \text{ g.L}^{-1}$  e diluição de 1:100 (vol/vol). As NPs de CdTe/MSA com os anticorpos reagiram *overnight* em refrigerador ( $2-8 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Após o período de incubação realizou-se bloqueio por 1h em temperatura ambiente sob agitação orbital, adicionando-se 0,0012 g de TRIS (ultra puro, Amresco) para cada conjugado, ficando as amostras com concentração final de TRIS no valor de  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Os bioconjugados CdTe/MSA – Anti NS1 DENV-1 / DENV-2 / DENV-3 / DENV-4 foram utilizados em ensaios de detecção da proteína viral não estrutural NS1 em microplacas negras de poliestireno.

#### **4.4 Bioconjugação de NPs de CdTe/CTM com Anticorpos Monoclonais Anti-NS1 DENV**

As NPs de CdTe/CTM alíquota 4h foram covalentemente ligadas aos anticorpos anti-NS1 DENV-2 e DENV-3 (concentração média de  $8 \text{ g.L}^{-1}$ ) empregando o *crosslinker* heterobifuncional sulfo-SMCC (BRASIL JUNIOR, 2014; SHIN, 2010; HERMANSON, 2008). Inicialmente as NPs foram submetidas à etapa de

purificação empregando dispositivo de ultrafiltração por força centrífuga (Thermo Scientific, pierce concentrator 20MWCO), a 2000 rpm por 3 minutos, com três repetições.

Iniciou-se o processo de conjugação pela etapa de redução seletiva das ligações dissulfeto dos anticorpos anti-NS1 DENV. Para 20  $\mu\text{L}$  de cada anticorpo adicionaram-se 7  $\mu\text{L}$  da solução de TCEP 0,5  $\text{mmol.L}^{-1}$  (98%, Sigma-Aldrich), resultando em excesso molar de TCEP de aproximadamente 2,75. Os anticorpos foram submetidos a redução por 2h a temperatura de 37°C.

Após 60 minutos do início da primeira reação (redução dos anticorpos), iniciou-se em paralelo o processo de ativação da superfície aminada das NPs de CdTe/CTM 4h. Retirou-se do CdTe/CTM 4h (6,4  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) purificado uma alíquota de 2 mL que foi submetida a ajuste de pH para 7,2 com emprego de solução de NaOH 0,1  $\text{mol.L}^{-1}$ . Após a etapa de ajuste do pH, adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  da solução de sulfo-SMCC 27,5  $\text{mmol.L}^{-1}$  (99%, Chem-Impex) a alíquota de 2 mL de CdTe/CTM.

Após a adição do sulfo-SMCC a amostra foi deixada sob agitação orbital em temperatura ambiente por 60 minutos, promovendo a reação entre as amins presentes na superfície das NPs e os ésteres NHS do reagente. Ao término da ativação, realizou-se uma purificação adicional com dispositivo de ultrafiltração (com parâmetros idênticos ao inicial) tendo por finalidade a eliminação de Sulfo-SMCC residual, minimizando a probabilidade de formação de dímeros de anticorpos.

Prepararam-se dois conjugados distintos, por meio da mistura de 973  $\mu\text{L}$  das NPs ativadas e purificadas com 27  $\mu\text{L}$  de anticorpo anti-NS1 DENV para cada sorotipo, resultando uma concentração final média de 0,16  $\text{g.L}^{-1}$  de anticorpo para cada bioconjugado e diluição de 1:50 (vol/vol). As NPs de CdTe/CTM com os anticorpos reagiram *overnight* em refrigerador (2-8 °C) e ao final foram submetidas a uma ultrafiltração (com parâmetros idênticos ao inicial). Os bioconjugados CdTe/CTM – Anti NS1 DENV-2 e DENV-3 foram utilizados em ensaios de detecção da proteína viral não estrutural NS1 em microplacas negras de poliestireno.

#### **4.5 Caracterização óptica dos bioconjugados e das NPs de CdTe/MSA e CdTe/CTM**

As propriedades ópticas dos bioconjugados e das NPs de CdTe/MSA e CdTe/CTM foram analisadas por espectroscopia de absorção, empregando-se o

espectrofotômetro UV-Vis Thermo Scientific (modelo Evolution 600), e de excitação e emissão no fluorímetro Perkin Elmer (modelo LS 55), com fendas adequadas para garantir uma detecção eficiente.

A estimativa do tamanho das NPs de CdTe foi descrita na literatura em 2007 por Dagtepe e colaboradores e baseia-se na interpolação numa curva empírica de crescimento destas nanopartículas (DAGTEPE, 2007) (Eq 1):

$$D = \frac{1,38435 - 0,00066\lambda}{1 - 0,00121\lambda} \quad (1)$$

onde D = diâmetro das NPs de CdTe

$\lambda$  = comprimento de onda (nm) do máximo de absorção característico da transição excitônica 1S-1S.

A concentração das NPs também é estimada utilizando-se a relação de Lambert-Beer (3) onde o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) das NPs de CdTe foi estimado pela relação empírica desenvolvida por Yu e colaboradores (YU, 2003) (Eq. 2):

$$\epsilon = 10043 \times (D)^{2,12} \quad (2)$$

onde D é o diâmetro das NPs de CdTe.

$$A = \epsilon C L \quad (3)$$

Onde **A** é a absorvância no primeiro máximo de absorção, **C** é a concentração em mol.L<sup>-1</sup>, **L** é a distância percorrida pela luz (cubeta com caminho óptico de 1 cm) e  $\epsilon$  é o coeficiente de correlação tendo como unidade L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.

#### 4.6 Caracterização estrutural das NPs de CdTe/MSA e CdTe/CTM

A caracterização estrutural das NPs obtidas foi realizada por meio das técnicas de difratometria de raios-X (DRX) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

As amostras de CdTe/MSA e CdTe/CTM preparadas para análise de DRX foram submetidas a um processo de precipitação induzida pela desestabilização do meio coloidal com álcool isopropílico absoluto (P.A., Dinâmica), seguido de centrifugação, 4000 rpm por 5 minutos. O equipamento empregado para obtenção dos difratogramas das NPs, foi um difratômetro da marca Siemens Nixford D5000, varredura  $2\theta = 20^\circ - 60^\circ$ , radiação incidente  $K\alpha_{(Cu)} = 1,544 \text{ \AA}$  e filtro de Níquel.

Realizou-se o cálculo teórico da estimativa do diâmetro médio das NPs por meio da equação de Scherrer:

$$D (\text{Å}) = (0,9 \times \lambda) / (\beta \times \cos\theta) \quad (4)$$

Onde **D** é o diâmetro médio das partículas em Å,  **$\lambda$**  Comprimento de onda da radiação incidente ( $K\alpha=1,5406 \text{ \AA}$ ),  **$\beta$**  é a largura do pico de difração mais intenso a meia altura em radianos e  **$\theta$**  é o ângulo do pico mais intenso.

Utilizou-se a microscopia eletrônica de transmissão com intuito de se obter informações relativas à morfologia, tamanho médio e dispersão de tamanho das NPs de CdTe/MSA. O material analisado foi depositado, sob a forma de gotículas da suspensão concentrada, em uma tela de cobre (200 *mesh*) revestida com filme fino de carbono. As gotículas foram deixadas secar e a grade foi utilizada em seguida. O equipamento utilizado foi um microscópio fabricado pela Jeol, modelo 200CX, com tensão de 200 KV e resolução de ponto 0,38 nm.

A carga superficial das NPs de CdTe foi determinada utilizando-se um equipamento Malvern (modelo ZetaSizer Nano ZS90), obtendo-se os valores de potencial zeta ( $\zeta$ ).

#### **4.7 Detecção da proteína viral NS1 por análise de fluorescência em microplacas**

Microplacas negras de poliestireno com 96 poços  $\frac{1}{2}$  área (1/2 Area Plate 96F Black, volume máximo 200  $\mu\text{L}$ , Perkin Elmer) foram previamente sensibilizadas com a proteína viral não estrutural NS1 DENV-2 nativa da cepa circulante na Tailândia, que possui maior virulência e efeito citopático mais pronunciado.

Obteve-se a proteína NS1 nativa DENV-2 infectando células clone C6/36 em crescimento no interior de frascos T25 com o emprego do DENV-2 (cepas 16681/Tailândia) e multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1. As células foram cultivadas em meio Leibovitz L-15 (GIBCO, Invitrogen) contendo soro fetal bovino por

5-6 dias à temperatura de 28°C. Coletaram-se os sobrenadantes das culturas contendo a proteína NS1 no quinto dia e realizou-se centrifugação do material por 10 minutos a 1500 rpm. Como controle negativo utilizou-se sobrenadante de cultura de C6/36 não infectada, preparado sob as mesmas condições. A confirmação da presença de NS1 nativa foi realizada empregando-se anticorpos monoclonais anti-NS1 DENV-2 por ELISA. As amostras de NS1 nativa foram obtidas no Laboratório de Virologia e Terapia Experimental do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (LaVITE/CPqAM).

A proteína nativa NS1 DENV-2 da cepa circulante na Tailândia foi diluída na razão 1:1 com PBS 1X (pH=7,2), não se podendo inferir a quantidade de proteína presente na alíquota. Após a diluição, adicionou-se 50 µL por poço da solução contendo a NS1 DENV-2 Brasil em 48 poços. Em seguida armazenou-se a microplaca em refrigerador, para sensibilização *overnight* em temperatura de 2-8 °C. Realizada a sensibilização, efetuaram-se lavagens com volume de 150 µL de PBS 1X por poço com três repetições, promovendo a retirada de NS1 não aderida à superfície dos poços. Após a remoção da proteína sem adesão, com o intuito de ocupar os sítios vazios, realizou-se bloqueio com adição de 100 µL por poço de solução de BSA 1%, submetendo a microplaca à incubação *overnight* em refrigerador. Concluído o bloqueio, lavaram-se os poços com 150 µL de PBS 1X por três vezes, para retirada do excesso de BSA. Armazenou-se a microplaca sensibilizada e bloqueada em refrigerador para posterior uso com os conjugados CdTe-anti NS1 DENV.

Utilizaram-se as microplacas sensibilizadas em ensaios de detecção da proteína viral NS1 por análise de fluorescência, com o emprego dos conjugados CdTe/MSA anti-NS1 DENV (dos quatro sorotipos) e CdTe/CTM anti-NS1 DENV-2 e DENV-3.

Preparam-se as microplacas negras de poliestireno com amostras em quintuplicata, tanto para os controles quanto para os conjugados utilizados na detecção da proteína, descritos abaixo:

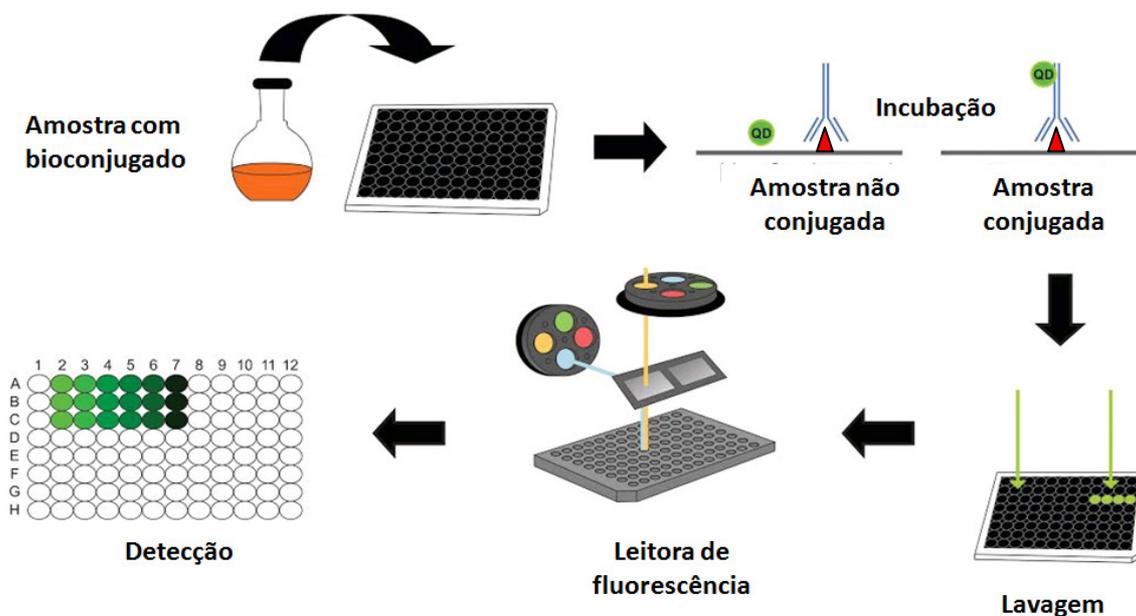
- 1) Leitura de poços vazios (detecção de ruído do equipamento);
- 2) Controle (NS1 DENV-2, detecção de possível fluorescência da proteína isolada na faixa de excitação e emissão empregada);
- 3) Controle de possível interação inespecífica (sensibilização dos poços com BSA 4% e posterior adição do bioconjugado);

4) CdTe/MSA ou CdTe/CTM isolados (comprovar a ausência de adesão direta das NPs ao poliestireno da microplaca);

5) Bioconjugados CdTe/MSA-anti-NS1 DENV ou CdTe/CTM-anti-NS1 DENV (em poços sensibilizados com NS1 DENV-2 e bloqueados com BSA 1%).

Nos itens 3 e 5 adicionaram-se 50  $\mu\text{L}$  do bioconjugado selecionado por poço, enquanto que no item 4 adicionaram-se 50  $\mu\text{L}$  de CdTe/MSA ou CdTe/CTM. Após adição do bioconjugado e das NPs isoladas em seus respectivos poços, incubou-se a microplaca *overnight* em refrigerador. Posteriormente, os poços foram lavados por 3 vezes com PBS 1X e volume de 200  $\mu\text{L}$  por poço, com agitação suave da microplaca durante 30 segundos por ciclo de lavagem. A Figura 4.4 exibe o esquema empregado na análise das microplacas.

Em seguida, as microplacas foram inseridas no leitor de placas Perkin Elmer (modelo Victor 2 Wallac) por fluorescência e submetidas a leituras com os filtros de excitação (F355nm) e de emissão (F595nm) para os bioconjugados e controles contendo CdTe/MSA e os filtros de excitação (F355nm) e de emissão (F535nm) para os bioconjugados e controles contendo CdTe/CTM. Ajustou-se a intensidade da lâmpada para 15.000 cW, com 1s de tempo de coleta e fendas de excitação e emissão com abertura normal (CARVALHO,2014; BRASIL JR., 2014).



**Figura 4.4** - Representação Esquemática do processo de detecção da proteína viral NS1 DENV-2 por análise de fluorescência em microplaca.

#### **4.8 Marcação de células clone C6/36 com bioconjugado CdTe/MSA-anti-NS1 DENV-2**

Infectaram-se células C6/36 do mosquito *Aedes albopictus* em crescimento em frascos T25 com densidade média de 300.000 células/mL com DENV-2 (cepa 3808/BR-PE/95) e MOI de 0,1. As células foram cultivadas em meio Leibovitz L-15 (GIBCO, Invitrogen) contendo soro fetal bovino por 3 dias a temperatura de 28°C. Coletou-se a suspensão da cultura de células contendo o DENV no terceiro dia e centrifugou-se o material por 5 minutos a 1000 rpm, descartando-se 50% do sobrenadante. Como controle negativo empregou-se a suspensão de células não infectadas, submetidas às mesmas condições.

Inseriram-se lamínulas no interior da placa de cultura celular de 24 poços, sendo recobertas com 150 µL da suspensão de células infectadas ou com mesmo volume para a suspensão de células não infectadas, empregadas como controles negativos. Todo o processo de inoculação e replicação do DENV-2 em células C6/36, bem como o preparo das lamínulas foi realizado no LaVITE/CPqAM.

Durante a etapa de preparo das lamínulas para visualização em microscópio de fluorescência, retirou-se pelas bordas dos poços da placa o meio de cultura que recobria as mesmas, cuidadosamente com auxílio de micropipetador. As lamínulas contendo as células aderidas foram divididas em dois sistemas, fixado e não fixado, possuindo os mesmos controles. No sistema contendo células fixadas realizou-se o procedimento com emprego de acetona 30% (P.A., Vetec) em PBS gelado, recobrando as células com a solução e incubação por 30 minutos em refrigerador. Ao término da incubação removeu-se o solvente e realizou-se a secagem das lamínulas com secador cuidadosamente. As demais lamínulas utilizadas no sistema não fixado não foram submetidas à etapa de fixação, tendo por finalidade a verificação da influência do processo no perfil de marcação das células.

Em seguida, para os dois sistemas, adicionaram-se 150 µL do CdTe/MSA (apenas o PQ) diluído a 25% em água, nas lamínulas contendo células infectadas por DENV-2, como controle do procedimento de marcação. Células fixadas e não fixadas com e sem infecção por DENV-2 e ausentes de PQs ou bioconjugados também foram empregadas como controles. Recobriram-se lamínulas fixadas e não fixadas contendo células infectadas por DENV-2 com 150 µL do bioconjugado CdTe/MSA-anti-NS1 DENV-2, avaliando-se a marcação. Após a adição do PQ ou

bioconjugado, realizou-se a etapa de incubação em estufa à 37 °C / 5% CO<sub>2</sub> durante 30 minutos.

Finalizada a incubação lavaram-se os poços com PBS 1x durante 10 minutos por duas vezes, retirando-se cuidadosamente o tampão e deixando um pouco do líquido para evitar o ressecamento das lamínulas. Transferiram-se as lamínulas para lâminas de microscópio e observou-se em objetiva com aumento de 40X no microscópio convencional de fluorescência Leica (modelo DMI400). A fluorescência do material foi detectada com emprego do filtro de *band pass* de 645/75 nm.

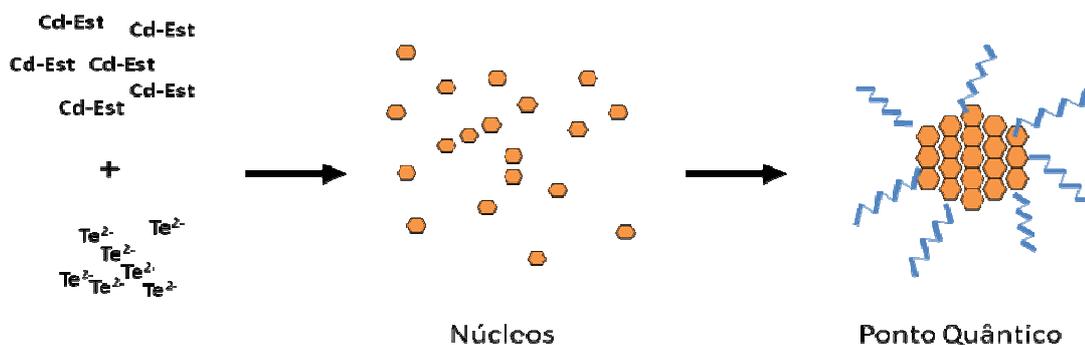
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Preparação dos pontos quânticos de CdTe em meio aquoso – considerações sobre os processos de obtenção

Todas as sínteses foram realizadas sob atmosfera não oxidativa, tendo em vista que a ausência de  $O_2$  é imprescindível para a redução do telúrio e manutenção dos íons  $Te^{2-}$  no meio. Este elemento químico é altamente propenso a reagir com o oxigênio, caso esteja presente, resultando num de seus respectivos óxidos,  $TeO_2$ ,  $Te_2O_7$ , dentre outros (PETRAGNANI, 2010; GAPONIK, 2002).

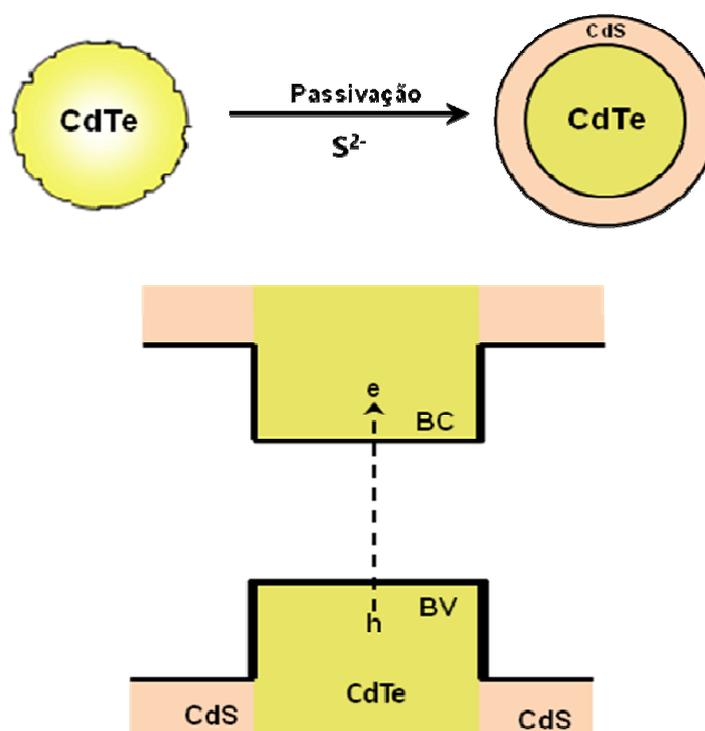
Na primeira etapa do processo de síntese ocorre a desprotonação dos grupamentos sulfidrilas (SH) do estabilizante, em virtude do ajuste do valor de pH se encontrar acima do pKa dos grupamentos SH, garantindo uma maior concentração sob a forma ionizada no meio (BRASIL JR., 2010). Excetua-se desse processo a síntese que emprega CTM como agente estabilizante, tendo em vista que os trabalhos desenvolvidos na literatura (WANG, 2012; CHEN, 2007), empregaram pH geralmente entre 5,6 e 5,85 na solução fonte de CTM, garantindo maior estabilidade e fluorescência das sínteses obtidas.

Na etapa de nucleação ocorre a formação de monômeros CdTe, oriundos da adição do  $Te^{2-}$  à solução que contém íons  $Cd^{2+}$  complexados às sulfidrilas do estabilizante, presentes no meio reacional. O esquema da Figura 5.1 apresenta as etapas de formação dos nanocristais em meio coloidal. Em seguida, ocorre o agrupamento dos monômeros promovendo o crescimento dos PQs (DAGTEPE, 2007; ZHANG, 2003).



**Figura 5.1** – Esquema geral das etapas relacionadas à formação das nanopartículas de CdTe em meio coloidal. Cd-Est (Est = estabilizante) é o complexo inicialmente formado entre os íons  $Cd^{2+}$  e o agente estabilizante utilizado.

Ao final da etapa de nucleação o excesso de íons  $\text{Cd}^{2+}$  complexados às sulfidrilas do estabilizante presentes no estágio inicial do crescimento dos nanocristais provê condições favoráveis para otimizar o ordenamento da superfície do material obtido (ZHANG, 2003). O excesso de complexo presente no meio reacional se deposita na superfície dos nanocristais, formando algumas monocamadas do material semiconductor CdS que possui *bandgap* maior ( $E_g = 2,5$  eV) (SANTOS, 2008). A formação destas monocamadas compreende uma etapa conhecida por passivação superficial das nanopartículas. Esta etapa é crucial para a eficiência do processo responsável pela fluorescência destes sistemas: a recombinação excitônica. As partículas recém preparadas, devido à alta velocidade de crescimento, possuem uma grande quantidade de defeitos superficiais relacionados principalmente à vacância de íons no retículo ( $\text{Cd}^{2+}$  ou  $\text{Te}^{2-}$ ). Estes defeitos geram novos estados de energia onde processos de desativação da fluorescência podem ocorrer. À medida que a camada de passivação é formada, estas vacâncias são suprimidas e aumenta-se a eficiência da fluorescência (ZHANG, 2003; SANTOS, 2008), como exibido na Figura 5.2.



**Figura 5.2** – Esquema ilustrativo do processo de passivação que ocorre na superfície dos PQs. BV = banda de valência; BC = banda de condução.

### 5.1.1 Sistema estabilizado pelo ácido mercaptosuccínico

Nos últimos anos vem ocorrendo um acréscimo na quantidade de trabalhos que descrevem as metodologias de obtenção de pontos quânticos coloidais em meio aquoso estabilizadas por MSA (ZHU, 2013; YING, 2008; WANG, 2008). Em comparação com os alquil-tióis comumente empregados na preparação de NPs de CdTe em meio aquoso, com destaque para os ácidos mercaptoacético e mercaptopropiônico, o MSA proporciona maior estabilidade e fluorescência ao material (ZHU, 2013; WANG, 2008).

A molécula de MSA apresenta em sua estrutura dois grupamentos carboxílicos com valores distintos de  $pK_{COOH}$  ( $pK_{COOH1} = 3,30$  e  $pK_{COOH2} = 4,94$ ) que conferem maior carga superficial as NPs que os alquil-tióis citados anteriormente. As NPs de CdTe/MSA podem ser utilizadas em procedimentos experimentais em meios alcalinos ou levemente ácidos, pH na faixa de 5,0-8,0, sem sofrer alterações significativas na estabilidade e fluorescência (YING, 2008). Estudos anteriores envolvendo a interação de sulfidrilas na superfície de monômeros de CdS na etapa de nucleação, demonstraram que em meio ácido as sulfidrilas do estabilizante se complexam mais fortemente à superfície dos monômeros que aos íons  $Cd^{2+}$  livres no meio, ocorrendo também liberação de moléculas do estabilizante que inicialmente formam complexos com íons  $Cd^{2+}$  via sulfidrilas (SWAYAMBUNATHAN, 1990).

Este fenômeno ocorre de modo similar nas NPs recobertas/estabilizadas com MSA, acontecendo uma deposição adicional do estabilizante à superfície das NPs de CdTe em meio ácido. Esta deposição adicional minimiza defeitos superficiais relacionados principalmente à vacância de íons no retículo, promovendo melhoria na emissão do material (YING, 2008). Contudo, sistemas com pH inferior a 5,0 promovem a protonação dos grupamentos carboxílicos do MSA, ocasionando instabilidade ao sistema coloidal, evidenciada por turvação inicial e posteriormente coagulação/precipitação das NPs de CdTe.

Esta robustez do material é proporcionada pelo estabilizante, em virtude da forte interação das sulfidrilas com os íons  $Cd^{2+}$  presentes na superfície das NPs, pela carga superficial e pelo efeito estérico da cadeia carbônica. Estas características favorecem o emprego das NPs de CdTe/MSA em reações de bioconjugação em pH levemente ácido, uma vez que a etapa de acoplamento empregando os reagentes EDC e Sulfo-NHS deve ser realizada preferencialmente em pH na faixa de 5,0-6,0 (ZHU, 2013; YING, 2008; HERMANSON, 2008). Uma vantagem adicional das NPs

de CdTe/MSA em reações de acoplamento via EDC/Sulfo-NHS, reside no maior número de grupamentos carboxílicos superficiais disponíveis para formação de ligações covalentes com as aminas protéicas.

O protocolo de síntese das NPs de CdTe/MSA baseou-se em metodologias desenvolvidas por (ZHU, 2013; YING, 2008; WANG, 2008). Ao término do processo de obtenção do material, os PQs de CdTe/MSA exibiram fluorescência, estabilidade satisfatória e ausência de processos oxidativos. A Figura 5.3 exibe uma imagem representativa do sistema coloidal obtido de CdTe/MSA através da metodologia empregada aqui.



**Figura 5.3** – À esquerda observa-se uma imagem do resultado da obtenção de sistema coloidal contendo CdTe/MSA à direita uma imagem do mesmo sistema sob excitação no UV ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ).

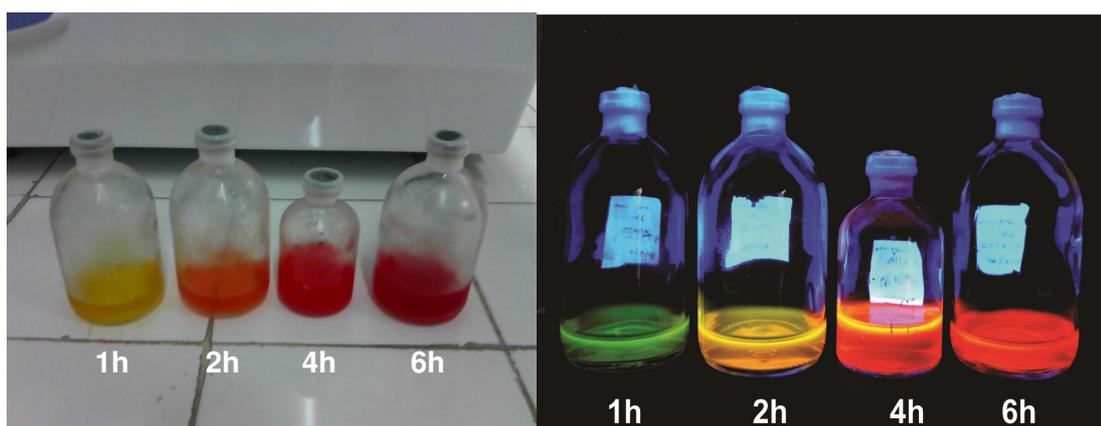
### 5.1.2 Sistema estabilizado pela Cisteamina

O protocolo de síntese dos PQs de CdTe/CTM baseou-se em metodologias descritas na literatura (WANG, 2012; YANG, 2008; CHEN, 2007). De acordo com observações dos autores destas metodologias os PQs de CdTe/CTM apresentam maior estabilidade e fluorescência quando o pH do meio é ajustado para 5,6-5,9, antes, durante e após o processo reacional. Os estudos de Wang e colaboradores demonstraram que no pH = 5,85 os PQs de CdTe/CTM exibiram fluorescência mais intensa e apresentaram boa estabilidade, enquanto que no pH = 6,05 ocorreu a separação de fase coloidal levando à formação de precipitados (WANG, 2012).

Similarmente ao observado nos PQs de CdTe/MSA, a formação dos complexos de  $\text{Cd}^{2+}$  com as sulfidrilas bem como a deposição adicional das moléculas do estabilizante à superfície das NPs de CdTe/CTM dependem do pH do meio

reacional (SWAYAMBUNATHAN, 1990). Contudo, a CTM não confere a mesma robustez aos PQs de CdTe que é observada com o emprego do MSA, sendo observado durante os procedimentos experimentais que os PQs de CdTe/CTM quando são submetidos a valores de pH acima de 6,0 precipitam e perdem intensidade de fluorescência.

Obteve-se êxito na estabilidade do material, quando o pH foi ajustado após o término da síntese com solução do próprio estabilizante e as amostras armazenadas sob atmosfera de nitrogênio, minimizando processos oxidativos. Realizou-se o estudo de acompanhamento da cinética de crescimento do material em diferentes intervalos de tempo, tendo por objetivo avaliar a influência do tempo de aquecimento nas propriedades dos PQs obtidos. Observou-se que o tempo em que o sistema foi submetido ao aquecimento e refluxo, influenciou diretamente nas dimensões e propriedades ópticas do material, acelerando a cinética de crescimento, conforme resultados apresentados no item 5.5. Ao término do processo de obtenção do material, as diversas alíquotas dos PQs de CdTe/CTM exibiram fluorescência, estabilidade satisfatória e ausência de processos oxidativos. A Figura 5.4 exibe a imagem de suspensões coloidais de CdTe/CTM obtidas e deixadas em meio reacional a diferentes tempos de aquecimento, enquanto que a Figura 5.5 exibe a suspensão de CdTe/CTM empregada na etapa de bioconjugação com os anticorpos anti-NS1 DENV.



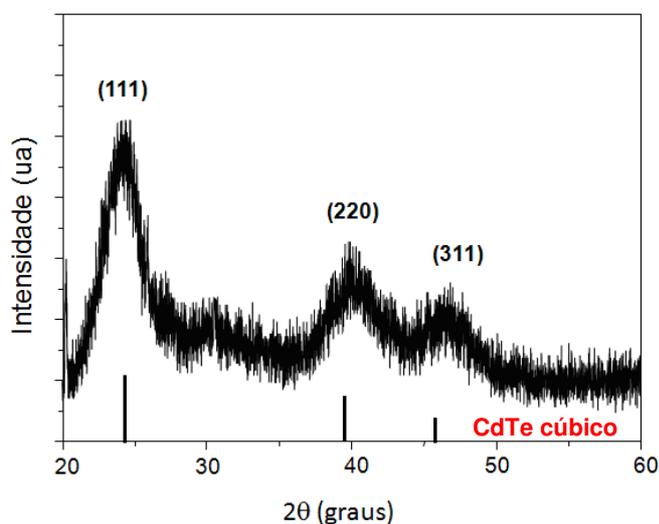
**Figura 5.4** – Fotografia representativa dos sistemas obtidos evidenciando as diferenças ópticas com o tempo reacional. À esquerda observa-se a imagem de alíquotas de CdTe/CTM e à direita observa-se o mesmo sistema sob excitação no UV ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ).



**Figura 5.5** – Fotografia da suspensão de CdTe/CTM utilizada para o desenvolvimento do fluoroimunoensaio. À esquerda observa-se o resultado direto da síntese e à direita observa-se o mesmo sistema sob excitação no UV ( $\lambda = 365$  nm).

## 5.2 - Caracterização estrutural das NPs de CdTe/MSA

A Figura 5.6 exibe um difratograma representativo de raios-X de pó característico das NPs de CdTe/MSA.



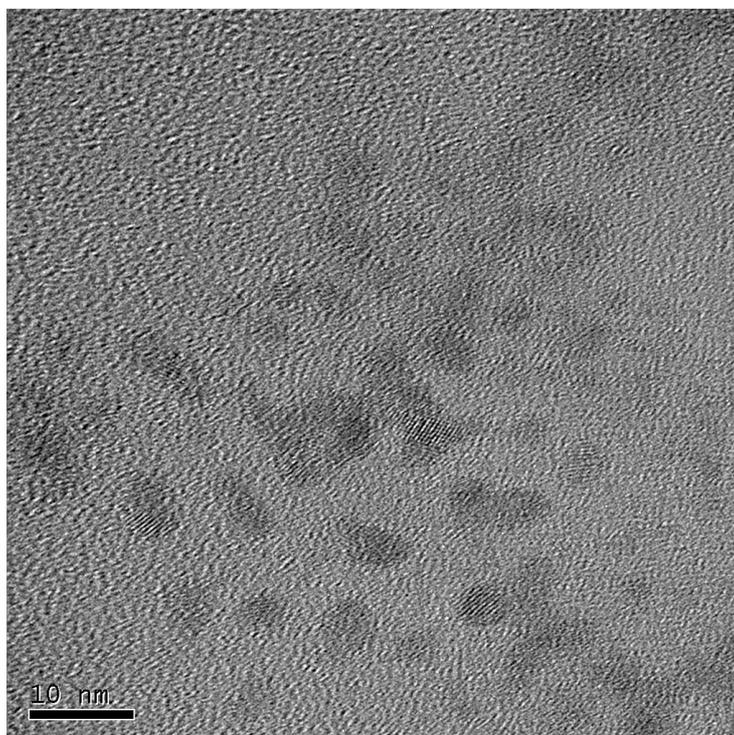
**Figura 5.6** - Difratograma de Raios-X de pó da amostra de PQs de CdTe/MSA.

A análise do difratograma da Figura 5.6 evidencia a presença de picos alargados, padrão característico de materiais de dimensões nanométricas. As NPs apresentam uma quantidade reduzida de planos cristalinos detectáveis, o que reduz

substancialmente o fenômeno de difração dos Raios-X incidentes (ZHU, 2013; WANG, 2012).

Os picos de difração  $2\theta = 24,5^\circ$ ;  $40,5^\circ$  e  $47,2^\circ$  podem ser atribuídos aos planos (111), (220) e (311), respectivamente, correspondendo ao sistema cúbico blenda de zinco do CdTe *bulk*, confirmado por dados da biblioteca cristalográfica JCPDS (Nº 65-1046). Empregando a equação de Scherrer, estimou-se que as NPs analisadas apresentam um diâmetro médio de 2,7 nm, valor próximo ao encontrado com emprego dos dados da absorbância no UV-Vis, a serem apresentados adiante (Item 5.3).

A Figura 5.7 exibe uma micrografia representativa das NPs de CdTe/MSA, apresentando pequenos aglomerados e NPs isoladas de dimensões variáveis.



**Figura 5.7** – Microscopia eletrônica de transmissão representativa de NPs de CdTe/MSA (regiões mais elétrons densas da imagem). Barra = 10 nm.

As NPs de CdTe/MSA na imagem apareceram sob formatos diversos, tendo algumas apresentado tamanho próximo a 3 nm, sendo possível visualizar os planos atômicos, o que indica a estrutura cristalina do material obtido.

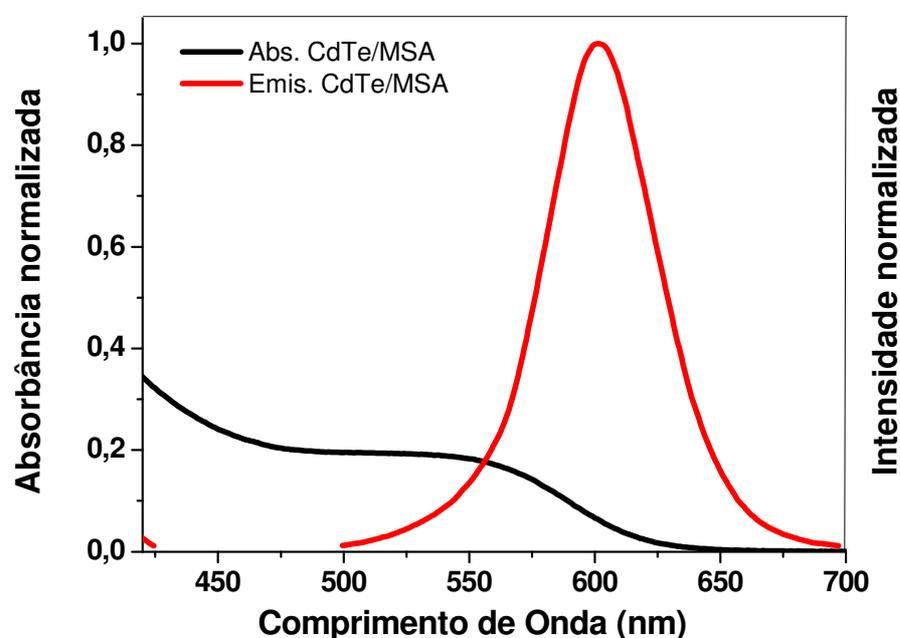
O potencial zeta ( $\xi$ ) está relacionado à densidade de cargas presentes na superfície das NPs, por isso, quanto maior a carga de superfície, maior em módulo será o valor do potencial. Este potencial contribui de modo significativo para as propriedades do sistema coloidal, tais como a estabilidade e as interações

interpartículas. As NPs de CdTe/MSA apresentaram em pH=10,0, potencial zeta  $\xi = -37,6$  mV, valor considerado satisfatório para conferir estabilidade ao sistema coloidal. Este valor está relacionado à presença de cargas negativas na superfície das NPs, que são oriundas dos grupamentos carboxílicos desprotonados do estabilizante (MSA). Quanto maior for o valor em modulo do potencial, menor será a frequência de interações entre as NPs, o que é benéfico ao material obtido, pois retarda o processo de maturação de Ostwald (PONS, 2006) que pode levar à desestabilização dos sistemas coloidais.

### 5.3 - Propriedades ópticas das suspensões de CdTe/MSA

A Figura 5.8 exhibe os espectros de absorção e emissão obtidos a partir da suspensão coloidal de CdTe/MSA.

A estimativa dos tamanhos e das concentrações das suspensões dos PQs de CdTe foi obtida através da análise de espectroscopia de absorção UV-vis. Estimou-se o tamanho dos PQs das amostras das suspensões por meio da equação empírica apresentada por Datgepe (DAGTEPE, 2007), conforme descrito na seção 4.5.



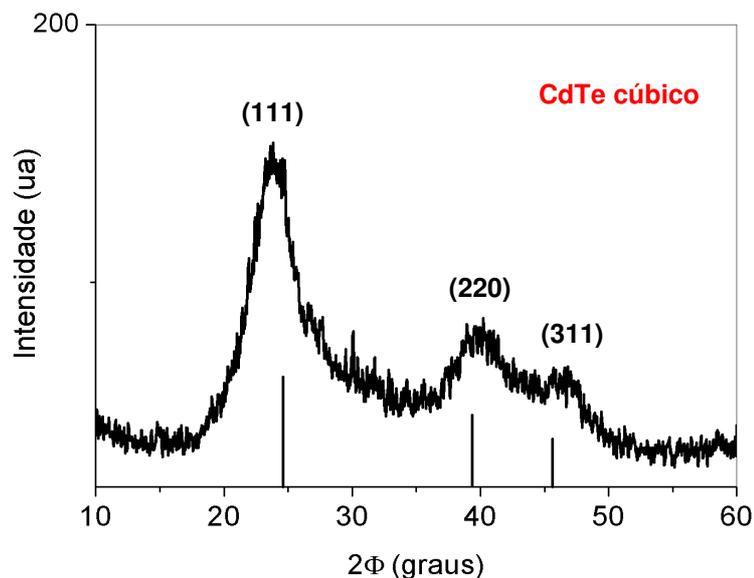
**Figura 5.8** – Espectros de absorção (em preto) e emissão (em vermelho) da suspensão de PQs de CdTe/MSA ( $\lambda_{exc} = 365$  nm). O primeiro máximo de absorção foi estimado em  $\lambda = 550$  nm e o máximo de emissão ocorre em  $\lambda = 602$  nm. Com FWHM = 51 nm.

Em estudos realizados por Yu e colaboradores (YU, 2003), não foi detectada a influência de métodos de síntese, estabilizantes ou solventes nos valores do coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) dos PQs. O tamanho dos PQs foi determinado pela posição do primeiro máximo de absorção do espectro UV-vis. Empregando as equações apresentadas na seção 4.5, para os PQs de CdTe/MSA neste trabalho foi estimado um tamanho médio de  $d = 3,0$  nm e concentração de  $[\text{CdTe}] = 2 \mu\text{mol.L}^{-1}$  para os sistemas recém preparados. O alargamento observado na banda de absorção do espectro da Figura 5.8, com ausência de um máximo de absorção bem definido na região entre 540 - 560 nm indica que o sistema apresenta populações de PQs com diferentes diâmetros, ou seja, com uma dispersão de tamanho considerável. A dispersão de tamanho do sistema está relacionada à cinética de formação dos PQs e a algumas limitações de controle externo durante o processo (p. ex. mistura homogênea de um precursor com o outro) são fatores que contribuem para este alargamento. Contudo, para a aplicação a que se destinou no desenvolvimento do projeto, essa dispersão de tamanho foi aceitável, tendo em vista que não comprometeu a aplicabilidade do material conforme será apresentado adiante.

O espectro de emissão se constitui num registro das intensidades de emissão sob determinado comprimento de onda de excitação. A emissão dos PQs de CdTe/MSA utilizados neste trabalho apresentam o máximo em  $\lambda = 602$  nm, estando esse valor inserido na região do laranja no espectro eletromagnético visível. A banda de emissão representa a primeira recombinação excitônica característica. A intensidade do pico de emissão revela a possível competição entre a recombinação radiativa e não-radiativa, enquanto que a largura da banda evidencia a presença de defeitos de superfície (SANTOS, 2008), mais baixos em energia. Isto causa um desvio para direita no perfil gaussiano da banda de emissão. A largura de banda à meia altura (*Full Width at Half Maximum* – FWHM) para emissão de PQs de semicondutores II-VI com baixa concentração de defeitos superficiais encontra-se na faixa de FWHM = 30 - 50 nm (YING, 2008). Neste trabalho observa-se uma FWHM = 51 nm. Diante disso, podemos concluir que o material obtido apresenta uma quantidade de defeitos superficiais dentro de um intervalo aceitável, não comprometendo a intensidade de fluorescência do material.

#### 5.4 - Caracterização estrutural das NPs de CdTe/CTM

A Figura 5.9 exibe um difratograma de raios-X de pó característico das NPs de CdTe/CTM. Assim como o difratograma do CdTe/MSA, a amostra de CdTe/CTM também apresentou picos alargados, algo que é bastante característico de materiais de dimensões nanométricas. Estas NPs apresentam uma quantidade reduzida de planos cristalinos detectáveis, o que reduz substancialmente o fenômeno de difração dos Raios-X incidentes (ZHU, 2013; WANG, 2012). Os picos de difração  $2\theta = 24,1^\circ$ ;  $39,7^\circ$  e  $46,6^\circ$  podem ser atribuídos aos planos (111), (220) e (311), respectivamente. A posição dos picos de difração corresponde ao sistema cúbico blenda de zinco do CdTe *bulk*, confirmado por dados da biblioteca cristalográfica JCPDS (Nº 65-1046).



**Figura 5.9** - Difratograma de Raios-X de pó da amostra de PQs de CdTe/CTM.

Empregando a equação de Scherrer estimou-se que as NPs analisadas apresentam um diâmetro médio de  $d = 2,02$  nm, valor próximo ao obtido com emprego dos dados da absorvância no UV-Vis.

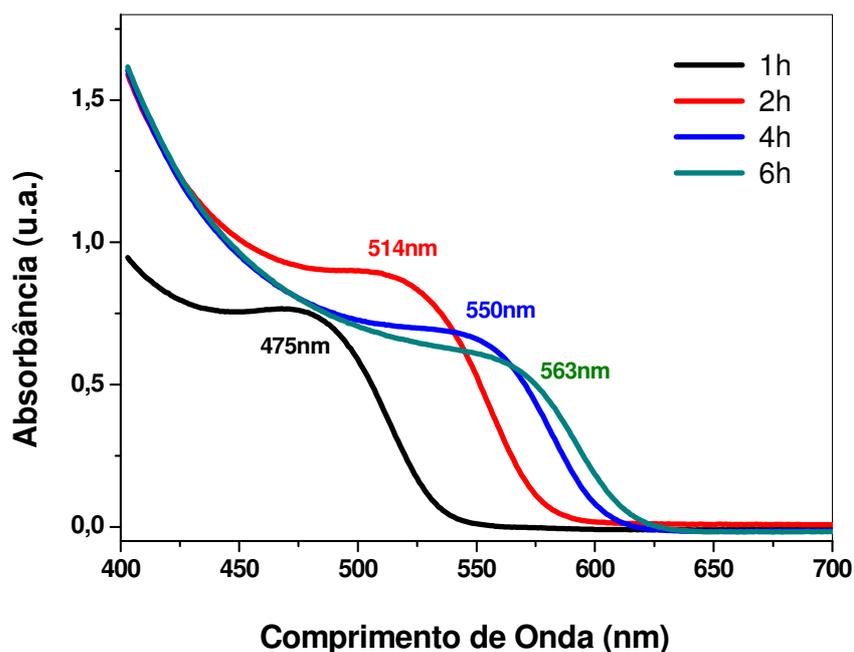
As NPs de CdTe/CTM em pH=5,6, apresentaram potencial zeta  $\xi = +25,4$  mV, valor considerado satisfatório para conferir estabilidade ao sistema coloidal. Este valor está relacionado à presença de cargas positivas na superfície das NPs, que são oriundas de aminas protonadas do estabilizante (CTM). Quanto maior for o valor em modulo do potencial, menor será a frequência de interações entre as NPs, o que

é benéfico ao material obtido, pois retarda o processo de maturação de Ostwald (PONS, 2006)

### 5.5 Propriedades ópticas das suspensões de CdTe/CTM

Os PQs de CdTe/CTM exibiram fluorescência em diferentes comprimentos de onda do espectro eletromagnético visível (coloração verde, amarela alaranjada ou vermelha, sob excitação UV), estando relacionados ao crescimento das partículas durante o tempo de duração e aquecimento empregado no processo reacional, conforme o exibido nas imagens apresentadas na Figura 5.4.

A Figura 5.10, exibe os espectros de absorção dos PQs de CdTe/CTM em diferentes intervalos de tempo.



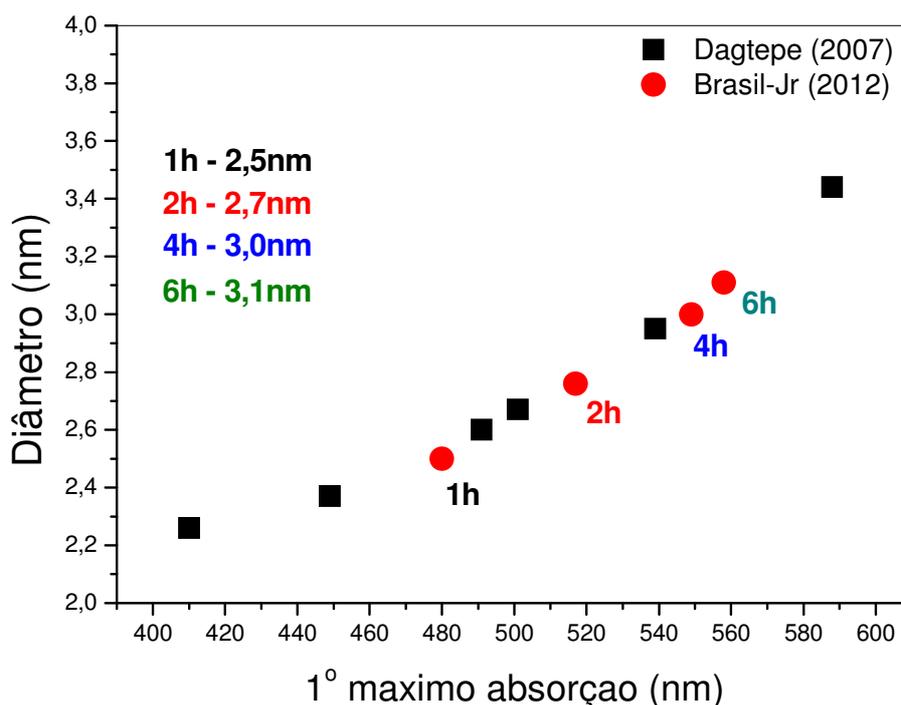
**Figura 5.10** - Espectros de absorção da suspensão de PQs de CdTe/CTM em diferentes intervalos de tempo reacional (1h, 2h, 4h e 6h).

Os espectros de absorção exibidos na Figura 5.10 apresentam os respectivos primeiros máximos de absorção razoavelmente bem definidos, para as amostras coletadas em tempos variados de reação observa-se um deslocamento em direção ao vermelho, a medida que o tempo reacional aumenta, evidenciando o crescimento dos PQs. Os espectros das alíquotas de CdTe/CTM obtidas apresentam o mesmo perfil de deslocamento observado no trabalho de Wang (WANG, 2012).

Este estudo de acompanhamento temporal para a síntese de CdTe/CTM teve por finalidade observar a cinética de crescimento dos nanocristais, bem como a influência do tempo de aquecimento nas propriedades ópticas do material.

Empregando as equações (1), (2) e (3) para os PQs de CdTe/MAS (seção 4.5) foram estimadas as concentrações das alíquotas 1h, 2h, 4h e 6h, tendo como resultados  $10,62 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ,  $11 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ,  $6,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e  $5,45 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Esta redução da concentração dos PQs ao longo do tempo reacional sugere que o crescimento está ocorrendo não somente a partir do consumo dos agentes precursores residuais, mas prioritariamente a partir da dissolução das partículas menores.

A Figura 5.11, exibe uma análise comparativa entre os resultados obtidos para CdTe/CTM e os publicados por Dagtepe e colaboradores (2007), aplicando a equação desenvolvida por Dagtepe que correlaciona matematicamente o 1º máximo de absorção ao diâmetro médio dos PQs.

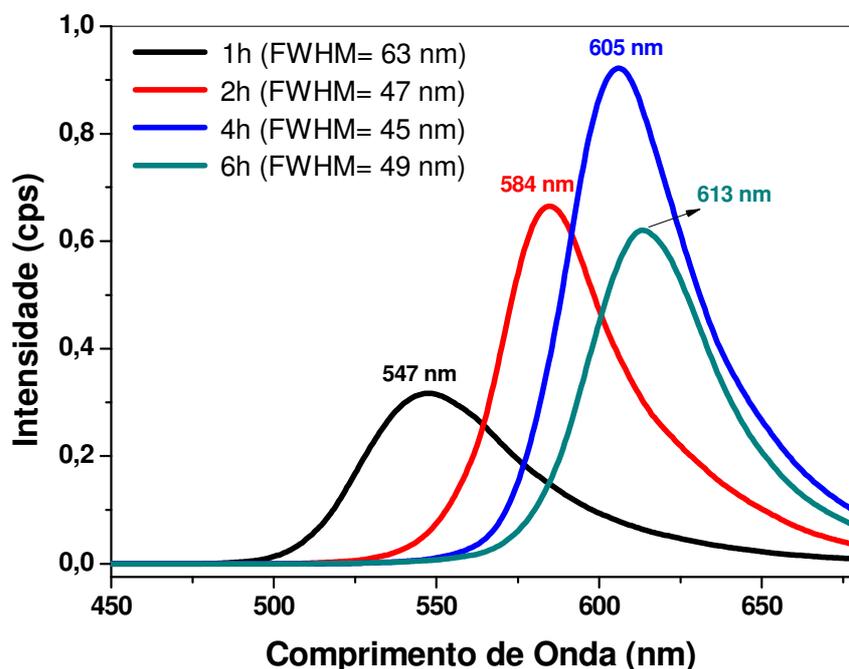


**Figura 5.11** – Análise comparativa entre os resultados encontrados por Dagtepe (2007) e o presente trabalho, correlacionando o 1º máximo de absorção ao diâmetro médio dos PQs.

Observou-se um aumento gradual, em concordância com os resultados obtidos por Dagtepe (2007), no diâmetro médio dos PQs de CdTe/CTM à medida em que os primeiros máximos de absorção se deslocaram em direção à região do vermelho no espectro eletromagnético visível. O diâmetro médio variou de 2,5 para 3,1 nm durante o aquecimento de 1 a 6 h, respectivamente.

A Figura 5.12, exibe os espectros de emissão dos PQs de CdTe/CTM em diferentes intervalos de tempo, quando excitados em 420 nm.

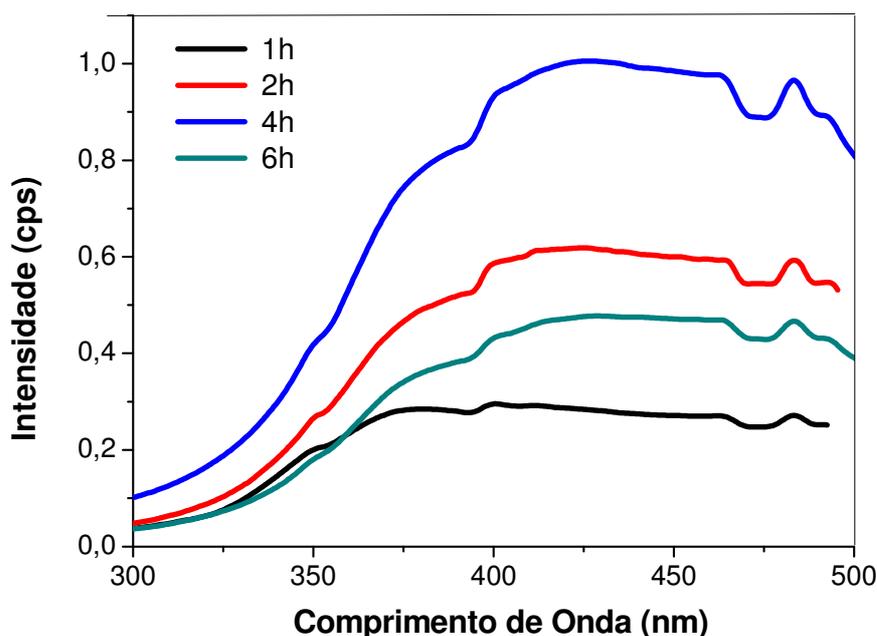
Também se observou a ocorrência de deslocamento progressivo do comprimento de onda da amostra em direção ao vermelho do espectro eletromagnético visível, ao decorrer do processo reacional de 547 nm para 613 nm. Onde a banda de emissão apresentou diminuição do alargamento inicial (alíquota com 1 h) com a evolução temporal do processo de síntese, sendo encontrado o menor valor de largura de banda a meia altura para alíquota de 4 h (FWHM= 45 nm).



**Figura 5.12** – Variação temporal dos espectros de emissão da suspensão de PQs de CdTe/CTM (1h, 2h, 4h e 6h), sob excitação em  $\lambda = 420$  nm.

O deslocamento dos picos de emissão foi acompanhado por um aumento gradual no diâmetro médio dos PQs, de 2,5 nm a 3,1 nm, no intervalo compreendido entre 1h e 6h. Também se observou que o deslocamento do pico de emissão foi geralmente acompanhado de um aumento considerável na intensidade de fluorescência, exceto para a alíquota de 6h. A alíquota coletada no tempo de 6 horas apresentou uma redução significativa da fluorescência, em comparação as alíquotas de 2 e 4 h. Sugere-se que esse fenômeno pode estar relacionado à degradação da camada de passivação dos PQs, em virtude da dissociação ou hidrólise do agente estabilizante.

A Figura 5.13, exibe os espectros de excitação dos PQs de CdTe/CTM em diferentes intervalos de tempo. Os espectros de excitação, observando-se os máximos descritos nos espectros de emissão dos sistemas (Figura 5.12) exibem três máximos bem definidos  $\lambda = 380, 400$  e  $420$  nm, possibilitando que os PQs apresentem intensidade satisfatória de emissão quando excitados nesses comprimentos de onda.



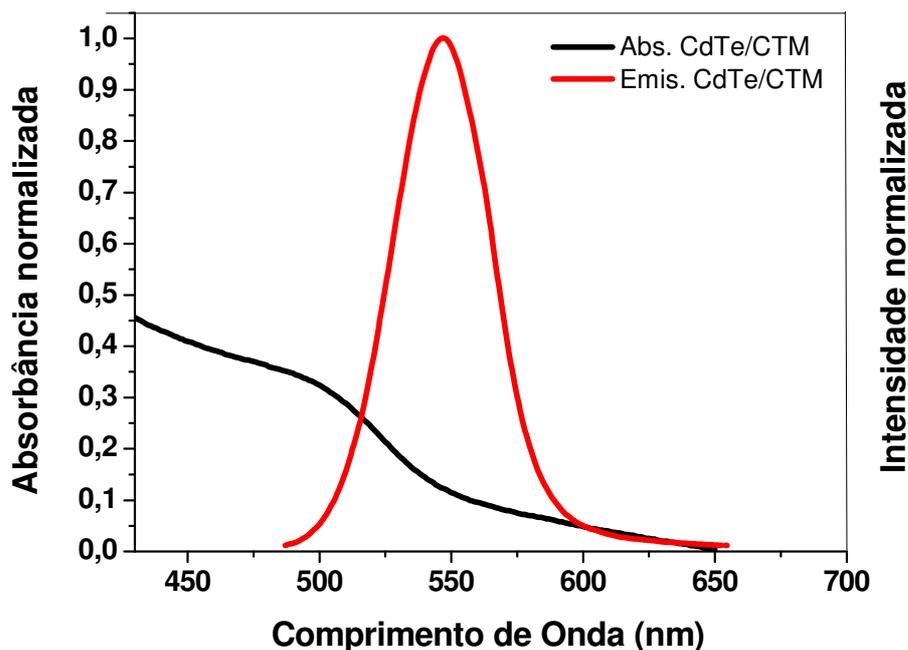
**Figura 5.13** - Espectros de excitação da suspensão de PQs de CdTe/CTM com diferentes intervalos de tempo reacional ( $t = 1h, 2h, 4h$  e  $6h$ ) observando-se para cada espectro o máximo de emissão descrito na Figura 5.12.

Ao término do estudo de acompanhamento temporal, concluiu-se que para as condições empregadas durante a etapa de obtenção dos PQs de CdTe/CTM, a alíquota 4h apresentou as melhores propriedades ópticas em conjunto com estabilidade coloidal satisfatória. Essas características promoveram a escolha dos parâmetros da alíquota 4h para uma síntese adicional de CdTe/CTM, que foi empregada nos experimentos de bioconjugação com os anticorpos anti-NS1 DENV dos quatro sorotipos.

A Figura 5.14 exibe os espectros de absorção e emissão obtidos a partir da suspensão coloidal de CdTe/CTM empregada na bioconjugação aos anticorpos anti-NS1 DENV.

Empregando as equações (1), (2) e (3) para os PQs de CdTe/CTM (seção 4.5) foi estimado um tamanho médio de  $2,7$  nm e concentração de  $6 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . O

alargamento observado na banda de absorção do espectro da Figura 5.14, com ausência de um máximo de absorção bem definido na região entre 490 - 525 nm indica que o sistema apresenta populações de PQs com diferentes diâmetros, ou seja, com uma dispersão de tamanho considerável. Provavelmente, a dispersão de tamanho do sistema, está relacionada à cinética de formação dos PQs e a algumas limitações de controle externo durante o processo.

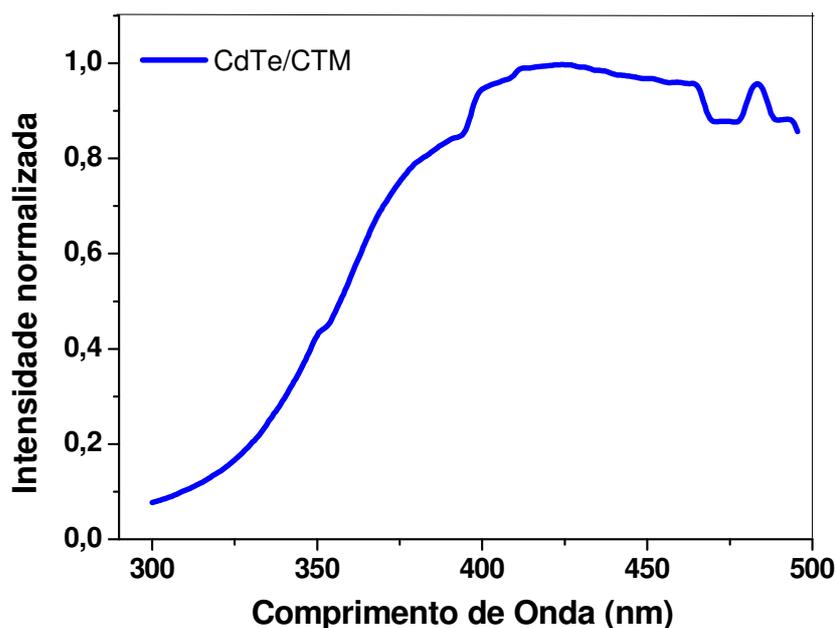


**Figura 5.14** – Espectros de absorção (preto) e emissão (vermelho) da suspensão de PQs de CdTe/CTM ( $\lambda_{exc} = 365$  nm).  $FWHM_{emissão} = 45$  nm.

Adicionalmente observamos um discreto deslocamento da linha de base no espectro de absorção, possivelmente devido ao espalhamento de luz causado por uma leve turbidez da suspensão coloidal de CdTe/CTM. Contudo, para a aplicação a que se destinou no desenvolvimento do projeto, essa dispersão de tamanho foi aceitável, tendo em vista que não comprometeu a aplicabilidade do material.

A emissão dos PQs de CdTe/CTM apresentou o máximo em  $\lambda = 546$  nm, estando esse valor inserido na região do verde no espectro eletromagnético visível. Ao visualizarmos a banda de emissão do CdTe/CTM observamos um formato simétrico, com pouco alargamento a meia altura. A largura de banda à meia altura encontrada foi de  $FWHM = 45$  nm, demonstrando que o material obtido apresenta uma quantidade de defeitos superficiais dentro de parâmetros aceitáveis, não comprometendo a fluorescência dos PQs (YING, 2008).

A Figura 5.15 apresenta o espectro de excitação dos PQs de CdTe/CTM. O espectro de excitação, observando-se o máximo apresentado no espectro de emissão do sistema (Figura 5.14), exibe uma banda larga entre  $\lambda = 380$  a  $460$  nm com intensidade máxima em torno de  $\lambda = 420$  nm, possibilitando que o material apresente intensidade satisfatória de emissão quando excitado nesse intervalo de comprimentos de onda.



**Figura 5.15** - Espectro de excitação representativo da suspensão de PQs de CdTe/CTM obtida com tempo reacional  $t = 4$  h, observando-se emissão em  $\lambda = 605$  nm.

## 5.6 Bioconjugação de NPs de CdTe/MSA com Anticorpos Monoclonais Anti-NS1 DENV

Os PQs de CdTe/MSA foram covalentemente ligados aos anticorpos monoclonais anti-NS1 DENV dos quatro sorotipos, sendo o processo mediado pelos agentes de acoplamento EDC e Sulfo-NHS. Esses reagentes promovem a formação de ligações entre os grupamentos amina dos anticorpos e os grupamentos carboxílicos presentes na superfície de PQs de CdTe/MSA. O EDC reage com ácidos carboxílicos, formando o intermediário altamente reativo *o*-acilisouréia. Estas espécies ativas interagem em seguida com nucleófilos presentes no meio reacional, neste caso com as aminas primárias dos anticorpos, resultando em ligação amida (BRASIL JR., 2010; HERMANSON, 2008).

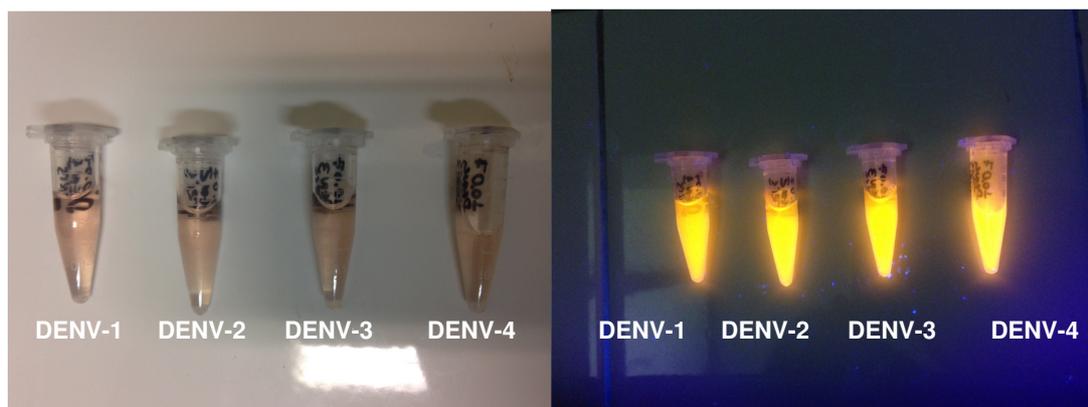
Durante o procedimento experimental, a etapa inicial de ultrafiltração dos PQs tem por finalidade reduzir a quantidade de resíduos provenientes da etapa de

síntese, em especial os íons  $\text{Cd}^{2+}$  livres na suspensão coloidal. Ao final da etapa de ativação realizou-se uma purificação adicional do material para retirar as moléculas residuais de EDC e sulfo-NHS, tendo por finalidade evitar uma possível ativação dos grupamentos carboxílicos dos anticorpos, o que acabaria promovendo a formação de dímeros de anticorpos, uma vez que essas biomoléculas apresentam os dois grupamentos envolvidos na formação da ligação (BRASIL JR., 2014; HERMANSON, 2008).

O processo de interação dos anticorpos com os PQs de CdTe/MSA foi realizado *overnight* em refrigerador (2-8°C), com pH ajustado para 7,2, visando minimizar condições desfavoráveis às biomoléculas, mantendo a sua bioespecificidade e atividade. Durante o desenvolvimento do protocolo, foram realizados testes para verificar as condições ideais, com a etapa de interação sendo realizada a temperatura ambiente por 2 h e posteriormente 4 h, entretanto os resultados obtidos não foram satisfatórios, possivelmente devido à cinética lenta do processo reacional em conjunto com uma provável desnaturação das proteínas.

O reagente TRIS é um composto orgânico que apresenta em sua estrutura uma amina primária, que na etapa de bloqueio dos bioconjugados CdTe/MSA-anti-NS1 DENV foi empregado para promover a interação entre estes grupamentos e uma pequena fração de PQs ativados presente no meio reacional que não foram acoplados aos anticorpos. Estes PQs ativados e não acoplados aos anticorpos, caso não sejam bloqueados, atuam como interferentes na etapa de detecção em microplacas, uma vez que eles podem se ligar diretamente as proteínas aderidas aos poços da microplaca (NS1, BSA), aumentando a amplitude do sinal de modo indevido.

Os bioconjugados obtidos permaneceram límpidos e com fluorescência intensa, sendo empregados nos ensaios de detecção da proteína viral NS1 nativa com êxito a ser apresentado adiante. Esta metodologia apresentou compatibilidade para os dois sistemas envolvidos (inorgânico/biológico), uma vez que as proteínas permaneceram com atividade e os PQs se mantiveram estáveis e fluorescentes. A Figura 5.16 exhibe os bioconjugados CdTe/MSA-anti-NS1 DENV-1/2/3/4 obtidos.

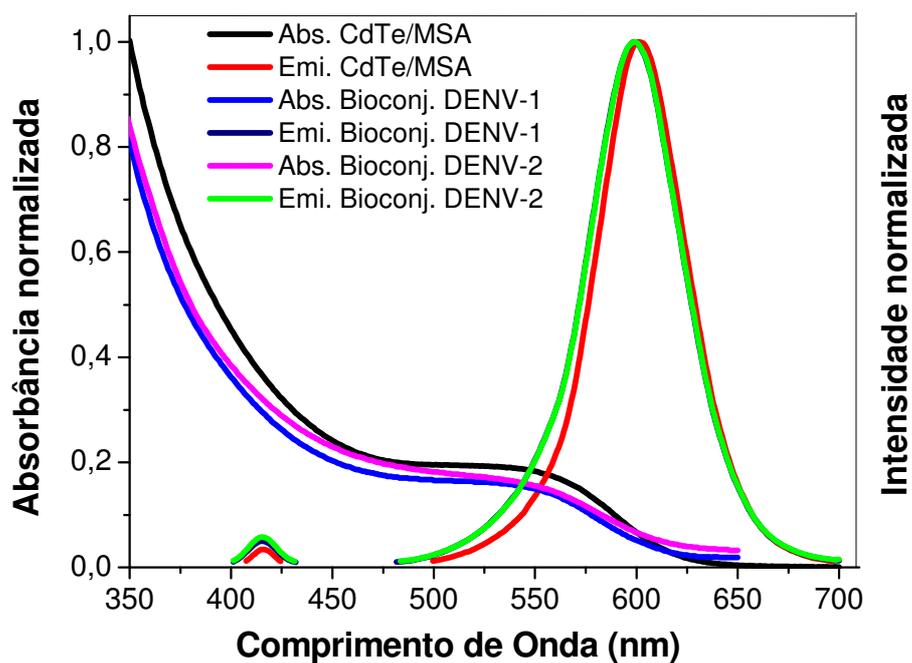


**Figura 5.16** – À esquerda observam-se imagens dos bioconjugados CdTe/MSA-anti-NS1 DENV dos quatro sorotipos e à direita imagem dos mesmos sistemas sob excitação no UV ( $\lambda = 365$  nm).

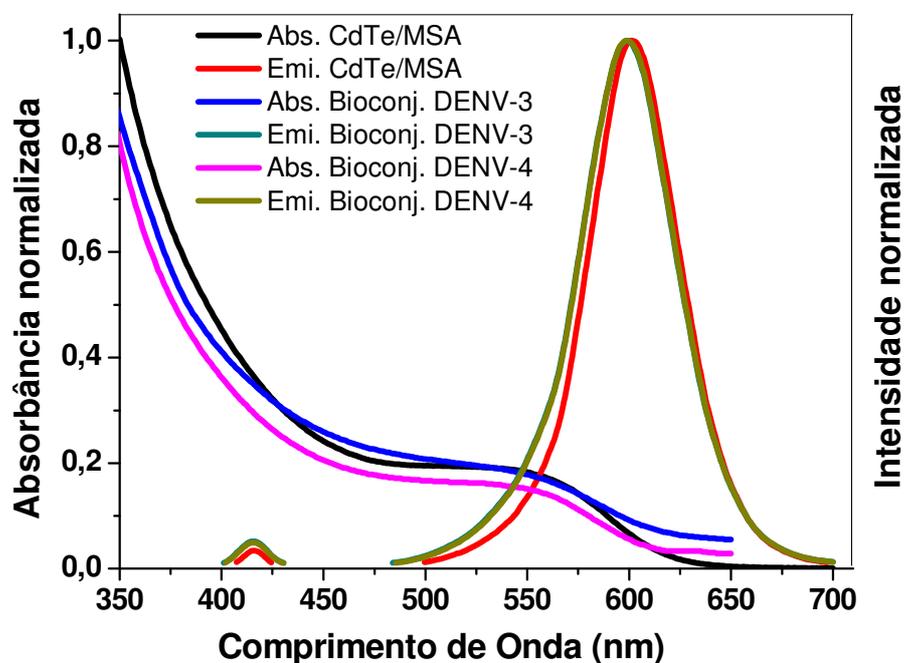
### 5.7 Propriedades ópticas dos bioconjugados CdTe/MSA – anti-NS1 DENV

As Figuras 5.17 e 5.18, exibem os espectros de absorção e emissão dos PQs de CdTe/MSA e dos bioconjugados CdTe/MSA-anti-NS1 DENV antes e após o processo de bioconjugação.

A análise do perfil de absorção dos PQs de CdTe/MSA na suspensão original e após sua bioconjugação mostra que não ocorreram alterações significativas no 1º máximo de absorção dos bioconjugados, apenas um discreto deslocamento das linhas de base. Todos os espectros de emissão dos bioconjugados apresentaram deslocamento de 3 nm em direção ao azul, provavelmente devido a algum fenômeno de superfície que ocorre após o acoplamento dos PQs aos anticorpos.



**Figura 5.17** – Espectros de absorção e emissão da suspensão de PQs de CdTe/MSA e dos bioconjugados CdTe/MSA-anti-NS1 DENV-1 e DENV-2 ( $\lambda_{exc} = 365$  nm).



**Figura 5.18** – Espectros de absorção e emissão da suspensão de PQs de CdTe/MSA e dos bioconjugados CdTe/MSA-anti-NS1 DENV-3 e DENV-4 ( $\lambda_{exc} = 365$  nm).

## 5.8 Bioconjugação de NPs de CdTe/CTM com Anticorpos Monoclonais Anti-NS1 DENV

O Sulfo-SMCC contém os grupamentos *N*-hidroxisuccinimida (éster NHS) e maleimidados. O primeiro grupamento reage com aminas primárias em pH na faixa de 7 - 9 formando ligações amidas estáveis, enquanto o segundo reage com grupamentos sulfidrilas com pH entre 6,5 e 7,5 formando ligações tioéteres estáveis. Por essas razões, conjugações empregando esse *crosslinker* são usualmente realizadas em pH 7,2-7,5, proporcionando condições menos danosas para os envolvidos no processo de interação, sobretudo a proteína (HERMANSON, 2008).

Os experimentos de bioconjugação envolvendo os PQs de CdTe/CTM com os anticorpos anti-NS1 DENV-2 e DENV-3 foram realizados em esquema reacional de duas etapas. A etapa inicial de ultrafiltração dos PQs tem por finalidade reduzir a quantidade de resíduos provenientes da etapa de síntese, em especial os íons  $\text{Cd}^{2+}$  e as moléculas de CTM livres na suspensão coloidal. O sulfo-SMCC reagiu em pH = 7,2 com os grupamentos amina presentes na superfície dos PQs, formando ligações amidas, sendo o excesso de reagente removido durante a etapa de ultrafiltração. Durante esta etapa de ajuste de pH e adição do reagente de acoplamento, ocorreu turvação dos PQs com início de precipitação. Diferentemente dos PQs de CdTe/MSA, os PQs de CdTe/CTM não resistem a alterações significativas de pH do meio. A purificação adicional tem por finalidade evitar uma possível ativação das aminas primárias dos anticorpos, o que acabaria promovendo a formação de dímeros de anticorpos, uma vez que essas biomoléculas apresentam os dois grupamentos envolvidos na formação da ligação (BRASIL JR., 2014; HERMANSON, 2008).

Em paralelo à etapa de ativação dos PQs de CdTe/CTM, realizou-se a redução das ligações dissulfeto dos anticorpos empregando o agente redutor TCEP. Este reagente promoveu a ruptura de ligações dissulfeto na região da dobradiça dos anticorpos, ocorrendo exposição de sulfidrilas que ficaram disponíveis para interagir com os PQs ativados com o sulfo-SMCC. A adição dos anticorpos reduzidos à alíquota de PQs ativados desencadeou na formação de ligações tioéteres estáveis, tendo como resultado o acoplamento entre os PQs e os anticorpos (BRASIL JR., 2014).

A etapa de redução dos anticorpos é a mais crítica de todo o processo de acoplamento, pois uma redução excessiva promoverá a inativação dos anticorpos. Enquanto que em uma redução ineficiente, não ocorrerá exposição de sulfidrilas em quantidade suficiente para se ligar aos PQs ativados. Visando minimizar o risco de

inativação dos anticorpos, porém com a garantia de uma exposição suficiente de sulfidrilas empregou-se um excesso molar de TCEP de 2,75 em relação aos anticorpos (HERMANSON, 2008).

Ao final da bioconjugação, após incubação *overnight* em refrigerador (2 - 8°C), os bioconjugados foram ultrafiltrados visando retirar o resíduo de TCEP da etapa de redução. Neste protocolo não foi necessária a realização de bloqueio ao final da reação, tendo em vista que o TCEP residual foi removido e as proteínas aderidas a microplaca (NS1 e BSA) não se encontram reduzidas (sem sulfidrilas expostas) para interagir com a pequena fração remanescente de PQs ativados pelo sulfo-SMCC que não foram acoplados aos anticorpos.

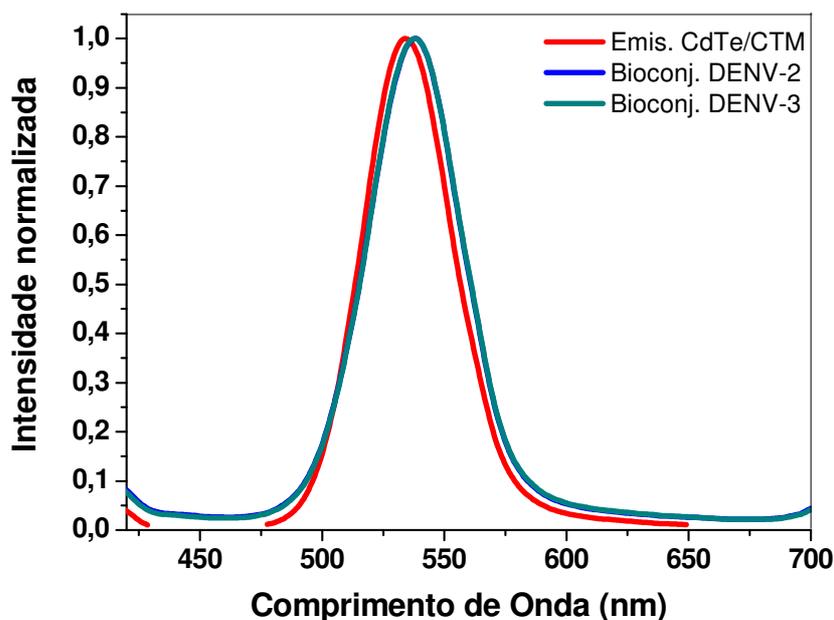
Os bioconjugados obtidos se apresentaram turvos e com formação de precipitados, ocorrendo alteração na fluorescência do material. Nestes protocolos de conjugação foram empregados apenas os anticorpos anti-NS1 DENV-2 e DENV3, pois estes apresentaram melhores resultados em ensaios de detecção em microplacas bem como em ensaios ELISA, realizados no LAVITE/CPqAM durante a etapa de avaliação de atividade. Os bioconjugados foram empregados nos ensaios de detecção da proteína viral NS1 nativa, porém não foram observados resultados satisfatórios, provavelmente em decorrência da desestabilização do sistema coloidal e redução da atividade dos anticorpos. A Figura 5.19 exhibe uma amostra de bioconjugado CdTe/MSA-anti-NS1 DENV obtida.



**Figura 5.19** – Imagem dos bioconjugado CdTe/CTM-anti-NS1 DENV e do mesmo sistema sob excitação no UV ( $\lambda = 365\text{nm}$ ).

## 5.9 Propriedades ópticas dos bioconjugados CdTe/CTM – anti-NS1 DENV

A Figura 5.20 exibe os espectros de emissão dos PQs de CdTe/CTM e dos bioconjugados CdTe/CTM-anti-NS1 DENV-2 e DENV-3 antes e após o processo de bioconjugação



**Figura 5.20** – Espectros de emissão da suspensão de PQs de CdTe/CTM e dos bioconjugados CdTe/MSA-anti-NS1 DENV-1 e DENV-2 ( $\lambda_{exc} = 365$  nm).

Não foi possível realizar a análise comparativa do perfil de absorção dos PQs de CdTe/CTM na suspensão original e após sua bioconjugação, pois os espectros das amostras bioconjugadas apresentaram acentuado deslocamento da linha de base e ausência de 1º máximo bem definido. Isto ocorreu devido à extensa turvação do meio indicando desestabilização do sistema coloidal. Todos os espectros de emissão dos bioconjugados apresentaram deslocamento de 4 nm em direção ao vermelho (534 para 538 nm), provavelmente devido a algum fenômeno de superfície que ocorre após o acoplamento dos PQs aos anticorpos.

### 5.10 Detecção da proteína viral NS1 por análise de fluorescência em microplacas

Durante a realização do experimento empregou-se uma técnica de detecção semi-quantitativa da intensidade de fluorescência para confirmar a presença da proteína viral NS1 nativa (CARVALHO, 2014). Microplacas negras de poliestireno com volume reduzido foram utilizadas como fase sólida durante os ensaios. Nessas microplacas são formadas interações hidrofóbicas entre o polímero que as recobre e os resíduos hidrofóbicos presentes nas proteínas.

A proteína viral NS1 nativa foi obtida do sobrenadante da cultura de células C6/36 infectadas com o DENV-2. O sobrenadante foi coletado no quinto dia após a inoculação do DENV, apresentando título elevado do antígeno NS1, devido a elevada virulência da cepa. Apesar de não se tratar de uma amostra contendo a NS1 purificada ou de um antígeno recombinante, a concentração elevada de NS1 no sobrenadante permitiu que o processo de detecção ocorresse sem dificuldades. Após a etapa de sensibilização *overnight* (2 - 8°C) dos poços da microplaca com o antígeno viral NS1, realizou-se o bloqueio com solução de BSA 1% (*overnight*, 2 - 8°C) com a finalidade de bloquear sítios não ocupados pela NS1 na superfície dos poços.

As microplacas sensibilizadas com a proteína NS1 nativa e bloqueadas com BSA foram incubadas (*overnight*, 2-8°C) com os bioconjugados CdTe/MSA-anti-NS1 DENV (quatro sorotipos) e CdTe/CTM-anti NS1 DENV-2 e DENV-3, tendo em média 4 µg e 8 µg de anticorpo anti-NS1 DENV por poço, respectivamente. As diluições dos anticorpos nos conjugados, 1:100 no CdTe/MSA-anti-NS1 DENV e 1:50 no CdTe/CTM-anti-NS1 DENV, são empregadas na rotina do ensaio ELISA de detecção do antígeno viral NS1.

Quando adicionados isolados nos poços das microplacas, os PQs não possuem a capacidade de interagir com o revestimento polimérico presente na fase sólida. Sendo evidenciado por meio de ensaios anteriores nos quais foram incubados apenas os PQs nas placas e pelos controles realizados no experimento (BRASIL JR., 2014; CARVALHO, 2014). Realizou-se também controle para verificar uma possível interação inespecífica entre os bioconjugados e a BSA empregada na etapa de bloqueio dos poços. Utilizou-se a BSA em concentração mais elevada (BSA 4%) com objetivo de garantir que todos os sítios dos poços fossem ocupados pela proteína, em virtude da ausência da proteína NS1 nativa DENV-2. Os demais controles, leitura

de poços vazios e de poços com apenas a proteína NS1, tiveram a finalidade de avaliar o *background* do equipamento e confirmar a ausência de fluorescência da NS1 nativa na faixa de excitação e emissão empregada no leitor de microplacas.

Após as etapas de incubação dos controles e dos bioconjugados, as microplacas foram lavadas por três vezes com PBS 1x, seguido de leitura no equipamento com detector de fluorescência. A fluorescência relativa dos bioconjugados foi estimada aplicando-se a Equação 5 (CARVALHO, 2014):

$$FL_{rel}(\%) = \frac{(FL_{bioconjugado} - FL_{controle})}{FL_{controle}} \times 100\% \quad (5)$$

onde  $FL_{bioconjugado}$  é média da intensidade de fluorescência do CdTe-anti-NS1 DENV e o  $FL_{controle}$  é o sinal médio detectado pelos controles.

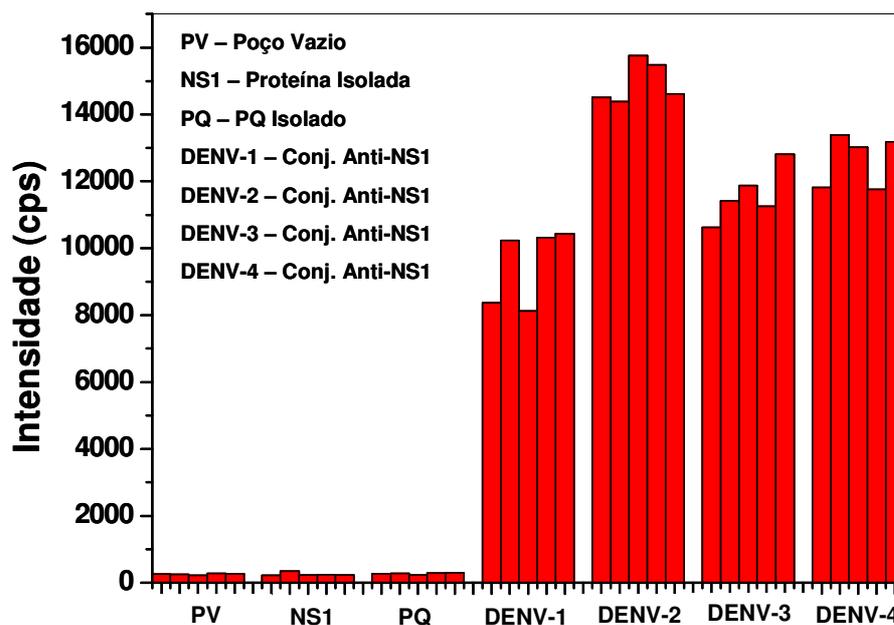
Se a intensidade de  $FL_{bioconjugado}$  é no mínimo o dobro do valor encontrado para  $FL_{controle}$  podemos considerar que o anticorpo foi satisfatoriamente acoplado aos PQs e manteve sua função de reconhecimento do antígeno NS1. Quanto mais elevados são os valores encontrados de  $FL_{bioconjugado}$ , podemos inferir que mais eficiente foi o processo de acoplamento. No outro sentido, se os valores de  $FL_{bioconjugado}$  estão na mesma ordem de intensidade do sinal dos controles, podemos considerar que o processo de conjugação não obteve êxito. Em outras palavras, o resultado é considerado positivo se a  $FL_{relativa}(\%)$  é igual ou superior a 100%, e negativo se inferior a 100%. Este critério de 100% foi selecionado após uma série de experimentos, envolvendo diferentes PQs e biomoléculas (BRASIL, 2014)

Todos os controles, apresentaram intensidades de fluorescência bem inferiores, em relação às detectadas para os bioconjugados CdTe-anti-NS1 DENV. Os anticorpos podem apresentar emissão na faixa de 310 a 340 nm, devido à presença de aminoácidos aromáticos. Entretanto, a emissão não é detectada no equipamento, tendo em vista que os filtros de excitação e emissão não são apropriados para esta região espectral. A fluorescência com intensidade significativa na região visível do espectro eletromagnético só é observada nos poços que foram previamente sensibilizados com a NS1 nativa e bloqueados com BSA, seguido de incubação com os bioconjugados CdTe-anti-NS1 DENV ativos e bioespecíficos.

Diferentes filtros de emissão foram empregados nos ensaios, tendo em vista que os PQs de CdTe/MSA e CdTe/CTM apresentam fluorescência em comprimentos de onda distintos. Contudo, os conjugados de CdTe/CTM-anti-NS1 DENV não

apresentaram resultados satisfatórios, apresentando intensidades de fluorescência com aumento pouco significativo em relação aos controles, evidenciando que o protocolo de conjugação para esse sistema necessita de otimização, visando garantir a integridade do anticorpo e a estabilidade/fluorescência dos PQs.

Encontram-se na Figura 5.21 e na Tabela 5.1, os resultados obtidos com os conjugados CdTe/MSA-anti-NS1 (para os quatro sorotipos).



**Figura 5.21** – Resultado das leituras feitas nos ensaios de fluorescência em microplacas obtidos para os conjugados CdTe/MSA-anti-NS1 (quatro diferentes sorotipos) e controles.

Durante a detecção foram empregados os filtros de excitação e de emissão (F355 nm) e (F595 nm), respectivamente. Os bioconjugados empregados conseguiram detectar satisfatoriamente a proteína viral NS1 nativa aderida à superfície dos poços da microplaca. Dentre os bioconjugados o CdTe/MSA-anti-NS1 DENV-2 apresentou o melhor resultado, apresentando  $FL_{rel}(\%)$  na ordem de 5.711%, correspondendo a um aumento de intensidade em torno de 57 vezes em relação aos controles.

Apesar de todos os anticorpos apresentarem reação cruzada com os demais sorotipos, o valor observado para a  $FL_{rel}(\%)$  do CdTe/MSA-anti-NS1 DENV-2 corrobora com a maior afinidade esperada deste anticorpo pela proteína NS1 DENV-2 aderida na microplaca. O coeficiente de variação deste bioconjugado ficou abaixo de 5% (tabela 5.1), evidenciando um conjunto de dados homogêneo devido à pequena dispersão relativa observada nos valores obtidos.

**Tabela 5.1** – Resultados da análise de detecção de fluorescência dos conjugados CdTe/MSA-anti-NS1 DENV (quatro sorotipos) em microplaca.  $FL_{rel}$  (%) corresponde ao aumento relativo da fluorescência do bioconjugado com relação ao sinal dos controles estimada pela Equação (5).

<b>Amostras</b>	<b>Média da Intensidade (cps)</b>	<b><math>FL_{rel}</math>(%)</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Coefficiente de Variação (%)</b>
<b>Poço Vazio</b>	252,2	-	25,8	10,2
<b>Proteína NS1</b>	249,4	-	54,3	21,8
<b>CdTe/MSA</b>	270,2	-	24,3	9,0
<b>Bioconj. anti-NS1 DENV-1</b>	9.493,6	3.591,1	1.145,3	12,1
<b>Bioconj. anti-NS1 DENV-2</b>	14.947,2	5.711,5	625,4	4,2
<b>Bioconj. anti-NS1 DENV-3</b>	11.594,0	4.407,7	825,8	7,1
<b>Bioconj. anti-NS1 DENV-4</b>	12.630,8	4.810,8	783,4	6,2

Os bioconjugados CdTe/MSA-anti-NS1 DENV-3 e DENV-4 também apresentaram elevada  $FL_{rel}$ (%), entretanto inferior ao conjugado do anti-NS1 DENV-2, e com discreto aumento dos coeficientes de variação, em virtude de uma maior dispersão nos valores da intensidade de fluorescência. O bioconjugado CdTe/MSA-anti-NS1 DENV-1 também apresentou elevada  $FL_{rel}$ (%), contudo, os valores de intensidade de fluorescência apresentaram maior dispersão que os demais, apresentando coeficiente de variação acima de 10%.

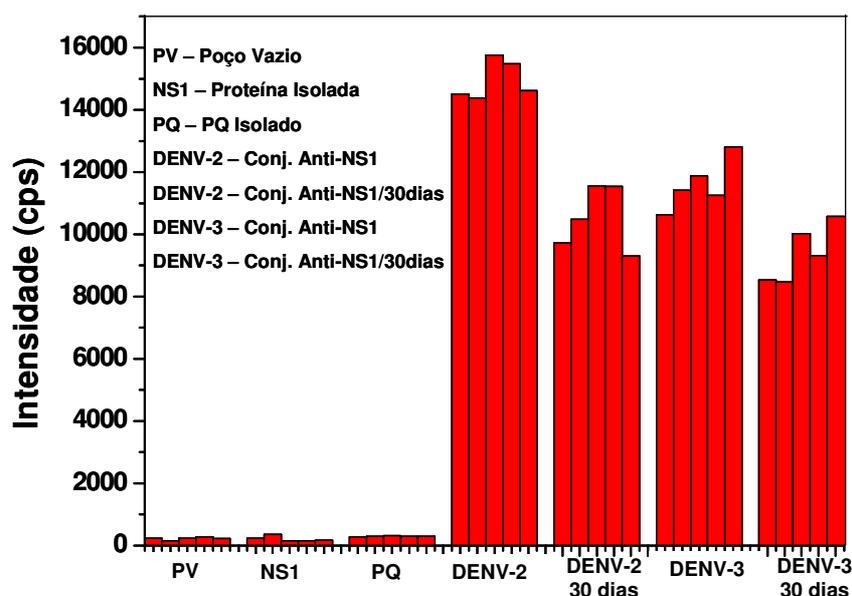
O ensaio para avaliar uma possível interação inespecífica foi realizado empregando os conjugados CdTe/MSA-anti-NS1 DENV dos quatro sorotipos em microplacas sensibilizadas com BSA. A Tabela 5.2 exibe os resultados obtidos com os conjugados.

O ensaio demonstrou não ocorrer ligação inespecífica significativa entre os anticorpos bioconjugados e a proteína empregada (BSA) na etapa de bloqueio da microplaca. Excetuando-se o bioconjugado CdTe/MSA-anti-NS1 DENV-3, os valores observados estão próximos aos dos demais controles apresentados na Tabela 5.1. Após intervalo de 30 dias, os bioconjugados CdTe/MSA-anti-NS1 DENV-2 e CdTe/MSA-anti-NS1 DENV-3 que estavam armazenados em refrigerador (4 – 10°C), cujos resultados estão apresentados na Tabela 5.1 foram empregados em novo ensaio de detecção da proteína NS1 DENV-2.

**Tabela 5.2** – Resultados da análise de detecção de fluorescência dos conjugados CdTe/MSA-anti-NS1 DENV (quatro sorotipos) em microplaca sensibilizada com BSA 4%.

Amostras	Média da Intensidade (cps)	FL <sub>rel</sub> (%)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Bioconj. anti-NS1 DENV-1	289,66	-	11,00	3,79
Bioconj. anti-NS1 DENV-2	347,00	-	12,16	3,50
Bioconj. anti-NS1 DENV-3	584,66	-	48,46	8,28
Bioconj. anti-NS1 DENV-4	301,00	-	37,72	12,53

A Figura 5.22 e a Tabela 5.3 exibem o comparativo entre os valores da detecção inicial e os resultados obtidos com os conjugados após 30 dias de armazenamento em refrigerador.



**Figura 5.22** – Comparativo entre os valores da detecção inicial e os resultados obtidos com CdTe/MSA anti-NS1 DENV-2 e CdTe/MSA anti-NS1 DENV-3 após 30 dias de armazenamento em refrigerador.

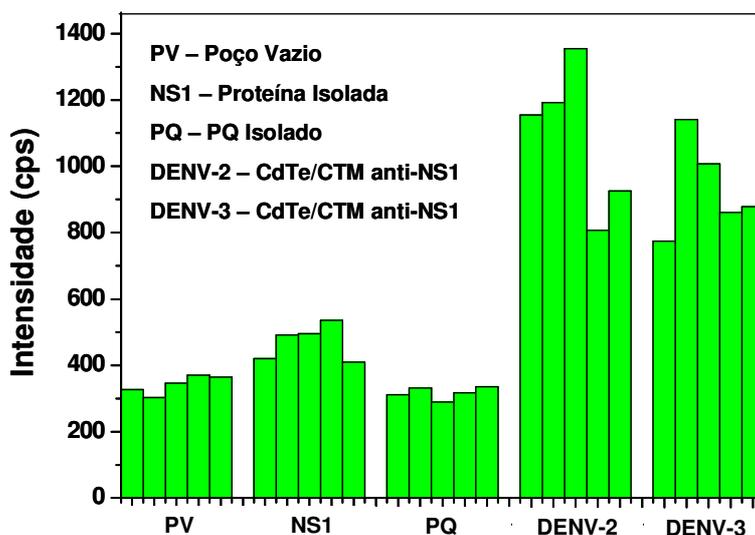
Os bioconjugados após 30 dias de armazenamento conseguiram detectar a proteína viral NS1 nativa aderida à superfície dos poços da microplaca. Apesar da redução de 23% e 14% das FL<sub>rel</sub>(%), os bioconjugados CdTe/MSA-anti-NS1 DENV-2 e CdTe/MSA-anti-NS1 DENV-3 apresentaram resultados satisfatórios.

**Tabela 5.3** – Resultados da análise de detecção de fluorescência dos conjugados CdTe/MSA-anti-NS1 DENV-2 e DENV-3, inicial e após 30 dias.  $FL_{rel}$  (%) corresponde ao aumento relativo da fluorescência do bioconjugado com relação ao sinal dos controles estimada pela Equação (5).

Amostras	Média da Intensidade (cps)	$FL_{rel}$ (%)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Poço Vazio	222,60	-	46,57	20,92
Proteína NS1	210,04	-	88,39	42,08
CdTe/MSA	294,20	-	13,95	4,74
Bioconj. anti-NS1 DENV-2	14.947,2	5.711,5	625,43	4,18
Bioconj. anti-NS1 DENV-2 30d	10.520,8	4.424,4	1.027,2	9,76
Bioconj. anti-NS1 DENV-3	11.594	4.407,7	825,82	7,12
Bioconj. anti-NS1 DENV-3 30d	9.383	3.772,8	920,69	9,81

A queda da intensidade de fluorescência/detecção se deve provavelmente à diminuição da atividade dos anticorpos conjugados. Contudo, os resultados obtidos são promissores, tendo em vista que os bioconjugados mantiveram a capacidade de ligação ao antígeno NS1 após intervalo de 30 dias, o que viabiliza sua futura aplicação em ensaios diagnósticos. Apesar do aumento do coeficiente de variação de ambos bioconjugados, os dados permaneceram homogêneos, com uma discreta elevação da dispersão observada nos valores obtidos.

A Figura 5.23 e a Tabela 5.4 exibem os resultados obtidos com os conjugados CdTe/CTM-anti-NS1 DENV-2 e DENV-3.



**Figura 5.23** – Resultados obtidos com os conjugados CdTe/CTM-anti-NS1 DENV-2, CdTe/CTM-anti-NS1 DENV-3 e controles.

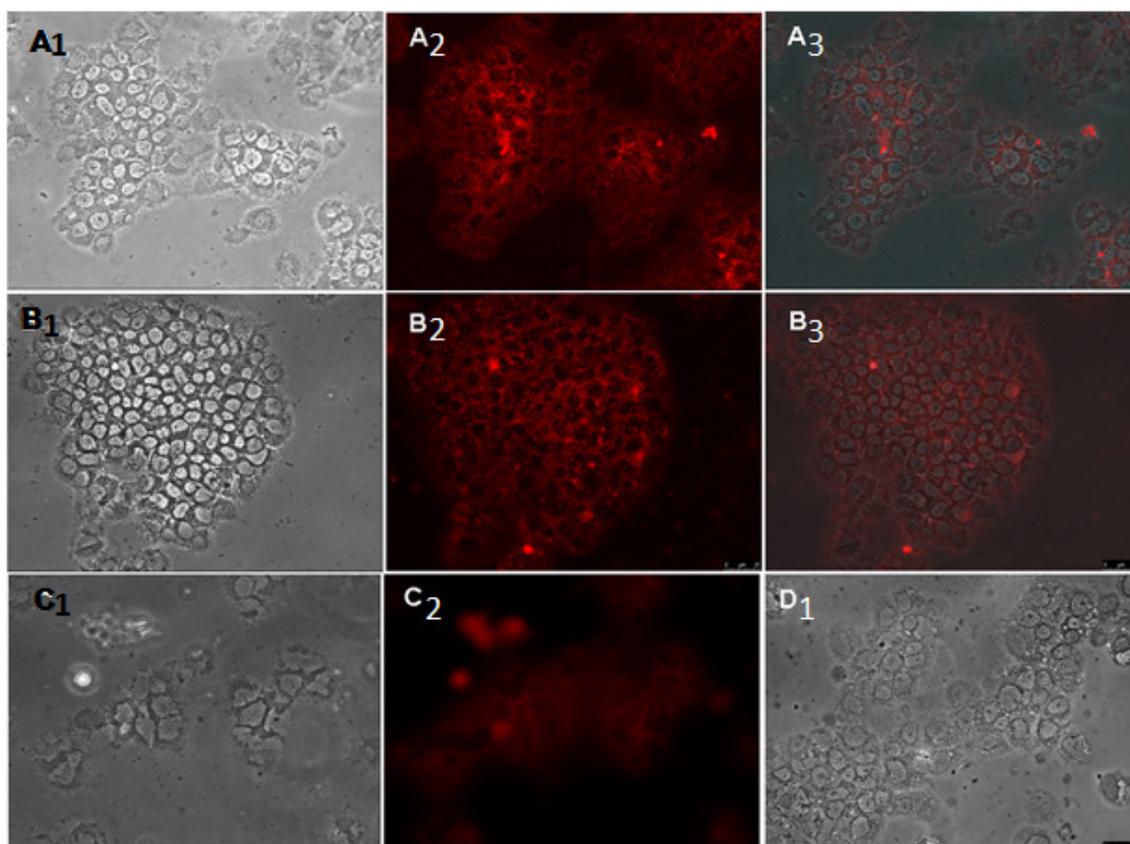
**Tabela 5.4** – Resultados da análise de detecção de fluorescência dos conjugados CdTe/CTM-anti-NS1 DENV-2 e DENV-3 em microplaca.  $FL_{rel}$  (%) corresponde ao aumento relativo da fluorescência do bioconjugado com relação ao sinal dos controles estimada pela Equação (5).

Amostras	Média da Intensidade (cps)	$FL_{rel}$ (%)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Poço Vazio	341,8	-	27,8	8,1
Proteína NS1	470,0	-	53,6	11,4
CdTe/CTM	317,0	-	18,4	5,81
Bioconj. anti-NS1 DENV-2	1.086,8	188,8	218,9	20,1
Bioconj. anti-NS1 DENV-3	932,2	147,7	143,4	15,4

Os bioconjugados de CdTe/CTM-anti-NS1 DENV-2 e CdTe/CTM-anti-NS1 DENV-3 foram empregados em ensaios de detecção da proteína viral NS1 DENV-2, contudo, não apresentaram resultados de  $FL_{rel}$ (%) elevados como o sistema CdTe/MSA-anti-NS1 DENV. Podemos inferir que os anticorpos presentes nos bioconjugados se ligaram à proteína NS1 imobilizada, porém em menor extensão que nos ensaios com CdTe/MSA. A perda de estabilidade dos PQs (precipitação) e o processo de redução das ligações dissulfeto provocando uma desnaturação parcial do anticorpo durante a etapa de bioconjugação, justificam esta baixa intensidade de  $FL_{rel}$ (%). Os bioconjugados apresentaram coeficientes de variação acima de 10%, que pode ser devido à reduzida atividade e especificidade dos bioconjugados obtidos por esta metodologia.

### 5.11 - Marcação de células C6/36 com bioconjugado CdTe/MSA-anti-NS1 DENV-2

A Figura 5.24 exibe os resultados obtidos no experimento de marcação de células C6/36 não fixadas com o conjugado CdTe/MSA-anti-NS1 DENV-2. Como pode ser observado nas imagens, as células C6/36 não fixadas sofreram pequenas alterações em sua morfologia provavelmente devido à ausência de aporte nutricional (retirada do meio de cultura durante as lavagens) e alteração da osmolaridade do meio provocada pela adição de PBS 1x.



**Figura 5.24** – Resultados obtidos no experimento de marcação de células C6/36 não fixadas com o conjugado CdTe/MSA-anti-NS1 DENV-2 (séries A e B). As imagens da série C representam células não fixadas incubadas com PQs de CdTe/MSA não bioconjugados. As imagens com índice 1 representam imagens de contraste de fase, com índice 2 representam imagens de fluorescência e as de índice 3 são superposições das séries 1 e 2. Imagem D representam células infectadas por DENV-2 sem PQs.

As imagens das linhas A e B são de células infectadas por DENV-2 após 3 dias de cultivo e incubadas com o bioconjugado CdTe/MSA-anti-NS1 DENV-2. Podemos observar marcação em volta da membrana celular e no meio extracelular circundando as células, locais estes onde se pode encontrar a proteína não estrutural NS1 na etapa de replicação viral, sendo evidenciada esta marcação periférica nas micrografias de sobreposição das imagens.

Para avaliar a especificidade da marcação das células C6/36 promovida pelo bioconjugado, preparamos um controle contendo as células infectadas e não fixadas sob as mesmas condições e incubamos com os PQs de CdTe/MSA não conjugados. Neste controle (Imagens C) um sinal de fluorescência muito tênue foi observado, diferentemente das células incubadas com o bioconjugado (Imagens A e B). Na imagem D são exibidas células infectadas e não fixadas na ausência de conjugados e PQs isolados. Não exibimos as imagens das células C6/36 do sistema fixado, devido à ausência de diferenciação entre células marcadas e não marcadas.

Podemos inferir que a etapa de fixação empregada, altera as propriedades do bioconjugado e dos PQs isolados empregados no ensaio.

O perfil de marcação diferenciado entre as células C6/36 incubadas com o bioconjugado e as células incubadas com os PQs de CdTe/MSA não conjugados, corrobora a funcionalidade deste bioconjugado em um sistema distinto ao ensaio de detecção de NS1 em microplacas.

## 6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Durante a realização das diversas etapas deste trabalho, as seguintes conclusões foram obtidas:

- Desenvolveram-se protocolos de síntese de PQs de CdTe empregando como agentes estabilizantes o ácido mercaptosuccínico e a cisteamina.
- O estudo de acompanhamento da cinética de crescimento da síntese de CdTe/CTM proporcionou a obtenção PQs com emissão em diferentes comprimentos de onda.
- Os PQs de CdTe/MSA e CdTe/CTM sintetizados apresentaram fluorescência elevada e boa estabilidade coloidal.
- Os bioconjugados de CdTe/MSA-anti-NS1 DENV para os quatro sorotipos mantiveram intensa fluorescência, sem formação de precipitados e com mínima alteração das propriedades ópticas frente ao PQ não conjugado.
- Os bioconjugados de CdTe/MSA-anti-NS1 DENV para os quatro sorotipos apresentaram resultados promissores nos ensaios de detecção da proteína viral NS1 imobilizada em microplaca, destacando-se o bioconjugado constituído pelo anticorpo monoclonal anti-NS1 DENV-2.
- Os bioconjugados de CdTe/MSA-anti-NS1 DENV-2 e DENV-3, apesar da discreta queda na  $FL_{rel}(\%)$ , mantiveram a capacidade de ligação ao antígeno NS1 após intervalo de 30 dias, viabilizando uma futura aplicação em ensaios diagnósticos.
- Os bioconjugados de CdTe/CTM-anti-NS1 DENV-2 e DENV-3 se mantiveram fluorescentes, entretanto, apresentaram formação de precipitados e alterações nas propriedades ópticas.

- Faz-se necessário empreender esforços para otimizar o protocolo de conjugação entre os PQs de CdTe/CTM e os anticorpos monoclonais anti-NS1 DENV e imunoglobulina, visando a melhoria dos resultados nos ensaios de detecção da proteína NS1.
- Observou-se um perfil distinto de marcação das células C6/36 infectadas e não fixadas dentre a incubação realizada com o conjugado CdTe/MAS-anti-NS1 DENV-2 e a efetuada com PQ de CdTe/MSA isolado.

O trabalho desenvolvido tem como perspectivas:

- Otimizar os protocolos de conjugação entre os PQs de CdTe/CTM e os anticorpos monoclonais anti-NS1 DENV;
- Empregar os bioconjugados de CdTe/MSA-anti-NS1 DENV dos quatro sorotipos em fluoroimunoensaios de captura da proteína NS1 em soros de pacientes.
- Determinar os melhores parâmetros para os fluoroimunoensaios de captura da proteína NS1.
- Reproduzir os ensaios de marcação de células C6/36, tendo por finalidade melhorar a qualidade das imagens adquiridas
- Empregar células C6/36 infectadas e não infectadas com DENV em experimento envolvendo a técnica de citometria de fluxo, observando-se o perfil de marcação das mesmas.

## REFERÊNCIAS

AL-JAMAL, Wafa'T. et al. Blood circulation and tissue biodistribution of lipid-quantum dot (L-QD) hybrid vesicles intravenously administered in mice. **Bioconjugate chemistry**, v. 20, n. 9, p. 1696-1702, 2009.

ARAÚJO, Tais Pinheiro de et al. Diagnóstico sorológico de infecções por dengue e febre amarela em casos suspeitos no Estado do Pará, Brasil, 1999. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 6, p. 579-584, 2002.

AVIRUTNAN, Panisadee et al. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. **Journal of Infectious Diseases**, v. 193, n. 8, p. 1078-1088, 2006.

BALLOU, Byron et al. Noninvasive imaging of quantum dots in mice. **Bioconjugate chemistry**, v. 15, n. 1, p. 79-86, 2004.

BRASIL JR, et al. Semiquantitative fluorescence method for bioconjugation analysis. *Quantum Dots: Applications in Biology, Methods in Molecular Biology*. Springer science. Vol 1199. 2014

BRASIL JR., Aluizio G. Desenvolvimento de processos de bioconjugação empregando pontos quânticos fluorescentes de semicondutores II-VI. Dissertação, Ciências Farmacêuticas, CCS-UFPE, 2010.

BRUCHEZ, M. P.; HOTZ, C. Z. *Quantum Dots: Applications in Biology*. Humana Press Inc., 2007.

BRUCHEZ, Marcel et al. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. **Science**, v. 281, n. 5385, p. 2013-2016, 1998.

CARVALHO, Kilmara HG et al. Fluorescence Plate Reader for Quantum Dot-Protein Bioconjugation Analysis. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 14, n. 5, p. 3320-3327, 2014.

CHAMBERS, Thomas J. et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 649-688, 1990.

CHEN, Qi-Fan et al. Direct Aqueous Synthesis of Cysteamine-Stabilized CdTe Quantum Dots and Its Deoxyribonucleic Acid Bioconjugates. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 135-138, 2007.

CHEN, Yaping; MAGUIRE, Terry; MARKS, Rory M. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. **Journal of virology**, v. 70, n. 12, p. 8765-8772, 1996.

DAGTEPE, Pinar 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.

YU, W. William 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.

DANEK, Michal et al. Synthesis of luminescent thin-film CdSe/ZnSe quantum dot composites using CdSe quantum dots passivated with an overlayer of ZnSe. **Chemistry of Materials**, v. 8, n. 1, p. 173-180, 1996.

DE FARIAS, P. M. A. et al. Highly fluorescent semiconductor core-shell CdTe-CdS nanocrystals for monitoring living yeast cells activity. **Applied Physics A**, v. 89, n. 4, p. 957-961, 2007.

DE MENEZES, F. D. et al. CdTe/CdS core shell quantum dots for photonic applications. **Microelectronics journal**, v. 36, n. 11, p. 989-991, 2005.

DUSSART, Philippe et al. Evaluation of two new commercial tests for the diagnosis of acute dengue virus infection using NS1 antigen detection in human serum. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 2, n. 8, p. e280, 2008.

FAUQUET, Claude M. et al. (Ed.). **Virus taxonomy: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Academic Press, 2005.

FIGUEIREDO, Luiz Tadeu Moraes. The brazilian flaviviruses. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 13, p. 1643-1649, 2000.

FIGUEIREDO, Luiz Tadeu Moraes. Uso de células de Aedes albopictus C6/36 na propagação e classificação de arbovírus das famílias Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae e Rhabdoviridae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 23, n. 1, p. 13-18, 1990.

FONTES, Adriana et al. Quantum dots in biomedical research. **Quantum dots in biomedical research. Biomedical engineering—technical applications in medicine, 1st edn. InTech, Rijeka**, p. 269-290, 2012.

FRASCO, Manuela F.; CHANIOTAKIS, Nikos. Bioconjugated quantum dots as fluorescent probes for bioanalytical applications. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 396, n. 1, p. 229-240, 2010.

FUCHS, Inbal et al. NS1 antigen testing for the diagnosis of dengue in returned Israeli travelers. **Journal of medical virology**, 2014.

GAPONIK, Nikolai et al. Thiol-capping of CdTe nanocrystals: an alternative to organometallic synthetic routes. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 106, n. 29, p. 7177-7185, 2002.

GUBLER, D. J. et al. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 33, n. 1, p. 158-165, 1984

GUBLER, Duane J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUBLER, Duane J. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. In: **Novartis foundation symposium**. Chichester; New York; John Wiley; 1999, 2006. p. 3.

GUZMAN, Maria G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. S7-S16, 2010.

GUZMAN, Maria G. et al. Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 8, p. e811, 2010.

GUZMAN, Maria G. et al. Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 8, p. e811, 2010.

GUZMÁN, Maria G.; KOURI, Gustavo. Advances in dengue diagnosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 3, n. 6, p. 621, 1996.

HERMANSON, Greg T. **Bioconjugate techniques**. Academic press, 2013.

HOLMES, Edward C.; BARTLEY, Lucy M.; GARNETT, Geoffrey P. 10 The Emergence of Dengue: Past Present and Future. **Biomedical research reports**, v. 1, p. 301-325, 1998.

HUANG, Xiangyi et al. Characterization of quantum dot bioconjugates by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescent detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1113, n. 1, p. 251-254, 2006.

LI, Li et al. Synthesis of functionalized ZnSe nanoparticles and their applications in the determination of bovine serum albumin. **Journal of fluorescence**, v. 19, n. 3, p. 437-441, 2009.

MAMEDOVA, Nataliya N. et al. Albumin-CdTe nanoparticle bioconjugates: preparation, structure, and interunit energy transfer with antenna effect. **Nano Letters**, v. 1, n. 6, p. 281-286, 2001.

MARTÍNEZ TORRES, Eric. Dengue. **Estudos avançados**, v. 22, n. 64, p. 33-52, 2008.

MEDINTZ, Igor L. et al. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. **Nature materials**, v. 4, n. 6, p. 435-446, 2005.

MIAGOSTOVICH, M. P. et al. Retrospective study on dengue fatal cases. **Clinical neuropathology**, v. 16, n. 4, p. 204-208, 1996

MICHALET, Xavier et al. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. **science**, v. 307, n. 5709, p. 538-544, 2005.

NOGUEIRA, Rita Maria Ribeiro; MIAGOSTOVICH, Marize Pereira; SCHATZMAYR, Hermann Gonçalves. Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, n. 1, p. 205-211, 2000.

PEREIRA, Mark; LAI, Edward PC. Capillary electrophoresis for the characterization of quantum dots after non-selective or selective bioconjugation with antibodies for immunoassay. **Journal of nanobiotechnology**, v. 6, n. 1, p. 10, 2008.

PETRAGNANI, Nicola; STEFANI, Hélio A. **Tellurium in Organic Synthesis: Second**. Academic Press, 2010.

PETRYAYEVA, Eleonora; ALGAR, W. Russ; MEDINTZ, Igor L. Quantum dots in bioanalysis: a review of applications across various platforms for fluorescence spectroscopy and imaging. **Applied spectroscopy**, v. 67, n. 3, p. 215-252, 2013.

PONS, Thomas et al. Hydrodynamic dimensions, electrophoretic mobility, and stability of hydrophilic quantum dots. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 41, p. 20308-20316, 2006.

ROCCO, Iray Maria et al. First isolation of dengue 4 in the state of São Paulo, Brazil, 2011. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 54, n. 1, p. 49-51, 2012.

RODENHUIS-ZYBERT, Izabela A.; WILSCHUT, Jan; SMIT, Jolanda M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. **Cellular and molecular life sciences**, v. 67, n. 16, p. 2773-2786, 2010.

ROSEN, Leon et al. The transmission of dengue by *Aedes polynesiensis* Marks. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 3, n. 5, p. 878-882, 1954.

SANTOS, B. S. et al. Semiconductor nanocrystals obtained by colloidal chemistry for biological applications. **Applied Surface Science**, v. 255, n. 3, p. 796-798, 2008.

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

SAPSFORD, Kim E. et al. Analyzing nanomaterial bioconjugates: a review of current and emerging purification and characterization techniques. **Analytical chemistry**, v. 83, n. 12, p. 4453-4488, 2011.

SCHATZMAYR, Hermann G. Dengue situation in Brazil by year 2000. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 179-181, 2000.

SHAO, Liwen et al. Studies on interaction of CdTe quantum dots with bovine serum albumin using fluorescence correlation spectroscopy. **Journal of fluorescence**, v. 19, n. 1, p. 151-157, 2009.

SHIN, Seonmi et al. Quantum Dot-Based Aptasensor for Sensitive Protein Detection. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 31, n. 7, p. 2091-2093, 2010.

SILER, Joseph Franklin et al. Dengue: Its History, Epidemiology, Mechanism of Transmission, Etiology, Clinical Manifestations, Immunity and Prevention. **Philippine Bur. Sci.**, n. Monogr. 20, 1926.

SWAYAMBUNATHAN, V. et al. Thiol surface complexation on growing cadmium sulfide clusters. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 10, p. 3831-3837, 1990

TEIXEIRA, Maria da Glória et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences?. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 5, p. 1307-1315, 2005.

THOMAS, Stephen J. et al. Dengue plaque reduction neutralization test (PRNT) in primary and secondary dengue virus infections: How alterations in assay conditions impact performance. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 81, n. 5, p. 825-833, 2009.

ULRICH, Henri. **Chemistry and technology of carbodiimides**. John Wiley & Sons, 2008.

VEZZA, Anne C. *et al.* Characterization of the viral RNA species of prototype dengue viruses. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 29, n. 4, p. 643-652, 1980.

WALT, David R.; AGAYN, Venetka I. The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 13, n. 10, p. 425-430, 1994.

WANG, Chao; MA, Qiang; SU, Xingguang. Synthesis of CdTe nanocrystals with mercaptosuccinic acid as stabilizer. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 8, n. 9, p. 4408-4414, 2008

WANG, Yilin et al. Synthesis and characterization of cysteamine-CdTe quantum dots via one-step aqueous method. **Materials Letters**, v. 66, n. 1, p. 261-263, 2012.

WEI, Xiao *et al.* Synthesis of molecularly imprinted silica nanospheres embedded mercaptosuccinic acid-coated CdTe quantum dots for selective recognition of  $\lambda$ -cyhalothrin. **Journal of Luminescence**, v. 153, p. 326-332, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. World Health Organization, 2009.

YING, Erbo et al. Synthesis and bio-imaging application of highly luminescent mercaptosuccinic acid-coated CdTe nanocrystals. **PloS one**, v. 3, n. 5, p. e2222,

2008.

YOUNG, Paul R. et al. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1053-1057, 2000.

ZAINAH, S. et al. Performance of a commercial rapid dengue NS1 antigen immunochromatography test with reference to dengue NS1 antigen-capture ELISA. **Journal of virological methods**, v. 155, n. 2, p. 157-160, 2009.

ZHANG, Hao et al. The influence of carboxyl groups on the photoluminescence of mercaptocarboxylic acid-stabilized CdTe nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 1, p. 8-13, 2003.

ZHANG, Hongyan et al. L - Cysteine capped CdTe–CdS core–shell quantum dots: preparation, characterization and immuno - labeling of HeLa cells. **Luminescence**, v. 26, n. 2, p. 86-92, 2011.

ZHANG, Ying et al. Structures of immature flavivirus particles. **The EMBO journal**, v. 22, n. 11, p. 2604-2613, 2003.

ZHU, Yian et al. One-pot preparation of highly fluorescent cadmium telluride/cadmium sulfide quantum dots under neutral-pH condition for biological applications. **Journal of colloid and interface science**, v. 390, n. 1, p. 3-10, 2013.

## APÊNDICE

# Apêndice A: Fluorescence Plate Reader for Quantum Dot-Protein Bioconjugation Analysis.



Copyright © 2014 American Scientific Publishers  
All rights reserved  
Printed in the United States of America

Article

*Journal of  
Nanoscience and Nanotechnology*  
Vol. 14, 3320–3327, 2014  
[www.aspbs.com/jnn](http://www.aspbs.com/jnn)

## Fluorescence Plate Reader for Quantum Dot-Protein Bioconjugation Analysis

Kilmara H. G. Carvalho<sup>1,2</sup>, Aluizio G. Brasil, Jr<sup>1,2</sup>, Paulo E. Cabral Filho<sup>2,3</sup>,  
Denise P. L. A. Tenório<sup>2,4</sup>, Ana C. A. de Siqueira<sup>2</sup>, Elisa S. Leite<sup>2,5</sup>,  
Adriana Fontes<sup>2,3,\*</sup>, and Beate S. Santos<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, CCS, UFPE, 50740-120, Recife, PE, Brazil

<sup>2</sup>Grupo de Pesquisa em Nanotecnologia Biomédica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil

<sup>3</sup>Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, CCB, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil

<sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil

<sup>5</sup>Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil

We present here a new and alternative method that uses a Fluorescence Plate Reader in a different approach, not to study protein–protein interactions, but to evaluate the efficiency of the protein bioconjugation to quantum dots (QDs). The method is based on the QDs' native fluorescence and was successfully tested by employing two different QDs-proteins conjugation methodologies, one by promoting covalent binding and other by inducing adsorption processes. For testing, we used bioconjugates between carboxyl coated CdTe QDs and bovine serum albumin, concanavalin A lectin and anti-A antibody. Flow cytometry and fluorescence spectroscopy studies corroborated the results found by the Fluorescence Plate Reader assay. This kind of analysis is important because poor bioconjugation efficiency leads to unsuccessful applications of the fluorescent bioconjugates. We believe that our method presents the possibility of performing semi-quantitative and simultaneous analysis of different samples with accuracy taking the advantage of the high sensitivity of optical based measurements.

**Keywords:** Quantum Dot, CdTe, Bioconjugation, Fluorescence, Biomolecule.

### 1. INTRODUCTION

Quantum dots (QDs) are colloidal semiconductor nanocrystals which show unique physicochemical properties due to their quantum confinement regime in three dimensions. Some of the main optical features observed for these systems are: wide excitation bands, narrow emission spectra, size-controlled emission at different regions of the visible-light spectra and great photostability. These properties offer significant advantages for QDs when compared with conventional organic dyes, which are commonly used as fluorescent probes.<sup>1–3</sup> Additionally, the fluorescence of organic dyes tends to quench rapidly, so they are not suitable for long term analysis.<sup>4</sup>

QDs are nanocrystals made up of elements from the II–VI (e.g., CdSe, CdTe, CdS, and ZnSe), III–V

(e.g., InP and InAs) or IV–VI (e.g., PbSe) group. As their surface atoms render a greater part of their structure, compared to bulk crystals, they show intrinsic electronic defects that have to be overcome. This is usually accomplished by chemically coating the nanocrystal core with monolayers of a semiconductor that usually has a higher bandgap, a process called passivation. These core–shell nanostructured systems can be synthesized using different chemical approaches. For biological applications they are prepared using colloidal chemistry either in organic or in aqueous media. When compared to organometallic routes, water-based QDs's preparation method is less toxic, applies low-cost precursors and is intrinsically biocompatible to applications in biological fields.<sup>1</sup>

Due to the improvement of the colloidal synthesis methodologies, especially the aqueous based, in the last 15 years, QDs have been successfully used as fluorescent

\*Authors to whom correspondence should be addressed.

probes in biological and medical field. In this time lapse we observed an exponential growth of the use of this new class of fluorophores in bioimaging (fixed cell, *ex vivo* live cell and *in vivo* animal targeting), bioanalytical assays, in immunofluorescence assays, as potential photosensitizers for photodynamic therapy and as probes to trace the pharmacological routes of some drugs.<sup>1-3</sup>

In almost all of these applications, the coating of QDs with antibodies and other proteins plays an important role, because they form inorganic-biological hybrid nanoparticles that combine characteristics of both materials, which are the fluorescence properties of QDs with the biochemical functions of the proteins. This process called *bioconjugation* is an important step for promising biological applications and needs to be characterized independently of the conjugation approaches employed, such as covalent binding or adsorption. The characterization and evaluation of the QDs bioconjugation is still a current critical problem for successfully using these new optical probes.

Many research groups have been reporting different methods to characterize QDs bioconjugates. Sapsford et al. (2011)<sup>5</sup> in a recent review article compiled bioconjugation characterization approaches for various nanomaterials and classified them as separation, scattering, microscopy and spectroscopy techniques. Among the most cited methods are the gel and capillary electrophoresis,<sup>6</sup> the dynamic light scattering (DLS)<sup>7</sup> and the fluorescence correlation spectroscopy (FCS).<sup>8</sup> However, these methods currently used still present one or other disadvantages: laborious methodologies, lack of standardization for the interpretation of the results or the use of expensive equipments. Electrophoresis, for example, is a laborious technique and, despite to be able to analyze and compare bioconjugation for various samples at same time, it can be applied only for qualitative analyses of charged specimens. Moreover, if the conjugated molecule has low or medium weight, the electrophoresis is no more appropriate.<sup>9,10</sup> DLS can qualitatively answer if the bioconjugation happened, for one sample at a time, based on the average sizes, but has poor resolution and can only resolve particle populations (within the same sample) if they differ in size by at least a factor of 3.<sup>5</sup> FCS technique is similar to DLS. However, although FCS is more sensitive than DLS for discriminating similar sizes, it needs a confocal microscopy, and then it is an expensive technique. Moreover, the FCS can answer if the bioconjugation happened, but it cannot give much information about the efficiency. Therefore, new and complementary methods are always welcome to evaluate bioconjugation process.

We present here an alternative optical method to confirm QDs bioconjugation by using a Fluorescence Plate Reader. This analytical approach is based on the native QDs' fluorescence detection of samples containing the bioconjugates and the absence of signal in all other samples named controls. The Fluorescence Plate Reader is routinely applied

in immunoassays to detect antigen-antibody interactions as already described in the literature.<sup>11</sup> This detection is possible because one of the proteins (antigen or antibody) was previously conjugated to a fluorescent marker, which can also be a quantum dot.<sup>12</sup> In this work, we propose the use of the Fluorescence Plate Reader not to study protein-protein interaction, but instead, for a different approach: to evaluate the efficiency of the protein bioconjugation to QDs. This analysis of bioconjugation is important because poor efficiency leads to unsuccessful applications of the fluorescent bioconjugates.

Among the methods used to evaluate bioconjugation, electrophoresis is, by far, the most used approach. When compared to the most applied methods, especially with electrophoresis, our approach has the advantages to be able to evaluate and discriminate semi-quantitatively a great number of different types of bioconjugates simultaneously (for example, there are microplates with 96 wells). Moreover, it is a simple, practical, fast and sensitive method. Besides, it is not limited by size or charge of the bioconjugates. Therefore, why do not use this procedure as a complementary approach to detect and evaluate the QDs-protein bioconjugation? In order to demonstrate this alternative method, we tested CdTe QDs bioconjugated to different proteins: bovine serum albumin (BSA), anti-A antibody and concanavalin A lectin (ConA). We employed two different conjugation methodologies, one by using covalent binding<sup>10</sup> and other by adsorption, a phenomenon mainly mediated by electrostatic and hydrophobic/hydrophilic interactions.<sup>13</sup>

## 2. EXPERIMENTAL PROCEDURES

### 2.1. General Experimental Details

All reagents for the QDs synthesis were purchased from Sigma Aldrich and used as received. Microplate-based fluorescence measurements were performed using a WALLAC 1420 microplate reader with the software Victor<sup>2</sup> (PerkinElmer). Black 96-well Optiplate F HB microplates were purchased from PerkinElmer. The biomolecules used were BSA (Sigma Aldrich), ConA (Sigma Aldrich) and anti-A antibody (DiaMed—Minas Gerais—Brazil). Absorption spectra of bare and conjugated QDs were collected on a DU 7500 UV/VIS spectrophotometer (Beckman) or in a HR 4000 spectrophotometer (Ocean Optics) in the range of 200 to 600 nm. Emission spectra of bare and conjugated QDs (excited at 365 nm) were recorded using a PC1, (a photon-counting fluorescence spectrometer from ISS with a xenon lamp of 300 W as excitation source), employing excitation and emission slits of 1 mm and voltage = 15 V.

### 2.2. CdTe QDs Synthesis

Aqueous colloidal dispersion of CdTe core/shell QDs were synthesized by adapting a previously reported method.<sup>14</sup> Briefly, QDs were prepared by the addition

of  $\text{Te}^{2-}$  in a  $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$  solution of  $\text{pH} > 10$  in the presence of TGA (thioglycolic acid), MPA (3-mercaptopropionic acid) or MSA (mercaptosuccinic acid) (Sigma Aldrich) as stabilizing agents in a 2:1:4.2/4.6/2.4 ratio of Cd:Te:TGA/MPA/MSA respectively. The  $\text{Te}^{2-}$  aqueous solution was prepared by using metallic tellurium (Sigma Aldrich) and  $\text{NaBH}_4$  (Sigma Aldrich), at a high pH and under argon or nitrogen saturated atmosphere. The reaction proceeded, in argon or nitrogen, under constant stirring and heating at 80 °C during 1 hour for TGA and 7 and 15 hours at 100 °C for MPA and MSA, respectively.

### 2.3. Plate Reader Bioconjugation Detection Method

The method here described proposes to analyze and verify the QDs-protein bioconjugation based on the fluorescence intensities of samples placed in a Fluorescence Plate Reader. It is known that proteins have affinity for polystyrene, which is one of the most used plastic in microplates employed for protein immobilization in immunoassays.<sup>15–17</sup> Bare QD samples do not efficiently link to the polymer because they do not have enough specific groups required for a strong interaction. Therefore, after washing the microplate with a buffer solution such as PBS (phosphate buffered saline), the QDs are removed and no fluorescence signal is detected. The biomolecules alone do not present considerable fluorescence in the same wavelength region of the QDs employed. So, in the case of a well succeeded QD-protein bioconjugation, the Fluorescence Plate Reader will give a fluorescence signal indicating that QDs are bound to the proteins attached to the well. Based on these features, the adsorption or covalent conjugation between carboxylate QDs and amine groups

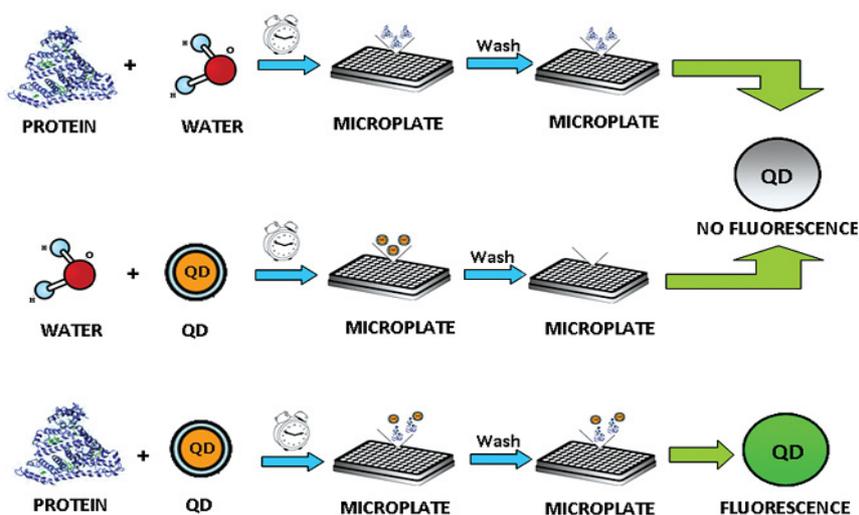
of biomolecules such as peptides, proteins and DNA<sup>1</sup> can be confirmed by comparing the conjugates and controls signals intensities values, according to Figures 1 and 2 respectively.

Each sample set is consisted on three/four components: two/three controls and the QD-biomolecule conjugates. The first control corresponded to bare colloidal QDs. The second control consisted on protein molecules alone and the third control (only used for conjugation by covalent binding) corresponded to all reagents used in the bioconjugation process, except the QDs.

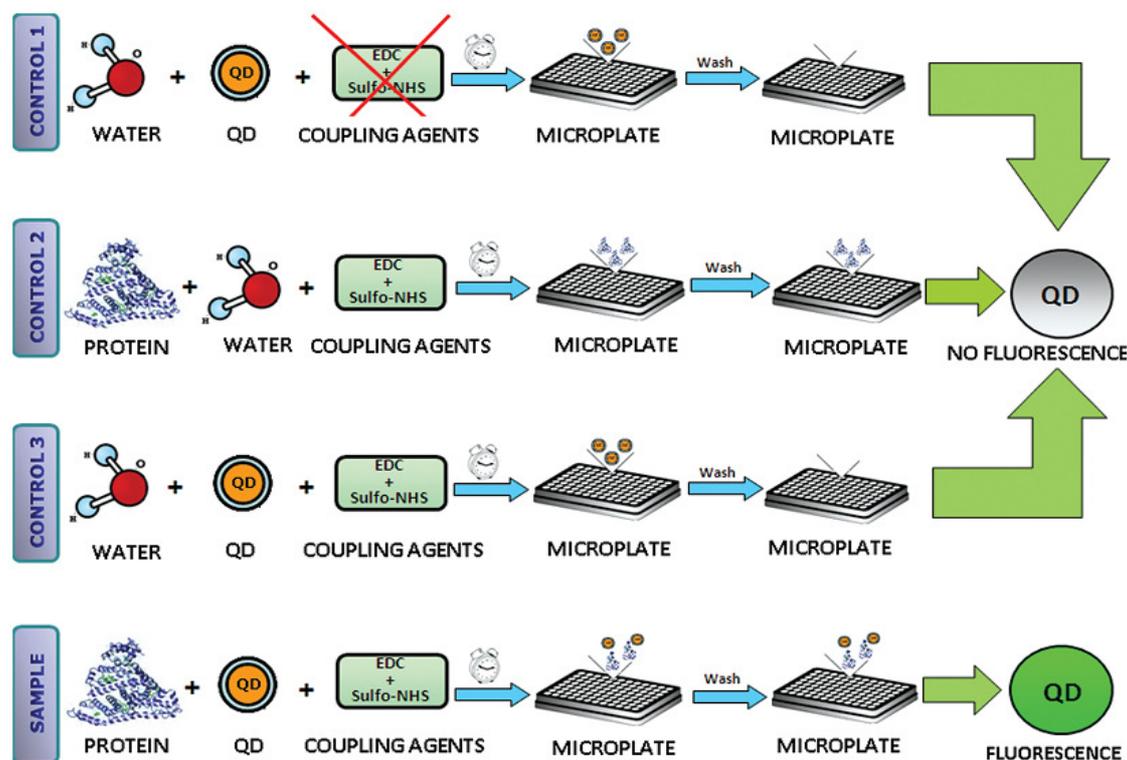
If the signal intensity of the QDs-biomolecules sample was at least 100% higher than the average controls values, this was considered a good indication of a satisfactory conjugation. On the other hand, if the signal intensity was of the same order of the controls, the conjugation was considered unsuccessful. These methodologies are summarized in Figure 1 (adsorption) and Figure 2 (covalent bond) and the correspondent results are presented in Tables I and II respectively.

### 2.4. Conjugation by Covalent Binding

TGA-coated CdTe QDs were conjugated with BSA protein using EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimide) and Sulfo-NHS (*N*-hydroxysulfosuccinimide) as coupling reagents.<sup>9,10</sup> Firstly, 20 nmol of CdTe was added to the activation buffer at 0.1 M MES (2-[morpholino]ethanesulfonic acid) at pH 6.0. After 15 minutes, 1 mL of EDC (2.08 mM) and 1 mL of Sulfo-NHS (5.06 mM) in ultrapure water were added to the system. Then, 1.4  $\mu\text{L}$  of 2-mercaptoethanol (20 mM) were used to quench the EDC. After that, we added 1 mL



**Figure 1.** Experimental procedure used in the fluorescence plate reader method for QDs-protein interaction by adsorption. The scheme shows the interaction process between the microplates with different samples: the two controls used in the experiment present no considerable fluorescence signal, while the QDs-protein bioconjugates present fluorescence indicating conjugation. This scheme is used to interpret Table I.



**Figure 2.** Experimental procedure used in the fluorescence plate reader method for QDs-protein covalent binding bioconjugates. The scheme shows the interaction process between the microplates with different samples: the three controls used in the experiment present no considerable fluorescence signal and QDs-protein bioconjugates present fluorescence indicating conjugation. This scheme is used to interpret Table II.

of BSA (1 mg/mL) in a hydroalcoholic solution (80:20). All this procedure was performed in inert atmosphere up to 4 hours at room temperature.

## 2.5. Conjugation by Adsorption

The MPA-coated or MSA-coated CdTe conjugations, by adsorption, with anti-A, BSA and ConA were performed by adjusting the QDs pH to 8.0 and placing the molecules in contact with QDs for 2 hours at room temperature without stirring. The QD:anti-A proportion was 50:1 (v/v). For ConA (0.2 mg/mL), the QD:ConA proportion was 7:1 (v/v) and QD:BSA (10 mg/mL) was 60:1 (v/v). Con A is a lectin that targets sugars such as mannose and glucose.

## 2.6. Procedure of Bioconjugates Immobilization and Analysis

A solution of PBS, at 7.4 pH, was employed as wash buffer. All samples were measured in triplicate. The control samples (described as QDs in water or in PBS (1×) and biomolecules in PBS (1×), both at the same concentration used in the conjugation) and conjugated samples were incubated in the microplate wells (200 μL in each well) for 2 hours in an incubator (water bath, humid chamber) at 37 °C. After this time, the wells were washed 3 times with PBS. Then, the microplate was placed in the

Plate Reader and the signals of each well (with controls and QDs-biomolecules samples) were analyzed under F480 (480 nm/15.5 nm) or F485 (485 nm/7 nm) excitation filters, F535 (535 nm/12.5 nm) or F595 (595 nm/30 nm) emission filters. The acquisition time was 1 s, the lamp was set to 20,000 or 60,000 cW and normal slits were used for excitation and emission.

## 2.7. Procedure for Confirmation of the Bioconjugation with Other Methods

Analysis of emission spectra was used to confirm the covalent conjugation results of BSA obtained by Fluorescence Microplate Reader. Flow cytometry assay was applied to evaluate the adsorption conjugation results for anti-A antibody obtained by Fluorescence Microplate Reader. For this, red blood cells (RBCs) were labeled by the QDs-(anti-A) conjugates and analyzed in a FAC-SCalibur cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). The software used for data processing was Cell Pro (Cell Quest™ Software, Becton Dickinson immunocytometry system, San Jose, CA, USA). Around 10,000 events per second were acquired. The fluorescence in cells was excited at 488 nm and measured with FL1 filter (530 nm/15 nm) or FL2 filter (585 nm/21 nm). RBCs type A and type O collected in EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) tubes were used to prepare a 5% diluted

**Table I.** Fluorescence intensity measurements obtained, in triplicate, in the fluorescence microplate reader for the detection of free and bioconjugated QDs systems by adsorption interaction.

System	Fluorescence intensity (a.u.) <sup>a</sup> (%)	Relative fluorescence intensity (%)
Control 1 (QDs-MPA)	705 ± 3	
Control 2 (anti-A)	837 ± 6	
<b>Average control</b>	<b>771 ± 3.5</b>	
<b>QDs-MPA-(anti-A)</b>	<b>2037 ± 6</b>	<b>164% ± 7.7%</b>
Control 1 (QDs-MSA)	200 ± 2.4	
Control 2 (anti-A)	218 ± 6	
<b>Average control</b>	<b>209 ± 3.2</b>	
<b>QDs-MSA-(anti-A)</b>	<b>886 ± 9</b>	<b>325% ± 10%</b>
Control 1 (QDs-MSA)	312 ± 5	
Control 2 (ConA)	435 ± 3	
<b>Average control</b>	<b>374 ± 2.7</b>	
<b>QDs-MSA-ConA</b>	<b>1078 ± 7</b>	<b>188% ± 7.4%</b>
Control 1 (QDs-MSA)	429 ± 6.2	
Control 2 (BSA)	383 ± 10	
<b>Average control</b>	<b>406 ± 6</b>	
<b>QDs-MSA-BSA</b>	<b>884 ± 6</b>	<b>117% ± 7.4%</b>

Notes: <sup>a</sup>Measurements performed with F480 excitation filter and F535 or F595 emission filters, acquisition time of 1 s, 20,000 and normal slits for excitation and emission. QDs employed were CdTe-MPA and CdTe-MSA.

suspension of cells using saline solution. After that, RBCs were incubated with QD-(anti-A) conjugates for one hour at 37 °C using a proportion of 3:1 v/v (QDs conjugate:cells). RBCs type O were the negative control, since they do not present A antigens in their membranes.

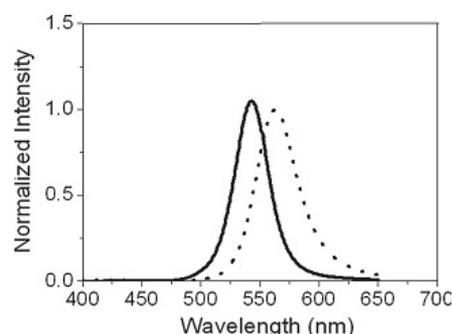
### 3. RESULTS AND DISCUSSION

Initially, all QDs employed in the experiments were characterized by absorption and emission spectra which are shown in Figures 3 and 4. According to optical characterizations, CdTe-TGA, CdTe-MPA and CdTe-MSA nanoparticles maxima emissions and the FWHM (full width half maximum) were 560 nm (FWHM = 35 nm), 550 nm (FWHM = 53 nm), 604 nm (FWHM = 50 nm), while the average diameters were 2.7 nm, 2.6 nm and 3.3 nm respectively.<sup>18,19</sup> The QDs concentrations used were 1 μM

**Table II.** Fluorescence microplate reader results of fluorescence intensity from triplicate detection of free and bioconjugated QDs systems by covalent binding.

Systems	Fluorescence intensity (a.u.) <sup>a</sup> (%)	Relative fluorescence intensity (%)
Control 1 (QDs)	260 ± 2	–
Control 2 (BSA)	299 ± 2	–
Control 3	320 ± 6	–
<b>Average control</b>	<b>293 ± 2.2</b>	–
QDs-BSA 2 hours	<b>560 ± 5</b>	<b>91% ± 6%</b>
QDs-BSA 4 hours	<b>1,483 ± 2</b>	<b>406% ± 3.7%</b>

Notes: <sup>a</sup>Acquisition performed with the F485 nm excitation filter and F535 emission filter, acquisition time of 1 s, 60,000 and normal slits for excitation and emission. QDs employed were TGA capped CdTe.



**Figure 3.** Comparative emission spectra of bare CdTe-TGA (dashed line) QDs and CdTe-TGA-BSA bioconjugates (solid line). The BSA protein shows no fluorescence in the wavelength range of the QD employed. Excitation at  $\lambda = 365$  nm.

for CdTe-TGA, 13 μM for CdTe-MPA and 6 μM for CdTe-MSA.<sup>20</sup>

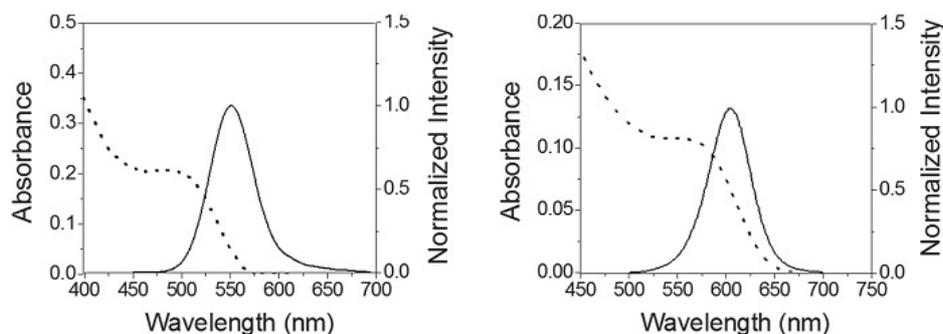
The signal intensities for the QDs conjugated to proteins, the control 1 (QDs alone), control 2 (proteins alone) and control 3 (see Experimental Procedure Section) for each experiment performed on the Fluorescence Microplate Reader are shown in Tables I and II. The Figures 1 and 2 can be used to an appropriate interpretation of these tables.

The relative fluorescence intensity, which evaluates how higher was the bioconjugates signals when compared to controls, was calculated by Eq. (1).

$$\begin{aligned} \text{RelativeFL (\%)} \\ = \frac{\text{BioconjugateFL} - \text{ControlFL}}{\text{ControlFL}} \times 100\% \end{aligned} \quad (1)$$

where *BioconjugatedFL* is the fluorescence intensity of the QDs-biomolecules sample and *ControlFL* is the average controls signal detected.

Tables I and II show that the relative intensity detected, for all the bioconjugated samples, was higher than for the controls. If there was a lower relative intensity signal (corresponding to low signal measurements in bioconjugated wells), the conjugation was not successful and only the proteins should be in the wells. The low signals found for the controls are due to stray light coming from the excitation source and being scattered by the wells. The standard errors in the tables represent the contributions of the errors associated with the adsorption process of protein-microplate interactions plus the errors related to the fluorescence signal detection by the photomultiplier of the equipment. The signals detected in the wells can present some differences for the absolute values depending on the conditions of the experiment (filters and QDs used, for example). However, in general, microplate assays are considered reliable methods and are usually applied for diagnosis purposes.<sup>11,12</sup> Relative fluorescence intensity values show quantitative reproducibility (with standard



**Figure 4.** Emission (solid line) and absorption (dashed line) spectra of CdTe-MPA (left) and CdTe-MSA (right) QDs.

errors smaller than 10%) when the same samples of bioconjugates were used, evidencing the effectiveness of this detection method.

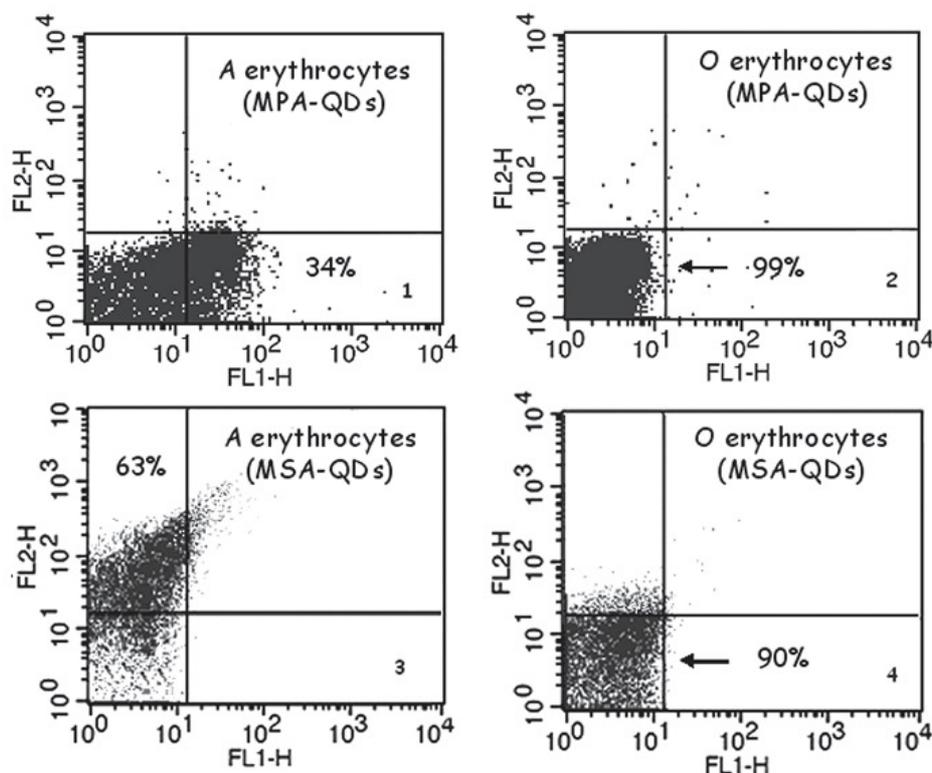
By comparing the analysis for QDs-BSA obtained by different time periods (2 and 4 hours) of covalent binding reaction, the results show relative fluorescence intensities of 91% and 406% respectively. Therefore, an increase in the conjugation reaction time is clearly followed by an increase in the relative intensity value, indicating that this method is semi-quantitative and can help to monitor and to improve the bioconjugation process. However, considering that the fluorescence intensity is given in arbitrary units only relative comparisons can be made. In our experiments, the highest intensity values were obtained after 4 hours of bioconjugation reaction time, indicating that the bioconjugation was more effective after 4 hours of reaction, but after this period of time it is important to test the functionality of the biomolecule. A good reaction time has to promote an efficient conjugation between QDs and proteins and also preserve the biomolecule activity. Moreover, it is important to highlight that QDs can be efficiently bioconjugated to proteins, however this procedure can cause changes in the biomolecule properties. In this way a good result obtained in a bioconjugation analysis is an indication, but is not a complete guaranty, of a successfully biological application.

In Figure 3, we present emission spectra for CdTe-TGA alone and CdTe-TGA-BSA bioconjugate (after 4 hours of reaction). The blue shift of the maximum emission peak from 560 to 540 nm (excitation at  $\lambda = 365$  nm) confirms the bioconjugation. Both CdTe-TGA bare QDs and CdTe-TGA-BSA QDs presented symmetric and narrow emission spectra. BSA shows no fluorescence in the wavelength range employed. The BSA fluorescence is related to tryptophan residues which provide major contribution to the intrinsic fluorescence of this protein near 340 nm.<sup>21,22</sup> Also, it was observed a small decay in the fluorescence emission spectra intensity for bioconjugated QDs which may be explained by the effect of the surrounding environment pH. Previous study<sup>23</sup> reported the effect of various factors on QDs fluorescence, including pH, after the conjugation procedure with BSA. Their results showed that the

maximum relative fluorescence intensity (RFI) occurred at pH 6.83, while for lower pH the values of the RFI decreases. The authors described that this decay is also probably caused by depassivation, where the protonation of the surface-binding thiolates results in the deconstruction of the Cd<sup>2+</sup>-TGA complexes. This prior study corroborates with our results because we employed pH 6.0 in the covalent bioconjugation process (with EDC plus Sulfo-NHS) and obtained a small decrease in the intensity of the emission spectra when compared to the bare QDs.

As it can be observed in Table I, a value of 325% for the relative intensity demonstrated a more effective conjugation for QDs-MSA-(anti-A), while for QDs-MPA-(anti-A) it was observed a value of 164%. The flow cytometry analysis corroborated the results obtained using the Plate Reader. Figure 5 shows the labeling of approximately 60% of A erythrocytes by QDs-MSA-(anti-A), in contrast to around 30% for QDs-MPA-(anti-A). Erythrocytes type O did not present fluorescence, confirming the specific labeling (Fig. 5(2)). These results indicate that, when the properties of proteins are preserved, a greater signal obtained by our method can be related to a more efficient bioconjugation process. In fact, we believe that the flow cytometry and the Fluorescence Plate Reader approach are complementary. The analysis with the Plate Reader indicates if the bioconjugation of proteins to QDs was efficient, or not, and the flow cytometry results can be used as a contra proof to validate this methodology of evaluation of the bioconjugation. As higher is the signal observed in the Plate Reader, the more efficient is the bioconjugation procedure and a higher number of labeled cells is expected to be detected by flow cytometer.

The flow cytometry results were performed more than five times and were reproducible. The analysis showed that we could label specifically only A erythrocytes. Although these results were reproducible, 100% of the cells were not labeled due to the conjugation process used. The adsorption is driven by electrostatic forces and may not be totally effective because it does not promote a connection among all antibodies to all QDs of the sample, so some QDs are not covered by antibodies and bare QDs do not label RBCs. The labeling of cells incubated with MSA-QDs was



**Figure 5.** Dot plots of A and O erythrocytes: (1) “A” cells labeled with MPA-(anti-A) QDs, (2) O erythrocytes presenting quite no labeling after incubation with MPA-anti-A QDs, (3) “A” cells labeled with MSA-(anti-A) QDs and (4) the same as (2) for O erythrocytes and MSA-(anti-A) QDs.

more efficient than the labeling of cells incubated with MPA-QDs, probably because the MSA agent presents two free carboxyl groups promoting a better interaction with biomolecules, while MPA has only one carboxyl group.

#### 4. CONCLUSION

The alternative Plate Reader bioconjugation method here proposed was successfully tested and confirmed by flow cytometry and spectroscopic analysis. This bioconjugation detection method consists in a fast semi-quantitative analysis showing sensitivity and reproducibility. By using this method it is possible to analyze multiple types of samples (QDs associated to different proteins or QDs associated to molecules by different conditions such as pH and stoichiometric proportion) at the same time. It is an alternative bioconjugation detection method for researchers especially working in the optical field. Moreover, small amount of reagents and samples are required, taking advantage of the native fluorescence of QDs. Therefore, this method could be used as a complementary approach to analyze QD-protein bioconjugation using microplates wells with Fluorescence Plate Reader. Additionally, we limited this optical method in this work to QD-protein bioconjugate detection, but the same idea shows a great potential to be extrapolated for other fluorophores and for other kind of biomolecules, including uncharged biomolecules as well

as uncharged pegylated QDs, which are hard to detect by standard non optical methods.

**Acknowledgments:** The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) for financial support and student fellowships. We are also grateful to the National Institute of Science in Photonics (INFO) for financial resources. Additionally, we would like to thank the Non-Conventional Polymer Group of Physics Department of UFPE for the spectroscopic analysis, Aggeu Magalhães—FIOCRUZ for the flow cytometry measurements and Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE). We would like to dedicate this work *in memoriam* of Professor Benício de Barros Neto.

#### References and Notes

1. I. L. Medintz, H. T. Uyeda, E. R. Goldman, and H. Mattoussi, *Nat. Mater.* 4, 435 (2005).
2. X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolia, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, and S. Weiss, *Science* 307, 538 (2005).
3. B. S. Santos, P. M. A. Farias, and A. Fontes, *Handbook of Self Assembled Semiconductor Nanostructures Novel Devices in Photonics and Electronics*, edited by M. Henini, Elsevier, Amsterdam (2008), Vol. 1, pp. 771–798.

4. C. Chornokur, S. Ostapenko, E. Oleynik, C. Phelan, N. Korsunskaya, T. Kryshchuk, J. Zhang, A. Wolcott, and T. Sellers, *Superlattices Microstruct.* 45, 240 (2009).
5. K. E. Sapsford, K. M. Tyner, B. J. Dair, J. R. Deschamps, and I. L. Medintz, *Anal. Chem.* 83, 4453 (2011).
6. X. Huang, J. Weng, F. Sang, X. Song, C. Cao, and J. Ren, *J. Chromatogr. A* 1113, 251 (2006).
7. W. T. Al-Jamal, K. T. Al-Jamal, A. Cakebread, J. M. Halket, and K. Kostarelos, *Bioconjugate Chem.* 20, 1696 (2009).
8. L. Shao, C. Dong, F. Sang, H. Qian, and J. Ren, *J. Fluoresce.* 19, 151 (2008).
9. H. Mattousi, J. M. Mauro, E. R. Goldman, G. P. Anderson, V. C. Sundar, F. V. Mikulec, and M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* 122, 12142 (2000).
10. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Elsevier, Amsterdam (2008), Vol. 2, p. 215.
11. M. G. Warnera, J. W. Gratea, A. Tyler, R. M. Ozanicha, K. D. Millera, J. Loub, J. D. Marks, and C. J. Bruckner-Lea *Biosens. Bioelectron.* 25, 179 (2009).
12. H. Li, Z. Cao, Y. Zhang, C. Lau, and J. Lu, *Analyst.* 136, 1399 (2011).
13. Bangs Laboratories, Inc. Adsorption to Microspheres, *Tech Note* 204, 1 (2008).
14. B. S. Santos, P. M. A. Farias, F. D. de Menezes, A. G. B. Júnior, R. Ferreira, M. A. Motta, A. G. C. Neto, A. A. S. Vieira, D. C. N. Silva, A. Fontes, and C. L. Cesar, *Applied Physics A, Materials Science and Processing* 89, 957 (2007).
15. A. J. Pesce, D. J. Ford, M. Gaizutis, and V. E. Pollak, *Biochimica et Biophysica Acta—Protein Structure* 492, 399 (1977).
16. L. A. Cantarero, J. E. Butler, and J. W. Osborne, *Anal. Biochem.* 105, 375 (1980).
17. B. D. Fair and A. M. Jamieson, *J. Colloid Interface Sci.* 77, 525 (1980).
18. P. Dagtepe, V. Chikan, J. Jasinski, and V. J. Leppert, *J. Phys. Chem. C* 111, 14977 (2007).
19. A. L. Rogach, I. T. Franz, T. A. Klar, J. Feldmann, N. Gaponik, V. Lesnyak, A. Shavel, A. Eychmüller, Y. P. Rakovich and J. F. Donegan, *J. Phys. Chem. C* 111, 14628 (2007).
20. W. W. Yu, L. Qu, W. Guo, and X. Peng, *Chem. Mater.* 15, 2854 (2003).
21. N. N. Mamedova, N. A. Kotov, A. L. Rogach, and J. Studer, *American Chemical Society* 1, 281 (2001).
22. D. Wu, Q. Wei, Y. Li, B. Du, and G. Xu, *Int. J. Biol. Macromol.* 37, 69 (2005).
23. Y. Yu, Y. Lai, X. Zheng, J. Wu, Z. Long, and C. Liang, *Spectrochim. Acta, Part A* 68, 1356 (2007).

Received: 7 April 2013. Accepted: 12 July 2013.

## Chapter 8

### Semiquantitative Fluorescence Method for Bioconjugation Analysis

Aluizio G. Brasil Jr., Kilmara H.G. Carvalho, Elisa S. Leite, Adriana Fontes, and Beate Saegesser Santos

#### Abstract

Quantum dots (QDs) have been used as fluorescent probes in biological and medical fields such as bioimaging, bioanalytical, and immunofluorescence assays. For these applications, it is important to characterize the QD–protein bioconjugates. This chapter provides details on a versatile method to confirm quantum dot–protein conjugation including the required materials and instrumentation in order to perform the step-by-step semiquantitative analysis of the bioconjugation efficiency by using fluorescence plate readings. Although the protocols to confirm the QD–protein attachment shown here were developed for CdTe QDs coated with specific ligands and proteins, the principles are the same for other QDs–protein bioconjugates.

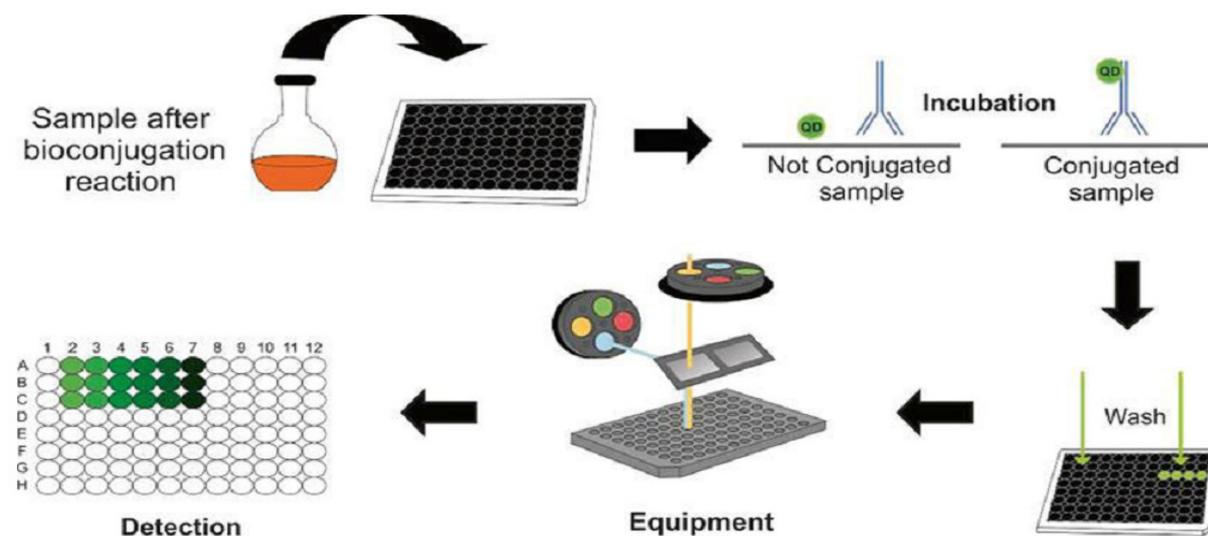
**Key words** Quantum dot, Fluorescence plate reader, Bioconjugate, CdTe, Protein

---

#### 1 Introduction

One of the key problems for successfully using the quantum dots as new optical probes in biological systems [1–3] is to guarantee the quality and efficiency of the conjugation processes to proteins and other specific biomolecules and ultimately the interaction of the ensemble with the biological systems. A poor conjugation leads to unsuccessful applications. For this reason the characterization and evaluation of the QDs' bioconjugation is necessary, independently of the physicochemical conjugation approaches applied.

In the last decades different methods to characterize QDs bioconjugates have been reported in the literature [4–9]. Sapsford et al. [4] classified in a recent review the bioconjugation characterization approaches for various nanomaterials different kind of techniques: separation, scattering, microscopy, and spectroscopy. However, lack of standardization for interpreting the results, the use of expensive equipment, and/or laborious methodologies represent common disadvantages to current methods.



**Fig. 1** Experimental procedure used in the Fluorescence Plate Reader method for QDs–protein covalent binding bioconjugates. The scheme shows the interaction process between the microplates with different samples: the two controls used in the experiment present no considerable fluorescence signal and QDs–protein bioconjugates present fluorescence indicating conjugation

For example, among the most cited methods, electrophoresis is a laborious technique and can be applied only for qualitative analyses of charged specimens. Moreover, if the conjugated molecule has low or medium molecular weight, electrophoresis is no longer feasible [5, 8, 9]. Another cited method, the dynamic light scattering (DLS) can qualitatively analyze the success of the bioconjugation based on the average sizes of the systems prior and after the conjugation processes but present a poor resolution. Additionally, it analyzes just one sample at a time and can resolve particle populations within the same sample only if they differ in size at least by a factor of three [4, 6]. The fluorescence correlation spectroscopy (FCS) [7] although is more sensitive than DLS for discriminating similar sizes, needs a confocal microscopy, an expensive equipment which is not common in laboratories. Moreover, the FCS cannot give much information about the efficiency of the bioconjugation process. Therefore, new and complementary methods are always welcome to evaluate bioconjugation process.

Here, an alternative method for investigating QDs–protein bioconjugates provides a simple attempt to resolve some of these difficulties described (Fig. 1). We propose the use of Fluorescence Plate Reader as a complementary approach to distinguish QDs and proteins from QDs–proteins based on the QDs' native fluorescence and on the different intensities showed by the bioconjugates and control samples [10]. The protein part of the bioconjugates attaches itself through hydrophobic interactions to the polymer based plate. The equipment detects the fluorescence output of the

bioconjugates and also a small fraction of stray light which must be estimated for each analysis, resulting a relative intensity. The relative fluorescence intensity (*RelativeFL*), which evaluates the increase of the bioconjugates' fluorescence over the controls, can be calculated by applying Eq. 1.

$$RelativeFL(\%) = \frac{(BioconjugateFL - ControlFL)}{ControlFL} \times 100\%, \quad (1)$$

where *BioconjugateFL* is the fluorescence intensity of the QDs–biomolecule samples and *ControlFL* is the average signal detected for the controls. We recommend at least two controls: the first one consists of isolated colloidal QDs and the second control consists of the protein molecules.

If *BioconjugateFL* (the signal intensity of the QDs–biomolecule samples) is at least twice the value of *ControlFL* (the average controls values), this is considered an indication of conjugation. The higher the signal the more satisfactory and efficient is the process (*see Note 1*). On the other hand, if the *BioconjugateFL* is of the same order of the control signals, the conjugation is considered unsuccessful (*see Note 1*). In other words, the result is considered positive if *RelativeFL* is equal or higher than 100 % and is considered negative if *RelativeFL* is lower than 100 %. This criterion of 100 % was chosen by empirical experimental observation after exhaustive test reproduction of this bioconjugation method with different QD and biomolecule systems.

This alternative method is fast, simple, sensitive, and practical. Moreover, it is not limited by the charge or the size of the bioconjugates. Besides, it has the advantage to be able to evaluate and discriminate semiquantitatively a great number of different types of bioconjugates simultaneously, depending on the number of the wells in the microplate [10].

This chapter provides the basic procedures and detailed information on how to determine the efficiency of the conjugation reaction process of QDs–protein bioconjugates. The protocols described here employ cadmium telluride water-based QDs, albumin and immunoglobulin, but the procedures can be adapted to analyze bioconjugates prepared with different QDs and proteins.

---

## 2 Materials

### 2.1 CdTe QDs Synthesis (*See Note 2*)

1. Thioglycolic acid (TGA), HSCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H<sub>(l)</sub>.
2. Cysteamine (CTM), HSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2(s)</sub>.
3. Cadmium Perchlorate, Cd(ClO<sub>4</sub>)<sub>2(s)</sub>.
4. Metallic tellurium, Te<sup>o</sup><sub>(s)</sub>.
5. Sodium borohydride, NaBH<sub>4(s)</sub>.
6. Ultrapure water.

**2.2 Bioconjugation**

1. 1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride (EDC).
2. *N*-hydroxysulfosuccinimide (Sulfo-NHS).
3. 2-[morpholino] ethanesulfonic acid (MES).
4. Bovine Serum Albumin (BSA) (*see Note 3*).
5. Thioglycolic acid-coated cadmium telluride QDs (TGA-coated CdTe QDs).
6. Sulfosuccinimidyl 4-[*N*-maleimidomethyl] cyclohexane-1-carboxylate (Sulfo-SMCC) (*see Note 4*).
7. Tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP).
8. Human Immunoglobulin G (IgG).
9. Cysteamine-coated cadmium telluride (CTM-coated CdTe).
10. Phosphate buffer solution (PBS).

**2.3 Bioconjugate Analysis**

1. Fluorescence microplate reader. For example, we used Model Wallac Victor<sup>2</sup> (Perkin Elmer).
2. Black microplates. For example, we used polystyrene black microplates.
3. Phosphate buffer solution (PBS).
4. Negative controls (*see Note 5*).

---

**3 Methods****3.1 General Procedure for CdTe QDs Synthesis**

Aqueous colloidal dispersion of CdTe QDs could be synthesized by adapting a previously reported method [11]. Briefly, QDs can be prepared by the addition of  $\text{Te}^{2-}$  in a  $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$  solution of  $\text{pH} > 10$  in the presence of TGA as stabilizing agent in a 2:1:4.2 ratio of Cd:Te:TGA and a pH in the range of 5.6–5.9 in the presence of CTM as stabilizing agent in a 2:0.2:2.4 ratio of Cd:Te:CTM. The  $\text{Te}^{2-}$  aqueous solution should be prepared using metallic tellurium and  $\text{NaBH}_4$ , at a high pH and both under argon saturated inert atmosphere. We recommend to proceed the reaction in this way, under constant stirring and heating at 80 °C for at least 1 h. The time interval of the synthesis will depend on the expected size (and emission profile) of the QDs.

**3.2 Bioconjugation Procedure**

Covalent binding is among the most widely used techniques for bioconjugation. Here we outline the procedures for the conjugation of TGA-coated CdTe QDs with BSA protein using EDC and Sulfo-NHS as coupling reagents and of CTM-coated CdTe QDs with IgG using Sulfo-SMCC as coupling reagent [8, 9].

It is necessary to employ QDs which show fluorescence in wavelength region different from the biomolecule's autofluorescence avoiding spectral overlap. This allows the analysis of QDs–protein

bioconjugates based on the fluorescence intensities of samples placed in a fluorescence plate reader. In the sequence, we present examples of conjugation protocols that apply the proposed method, first to BSA and then for IgG. For this protocol, the bioconjugates used were carboxyl-coated CdTe QDs with BSA and amine-coated CdTe QDs with IgG obtained by using EDC/Sulfo-NHS and Sulfo-SMCC coupling agents, respectively.

It is important to mention that a robust QD should be acquired or synthesized to maintain the original optical properties after the bioconjugation procedure (*see Note 6*).

### 3.2.1 QD Conjugation by Covalent Binding to BSA

1. Add 20 nmol of TGA-coated CdTe QDs to the activation buffer at 0.1 M MES at pH 6.0.
2. Add 0.4 mg EDC and 1.1 mg Sulfo-NHS to buffered quantum dot.
3. Allow the reaction to proceed for 15 min at room temperature.
4. Then, add 1.4  $\mu\text{L}$  of 2-mercaptoethanol (20 mM) to quench the EDC.
5. Add 1 mL of BSA at 1 mg/mL to activate quantum dot.
6. Allow the protein and quantum dot to react for at least 2 h at room temperature.
7. Prepare the microplate reader and measure the fluorescence intensity of the samples (*see Subheading 3.3*).

### 3.2.2 QD Conjugation by Covalent Binding to IgG

1. Raise the pH of CTM-coated CdTe QDs up to 7.0–7.2.
2. Then, add 3 mg of Sulfo-SMCC in 6.2 nmol of CTM-coated CdTe QDs for their chemical activation.
3. Incubate reaction mixture for 60 min at room temperature.
4. Remove excess crosslinker employing an ultracentrifugation device with a cut off of 20 MWCO (*see Note 7*).
5. In another vial, add 40  $\mu\text{L}$  of IgG at 1 mg/mL in PBS buffer and employ a final concentration of 10–20 mM TCEP (*see Note 8*).
6. Allow the IgG and TCEP to react during 30 min at room temperature for disulfide reduction.
7. Combine and mix the maleimide-activated QDs and IgG-SH (reduced) and incubate for 60 min at 25 °C.
8. Prepare the microplate and measure the samples' fluorescence intensity (*see Subheading 3.3*).

### 3.3 Procedure for Immobilized Bioconjugates and Analysis

1. Add 200  $\mu\text{L}$  in each well of all samples (controls and bioconjugates) at least in triplicate (*see Note 9*).
2. Protect the wells from external environment.
3. Incubate the microplate at room temperature for at least 1 h, gently rotating the microplate at an angle to ensure coverage of the internal well surface, during this period.

**Table 1**  
**Results of fluorescence intensity from detection of free and bioconjugated QDs systems by covalent binding in a Fluorescence Microplate Reader**

Systems	Fluorescence intensity (a. u.) <sup>a</sup>	Relative fluorescence intensity (%)
Control 1 (BSA)	299	–
Control 2 (QDs)	260	–
Average control	280	–
QDs–BSA 2 h	560	100 %
QDs–BSA 4 h	1,483	430 %
Control 1 (IgG)	268	–
Control 2 (QDs)	295	–
Average control	281	–
QDs–IgG 2 h	2,252	701 %

<sup>a</sup>Acquisition performed with the F485 excitation and F535 emission filters to BSA and F355 excitation and F595 emission filters to IgG, acquisition time of 1 s and normal slits. QDs used for BSA was TGA capped CdTe and for IgG was CTM capped CdTe

4. Add 200  $\mu$ L of PBS solution at pH 7.4 as the wash buffer in each well.
5. Wash the wells at least three times, gently rotating the microplate and wait 2 min, then discard the wells's samples (*see Note 10*).
6. Measure the fluorescence intensity of the samples (controls and QDs–protein samples) in a Microplate Fluorescence Reader (*see Notes 11–13*).
7. The analysis of some data of the presented characterization procedure is showed in Table 1.

## 4 Notes

1. Values for the *RelativeFL* show quantitative reproducibility (with standard errors smaller than 10 %) when the same samples of bioconjugates were used, evidencing the effectiveness of this detection method [10].
2. A wide range of high quality QDs are now available from commercial sources and may be used to avoid the synthesis step.
3. The BSA's fluorescence is related to tryptophan residues which provide major contribution to the intrinsic fluorescence of this protein near 340 nm [12, 13].
4. Amine-containing QDs may be usually activated with sulfo-SMCC which contains sulfhydryl-reactive maleimides for conjugation with thiol-containing proteins or other molecules [9].

5. It is important to use controls in the analysis to compare their fluorescence signal with the QD–biomolecules conjugates fluorescence. The negative controls suggested are the isolated colloidal QDs and the protein molecules.
6. The CdTe QDs' preparation procedure does not always comprehends a passivation with another semiconductor material shell. The QDs prepared in the present example were kept in closed vials for at least 60 days. This time is necessary for the emission intensity to increase and reach a plateau, due to the slow hydrolysis of the alkyl-thiol molecules and subsequent formation of a CdS shell on the particles. This is not necessary for the commercially acquired QDs.
7. It is important to remove the excess of crosslinker, which can be performed by employing a desalting column or other gel filtration column. The excess of crosslinker which does not interact with QDs can react with biomolecules producing protein dimmers.
8. In most situations, TCEP concentrations  $<10\text{--}20\text{ mM}$  are compatible with maleimide reaction chemistry and provides sufficient molar excess to effectively reduce protein disulfide bonds with reduced risk of protein denaturation. TCEP does not have to be removed from solutions before performing reactions involving maleimide labeling or cross-linking reagents.
9. Proteins have usually affinity for polystyrene, which is one of the most used plastic in microplates employed for protein immobilization in immunoassays [14–16] but for those which do not show a good adsorption to this material another alternatives may be tested: (1) to try other types of polymeric plates and (2) to coat the polystyrene plate with a complementary protein or other biomolecules which show a greater affinity to the polymer and may associate to the tested bioconjugate.
10. Isolated QD samples do not efficiently link to the polymer because they do not have enough specific groups required for a strong interaction. So, after washing the microplate with a buffer solution such as PBS, the QDs should be removed and no fluorescence signal will be detected.
11. Adjust the parameters such as excitation and emission filters, acquisition time, intensity lamp and slits for excitation and emission, based on the QDs applied.
12. The biomolecules alone usually do not present fluorescence in the same wavelength region of the QDs employed. So in the case of a well-succeeded QD–protein bioconjugation, the Fluorescence Plate Reader will give a fluorescence signal indicating that QDs are bound to the proteins attached to the well surface.
13. The low signals for the controls are due to stray light coming from the excitation source and being scattered by the wells.

## Acknowledgments

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) for financial support and student fellowships. We are also grateful to the National Institute of Science in Photonics (INFO) for financial resources. The authors also wish to thank Pedro Barroca and Beatriz S. Santos for the schematic drawing.

## References

1. Medintz IL, Uyeda HT, Goldman ER, Mattoussi H (2005) Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat Mater* 4:435–446
2. Michalet X, Pinaud FF, Bentolia LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, Sundaresan G, Wu AM, Gambhir SS, Weiss S (2005) Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science* 307:538–544
3. Santos BS, Farias PMA, Fontes A (2008) Semiconductor quantum dots for biological applications. In: Henini M (ed) *Handbook of self-assembled semiconductor nanostructures novel devices in photonics and electronics*, vol 1. Elsevier, Amsterdam, pp 771–798
4. Sapsford KE, Tyner KM, Dair BJ, Deschamps JR, Medintz IL (2011) Analyzing nanomaterial bioconjugates: a review of current and emerging purification and characterization techniques. *Anal Chem* 83(12):4453–4488
5. Huang X, Weng J, Sang F, Song X, Cao C, Ren J (2006) Characterization of quantum dot bioconjugates by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescent detection. *J Chromatogr A* 1113:251–254
6. Al-Jamal WT, Al-Jamal KT, Cakebread A, Hallett JM, Kostarelos K (2009) Blood circulation and tissue biodistribution of lipid–quantum dot (L-QD) hybrid vesicles intravenously administered in mice. *Bioconjug Chem* 20:1696–1702
7. Shao L, Dong C, Sang F, Qian H, Ren J (2008) Studies on interaction of CdTe quantum dots with bovine serum albumin using fluorescence correlation spectroscopy. *J Fluoresc* 19:151–157
8. Mattoussi H, Mauro JM, Goldman ER, Anderson GP, Sundar VC, Mikulec FV, Bawendi MG (2000) Self-assembly of CdSe–ZnS quantum dots bioconjugates using an engineered recombinant protein. *J Am Chem Soc* 122:12142–12150
9. Hermanson GT (2008) *Bioconjugate techniques*, vol 2. Elsevier, Amsterdam, p 215
10. Carvalho KHG, Brasil AG Jr, Cabral Filho PE, Tenório DPLA, de Siqueira ACA, Leite ES, Fontes A, Santos BS (2014) Fluorescence plate reader for quantum dot–protein bioconjugation analysis. *J Nanosci Nanotechnol* 14:3320–3327
11. Santos BS, Farias PMA, Menezes FD, Brasil Júnior AG, Ferreira R, Motta MA, Castro Neto AG, Vieira AAS, Silva DCN, Fontes A, Cesar CL (2007) Highly fluorescent semiconductor core–shell CdTe–CdS nanocrystals for monitoring living yeast cells activity. *Appl Phys A* 89(4):957–961
12. Mamedova NN, Kotov NA, Rogach AL, Studer J (2001) Protein–CdTe nanoparticle conjugates: preparation, structure and inter-unit energy transfer. *Nano Lett* 1(6):281–286
13. Wu D, Wei Q, Li Y, Du B, Xu G (2005) Quenching of the intrinsic fluorescence of bovine serum albumin by phenylfluorone–Mo(VI) complex as a probe. *Int J Biol Macromol* 37:69–72
14. Pesce AJ, Ford DJ, Gaizutis M, Pollak VE (1977) Binding of protein to polystyrene in solid-phase immunoassays. *Biochim Biophys Acta* 492(2):399–407
15. Cantarero LA, Butler JE, Osborne JW (1980) The adsorptive characteristics of proteins for polystyrene and their significance in solid-phase immunoassays. *Anal Biochem* 105(1):375–382
16. Fair BD, Jamieson AM (1980) Studies of protein adsorption on polystyrene latex surfaces. *J Colloid Interface Sci* 77(2):525–534