



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE MATERIAIS

TESE DE DOUTORADO

**Aplicação de Pontos Quânticos de CdTe e Conjugados
a Concanavalina A e Antigalectina-3 em Protocolos de
Marcação Histoquímica de Lesões da Mama**

DENISE PATRICIA LINS DE AZEVEDO TENÓRIO

Recife, Julho de 2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE MATERIAIS

Aplicação de Pontos Quânticos de CdTe e Conjugados a Concanavalina A e Antigalectina-3 em Protocolos de Marcação Histoquímica de Lesões da Mama

Por

DENISE PATRICIA LINS DE AZEVEDO TENÓRIO

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Materiais como um dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Ciência de Materiais

Orientador: Prof. Severino Alves Júnior

Co-orientadoras: Profa. Beate Seagesser Santos

Profa. Adriana Fontes

Recife, Julho de 2012

Catálogo na fonte
Bibliotecária Joana D'Arc L. Salvador, CRB 4-572

Tenório, Denise Patricia Lins de Azevedo.
Aplicação de pontos quânticos de CdTe e
conjugados a concanavalina A e antigalectina-3 em
protocolos de marcação histoquímica de lesões da
mama / Denise Patricia Lins de Azevedo Tenório. –
Recife: O Autor, 2012.

xiv, 132 p.: fig.; tab.

Orientador: Severino Alves Júnior.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de
Pernambuco. CCEN. Ciência de Materiais, 2012.
Inclui bibliografia e anexo.

1. Nanotecnologia. 2. Materiais nanoestruturados.
3. Candida albicans. 4. Mamas – câncer. I. Alves Júnior,
Severino (orientador). II. Título.

620.5

(22. ed.)

FQ 2012-048



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE MATERIAIS

PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

DENISE PATRICIA LINS DE AZEVEDO TENÓRIO

**“APLICAÇÃO DE PONTOS QUÂNTICOS DE CdTe E CONJUGADOS A
CONCAVALINA A E ANTIGALECTINA-3 EM PROTOCOLOS DE
MARCAÇÃO HISTOQUÍMICA DE LESÕES DA MAMA”**

A Banca Examinadora composta pelos Professores: SEVERINO ALVES JÚNIOR (Orientador e Presidente da Banca Examinadora), do Departamento de Química Fundamental da UFPE; ROSA AMÁLIA FIREMAN DUTRA, do Departamento de Engenharia Biomédica da UFPE; LUIZ BEZERRA DE CARVALHO JÚNIOR, do Departamento de Bioquímica da UFPE; WALLACE DUARTE FRAGOSO, do Departamento de Química da UFPE; e EDUARDO HENRIQUE LAGO FALCÃO, do Departamento de Química Fundamental da UFPE; considera a Tese da candidata:

☒ APROVADA

☐ REPROVADA

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal de Pernambuco, em 31 de julho de 2012.


PROF. SEVERINO ALVES JÚNIOR
PRESIDENTE E 1º EXAMINADOR


PROF. ROSA AMÁLIA FIREMAN DUTRA
2º EXAMINADOR


PROF. LUIZ BEZERRA DE CARVALHO JÚNIOR
3º EXAMINADOR


PROF. WALLACE DUARTE FRAGOSO
4º EXAMINADOR


PROF. EDUARDO HENRIQUE LAGO FALCÃO
5º EXAMINADOR

AGRADECIMENTOS

A DEUS por tudo o que me proporcionou e me proporcionará.

Aos meus orientadores, Prof. Severino Alves Júnior e Profa. Beate S. Santos e Profa. Adriana Fontes, pela confiança e dedicação.

Ao Prof. Eduardo Beltrão, do LIKA/UFPE, e aos seus alunos pelo fornecimento das amostras histológicas.

A Profa. Martha Ribeiro, do IPEN/CNEN, e a seus alunos pelo fornecimento da *C. albicans*.

A Profa. Tereza Correia e Profa. Patrícia Paiva, do Departamento de Bioquímica/UFPE, e seus respectivos alunos pelo fornecimento das suspensões de eritrócitos de coelho.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Ciência de Materiais, pelos ensinamentos.

Aos Secretários do Programa de Pós-graduação em Ciência de Materiais e aos Secretários do Programa de Pós-graduação em Química.

A todos os companheiros de laboratório: professores, alunos e funcionários, pelos momentos em que estivemos juntos.

Aos colegas da pós-graduação em Ciência de Materiais.

A Magaly Nascimento, do CETENE, pela realização dos espectros de dicroísmo circular.

A Diogo Burigo, Claudilene Chaves e Paulo Euzébio, pelas imagens de MET e DRX.

Ao Sr. João Carlos e a Tarcyla Gomes, do DF/UFPE, pela realização das análises de DRX.

A Virgínia, do DF/UFPE, pela realização de alguns espectros de absorção.

Ao Prof. Celso Pinto, do DF/UFPE, e aos seus alunos, Clécio, Renata e Etelino, pela realização de alguns espectros de emissão e pelas análises de DLS.

Aos meus familiares, pelo apoio.

Ao meu esposo, Rômulo e nossa filha, Luísa, pela contribuição e paciência.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	ix
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO 1 - Considerações Sobre Pontos Quânticos e sua Aplicação no Estudo das Lesões da Mama Através de Lectinas	
1.1 Introdução	7
1.2 Considerações Gerais sobre Semicondutores	8
1.2.1 Semicondutores de Tamanhos Reduzidos	14
1.2.1.1 Pontos Quânticos de Telureto de Cádmio	18
1.3 Aspectos Histológicos da Mama	20
1.4 Considerações Sobre as Lectinas e Seu Uso no Estudo do Câncer	26
1.4.1 Generalidades Sobre a Concanavalina A	28
1.4.2 Generalidades Sobre a Galectina-3	32
CAPÍTULO 2 - Metodologias	
2.1 Introdução	40
2.2 Preparação das Nanopartículas de CdTe	40
2.2.2 Métodos de Caracterização Estrutural dos Sistemas	42
2.2.3 Método de Caracterização Óptica dos Sistemas	43
2.3 Conjugação dos Pontos Quânticos à Con A e Antigal-3	44
2.4 Caracterização dos Pontos Quânticos Conjugados à Con A e Antigal-3	45
2.5 Marcação de <i>Candida albicans</i>	47

2.6 Marcação Histoquímica das Lesões e Tecido de Mama Normal	47
CAPÍTULO 3 - Obtenção e Caracterização dos Pontos Quânticos de CdTe	
3.1 Introdução	50
3.2 Caracterização Estrutural dos Sistemas	50
3.3 Caracterização Óptica dos Sistemas	53
CAPÍTULO 4 - Aplicação dos Pontos Quânticos Conjugados como Marcador Biológico Fluorescente	
4.1 Introdução	62
4.2 Conjugação de CdTe a Con A e Antigal-3	63
4.2.1 Monitoramento da Estabilidade Coloidal dos Pontos Quânticos à Variação de pH e na Presença de Con A	63
4.2.2 Caracterização Óptica de CdTe Conjugado a Con A e Antigal-3	65
4.2.3 Verificação da Integridade Estrutural das Proteínas	68
4.2.4 Avaliação da Eficiência da Conjugação	70
4.2.5 Avaliação da Atividade Biológica de Con A	71
4.3 Marcação de <i>C. albicans</i>	72
4.2.3 Marcação Histoquímica das Lesões e Tecido de Mama Normal	75
CAPÍTULO 5 - Conclusões e Perspectivas	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
ANEXOS	107
<i>Curriculum Vitae</i> Resumido	108
Publicações	112
Artigo em Fase Final de Escrita	116

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1.1 Destaque da tabela periódica demonstrando os elementos químicos classificados como semicondutores.	9
Fig. 1.2 (A) Sistema de coordenadas (x , y , e z) definido para os sistemas cristalinos.	9
Fig. 1.3 Estruturas cristalinas de coordenação tetraédrica apresentada pelos cristais de semicondutores. (A) Estrutura do tipo diamante, formada por duas redes cúbicas de face centradas interpenetradas. Nesta estrutura dois átomos estão associados por ponto de rede, totalizando oito átomos por célula unitária. (B) Estrutura do tipo blenda de zinco, formada por duas redes cúbicas de face centradas interpenetradas. O arranjo atômico nesta estrutura configura a presença de oito íons por célula unitária. Cada espécie atômica tem quatro vizinhos. (C) Estrutura do tipo wurtzita, constituída pela interpenetração de duas redes hexagonais compactas. Nesta estrutura, cada célula unitária contém quatro íons por ponto de rede e por célula unitária. Cada espécie atômica possui quatro vizinhos e uma segunda camada formada por doze íons.	11
Fig. 1.4 (A) Arranjo tetraédrico dos íons dos elementos formadores de compostos semicondutores. Orientações dos tetraedros atômicos adjacentes na (B) blenda de zinco e na (C) wurtzita. <i>A</i> e <i>B</i> referem-se a duas espécies atômicas diferentes.	11
Fig. 1.5 Evolução representativa dos orbitais atômicos em bandas de energia em um cristal.	12
Fig. 1.6 Representação esquemática do éxciton do tipo (A) Wannier-Mott ou livre, geralmente apresentado pelos elementos e compostos semicondutores. O par (e^-h^+) está fracamente ligado, devido a grande separação entre o elétron e o buraco, e apresenta movimento livre por toda a extensão do cristal. Éxciton do tipo (B) Frenkel ou estreitamente ligado, que ocorre em materiais isolantes e cristais de moléculas (ex. antraceno). O par (e^-h^+) apresenta raio pequeno, mobilidade reduzida e se movimenta através do cristal 'saltando' de um átomo a outro. (C) Raio de Bohr do éxciton.	13
Fig. 1.7 Esquema da energia do elétron em um (A) composto semiconductor ou do tipo <i>gap</i> -direto, como GaAs e InP; e de um (B) elemento semiconductor ou do tipo <i>gap</i> -indireto, ex. Si, Ge e GaP), a partir do vetor de onda $k = 0$.	14
Fig. 1.8 Densidade de estados eletrônicos em cristais macroscópicos, e em regime de confinamento em uma (filme quântico), duas (fio quântico) e três dimensões (ponto quântico).	15
Fig. 1.9 Representação dos estágios de nucleação e crescimento de nanocristais	16

monodispersos segundo o modelo de La Mer.

- Fig. 1.10** Primeiras imagens obtidas para a marcação de células por pontos quânticos. 17
(A) Fibroblastos 3T3 marcados por CdSe. (B) Células HeLa marcadas por CdSe/ZnS.
- Fig. 1.11** Resistência ao fotoclareamento apresentado pelos pontos quânticos (em 18
vermelho) comparado ao corante orgânico (verde) em dupla marcação de fibroblastos 3T3.
- Fig. 1.12** (A) Aspecto do cristal macroscópico de CdTe. (B) Demonstração da relação 18
entre o comprimento de onda de fluorescência e a variação no tamanho dos pontos quânticos, de 2-4 nm.
- Fig. 1.13** Algumas formas de interação entre PQs e biomoléculas para aplicação 19
biológica.
- Fig. 1.14** (A) Glândula mamária, demonstrando a porção secretora (ácinos) e os ductos. 20
Mag. 50X. (B) Corte da porção secretora de uma glândula mamária. Média magnificação.
- Fig. 1.15** (A) Esquema da mama feminina mostrando as glândulas mamárias inativas e 21
(B) o desenvolvimento de ácinos nas glândulas mamárias ativas.
- Fig. 1.16** (A) Mama normal: lóbulo ou glândula mamária apresentando dupla camada 22
formada por células epiteliais e mioepiteliais. Mama apresentando fibroadenoma com (B) perfil intracanalicular, onde os ductos são comprimidos e (C) perfil pericanalicular, onde não há compressão dos ductos pela porção estromal. Média e pequena magnificação.
- Fig. 1.17** Aspectos histológicos do carcinoma ductal invasivo, demonstrando (A) a 24
desorganização no arranjo glandular e (B) a invasão de tecido adiposo adjacente, em meio à porção secretora glandular. Magnificação 200x. Nas imagens de marcação histoquímica para receptores de estrogênio, observa-se a ausência da camada de células mioepiteliais no tumor maligno (C) quando comparado ao tecido normal (D), que apresenta localização justaposta ao epitélio glandular, corado em marrom. Magnificação média.
- Fig. 1.18** Representação do monômero da lectina leguminosa concanavalina A. (A) 29
Diagrama em fitas de Con A. Os íons cálcio (roxo) e manganês (verde) estão indicados. A folha dorsal com 6 fitas, em vermelho, a folha frontal com 7 fitas, em amarelo e a folha superior com 5 fitas, em cinza. O primeiro e o último resíduo de aminoácido estão destacadas em ciano e cinza. (B) Diagrama topológico do enovelamento do monômero representado em (A). A estrela indica a posição onde os cátions divalentes interagem com o monômero. *Protein Data Banking: 2CNA*.

Fig. 1.19 Representação esquemática do sítio de ligação dos íons metálicos às cadeias 29 laterais dos aminoácidos presentes no monômero de Con A. Os átomos de carbono estão representados em branco, nitrogênio em cinza claro, oxigênio em cinza escuro e água como *wat*. Os grupos funcionais essenciais à ligação ao açúcar estão destacados em caixa cinza. **Obs:** apenas os átomos das cadeias laterais estão representados. As cadeias laterais dos resíduos de glutamato (Glu8), aspartato (Asp10 e Asp19) e histidina (His24) são a região de ligação para o metal de transição, e aspartato (Asp10 e Asp19), tirosina (Tyr12) e arginina (Arg228), para o íon cálcio.

Fig. 1.20 Representação estrutural da Con A: monômero (A), estrutura quaternária 30 dimérica (pH < 5,6), representada pelo alinhamento antiparalelo *side-by-side*, das duas folhas- β dorsais, formando uma folha- β contínua com 12 fitas, coloridas em vermelho (B) e (C) tetramerização da estrutura quaternária (pH > 7,0), resultante da agregação *back to back* de dois dímeros *side-by-side*, perpendicularmente inclinados num ângulo de 82°.

Fig. 1.21 Diagrama esquemático da rede de ligações de hidrogênio entre os átomos de 30 oxigênio da manose (ou glicose) e os hidrogênios doadores e aceptores do domínio de reconhecimento de carboidratos de Con A: OH-6 está ligada ao OD1 (oxigênio doador) de Asp208 e o O-6 está interagindo com a NH- de Tyr100, por interações de van der Waals; O-3 está interagindo com NH- de Arg228; O-5 está interagindo com o NH- de Leu99; OH-4 está ligado ao OD2 de Asp208 e O-4 interagindo com NH- da amida de Asn14; OH-2 faz ligação de hidrogênio com uma molécula de água, ligada a um tetrâmero adjacente e O-1 não realiza nenhuma ligação de hidrogênio.

Fig. 1.22 Representação do arranjo dos domínios de reconhecimento de carboidratos 32 apresentado pelas subfamílias de galectinas: (A) grupo protótipo: representado pela Gal-5, -7 e -10 (biologicamente ativas como monômeros) Gal-1, -2, -11, -13, -14 e -15 (ativas como homodímeros); (B) grupo quimera, na qual a única integrante é a Gal-3, a atividade biológica é conferida pela forma oligomérica, cujas se agregam através da porção N-terminal; (C) grupo tipo bi-DRC onde os dois DRC são distintos e, geralmente, apresentam várias isoformas, como a Gal-4, -6, -8, -9 e -12.

Fig. 1.23 Diagrama em fitas do DRC da Galectina-3. O arranjo das duas folhas- β 33 antiparalelas demonstram uma folha anterior com 5 fitas, colorida em vermelho, e uma folha posterior com 6 fitas (S6a e S6b representam a região de ligação ao carboidrato), em amarelo. O resíduo inicial, em ciano; e o resíduo final, em cinza, estão indicados na figura. *Protein Data Banking*: 1A3K.

Fig. 1.24 Diagrama das ligações de hidrogênio decorrentes da interação Gal-3 e as 35 porções galactose e glicose, presentes na lactose ou N-acetil-lactose.

Fig. 2.1 Moléculas orgânicas funcionalizadas utilizadas na estabilização dos PQs de CdTe: 40 (A) ácido 3-mercaptopropiônico, AMP e (B) ácido mercaptosuccínico, AMS.

- Fig. 2.2** Procedimento de preparo dos PQs de CdTe, estabilizados com AMP ou AMS. 41
- Fig. 2.3** Diagrama adotado para os ensaios de avaliação da conjugação dos PQs de CdTe- 45
AMP e CdTe-AMS a Con A e Antigal-3
- Fig. 3.1** Perfil da difração de Raios-X de (A) CdTe-AMP, $2\theta = 24,12^\circ$, $40,13^\circ$ e $46,36^\circ$; e 51
(B) CdTe-AMS, $2\theta = 24,2^\circ$, $40,02^\circ$ e $46,42^\circ$. Em vermelho, os ângulos de difração
para CdTe ($2\theta = 23,8^\circ$, $39,3^\circ$ e $46,5^\circ$) e, em azul, para CdS ($2\theta = 24,6^\circ$, $43,9^\circ$ e
 $52,1^\circ$), simetria cúbica.
- Fig. 3.2** Imagens de MET dos pontos quânticos de (A) CdTe-AMP e (B) CdTe-AMS. 52
- Fig. 3.3** Espectro de absorção e emissão eletrônica para os pontos quânticos de CdTe- 53
AMP, diluídos na proporção de 1:5 e sem diluição. A emissão máxima foi observada
em torno de $\lambda = 550$ nm ($\lambda_{exc.} = 365$ nm) e o pico de absorção excitônica em $\lambda = 488$
nm.
- Fig. 3.4** Espectro de absorção e emissão eletrônica para os pontos quânticos de CdTe- 55
AMS, diluídos na proporção de 1:1 e sem diluição. A emissão máxima foi observada
em $\lambda = 600$ nm ($\lambda_{exc.} = 365$ nm) e o pico de absorção excitônica em $\lambda = 547$ nm.
- Fig. 3.5** Diâmetro hidrodinâmico apresentado pelas nanopartículas de (A) CdTe-AMP e (B) 56
CdTe-AMS.
- Fig. 4.1** Perda da estabilidade dos PQs de CdTe em função da variação do pH, 64
demonstrando que CdTe-AMP permanece estável em $pH > 6,5$ e CdTe-AMS, em
 $pH > 6,0$.
- Fig. 4.2** (A) Espectros de absorção e (B) emissão dos pontos quânticos de CdTe-AMP 65
conjugado a Con A e Antigal-3 ($\lambda_{exc} = 365$ nm).
- Fig. 4.3** Espectros de emissão para a (A) Con A e a (B) Antigal-3, conjugadas ou não aos 66
pontos quânticos de CdTe-AMP e -AMS ($\lambda_{exc} = 280$ nm).
- Fig. 4.4** (A) Espectros de absorção e (B) emissão dos pontos quânticos de CdTe-AMS, 67
conjugado a Con A e Antigal-3.
- Fig. 4.5** Espectros de absorção diferencial da luz circularmente polarizada apresentadas 69
pela proteína Con A e os conjugados entre (A) CdTe –AMP/Con A e (B) CdTe–
AMS/Con A.
- Fig. 4.6** Espectros de absorção diferencial da luz circularmente polarizada apresentadas 70
pelo anticorpo Antigal-3 e os conjugados entre (A) CdTe –AMP/ Antigal-3 e (B)
CdTe–AMS/ Antigal-3.
- Fig. 4.7** Imagens de contraste de fase óptico (A e C) e de microscopia confocal (B e D) das 73

leveduras de *C. albicans* marcadas por (A e B) CdTe–AMP/Con A e (C e D) CdTe–AMS/Con A. $\lambda_{exc} = 473$ nm.

Fig. 4.8 Imagens de contraste de fase óptico (A e C) e de microscopia de fluorescência (B e D) do biofilme de *C. albicans* marcado por (A e B) CdTe–AMP/Con A e (C e D) CdTe–AMS/Con A. $\lambda_{exc} = 560/40$ nm e $\lambda_{exc} = 480/40$ nm, respectivamente.

Fig. 4.9 Imagens de contraste de fase óptico e de fluorescência do tecido MN incubado com CdTe–AMS/Con A por 2 h, demonstrando ausência de marcação. Magnif. 200x. $\lambda_{exc} = 560/40$ nm.

Fig. 4.10 Imagens de contraste de fase óptico e de fluorescência dos tecidos de mama com FIB incubados com CdTe–AMS/Con A por 2 h. (A) Imagem de vasta região de tecido conjuntivo. Magnif. 400x. (B e C) Imagem de tecido glandular demonstrando marcação pronunciada das glândulas mamárias. Magnif. 400x. e 200x. $\lambda_{exc} = 560/40$ nm.

Fig. 4.11 Imagens de contraste de fase óptico e de fluorescência dos tecidos com CDI incubados com CdTe–AMS/Con A por 2 h. (A) Região de tecido conjuntivo. Magnif. 200x. (B) Tecido glandular invasivo demonstrando marcação diferenciada das glândulas mamárias. Magnif. 200x. (C e D) Tecido em elevado grau de desestruturação, sem diferenciação entre a região glandular e estromal, demonstrando marcação preferencial do tecido epitelial. Magnif. 630x. $\lambda_{exc} = 560/40$ nm.

Fig. 4.12 Imagens de contraste de fase óptico e de fluorescência do tecido MN com CdTe–AMS/Antigal-3 por 20 h, (A) demonstrando marcação ausente das glândulas mamárias e (B) marcação pronunciada do estroma. Magnif. 200x. $\lambda_{exc} = 560/40$ nm.

Fig. 4.13 Imagens de contraste de fase óptico e de fluorescência dos tecidos com FIB incubados com CdTe–AMS/Antigal-3, por 20 h. (A) Região de tecido conjuntivo. (B) Marcação das glândulas e do estroma mamário. (C) Destaque para a marcação das células epiteliais. Magnif. 200x e 630x (destaque). $\lambda_{exc} = 560/40$ nm.

Fig. 4.14 Imagens de contraste de fase óptico e de fluorescência dos tecidos de mama com CDI incubados com CdTe–AMS/Antigal-3, por 20 h. (A) Imagem de região indiferenciada dos tecidos da mama demonstrando marcação das células epiteliais. Magnif. 200x. (B e C) Imagem demonstrando em destaque a marcação preferencial das células epiteliais difusas no estroma. Magnif. 200x e 630x. $\lambda_{exc} = 560/40$ nm.

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tab. 1.2 Os sistemas cristalinos e as redes cristalinas ou de Bravais.	10
Tab. 1.2 Algumas propriedades físicas apresentadas pelos compostos semicondutores CdTe e CdS, a 25 °C.	19
Tab. 1.3 Correlação entre as lesões malignas da mama classificadas de acordo com o tipo histológico e perfil molecular	23
Tab. 1.4 Classificação das lectinas.	27
Tab.1.5 Relação das ligações de hidrogênio entre o domínio ligante a carboidrato no monômero de concanavalina A e as hidroxilas glicosídicas.	31
Tab. 1.6 Relação das ligações de hidrogênio no domínio de reconhecimento de carboidrato na Gal-3.	34
Tab. 2.1 Parâmetros utilizados no preparo dos pontos quânticos de CdTe.	41
Tab. 2.2 Parâmetros utilizados na conjugação por adsorção entre os pontos quânticos de CdTe, preparado com AMP ou AMS, a Con A ou Antigal-3.	44
Tab. 3.1 Resumo dos dados obtidos na caracterização das nanopartículas de CdTe.	56
Tab. 4.1 Percentual de conjugação dos pontos quânticos de CdTe-AMP e CdTe-AMS conjugados a Con A e Antigal-3.	71
Tab. 4.2 Valores da atividade hemaglutinante, UAH, para a Con A conjugada aos pontos quânticos de CdTe-AMP e CdTe-AMS e para os sistemas-controle.	71

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

Å	Angstron = 10^{-10} m
A	Absorbância
a_B	Raio de Bohr do semiconductor
Antigal-3	Antigalectina-3
AMP	Ácido 3-mercaptopropiônico
AMS	Ácido mercaptosuccínico
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
B	Largura da banda à meia altura
b	Caminho óptico
BC	Banda de condução
BV	Banda de valência
c	Concentração
$(\text{CdClO}_4)_2$	Perclorato de cádmio
CDI	Carcinoma ductal invasivo
CD-MPR	Receptor de manose-6-fosfato dependente de cálcio
CdSe	Seleneto de cádmio
CdTe	Telureto de cádmio
CL-43	Colectina-43
Con A	Concanavalina A
Cq 5 e 6	Citoqueratina 5 e 6
CT	Toxina colérica
D	Diâmetro
DCR	Domínio de Reconhecimento de Carboidrato

DRX	Difração de raios-X
ε	Constante dielétrica estática do semicondutor
ε	Coeficiente de absortividade molar
e^-	Elétron
E_c	Energia no limite inferior da banda de condução
EcoL	Lectina de <i>Erythrina corallodendron</i>
E_{gap}	Energia de <i>gap</i>
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
eV	Elétron-Volt
E_v	Energia no limite superior da banda de valência
FIB	Fibroadenoma
FGFR-1 a -4	Receptor do fator de crescimento fibroblástico-1 a -4
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GaAs	Arseneto de gálio
Gal	Galactose
Gal-1 a -15	Galectina-1 a -15
GaP	Fosfeto de gálio
Glc	Glicose
Glu	Glutamato
GNA	Lectina da planta Gota de neve
GS4	Lectina 4 de <i>griffonia simpliciflora</i>
h^+	“Buraco”
HA	Hemaglutinina
HER2	Receptor-2 do fator de crescimento epidérmico humano
His	Histidina
IgE	Imunoglobulina da classe E
IGF-II/MPR	Receptor de manose-6-fosfato/ fator de crescimento II semelhante a insulina

IgG1	Imunoglobulina da subclasse 1 da classe G
InP	Fosfeto de índio
k	Vetor de onda
k	Constante de Scherrer
K_a	Constante de associação
KDa	Quilo-Dáton (unidade equivalente a 1000 u.m.a, unidades de massa atômica)
KV	Quilo-Volts
λ	Comprimento de onda
Lac	Lactose
LacNac	N-acetil-lactosamina
Leu	Leucina
LOLI e II	Lectina de <i>Lathyrus ochus</i> I e II
μ	Massa reduzida do elétron-buraco
M	Molar
Man	Manose
MBL	Lectina ligante a manana
MBP-A e -C	Proteína-A (ou -C) ligante a manose
m_e^*	Massa efetiva do elétron
MEC	Matriz extracelular
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
m_h^*	Massa efetiva do buraco
MM	Massa molecular
m_0	Massa do elétron em repouso
NaBH ₄	Borohidreto de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
Nag	N-acetil-glicosamina
NaHTe	Telureto de sódio

NaOH	Hidróxido de sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
pK	Constante de dissociação
PQs	Pontos quânticos
PT	Toxina pertussis
$[\theta]$	Elipticidade molar
ρ	Resistividade elétrica
R	Resistência
R	Raio
RE	Receptor para estrógeno
RP	Receptor para progesterona
σ	Condutividade elétrica
SAP	Componente P sérico amiloidal
SBA	Aglutinina de soja
<i>Singlecs</i> -1 a -11	Sialoadesinas-1 a -11
SP-A e -D	Proteína surfactante A e D
TL	Enterotoxina termolábil
TL-1 a -5	Taquilectina-1 a -5
Tyr	Tirosina
UAH	Unidade de atividade hemaglutinante
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia por mililitro
UV	Ultra-violeta
VP1	Proteína viral 1
Ω	Ohm
WGA	Aglutinina do gérmen de trigo
ZnS	Sulfeto de zinco
$Zn_{1-x}Cd_xSe$	Seleneto de cádmio e zinco

RESUMO

Pontos quânticos são nanocristais de semicondutores que apresentam diâmetro entre 1 – 10 nm. O confinamento quântico dos elétrons a espaços limitados faz com que as propriedades dos materiais nanoestruturados se tornem dependentes do tamanho do cristal, tornando as propriedades físicas e químicas apresentadas pelos nanocristais muito diferentes daquelas apresentadas por seus respectivos cristais macroscópicos, ou *bulk*; onde as propriedades ópticas recebem destaque particular. Neste trabalho, foram preparados pontos quânticos de CdTe conjugados a lectina concanavalina A, Con A, e ao anticorpo antigalectina-3, Antigal-3, objetivando sua ligação específica a tecidos de mama (normal, com fibroadenoma e com carcinoma ductal invasivo). Os pontos quânticos foram preparados com ácido 3-mercaptopropiônico, AMP, e ácido mercaptosuccínico, AMS, após 3 e 12 horas de aquecimento, respectivamente. A eficiência da conjugação foi superior a 180 % e as biomoléculas, conjugadas a CdTe, não apresentaram alteração estrutural. A lectina conjugada a CdTe/Con A não perdeu sua capacidade de ligação a carboidratos e foi utilizado com sucesso na marcação de *Candida albicans* (leveduras e biofilme). A marcação diferencial das lesões de mama, comparada ao tecido de mama normal, por CdTe-AMS/Con A e CdTe-AMS/Antigal-3, indicam a potencialidade destas nanoestruturas no estudo das alterações moleculares do câncer. No entanto, investigações adicionais são necessárias para sua classificação definitiva como ferramenta diagnóstica alternativa aos métodos convencionalmente utilizados.

Palavras-chave: Pontos Quânticos, CdTe, Marcadores Biológicos Fluorescentes, *Candida albicans*, Câncer de Mama.

ABSTRACT

Quantum dots are semiconductor nanocrystals that have diameters of 1-10 nm. The effect of the quantum confinement of the electrons makes the physical-chemical properties very dependent on the size of the nanocrystal, making the properties presented very different from those displayed by their macroscopic crystals, or bulk. However, the optical properties of the nanocrystals have received particular attention. This work was carried out to obtain CdTe quantum dots conjugated to the lectin concanavalin A, Con A, and to the antibody antigalectin-3, Antigal-3, when the goal was the its binding to breast tissue (normal, fibroadenoma and ductal invasive carcinoma). Quantum dots were prepared both with 3-mercaptopropionic acid (MPA) and mercaptosuccínico acid (MSA) as stabilizers, after 3 and 12 hours of heating respectively. The efficiency of conjugation exceeds 180% and the biomolecules conjugated to CdTe who no showed changes in its structure. The lectin conjugated to CdTe-AMP/Con A shows no change in their ability to bind to carbohydrates and was successful used in assay of biolabeling of *Candida albicans* (yeasts and biofilm). The differential labeling of breast lesions compared to normal breast tissue, performed by the conjugates CdTe-AMS/Con A and CdTe-AMS/Antigal-3, indicate the potential of these nanostructures in the study of the molecular alterations of cancer. However, further investigations are required to classify this material as definitive diagnostic tool in alternative to conventionally used methods.

Key words: Quantum dots, CdTe, Biolabels Fluorescent, *Candida albicans*, Breast Cancer

CAPÍTULO 1

**Considerações sobre Pontos Quânticos e sua Aplicação no
Estudo de Lesões da Mama Através de Lectinas**

1.1 Introdução

A nanotecnologia compreende a produção e aplicação de sistemas físicos, químicos e biológicos, em regime de tamanho nanométrico, bem como a integração das nanoestruturas resultantes em sistemas maiores (BHUSHAN, 2010). Sua aplicação no tratamento, diagnóstico e monitoramento de doenças ao nível molecular é conhecida como nanomedicina (JAIN, 2009). Neste contexto, as nanopartículas de ouro, os pontos quânticos e os *cantilevers* são considerados ferramentas diagnósticas promissoras (AZZAZY; MANSOUR; KAZMIERCZAK, 2006) no estudo do câncer (NIDA *et al.*, 2005), de doenças infecciosas (SU; LI, 2004) e parasitárias (CHAVES *et al.*, 2008).

Pontos quânticos (PQs) são nanopartículas de semicondutores, compostos pelos elementos pertencentes aos grupos 12-16 e 13-15 da tabela periódica, cujo diâmetro de até 10 nm, é menor ou muito próximo das dimensões do raio de Bohr do éxciton. A restrição da mobilidade dos carreadores de carga (elétrons e buracos) às dimensões do nanocristal faz com que estas nanoestruturas apresentem propriedades (ópticas e eletrônicas) dependentes do tamanho (WANG; CHEN, 2011), permitindo o uso destes nanomateriais em novas aplicações; como marcador biológico fluorescente ao nível celular e molecular, em ensaios *in vitro* e *in vivo* (GAO *et al.*, 2005).

Esta nova possibilidade de aplicação, relatada em 1998 (BRUCHEZ *et al.*, 1998; CHAN; NIE, 1998), associada a crescente incidência de novos casos de câncer - que se constitui um problema de saúde pública mundial, segundo a Organização Mundial da Saúde/ World Health Organization (INCA, 2012; WHO, 2012); torna importante o desenvolvimento de novas tecnologias para um melhor entendimento da doença e/ou descoberta de novos biomarcadores; através da conjugação de PQs a moléculas de reconhecimento específico (TOTHILL, 2009), como as lectinas e os anticorpos.

Com o objetivo de investigar a ocorrência de alterações moleculares nos principais tipos de lesões da mama (fibroadenoma e carcinoma ductal invasivo) comparadas ao tecido normal, foram utilizados PQs de telureto de cádmio (CdTe) conjugados a lectina concanavalina A e ao anticorpo antigalectina-3, como marcador biológico fluorescente em protocolos de marcação histoquímica. Paralelamente também foi analisado o perfil de marcação das leveduras e do biofilme de *Candida albicans* pelos conjugados de CdTe/Con A, sendo realizadas as seguintes etapas:

- Preparo dos PQs de CdTe, utilizando o ácido 3-mercaptopropiônico (AMP) e o ácido mercaptosuccínico (AMS) como estabilizantes;

- Caracterização estrutural dos PQs por meio da difratometria de Raios-X (DRX) e de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e caracterização óptica através de medidas espectroscópicas: espectroscopia de absorção no UV-visível e espectroscopia de emissão;
- Conjugação dos PQs a biomoléculas de reconhecimento celular específico: concanavalina A (Con A) e antigalectina-3 (Antigal-3) e caracterização óptica dos conjugados;
- Avaliação da integridade estrutural das proteínas conjugadas aos PQs, por meio da espectroscopia por dicroísmo circular;
- Avaliação da eficiência da conjugação através do ensaio de fluorescência indireta;
- Avaliação da atividade biológica da lectina Con A conjugada aos PQs através do ensaio da atividade hemaglutinante;
- Marcação de leveduras e do biofilme de *C. albicans*;
- Marcação histoquímica das lesões de mama benigna e maligna e mama normal e análise dos perfis de marcação em microscopia óptica de fluorescência.

Neste capítulo será realizada uma breve explanação teórica sobre as propriedades apresentadas pelos nanocristais de semicondutores (pontos quânticos), os aspectos histológicos da mama e a aplicação das lectinas no estudo molecular das alterações glicosídicas decorrentes do câncer.

1.2 Considerações Gerais sobre Semicondutores

Os materiais sólidos são agrupados de acordo com sua estrutura (arranjo atômico de seus átomos) e propriedades (mecânica, elétrica, térmica, magnética, óptica e reatividade química) em cinco classes de materiais: metais, polímeros, cerâmicas, compósitos e materiais avançados. Esta última categoria compreende a classe de materiais cujas propriedades foram melhoradas para o desenvolvimento de materiais de desempenho elevado, que são utilizados em aplicações de alta tecnologia, como equipamentos eletrônicos e implantes médicos. Agrupados nesta classe estão os biomateriais, os materiais inteligentes, os materiais nanoengenhierados e os semicondutores, categoria a qual pertence o nanomaterial empregado neste estudo (CALLISTER Jr., 2007).

Os semicondutores apresentam como características principais: condutividade elétrica, σ , à temperatura ambiente, intermediária aos metais e isolantes (10^{-4} a $10^4 \Omega^{-1} \text{ m}^{-1}$); valor negativo

para o coeficiente de resistividade, ρ , a elevadas temperaturas; e sensibilidade à luz, produzindo uma foto-voltagem ou mudança de resistência, R ; onde as propriedades apresentadas por estes materiais são decorrentes do arranjo de seus estados ou níveis eletrônicos em bandas e à maneira segundo a qual os elétrons ocupam estas bandas (CALLISTER Jr., 2007; PHILLIPS, 1973; SMITH, 1978). Os elementos semicondutores são representados pelos Grupos 12 a 16, da tabela periódica, como demonstrado na Fig. 1.1, onde o silício (Si) e o germânio (Ge) representam os principais elementos semicondutores. A combinação entre os elementos dos Grupos 13-15 e dos Grupos 12-16, compreendem aos compostos semicondutores, como arseneto de gálio (GaAs), sulfeto de zinco (ZnS) e seleneto de cádmio e zinco ($\text{Zn}_{1-x}\text{Cd}_x\text{Se}$), por exemplo; cujos átomos se arranjam de forma regular e repetida constituindo um sólido cristalino (SHACKELFORD, 2000).

	13	14	15	16
				8 O oxygen (15.99; 16.00)
	13 Al aluminium 26.98	14 Si silicon (28.08; 28.08)	15 P phosphorus 30.97	16 S sulfur (32.06; 32.06)
12	30 Zn zinc (65.38(2))	31 Ga gallium 69.72	32 Ge germanium 72.63	33 As arsenic 74.92
	48 Cd cadmium 112.4	49 In indium 114.8	50 Sn tin 118.7	51 Sb antimony 121.8
	80 Hg mercury 200.6			52 Te tellurium 127.6

Fig. 1.1 Destaque da tabela periódica demonstrando os elementos químicos classificados como semicondutores (IUPAC, 2012).

O arranjo repetido e periódico dos átomos constituintes do sólido cristalino é conhecido como célula unitária, onde sua forma (sem levar em consideração as posições atômicas) é associada a um sistema de coordenadas (x , y , e z). Neste sistema, cada um dos eixos coincide com um dos três contornos da célula unitária (a , b e c), cujo comprimento é denominado de parâmetro de rede. O ângulo formado entre estes eixos constituem os ângulos interaxiais (α , β e γ) que, juntos, definem a geometria da célula unitária, como visto na Fig. 1.2 (MITCHELL, 2004).

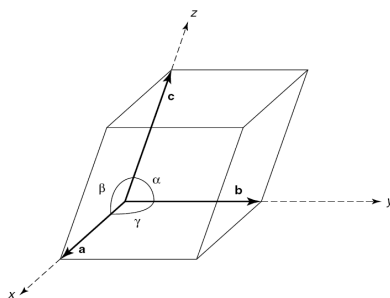
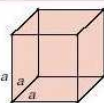
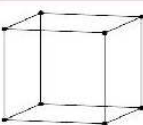
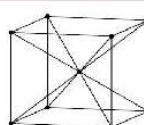
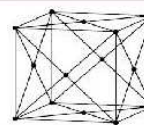
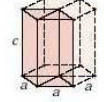
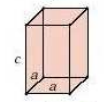
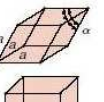
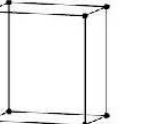
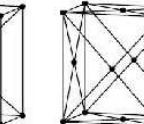
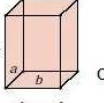
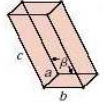
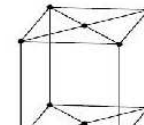
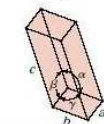


Fig. 1.2 Sistema de coordenadas (x , y , e z) definido para os sistemas cristalinos (MITCHELL, 2004).

Com base nestas considerações, existem sete diferentes possibilidades de combinações de parâmetros de rede e ângulos interaxiais, cujos representam os sistemas cristalinos. A consideração de como os átomos ou grupo de átomos se arranjam, num dado espaço tridimensional, é denominado de pontos de rede, e apresenta um número limitado de possibilidades referidas como quatorze redes cristalinas ou de Bravais, como demonstrado na Tab. 1.1 (CALLISTER Jr., 2007; SHACKELFORD, 2000).

Tab. 1.1 Os sistemas cristalinos e as redes cristalinas ou de Bravais (CALLISTER Jr, 2007; MITCHELL, 2004).

Sistema Cristalino	Relação axial	Ângulos Interaxiais	Geometria da Célula Unitária	Redes de Bravais			
Cúbico	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$					
Hexagonal	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$		Cúbico Simples	Cúbico de Corpo Centrado (BCC)	Cúbico de Face Centrada (FCC)	
Tetragonal	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$			Tetragonal Simples	Tetragonal de Corpo Centrado	Romboédrico
Romboédrico	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$					
Ortorrômbico	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$		Ortorrômbico Simples	Ortorrômbico de Base Centrada	Ortorrômbico de Corpo Centrado	Ortorrômbico de Face Centrada
Monoclínico	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \gamma = 90^\circ \neq \beta$					
Triclínico	$a \neq b \neq c$	$\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$		Monoclínico Simples	Monoclínico de Base Centrada	Triclínico	

Os elementos semicondutores (Si e Ge, por exemplo) apresentam o sistema cristalino, onde a rede cristalina é denominada de estrutura cristalina do tipo diamante (Fig. 1.3 A). Nesta estrutura do tipo cúbica de face centrada, há a associação de dois átomos por cada ponto de rede, configurando a presença de oito átomos por célula unitária, de forma a acomodar a ligação tetraédrica destes elementos (SHACKELFORD, 2000).

Nos compostos semicondutores, dois tipos de sistemas cristalinos são observados: cúbico e hexagonal, dependendo do processo de cristalização. Esta diferença de simetria é resultante das diferentes orientações dos tetraedros adjacentes, onde o ânion, situado ao centro, liga-se a outros quatro íons cátion, ou vice-versa; e a natureza das ligações possui caráter iônico-covalente em virtude da transferência parcial de densidade eletrônica do íon de menor ao de maior eletronegatividade (ROMANO, 2003; SHACKELFORD, 2000).

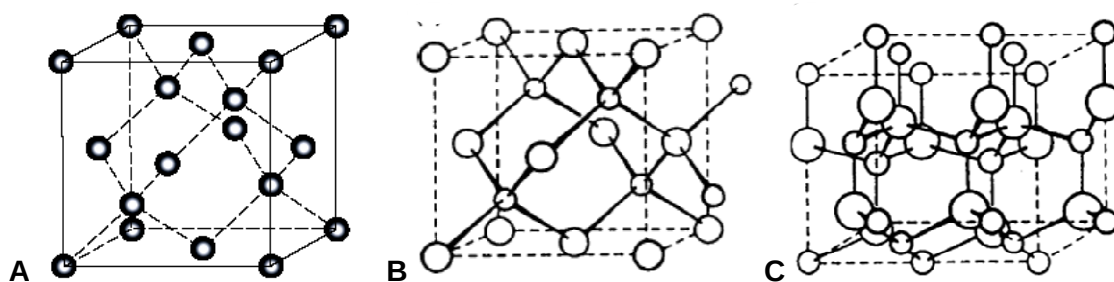


Fig. 1.3 Estruturas cristalinas de coordenação tetraédrica apresentada pelos cristais de semicondutores. (A) Estrutura do tipo diamante, formada por duas redes cúbicas de face centrada interpenetradas. Nesta estrutura dois átomos estão associados por ponto de rede, totalizando oito átomos por célula unitária. (B) Estrutura do tipo blenda de zinco, formada por duas redes cúbicas de face centrada interpenetradas. O arranjo atômico nesta estrutura configura a presença de oito íons por célula unitária. Cada espécie atômica tem quatro vizinhos. (C) Estrutura do tipo wurtzita, constituída pela interpenetração de duas redes hexagonais compactas. Nesta estrutura, cada célula unitária contém quatro íons por ponto de rede e por célula unitária. Cada espécie atômica possui quatro vizinhos e uma segunda camada formada por doze íons (CALLISTER Jr., 2007; ROGACH, 2008).

No sistema de geometria cúbica, os átomos se arranjam na rede cristalina conhecida como blenda de zinco. Nesta estrutura há a interpenetração de duas redes cúbicas de face centrada, as quais estão intimamente empacotadas e configuram a presença de dois íons distintos por ponto de rede na célula unitária. Cada espécie atômica tem quatro vizinhos, evidenciando a presença de oito íons por célula unitária. No sistema de geometria hexagonal, a rede cristalina é denominada wurtzita, onde duas redes hexagonais compactas estão interpenetradas. Cada célula unitária apresenta quatro íons por ponto de rede e por célula unitária. Cada espécie atômica apresenta quatro vizinhos, o que a torna duas vezes mais larga que a da blenda de zinco (Fig. 1.3 B e C); e o eixo $\langle 111 \rangle$, na blenda de zinco, corresponde ao eixo-c ou $\langle 001 \rangle$ na wurtzita, Fig. 1.4 (LONG, 1968; PHILLIPS, 1973).

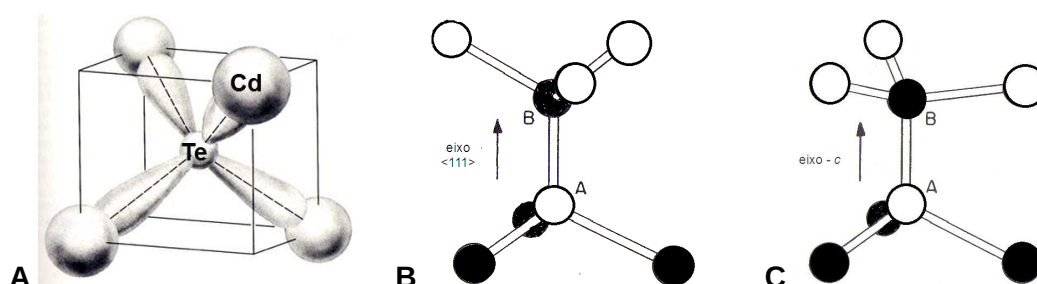


Fig. 1.4 (A) Arranjo tetraédrico dos íons dos elementos formadores de compostos semicondutores. Orientações dos tetraedros atômicos adjacentes na (B) blenda de zinco e na (C) wurtzita. A e B referem-se a duas espécies atômicas diferentes (LONG, 1968).

A agregação periódica dos elementos químicos no cristal leva a sobreposição dos níveis discretos de energia (ou orbitais moleculares) de cada elemento, formando as bandas de energia eletrônica. Durante este rearranjo, os elétrons de cada átomo ou íon passam a interagir com o potencial atrativo de outros núcleos, mudando os seus níveis de energia. As então formadas bandas de energia apresentam um espaçamento ou *band gap*, no qual os elétrons não podem ocupar; Fig. 1.5 (GAPONENKO, 1998; PHILLIPS, 1973).

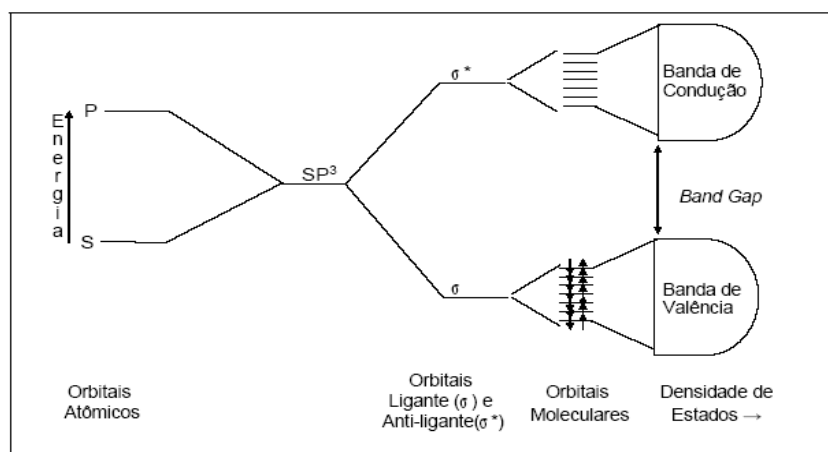


Fig. 1.5 Evolução representativa dos orbitais atômicos em bandas de energia em um cristal (GAPONENKO, 1998).

A distribuição dos elétrons nestas bandas está relacionada aos tipos de orbitais que as constituem. A banda de energia formada pela sobreposição dos orbitais moleculares do tipo ligante (σ) origina a banda de valência (BV) e está completamente preenchida por elétrons. A banda constituída pela sobreposição dos orbitais moleculares vazios, do tipo anti-ligante (σ^*), dão origem à banda de condução (BC). A passagem de elétrons da BV à BC ocorre pela absorção de energia (térmica, mecânica ou química) de valor superior à energia do espaçamento entre as bandas, E_{gap} . Esta E_{gap} é correspondente à diferença entre os valores de energia do ponto mais alto da banda de valência (E_v) e do ponto mais baixo da banda de condução (E_c), como demonstrado na Eq. 1.1. Para os semicondutores, o valor da E_{gap} é da ordem 1-3 eV; nos isolantes é maior que 2 eV e os metais ou condutores apresentam o valor de $\sim 1/40$ eV (GAPONENKO, 1998; MITCHELL, 2004; PHILLIPS, 1973).

$$E_{gap} = E_c - E_v \quad \text{Eq. 1.1}$$

Durante a transição eletrônica, um elétron (e^-) deixa um espaço vazio na BV, denominado buraco (h^+), com o qual interage através de interações coulombicas, formando uma quasipartícula neutra chamada éxciton (e^-h^+); cuja semelhança ao átomo de hidrogênio, também é referido

como um par hidrogenóide. Juntos, o elétron e o buraco apresentam movimento livre através do cristal e contribuem na condutividade elétrica e nas propriedades ópticas ou fotônicas dos materiais semicondutores. O tipo de éxciton de ocorrência comum nos elementos e compostos semicondutores é o éxciton de Wannier-Mott ou “livre”, Fig. 1.6 A, que se caracteriza por apresentar um raio largo e mover-se livremente através do cristal; diferente do éxciton de Frenkel ou 'estritamente' ligado, Fig. 1.6 B, que tem raio comparável à constante de rede da célula unitária e é considerado como o estado excitado do átomo ou molécula onde está localizado (cristais moleculares e de isolantes). O raio de Bohr do éxciton ou raio de Bohr de um semiconductor específico, a_B , expressa a distância mais provável entre o elétron e o buraco em um material semiconductor, Fig. 1.6 C, está relacionado ao raio de Bohr do átomo de hidrogênio, conforme Eq. 1.2 (GAPONENKO, 1998; KITTEL, 2005; PRASAD, 2004).

$$a_B = \varepsilon m_0 / \mu \times 0,53 \text{ \AA} \quad \text{Eq. 1.2}$$

$$\mu^{-1} = m_e^{*-1} + m_h^{*-1} \quad \text{Eq. 1.3}$$

Em que,

0,53 Å – raio de Bohr do átomo de hidrogênio
 ε – constante dielétrica estática do semiconductor
 μ – massa reduzida elétron-buraco
 m_0 – massa do elétron, em repouso
 m_e^* – massa efetiva do elétron
 m_h^* – massa efetiva do buraco

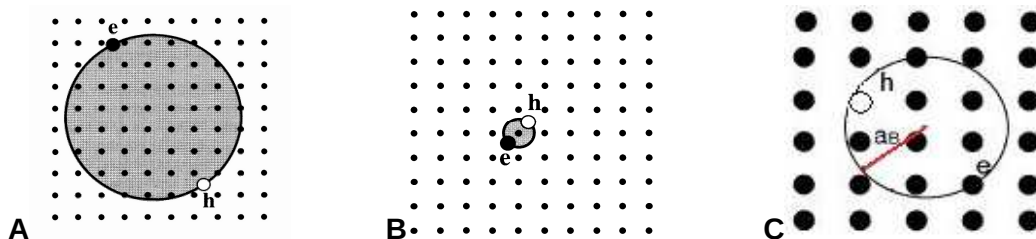


Fig. 1.6 Representação esquemática do éxciton do tipo (A) Wannier-Mott ou livre, geralmente apresentado pelos elementos e compostos semicondutores. O par (e^-h^+) está fracamente ligado, devido a grande separação entre o elétron e o buraco, e apresenta movimento livre por toda a extensão do cristal. Éxciton do tipo (B) Frenkel ou estritamente ligado, que ocorre em materiais isolantes e cristais de moléculas (ex. antraceno). O par (e^-h^+) apresenta raio pequeno, mobilidade reduzida e se movimenta através do cristal 'saltando' de um átomo a outro. (C) Raio de Bohr do éxciton (PRASAD, 2004).

O mecanismo de formação e recombinação excitônica do par (e^-h^+) entre os elementos e compostos semicondutores ocorre de forma diferente. Nos compostos semicondutores, ou semicondutores do tipo *gap*-direto, a transição eletrônica ocorre de forma direta, ou seja, através da absorção de fótons de energia superior a E_{gap} , que resulta num decaimento radiativo ou luminescente, com emissão de fótons de energia menor que a energia absorvida, Fig. 1.7 A. A perda de energia térmica, decorrente da relaxação vibracional, concorre com a emissão de fótons de comprimento de onda maior, denominado *Stokes shift*. Nos elementos semicondutores, além da absorção de energia superior a E_{gap} do semiconductor, a transição eletrônica é mediada pela criação de um fónon (vibração da rede cristalina), o que os denomina semicondutores do tipo *gap*-indireto, Fig. 1.7 B, cuja recombinação excitônica, nestes materiais, não resulta na emissão de luz (BLASSE, 1994; FOX, 2001; LAKOWICZ, 2006; PRASAD, 2004).

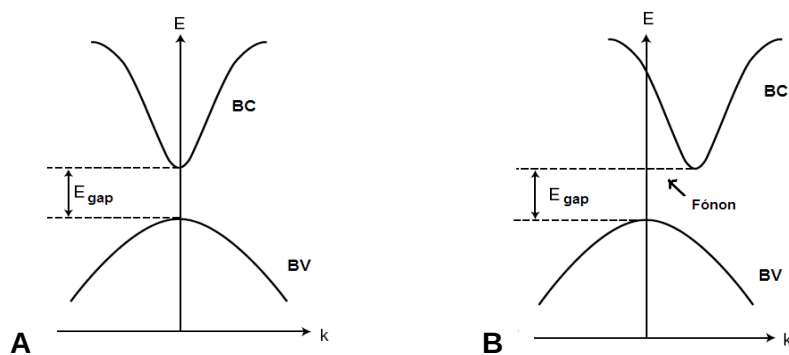


Fig. 1.7 Esquema da energia do elétron em um (A) composto semiconductor ou do tipo *gap*-direto, como GaAs e InP; e de um (B) elemento semiconductor ou do tipo *gap*-indireto, ex. Si, Ge e GaP), a partir do vetor de onda $k = 0$ (PRASAD, 2004).

Devido as suas propriedades, os compostos e elementos semicondutores são amplamente empregados como fotodetectores em circuitos eletrônicos sofisticados (LIMOUSIN, 2003; MORALES-ACEVEDO, 2009) e, recentemente, como marcadores moleculares em sistemas biológicos, quando em regime de tamanho reduzido (BAILEY; SMITH; NIE, 2004; SUTHERLAND, 2002), assim, serão citadas algumas característica apresentadas pelos nanocristais de semicondutores e sua aplicação como macadores biológicos fluorescentes.

1.2.1 Semicondutores de Tamanhos Reduzidos

A redução no tamanho, em uma ou mais dimensões dos cristais dos compostos semicondutores, ao tamanho equiparável ao do raio de Bohr do éxciton do cristal semiconductor macroscópico ou *bulk* resultam em mudanças na estrutura das bandas do semiconductor, Fig. 1.8. Os elétrons passam a ocupar níveis discretos de energia e adquirem energia cinética devido ao

movimento térmico na dimensão do confinamento. O confinamento dos elétrons em uma, duas ou três dimensões, resulta em materiais nanoestruturados, como os poços quânticos ou filmes quânticos (*quantum well* ou *quantum film* – 2D), que apresentam duas dimensões livres do confinamento; os fios quânticos (*quantum wires* – 1D); e os pontos quânticos (*quantum dots* – 0D), cujo confinamento ocorre nas três dimensões (FOX, 2001; KLABUNDE, 2001).

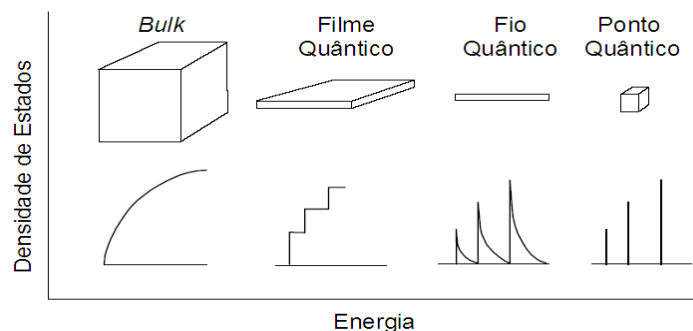


Fig. 1.8 Densidade de estados eletrônicos em cristais macroscópicos, e em regime de confinamento em uma (filme quântico), duas (fio quântico) e três dimensões (ponto quântico) (PRASAD, 2004).

O efeito do confinamento quântico faz com que as propriedades dos materiais nanoestruturados se tornem dependentes do tamanho do cristal, como redução do ponto de fusão e maior reatividade de superfície, quando comparados a seus respectivos cristais macroscópicos. Entretanto, as propriedades ópticas recebem destaque particular, pois a absorção e emissão de fótons requer maior energia. Segundo Al. L. Efros e A. L. Efros (1982) e E. I. Ekimov e A. A. Onushchenko (1982), os efeitos do tamanho variam de acordo com a diferença da razão entre a dimensão do nanocristal, R , e o raio de Borh do semiconductor, a_B ; onde são classificados em duas categorias: regime de confinamento forte ($R \ll a_B$) e regime de confinamento fraco ($R \gg a_B$), cuja dimensão do nanocristal é cerca de 2 a 4 vezes maior que a_B (GAPONENKO, 1998; PRASAD, 2004; ROGACH, 2008; YAMANE; ASAHARA, 2004).

A obtenção de materiais nanométricos em regime de confinamento nas três dimensões é realizada através de técnicas especiais, como métodos de crescimento epitaxial, métodos litográficos e métodos de crescimento espontâneo (POOLE Jr; OWENS, 2003), classificados como métodos *top-down* (como os métodos físicos) ou *bottom-up* (química coloidal). No método *top-down*, os precursores, em larga escala de tamanho, têm uma ou mais de suas dimensões gradualmente reduzidas pela incidência de um feixe de elétrons, átomos neutros, íons, laser ou radiação eletromagnética (luz visível, UV ou raios-X) na região da superfície da amostra desejada, seguida pelo tratamento químico da superfície. No método *bottom-up* os íons dos precursores e moléculas estabilizantes (ex. polímeros, surfactantes e moléculas orgânicas), dispersos em um meio líquido (orgânico ou aquoso), se agregam formando pequenos núcleos; cujo crescimento subsequente destes núcleos origina os nanocristais (SANTOS; FARIAS; FONTES, 2008; FOX,

2001). O modelo de La Mer descreve os estágios de nucleação e crescimento de nanocristais monodispersos obtidos pelo método de química coloidal, Fig. 1.9, o qual relata que o processo de crescimento secundário dos nanocristais através da dissolução de núcleos muito pequenos, denominado amadurecimento de Ostwald; e a saturação dos materiais precursores (MURRAY; KAGAN; BAWENDI, 2000).

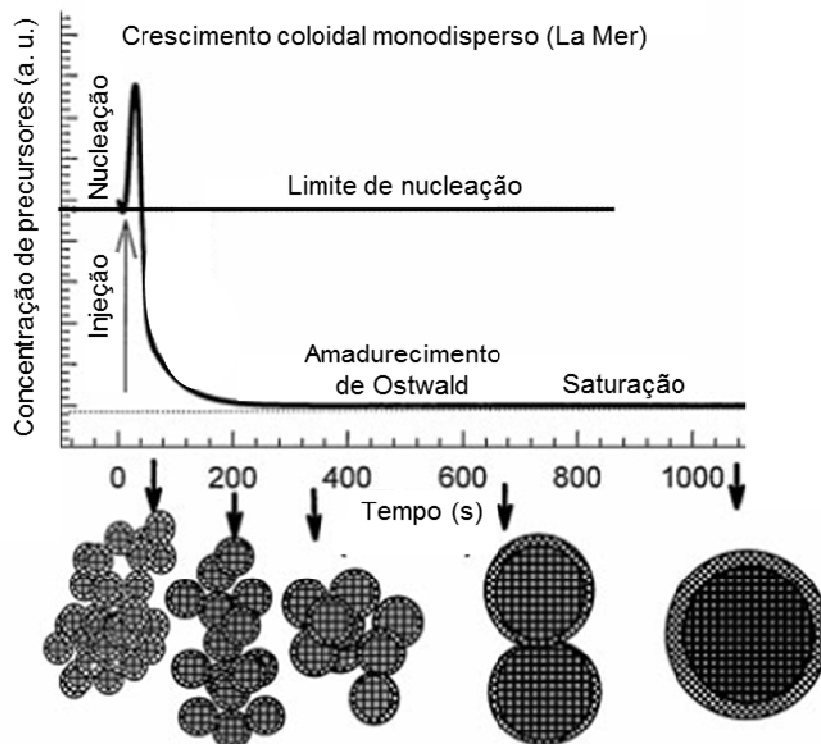


Fig. 1.9 Representação dos estágios de nucleação e crescimento de nanocristais monodispersos segundo o modelo de La Mer (MURRAY; KAGAN; BAWENDI, 2000).

Os nanocristais, preparados pelos métodos físicos ou de química coloidal, apresentam muitos defeitos em sua superfície devido a presença de ligações químicas parcialmente saturadas em decorrência da descontinuidade da extensão do cristal. No entanto, sua estabilização pode ser obtida pela adição de cargas à superfície dos nanocristais ou por meio de impedimento estérico, proporcionado pelo uso de alcanos funcionalizados, sílica ou polímeros. O equilíbrio entre as interações repulsivas (repulsão estérica e eletrostática) e atrativas (interações hidrofóbicas e de van der Waals) permite que os nanocristais permaneçam em suspensão e que as propriedades físico-químicas intrínsecas relacionadas ao tamanho sejam evidenciadas e tecnologicamente exploradas (SANTOS; FARIAS; FONTES, 2008; PRASAD, 2004).

Os agentes estabilizantes possibilitam ainda a ligação dos PQs às biomoléculas (SHAO *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2010), redução da toxicidade (TAN; ZANG, 2005; WOLCOTT *et al.*, 2006) e melhora as propriedades ópticas dos nanocristais, por participar da formação da camada de passivação (GAPONIK *et al.*, 2002; TALAPIN *et al.*, 2002), onde um semicondutor, com maior E_{gap} é 'crescido' na superfície dos nanocristais (ROGACH, 2008).

Em 1998, foi iniciada a aplicação de PQs de CdSe, solúveis em água e conjugados a biomoléculas, como marcadores biológicos fluorescentes, Fig. 1.10, pelos grupos liderados por A. Paul Alivisatos (BRUCHEZ *et al.*, 1998) e Shuming Nie (CHAN; NIE, 1998); transformando estas nanoestruturas em promissoras ferramentas nanodiagnósticas (AZZAZZY; MANSOUR; KAZMIERCZAK, 2006).

Atualmente, os PQs têm sido utilizados na obtenção de imagens por fluorescência, com elevada resolução e precisão, em tempo real, de compartimentos variados de células vivas individuais (MICHALET *et al.*, 2005); na localização de moléculas no interior de células e de receptores de membrana (LIDKE *et al.*, 2005); na marcação de organelas (CAI *et al.*, 2007); tecidos (CHEN *et al.*, 2009); como agente fotossensibilizador na terapia fotodinâmica (SAMIA; CHEN; BURDA, 2003); como marcador farmacocinético de agentes terapêuticos e como auxiliar em cirurgias ópticas (MATSUNO *et al.*, 2005); em microarranjos (ROUSSERIE *et al.*, 2010) e em hibridização fluorescente *in situ* (THOLOULI *et al.*, 2006), permitindo o estudo da organização espacial e temporal, distribuição intracelular de moléculas e o tráfico molecular dinâmico (MICHALET *et al.*, 2005; SUKHANOVA; NABIEV, 2008).

As propriedades ópticas, dependentes do tamanho e composição química, possibilitam a obtenção de PQs com espectro de emissão entre o ultravioleta e o infravermelho (SUKHANOVA; NABIEV, 2008); que, comparados às sondas fluorescentes orgânicas, comumente utilizadas como marcadores biológicos, apresentam como vantagens, menor toxicidade em sistemas vivos; maior resistência a fotodegradação e fotoclareamento, permitindo o uso em ensaios dinâmicos de detecção por períodos prolongados, Fig. 1.11; ampla região de absorção no espectro UV-visível, picos de emissão simétrico e estreito e amplo *Stokes shift*, favorecendo a separação óptica entre a luz emitida e a utilizada para excitação (RESH-GENGER *et al.*, 2008).

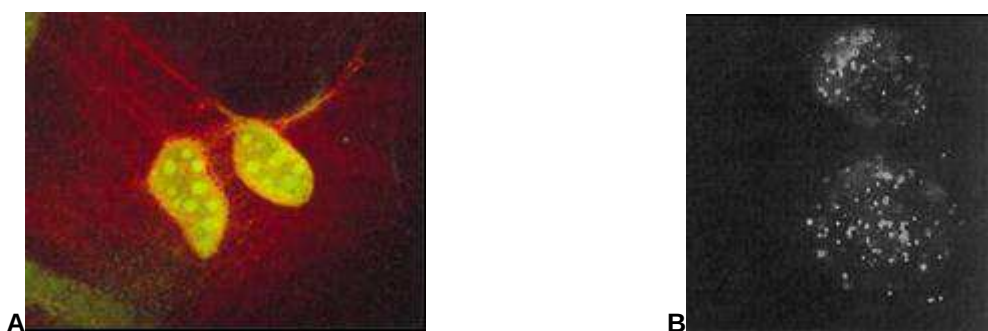


Fig. 1.10 Primeiras imagens obtidas para a marcação de células por pontos quânticos. (A) Fibroblastos 3T3 marcados por CdSe/CdS. (B) Células HeLa marcadas por CdSe/ZnS (BRUCHEZ *et al.*, 1998; CHAN; NIE, 1998).

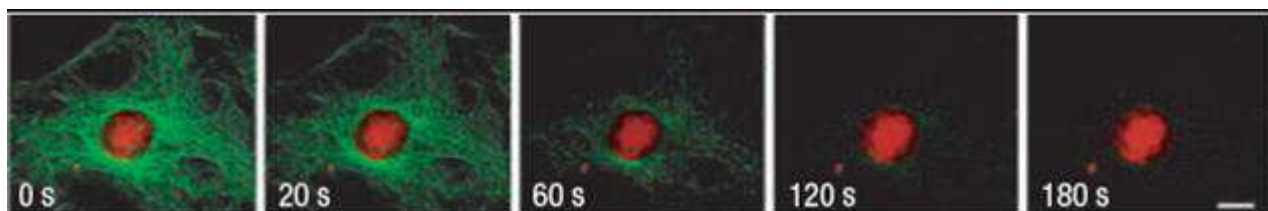


Fig. 1.11 Resistência ao fotoclareamento apresentado pelos pontos quânticos (em vermelho) comparado ao corante orgânico (verde) em dupla marcação de fibroblastos 3T3 (MEDINTZ *et al.*, 2005).

1.2.1.1 Pontos Quânticos de Telureto de Cádmio

O telureto de cádmio, CdTe, é um composto semicondutor do tipo *gap*-direto formado pelos elementos pertencente aos Grupos 12 (cádmio) e 16 (telúrio). O cristal *bulk* ou macroscópico, Fig. 1.12 A, tem aspecto cinza escuro e seus átomos podem se arranjar sob o sistema cristalino cúbico ou hexagonal, com E_{gap} de 1,51 eV e 1,54 eV, a 25°C, respectivamente, onde a rede cristalina do tipo blenda de zinco se apresenta como a fase termodinamicamente mais estável à temperatura ambiente (AL-DOURI, 2003; HOSSEINI, 2008).

A obtenção de PQs de CdTe com tamanhos variados, Fig. 1.12 B, é realizada por metodologias que empregam diferentes tempos de crescimento (PENG; PENG, 2001; XIAO *et al.*, 2010), proporção de precursores (ZHANG *et al.*, 2003) e moléculas estabilizantes (HE *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2009); que depende da aplicação: marcador biológico fluorescente (LIRA *et al.*, 2012; TALAPIN *et al.*, 2002) ou sensor (SARAN, 2011; WANG, 2010), por exemplo.



Fig. 1.12 (A) Aspecto do cristal macroscópico de CdTe. (B) Demonstração da relação entre o comprimento de onda de fluorescência e a variação no tamanho dos pontos quânticos, de 2-4 nm (CHEMISTRY RESOURCE, 2011; SILVA *et al.*, 2010).

Pontos quânticos de telureto de cádmio recobertos por sulfeto de cádmio, CdTe/CdS, são nanoestruturas do tipo núcleo-casca ou *core-shell*, onde telureto de cádmio compõe o núcleo e sulfeto de cádmio recobre a superfície; e que possui energia de *gap* maior que CdTe. Isso promove a passivação das ligações químicas não saturadas na superfície do nanocristal e permite que a luz emitida pelo núcleo seja transmitida sem qualquer absorção pela casca, melhorando a

eficiência da luminescência do nanocristal (PRASAD, 2004). Na Tab. 1.2 estão resumidas algumas propriedades físicas apresentadas por CdTe e CdS.

Tab. 1.2 Algumas propriedades físicas apresentadas pelos compostos semicondutores CdTe e CdS, a 25°C (BORISENKO; OSSICINI, 2004; ESCH *et al.*, 1990; GAPONENKO, 1998; POOLE Jr; OWENS, 2003).

Propriedade	CdTe	CdS
Rede cristalina	Blenda de zinco	Blenda de zinco
Parâmetro de rede (nm)	0,6477	0,582
Natureza da E_{gap}	direta	direta
E_{gap} fundamental (eV)	1,50	2,50
Índice de refração	2,75	2,5
Permissividade relativa (constante dielétrica estática)	10,9	-
Raio de Bohr do éxciton (nm)	7,3	2,8
Densidade (g/cm ³)	5,86	4,82
Peso molecular (g/mol)	240,0	144,47
Ponto de fusão (K)	1365	1750
Condutividade térmica (mW/cm.K)	59	200

A aplicação biológica dos PQs de CdTe como marcadores biológicos fluorescentes específicos abrange a conjugação destas nanoestruturas a moléculas biológicas, como proteínas ou anticorpos (LI *et al.*, 2005) que pode ser realizada através de ligação covalente entre o ponto quântico e a proteína mediada pelo uso de ligantes bifuncionais; por meio da atração eletrostática, mediada ou não pela coadsorção de íons; através da atração hidrofóbica; e pela silanização da superfície do ponto quântico ou agregação a matrizes poliméricas ou *beads* (CHAN *et al.*, 2002), como ilustrado na Fig. 1.13.

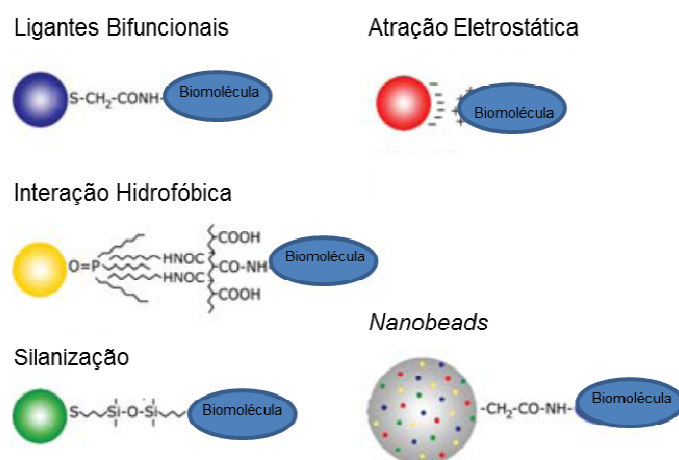


Fig. 1.13 Alguns tipos de interação entre PQs e biomoléculas para aplicação biológica (CHAN *et al.*, 2002).

Em virtude dos PQs de CdTe terem sido utilizados como marcador biológico fluorescente em protocolos de marcação histoquímica das lesões mais comuns da mama, serão realizadas algumas considerações sobre as características da mama e dos dois principais tipos de lesões que acometem este órgão: o fibroadenoma e o carcinoma ductal invasivo.

1.3 Aspectos Histológicos da Mama

Histologicamente, a mama corresponde a um órgão constituído por tecido epitelial glandular e tecido de sustentação (tecidos conjuntivo e adiposo). No tecido epitelial glandular as células constituintes são especializadas na atividade de secreção, sendo responsável pela secreção de proteínas, lipídios e complexos de carboidratos e proteínas que compõem o leite materno. Neste tipo de tecido epitelial, as glândulas são exócrinas, pois transportam e eliminam as secreções à superfície do corpo através de ductos tubulares. A porção secretora é constituída por células que apresentam forma esférica e arredondada, classificando-a como uma glândula composta túbulo-acinosa do tipo apócrina, pois o produto de secreção é descarregado junto com porções do citoplasma apical da célula; e justapostas às células secretoras, encontram-se as células mioepiteliais, que são capazes de contração, Fig. 1.14 (GUINEBRETIERE *et al.*, 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Cada glândula mamária, também chamada de lóbulo, está presente num número de 15 a 25 glândulas em cada mama. Os lóbulos são separados por tecido conjuntivo denso e muito tecido adiposo, denominados estroma, dispostos imediatamente abaixo da lâmina basal do tecido epitelial. No tecido conjuntivo denso estão presentes vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e abundante matriz extracelular na qual estão presentes as proteínas fibrosas (colágeno e elastina) e um complexo viscoso de macromoléculas (glicosaminoglicanos e proteoglicanos) e glicoproteínas multiadesivas (laminina e fibronectina, entre outras) que promovem nutrição e sustentação (GUINEBRETIERE *et al.*, 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

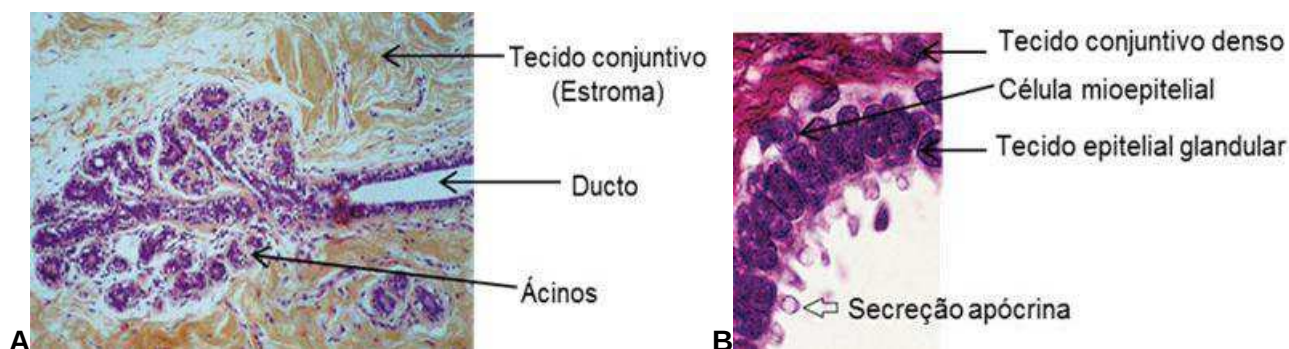


Fig. 1.14 (A) Glândula mamária, demonstrando a porção secretora (ácinos) e os ductos. Mag. 50X. (B) Corte da porção secretora de uma glândula mamária. Média magnificação (GUINEBRETIERE *et al.*, 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

As variações na estrutura histológica destas glândulas estão relacionadas ao sexo, idade e estado fisiológico. Após a puberdade, no sexo feminino, há desenvolvimento dos seios galactóforos e suas ramificações (ductos galactóforos), que resultam no aumento do tamanho, devido ao acúmulo de tecido de sustentação e a proliferação dos ductos galactóforos. Associado a isto, as variações mensais cíclicas, em decorrência da diferente expressão de receptores hormonais e apoptose, levam a proliferação de células epiteliais (na fase estrogênica) e ao aumento do estroma, ocasionado por maior hidratação, formação de vasos e infiltração de linfócitos (na fase progestacional). Durante a gravidez e lactação, os lóbulos aumentam significativamente, decorrentes do desenvolvimento numeroso de ácidos com lúmen dilatado para a produção de leite, Fig. 1.15. Na menopausa há atrofiamento das glândulas e redução de tecido conjuntivo, que é substituído por tecido adiposo. No sexo masculino, normalmente não há desenvolvimento completo destas glândulas (GUINEBRETIERE *et al.*, 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

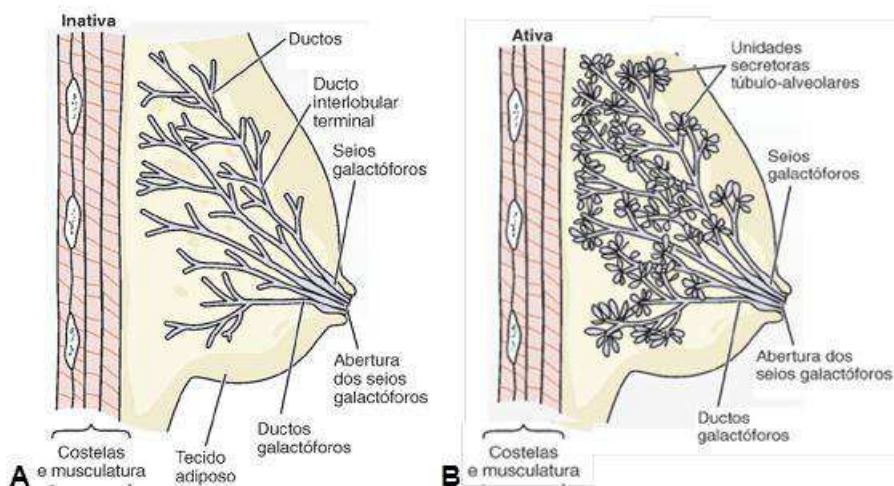


Fig. 1.15 (A) Esquema da mama feminina mostrando as glândulas mamárias inativas e (B) o desenvolvimento de ácidos nas glândulas mamárias ativas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Alterações histológicas, decorrentes da proliferação excessiva das células da mama, podem ocasionar o surgimento de lesões. Dentre estas lesões, a grande maioria é classificada como doença benigna da mama; e geralmente envolve aumento na quantidade de tecido fibroso (fibrose), aumento do tamanho das glândulas (adenose), presença de cisto (massa nodular <1 cm) e/ou aumento no número de células epiteliais nos ductos (hiperplasia), onde o fibroadenoma configura o tipo de lesão benigna mais comum da mama (GUINEBRETIERE *et al.*, 2005; GURAI; SAHIN, 2006).

O fibroadenoma é um tumor do tipo hormônio-dependente e se apresenta como uma massa apalpável na mama, com diâmetro <3 cm, móbil, firme e não tendinoso, que acomete

mulheres entre os 15 e 35 anos de idade. Numa variação deste tipo de lesão, fibroadenoma gigante ou juvenil, o crescimento rápido e massivo resulta em tumor de dimensão superior a 10 cm de diâmetro, acometendo principalmente jovens e adolescentes, entre 10 e 20 anos de idade. A frequência de ocorrência é geralmente de forma unilateral, entretanto, lesões múltiplas ou de forma bilateral é observada em torno de 20% dos casos (BISWAS *et al.*, 2012; GURAI; SAHIN, 2006).

Histologicamente o fibroadenoma se caracteriza pela proliferação de tecido glandular e estromal. O aumento do estroma em torno das glândulas pode resultar num perfil de crescimento pericanalicular ou intracanalicular, no qual os ductos sofrem compressão, Fig. 1.16. A associação deste tipo de lesão a outras mudanças proliferativas, como adenose esclerosante, adenose e hiperplasia dos ductos epiteliais, pode ocorrer em 50% dos casos, caracterizando um fibroadenoma complexo. O risco associado ao posterior desenvolvimento de lesões malignas deve ser considerado, principalmente se houver registros de casos de câncer de mama na família (CHINTAMANI *et al.*, 2009; GURAI; SAHIN, 2006; KUIJPER *et al.*, 2001).

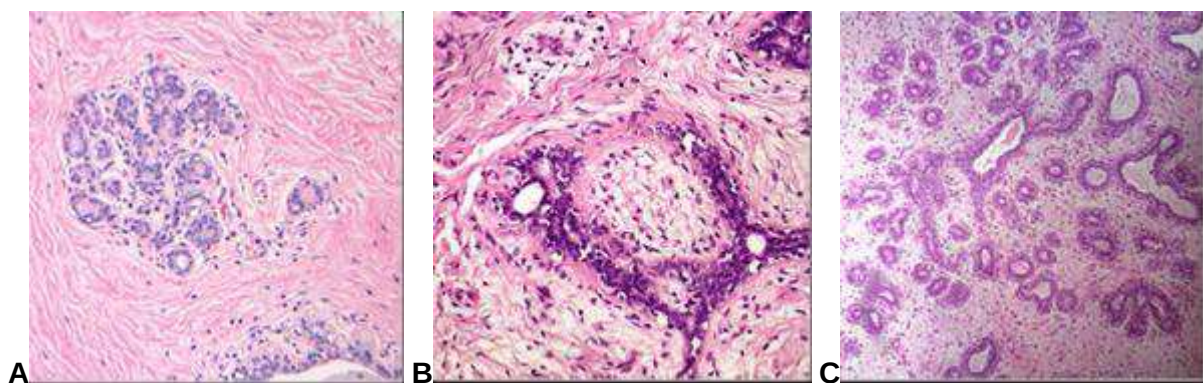


Fig. 1.16 (A) Mama normal: lóbulo ou glândula mamária apresentando dupla camada formada por células epiteliais e mioepiteliais. Mama apresentando fibroadenoma com (B) perfil intracanalicular, onde os ductos são comprimidos e (C) perfil pericanalicular, onde não há compressão dos ductos pela porção estromal. Média e pequena magnificação (SINGH, 2012).

As lesões malignas correspondem a doenças complexas nas quais há associação de características clínicas, biológicas e histológicas distintas. As lesões são caracterizadas pela morfologia: distribuição tubular/acinar e proliferação celular alterada, classificadas em cerca de dezoito tipos histológicos (WEIGELT *et al.*, 2010); e de acordo com o perfil de expressão gênico, agrupadas em cinco subtipos moleculares e outros três subtipos adicionais, que têm por base a expressão de receptores hormonais: positivo ou negativo, e/ou origem das células epiteliais: mioepitelial/basal ou glandular/luminal (COLOMBO *et al.*, 2011; KWEI *et al.*, 2010; RAKHA *et al.*, 2007). A Tab. 1.3 correlaciona os tipos de classificação.

Tab. 1.3 Correlação entre as lesões malignas da mama classificadas de acordo com o tipo histológico e o perfil molecular (COLOMBO *et al.*, 2011; KWEI *et al.*, 2010; WEIGELT *et al.*, 2010).

Subtipos Moleculares	Características	Tipos Histológicos
Expressão Positiva de Receptores Hormonais		
- Luminal A	RE +, RP +/-, HER2 -	Carcinoma ductal invasivo Carcinoma lobular invasivo Carcinoma neuroendócrino Carcinoma mucinoso Carcinoma tubular
- Luminal B	RE +, RP +/-, HER2 +	Carcinoma micropapilar invasivo Carcinoma apócrino
Expressão Negativa de Receptores Hormonais		
- Semelhante ao Basal	RE -, RP -, HER2 -, cq 5/6 +, EGFR +	Carcinoma adenoide cístico Carcinoma medular Carcinoma metaplástico Carcinoma de células acínicas Carcinoma secretório
- Superexpressão de HER2	RE -, RP -, HER2 +, cq 5/6 +/-, EGFR +/-	Carcinoma lobular invasivo Carcinoma micropapilar invasivo Carcinoma apócrino
- Semelhante à mama normal	RE -/+, RP ?, HER2 -, EGFR +	Carcinoma medular Carcinoma metaplástico
Subtipos Adicionais		
- Apócrino molecular	RE -, RP -, HER2 +/-, cq 5/6 +/-, EGFR +/-	Carcinoma apócrino
- Baixa expressão de proteínas "claudin"	RE -, RP -, HER2 -, cq 5/6 +/-, EGFR +/-	Carcinoma metaplástico
- Relacionado à interferon	RE -/+, RP ?, HER2 -	Carcinoma medular
De Tipos Moleculares Não Determinados		
- ND	ND	Carcinoma cribiforme invasivo Carcinoma papilar invasivo Carcinoma sebáceo Carcinoma de células límpidas rica em glicogênio Carcinoma oncocítico Carcinoma rico em lipídios

RE: receptor para estrógeno; RP: receptor para progesterona; HER2: receptor-2 do fator de crescimento epidérmico humano; EGFR: receptor do fator de crescimento epidérmico; -: negativo; +: positivo; ?: desconhecido; +/-: ocasionalmente positivo; -/+: raramente positivo; ND: não determinado; cq 5/6: citoqueratinas 5 e 6.

Cerca de 95% das lesões malignas da mama são resultantes da proliferação de células pertencentes ao tecido glandular, sendo classificadas como carcinomas. Entretanto o carcinoma ductal invasivo é o mais frequente, correspondendo a mais de 75% dos casos. Histologicamente, as glândulas apresentam forma e tamanhos variados, com arranjo desordenado e ausência de camada mioepitelial verdadeira. As margens são irregulares e apresentam infiltração variável de tecido adiposo adjacente, Fig. 1.17 (GUINEBRETIERE *et al.*, 2005; SINGH, 2012; WEIGELT *et al.*, 2010).

No Brasil são estimados mais de 52.000 novos casos de câncer de mama para o ano de 2012 e também de 2013 (INCA, 2012). Os fatores de risco estão intrinsecamente relacionados à i) vida reprodutiva da mulher: menarca precoce, nuliparidade, primeira gestação acima dos 30 anos, uso de anticoncepcionais orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal; ii) aos fatores genéticos, incluindo a prévia ocorrência de certos tipos de tumores benignos da mama; e iii) aos fatores comportamentais, como consumo de bebida alcoólica, sedentarismo, hábito de fumar, aspectos nutricionais (consumo de carne vermelha e alimentação rica em triglicerídeos) e estresse psicológico (ANTONOVA; ARONSON; MUELLER, 2011).

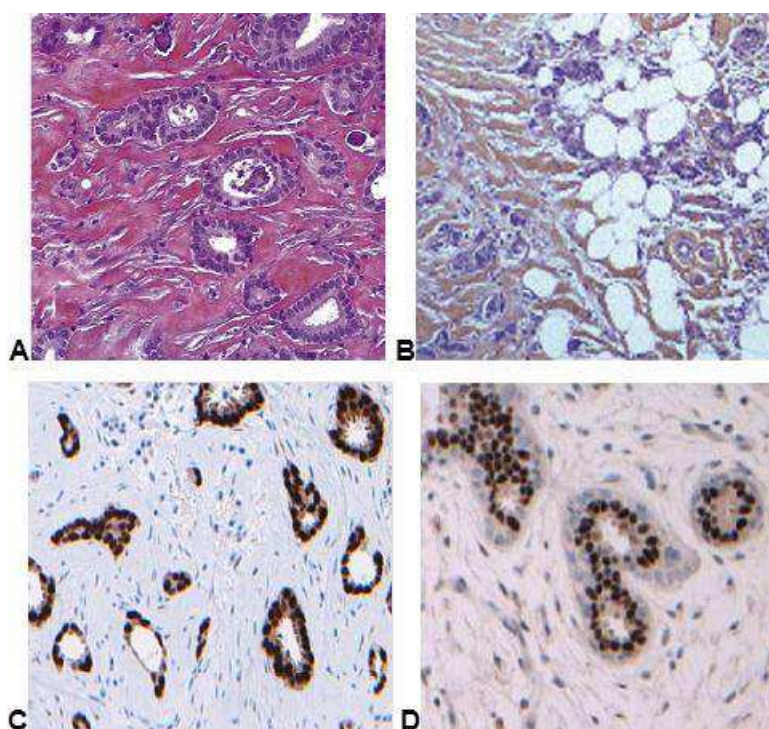


Fig. 1.17 Aspectos histológicos do carcinoma ductal invasivo, demonstrando (A) a desorganização no arranjo glandular e (B) a invasão de tecido adiposo adjacente, em meio à porção secretora glandular. Magnificação 200x. Nas imagens de marcação histoquímica para receptores de estrogênio, observa-se a ausência da camada de células mioepiteliais no tumor maligno (C) quando comparado ao tecido normal (D), que apresenta localização justaposta ao epitélio glandular, corado em marrom. Magnificação média (GUINEBRETIERE *et al.*, 2005; SINGH, 2012).

A transformação de células normais em células neoplásicas, ou seja, células com caráter proliferativo fora do controle das restrições do ciclo celular; compreende a um evento complexo, onde estão envolvidas mudanças genéticas e fenotípicas. As alterações genéticas promovem a superexpressão de sinais de crescimento e as tornam indiferentes aos efeitos inibitórios dos produtos de supressão gênica tumoral, enquanto que as mudanças fenotípicas, especialmente aquelas relacionadas aos carboidratos da superfície celular, são responsáveis por promoverem mecanismos de escape à vigilância imunológica e habilidade de invadirem outros contornos teciduais (ALBERTS *et al.*, 2002; GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011).

A glicosilação de lipídios e proteínas compreende a uma das mais importantes modificações moleculares nos sistemas biológicos. Enzimas das subclasses das glicosidases e glicosiltransferases são as responsáveis pela síntese destes glicoconjugados, que atuam no reconhecimento e adesão intercelular, migração celular durante o desenvolvimento, tipagem sanguínea e resposta imunológica, entre outros. A estrutura dos resíduos glicosídicos, nos glicoconjugados, é diversa e se deve i) as possibilidade de configuração do carbono anomérico (α/β); ii) diferentes posições dos átomos de carbono participantes da ligação (1→1, 2, 3, 4, 6, para hexopiranoses); iii) número de membros no anel (piranose/furanose) e iv) ramificações e substituições sítio-específicas (acetilação, fosforilação ou sulfatação) (GABIUS *et al.*, 2011; NELSON; COX, 2004; ROSENFELD *et al.*, 2007).

O perfil de expressão glicosídica na superfície das células varia de acordo com o tipo, o estágio de desenvolvimento e diferenciação ou maturação celular e é comumente observada em muitos estados patológicos, facilitando a discriminação entre lesões benignas e câncer. A alteração fenotípica de carboidratos, na superfície celular, pode ser avaliada pelo uso de lectinas, que são moléculas pertencentes a uma superfamília de glico(proteínas) com a capacidade de ligar a carboidratos de forma tão específica quanto a interação entre antígeno-anticorpo ou enzima-substrato (GABIUS *et al.*, 2011). Nestas moléculas, o domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC) é o responsável por esta característica, sendo capaz de distinguir entre os isômeros anoméricos (α/β) dos resíduos glicosil, na porção final não reduzida dos oligossacarídeos (CAZET *et al.*, 2010; GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011; LIMA *et al.*, 2010; SHEKHAR *et al.*, 2004).

Como a lectina concanavalina A foi utilizada nos protocolos de marcação histoquímica das lesões da mama e o anticorpo monoclonal antigalectina-3 foi utilizado para observação da presença da lectina galectina-3 nas secções histológicas da mama serão realizadas algumas considerações sobre estas lectinas.

1.4 Considerações Sobre as Lectinas e Seu Uso no Estudo do Câncer

As lectinas são membros de uma superfamília de glico(proteínas) que apresentam a capacidade de reconhecer especificamente carboidratos e mediar uma variedade de processos biológicos. A origem deste termo vem do Latin, *lectus* (forma no passado de *legere*) que significa 'escolher' ou 'selecionar'; denominada por William C. Boyd e E. Shapleigh, em 1954 (GABIUS *et al.*, 2011; JIANG; MA; RAMACHANDRAN, 2010).

Os primeiros registros históricos são relacionados à característica aglutinante apresentada por estas proteínas e datam de 1860 e 1888, por S. Weir Mitchell e Peter Hermann Stillmark, para o veneno da cobra *Crotalus durissus* e para o extrato da semente de *Ricinus communis* (rícin), respectivamente. Em 1936, James B. Sumner e Stacey F. Howell sugerem que a atividade aglutinante apresentada pelas lectinas ocorra em decorrência de sua ligação à glicoproteínas; sendo comprovado por Walter J. T. Morgan e Winifred M. Watkins, na década de 1950, que a ligação das lectinas aos carboidratos ocorre de forma específica (GABIUS, 2002; SHARON, 2007; SHARON; LIS, 2004; SUMNER; HOWELL, 1936).

Amplamente encontradas na natureza (vírus, bactérias, fungos, protozoários, vegetais e animais), as lectinas desempenham funções biológicas variadas associadas ao reconhecimento molecular em processos como infecções (virais, bacterianas e parasíticas), fertilização, regulação do crescimento celular, apoptose, adesão celular, quimiotaxia e produção de citocinas. E, devido a diversidade apresentada pelos seus membros, as lectinas são classificadas de acordo com a semelhança de seus domínios globulares de reconhecimento de carboidratos, conforme a Tab. 1.4 (KHAN; KHAN, 2011; LORIS, 2002; LORIS *et al.*, 1998; RABINOVICH; RUBINSTEIN; TOSCANO, 2002; VENKATARAMAN, 1997; WEISS; DRICKAMER, 1996).

A especificidade de ligação a carboidratos conferida aos membros desta superfamília de glico(proteínas), permite que sejam empregadas em diversos usos biotecnológicos, como a purificação e caracterização de carboidratos complexos e glicoproteínas (WU *et al.*, 2009), ensaios diagnósticos (OLIVEIRA; CORREIA; DINIZ, 2009), marcações histoquímicas (LIMA *et al.*, 2010) e na fabricação de sensores de glicose (LABIB *et al.*, 2010). A seguir serão citadas algumas observações sobre a concanavalina A e a galectina-3.

Tab. 1.4 Classificação das lectinas (ANGATA; BRINKMAN-Van der LINDEN, 2002; DAHMS; HANCOCK, 2002; KAWABATA; TSUDA, 2002; LIU; PATTERSON; WANG, 2002; LU *et al.*, 2002; RABINOVICH; RUBINSTEIN; TOSCANO, 2002; WEISS; DRICKAMER, 1996).

Família de Lectinas	Lectinas
Lectinas vegetais	
Lectinas de leguminosas	Concanavalina A (Con A) Lectina de ervilha Lectina de <i>Lathyrus ochus</i> (LOL I e LOL II) Lectina 4 <i>Griffonia simpliciflora</i> (GS4) Lectina de <i>Erythrina corallodendron</i> (EcoL)
Lectinas de cereais	Aglutinina de soja (SBA) Aglutinina do gérmen de trigo (WGA)
Toxinas vegetais	Rícino
Lectinas de bulbo	Lectina de gota de neve (GNA)
Lectinas animais	
Lectinas do Tipo S ou Galectinas	Galectina-1 a -15 (Gal-1 a -15)
Lectinas do Tipo C (dependentes de cálcio)	Proteína A ligante a manose (MBP-A) Mutante de MBP-A ligante a galactose Proteína C ligante a manose (MBP-C) Colectinas: lectina ligante a manana (MBL), proteína surfactante A e D (SP-A e -D), congulinina e colectina-43 (CL-43) Ficolinas (Ficolina-H, -L, -M)
Lectinas do Tipo I (reconhecem o ácido siálico, outros carboidratos e glicosaminoglicanos sulfatados)	Sialoadesinas-1 a -11 (Singlecs-1 a -11) Outros carboidratos: hemolina, CD2 e CD83 Glicosaminoglicanos sulfatados: receptor do fator de crescimento fiblobástico-1 a -4 (FGFR-1 a -4)
Lectinas do Tipo P (receptores de manose-6-fosfato)	Receptor de manose-6-fosfato dependente de cálcio (CD-MPR) Receptor de manose-6-fosfato/ fator de crescimento II semelhante a insulina (IGF-II/MPR)
Pentraxinas	Componente P sérico amiloidal (SAP)
Taquilectinas	Taquilectina-1 a -5 (TL-1 a -4, -5A e -5B)
Lectinas bacterianas	
Toxinas	Enterotoxina termolábil (TL) Toxina colérica (CT) Toxina pertussis (PT)
Lectinas virais	
Vírus Influenza	Hemaglutinina–Leu ²²⁶ (sítio 1) (HA) Hemaglutinina–Gln ²²⁶ (sítio 1) (HA) Hemaglutinina (sítio 2) (HA)
Polioma vírus	Proteína viral 1 (VP1)

1.4.1 Generalidades Sobre a Concanavalina A

A lectina concanavalina A (Con A) é extraída dos grãos da leguminosa *Canavalia ensiformis* e foi a primeira lectina a ter sua estrutura cristalina determinada por cristalografia de raios-X, a uma resolução de 2,0 e 2,4 Å, em 1972, por Gerald M. Edelman e colaboradores, e por Karl D. Hardman e Clinton F. Ainsworth. O estudo de sua interação específica a carboidratos foi detalhadamente realizado por Z. Derewenda e colaboradores, em 1989, por difração de raios-X, a uma resolução de 2,9 Å, da lectina complexada a metil- α -D-manopiranosil (DEREWENDA *et al.*, 1989; EDELMAN *et al.*, 1972; HARDMAN; AINSWORTH, 1972; LORIS, 2002).

Concanavalina A é uma proteína que apresenta mudança na conformação de sua estrutura quaternária, em solução aquosa, com variação do pH (ZAND; AGRAWAL; GOLDSTEIN, 1971), temperatura (HUET *et al.*, 1974) e força iônica da solução (McKENZIE; SAWYER; NICHOL, 1972). A variação do pH favorece ou não a agregação de seus dímeros em tetrâmeros. A subunidade monomérica, ou seja, a estrutura terciária, é constituída por 237 resíduos de aminoácidos, de massa molecular, MM, equivalente a 26,5 KDa; cuja agregação de dois monômeros, forma um dímero de MM ~53 KDa (pH < 5,6), conhecido como dímero canônico. A mudança do pH a valores superiores a 7,0, resulta na agregação de dois dímeros em um tetrâmero (MM = 104 KDa; pH > 7,0), chamado de dímero de dímeros (MANDAL; BREWER, 1993; NAEEM; KHAN; KHAN, 2005; OLSON; LIENER, 1967).

O enovelamento dos monômeros de Con A é semelhante a um sanduíche de duas folhas- β antiparalelas, superiormente cobertas por uma terceira folha- β : uma folha dorsal com seis fitas, uma folha frontal com sete fitas e uma folha superior com cinco fitas, Fig. 1.18, estabilizadas por dois cátions divalentes: o íon cálcio (Ca^{2+}) e o íon de um metal de transição (Mn^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} e Co^{2+}), ligados à proteína através das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos, Fig. 1.19 (CHATTERJEE; MANDAL, 2003; DEREWENDA *et al.*, 1989). O íon Ca^{2+} é responsável pela coordenação e fixação das cadeias laterais dos aminoácidos que interagem com o açúcar (1ª camada de coordenação) e das posições dos elementos estruturais dos aminoácidos que estão em contato com estes (2ª camada), estabilizando a arquitetura geral do sítio de ligação. O íon Mn^{2+} não coordena nenhuma interação direta com a proteína, entretanto sua função é fixar a posição do íon cálcio (MANDAL; BREWER, 1993; WEISS; DRICKAMER, 1996).

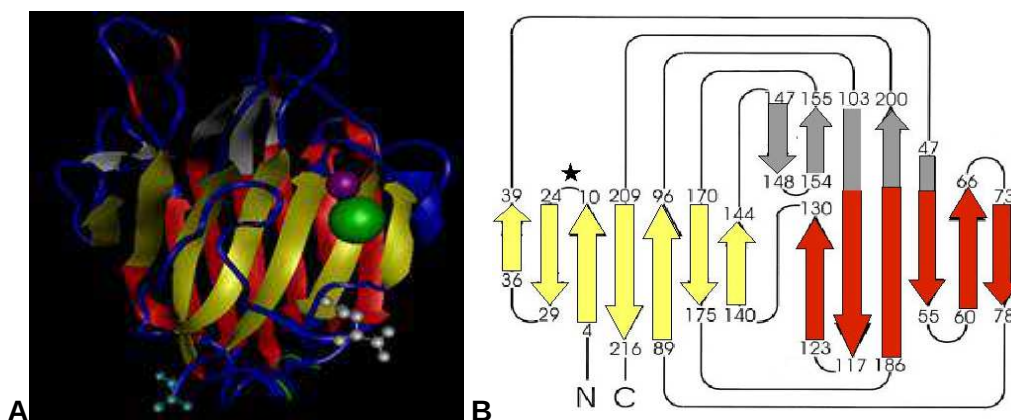


Fig. 1.18 Representação do monômero da lectina leguminosa concanavalina A. (A) Diagrama em fitas de Con A. Os íons cálcio (roxo) e manganês (verde) estão indicados. A folha dorsal com 6 fitas, em vermelho, a folha frontal com 7 fitas, em amarelo e a folha superior com 5 fitas, em cinza. O primeiro e o último resíduo de aminoácido estão destacadas em ciano e cinza. (B) Diagrama topológico do enovelamento do monômero representado em (A). A estrela indica a posição onde os cátions divalentes interagem com o monômero. *Protein Data Banking: 2CNA (HUMPHEY; DALKE; SCHULTEN, 1996; LORIS et al., 1998).*

A dimerização na Con A envolve o alinhamento antiparalelo, do tipo *side-by-side* (lado a lado), de duas folhas- β dorsais com seis fitas, realizado através de interações não covalentes (ligações de hidrogênio, ligações iônicas e interações hidrofóbicas), gerando a formação de uma folha- β contínua com 12 fitas, conhecido como dímero canônico. Esta interação intermonomérica é tão intensa que o dímero 'comporta-se' como se fosse uma única molécula; na qual $\sim 1000 \text{ \AA}^2$ de área por subunidade se tornam ocultos. Na tetramerização, dois dímeros *side-by-side*, perpendicularmente inclinados (82°), se associam na forma *back to back* (dorso com dorso), ilustrado na Fig. 1.20 (CHATTERJEE; MANDAL, 2003; SRINIVAS *et al.*, 2001).

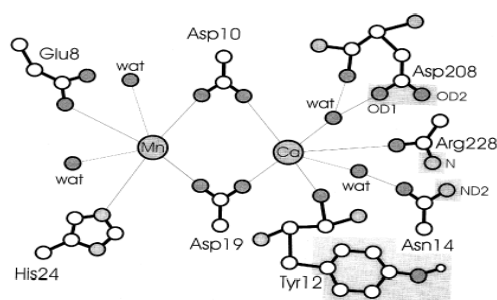


Fig. 1.19 Representação esquemática do sítio de ligação dos íons metálicos às cadeias laterais dos aminoácidos presentes no monômero de Con A. Os átomos de carbono estão representados em branco, nitrogênio em cinza claro, oxigênio em cinza escuro e água como *wat*. Os grupos funcionais essenciais à ligação ao açúcar estão destacados em caixa cinza. **Obs:** apenas os átomos das cadeias laterais estão representados. As cadeias laterais dos resíduos de glutamato (Glu8), aspartato (Asp10 e Asp19) e histidina (His24) são a região de ligação para o metal de transição, e aspartato (Asp10 e Asp19), tirosina (Tyr12) e arginina (Arg228), para o íon cálcio (LORIS *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 1975).

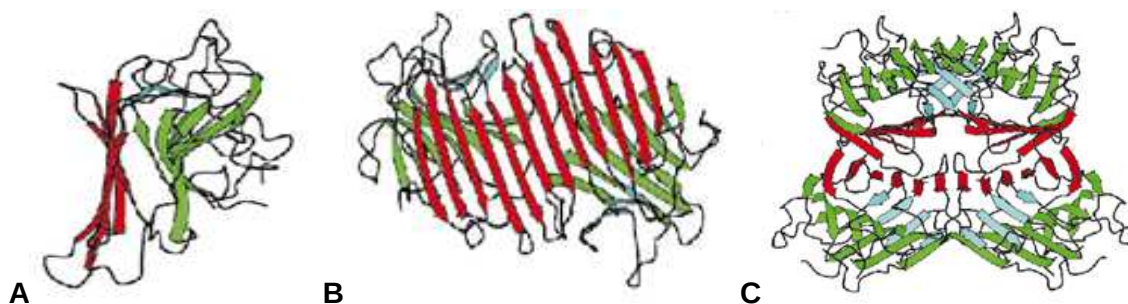


Fig. 1.20 Representação estrutural da Con A: monômero (A), estrutura quaternária dimérica (pH < 5,6), representada pelo alinhamento antiparalelo *side-by-side*, das duas folhas- β dorsais, formando uma folha- β contínua com 12 fitas, coloridas em vermelho (B) e (C) tetramerização da estrutura quaternária (pH > 7,0), resultante da agregação *back to back* de dois dímeros *side-by-side*, perpendicularmente inclinados num ângulo de 82° (SRINIVAS *et al.*, 2001).

A atividade biológica desempenhada por Con A está relacionada a sua capacidade em reconhecer especificamente resíduos de α -D-manopiranosil e α -D-glicopiranosil. A ligação ao sacarídeo, na conformação cadeira, ocorre através de ligações de hidrogênio entre quase todas as suas hidroxilas (aceptoras e doadoras) e o domínio de reconhecimento de carboidratos da lectina. Dentre as sete ligações de hidrogênio presentes, quatro são realizadas entre os α -aminos da leucina, arginina e tirosina (Leu99, Arg228 e Tyr100) e três entre os radicais laterais de aspartato e asparagina (Asp208 e Asn14), ligados ao íon cálcio; além de interações de van der Waals entre os resíduos aromáticos de tirosina (Tyr12 e Tyr100) e os carbonos glicosídicos C-5 e C-6, Fig. 1.21 e Tab. 1.5 (DEREWENDA *et al.*, 1989; LORIS *et al.*, 1998).

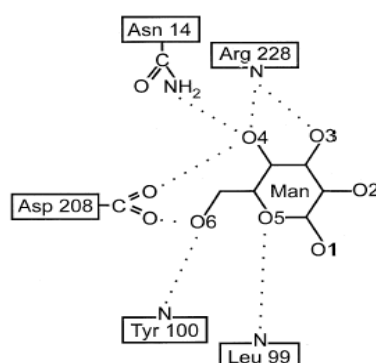


Fig. 1.21 Diagrama esquemático da rede de ligações de hidrogênio entre os átomos de oxigênio da manose (ou glicose) e os hidrogênios doadores e aceptores do domínio de reconhecimento de carboidratos de Con A: OH-6 está ligada ao OD1 (oxigênio doador) de Asp208 e o O-6 está interagindo com a NH- de Tyr100, por interações de van der Waals; O-3 está interagindo com NH- de Arg228; O-5 está interagindo com o NH- de Leu99; OH-4 está ligada ao OD2 de Asp208 e O-4 interagindo com NH- da amida de Asn14; OH-2 faz ligação de hidrogênio com uma molécula de água, ligada a um tetrâmero adjacente e O-1 não realiza nenhuma ligação de hidrogênio (DEREWENDA *et al.*, 1989; GABIUS *et al.*, 2011; LORIS *et al.*, 1998).

Tab.1.5 Relação das ligações de hidrogênio entre o domínio ligante a carboidrato no monômero de concanavalina A e as hidroxilas glicosídicas (DEREWENDA *et al.*, 1989).

Ligações de hidrogênio			
Doador (D)	Aceptor (A)	Distância D - A (Å)	Comentários
O-4	Asp208 OD2	2,84	Ligação de H Ca^{2+} - Arg OD2 liga ao Ca^{2+}
O-6	Asp208 OD1	2,72	
Arg228 NH	O-3	3,15	
Asn14 ND2	O-4	3,24	
Leu99 NH	O-5	3,02	
Tyr100 NH	O-6	3,25	
O-2	água (externa)	3,13	Ligação de H à Ser168 e Thr226 ou Asp71 do tetrâmero adjacente

Asp – aspartato; Arg – arginina; Asn – asparagina; Leu – leucina; Ser - serina; Thr – treonina.

A conformação da estrutura quaternária da Con A também exerce influência sobre sua atividade biológica. Na conformação tetramérica (pH 7,2) a constante de associação, K_a (M^{-1}), à oligomanoses semelhantes a glicopeptídios, é cerca de quatro a dez vezes maior quando comparada a sua forma dimérica (pH 5,2) e a seus derivados diméricos irreversíveis, succinil- e acetil-Con A (pH 7,2) (GUNTHER *et al.*, 1973). Maior capacidade hemaglutinante, indução do capeamento por receptores glicoprotéicos e inibição do capeamento dos receptores de imunoglobulinas, em linfócitos, também são atividades melhor observadas para a conformação tetramérica (MANDAL; BREWER, 1993). Estudos recentes sobre o câncer têm empregado esta lectina em marcações histoquímicas de variados tipos teciduais e como agente indutor da apoptose (morte celular programada do tipo I) em diversas linhagens celulares (LI *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2009; VETRI *et al.*, 2010).

Os resultados de marcações histoquímicas que utilizam Con A em seus estudos demonstram um perfil de marcação glicosídica diferencial entre tecidos neoplásicos e normais. A marcação de tecidos da mucosa gástrica não infectada por *Helicobacter pilory* demonstrou que Con A, conjugada ao corante fluorescente isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou a enzima peroxidase, apresentou um intenso perfil de marcação; enquanto que foi observada apenas uma fraca marcação por Con A-FITC na mucosa infectada, sugerindo que a bactéria tenha impedido a ligação da lectina ao tecido. A marcação de tecidos de próstata normal demonstra a afinidade de ligação de Con A ao estroma glandular e fraca marcação das células epiteliais. Na hiperplasia benigna, as glândulas são moderadamente marcadas. Entretanto nenhuma marcação foi observada em tecidos de cólon em estado normal ou inflamatório (colite ulcerativa), sugerindo que os glicoconjugados específicos para a Con A foram ausentes ou não acessíveis à lectina (LIMA *et al.*, 2010; MELO-Jr *et al.*, 2004; MELO-Jr *et al.*, 2008).

1.4.2 Generalidades Sobre a Galectina-3

As galectinas também são conhecidas como lectinas do tipo S (devido a descoberta da atividade ligante a carboidrato de seu primeiro membro ter dependido de reagentes sulfidrilas) ou lectinas S-Lac (uma vez que todos os membros desta família são solúveis e se ligam a lactose e sacarídeos relacionados), constituem uma família de lectinas encontrada em alguns fungos e em muitos segmentos taxonômicos do Reino *Animalia*: das esponjas ao homem. Dentre as principais características dos membros desta família estão: *i*) a afinidade de ligação específica a β -galactosídios; e *ii*) a sequência conservada dos elementos presentes no domínio de reconhecimento de carboidratos, DRC (HASAN; ASHRAF; BANU, 2007; LIU; PATTERSON; WANG, 2002; LOBSANOV *et al.*, 1993).

Os domínios de reconhecimento de carboidratos dos membros desta família de lectinas são constituídos por cerca de 130 resíduos de aminoácidos e, a comparação de sua sequência, baseada no número e no arranjo de seus domínios, permite que sejam classificadas em três subfamílias, Fig. 1.22: Grupo protótipo, onde os membros são homodímeros não covalentes de dois DRC idênticos, permitindo a ligação cruzada entre ligantes na superfície celular e matriz extracelular, MEC, como as galectinas Gal-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 e -15; Grupo químera, possuem uma estrutura combinada composta de um DRC -C terminal ligado a um domínio -N terminal rico em prolina, glicina e tirosina, a Gal-3 é o único representante; e Grupo bi-DRC ou de sequência repetida (*Tandem Repeat*), cujos membros apresentam dois DRC distintos, como Gal-4, -6, -8, -9 e -12 (BARONDES *et al.*, 1994; INGRASSIA *et al.*, 2006; HASAN; ASHRAF; BANU, 2007; LIU; PATTERSON; WANG, 2002).

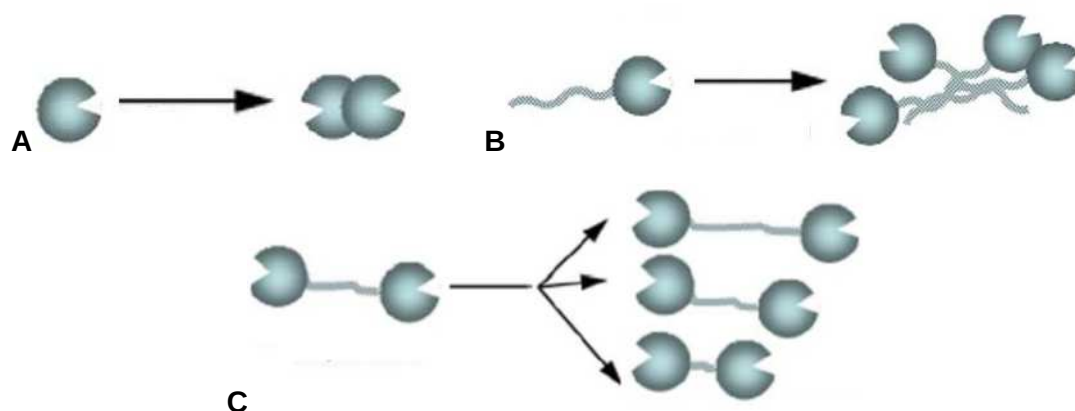


Fig. 1.22 Representação do arranjo dos domínios de reconhecimento de carboidratos apresentado pelas subfamílias de galectinas: (A) grupo protótipo: representado pela Gal-5, -7 e -10 (biologicamente ativas como monômeros) Gal-1, -2, -11, -13, -14 e -15 (ativas como homodímeros); (B) grupo químera, na qual a única integrante é a Gal-3, a atividade biológica é conferida pela forma oligomérica, cujas se agregam através da porção N-terminal; (C) grupo tipo bi-DRC onde os dois DRC são distintos e, geralmente, apresentam várias isoformas, como a Gal-4, -6, -8, -9 e -12 (ADAIR-KIRK; SENIOR, 2008; COOPER, 2002).

A primeira lectina animal a ter sua estrutura cristalina estudada foi a Gal-1, complexada a lactose, em 1993 por Yuri D. Lobsanov e colaboradores, por cristalografia de raios-X, numa resolução a 2,9 Å. O estudo cristalográfico da Gal-3 e de sua interação específica a carboidratos foi realizado em 1998 por J. Seetharaman e colaboradores, através da cristalografia de raios-X a 2,1 Å, do DRC complexado a lactose e a N-acetil-lactosamina, Fig. 1.23. Estes estudos demonstraram que o DRC é constituído por uma estrutura semelhante a um sanduíche de folhas- β antiparalelas, cujas cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos formam o domínio de reconhecimento de carboidrato (DANGUY; CAMBY; KISS, 2002; LIU; PATTERSON; WANG, 2002; LOBSANOV *et al.*, 1993; SEETHARAMAN *et al.*, 1998).

A Gal-3, assim como as demais galectinas, apresenta características estruturais comuns às proteínas citoplasmáticas (N- terminal acetilado, grupos sulfidrilas livre e glicosilação ausente); é sintetizada nos ribossomos e pode ser direcionada ao núcleo (como ocorre a Gal-1, -7, -10, -11 e -12), ao citoplasma, se estiver fosforilada (Gal-1, -7, -8, -10, -11 e -12), ser levada a membrana (Gal-4) e permanecer na superfície celular ou ser externalizada à matriz extracelular (Gal-1, -4 e -8) através de um carreador transmembrana ou em vesículas; onde pode desempenhar funções relacionadas à interação intercelular e a adesão das células à matriz extracelular, como a regulação da adesão e crescimento celular e processos imunes, como a inflamação, e função anti-apoptótica (Gal-3 fosforilada) (COOPER, 2002; HASAN; ASHRAF; BANU, 2007; LIU; PATTERSON; WANG, 2002; PERILLO; MARCUS; BAUM, 1998; RABINOVICH; RUBINSTEIN; TOSCANO, 2002).

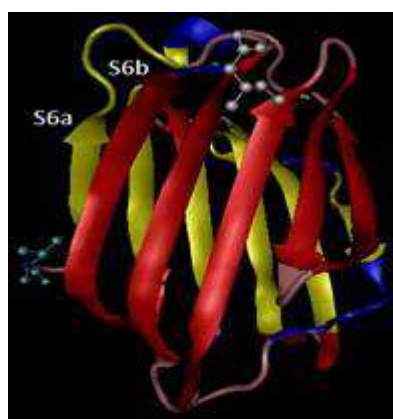


Fig. 1.23 Diagrama em fitas do DRC da Galectina-3. O arranjo das duas folhas- β antiparalelas demonstram uma folha anterior com 5 fitas, colorida em vermelho, e uma folha posterior com 6 fitas (S6a e S6b representam a região de ligação ao carboidrato), em amarelo. O resíduo inicial, em ciano; e o resíduo final, em cinza, estão indicados na figura. *Protein Data Banking*: 1A3K (HUMPHEY; DALKE; SCHULTEN, 1996).

A atividade biológica desta lectina por sua ligação a carboidrato ocorre a partir de interações restritas as folhas- β S4-S6a/S6b e os grupos hidroxilas da galactose (4- e 6-OH) e da glicose (3-OH), presente na lactose e na N-acetil-lactosamina, Tab. 1.6. O grupo hidroxila no C4 (4-OH) desempenha uma função central na ligação da proteína à galactose: atua como receptor e doador nas ligações de hidrogênio. A hidroxila 6-OH também desempenha um perfil cooperador nesta interação; além das interações de van der Waals entre os átomos de carbono da galactose (C-3, -4, -5 e -6) e a cadeia lateral aromática do triptofano (Trp181), Fig. 1.24. A ação aditiva da glicose ou N-acetil-glicosamina está relacionada à ligação de hidrogênio entre a hidroxila 2-OH ou grupo N-acetil e a proteína, mediada por uma molécula de água; e através da interação direta da hidroxila 3-OH ao glutamato (Glu184) e a arginina (Arg162) (INGRASSIA *et al.*, 2006; SEETHARAMAN *et al.*, 1998).

Esta característica ligante a galactose permite a interação de Gal-3 a glicoconjugados de elevado peso molecular, como laminina, mucina, fibronectina, citoqueratina, IgE, glicoproteínas associadas a membrana lisossomal, receptores Fc, antígenos carcinoembrionários, proteína ligante de Mac-2, bcl-2, lipopolisacarídeos, RNA e DNA de fita simples; cuja é inibida pelos sacarídeos: β -D-galactose, D-lactose e N-acetil-lactosamina e o anticorpo monoclonal antigalectina-3, devido a maior afinidade a estes (INGRASSIA *et al.*, 2006; PERILLO; MARCUS; BAUM, 1998).

Tab. 1.6 Relação das ligações de hidrogênio no domínio de reconhecimento de carboidrato na Gal-3 (SEETHARAMAN *et al.*, 1998).

Ligações de hidrogênio			
Átomo 1	Átomo 2	Distância (Å)	
		LacNAc	Lac
Gal O-3	Água 1	2,7	2,7
Água 1	Gal O-4	3,0	3,0
Água 1	Arg144 NH-1	2,5	2,6
Água 1	Asn160 OD-1	3,0	3,2
Gal O-4	His158 NE-2	2,6	2,6
Gal O-4	Arg162 NH-2	3,1	3,1
Gal O-4	Asn160 OD-1	3,2	3,3
Gal O-5	Arg162 NH-2	3,0	3,0
Gal O-6	Glu184 OE-2	2,8	2,8
Gal O-6	Asn174 ND-2	2,9	2,9
Gal O-6	Água 3	3,2	2,9
Água 3	Glu184 OE-2	3,1	3,1
Nag/Glc O-6	Água 3	2,9	2,9
Nag/Glc O-3	Arg162 NH-1	2,7	2,8
Nag/Glc O-3	Arg162 NH-2	3,0	3,0
Nag/Glc O-3	Glu184 OE-2	2,6	2,6
Nag N-2	Água 2	2,8	-
Glc O-2	Água 2	-	3,3
Água 2	Glu165 OE-2	2,8	3,1

Lac: lactose; LacNAc: N-acetil-lactosamina; Gal: galactose; Nag: N-acetil-glicosamina; Glc: glicose

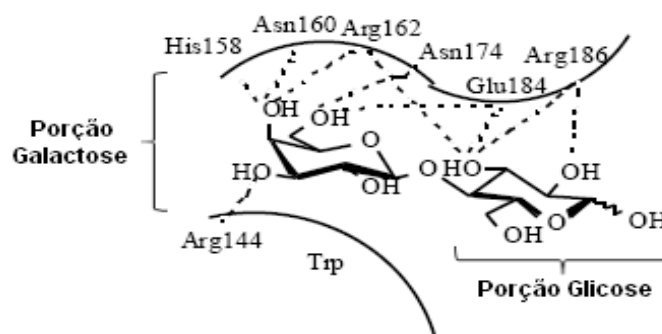


Fig. 1.24 Diagrama das ligações de hidrogênio decorrentes da interação Gal-3 e as porções galactose e glicose, presentes na lactose ou N-acetil-lactose (INGRASSIA *et al.*, 2006).

Alterações no perfil da expressão celular, variação da localização intracelular e/ou clivagem, modulada por metaloproteinases da matriz extracelular, da Gal-3, outrora denominada de L-29 e Mac-2; implica em mudanças na atuação biológica. Diferenças nos níveis de expressão são observadas em variados tipos de neoplasias, como no câncer de cólon, tireóide, gástrico e hepático, onde há superexpressão; no câncer de ovário, mama, próstata, útero, pele (basocelular e epidermóide), pâncreas, laringe e glândulas salivares, cuja expressão é reduzida (DANGUY; CAMBY; KISS, 2002). A distribuição intracelular nuclear (composta majoritariamente pela Gal-3 não fosforilada) *versus* citoplasmática (apenas a forma fosforilada de Gal-3, nos resíduos serina, Ser6 e Ser12, no domínio N-terminal), tem frequentemente sido associado ao grau de desenvolvimento do tumor (CALIFICE; CASTRONOVO; Van den BRÛLE, 2004; HUFLEJT *et al.*, 1993); bem como a clivagem de Gal-3 por metaloproteinases-2 e -9 em fragmentos de 22 e 9 KDa, resulta numa maior afinidade de ligação à laminina e ausência da capacidade hemaglutinante, do fragmento de 22 KDa, devido a não agregação homodimérica através da porção N-terminal (OCHIENG *et al.*, 1998), e angiogênese (NANGIA-MAKKER *et al.*, 2010).

Estudos relacionados a distribuição intercelular de Gal-3, têm demonstrado que seu acúmulo citossólico favorece a promoção da metástase, angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos) e proteção da anoicose (morte celular provocada pela perda de ancoragem celular), enquanto que sua localização nuclear atua de forma antagônica. Assim como elevados níveis de Gal-3 citoplasmática, com exclusão nuclear, tem sido relacionado a progressão da doença em câncer de mama (OLIVEIRA *et al.*, 2010), próstata (AHMED; BANERJEE; VASTA, 2007), tireóide e língua (CALIFICE; CASTRONOVO; Van den BRÛLE, 2004; DANGUY; CAMBY; KISS, 2002; HASAN; ASHRAF; BANU, 2007;).

CAPÍTULO 2

Metodologías

2.1 Introdução

Neste capítulo serão enfatizadas as condições experimentais empregadas na preparação dos pontos quânticos e as condições necessárias ao seu emprego nos estudos biológicos: marcação molecular e imagem de glicoconjugados e da lectina endógena galectina-3, presentes em tecidos de mama; e imagem *in vitro* de *C. albicans* (leveduras e biofilme).

2.2 Preparação das Nanopartículas de CdTe

As nanopartículas de telureto de cádmio foram obtidas pelo método de química coloidal (*bottom-up*) a partir da formação de agregados, ou núcleos, promovido pelos precursores, cujos foram estabilizados por alcanos funcionalizados, que também promoveram a passivação das ligações não saturadas na superfície dos nanocristais. A metodologia utilizada foi adaptada de métodos relatados na literatura (MENEZES *et al.*, 2005; YING *et al.*, 2008; ZHANG, *et al.*, 2003), que deram base a escolha dos estabilizantes e a razão molar entre os precursores: cádmio:telúrio:estabilizante (1:0,5:3,1).

Em um balão de duas vias, foram adicionados 20 mL de perclorato de cádmio, o agente estabilizante (AMP ou AMS, Fig. 2.1) e água nanopura; e o pH foi ajustado, com NaOH, a pH = 10,5, favorecendo a total desprotonação do estabilizante: pK_{SH} AMP = 10,27 (TSENG; GUTKNECHT, 1975) e pK_{SH} AMS = 10,02 (PAWELEC; STOCHEL; van ELDIK, 2004), levando à subsequente formação de um complexo entre duas moléculas de estabilizante e um íon cádmio (VAIRAVAMURTHY *et al.*, 2000). Em seguida o sistema foi fechado e submetido a aquecimento de $\sim 90^{\circ}\text{C}$, sob atmosfera inerte de nitrogênio (MENEZES *et al.*, 2005).



Fig. 2.1 Moléculas orgânicas funcionalizadas utilizadas na estabilização dos PQs de CdTe: (A) ácido 3-mercaptopropiônico, AMP e (B) ácido mercaptosuccínico, AMS.

Paralelamente, o telúrio metálico foi totalmente reduzido a NaHTe pelo borohidreto de sódio (em meio alcalino, a 90°C e atmosfera inerte), evidenciado pela formação de uma solução incolor (ZHANG *et al.*, 2003). A rápida injeção de telúrio reduzido, associado a razão elevada de agente redutor em relação ao conteúdo de

cádmio ($\text{NaBH}_4/\text{Cd}^{2+} = 15$), evitaram a possível oxidação do NaHTe (YING *et al.*, 2008); resultando numa solução de coloração marrom ou marrom-alaranjado, devido a formação dos núcleos de CdTe . O meio reacional permaneceu sob aquecimento de 3 horas (sistema estabilizado com AMP) e 12 horas (sistema estabilizado com AMS) para o crescimento efetivo dos núcleos de CdTe . Após o tempo de preparo foi observada intensa luminescência (verde e laranja, respectivamente) à iluminação com luz UV ($\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$) conforme ilustrado na Fig. 2.2. Na Tab. 2.1 estão resumidos os parâmetros empregados no preparo dos PQs de CdTe .

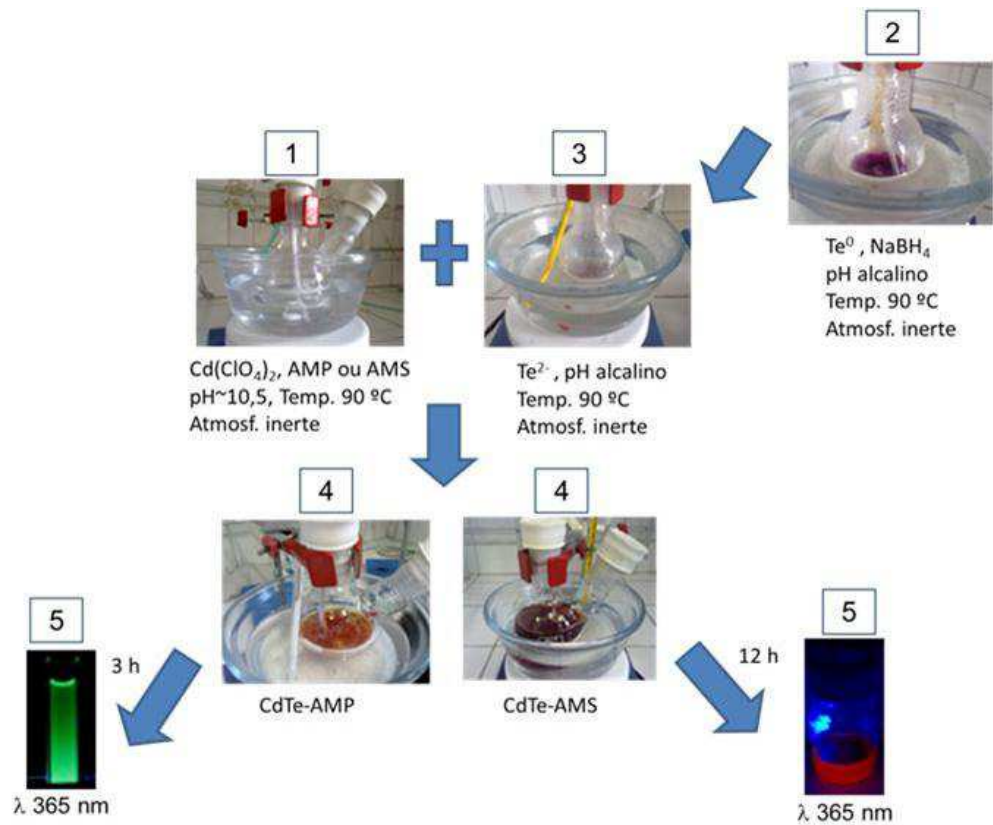


Fig. 2.2 Procedimento de preparo dos PQs de CdTe , estabilizados com AMP ou AMS. 1- Preparo da solução de cádmio e agente estabilizante. 2 e 3- Redução do telúrio a NaHTe . 4- Formação dos núcleos de CdTe . 5- Fluorescência observada na suspensão final.

Tab. 2.1 Parâmetros utilizados no preparo dos PQs de CdTe .

Reagentes ou Condições	Quantidade	Molaridade (mmol)
Telúrio, Te^0	0,013 g	0,1
Borohidreto de sódio, NaBH_4	0,114 g	3,0
Hidróxido de sódio, NaOH 2M	0,1 mL	
Perclorato de cádmio, $(\text{CdClO}_4)_2$ 0,01 M	20 mL	0,2
Ácido 3-mercaptopropiônico 4,9%	1,35 mL	0,62
ou		
Ácido mercaptosuccínico 4,9%	1,9 mL	0,62
Água nanopura	60 mL	
Gás Nitrogênio		
Temperatura	90°C	
Tempo de preparo	3 ou 12 h	

2.2.2 Métodos de Caracterização Estrutural dos Sistemas

Para a determinação do tamanho de partícula foram realizadas análises do perfil de difração de raios-X e microscopia eletrônica de transmissão, além da correlação do primeiro máximo de aborção ao tamanho da partícula e de medidas do espalhamento dinâmico de luz.

Os difratogramas foram obtidos no difratômetro Siemens Nixdorf D5000, no Departamento de Física da UFPE; numa varredura de $2\theta = 20^\circ - 60^\circ$, com CuK_α de $\lambda = 0,15418$ nm e filtro de níquel. As amostras foram precipitadas, com álcool isopropílico, e depositadas sobre a superfície fosca de uma lâmina de vidro, satisfazendo a condição de Bragg para a difração de raios-X para uma amostra na forma de pó.

O tamanho dos nanocristais foi estimado a partir da equação de Scherrer, Eq. 2.1, que relaciona a largura da banda à meia altura, B em rad, do pico de maior intensidade, θ , ao tamanho do cristalito presente na amostra analisada, D em nm, pois o alargamento das linhas de difração por cristalitos menores que 1000 Å de diâmetro se apresentam dependente do tamanho dos cristalitos. O valor de B deve ser corrigido pelo fator de alargamento do equipamento, b' , Eq. 2.2. A constante de Scherrer, $k = 0,9$, e o comprimento de onda dos raios-X incidentes, $\lambda = 0,15418$ nm, também foram considerados na realização desta estimativa (BIRKS; FRIEDMAN, 1946; GLUSKER; TRUEBLOOD, 1972; PATTERSON, 1939).

$$D = k.\lambda/B.\cos\theta \quad \text{Eq. 2.1}$$

$$B^2 = B'^2 - b'^2 \quad \text{Eq. 2.2}$$

Na análise por microscopia eletrônica de transmissão, as imagens foram construídas pela difração do feixe de elétrons, de alta potência, incidentes na superfície da amostra, de 40 - 60 nm de espessura (CLARKE, A. R.; EBERHARDT, 2002), através do microscópio Tecnai G2 20 FEI 2006, no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron - LNLS; operando a 200 kV. As amostras foram preparadas pelo gotejamento das suspensões diluídas dos nanocristais em grades de cobre recobertas com carbono, de 200 *mesh*, com imediata evaporação do excesso de solvente.

As medidas do espalhamento dinâmico de luz, DLS, foram obtidas no Zeta Sizer Nanoseries Nano ZS90 equipado com o *software* Malvern Instruments, em cubeta de caminho óptico de 1,0 cm, no Laboratório de Polímeros Não-Convencionais da UFPE.

2.2.3 Método de Caracterização Óptica dos Sistemas

A caracterização óptica foi realizada por meio da espectroscopia de absorção UV-visível e de emissão. Os espectros de absorção foram realizados no Espectrofotômetro Evolution 600 UV-Vis, Thermo Scientific, em cubetas de quartzo, com caminho óptico de 0,5, no Laboratório de Engenharia Biomédica da UFPE. Os espectros de emissão foram obtidos no Espectrômetro de Fluorescência LS 55, Perkin Elmer, em cubetas de quartzo, com caminho óptico de 1,0 cm, no Laboratório de Biofísica Química, no Departamento de Biofísica da UFPE.

Os dados obtidos no espectro de absorção permitiram estimar a concentração de nanopartículas por mililitro, através da Lei de Beer, Eq. 2.3, com o valor de A , no primeiro máximo de absorção, entre 0,15 e 0,25 (YU *et al.*, 2003).

$$A = \epsilon bc \quad \text{Eq. 2.3}$$

Devido à associação entre o primeiro máximo de absorção e o diâmetro dos nanocristais, os dados obtidos do espectro de absorção também permitiram que o diâmetro dos nanocristais fosse estimado através da fórmula empírica na Eq. 2.4 (YU *et al.*, 2003).

$$D = (9,8127 \times 10^{-7})\lambda^3 - (1,7147 \times 10^{-3})\lambda^2 + (1,0064)\lambda - 194,84 \quad \text{Eq. 2.4}$$

O valor do coeficiente de absortividade molar dos PQs de CdTe foi calculado pela Eq. 2.5, que correlaciona o coeficiente de absortividade molar ao diâmetro, D em nm, e ao primeiro máximo de absorção excitônica dos nanocristais, ΔE em eV; ou da Eq. 2.6, sem o emprego valor de ΔE (YU *et al.*, 2003).

$$\epsilon = 3450 \Delta E (D)^{2,4} \quad \text{Eq. 2.5}$$

$$\epsilon = 10043 (D)^{2,12} \quad \text{Eq. 2.6}$$

2.3 Conjugação dos Pontos Quânticos à Con A e Antigal-3

A conjugação de CdTe às biomoléculas concanavalina A, Con A e antigalectina-3, Antigal-3, foi realizada através da adsorção das proteínas a superfície dos pontos quânticos estabilizados/funcionalizados com moléculas orgânicas bifuncionais, que possibilitam a adicional modificação da superfície destes nanocristais partir da interação direta com as proteínas (THANH; GREEN, 2010; YU *et al.*, 2007). A conjugação foi realizada segundo os parâmetros descritos na Tab. 2.2, a 25°C, durante 2 horas, em suave homogeneização propiciada por um homogeneizador para tubos, tipo gangorra. Ao final do período de conjugação as amostras foram acondicionadas a 4°C, sem a realização de qualquer tipo de tratamento adicional, como diálise ou centrifugação, por exemplo (LI *et al.*, 2005; YEZHELYEV *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2012).

A razão utilizada de PQs e proteínas foi experimentalmente determinada através da observação da perda da estabilidade da suspensão coloidal em virtude da concentração da proteína, bem como foi determinada a estabilidade da suspensão de CdTe em função da variação do pH. A concentração final de proteína na suspensão de CdTe foi de 14 mg/mL, 9,3 mg/mL, 2,5 mg/mL, 0,28 mg/mL e 50 µg/mL, testadas a pH 7,4; perfazendo as proporções de PQs:Con A de (1:1), (2:1), (10:1), (100:1) e (600:1); onde o número de partículas foi de $\sim 10^{15}$ nanocristais/mL. A estabilidade da suspensão de CdTe ($\sim 10^{15}$ nanocristais/mL) em função da variação do pH do meio, foi avaliado para os valores de pH = 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,4 e 8,0; cuja observação foi realizada durante sete dias.

Tab. 2.2 Parâmetros utilizados na conjugação por adsorção entre os PQs de CdTe, preparado com AMP ou AMS, a Con A ou Antigal-3.

CdTe (AMP ou AMS) + Con A ou Antigal-3	
Volume de pontos quânticos	3,0 mL
Concentração de nanocristais/mL	$\sim 10^{15}$ nanocristais/mL
Volume de proteína	30 µL
Concentração final das proteínas no conjugado	
- Con A	0,28 mg/mL
- Antigal-3	0,2 µg/mL
Número de moléculas/mL	$\sim 10^{12}$ moléculas/mL
pH da suspensão/ conjugados	8,0 $\pm$ 0,1

2.4 Caracterização dos Pontos Quânticos Conjugados a Con A e Antigal-3

Os PQs conjugados às biomoléculas foram caracterizados por espectroscopia de absorção no UV-visível e de emissão. A integridade estrutural das proteínas, antes e após a conjugação, foi avaliada através da espectroscopia por dicroísmo circular. Os espectros foram realizados no Espectropolarímetro Jasco, J-815, na faixa de 185-250 nm, sob fluxo constante de nitrogênio. Os perfis de absorção diferencial foram obtidos a 25°C, em uma cubeta de 1,0 cm de caminho óptico, a uma velocidade de 50 nm/min, tempo de resposta de 8 s e média de 10 varreduras/espectro, realizado no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE. . O valor da elipticidade molar, $[\theta]$, em graus.cm².dmol⁻¹, foi obtido a partir do valor da elipticidade, em miligraus, através da Eq. 2.7, considerando a concentração molar das proteínas em 96 nM, para Con A, e 0,16 nM, para Antigal-3.

$$[\theta] = 100. \theta/c.b \quad \text{Eq. 2.7}$$

A eficiência da conjugação foi analisada através da medida quantitativa da fluorescência, que consiste na comparação da intensidade de luminescência entre os pontos quânticos conjugados e os controles (ponto quântico não conjugado e proteínas) analisados em três ensaios independentes, Fig. 2.3.

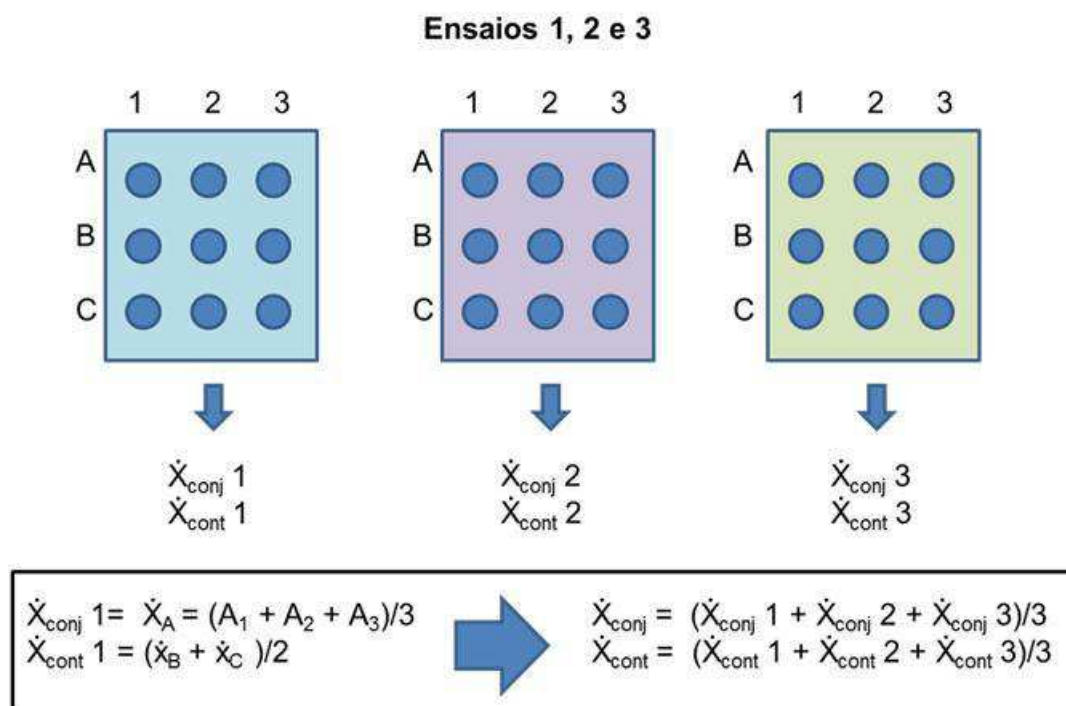


Fig. 2.3 Diagrama adotado para os ensaios de avaliação da conjugação dos PQs de CdTe - AMP e -AMS a Con A e Antigal-3.

A adsorção da proteína conjugada a CdTe, à microplaca de poliestireno preta, de 96 poços, Optiplate F HB, PerkinElmer, foi promovida pela adição de 200 µL da amostra a ser analisada, em três poços independentes, seguida por incubação em banho-maria, a 37 °C, durante 2 h. Em seguida, os poços foram lavados com tampão fosfato salino 0,01 M (pH 7,2), por três vezes, para remoção das proteínas não adsorvidas e as medidas de fluorescência foram realizadas no leitor de microplacas Wallac Victor² 1420, Perkin Elmer, equipado com o *software* Victor² HR4000, no Laboratório de Biofísica Química, no Departamento de Biofísica da UFPE. As leituras foram realizadas, nos poços secos, com filtro de excitação a 480 ± 31 nm e filtros de emissão a 595 ± 60 nm ou 535 ± 25 nm, com intervalo de um segundo, a intensidade da lâmpada de 20.000 cw. A média, $\bar{x}$, dos valores das intensidades para os sistemas-teste ($\bar{x}_{conj}$) e sistemas-controle ($\bar{x}_{cont}$) foi obtida pela média aritmética das intensidades de cada tréplica através da Eq. 2.8; e o desvio-padrão pode ser calculado através da Eq. 2.9; cuja porcentagem superior a 100% foi considerada um indicativo de conjugação.

$$\% \text{ conjugação} = (\bar{x}_{conj} - \bar{x}_{cont} / \bar{x}_{cont}) \times 100 \quad \text{Eq. 2.8}$$

$$DP = [\sum(A_i - \bar{X}_A)^2 / n - 1]^{1/2} \quad \text{Eq. 2.9}$$

A averiguação da atividade biológica da lectina Con A, antes e após a conjugação, foi avaliada através do teste de hemaglutinação. Este teste se baseia na formação de uma rede de hemaglutinação entre os eritrócitos, que possuem carboidratos em sua superfície, e a lectina, que reconhece especificamente estes carboidratos. Os pontos quânticos conjugados a Con A e os respectivos controles (pontos quânticos não conjugados e a lectina) foram seriadamente diluídos e incubados com uma suspensão a 2% (v/v) de eritrócitos de coelho tripsinizados, em NaCl 150 mM, em uma placa de microtitulação, com 96 poços em forma de “V”, durante 45 minutos. A atividade hemaglutinante foi determinada como a maior diluição que preserva hemaglutinação visível, a olho nu, quando comparada a suspensão de eritrócitos a 2% em solução salina; sendo expressa em unidades de atividade hemaglutinante, UAH (CHEVREUIL, 2007).

2.5 Marcação de *Candida albicans*

A marcação das leveduras e biofilme de *Candida albicans* ATCC 90028 também foi utilizado, neste estudo, como uma das formas de avaliar a efetivação da conjugação de CdTe à Con A e a preservação da atividade biológica da lectina. A suspensão de leveduras foi padronizada em 10^7 UFC/mL, a partir da transferência de uma alíquota de 10% (v/v) de uma cultura após 12 h de incubação em meio líquido de Sabouraud (pH 5,6), a 30°C. A incubação dos pontos quânticos, conjugados ou não a Con A, e as leveduras foi realizada na proporção de (1:1) (v/v) durante 1 hora. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas a $3,6 \times 10^3$ rpm, por 30 segundos, para remoção dos pontos quânticos em excesso, e o botão ou *pellet*, foi ressuspenso em tampão fosfato salino 0,01 M (pH 7,2) e microscopicamente analisado.

A incubação do biofilme aos pontos quânticos, conjugados ou não a Con A, foi realizada após o desenvolvimento do biofilme, com de 48 h de crescimento a 37°C, sob uma lamínula submersa em tampão fosfato salino 0,01 M (pH 7,2) a 10^7 UFC/mL. A incubação foi realizada na proporção de 1,0 mL da suspensão de pontos quânticos por biofilme, durante 1½ h. Em seguida, os sistemas foram lavados, em tampão salino fosfato 0,01 M (pH 7,2), e microscopicamente analisados. As imagens de microscopia de fluorescência foram obtidas no Microscópio de Fluorescência Leica DMI4000B, do Laboratório de Biofísica Química, no Departamento de Biofísica da UFPE, e no Microscópio Confocal Olympus IX81, no Laboratório de Engenharia Biomédica da UFPE.

2.6 Marcação Histoquímica das Lesões e Tecido de Mama Normal

Os pontos quânticos de CdTe conjugados a Con A ou Antigal-3, foram utilizados como marcador biológico fluorescente em protocolos de marcação histoquímica das lesões de mama (fibroadenoma e carcinoma ductal invasivo) e mama normal. As amostras de tecidos de mama foram provenientes do Banco de Tecidos do Setor de Patologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA da UFPE, cujo emprego em projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Bioética do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (SISNEP FR – 272931, CEP/CCS/UFPE Nº 195/09).

As secções teciduais, de 4 µm, foram desparafinizadas em xilol (1 - 4) e hidratadas em álcool etílico (100%, 100%, 95% e 70%), com posterior lavagem em água corrente, por 5 minutos, água destilada, por 1 minuto, e tampão fosfato salina

0,01 M (pH 7,2), por 5 minutos. Em seguida as secções teciduais foram tratadas com 125 µl de uma solução de tripsina 0,1% (p/v), durante 2 minutos, a 37 °C, e foram lavadas em tampão fosfato salino 0,01 M, por duas vezes, durante 5 minutos. Algumas secções teciduais foram tratadas com 125 µl de uma solução de azul de Evans 0,5%, durante 30 min, a 4°C, em câmara úmida; para supressão da autofluorescência das fibras de colágeno entre 380 e 570 nm.

Posteriormente, as secções teciduais foram incubadas com os pontos quânticos conjugados ou não as biomoléculas. As amostras histológicas incubadas com CdTe conjugado a Con A foram submetidas a 2 h de repouso, em câmara úmida, a 4 °C. As amostras incubadas com CdTe conjugado a Antigal-3 foram submetidas a um período de 20 h de repouso, sob as mesmas condições, devido ao maior tempo requerido pelo anticorpo em se ligar a galectina-3 tecidual. Após a incubação, as secções foram lavadas com tampão fosfato salino 0,01 M, por duas vezes, durante 5 minutos; e foram microscopicamente visualizadas no Microscópio de Fluorescência Leica DMI4000B, do Laboratório de Biofísica Química, no Departamento de Biofísica da UFPE (SANTOS *et al.*, 2006).

CAPÍTULO 3

Obtenção e Caracterização dos Pontos Quânticos de CdTe

3.1 Introdução

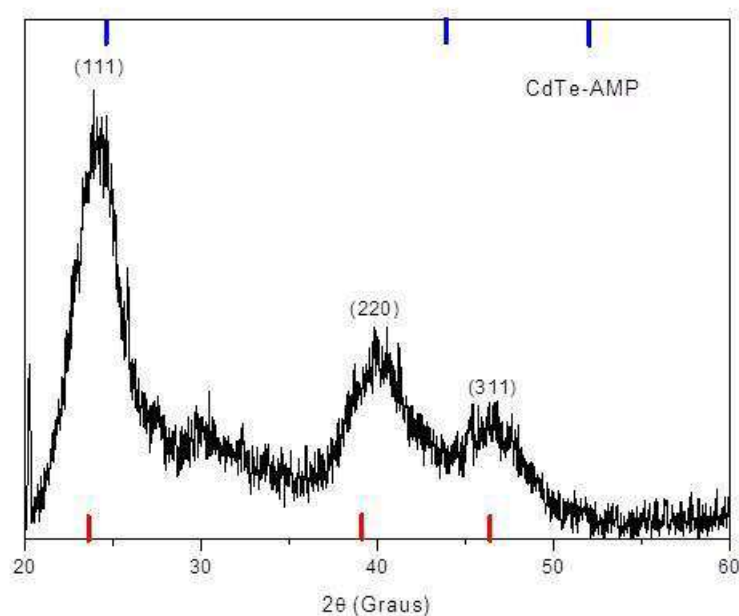
Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos na preparação de nanopartículas de CdTe e de sua caracterização.

Os PQs de CdTe preparados e estabilizados pelas moléculas bifuncionais AMP e AMS, tornam os nanocristais solúveis em água e facilitam a ligação destes à biomoléculas (SHAO *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2010), além de melhorarem suas propriedades ópticas, ao participar da formação da camada de passivação (GAPONIK *et al.*, 2002; TALAPIN *et al.*, 2002), onde um semiconductor, com maior E_{gap} é depositado na superfície dos nanocristais (ROGACH, 2008). Estes estabilizantes também permitem a obtenção de PQs com emissão entre $\lambda_{emis} = 530-800$ nm (AMP) (ROGACH *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2003a) e $\lambda_{emis} = 490-650$ nm (AMS) (YING *et al.*, 2008), os quais apresentam tamanhos variados. Neste trabalho, foi obtidas suspensões de CdTe com emissão no verde e no laranja, as quais foram analisadas por difração de raios-X, microscopia eletrônica de transmissão e espectroscopias de absorção no ultravioleta e visível e de emissão.

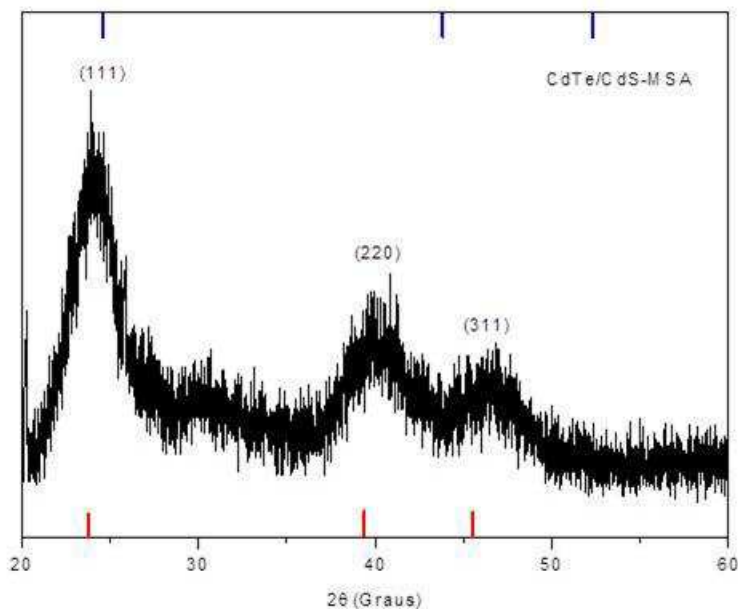
3.2 Caracterização Estrutural dos Sistemas

O telureto de cádmio (CdTe) pode apresentar simetria cúbica ou hexagonal. Em ambas as simetrias, os átomos estão tetraedricamente coordenados, e a principal diferença, consiste no arranjo sequencial de seus planos atômicos ao longo das direções cristalográficas $\langle 111 \rangle$ e $\langle 001 \rangle$ ou eixo-c (simetria cúbica e hexagonal, respectivamente). Em condições de pressão e temperatura normal, a estrutura blenda de zinco é mais estável, e corresponde a fase energeticamente preferível no macrocristal ou *bulk* (DAGTEPE *et al.*, 2007; LONG, 1968).

Os sistemas caracterizados por difração de raios-X demonstram que as nanopartículas de CdTe apresentam a estrutura cristalina blenda de zinco (simetria cúbica). Nos difratogramas, os picos com valores de $2\theta = 24,12^\circ$; $40,13^\circ$ e $46,36^\circ$ (CdTe-AMP) e de $2\theta = 24,2^\circ$; $40,02^\circ$ e $46,42^\circ$ (CdTe-AMS) são associados aos planos cristalográficos (111), (220) e (311), Fig. 3.1, pois esses valores são muito próximos dos valores atribuídos para a fase cúbica de CdTe: $2\theta = 23,8^\circ$, $39,3^\circ$ e $46,5^\circ$ (JCPDS nº 75-2086) (WANG *et al.*, 2003; ZENG *et al.*, 2008).



A.



B

Fig. 3.1 Perfil da difração de raios-X de (A) CdTe-AMP, $2\theta = 24,12^\circ$, $40,13^\circ$ e $46,36^\circ$; e (B) CdTe-AMS, $2\theta = 24,2^\circ$, $40,02^\circ$ e $46,42^\circ$. Em vermelho, ângulos de difração para CdTe ($2\theta = 23,8^\circ$, $39,3^\circ$ e $46,5^\circ$) e, em azul, para CdS ($2\theta = 24,6^\circ$, $43,9^\circ$ e $52,1^\circ$), simetria cúbica (WANG *et al.*, 2003; ZENG *et al.*, 2008).

O tamanho das nanopátículas foi estimado de acordo com a fórmula de Scherrer. Diâmetros em torno de $D = 2,0$ e $D = 3,0$ nm, para CdTe-AMP e CdTe-AMS, respectivamente, foram obtidos sem correção para o valor de B . Estes valores confirmam que estas nanopátículas se apresentam num regime de confinamento forte pois estas dimensões são menores que a apresentada para o raio de Bohr no macrocristal deste material, cujo valor é de $a_B = 7,3$ nm (ESCH *et al.*, 1990).

As imagens obtidas por MET, Fig. 3.2, das nanopartículas de CdTe-AMP ou CdTe-AMS, mostram os planos cristalinos apresentados por estes materiais, evidenciando sua natureza cristalina. A análise da distribuição de tamanho demonstrou a presença de nanopartículas com diâmetros variados, entre 2,5 e 4,5 nm.

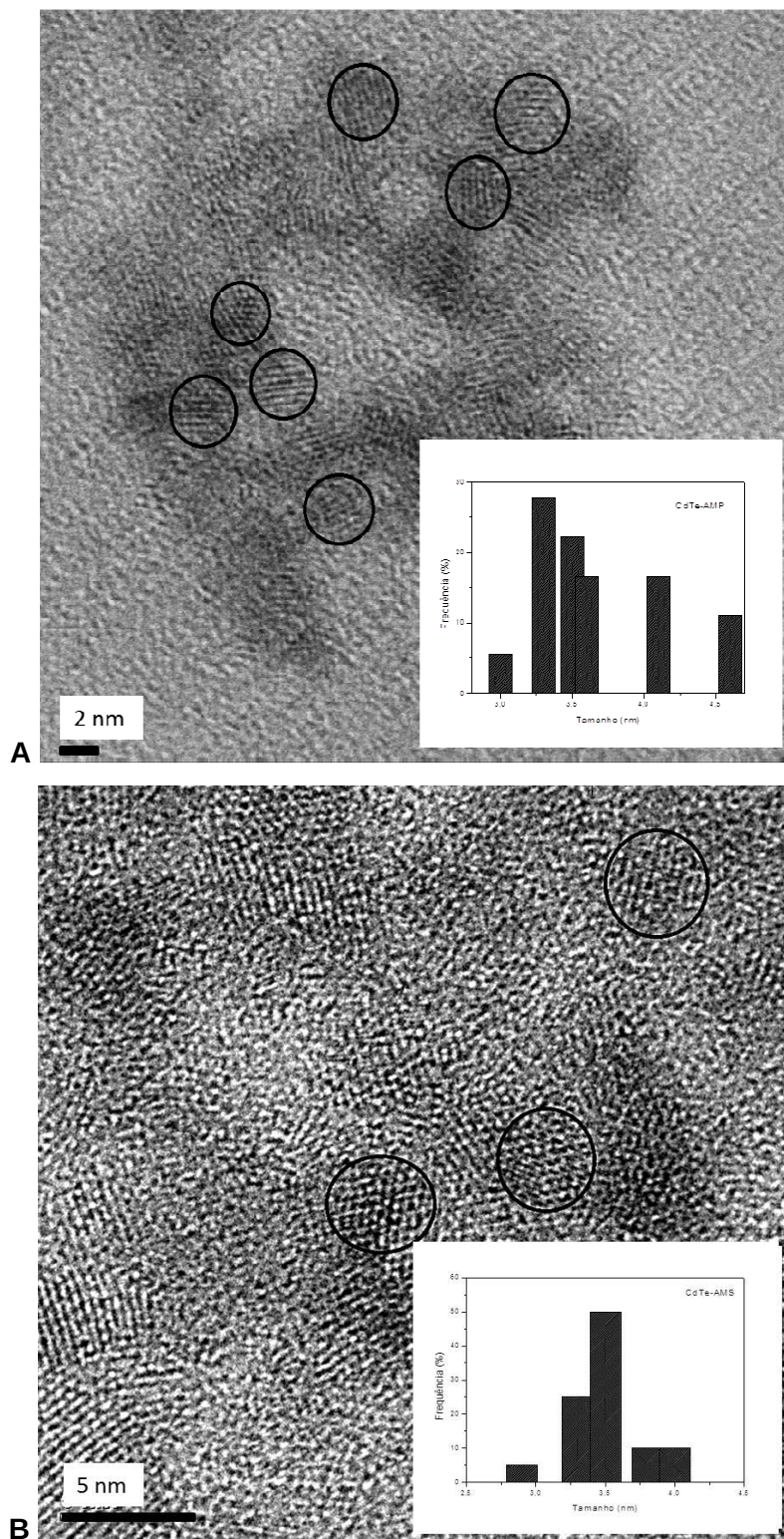


Fig. 3.2 Imagens de MET dos pontos quânticos de (A) CdTe-AMP e (B) CdTe-AMS.

3.3 Caracterização Óptica dos Sistemas

O espectro de absorção de nanopartículas de semicondutores forneceu informações sobre o tamanho dos nanocristais, pois o primeiro máximo de absorção está relacionado à energia de espaçamento, E_{gap} ; quanto menor o diâmetro da nanopartícula, maior será a distância entre as bandas de valência (BV) e de condução (BC) (ROGACH, 2008).

Os espectros de absorção e emissão apresentado pelos pontos quânticos de CdTe-AMP são mostrados na Fig. 3.3. O comprimento de onda para o primeiro máximo de absorção foi em $\lambda = 488$ nm. Com este dado foi possível estimar o diâmetro apresentado por estas nanopartículas no valor de $D = 2,0$ nm, calculado através da fórmula empírica descrita na Eq. 2.4 (YU *et al.*, 2003).

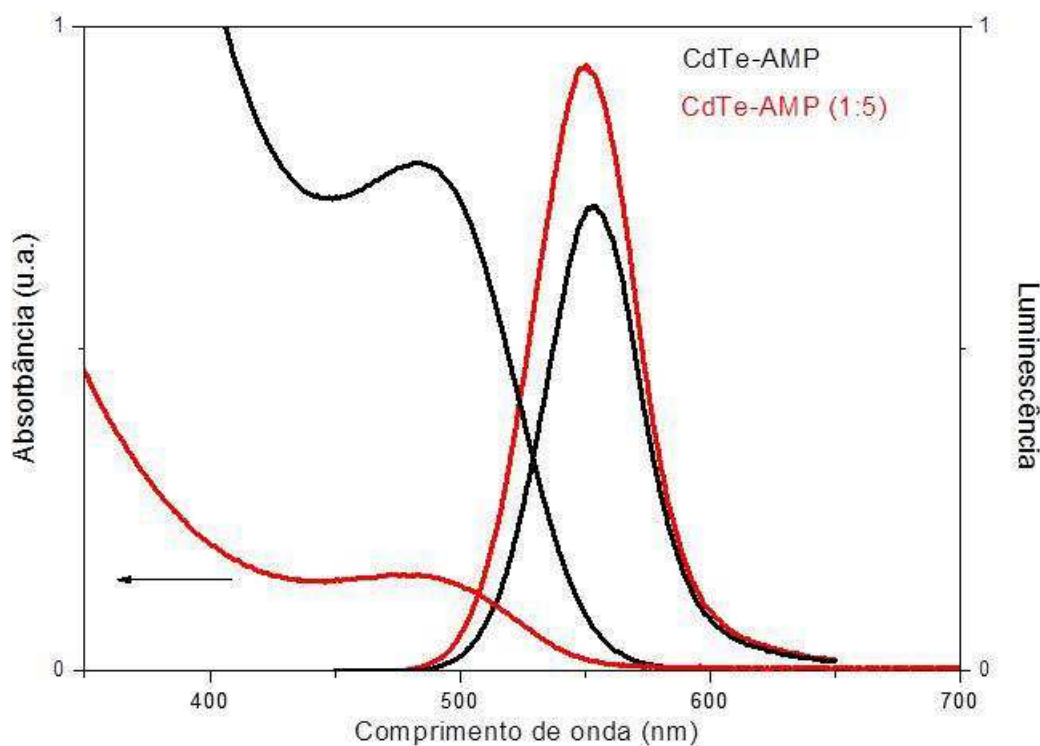


Fig. 3.3 Espectro de absorção e emissão eletrônica para os pontos quânticos de CdTe-AMP, diluídos na proporção de 1:5 e sem diluição. A emissão máxima foi observada em torno de $\lambda = 550$ nm ($\lambda_{exc.} = 365$ nm) e o pico de absorção excitônica em $\lambda = 488$ nm.

Para a estimativa da concentração de nanopartículas por mililitro, foi necessário inicialmente calcular o valor da absortividade molar apresentada pelas nanopartículas de CdTe de $D = 2,0$ nm. Para isto, as Eq. 2.5 e 2.6 foram utilizadas (YU *et al.*, 2003). Os valores obtidos através de ambas as equações, demonstraram que o valor foi de $\epsilon = 4,6 \times 10^4$ L/mol cm.

Através da Lei de Beer, Eq. 2.3, a concentração destas nanopartículas foi estimada em cerca de $c = 4,0 \times 10^{15}$ partículas/mL. A absorbância no primeiro máximo de absorção, para uma suspensão diluída a razão de (1:5), em água nanopura foi de $A = 0,148$ (YU *et al.*, 2003).

Os espectros de emissão foram obtidos pela emissão da radiação eletromagnética previamente absorvida pelos pontos quânticos, através da luminescência, que no caso destes materiais é classificada como fluorescência, pois o decaimento radiativo de elétrons de níveis mais energéticos a níveis de menor energia não envolve mudança no *spin* eletrônico (SKOOG; LEARY, 1992).

A diferença nos comprimentos de onda da radiação excitante e fluorescente apresentada pelos pontos quânticos é dependente do tamanho e da composição, e os espectros de emissão se caracterizam por picos estreitos e simétricos (BAILEY; SMITH; NIE, 2004).

Os espectros de emissão para CdTe-AMP, após 3 h de aquecimento, apresentaram emissão máxima em $\lambda = 553$ nm, sob excitação em $\lambda_{\text{exc}} = 365$ nm. Isso sugere que as moléculas orgânicas funcionalizadas com o grupo sulfidril tenham 'liberado' os átomos de enxofre do seu grupo tiol e que estes tenham se combinado aos átomos de cádmio na superfície dos nanocristais, cuja passivação das ligações químicas insaturadas, decorrentes da descontinuidade da extensão do cristal, permite a ocorrência da recombinação radiativa do par excitônico (e^-h^+) (ROGACH, 2008).

A observação do aumento da intensidade luminescente apresentada pela suspensão diluída em água nanopura, na proporção de 1:5, sugere que a menor taxa de colisão entre as nanopartículas presentes na suspensão diluída, tenha reduzindo o efeito de supressão da luminescência, semelhante ao efeito apresentado por soluções de compostos fluorescentes em concentrações elevadas (SANTOS; FARIAS; FONTES, 2008; SKOOG; LEARY, 1992).

Para as nanopartículas de CdTe-AMS, os espectros de absorção e emissão estão representados na Fig. 3.4. O diâmetro apresentado por estas nanopartículas foi calculado pela Eq. 2.4 e sugerem o diâmetro de $D = 3,2$ nm. O primeiro máximo de absorção foi observado em $\lambda = 547$ nm. O cálculo do valor da absorvidade molar apresentada pelas nanopartículas de CdTe-AMS de $D = 3,0$ nm, pelas Eq. 2.5 e 2.6, foi de $\epsilon = 1,09 \times 10^5$ L/mol cm.

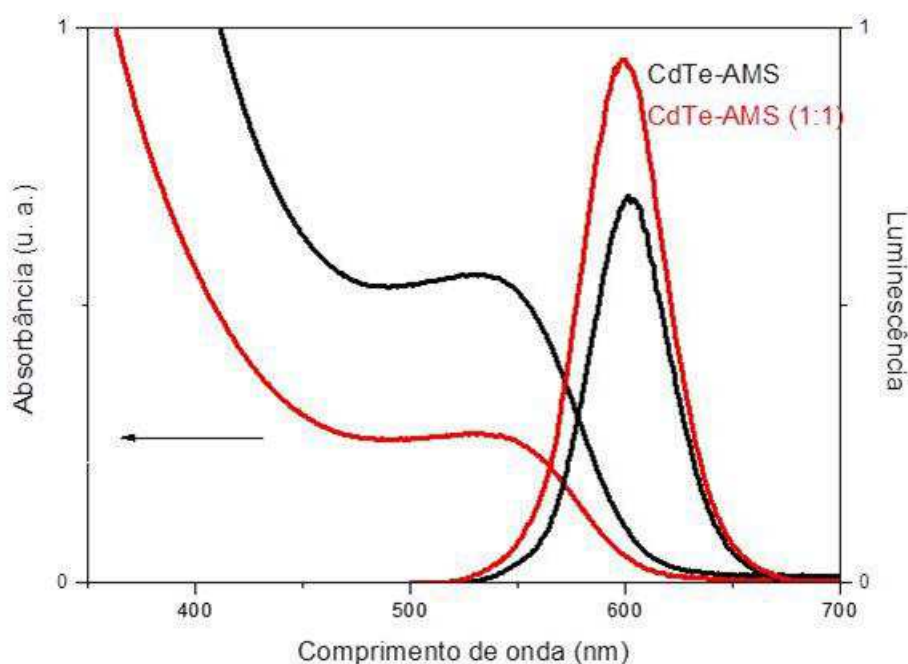


Fig. 3.4 Espectro de absorção e emissão eletrônica para os pontos quânticos de CdTe-AMS, diluídos na proporção de 1:1 e sem diluição. A emissão máxima foi observada em $\lambda = 600$ nm ($\lambda_{exc.} = 365$ nm) e o pico de absorção excitônica em $\lambda = 547$ nm.

O cálculo da concentração destas nanopartículas a uma absorbância de $A = 0,265$, no primeiro máximo de absorção, para uma suspensão diluída a razão de (1:1) em água nanopura, foi estimado pela Lei de Beer, Eq. 2.3. Assim foi estimada a presença de cerca de $c = 3,1 \times 10^{15}$ partículas/mL.

A emissão máxima observada para as nanopartículas de CdTe-AMS, após 12 horas de aquecimento, foi de 600 nm. Embora a obtenção de pontos quânticos de CdTe-AMS e com emissão em comprimento de onda próximo ao apresentado em nosso estudo, seja realizado em até 1 hora de aquecimento (WANG; LIU; ZHOU, 2012), um estudo sobre a cinética de crescimento dos nanocristais de CdTe relata que o crescimento em meio aquoso ocorre de forma lenta, sendo necessário um período de tempo longo para que ocorra a supersaturação dos precursores, na etapa de nucleação e, conseqüentemente, o crescimento efetivo do nanocristal no meio reacional, com distribuição de tamanho controlada (FERREIRA *et al.*, 2009; ROGACH *et al.*, 2007).

Os dados obtidos através da caracterização estrutural e óptica, para as nanopartículas de CdTe-AMP e CdTe-AMS, obtidas neste estudo, demonstram semelhança aos dados apresentados na literatura para nanocristais de CdTe, que correlacionam os valores espectroscópicos demonstrados por estes pontos quânticos a diâmetros entre 2,0 e 3,0 nm (PAWELEC; STOCHEL; van ELDIK, 2004; ROGACH *et*

al., 2007; ZHANG *et al.*, 2003). A Tab. 3.1 resume os valores obtidos na caracterização das nanopartículas de CdTe-AMP e CdTe-AMS e para o diâmetro estimado através de variadas técnicas.

Tab. 3.1 Resumo dos dados obtidos na caracterização das nanopartículas de CdTe.

Concentração (partículas/mL)	Absortividade molar		Diâmetro (nm)		
	$\epsilon = 3450 \Delta E (D)^{2,4}$	$\epsilon = 10043 (D)^{2,12}$	λ_{abs}	DRX	MET
CdTe/CdS-AMP					
$4,0 \times 10^{15}$	$4,6 \times 10^4$	$4,4 \times 10^4$	2,0	2,0	3,0
CdTe/CdS-AMS					
$3,1 \times 10^{15}$	$1,09 \times 10^5$	$1,03 \times 10^5$	3,2	3,0	3,5

O diâmetro hidrodinâmico apresentado pelas nanopartículas de CdTe, avaliado através do espalhamento dinâmico de luz (DLS), demonstram que as nanopartículas de CdTe-AMP apresentam diâmetro em torno de 24,2 nm; e CdTe-AMS, em torno de 29,4 nm, Fig. 3.5

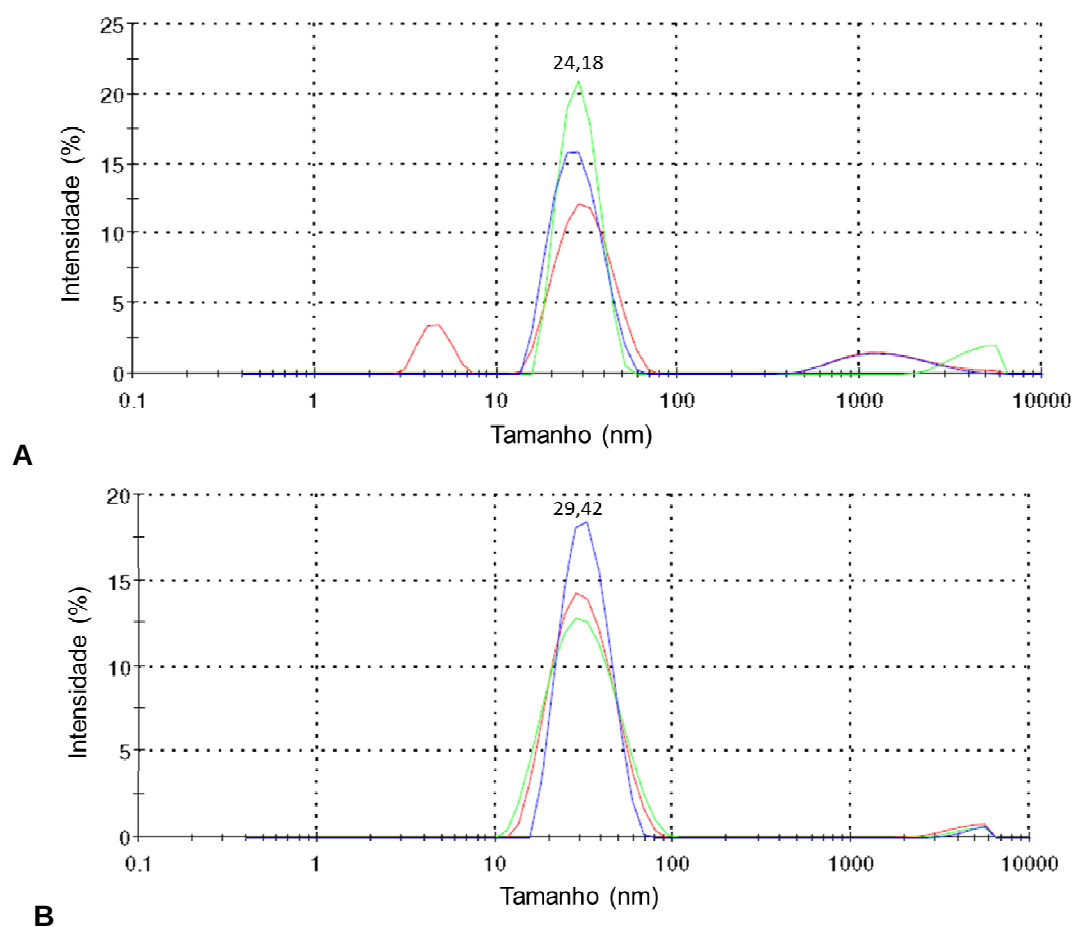


Fig. 3.5 Diâmetro hidrodinâmico apresentado pelas nanopartículas de (A) CdTe-AMP e (B) CdTe-AMS.

CAPÍTULO 4

Aplicação dos Pontos Quânticos Conjugados como Marcador Biológico Fluorescente

4.1 Introdução

Os pontos quânticos apresentam características importantes para o estudo de eventos celulares, pois o regime de tamanho nanométrico apresentado por estes materiais, associado a outras propriedades intrínsecas, como por exemplo, alta intensidade de emissão e alta resistência à fotodegradação, torna seu uso como marcador biológico muito interessante. Entretanto, para que ocorra uma marcação específica é necessária a conjugação destes pontos quânticos a biomoléculas apropriadas. Proteínas, carboidratos, peptídios, os ácidos nucleares DNA e RNA e lipídios são exemplos de moléculas passíveis de serem conjugadas a estas nanoestruturas (BAKALOVA *et al.*, 2005; MICHALET, 2005; ROBINSON *et al.*, 2005; SHE; HE; ZHU, 2008; SUH; SUH; STUCKY, 2009; VU *et al.*, 2005).

A forma de ligação entre os PQs e as biomoléculas pode ser através de ligação covalente, atração eletrostática ou adsorção, interação hidrofóbica, silanização e agregados poliméricos ou *beads* (CHAN *et al.*, 2002).

Neste capítulo serão apresentados os resultados da conjugação dos pontos quânticos, descritos no Capítulo 3, a duas biomoléculas e seu subsequente emprego como marcador fluorescente em dois diferentes sistemas biológicos:

(1) *Candida albicans*

(2) Tecidos de mama

As associações foram obtidas através da modificação superficial dos pontos quânticos através do uso de biomoléculas específicas. Para a *C. albicans* foi utilizada a lectina Concanavalina A, Con A enquanto que para a marcação do tecido de mama foi utilizada a lectina Con A e o anticorpo Antigalectina-3, Antigal-3.

Os pontos quânticos conjugados às biomoléculas foram caracterizados através de espectroscopia de absorção e de emissão eletrônica e a integridade estrutural das biomoléculas foi avaliada por dicroísmo circular. A eficiência da conjugação foi analisada através da medida quantitativa da fluorescência, em um leitor de microplacas. A averiguação da atividade biológica da lectina Con A, após a conjugação, foi adicionalmente avaliada através do teste de hemaglutinação e através da marcação de leveduras de *Candida albicans*, conforme descrito a seguir.

4.2 Conjugação de CdTe a Con A e Antigal-3

Neste trabalho a metodologia de conjugação de CdTe-AMP e CdTe-AMS às biomoléculas Con A ou Antigal-3 foi realizada por meio de adsorção, onde a interação entre os pontos quânticos e as proteínas ocorre através da atração eletrostática (LI *et al.*, 2005), visto que os PQs apresentam carga superficial negativa, conferida pelos grupos carboxílicos presentes nas moléculas dos agentes estabilizantes; e as biomoléculas apresentam carga positiva ou levemente negativa, devido ao pH = 8,0, ser próximo do ponto isoelétrico, pI, apresentado pelas proteínas.

O valor do ponto isoelétrico da Con A estabilizada pelos cátions divalentes (Ca^{2+} e Mn^{2+}) é de pI 8,35. Na ausência destes cátions, o ponto isoelétrico da Con A é de pI 6,5 (BHATTACHARYYA; BREWER, 1990), embora também sejam descritos valores iguais a pI 5,5 (SUMNER; HOWELL, 1936) e pI 7,0 (ZAND; AGRAWAL; GOLDSTEIN, 1971) para esta proteína. O ponto isoelétrico para o anticorpo monoclonal Antigal-3, que é uma imunoglobulina pertencente a subclasse 1, está entre pI 6,4 e 7,4 (HAMILTON, 2001).

No entanto a eficiência da conjugação entre PQs e proteínas, por exemplo, está relacionada à ausência de perturbação nas propriedades físico-químicas apresentadas pelos nanocristais e nas propriedades biológicas apresentadas pelas proteínas (CHAN *et al.*, 2002). Desta forma, a estabilidade das suspensões de CdTe foram monitoradas na presença de diferentes concentrações de proteína e da variação do pH; como também foram investigadas possíveis alterações estruturais na proteína.

4.2.1 Monitoramento da Estabilidade Coloidal dos Pontos Quânticos à Variação de pH e na Presença de Con A

A estabilidade da suspensão de pontos quânticos, numa concentração de 10^{15} nanocristais/mL foi avaliada em função da variação do pH e do agente funcionalizante. A perda de estabilidade físico-química da suspensão foi evidenciada visualmente através de turvação seguida de separação de fase. Foi observada perda da estabilidade, bem como sua fluorescência, para o sistema CdTe-AMS em um pH = 6,0 após quatro dias.

Os pontos quânticos de CdTe-AMP perderam estabilidade para um valor de pH < 6,5, em até três dias, embora não demonstrassem alteração na luminescência. A perda da estabilidade destas suspensões em valores de pH inferiores a 6,5 deve estar relacionada à diminuição da proporção de moléculas de AMP e AMS ionizadas visto que o valor de pK_{COO^-} conhecido para o grupo carboxílico presente nestes alcanos é de $pK_{COO^-} = 4,32$, para o AMP, e $pK_{COO^-} = 3,30$ e $4,54$, para o AMS. A redução da interação entre estes grupos funcionais e a água diminui a solubilidade dos pontos quânticos, ocasionando a precipitação destes, como demonstrado na Fig. 4.1 (NELSON; COX, 2004; YING *et al.*, 2008).

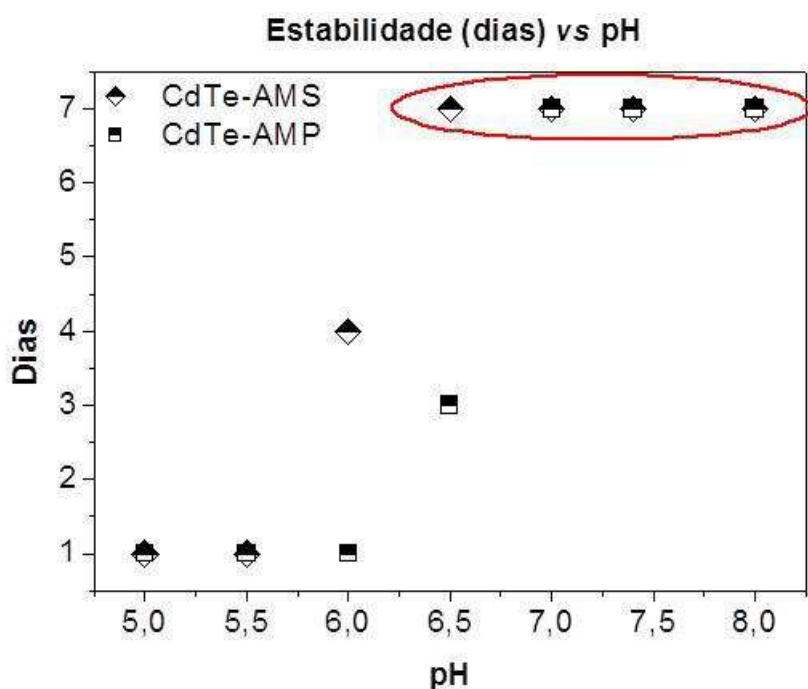


Fig. 4.1 Perda da estabilidade dos PQs de CdTe em função da variação do pH, demonstrando que CdTe-AMP permanece estável em pH > 6,5 e CdTe-AMS, em pH > 6,0.

A razão entre PQs e proteínas, utilizada na conjugação, foi experimentalmente determinada a partir da observação da estabilidade da suspensão coloidal frente a diferentes concentrações das proteínas. As proporções de (1:1), (2:1), (10:1), (100:1) e (600:1), entre CdTe-AMP e Con A, foram testadas em pH fisiológico, pH 7,4; numa concentração de 10^{15} nanocristais/mL e 14 mg/mL, 9,3 mg/mL, 2,5 mg/mL, 0,28 mg/mL e 50 µg/mL de proteína no conjugado. Apenas as suspensões com proporção de PQs:proteína de (100:1) e (600:1) permaneceram estáveis por até cinco dias, satisfazendo a escolha da razão entre pontos quânticos e proteínas utilizadas nos ensaios de conjugação. As demais suspensões perderam a estabilidade em menos de 24 horas.

4.2.2 Caracterização Óptica de CdTe Conjugado a Con A e Antigal-3

Os PQs conjugados às biomoléculas foram caracterizados por espectroscopia de absorção no UV-visível e de emissão e por dicroísmo circular.

Sistema CdTe-AMP/biomolécula

O espectro de absorção e emissão dos pontos quânticos de CdTe-AMP/Con A e CdTe-AMP/Antigal-3 são apresentados na Fig. 4.2. Observa-se uma pequena mudança no perfil de absorção dos pontos quânticos conjugados às proteínas, principalmente à Antigal-3 e uma razoável (ca. 50%) supressão da luminescência de ambos conjugados com relação à suspensão original (mesma concentração e pH).

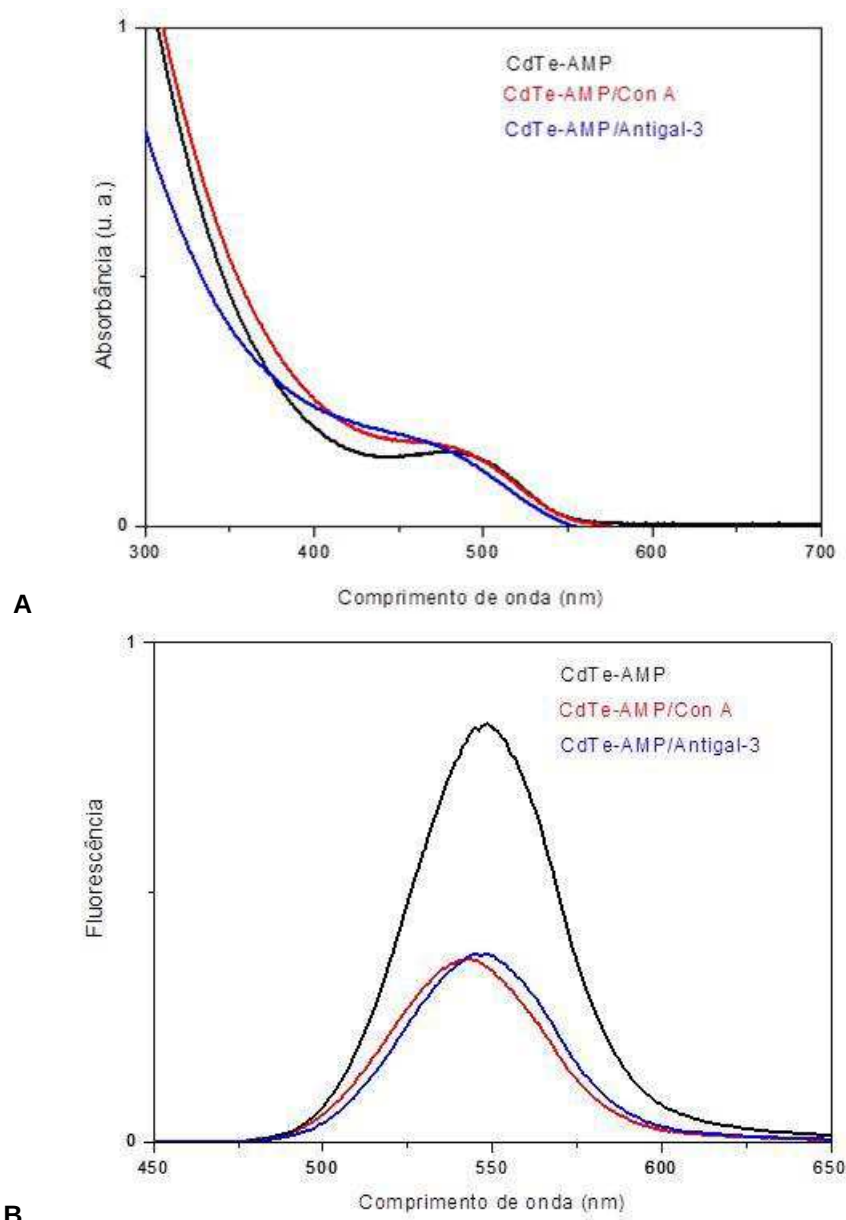


Fig. 4.2 (A) Espectros de absorção e (B) emissão dos pontos quânticos de CdTe-AMP conjugado a Con A e Antigal-3 ($\lambda_{exc} = 365$ nm).

Mudanças no espectro de absorção e emissão de um fluoróforo na presença de outra molécula sugerem a formação de um complexo no estado fundamental cuja redução na luminescência é associada ao efeito da supressão estática, ou *static quenching*, onde apenas a porção não complexada fluoresce (LAKOWICZ, 2006). No entanto, a redução na fluorescência dos bioconjugados formados pode estar associada à ligação de mais de um ponto quântico às proteínas, visto que o tamanho destes é de 2,0 nm, enquanto que a Con A têm cerca de 4,0 nm (EDELMAN *et al.*, 1972) e a Antigal-3 tem 12,0 nm (HARRIS; SKALETISKY; McPHERSON, 1998), tornando o efeito semelhante ao ocasionado pela supressão colisional, comum em soluções de concentrações elevadas (YU *et al.* 2007). Esta hipótese, no entanto, precisa ser ainda corroborada por dados experimentais.

A Figura 4.3 apresenta as bandas de fluorescência intrínseca das biomoléculas conjugadas aos pontos quânticos a CdTe-AMP ou CdTe-AMS. Observa-se neste caso intensa supressão da fluorescência que pode ser um indicativo da formação da associação entre os pontos quânticos e as proteínas. Neste caso, a supressão da luminescência pode ter sido ocasionada pela transferência de energia dos estados excitados das proteínas aos pontos quânticos, que apresentam intensa absorção em 350 nm (LAKOWICZ, 2006; PENG *et al.*, 2010).

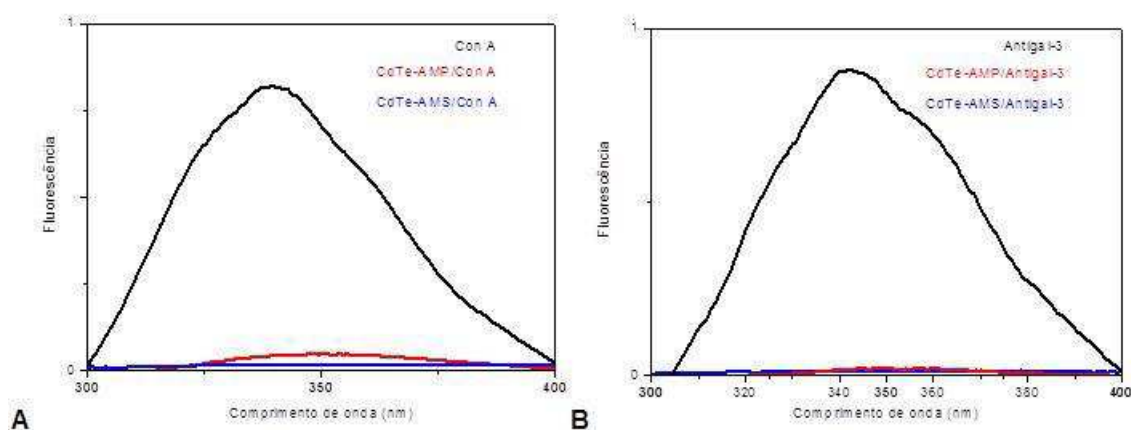


Fig. 4.3 Espectros de emissão para a (A) Con A e a (B) Antiga-3, conjugadas ou não aos pontos quânticos de CdTe-AMP e -AMS ($\lambda_{exc} = 280$ nm).

Sistema CdTe-AMS/biomolécula

O espectro de absorção e emissão dos pontos quânticos de CdTe-AMS/Con A e CdTe-AMS/Antigal-3 são apresentados na Fig. 4.4. Não foi evidenciada qualquer alteração no perfil de absorção e de emissão dos pontos quânticos conjugados às proteínas. O discreto aumento na intensidade de luminescência espectro de emissão de CdTe-AMS/Antigal-3 sugere que pode ter ocorrido transferência de energia entre a proteína e o pontos quânticos (SHI *et al.* 2009; PENG *et al.*, 2010).

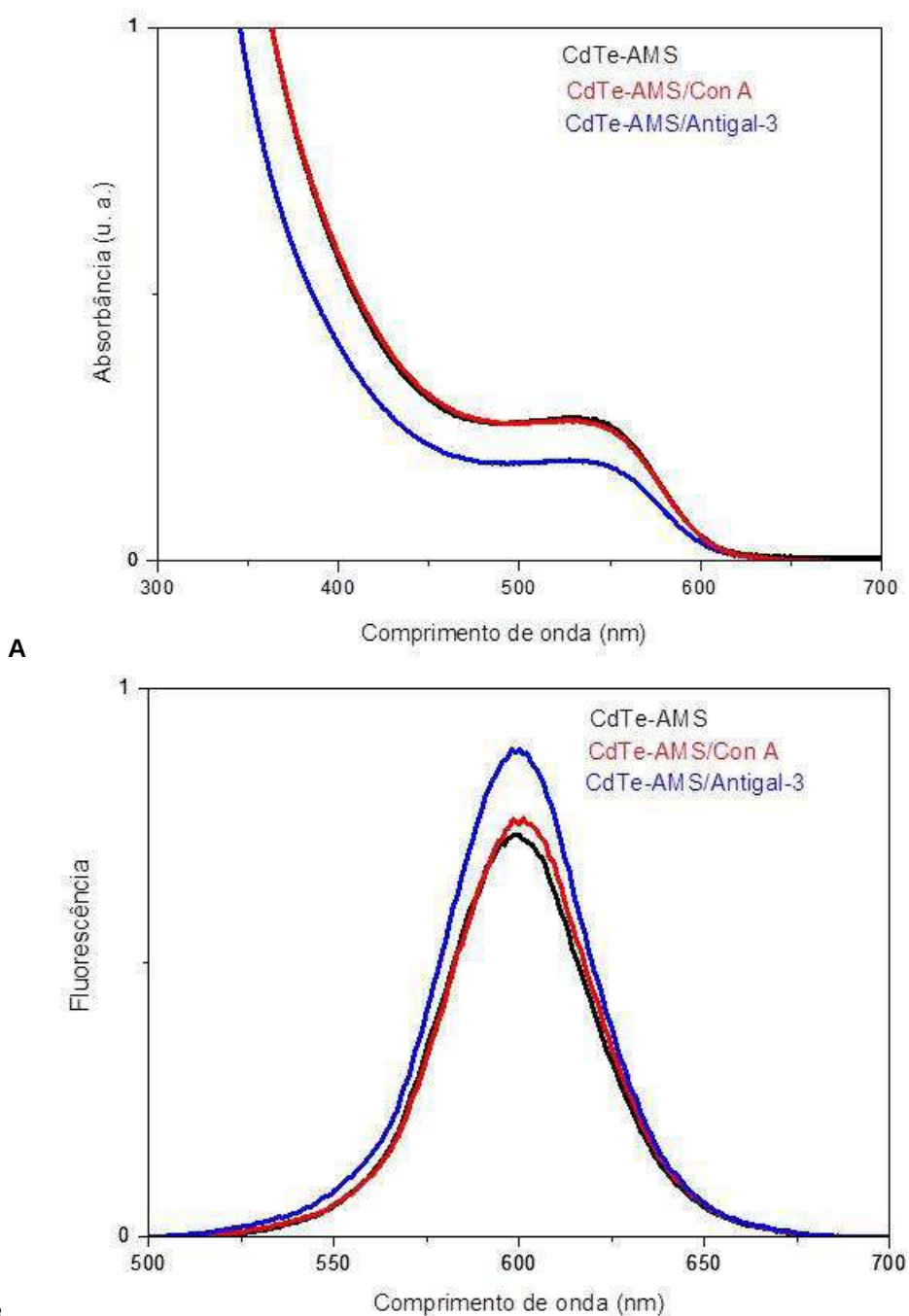


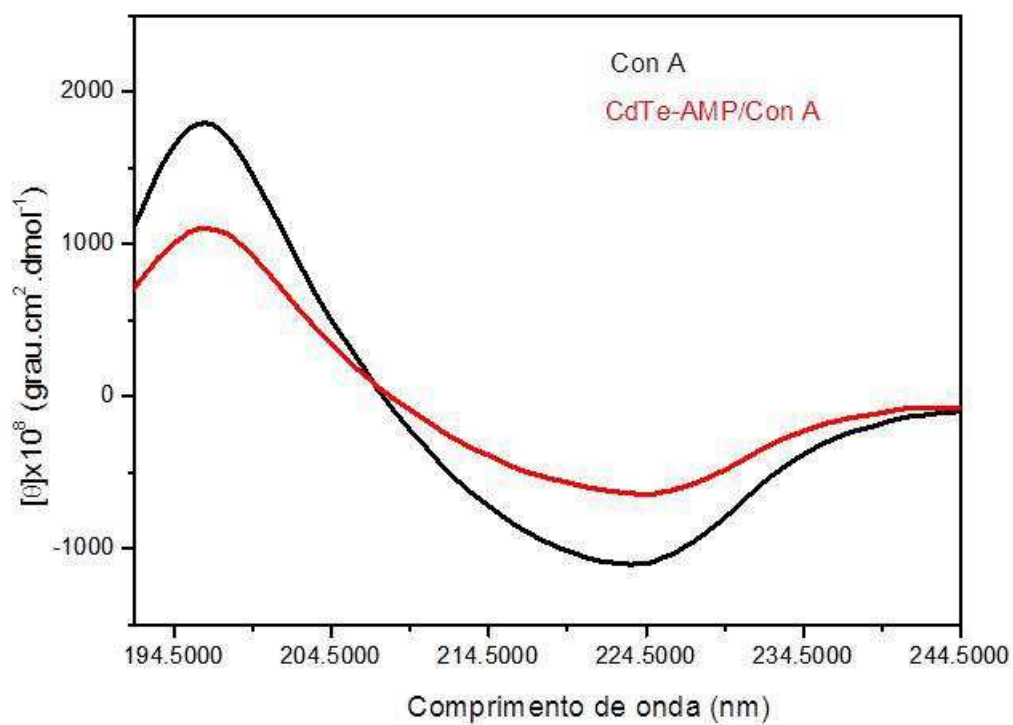
Fig. 4.4 (A) Espectros de absorção e (B) emissão dos pontos quânticos de CdTe-AMS, conjugado a Con A e Antigal-3.

4.2.3 Verificação da Integridade Estrutural das Proteínas

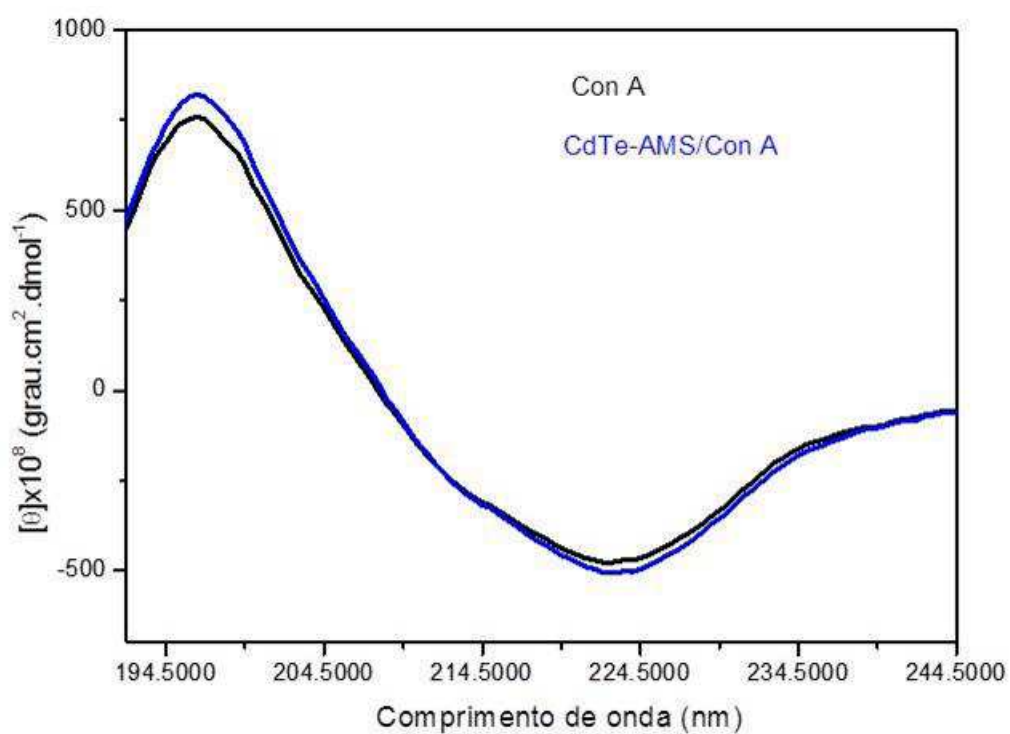
Após a conjugação das biomoléculas aos pontos quânticos foi realizada a caracterização estrutural das proteínas através da espectroscopia por dicroísmo circular. A lectina Con A é uma proteína cuja estrutura secundária é majoritariamente composta por folhas- β antiparalelas (HARDMAN; AINSWORTH, 1972). As proteínas que apresentam seus aminoácidos arranjados sob este tipo de estrutura, geralmente têm perfil de absorção diferencial caracterizado por uma banda negativa, em torno de 215 nm, e uma banda positiva, a 198 nm (SREERAMA; WOODY, 2004).

O espectro de absorção diferencial característico de proteínas que apresentam arranjo dos aminoácidos na forma de α -hélice apresenta duas bandas negativas de absorção, em torno de 222 e 208 nm, e uma banda positiva a 192 nm (KELLY; PRICE, 1997). Antigal-3 é um anticorpo monoclonal, produzido em rato, e que pertence à subclasse 1 da classe das imunoglobulinas G, IgG1, e apresenta estrutura secundária composta pelo arranjo em α -hélices e folhas- β , cuja maior porcentagem de α -hélice é demonstrado pela sobreposição da absorção diferencial típica para este tipo de estrutura (JANDA; CASADEVALL, 2010).

Os espectros de absorção diferencial das proteínas conjugadas ou não aos pontos quânticos de CdTe-AMP e CdTe-AMS, são apresentados na Fig. 4.5 e 4.6. Os resultados sugerem que a conjugação não ocasionou mudança estrutural nas proteínas; entretanto a redução na intensidade da absorção diferencial da Con A conjugada aos nanocristais de CdTe-AMP, pode estar relacionada à perda da estrutura secundária. Estudos teóricos predizem uma associação entre a intensidade das bandas de absorção diferencial, negativa e positiva, no espectro de dicroísmo circular da estrutura secundária do tipo folhas- β ao comprimento destas folhas- β ; de forma que um aumento na intensidade de ambas as bandas pode ser associado ao aumento do comprimento desta estrutura (SREERAMA; WOODY, 2004). Assim a redução na intensidade das bandas típicas para folhas- β pode ser um indicativo de perda desta estrutura secundária ao estado de glóbulo fundido ou *molten globule*, onde a molécula permanece compactada de forma semelhante à proteína nativa apesar de sofrer a perda em sua porção apolar (AHMAD et al., 2007; KHAN; NAEEM; BAIG, 2005).



A



B

Fig. 4.5 Espectros de absorção diferencial da luz circularmente polarizada apresentadas pela proteína Con A e os conjugados entre (A) CdTe-AMP/Con A e (B) CdTe-AMS/Con A.

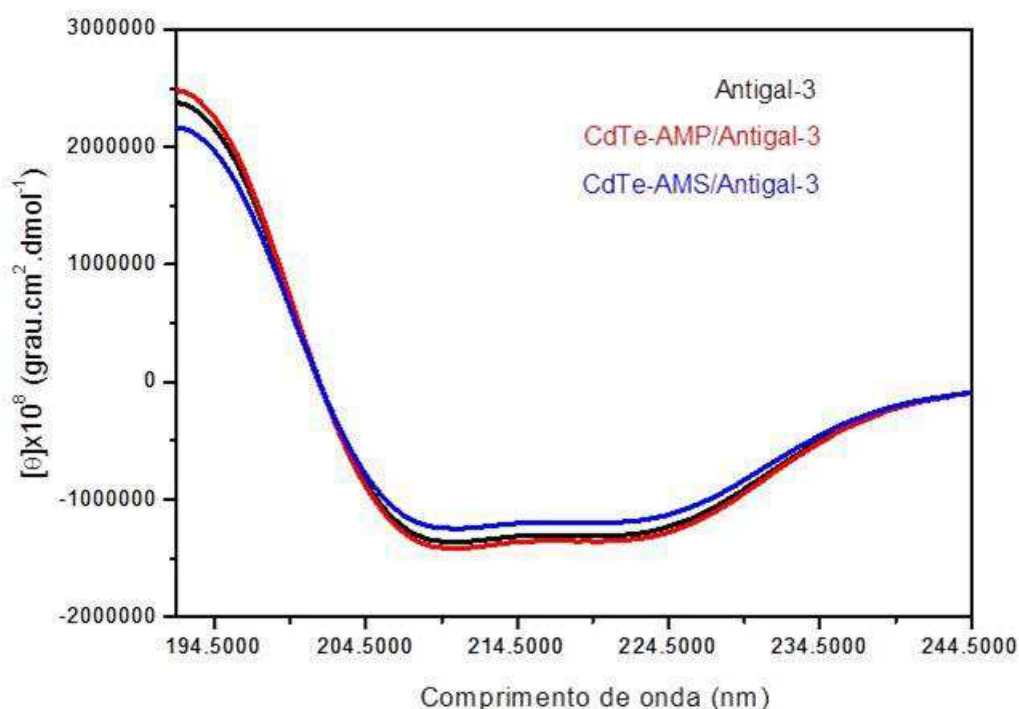


Fig. 4.6 Espectros de absorção diferencial da luz circularmente polarizada apresentadas pelo anticorpo Antical-3 e os conjugados entre CdTe-AMP /Antical-3 e CdTe-AMS/ Antical-3.

4.2.4 Avaliação da Eficiência da Conjugação

A eficiência da conjugação dos PQs conjugados a Con A e Antical-3, foi avaliada através da medida quantitativa da intensidade luminescente dos pontos quânticos conjugados. A adsorção, através de interações hidrofóbicas ou por coadsorção de íons (van DULM; NORDE; LYKLEMA, 1981), das proteínas previamente conjugadas aos pontos quânticos (sistemas-teste) e os sistemas-controle (PQs e proteínas não conjugadas, Con A e Antical-3), numa placa de poliestireno foi utilizada na avaliação da efetividade da conjugação dos pontos quânticos as proteínas.

Os valores estimados para a porcentagem de conjugação dos pontos quânticos de CdTe-AMP e -AMS, a Con A e Antical-3 estão apresentados na Tab. 4.1. Os resultados demonstram que a conjugação de CdTe -AMS e Con A apresentou melhor valor percentual de conjugação, onde o aumento da intensidade fluorescente para este sistema-teste, em relação aos sistemas-controle foi superior de 180%.

Os percentuais de conjugação apresentados pelos demais sistemas-teste indicam que a conjugação não ocorreu de forma tão efetiva quanto a interação entre os pontos quânticos de CdTe estabilizados/funcionalizados com AMS e a molécula de

Con A. Estes resultados sugerem que os pontos quânticos de CdTe -AMP e CdTe-AMS possam estar interagindo com as biomoléculas numa porção muito próxima aos sítios de interação hidrofóbica, presente na lectina e no anticorpo (EDELMAN; WANG, 1978; NELSON; COX, 2004) ou ocasionado impedimento estérico resultando numa menor taxa de adsorção das proteínas à placa.

Tab. 4.1 Percentual de conjugação dos pontos quânticos de CdTe-AMP e CdTe-AMS conjugados a Con A e Antigal-3.

	CdTe-AMP	CdTe-AMS
Con A	Controles: 656 ± 296 Teste: 1012 ± 392	Controles: 374 ± 75 Teste: 1079 ± 487
Aumento da intensidade	54%	188%
Antigal-3	Controles: 430 ± 78 Teste: 594 ± 121	Controles: 330 ± 36 Teste: 479 ± 116
Aumento da intensidade	38%	45%

4.2.5 Avaliação da Atividade Biológica de Con A

A atividade biológica da lectina Con A, antes e após a conjugação, foi realizada através do ensaio da atividade hemaglutinante. Os resultados demonstraram que os pontos quânticos de CdTe não apresentaram nenhuma capacidade hemaglutinante frente aos eritrócitos e que a lectina conjugada aos pontos quânticos preservou sua atividade biológica. Na Tab. 4.2 são apresentados os valores para as unidades de atividade hemaglutinante, UAH, para os sistemas avaliados.

Tab. 4.2 Valores da atividade hemaglutinante, UAH, para a Con A conjugada aos pontos quânticos de CdTe-AMP e CdTe-AMS e para os sistemas-controle.

Sistema	Atividade Hemaglutinante (UAH)
Con A	64
CdTe -AMP/Con A	128
CdTe -AMP	Sem atividade
CdTe-AMS/Con A	128
CdTe-AMS	Sem atividade

Os valores para atividade hemaglutinante apresentada para a Con A conjugada aos pontos quânticos demonstra que a proteína não sofreu alteração em sua estrutura quaternária, passível de ocorrer nos processos de adsorção de proteínas a diversos materiais (RABE; VERDES; SEEGER, 2011), bem como a interação não alterou a capacidade de reconhecimento a carboidratos da proteína, que permaneceu com sua atividade biológica. Os resultados também demonstram que a atividade da proteína não conjugada é duas vezes menor que o apresentado pela proteína conjugada, isto pode ter sido ocasionado por possíveis interações hidrofóbicas ou coadsorção de íons, entre a proteína e a placa de microtitulação, composta por poliestireno (NAKANISHI; SUKIYAMA; IMAMURA, 2001; NORDE; LYKLEMA, 1989; van DULM; NORDE; LYKLEMA, 1981). Uma vez ligada aos pontos quânticos, é possível que a interação entre a proteína e a placa tenha sido reduzida, ocasionando a observação da atividade hemaglutinante para a proteína conjugada num valor superior ao observado para a proteína não conjugada.

4.3 Marcação de *C. albicans*

A marcação das leveduras e do biofilme de *Candida albicans* ATCC 90028 foi utilizada como uma forma adicional de observação da atividade da lectina após a conjugação aos pontos de CdTe -AMP e CdTe-MAS, devido as seguintes características apresentadas por este microrganismo:

- Os fungos são microrganismos que apresentarem parede celular composta por carboidratos (80-90%; β -glucanas, quitina e glico[manno]proteínas), proteínas (6-25%) e lipídios (1-7%), favorecendo a ligação da Con A nesta estrutura celular fúngica (CHAFFIN *et al.*, 1998).

- A *C. albicans* é um fungo que apresenta diversificação de sua morfologia dependente da temperatura, pH e estágio nutricional, podendo apresentar a forma de levedura, não patogênica a 30°C; ou a forma filamentosa (hifas, pseudohifas e tubo germinativo) e patogênica a 37°C, que compõem o biofilme (WANSLEY; BANERJEE; McGEADY, 2003).

As suspensões de células a 10^7 UFC/mL foram incubadas aos pontos quânticos, conjugados ou não a Con A, durante 30 minutos, e em seguida foram microscopicamente analisadas. As imagens por contraste de fase óptico e por

fluorescência das células de *C. albicans* marcadas com CdTe-AMP e CdTe-AMS conjugados a Con A constam na Fig. 4.7.

As leveduras incubadas com os pontos quânticos não conjugados a lectina, não apresentaram fluorescência; demonstrando que a marcação observada nas células incubadas com os CdTe-AMP/Con A e CdTe-AMS/Con A foi mediada pela ligação específica entre Con A e as glico(mano)proteínas da parede celular da levedura. Estes resultados permitem concluir que a conjugação, entre os pontos quânticos e a Con A ocorreu de forma satisfatória: não induziu mudanças significativas na estrutura da proteína nem alterou sua atividade biológica.

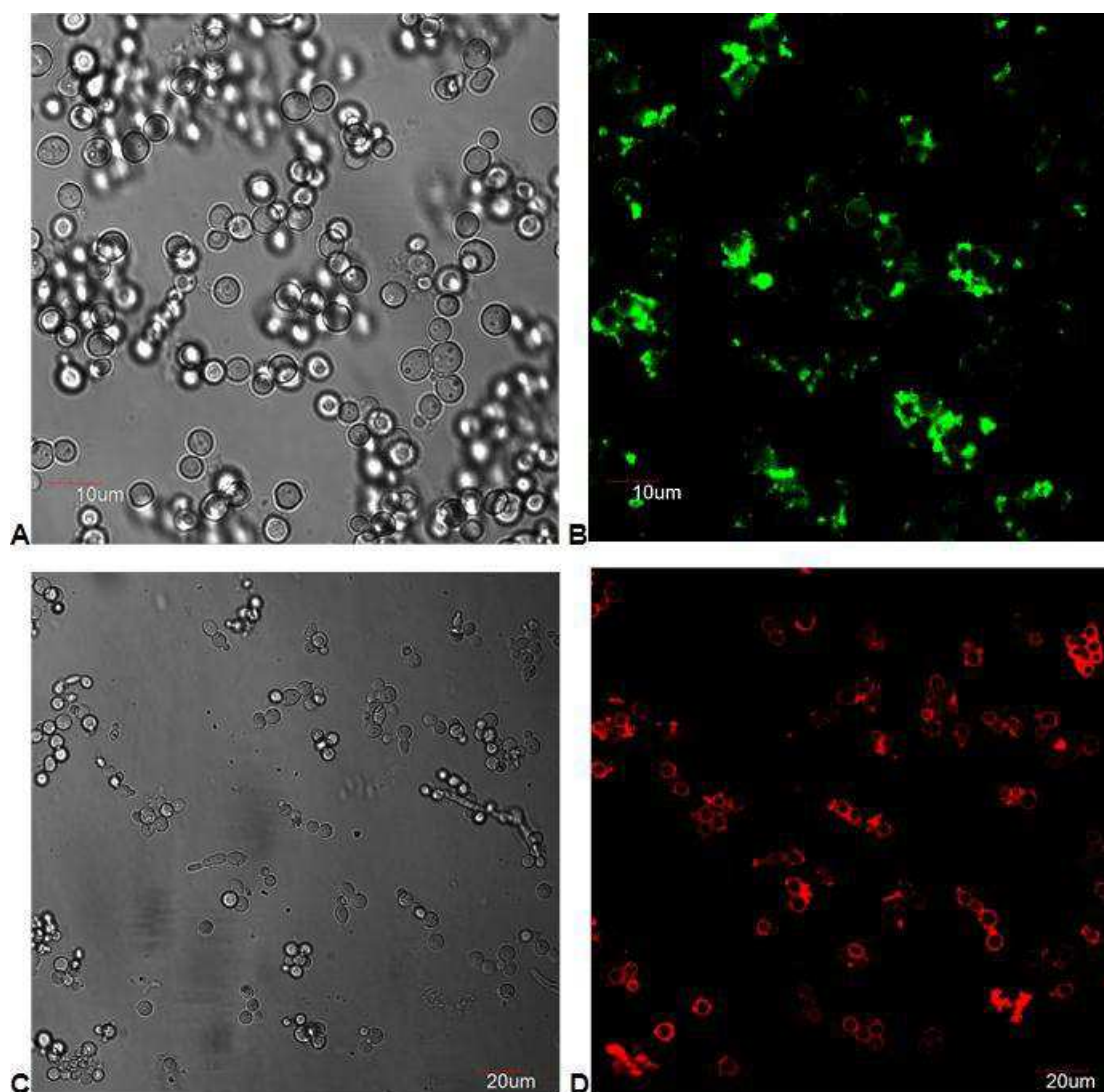


Fig. 4.7 Imagens de contraste de fase óptico (A e C) e de microscopia confocal (B e D) das leveduras de *C. albicans* marcadas por (A e B) CdTe-AMP/Con A e (C e D) CdTe-AMS/Con A. $\lambda_{exc} = 473$ nm.

O biofilme de *C. albicans* foi desenvolvido após 48 h de crescimento a 37 °C, sob uma lamínula submersa numa suspensão a 10^7 UFC/mL, em tampão fosfato salino 0,01M. Cada lamínula foi incubada com os pontos quânticos, conjugados ou não a Con A, durante 1½ h, e em seguida foram microscopicamente analisadas. A incubação dos biofilmes com os pontos quânticos conjugados ou não conjugados a lectina apresentou comportamento semelhante ao observado para as leveduras, onde apenas os biofilmes incubados aos pontos quânticos conjugados a Con A apresentaram fluorescência. As imagens dos biofilmes de *C. albicans* marcados por CdTe-AMP e CdTe-AMS conjugados a Con A são demonstrados na Fig. 4.8.

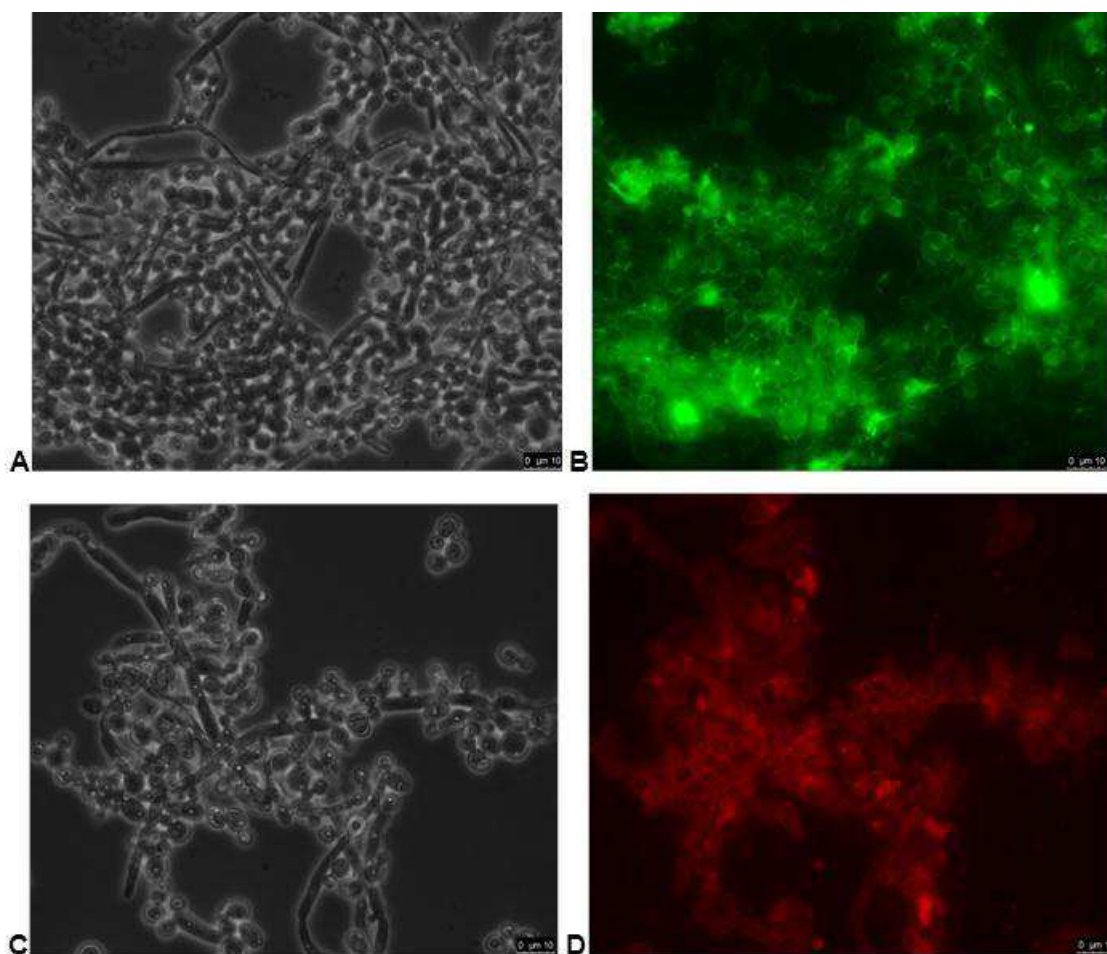


Fig. 4.8 Imagens de contraste de fase óptico (A e C) e de microscopia de fluorescência (B e D) do biofilme de *C. albicans* marcado por (A e B) CdTe-AMP/Con A e (C e D) CdTe-AMS/Con A. $\lambda_{exc} = 480/40$ nm e $\lambda_{exc} = 560/40$ nm, respectivamente.

As imagens demonstram que a marcação abrangeu a todas as formas de apresentação de *C. albicans* observáveis no biofilme: leveduras em brotamento ou

não, pseudo-hifas e hifas; apesar de apresentarem pequena modificação no percentual dos constituintes da parede celular (CHAFFIN *et al.*, 1998).

4.4 Marcação Histoquímica das Lesões e Tecido de Mama Normal

O emprego de PQs em protocolos de marcação histoquímica tem permitido a marcação de moléculas biológicas como: o receptor-2 do fator de crescimento epidérmico humano, em câncer de mama invasivo (CHEN *et al.*, 2009), a detecção de antígenos da camada de pigmentos da retina humana (PETTY *et al.*, 2010), a visualização e localização intracelular do homônio do crescimento e prolactina, na glândula pituitária de ratos (MATSUNO *et al.*, 2005) e a observação do perfil de glicosilação na mama normal e com fibroadenoma (SANTOS *et al.*, 2006).

Nesse estudo, PQs de CdTe-AMP e CdTe-AMS, conjugados a Con A e Antígal-3, foram aplicados como marcadores biológicos fluorescentes em protocolos de marcação histoquímica de secções da mama normal (MN), com fibroadenoma (FIB) e com carcinoma ductal invasivo (CDI) devido as seguintes motivações:

- A Con A é uma lectina de reconhecimento específico aos resíduos α -D-manopiranosil e α -D-glicopiranosil (DEREWENDA *et al.*, 1989), que permite a observação de diferentes perfis de glicosilação celular quando aplicada no estudo do câncer (LIMA *et al.*, 201; MITANI; MURAKAMI; TANAKA, 1984).

- A galectina-3 é uma lectina animal que apresenta variação do perfil de expressão em processos fisiológicos (por exemplo, inflamação) e tem sido correlacionada à progressão tumoral e metástase (BALAN; NANGIA-MAKKER; RAZ, 2010; RABINOVICH; RUBINSTEIN; TOSCANO, 2002); podendo ser detectada pela ligação específica ao anticorpo monoclonal antigalectina-3 (Antígal-3).

- As diferenças apresentadas entre o tecido de MN, FIB e CDI, como descrito anteriormente; onde o tecido de MN é caracterizado pela presença de células mioepiteliais em torno das glândulas, separadas por tecido conjuntivo denso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008); o FIB apresenta proliferação acentuada de tecido glandular (epitelial) e estromal (conjuntivo e adiposo), podendo resultar na compressão dos ductos (KUIJPER *et al.*, 2001); e no CDI as glândulas apresentam forma e tamanho variado, arranjo desordenado e ausência de camada mioepitelial verdadeira, com margens irregulares e presença de infiltração variável de tecido adiposo adjacente, caracterizando o câncer propriamente dito (GUINEBRETIÈRE *et al.*, 2005; SINGH, 2012).

- E, a ocorrência de alterações no perfil molecular apresentado pelos tecidos em estados fisiopatológicos, comparados ao tecido normal, sugerindo que os tecidos com FIB e CDI apresentem alterações no perfil glicosídico celular, permitindo inclusive a discriminação entre lesões benignas e câncer, que é caracterizado por apresentar elevado grau de glicosilação celular (CAZET *et al.*, 2010; SPIRO, 2002).

Os resultados apresentados demonstraram que os PQs de CdTe-AMP/Con A e CdTe-AMP/Antigal-3 não desempenharam marcações satisfatórias sob as condições analisadas. Embora CdTe-AMP/Con A tenha demonstrado excelente marcação das células de *C. albicans* (leveduras e biofilme), as alterações estruturais na lectina podem ter desfavorecido sua interação ao tecido; assim como a redução da fluorescência do ponto quântico conjugado pode ter ocasionando a visualização não expressiva destas marcações.

Por outro lado, o insucesso da marcação de CdTe-AMP/Antigal-3 pode ter sido ocasionado pela interação do ponto quântico no sítio de reconhecimento antigênico do anticorpo, reduzindo ou impedindo a ligação específica à galectina-3; tendo em vista que as interações entre antígeno e anticorpo ocorrem através interações moleculares fracas (ex. ligação de hidrogênio, van der Waals, interações hidrofóbicas e forças eletrostáticas) que atuam a curta distância: $\sim 1 \text{ \AA}$ (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000).

As marcações realizadas por CdTe-AMS/Con A e CdTe-AMS/Antigal-3 demonstraram resultados muito interessantes. A marcação do tecido de MN com CdTe-AMS/Con A não demonstrou marcação expressiva de nenhuma estrutura tecidual, conforme Fig. 4.9.

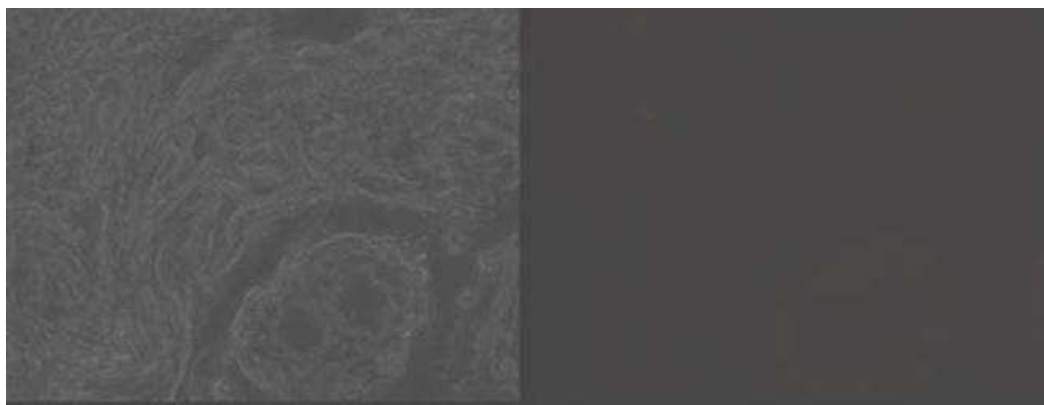


Fig. 4.9 Imagens de contraste de fase óptico e de fluorescência do tecido MN incubado com CdTe-AMS/Con A por 2 h, demonstrando ausência de marcação. Magnif. 200x. $\lambda_{exc} = 560/40 \text{ nm}$.

A interação entre estes pontos quânticos e as lesões de mama demonstrou um perfil de marcação diferencial entre eles. O perfil de marcação glicosídica nos tecidos com FIB, incubados com CdTe–AMS/Con A, demonstrou uma marcação fraca e, por vezes, ausente do tecido conjuntivo e das células epiteliais glandulares e mioepiteliais, sugerindo a reduzida expressão dos glicoconjugados no tecido sob esta condição fisiopatológica, Fig. 4.10.

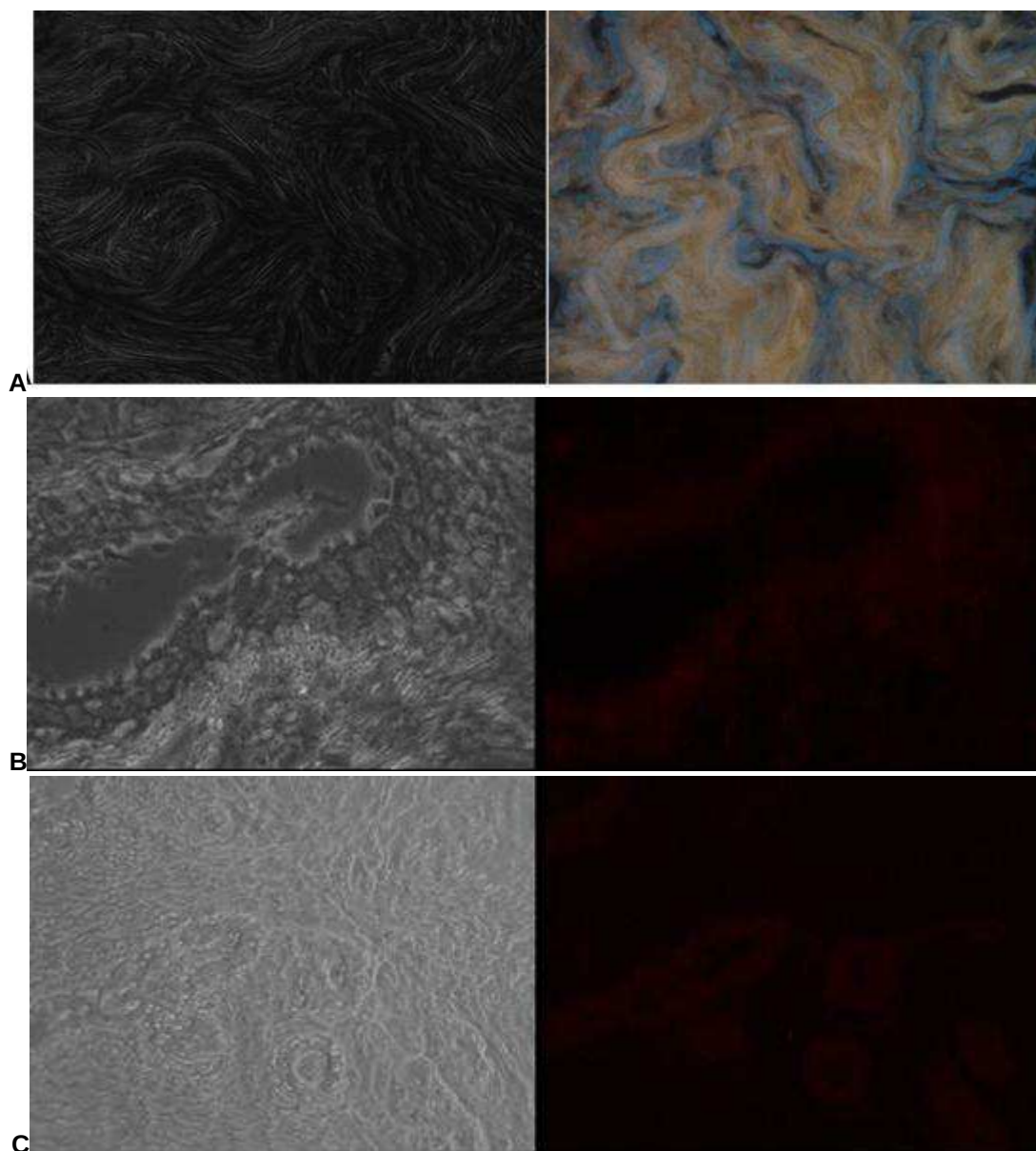


Fig. 4.10 Imagens de contraste de fase óptico e de fluorescência dos tecidos de mama com FIB incubados com CdTe–AMS/Con A por 2 h. (A) Imagem de vasta região de tecido conjuntivo. Magnif. 400x. (B e C) Imagem de tecido glandular demonstrando marcação pronunciada das glândulas mamárias. Magnif. 400x. e 200x. $\lambda_{exc} = 560/40$ nm.

A incubação dos tecidos com CDI e CdTe-AMS/Con A demonstrou marcação fraca ou ausente do estroma e marcação específica do epitélio glandular, Fig. 4.11.

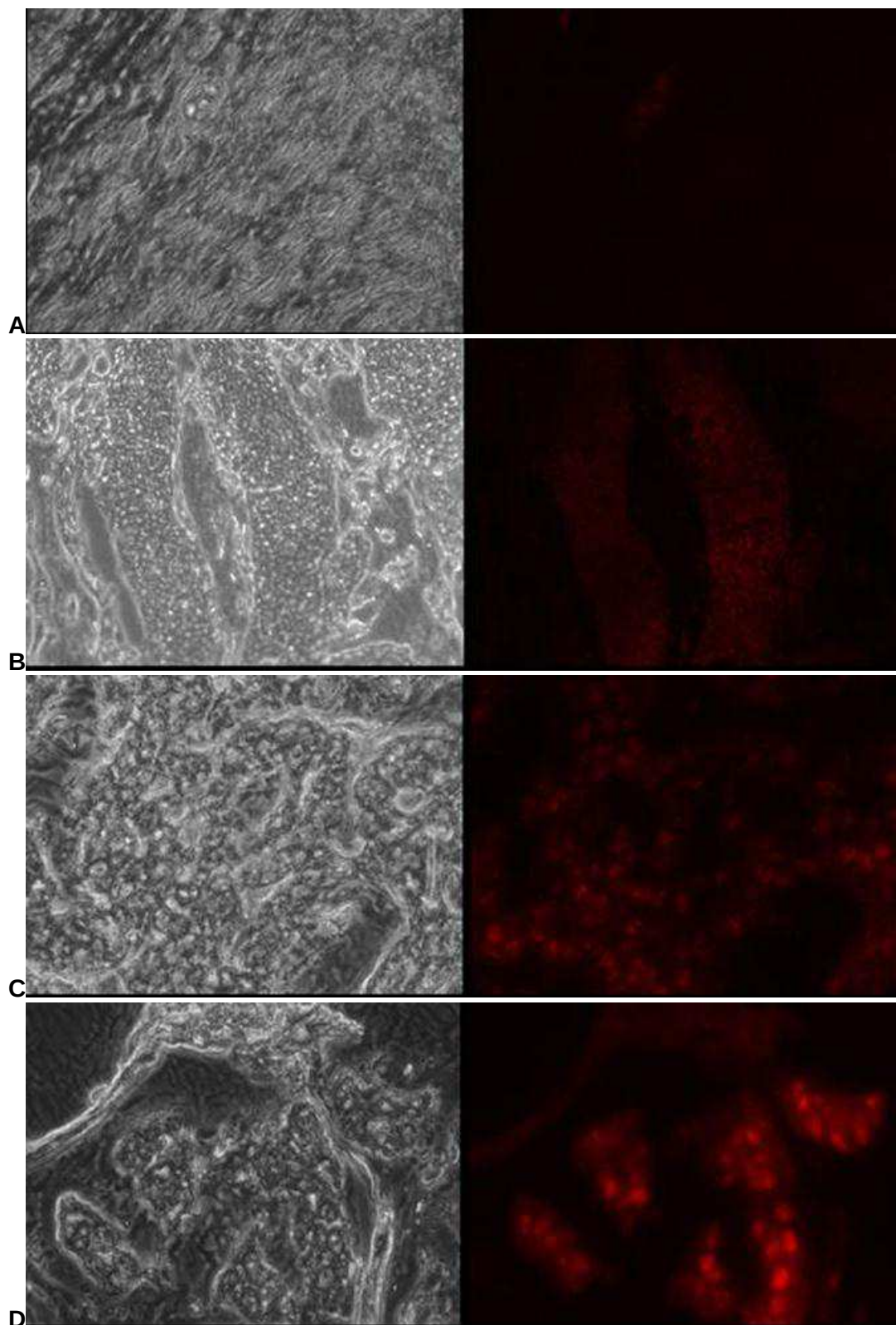


Fig. 4.11 Imagens de contraste de fase óptico e de fluorescência dos tecidos com CDI incubados com CdTe-AMS/Con A por 2 h. (A) Região de tecido conjuntivo. Magnif. 200x. (B) Tecido glandular invasivo demonstrando marcação diferenciada das glândulas mamárias. Magnif. 200x. (C e D) Tecido em elevado grau de desestruturação, sem diferenciação entre a região glandular e estromal, demonstrando marcação preferencial do tecido epitelial. Magnif. 630x. $\lambda_{exc} = 560/40$ nm.

Resultados semelhantes foram observados na marcação de tecidos com fibroadenoma comparados aos tecidos de mama normal (SANTOS *et al.*, 2006). E, de forma semelhante a marcação de tecidos com hiperplasia prostática benigna e adenocarcima prostático comparados ao tecido normal, os resultados sugerem um aumento no perfil glicosídico celular com o aumento do grau de desdiferenciação tecidual (LIMA *et al.*, 2010).

A marcação do tecido de MN com CdTe-AMS/Antigal-3 apresentou intensa marcação do estroma e marcação ausente do tecido glandular, Fig. 4.12.

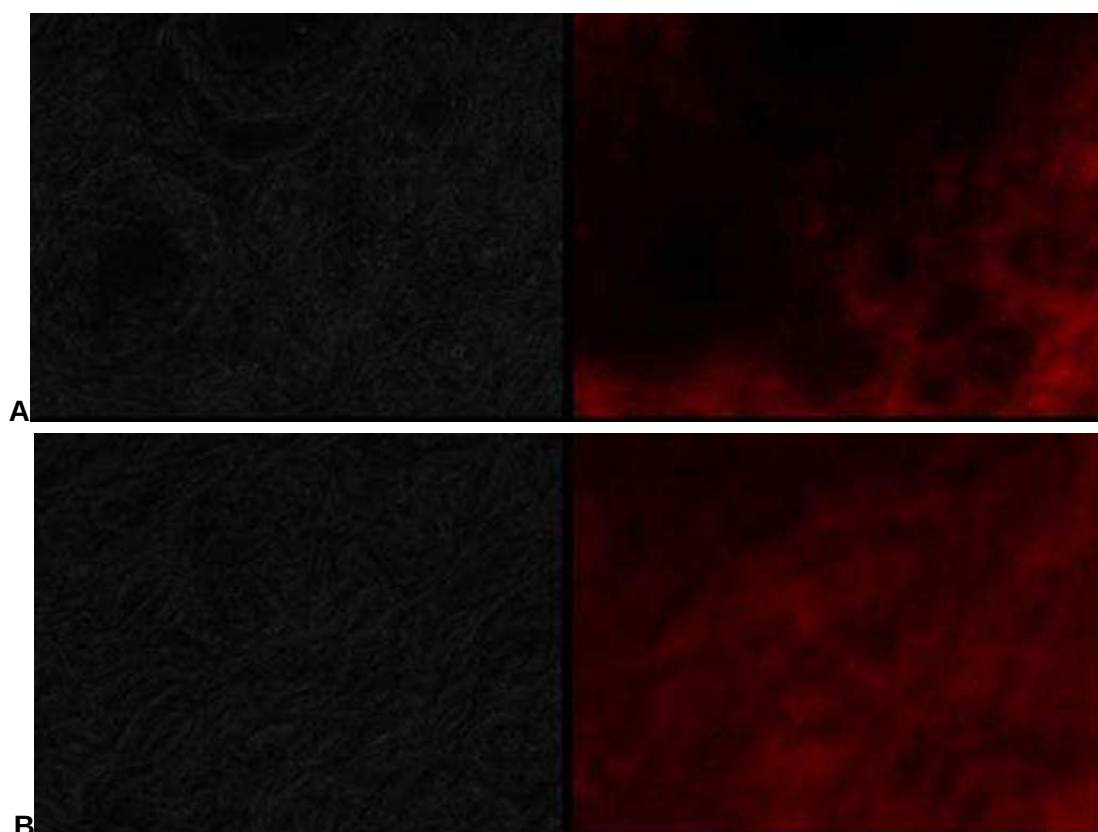


Fig. 4.12 Imagens de contraste de fase óptico e de fluorescência do tecido MN incubado com CdTe-AMS/Antigal-3 por 20 h, (A) demonstrando marcação ausente das glândulas mamárias e (B) marcação pronunciada do estroma. Magnif. 200x. $\lambda_{exc} = 560/40$ nm.

Não foi observada marcação nas secções teciduais com FIB ou CDI incubadas por 2 h com CdTe-AMS/Antigal-3. Entretanto a incubação por 20 h demonstrou um perfil de marcação diferencial da galectina-3, em ambos os tecidos. Na marcação dos tecidos com FIB foi observada marcação das células glandulares e mioepiteliais, e do tecido conjuntivo, demonstrando a expressão de galectina-3, Fig. 4 13.

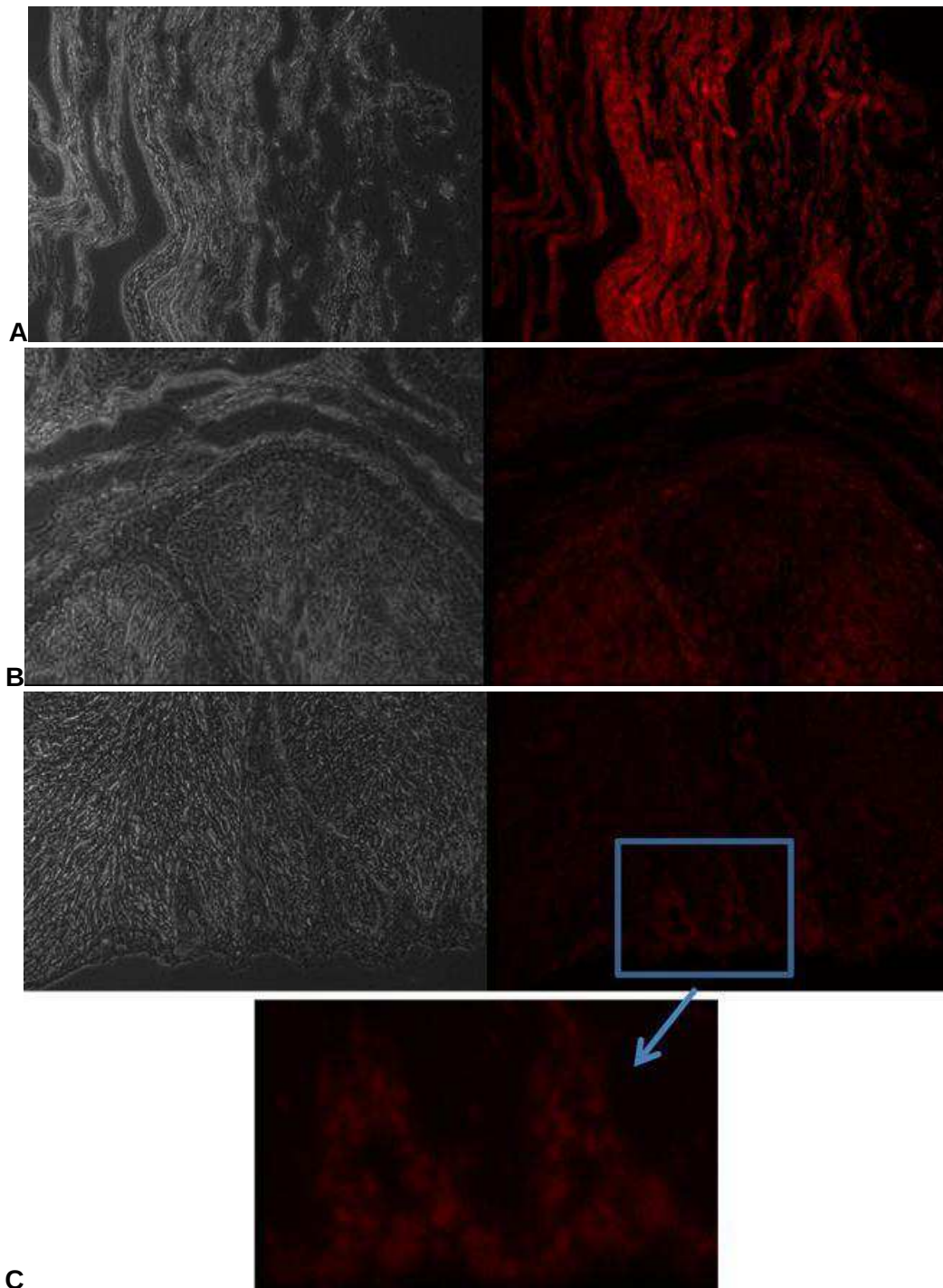


Fig. 4.13 Imagens de contraste de fase óptico e de fluorescência dos tecidos com FIB incubados com CdTe-AMS/Antigal-3, por 20 h. (A) Região de tecido conjuntivo. (B) Marcação das glândulas e do estroma mamário. (C) Destaque para a marcação das células epiteliais. Magnif. 200x e 630x (destaque). $\lambda_{exc} = 560/40$ nm.

A incubação das secções teciduais com CDI e CdTe-AMS/Antigal-3, por 20 h, favoreceu a visualização da marcação específica das células epiteliais glandulares, conforme demonstrado em destaque; e marcação ausente do tecido conjuntivo envolvente (estroma), Fig. 4. 14.

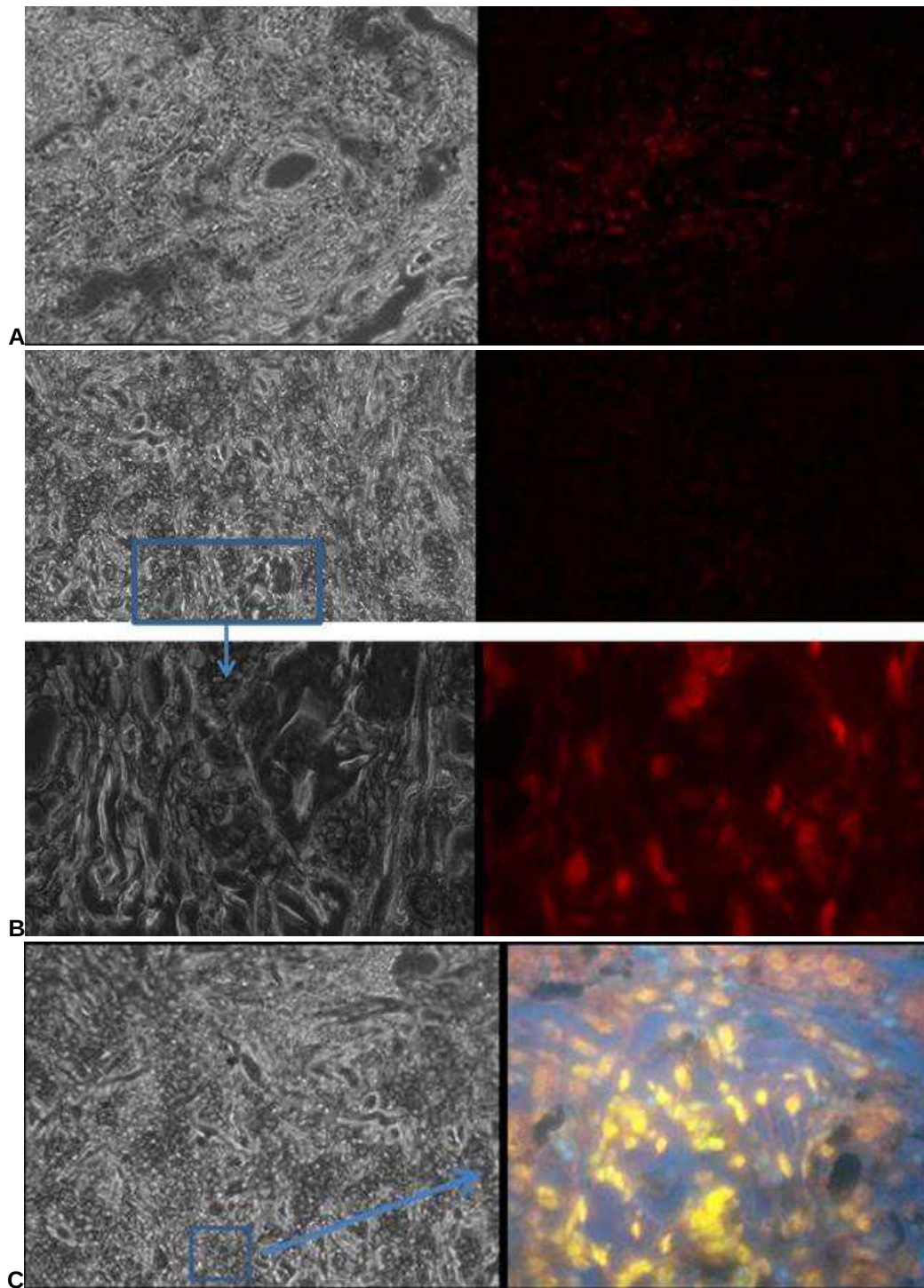


Fig. 4.14 Imagens de contraste de fase óptico e de fluorescência dos tecidos de mama com CDI incubados com CdTe–AMS/Antigal-3, por 20 h. (A) Imagem de região indiferenciada dos tecidos da mama demonstrando marcação das células epiteliais. Magnif. 200x. (B e C) Imagem demonstrando em destaque a marcação preferencial das células epiteliais difusas no estroma. Magnif. 200x e 630x. $\lambda_{exc} = 560/40$ nm.

O perfil de marcação observado demonstrou que a lectina endógena galectina-3 está presente em maior intensidade nas células epiteliais dos tecidos acometidos pelas lesões benigna e maligna da mama.

A expressão considerável de galectina-3 no estroma dos tecidos com FIB é um indicativo da ancoragem das células à matriz extracelular, em contraposição ao observado no tecido com CDI cuja reduzida expressão no tecido conjuntivo das lesões malignas propicia a migração de células cancerígenas a outros tecidos, sugerindo a demonstração do potencial de invasividade deste tipo de lesão (SHEKHAR *et al.*, 2004; SUJATHAN *et al.*, 2011).

Outros estudos indicam que a clivagem da galectina-3 por metaloproteinases da matriz extracelular, MEC, resulta num fragmento no qual o domínio de reconhecimento de carboidratos é conservado, e em outro no qual consta a porção amino-terminal, que é responsável pela promoção da homodimerização desta proteína e a consequente ativação de sua atividade biológica (OCHIENG *et al.*, 1998). Em tecidos com CDI, o percentual de galectina-3 clivada é considerado elevado (NANGIA-MAKKER *et al.*, 2010). A ligação do fragmento clivado de galectina-3 aos sítios ligantes de galectina-3, na MEC, impede a interação entre a proteína não clivada e os respectivos sítios de ligação desta proteína (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Em resumo, estes resultados demonstram que há uma redução no perfil de expressão de galectina-3 no estroma dos tecidos de mama acometidos por lesões benigna e maligna e uma crescente expressão nas células epiteliais, presente em maior grau nas lesões cancerígenas.

CAPÍTULO 5

Conclusões e Perspectivas

Conclusões e Perspectivas

Neste trabalho foram preparados pontos quânticos de CdTe com o uso de dois tipos de estabilizantes: ácido 3-mercaptopacético, AMP, e ácido mercaptosuccínico, AMS. A caracterização estrutural destes materiais demonstrou que foram obtidas nanopartículas de 2,0, para CdTe-AMP, e 3,0 nm de diâmetro, para CdTe-AMS, com simetria cúbica blenda de zinco, analisados por DRX e MET, e raio hidrodinâmico de 24,2 e 29,4 nm, respectivamente.

O efeito do confinamento quântico dos elétrons de CdTe, demonstrou que as suspensões deste material apresentaram primeiro máximo de absorção em $\lambda = 488$ nm, para CdTe-AMP, e $\lambda = 547$ nm, para CdTe-AMS; e emissão máxima em $\lambda = 540$ nm, para CdTe-AMP, e $\lambda = 600$ nm, para CdTe-AMS.

Através da fórmula empírica que correlaciona o primeiro máximo de absorção ao tamanho das nanopartículas, obtivemos resultados semelhantes aos obtidos através da caracterização estrutural destes materiais.

A observação da estabilidade destas nanopartículas a diferentes valores de pH demonstrou que CdTe-AMP perdeu estabilidade em valores inferiores a pH = 6,5 e CdTe-AMS, permaneceu estável somente em valores de pH maiores do que pH = 6,0, possivelmente ocasionada pela menor interação entre os grupos funcionais dos agentes estabilizantes e a água, em valores de pH próximos ao valor do pK_{COO^-} de seus grupos carboxílicos.

A estabilidade das suspensões de CdTe frente a variadas concentrações de Con A foi mantida apenas para a razão entre pontos quânticos e proteína, na ordem de 100:1, correspondendo a concentração de $\sim 10^{15}$ nanopartículas/mL e 0,028 g/mL de proteína.

A conjugação de CdTe a lectina Con A e ao anticorpo Antigal-3 demonstrou que as proteínas não perderam sua estrutura secundária após a conjugação, ao serem analisadas por dicroísmo circular; e que a atividade biológica da lectina foi preservada após o processo de conjugação, conforme foi demonstrado pelo ensaio de atividade hemaglutinante e marcação das leveduras e do biofilme de *C. albicans*.

O ensaio para avaliação da conjugação demonstrou que CdTe-AMS/Con A apresentou melhor resultado, com um aumento superior a 180% na intensidade fluorescente do conjugado em relação aos controles.

A caracterização óptica dos conjugados demonstrou que a suspensão de CdTe-AMP conjugada a Con A e Antigal-3 sofreu redução de cerca de 50% da intensidade de fluorescência comparada a CdTe-AMP sob mesmas condições, sugerindo que pode ter ocorrido a associação de mais de um ponto quântico por proteína. Nenhuma mudança foi evidenciada no espectro de absorção.

A suspensão de CdTe-AMS conjugada às biomoléculas não demonstrou alteração em seu perfil de absorção. A emissão deste ponto quântico conjugado em relação aos pontos quânticos não conjugados demonstrou leve aumento na intensidade fluorescente sugerindo que possa ter ocorrido transferência de energia fluorescente entre a proteína e o CdTe-AMS.

O uso dos conjugados de CdTe-AMP/Con A e CdTe-AMP/Antigal-3 em protocolos de marcação histoquímica de lesões de mama não apresentaram resultados satisfatórios sugerindo que, sob as condições analisadas, estes conjugados não corresponderam a marcadores fluorescentes eficientes. Este resultado pode ter sido ocasionado pela possível interação do ponto quântico no sítio de reconhecimento antigênico do anticorpo, reduzindo ou impedindo a ligação específica a galectina-3 e pelas alterações estruturais na lectina, evidenciadas por dicroísmo circular.

A interação entre CdTe-AMS/Con A e CdTe-AMS/Antigal-3 e os tecidos de mama demonstraram um perfil de marcação diferencial entre eles. Nenhuma marcação foi evidenciada para os tecidos de MN marcados com CdTe-AMS/Con A. O perfil de expressão glicosídica nos tecidos com FIB incubados com CdTe-AMS/Con A, demonstrou uma marcação fraca e, por vezes, ausente do tecido conjuntivo envolvente às glândulas e das células epiteliais glandulares e mioepiteliais.

A incubação entre as secções teciduais com CDI e CdTe-AMS/Con A, foi representada por uma marcação fraca ou ausente do tecido conjuntivo e marcação específica, em intensidade representativa, das células epiteliais glandulares, sugerindo um aumento no perfil de expressão glicosídica com o aumento do grau de desdiferenciação tecidual.

Os tecidos de mama normal incubados com CdTe-AMS/Antigal-3 demonstraram marcação ausente das células epiteliais glandulares e marcação expressiva do estroma tecidual. A marcação com FIB incubados com CdTe-AMS/Antigal-3 demonstraram marcação das células epiteliais glandulares e células mioepiteliais adjacentes; e as secções teciduais com CDI, marcadas com CdTe-

AMS/Antigal-3, demonstraram marcação específica de células epiteliais glandulares com marcação ausente do tecido conjuntivo envolvente (estroma).

Estes resultados sugerem que o CdTe-AMS conjugado as biomoléculas estudadas pode ser utilizado como um marcador biológico fluorescente no estudo das alterações glicídicas envolvidas no desenvolvimento do câncer.

O emprego destes nanomateriais no estudo do câncer de mama, como uma ferramenta diagnóstica auxiliar; pode auxiliar o tratamento desta doença, proporcionando um enfrentamento mais eficaz e menos invasivo aos pacientes acometidos pelo câncer de mama.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAIR-KIRK, T. L.; SENIOR, R. M. Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. 40: 1101–1110, 2008.
- AHMAD, E.; NAEEM, A.; JAVED, S.; YADAV, S.; KHAN, R. H. The minimal structural requirement of concanavalin A that retains its functional aspects. **Journal of Biochemistry**. 142: 307–315, 2007.
- AHMED, H.; BANERJEE, P. P.; VASTA, G. R. Differential expression of galectins in normal, benign and malignant prostate epithelial cells: silencing of galectin-3 expression in prostate cancer by its promoter methylation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 358: 241–246, 2007.
- ALBERTS, B.; *et al.* **Molecular Biology of the Cell**. 4th ed. Ed. Garland. 2002.
- AL-DOURI, Y. The pressure effect of the bulk modulus seen by the charge density in CdX compounds. **Materials Chemistry and Physics**. 78: 625-629, 2003.
- ANTANOVA, L.; ARONSON, K.; MUELLER, C. R. Stress and breast cancer: from epidemiology to molecular biology. **Breast Cancer Research**. 13: 208, 2011.
- ANGATA, T.; BRINKMAN-Van der LINDEN, T. C. M. I-type lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1572: 294-316, 2002.
- AZZAZY, H. M. E.; MANSOUR, M. M. H.; KAZMIERCZAK, S. C. Nanodiagnostics: a new frontier for clinical laboratory medicine. **Clinical Chemistry**, 52(7): 1238–1246, 2006.
- BAILEY, R. E.; SMITH, A. M.; NIE, S. Quantum dots in biology and medicine. **Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures**. 25: 1–12, 2004.
- BAKALOVA, R.; ZHELEV, Z.; OHBA, H.; BABA, Y. Quantum dot-conjugated hybridization probes for preliminary screening of siRNA sequences. **Journal of American Chemical Society**. 127: 11328-11335, 2005.
- BALAN, V.; NANGIA-MAKKER, P.; RAZ, A. Galectins as cancer biomarkers. **Cancers**. 2: 592-610, 2010.
- BARONDES, S. H.; COOPER, D. N. W.; GITT, M. A.; LEFFLE, H. Galectins - structure and function of a large family of animal lectins. **The Journal of Biological Chemistry**. 269 (33): 20807-20810, 1994.

- BHATTACHARYYA, L.; BREWER, C. F. Isoelectric focusing studies of concanavalin A and the lentil lectin. **Journal of Chromatography**. 502: 131-142, 1990.
- BIRKS, L. S.; FRIEDMAN, H. Particle size determination from X-ray line broadening. **Journal of Applied Physics**. 17: 687-692, 1946.
- BISWAS, S. K.; RAHMAN, A. S. M. T.; PAUL, A. C.; MOLLAH M. S. I.; CHOWDHURY, V. Giant juvenile fibroadenoma of the breast: report of 2 cases. **Faridpur Medical College Journal**. 7(1): 42-45, 2012.
- BLASSE, G. **Luminescent Materials**. Berlin/ Germany: Springer-Verlag. 1994. 232p.
- BORISENKO, V. E.; OSSICINI, S. **What is what in the Nanoworld. A Handbook on Nanoscience and Nanotechnology**. Germany: Wiley – VCH Verlag GmbH & Co. 2004. 335p.
- BRUCHEZ, JR, M.; MORONNE, M.; GIN, P.; WEISS, S.; ALIVISATOS, A. P. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. **Science**. 281: 2013-2016, 1998.
- BHUSHAN, B. (Ed.). **Springer Handbook of Nanotechnology**. 3rd ed. Berlin/ Germany: Springer-Verlag. 2010. 1964p.
- CAI, W.; HSU, A. R.; LI, Z.-B.; CHEN, X. Are quantum dots ready for in vivo imaging in human subjects? **Nanoscale Research Letters**. 2: 265-281, 2007.
- CALIFICE, S.; CASTRONOVO, V.; Van den BRÛLE, F. Galectin-3 and cancer. **International Journal of Oncology**. 25: 983-992, 2004.
- CALLISTER Jr., W. D. **Materials Science and Engineering – An Introduction**. 7th ed. New York/ USA: John Wiley & Sons, Inc.. 2007. 864p.
- CAZET, A.; JULIEN, S.; BOBOWSKI, M.; BURCHELL, J.; DELANNOY, P. Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. **Breast Cancer Research**. 12: 204-, 2010.
- CHAFFIN, W. L.-J.; LÓPEZ-RIBOT, J. L.; CASANOVA, M.; GOZALBO, D.; MARTÍNEZ, J. P. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 62 (1):130-180, 1998.
- CHAN, W. C. W.; NIE, S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. **Science**. 281: 2016-2018, 1998.
- CHAN, W. C. W.; MAXWELL, D. J.; GAO X.; BAILEY, R. E.; HAN, M.; NIE, S. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. **Current Opinion in Biotechnology**. 13: 40–46, 2002.

CHAVES, C. R.; FONTES, A.; FARIAS, P. M. A.; SANTOS, B. S.; MENEZES, F. D.; FERREIRA, R. C.; CESAR, C. L.; GALEMBECK, A.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. Application of core-shell PEGylated CdS/Cd(OH)₂ quantum dots as biolabels of *Trypanosoma cruzi* parasites. **Applied Surface Science**, 255: 728–730, 2008.

CHATTERJEE, A.; MANDAL, D. K. Denaturant-induced equilibrium unfolding of concanavalin A is expressed by a three-state mechanism and provides an estimate of its protein stability. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1648:174–183, 2003.

CHEMISTRY RESOURCE. **Cadmium Telluride**. Disponível na Worldwide web: <www.chemistryblog.net/cadmium-telluride.html>. Acesso em Jun. 2012.

CHEN, C.; PENG, J.; XIA, H.-S.; YANG, G.-F.; WU, Q.-S.; CHEN, L.-D.; ZENG, L.-B.; ZHANG, Z.-L.; PANG, D.-W.; LI, Y. Quantum dots-based immunofluorescence technology for the quantitative determination of HER2 expression in breast cancer. **Biomaterials**. 30: 2912-2918, 2009.

CHEVREUIL, L. R.; PANDO, S. C.; NINA-Jr, A. R.; BARIANI, A.; GONÇALVES, J. F. C.; SANTOS, A. L. W. Atividade de Proteínas Hemaglutinantes em Sementes de Leguminosas Arbóreas da Flora Amazônica. **Revista Brasileira de Biociências**. 5(2): 1020-1022, 2007.

CHINTAMANI; KHANDELWAL, R.; TANDON, M.; YASHWANT, K.; KULSHRESHTHA, P.; AERON, T.; BHATNAGAR, D.; BANSAL, A.; SAXENA, S. Carcinoma developing in a fibroadenoma in a woman with a family history of breast cancer: a case report and review of literature. **Cases Journal**. 2: 9348. doi:10.1186/1757-1626-2-9348. 2009.

CLARKE, A. R.; EBERHARDT, C. N. **Microscopy Techniques for Materials Science**. England: Woodhead Publishing Limited. 2002. 459p.

COLOMBO, P.-E.; MILANEZI, F.; WEIGELT, B.; REIS-F., J. S. Microarrays in the 2010s: the contribution of microarray-based gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction. **Breast Cancer Research**. 13: 212, 2011.

COOPER, D. N. W. Galectinomics: finding themes in complexity. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1572: 209–231, 2002.

DAGTEPE, P.; CHIKAN, V.; JASINSKI, J.; LEPPERT, V. J. Quantized growth of CdTe quantum dots; observation of magic-sized CdTe quantum dots. **The Journal of Physical Chemistry C**. 111 (41): 14977-14983, 2007.

DAHMS, N. M.; HANCOCK, M. K. P-type lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1572: 317-340, 2002.

- DANGUY, A.; CAMBY, I.; KISS, R. Galectins and cancer. **Biochimica et Biophysical Acta**. 1572: 285– 293, 2002.
- DEREWENDA, Z.; YARIV, J.; HELLIWELL, J. R.; KALB (GILBOA), A. J.; DODSON, E. J.; PAPIZ, M. Z.; WAN, T.; CAMPBELL, J. The structure of the saccharide-binding site of concanavalin A. **The EMBO Journal**. 8 (8): 2189-2193, 1989.
- EDELMAN, G. M.; WANG, J. L. binding and functional properties of concanavalin A and its derivatives. **The Journal of Biology Chemistry**. 253 (9): 3016-3022, 1978.
- EDELMAN, G. M.; CUNNINGHAM, B. A.; REEKE-JR., G. N.; BECKER, J. W.; WAXDAL, M. J.; WANG, J. L. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. 69 (9): 2580-2584, 1972.
- ESCH, V.; FLUEGEL, B.; KHITROVA, F. G.; GIBBS, H. M.; JIAJIN, X.; KANG, K.; KOCH, S. W.; LIU, L. C.; RISBUD, S. H.; PEYGHAMBARIAN, N. State filling, Coulomb, and trapping effects in the optical nonlinearity of CdTe quantum dots in glass. **Physical Review B**. 42 (12): 7450-7453, 1990.
- FERREIRA, D. L.; SILVA, F. O.; VIOL, L. C. S.; LICÍNIO, P.; VALADARES, M.; CURY, L. A.; SCHIAVON, M. A.; ALVES, J. L. A. Growth kinetics of CdTe colloidal nanocrystals. **The Journal of Chemical Physics**. 131: 084712-1 - 084712-4, 2009. doi: 10.1063/1.3212964.
- FOX, M. **Optical Properties of Solids**. Great Britain: Oxford University Press. 2001. 305p.
- GAPONENKO, S. V. **Optical Properties of Semiconductor Nanocrystals**. Cambridge/ UK: Cambridge University Press. 1998. 245p.
- GAPONIK, N.; TALAPIN, D. V.; ROGACH, A. L.; HOPPE, K.; SCHEVCHENKO, E. V.; KORNOWSKI, A.; EYCHMÜLLER, A.; WELLER, H. Thiol-capping of CdTe nanocrystals: an alternative to organometallic synthetic routes. **The Journal of Physical Chemistry B**. 106: 7177-7185, 2002.
- GABIUS, H. J. Animal lectins and life: a guided tour into the realm of the sugar code. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1572: 163-164, 2002.
- GABIUS, H.-J.; ANDRÉ, S.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; ROMERO, A.; SOLÍS, D. From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. **Trends in Biochemical Sciences**. 36 (6): 298-313, 2011.
- GAO, X.; YANG, L.; PETROS, J. A.; MARSHALL, F. F.; SIMONS, J. W.; NIE, S. In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots. **Current Opinion in Biotechnology**, 16: 63–72, 2005.

- GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochemica**. 113: 236–247, 2011.
- GLUSKER, J. P.; TRUEBLOOD, K. N. **Crystal Structure Analysis – A Primer**. New York/USA: Oxford University Press. 1972. 192p.
- GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; OSBORNE, B. A. **Kuby Immunology**. 4th ed. New York/USA: W. H. Freeman and Company. 2000. 670p.
- GUINEBRETIERE, J. M.; MENET, E.; TARDIVON, A.; CHEREL, P.; VANEL, D. Normal and pathological breast, the histological basis. **European Journal of Radiology**. 54: 6–14, 2005.
- GUNTHER, G. R.; WANG, J. L.; YAHARA, I.; CUNNINGHAM, B. A.; EDELMAN, G. M.. Concanavalin A derivatives with altered biological activities. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. 70 (4): 1012-1016, 1973.
- GURAY, M.; SAHIN, A. A. Benign breast diseases: classification, diagnosis and management. **The Oncologist**. 11: 435–449, 2006.
- HAMILTON, R. G. **The Human IgG Subclasses**. Calbiochem-Novabiochem Corporation: 2001, 64p.
- HAMMES, G. G. **Spectroscopy for the Biological Sciences**. New Jersey/ USA: John Wiley & Sons, Inc. 2005. 172p.
- HARDMAN, K. D.; AINSWORTH, C. F. Structure of Concanavalin A at 2.4-Å Resolution. **Biochemistry**. 11 (26): 4910-4919, 1972.
- HARRIS, L. J.; SKALETSKY, E.; McPHERSON, A. Crystallographic Structure of an Intact IgG1 Monoclonal Antibody **Journal of Molecular Biology**. 275: 861-872, 1998.
- HASAN, S. S.; ASHRAF, G. M.; BANU, N. Galectins – Potential targets for cancer therapy. **Cancer Letters**. 253: 25-33, 2007.
- HE, R.; YOU, X.; TIAN, H.; GAO, F.; CUI, D. Synthesis of CdTe colloidal quantum dots (QDs) in water. **Frontiers of Chemistry in China**. 3(3): 325–329, 2008. doi: 10.1007/s11458-008-0053-9.
- HOSSEINI, S. M. Optical properties of cadmium telluride in zinc-blende and wurzite structure. **Physica B**. 403: 1907–1915, 2008.
- HUET, C.; LONCHAMPT, M.; HUET, M.; BERNADAC, A. temperature effects on the concanavalin a molecule and on concanavalin A binding. **Biochimica et Biophysical Acta**. 365: 28-39. 1974.

HUFLEJT, M. E.; TURCK, C. W.; LINDSTEDT, R.; BARONDES, S. H.; LEFFLE, H. L-29, a soluble lactose-binding lectin, is phosphorylated on serine 6 and serine 12 *in vivo* and by casein kinase I. **The Journal of Biological Chemistry**. 268 (35): 26712-26718, 1993.

HUMPHEY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. **Journal of Molecular Graphics**. 14 (1): 33-38, 1996. VMD for win32 V. 1.8.7. Disponível na *Worldwide Web*: <www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>. Acesso em Nov. de 2009.

INCA/MS - Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa da Incidência de Câncer no Brasil 2012**. Disponível na *Worldwide Web*: <www.inca.gov.br>. Acesso em Mai. de 2012.

INGRASSIA, L.; CAMBY, I.; LEFRANC, F.; MATHIEU, V.; NSHIMYUMUKIZA, P.; DARRO, F.; KISS, R. Anti-galectin compounds as potential anti-cancer drugs. **Current Medicinal Chemistry**. 13 (29): 3513-3527, 2006.

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry. **Periodic Table of the Elements**. Disponível na *Worldwide web*: <www.iupac.org/fileadmin/user_upload/news/IUPAC_Periodic_Table-1Jun12.pdf>. Acesso em Jun. 2012.

JAIN, K. K. Role of nanobiotechnology in the development of personalized medicine. **Nanomedicine**. 4 (3): 249-252. 2009.

JANDA, A.; CASADEVALL, A. Circular dichroism reveals evidence of coupling between immunoglobulin constant and variable region secondary structure. **Molecular Immunology**. 47: 1421–1425, 2010.

JIANG, S.-Y.; MA, Z.; RAMACHANDRAN, S. Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants. **Biomed Central Evolutionary Biology**. 10: 79, 2010.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11^a ed. Guanabara Koogan. 2008. 524p.

KAWABATA, S.; TSUDA, R. Molecular basis of non-self recognition by the horseshoe crab tachylectins. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1572: 414-421, 2002.

KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1338: 161–185, 1997.

KHAN, F.; KHAN, M. I. Fungal lectins: current molecular and biochemical perspectives. **International Journal of Biological Chemistry**. 5 (1): 1-20, 2011.

- KHAN, R. H.; NAEEM, A.; BAIG, M. A. Spectroscopic studies on the protective effect of a specific sugar on concanavalin A at acidic, neutral and alkaline pH. **Cellular & Molecular Biology Letters**. 10 (1): 61-72, 2005.
- KITTEL, C. **Introduction to Solid State Physics**. 8th ed. New Jersey/ USA: John Wiley & Sons, Inc. 2005. 680p.
- KLABUNDE, K. J., ed. **Nanoscale Materials in Chemistry**. New York/ USA: Wiley – Interscience. 2001. 292p.
- KUIJPER, A.; MOMMERS, E. C. M.; van der WALL, E.; van DIEST, P. J. Histopathology of fibroadenoma of the breast. **American Journal of Clinical Pathology**. 115: 736-742, 2001.
- KWEI, K. A.; KUNG, Y.; SALARI, K.; HOLCOMB, I. N.; POLLACK, J. R. Genomic instability in breast cancer: pathogenesis and clinical implications. **Molecular Oncology**. 4: 255-266, 2010.
- LABIB, M.; HEDSTRÖM, M.; AMIN, M.; MATTIASSON, B. A novel competitive capacitive glucose biosensor based on concanavalin A-labeled nanogold colloids assembled on a polytyramine-modified gold electrode. **Analytica Chimica Acta**. 659: 194-200. 2010.
- LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy** 3rd ed. New York/ USA: Springer. 2006. 954p.
- LI, J.; ZHAO, K.; HONG, X.; YUAN, H.; MA, L.; LI, J.; BAI, Y.; LI, T. Prototype of immunochromatographic assay strips using colloidal CdTe nanocrystals as biological luminescent label. **Colloids and Surface B: Biointerface**. 40: 179–182, 2005.
- LI, W.-W.; YU, J.Y.; XU, H.-I.; BAO, J.-K. Concanavalin A: A potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 414: 282–286, 2011.
- LIDKE, D. S.; LIDKE, K. A.; RIEGER, B.; JOVIN, T. M.; ARNDT-JOVIN, D. J. Reaching out for signals: filopodia sense EGF and respond by directed retrograde transport of activated receptors. **The Journal of Cell Biology**. 170 (4): 619-626. 2005.
- LIMA, A. L. R.; CAVALCANTI, C. C. B.; SILVA, M. C. C.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B.; BELTRÃO, E. I. C.; CORREIA, M. T. S. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. doi: 10.1155/2010/179817. 2010.
- LIMOUSIN O. New trends in CdTe and CdZnTe detectors for X- and gamma-ray applications. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A**. 504: 24–37, 2003.

- LIRA, R. B.; CAVALCANTI, M. B.; SEABRA, M. A. B. L.; SILVA, D. C. N.; AMARAL, A. J.; SANTOS, B. S.; FONTES, A. Non-specific interactions of CdTe/Cds Quantum Dots with human blood mononuclear cells. **Micron**. 43: 621–626, 2012.
- LIU, B.; LI, C.-Y.; BIAN, H.-J.; MIN, M.-W.; CHEN, L.-F.; BAO, J.-K. Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of concanavalin A on human melanoma A375 cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 482: 1–6, 2009.
- LIU, F. T.; PATTERSON, R. J.; WANG, J. L. Intracellular functions of galectins. **Biochimica et Biophysical Acta**. 1572: 263-273, 2002.
- LOBSANOV, Y. D.; GITT, M. A.; LEFFLER, H.; BARONDES, S. H.; RINI, J. M. X-ray crystal structure of the human dimeric s-lac lectin, I-14-11, in complex with lactose at 2.9-Å resolution. **The Journal of Biological Chemistry**. 268 (36): 27034-27038, 1993.
- LONG, D. **Energy Bands in Semiconductor**. New York/ USA: Interscience Publishers John Wiley & Sons. 1968. 212p.
- LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. **Biochimica et Biophysical Acta**. 1572: 198-208, 2002.
- LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1383: 9–36, 1998.
- LU, J.; TEH, C.; KISHORE, U.; REID, K. B. M. Collectins and ficolins: sugar pattern recognition molecules of the mammalian innate immune system. **Biochimica et Biophysical Acta**. 1572: 387-400, 2002.
- MANDAL, D. K.; BREWER, C. F. Differences in the binding affinities of dimeric concanavalin a (including acetyl and succinyl derivatives) and tetrameric concanavalin A with large oligomannose-type glycopeptides. **Biochemistry**. 32: 5116-5120, 1993.
- MATSUNO, A.; ITOH, J.; TAKEKOSHI, S.; NAGASHIMA, T.; OSAMURA, R. Y. Three-dimensional imaging of the intracellular localization of growth hormone and prolactin and their mRNA using nanocrystal (quantum dot) and confocal laser scanning microscopy techniques. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. 53 (7): 833-838, 2005.
- McKENZIE, G. H.; SAWYER, W. H.; NICHOL, L. W. The molecular weight and stability of concanavalin A. **Biochimica et Biophysica Acta**. 263: 283-293, 1972.
- MEDINTZ, I. L.; UYEDA, S. T.; GOLDMAN, R. E.; MATTOUSSI, H. Quantum dots bioconjugates form imaging, labelling and sensing. **Nature Materials**. 4: 435-446, 2005.

- MELO-Jr, M. R.; CAVALCANTI, C. L. B.; PONTES-F^o, N. T.; CARVALHO-Jr., L. B.; BELTRÃO, E. I. C. Lectin staining patterns in human gastric mucosae with and without exposure to *Helicobacter pylori*. **Brazilian Journal of Microbiology**. 39: 238-240, 2008.
- MELO-Jr, M. R.; TELLES, A. M. S.; ALBUQUERQUE, F. E. B.; PONTES-F., N. T.; CARVALHO-Jr., L. B.; BELTRÃO, E. I. C. Altered lectin-binding sites in normal colon and ulcerative colitis. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. 40 (2): 123-125, 2004.
- MENEZES, F. D.; BRASIL-Jr., A. G.; MOREIRA, W. L.; BARBOSA, L. C.; CESAR, C. L.; FERREIRA, R. C.; FARIAS, P. M. A.; SANTOS, B. S. CdTe/CdS core shell quantum dots for photonic applications. **Microelectronics Journal**. 36: 989–991, 2005.
- MICHALET, X.; PINAUD, F. F.; BENTOLILA, L. A.; TSAY, J. M.; DOOSE, S.; LI, J. J.; SUNDARESAN, G.; WU, A. M.; GAMBHIR, S. S.; WEISS, S. Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging and diagnostics. **Science**. 307: 538-544, 2005.
- MITANI, H.; MURAKAMI, A.; TANAKA, H. Different concanavalin A binding patterns of malignant and nonmalignant mouse mammary epithelia in monolayer culture. **Cancer Research**, 44:674-680, 1984.
- MITCHELL, B. S. **An introduction to materials engineering and science: for chemical and materials engineers**. New Jersey/ USA: John Wiley & Sons, Inc. 2004. 954p.
- MORALES-ACEVEDO, A. Variable band-gap semiconductors as the basis of new solar cells. **Solar Energy**. 83 (9): 1466-1471, 2009.
- MURRAY, C. B.; KAGAN, C. R.; BAWENDI, M. G. Synthesis and characterization of monodisperse nanocrystals and close-packed nanocrystal assemblies. **Annual Review of Material Science**. 30: 545–610, 2000.
- NAEEM, A.; KHAN, A.; KHAN, R. S. Partially folded intermediate state of concanavalin A retains its carbohydrate specificity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 331: 1284–1294, 2005.
- NAKANISHI, K.; SUKIYAMA, T.; IMAMURA, K. On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 91(3): 233-244, 2001.
- NANGIA-MAKKER; P.; WANG, Y.; RAZ, T.; TAIT, L.; BALAN, V.; HOGAN, V.; RAZ, A. Cleavage of galectin-3 by matrix metalloproteases induces angiogenesis in breast cancer. **International Journal of Cancer**. 127: 2530–2541, 2010.

- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4th ed. W. H. Freeman. 2004. 1100 p.
- NIDA, D. L.; RAHMAN, M. S.; CARLSON, K. D.; RICHARDS-KORTUM, R.; FOLLEN, M. Fluorescent nanocrystals for use in early cervical cancer detection. **Gynecologic Oncology**, 99: S89 – S94, 2005.
- NORDE, W.; LYKLEMA, J. Protein adsorption and bacterial adhesion to solid surfaces: a colloid-chemical approach. **Colloids and Surface**. 38: 1-13, 1989.
- OCHIENG, J.; GREEN, B.; EVANS, S.; JAMES, O.; WARFIELD, P. Modulation of the biological functions of galectin-3 by matrix metalloproteinases. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1379: 97–106, 1998.
- OLIVEIRA, J. T.; MATOS, A. J. F.; GOMES, J.; VILANOVA, M.; HESPANHOL, V.; MANNINEN, A.; RUTTEMAN, G.; CHAMMAS, R.; GÄRTNER, F.; BERNARDES, E. S. Coordinated expression of galectin-3 and galectin-3-binding sites in malignant mammary tumors: implications for tumor metastasis. **Glycobiology**. 20 (11): 1341-1352, 2010.
- OLIVEIRA, M. D. L.; CORREIA, M. T. S.; DINIZ, F. B. Concanavalin A and polyvinyl butyral use as a potential dengue electrochemical biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**. 25: 728–732, 2009.
- OLSON, M. O. J.; LIENER, I. E. Some physical and chemical properties of concanavalin A, the phytohemagglutinin of the jack bean. **Biochemistry**. 6 (1): 105-111, 1967.
- PATTERSON, A. L. The Scherrer formula for X-ray particle size determination. **Physical Review**. 56: 978-982, 1939.
- PAWELEC, M.; STOCHEL, G.; van ELDIK, R. Mechanistic information on the copper-catalysed autoxidation of mercaptosuccinic acid in aqueous solution. **Dalton Transactions**. 292–298, 2004. doi: 10.1039/ b311053b.
- PENG, A. Z.; PENG, X. Formation of high-quality CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals using CdO as precursor. **Journal of American Chemical Society**. 123: 183-184, 2001.
- PENG, J.; LIU, S.; YAN, S.; FAN, X.; HE, Y. A study on the interaction between CdTe quantum dots and chymotrypsin using optical spectroscopy. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. 359: 13–17, 2010.
- PERILLO, N. L.; MARCUS, M. E.; BAUM, L. G. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. **Journal of Molecular Medicine**. 76: 402–412, 1998.

- PETTY, H. R.; ELNER, V. M.; KAWAJI, T.; CLARK, A.; THOMPSON, D.; YANG, D.-L.. A facile method for immunofluorescence microscopy of highly autofluorescent human retinal sections using nanoparticles with large Stokes shifts. **Journal of Neuroscience Methods**. 191: 222–226, 2010.
- PHILLIPS, J. C. **Bonds and Bands in Semiconductors**. New York/ USA: Academic Press, Inc. 1973. 288p.
- POOLE Jr, C. P.; OWENS, F. J. **Introduction to Nanotechnology**. New Jersey/ USA: John Wiley & Sons, Inc. 2003. 388p.
- PRASAD, P. N. **Nanophotonics**. New Jersey/ USA: John Wiley & Sons, Inc. 2004. 415p.
- RABE, M.; VERDES, D.; SEEGER, S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**. 162: 87–106, 2011.
- RABINOVICH, G. A.; RUBINSTEIN, N.; TOSCANO, M. A. Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1572: 274-284, 2002.
- RAKHA, E. A.; EL-SAYED, M. E.; GREEN, A. R.; LEE, A. H. S.; ROBERTSON, J. F.; ELLIS, I. O. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. **Cancer**. 109 (1): 25-32, 2007.
- RESH-GENGER, U. GRABOLLE, M.; CAVALIERE-JARICOT, S.; NITSCHKE, R.; NANN, T. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. **Nature Methods**. 5 (9): 763-775, 2008.
- ROBINSON, A.; FANG, J.-M.; CHOU, P.-T.; LIAO, K.W.; CHU, R.-M.; LEE, S.-J. Probing lectin and sperm with carbohydrate-modified quantum dots. **ChemBioChem**. 6: 1–8, 2005.
- ROGACH, A. L., ed. **Semiconductor Nanocrystal Quantum Dots – Synthesis, Assembly, Spectroscopy and Applications**. Viena/ Austria: Springer-Verlag/ Wien. 2008. 372p.
- ROGACH, A. L.; FRANZL, T.; KLAR, T. A.; FELDMANN, J.; GAPONIK, N.; LESNYAK, V.; SHAVEL, A.; EYCHMÜLLER, A.; RAKOVICH, Y. P.; DONEGAN, J. F. Aqueous synthesis of thiol-capped CdTe nanocrystals: state-of-the-art. **Journal of Physical Chemistry C**. 111: 14628-14637, 2007.
- ROMANO, R. **Estrutura e Modelos de Ligação Química para Semicondutores III-V e II-VI**. Monografia. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. 2003. 32p.
- ROSENFELD, R.; BANGIO, H.; GERWIG, G. J.; ROSENBERG, R.; ALONI, R.; COHEN, Y.; AMOR, Y.; PLASCHKES, I.; KAMERLING, J. P.; MAYA, R. B.-Y. A lectin array-based methodology for the analysis of protein glycosylation. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**. 70: 415–426, 2007.

- ROUSSERIE, G.; SUKHANOVA, A.; EVEN-DESRUMEAUX, K.; FLEURY, F.; CHAMES, P.; BATY, D.; OLEINIKOV V.; PLUOT, M.; COHEN, J. H. M.; NABIEV, I. Semiconductor quantum dots for multiplexed bio-detection on solid-state microarrays. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. 74: 1–15, 2010.
- SAMIA, A. C. S.; CHEN, X.; BURDA, C. Semiconductor quantum dots for photodynamic therapy. **Journal of American Chemical Society**. 125: 15736-15737, 2003.
- SANTOS, B. S.; FARIAS, P. M. A.; FONTES, A. Chapter 26: Semiconductor quantum dots for biological applications. In: **Handbook of Self Assembled Semiconductor Nanostructures Novel Devices in Photonics and Electronics**. HENINI, M. (Ed.). Great Britain: Elsevier Ltd. 2008. p. 773-798. 841p.
- SANTOS, B. S. FARIAS, P. M. A.; MENEZES, F. D.; FERREIRA, R. C.; ALVES-Jr., S.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; CARVALHO-Jr., L. B.; BELTRÃO, E. I. C. CdS-Cd(OH)₂ core shell quantum dots functionalized with concanavalin A lectin for recognition of mammary tumors. **Physica Status Solidi C**. 3 (11): 4017-4022, 2006.
- SARAN, A. D.; SADAWANA, M. M.; SRIVASTAVA, R.; BELLARE, J. R. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. 284: 393-400, 2011.
- SEETHARAMAN, J.; KANIGSBERG, A.; SLAABY, R.; LEFFLER, H.; BARONDES S. H.; RINI, J. M. X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate recognition domain at 2.1-Å resolution. **The Journal of Biological Chemistry**. 273 (21): 13047-13052, 1998.
- SHACKELFORD, J. F. **Introduction to Materials Science for Engineers**. 5th ed. New Jersey/ USA: Prentice Hall, Inc. 2000. 877p.
- SHAO, L.; CHAOQING, D.; FUMING, S.; HUIFENG, Q.; JICUN, R. Studies on interaction of CdTe quantum dots with bovine serum albumin serum using fluorescence correlation spectroscopy. **Journal of Fluorescence**. 19(1): 151-157, 2009. doi: 10.1007/s10895-008-0396-0
- SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. **The Journal of Biological Chemistry**. 282 (5): 2753-2763, 2007.
- SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**. 14 (11): 53-62. 2004.
- SHE, Y.; HE, P.; ZHU, X. Photoluminescence-enhanced biocompatible quantum dots by phospholipid functionalization. **Materials Research Bulletin** 43: 2626–2635, 2008.

- SHEKHAR, M. P. V.; NANGIA-MAKKER, P.; TAIT, L.; MILLER, F.; RAZ, A. Alterations in galectin-3 expression and distribution correlate with breast cancer progression. **American Journal of Pathology**. 165 (6): 1931-1941. 2004.
- SHI, C.; HUANG, X. Y.; DONG, C. Q.; CHEN, H. J.; REN J. C. Interaction of CdTe/CdS quantum dots with antibodies. **Chinese Chemical Letters**. 20: 1119–1122, 2009.
- SILVA, F. O.; VIOL, L. C. S.; FERREIRA, D.L.; ALVES, J. L. A.; SCHIAVON, M. A. O estado da arte da síntese de semicondutores nanocristalinos coloidais. **Quimica Nova**. 33 (9): 1933-1939, 2010.
- SINGH, M. Digital Atlas of Breast Pathology. Disponível na Worldwide web: <www.hsc.stoybook.edu/breast-atlas/>. Acesso em Fev. 2012.
- SKOOG, D. A.; LEARY, J. J. **Principles of Instrumental Analysis**. 4th ed. Florida/ USA: Saunders College Publishing. 1992. 700p.
- SMITH, R. A. **Semiconductors**. 2nd ed. Great Britain: Cambridge University Press. 1978. 523p.
- SPIRO, R. G. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. **Glycobiology**. 12 (4): 43R-56R, 2002.
- SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. **Methods in Enzymology**. 383: 318–351, 2004.
- SRINIVAS, V. R.; REDDY, G. B.; AHMAD, N.; SWAMINATHAN, C. P.; MITRA, N.; SUROLIA, A. Legume lectin family, the ‘natural mutants of the quaternary state’, provide insights into the relationship between protein stability, and oligomerization. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1527: 102-111, 2001.
- SU, X.-L.; LI, Y. Quantum dot biolabeling coupled with immunomagnetic separation for detection of *Escherichia coli* O157:H7. **Analytical Chemistry**, 76 (16): 4806-4810, 2004.
- SUH, W. H.; SUH, Y.-H.; STUCKY, G. D. Multifunctional nanosystems at the interface of physical and life sciences. **Nano Today**. 4: 27-36, 2009.
- SUJATHAN, K.; SOMANATHAN, T.; PREETHI, N. G. K.; GEORGE, P. S.; ABRAHAM, E. K.; REMANI, P. Down regulation of galectin-3 in primary tumor tissues of breast predict axillary lymph node metastasis. **Journal of Cancer Research and Experimental Oncology**. 3(4): 37-49, 2011.
- SUKHANOVA, A.; NABIEV, I. Fluorescent nanocrystal quantum dots as medical diagnostic tools. **Expert Opinion on Medical Diagnostics**. 2 (4): 429-447. 2008.

- SUMNER, J. B.; HOWELL, S. F. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. **Journal of Bacteriology**. 32 (2): 227-237, 1936.
- SUTHERLAND, A. J. Quantum dots as luminescent probes in biological systems. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**. 6: 365–370, 2002.
- TALAPIN, D. V.; ROGACH, A. L.; MEKIS, I.; HAUBOLD, S.; KORNOWSKI, A.; HAASE, M.; WELLER, H. Synthesis and surface modification of amino-stabilized CdSe, CdTe and InP nanocrystals. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. 202: 145–154, 2002.
- TAN, W. B.; ZHANG, Y. Surface modification of gold and quantum dot nanoparticles with chitosan for bioapplications. **Journal of Biomedical Materials Research. Part A**. 75 (1): 56-62, 2005.
- THANH, N. T. K.; GREEN, L. A. W. Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications. **Nano Today**. 5: 213–230, 2010.
- THOULOULI, E.; HOYLAND, J. A.; DI VIZIO, D.; O'CONNELL, F.; MacDERMOTT, S. A.; TWOMEY, D.; LEVENSON, R.; YIN, J. A. L.; GOLUB, T. R.; LODA, M.; BYERS, R. Imaging of multiple mRNA targets using quantum dot based *in situ* hybridization and spectral deconvolution in clinical biopsies. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 348: 628–636, 2006.
- TOTHILL, I. E. Biosensors for cancer markers diagnosis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**. 20: 55–62, 2009.
- TSENG, P. K. C.; GUTKNECHT, W. F. Direct potentiometric measurement of several thiols. **Analytical Chemistry**. 47 (13): 2613-2619, 1975.
- VAIRAVAMURTHY, M. A.; GOLDENBERG, W. S.; OUYANG, S.; KHALID, S. The interaction of hydrophilic thiols with cadmium: investigation with a simple model, 3-mercaptopropionic acid. **Marine Chemistry**. 70: 181–189, 2000.
- van DULM, P.; NORDE, W.; LYKLEMA, J. Ion participation in protein adsorption at solid surfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**. 82 (1): 77-82, 1981.
- VENKATARAMAN, C.; HAACK, B. J.; BONDADA, S.; KWAIK, Y. A. Identification of a Gal/GalNAc lectin in the protozoan *Hartmannella vermiformis* as a potential receptor for attachment and invasion by the legionnaires' disease bacterium. **The Journal of Experimental Medicine**. 186 (4): 537–547, 1997.

- VETRI, V.; CARROTTA, R.; PICONE, P.; DI CARLO, M.; MILITELLO, V. Concanavalin A aggregation and toxicity on cell cultures. **Biochimica et Biophysical Acta**. 1804: 173-183, 2010.
- VU, T. Q.; Maddipati, R.; Blute, T. A.; Nehilla, B. J.; Nusblat, L.; Desai, T. A. Peptide-conjugated quantum dots activate neuronal receptors and initiate downstream signaling of neurite growth. **Nano Letters**. 5 (4): 603-607, 2005.
- WANG, J.-H.; LI, Y.-Q.; ZHANG, H.-L.; WANG, H.-Q.; LIN, S.; CHEN, J.; ZHAO, Y.-D.; LUO, Q.-M. Bioconjugation of concanavalin A and CdTe quantum dots and the detection of glucose. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. 364: 82–86, 2010.
- WANG, J. L.; CUNNINGHAM, B. A.; WAXDAL, M. J.; EDELMAN, G. M. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. **The Journal of Biological Chemistry**. 250 (4):1490-1502, 1975.
- WANG, Q.; LIU, P.; ZHOU, X.; ZHANG, X.; FANG, T.; LIU, P.; MIN, X.; LI, X. Thermodynamic and conformational investigation of the influence of CdTe QDs size on the toxic interaction with BSA. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**. 230: 23– 30, 2012.
- WANG, W.; LIU, Z.; ZHENG, C.; XU, C.; LIU, Y.; WANG, G. Synthesis of CdS nanoparticles by a novel and simple one-step, solid-state reaction in the presence of a nonionic surfactant. **Materials Letters**. 57 (18): 2755-2760, 2003.
- WANG, Y.; CHEN, L. Quantum dots, lighting up the research and development of nanomedicine. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**. 7: 285-402, 2011.
- WANG, Y. L.; LIU, S. Y.; ZHOU, L. Y. An alternative aqueous synthetic route to preparing CdTe quantum dots with tunable photoluminescence. **Chinese Chemical Letters**. 23 (3): 359-362, 2012.
- WANSLEY, D. L.; BANERJEE, S.; McGEADY, P. Separation of the filamentous and cellular yeast forms of *C. albicans* following serum induction. **Journal of Microbiological Methods**. 55: 321–323, 2003.
- WEIGELT, B.; GEYER, F. C.; REIS-FILHO, J. S. Histological types of breast cancer: How special are they? **Molecular Oncology**. 4: 192-208. 2010.
- WEISS, W. I.; DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annual Review of Biochemistry**. 65: 441-73, 1996.
- WHO – World Health Organization. **Cancer**. Fact sheet N°297. 2012. Disponível na Worldwide web: <www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>. Acesso em Ago. 2012.

- WOLCOTT, A.; GERION, D.; VISCONTE, M.; SUN, J.; SCHWARTZBERG, A.; CHEN, S.; ZHANG, J. Z. Silica-coated CdTe quantum dots functionalized with thiols for bioconjugation to IgG proteins. **The Journal of Physical Chemistry B**. 110: 5779-5789, 2006.
- WU, A. M.; LISOWSKA, E.; DUK, M.; YANG, Z. Lectins as tools in glycoconjugate research. **Glycoconjugate Journal**. 26: 899-913, 2009.
- XIAO, J.; CHEN, L.; YANG, F.; LIU, C.; BAI, Y. Green, yellow and red emitting CdTe QDs decreased the affinities of apigenin and luteolin for human serum albumin in vitro. **Journal of Hazardous Materials**. 182: 696–703, 2010.
- YAMANE, M.; ASAHARA, Y. **Glasses for Photonics**. Cambridge University Press, United Kingdom. 2004. 271p.
- YEZHELYEV, M. V.; AL-HAJJ, A.; MORRIS, C.; MARCUS, A. I.; LIU, T.; LEWIS, M.; COHEN, C.; ZRAZHEVSKIY, P.; SIMONS, J. W.; ROGATKO, A.; NIE, S.; GAO, X.; O'REGAN, R. M. *In situ* molecular profiling of breast cancer biomarkers with multicolor quantum dots. **Advanced Materials**. 19: 3146–3151, 2007.
- YING, E.; LI, D.; GUO, S.; DONG, S.; WANG, J. Synthesis and bio-imaging application of highly luminescent mercaptosuccinic acid-coated CdTe nanocrystals. **PLoS ONE**. 3 (5): e222, 2008. doi: 10.1371/journal.pone.0002222.
- YU, W. W.; QU, L.; GUO, W.; PENG, X. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe and CdS nanocrystals. **Chemistry of Materials**. 15 (14): 2854-2860, 2003.
- YU, Y.; LAI, Y.; ZHENG, X.; WU, J.; LONG, Z.; LIANG, C. Synthesis of functionalized CdTe/CdS QDs for spectrofluorimetric detection of BSA. **Spectrochimica Acta Part A**. 68: 1356–1361, 2007.
- ZAND, R.; AGRAWAL, B. B. L.; GOLDSTEIN, I. J. pH-Dependent conformational changes of concanavalin A. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. 68 (9): 2173-2176, 1971.
- ZENG, Q. KONG, X.; SUN, Y.; ZHANG, Y.; TU, L.; ZHAO, J.; ZHANG, H. Synthesis and optical properties of type II CdTe/CdS core/shell quantum dots in aqueous solution via successive ion layer adsorption and reaction. **The Journal of Physical Chemistry C**. 112: 8587–8593, 2008.
- ZHANG, H.; SUN, P.; LIU, C.; GAO, H.; XU, L.; FANG, J.; WANG, M.; LIU, J.; XU, S. L-Cysteine capped CdTe–CdS core–shell quantum dots: preparation, characterization and immuno-labeling of HeLa cells. **Luminescence**. 2009. doi: 10.1002/bio.1188.

ZHANG, H.; WANG, L.; XIONG, H.; HU, L.; YANG, B.; LI, W. Hydrothermal synthesis for high-quality CdTe nanocrystals. **Advanced Materials**. 15 (20): 1712-1715, 2003a.

ZHANG, H.; ZHOU, Z.; YANG, B.; GAO, M. The influence of carboxyl groups on the photoluminescence of mercaptocarboxylic acid-stabilized CdTe nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry B**. 107: 8-13, 2003.

ANEXOS

CURRICULUM VITAE RESUMIDO

Denise Patricia Lins de Azevedo Tenório

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alagoas (2003), mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos pela Universidade Federal de Pernambuco (2005) e doutorado em Ciência de Materiais pela Universidade Federal de Pernambuco (2012), na área de Nano e Biomateriais. Têm experiência na realização de ensaios biológicos moluscicida, nematocida e cercaricida e em ensaios com microrganismos probióticos. Atualmente tem atuado no desenvolvimento de marcadores biológicos fluorescentes, baseados em materiais semicondutores, e sua aplicação em sistemas biológicos.

Identificação

Nome: Denise Patricia Lins de Azevedo Tenório

Nome em citações bibliográficas: AZEVEDO, D. P. L.; TENÓRIO, D. P. L. A.

Sexo: Feminino

Endereço

Endereço Pessoal: Estrada de Aldeia, PE-027, Km 12,5, Condomínio Flor do Juá, casa 15. Aldeia dos Camarás, Camaragibe, PE. CEP: 54786-001.
Telefone: (81) 8770-8624

Endereço Profissional: Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biofísica e Radiobiologia. Av. Professor Moraes Rego, Cidade Universitária, Recife, PE. CEP: 50670-901.
Telefone: (81) 2126-7818

Formação acadêmica/titulação

2007 – 2012: Doutorado em Ciência de Materiais.

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

Título: Aplicação de pontos quânticos de CdTe e conjugados a Concanavalina A e a Antigalectina-3 em protocolos de marcação histoquímica de lesões da mama, Ano de obtenção: 2012.

Orientador: Severino Alves Júnior, Beate Saegesser Santos, Adriana Fontes.

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Palavras-chave: Nanomarcadores fluorescentes; Nanopartículas de CdTe; Carcinomas mamários.

Grande área: Ciências Exatas e da Terra / Área: Química / Subárea: Nanoestruturas e Interfaces Biológicas.

Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Medicina / Subárea: Anatomia Patológica e Patologia Clínica.

Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Morfologia / Subárea: Citologia e Biologia Celular.

Setores de atividade: Atividades No Campo das Nanotecnologias e Desenvolvimento de Nanoprodutos.

2003 – 2005: Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos.

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

Título: Atividade antagônica da cultura de *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1015 sobre *Escherichia coli*.

Estudo do potencial probiótico, Ano de Obtenção: 2005.

Orientador: Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes.

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*; Atividade antimicrobiana; *Escherichia coli*; Potencial Probiótico.

Grande área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia / Subárea: Microbiologia Aplicada.

Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia / Subárea: Bacteriologia.

Setores de atividade: Desenvolvimento de Produtos Tecnológicos Voltados Para A Saúde Humana.

1999 – 2003: Graduação em Ciências Biológicas (Bacharelado e Licenciatura).

Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Brasil.

Título: Potencial Tóxico de Espécies Vegetais Úteis no Controle da Esquistossomose.

Orientador: Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana, Aldenir Feitosa dos Santos.

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Formação Complementar

2008 – 2008: Extensão universitária em Histotecnologia. (Carga horária: 150h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

2008 – 2008: I Simpósio em Citometria de Fluxo do Recife.
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

2006 – 2006: Extensão universitária em Genes, Genomas e Tecnologias Genômicas. (Carga horária: 30h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

2003 – 2003: Purificação de Proteínas por Cromatografia Líquida. (Carga horária: 8h).
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

2002 – 2002: Etnofarmacologia (Básico). (Carga horária: 8h).
Sociedade Brasileira de Etnobiologia e Etnoecologia.

2001 – 2001: I Curso de Micologia Médica - Micoses Sistêmicas. (Carga horária: 8h).
Laboratório de Micologia Médica.

2001 – 2001: Curso de Segurança no Laboratório, Gerenciamento e. (Carga horária: 40h).
Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Brasil.

2001 – 2001: Curso de Biosegurança: Abordagem Técnica, Legal e. (Carga horária: 40h).
Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Brasil.

2001 – 2001: Recursos Biológicos Marinhos. (Carga horária: 8h).
Laboratório de Fitogeografia Aplicada.

1999 – 1999: Extensão universitária em Estruturação de Laboratório Micológico - Módulo I. (Carga horária: 10h). Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Brasil.

Linhas de pesquisa

1. Desenvolvimento de nanomateriais inorgânicos fluorescentes para marcação celular e diagnóstico

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Biologia Geral / Subárea: Nanobiotecnologia.

Idiomas

Inglês: Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

Produções

Artigos completos publicados em periódicos

1. MA-HOCK, L.; BRILL, S.; WOHLLEBEN, W.; FARIAS, P.M.A.; CHAVES, C. R.; **TENÓRIO, D. P. L. A.**; FONTES, A.; SANTOS, B.S.; LANDSIEDEL, R.; STRAUSS, V.; TREUMANN, S.; van RAVENZWAAY, B. Short term inhalation toxicity of a liquid aerosol of CdS/Cd(OH)₂ core shell quantum dots in male Wistar rats. Toxicology Letters, v. 208, p. 115-124, 2012.

2. KATO, I. T.; SANTOS, C. C.; **TENÓRIO, D. P. L. A.**; CABRAL FILHO, P. E.; SABINO, C. P.; FONTES, A.; SANTOS, B. S.; PRATES, R. A.; RIBEIRO, M. S. CdTe/CdS-MPA quantum dots as fluorescent probes to label

yeast cells: synthesis, characterization and conjugation with Concanavalin A. Proceedings of SPIE, the International Society for Optical Engineering, v. 8232, p. 82320D, 2012.

3. LIRA, R. B.; SALES-NETO, A. T.; CARVALHO, K. H. G.; LEITE, E. S.; BRASIL Jr, A. G.; **AZEVEDO, D. P. L.**; CABRAL FILHO, P. E.; CAVALCANTI, M. B.; AMARAL, A. J.; FARIAS, P. M. A.; SANTOS, B. S.; FONTES, A. Biocompatible water soluble quantum dots as new biophotonic tools for hematologic cells: applications for flow cytometry. Proceedings of SPIE, the International Society for Optical Engineering, v. 7575, p. 75750P, 2010.

4. SANTOS, B. S.; FARIAS, P. M. A.; MENEZES, F. D.; BRASIL Jr, A. G.; FONTES, A.; ROMÃO, L.; AMARAL, J. O.; MOURA-NETO, V.; **TENÓRIO, D. P. L. A.**; CESAR, C. L.; BARBOSA, L. C.; FERREIRA, R. New highly fluorescent biolabels based on II-VI semiconductor hybrid organic inorganic nanostructures for bioimaging. Applied Surface Science, v. 255, p. 790-792, 2008.

5. SANTOS, A. F.; **AZEVEDO, D. P. L.**; MATA, R. C. S.; MENDONÇA, D. I. M. D.; SANT'ANA, A. E. G. The lethality of *Euphorbia conspicua* to adults of *Biomphalaria glabrata*, cercaria of *Schistosoma mansoni* and larvae of *Artemia salina*. Bioresource Technology, v. 98, p. 135-139, 2007.

Resumos publicados em anais de congressos

1. **TENÓRIO, D. P. L. A.**; ANDRADE, C. G.; CABRAL FILHO, P. E.; SANTOS, C. C.; KATO, I. T.; RIBEIRO, M. S. ALVES Jr., S.; BELTRÃO, E. I. C.; CARVALHO Jr., L. B.; FONTES, A.; SANTOS, B. S. CdTe/CdS quantum dots bioconjugated to concanavalin A lectin to study carbohydrates expression in *Candida albicans*. In: 10th ICCB/ 16th Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, Rio de Janeiro/RJ, 2012.

2. **AZEVEDO, D. P. L.**; ANDRADE, C. G.; CABRAL FILHO, P. E.; SANTOS, C. C.; KATO, I. T.; RIBEIRO, M. S.; ALVES Jr., S.; BELTRÃO, E. I. C.; CARVALHO Jr., L. B.; FONTES, A.; SANTOS, B. S. CdTe/CdS quantum dots conjugated to Concanavalin A lectin as potencial probes to diagnostic. In: III SINATER, 2011, Recife. Symposium International of Diagnostic and Therapy, Recife/PE, 2011.

3. BEZERRA, M. C.; **TENÓRIO, D. P. L. A.**; CHAVES, C. R.; STAMFORD, T. M.; SANTOS, B. S.; FONTES, A.; FARIAS, P. M. A. Nanospheres of chitosan and CdTe quantum dots for the development of drug carrier systems. In: IX Brazilian MRS Meeting, 2010, Ouro preto/MG. IX Brazilian MRS Meeting, 2010.

4. SALES-NETO, A. T.; BRASIL Jr, A. G.; **TENÓRIO, D. P. L. A.**; LIRA, R. B.; FARIAS, P. M. A.; FONTES, A.; SANTOS, B. S. CdS/Cd(OH)₂ nanocrystals as new biophotonic tools to investigate the antigens A expression in red blood cells. In: 11th International Conference on Advanced Materials ICAM 2009 - VIII Encontro da SBPMat, 2009, Rio de Janeiro/RJ. 11th International Conference on Advanced Materials, 2009.

5. STAMFORD, Thatiana M.; **TENÓRIO, D. P. L. A.**; NASCIMENTO, R. M.; STAMFORD, Thaysa. M.; SANTOS, B. S.; FONTES, A.; FARIAS, P. M. A. Physico-chemical analyses of distinct chitosan and their potential as quantum dots biocompatibilization agents. In: 11th International Conference on Advanced Materials ICAM 2009 - VIII Encontro da SBPMat, 2009, Rio de Janeiro/RJ. 11th International Conference on Advanced Materials, 2009.

6. CASTRO-NETO, A. G.; FONTES, A.; SANTOS, B. S.; **TENÓRIO, D. P. L. A.**; SAADE, J.; FARIAS, P. M. A. Synthesis, optical and structural characterization of fluorescent water soluble CdSe/CdS quantum dots. In: 11th International Conference on Advanced Materials ICAM 2009 - VIII Encontro da SBPMat, 2009, Rio de Janeiro/RJ. 11th International Conference on Advanced Materials, 2009.

7. CABRAL FILHO, P. E.; SALES-NETO, A. T.; BRASIL Jr, A. G.; **TENÓRIO, D. P. L. A.**; LIRA, R. B.; FARIAS, P. M. A.; SANTOS, B. S.; FONTES, A. Nanocrystals fluorescentes de semicondutores como novas ferramentas biofotônicas para investigação da expressão de antígenos eritrocitários. In: 6 Congresso Alagoano de Biomedicina - 2º Congresso do Instituto Nacional de Biomedicina - 2 EREBIOM, 2009, Maceió/AL. 6 Congresso Alagoano de Biomedicina, 2009.

8. CHAVES, C. R.; **TENÓRIO, D. P. L. A.**; BRASIL Jr, A. G.; MOURA, R. M. B.; CARVALHO, K. H. G.; FARIAS, P. M. A.; FONTES, A.; SANTOS, B. S. Simple synthetic routes of water soluble CdTe nanocrystals for biological applications. In: XIV Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry I Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry, 2008, Foz do Iguaçu/RS. XIV Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry, 2008.

9. JOVINO, C. N.; MENEZES, F. D.; **AZEVEDO, D. P. L.**; FARIAS, P. M. A.; FERREIRA, R.; SANTOS, B. S. New synthetic methods for highly luminescent CdSe and CdSe/Zn(OH)₂ quantum dots in aqueous medium. In:

XIII Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry, 2006, Fortaleza/CE. XIII Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry, 2006. v. Único.

10. AZEVEDO-XIMENES, E.; **AZEVEDO, D. P. L.** Potencial Probiótico da Cultura de *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1015 sobre linhagens de *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases. In: IV COPEFARMA, 2005, Recife/PE. IV Congresso Pernambucano de Farmácia, 2005. v. Único. p. 101.

11. SANTOS, A. F.; **AZEVEDO, D. P. L.**; AURELIANO, B. G.; Silva, E. D. A.; PORFIRIO, Z.; SANT'ANA, A. E. G. Avaliação da Atividade Piscicida de Espécies Vegetais Moluscicidas. In: 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2003, Poços de Caldas/MG. Anais da 26ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 2003.

12. SANTOS, A. F.; LOPES, L. A.; SANTOS, C. M.; **AZEVEDO, D. P. L.**; SANT'ANA, A. E. G. Espécies Vegetais no Combate a Esquistossomose Mansônica. In: 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2002, Poços de Caldas/MG. Anais da 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2002.

13. **AZEVEDO, D. P. L.**; SANTOS, A. F.; SANT'ANA, A. E. G. Avaliação da Atividade Nematicida de Algumas Espécies Vegetais Frente ao Nematódeo *Caenorhabditis elegans* e sua Toxicidade Frente a *Artemia salina*. In: XI Encontro de Iniciação Científica, 2002, Maceió/AL. XI Encontro de Iniciação Científica, 2002.

14. **AZEVEDO, D. P. L.**; SANTOS, A. F.; SANT'ANA, A. E. G. Avaliação da Atividade de Algumas Espécies Vegetais Frente ao Molusco *Biomphalaria glabrata* Say e Toxicidade Frente a *Artemia salina* Leach. In: XII Encontro de Iniciação Científica, 2002, Maceió/AL. XII Encontro de Iniciação Científica, 2002.

15. SANTOS, A. F.; LOPES, L. A.; SANTOS, C. M.; **AZEVEDO, D. P. L.**; SILVA, L. A.; SANT'ANA, A. E. G. Atividade Cercaricida de Espécies Vegetais. In: 24ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2001, Poços de Caldas/MG. Anais da 24ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2001.

16. SANTOS, A. F.; **AZEVEDO, D. P. L.**; SANTOS, C. M.; MENDONÇA, D.; RODILLA, J. M. L.; MATA, R.; SANT'ANA, A. E. G. Molluscicidal Activity of Compounds from *Euphorbia conspicua*. In: 8º International Symposium on Schistosomiasis, 2001, Recife/PE. Anais do 8º International Symposium on Schistosomiasis, 2001.

17. **AZEVEDO, D. P. L.**; SANTOS, A. F.; SANT'ANA, A. E. G. Avaliação da Atividade Nematicida de Espécies Vegetais Frente ao Nematódeo *Caenorhabditis elegans*. In: X Encontro de Iniciação Científica, 2000, Maceió/AL. Anais do X Encontro de Iniciação Científica, 2000.

18. SANTOS, A. F.; **AZEVEDO, D. P. L.**; SANTOS, C. M.; SILVA, L. A.; SANT'ANA, A. E. G. Avaliação da Atividade Nematicida de Espécies Vegetais Frente a *Caenorhabditis elegans*. In: XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2000, Recife/PE. Anais do XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2000. p. 249.

PUBLICAÇÕES:

CdTe/CdS-MPA quantum dots as fluorescent probes to label yeast cells: synthesis, characterization and conjugation with Concanavalin A

Ilka T. Kato¹, Camila C. Santos¹, Endi Benetti¹, Denise P. L. A. Tenório², Paulo E. Cabral Filho², Caetano P. Sabino¹, Adriana Fontes², Beate S. Santos³, Renato A. Prates¹, Martha S. Ribeiro¹

¹ Centro de Lasers e Aplicações, IPEN-CNEN/SP, São Paulo/SP, Brazil

² Departamento de Biofísica e Radiobiologia, UFPE, Recife/PE, Brazil

³ Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPE, Recife/PE, Brazil

ABSTRACT

Candida albicans is the most frequent human opportunistic pathogenic fungus and one of the most important causes of nosocomial infections. In fact, diagnosis of invasive candidiasis presents unique problems. The aim of this work was to evaluate, by fluorescence image analysis, cellular labeling of *C. albicans* with CdTe/CdS quantum dots conjugated or not to concanavalin A (ConA). Yeast cells were incubated with CdTe/CdS quantum dots (QD) stabilized with mercaptopropionic acid (MPA) (emission peak at 530 nm) for 1 hour. In the overall study we observed no morphological alterations. The fluorescence microscopic analysis of the yeast cells showed that the non-functionalized QDs do not label *C. albicans* cells, while for the QD conjugated to ConA the cells showed a fluorescence profile indicating that the membrane was preferentially marked. This profile was expected since Concanavalin A is a protein that binds specifically to terminal carbohydrate residues at the membrane cell surface. The results suggest that the QD-labeled *Candida* cells represent a promising tool to open new possibilities for a precise evaluation of fungal infections in pathological conditions.

Key words: biofilm, *Candida albicans*, candidiasis diagnosis, lectin, fluorescence microscopy

1. Introduction

Candida albicans is a commensal fungus of the human gastrointestinal and genitourinary tract that frequently causes superficial infections of mucosa and skin. The infection depends on imbalances between *C. albicans* virulence attributes and impaired host defense. In critically ill patients, this yeast may invade deeper tissues, penetrate the blood vessels, and cause life-threatening systemic infections¹.

Invasive candidiasis (IC) is a serious problem and associated with significant morbidity and mortality, so early identification of intensive care unit patients with signs of sepsis at high risk of IC is challenging². Effective antifungal drugs are the gold standard treatment for IC, and success of the treatment depends on the speed in differential diagnostic of the yeast. Early diagnosis of IC and candidaemia is of vital importance mainly in immunosuppressed patients, however, blood cultures frequently lack sensitivity, are often inadequate in quantity and require 24–48 h of incubation³. Other techniques are also available but an efficient diagnostic method is still missing.

Quantum dots (QD) are semiconductor nanocrystals that have been applied as fluorescent probes. QD present unique optical properties including high photostability, broad absorption bands and size-tunable narrow emission spectra, which make them suitable for biological applications⁴. Beside, QD can be linked with biorecognition molecules such as proteins, peptides, and nucleic acids⁵. The major advantages of QDs are that they are brighter and do not suffer from photobleaching, a problem encountered on conventional fluorophores. This allows following processes in living cells on a long-time scale⁶.

Lectins are proteins that selectively bind carbohydrates. Concanavalin A (ConA), a powerful agglutinating lectin that binds specifically to α -D-mannose and glucose, has been applied in new methodologies of diagnostic⁷.



Short term inhalation toxicity of a liquid aerosol of CdS/Cd(OH)₂ core shell quantum dots in male Wistar rats

L. Ma-Hock^a, S. Brill^a, W. Wohlleben^b, P.M.A. Farias^{c,d}, C.R. Chaves^{c,d}, D.P.L.A. Tenório^{c,d}, A. Fontes^e, B.S. Santos^f, R. Landsiedel^a, V. Strauss^a, S. Treumann^a, B. van Ravenzwaay^{a,*}

^a BASF SE, Experimental Toxicology and Ecology, 67056 Ludwigshafen, Germany

^b BASF SE, Polymer Physics, 67056 Ludwigshafen, Germany

^c Research Group on Nanostructures and Biological Interfaces, Federal University of Pernambuco (UFPE), 50670-901 Recife, Brazil

^d Graduate Program on Materials Science, Federal University of Pernambuco (UFPE), 50670-901 Recife, Brazil

^e Graduate Program on Biological Sciences, Federal University of Pernambuco (UFPE), 50670-901 Recife, Brazil

^f Graduate Program on Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco (UFPE), 50670-901 Recife, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 July 2011

Received in revised form 12 October 2011

Accepted 13 October 2011

Available online 20 October 2011

Keywords:

Quantum dots

Rat

Inhalation

Cadmium

Sub-acute toxicity

ABSTRACT

Colloidal quantum dots (QD) show great promise as fluorescent markers. The QD used in this study were obtained in aqueous medium rather than the widely used colloidal QD. Both methodologies used for the production of QD are associated with the presence of heavy metals such as cadmium (Cd). Here we investigate the short-term inhalation toxicity of water-soluble core-shell CdS/Cd(OH)₂ QD. Male Wistar rats were head-nose exposed for 6 h/day on 5 days at the technically maximum concentration (0.52 mg Cd/m³). Histological examination was performed directly after the last exposure. Additional rats were used for Cd organ burden determinations. Clinical parameters in blood, bronchoalveolar lavage fluid and lung tissue were determined 3 days after the last exposure. To analyze the reversibility or progression of effects, the examinations were performed again after a recovery period of 3 weeks. The results of the study indicate that CdS/Cd(OH)₂ QD caused local neutrophil inflammation in the lungs that partially regressed after the 3-week recovery period. There was no evidence that QD were translocated to the central nervous system nor that a systemic acute phase response occurred.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Quantum dots (QD), first developed in the early 1980s, are crystalline semiconducting nanoparticles comprised of a metalloid crystalline core and a “cap” or “shell” that shields the core, minimizes surface traps and increases quantum yield (Powell and Kanarek, 2006). Cadmium (Cd)-containing QD consist of different core/shell structures: CdS/Cd(OH)₂, CdSe/CdS, CdTe/CdS. They are nanoparticles in the low nanometer range, their fluorescence wavelength is closely related to their size. Photobleach tendency of such QDs is low. These properties make them suitable for fluorescent probing applications to detect cancer biomarkers *in vitro* and *in vivo* in cells/tissues/whole body (Gao et al., 2004; Farias et al., 2006). The increasing use and applications of QD in distinct technological areas, however, will invariably result in human exposure to QD.

Beside all their exciting optical and electrical properties, QD are nanoparticles with unknown *in vivo* toxicological properties. Thus,

the risk/benefit ratio for the use of nanomaterials in any technological or medical development must be evaluated (Thomas and Sayre, 2004; Medina et al., 2007). For certain medical applications besides intravenous (i.v.) injection inhalation is also a relevant exposure route. Nanoparticles can induce increased lung toxicity compared to larger particles with the same chemical composition at equivalent mass concentration (Oberdörster et al., 2005). In addition, it has been shown that nanomaterials can induce inflammatory reactions in the lungs of experimental animals (Brown et al., 2001; Gilmour et al., 2004; Dailey et al., 2006). Although inflammatory reactions in the lung seem to be a common denominator, the extent of the toxicity induced by nanomaterials depends on a combination of parameters. Among these, the chemical composition and surface modification, size and shape, persistence and the release of metal ions are considered to be the most relevant (Landsiedel et al., 2010). Furthermore, a few of the inhaled nanoparticles could possibly avoid normal phagocytic defenses in the respiratory system and translocate to the blood stream or even to the central nervous system (Kreyling et al., 2002; Oberdörster et al., 2004). In addition to the general toxicity of nanoparticles, it should be noted that intake of QD poses a risk of systemic exposure to Cd. Cd is known to have a biological half-life of 15–20 years in humans

* Corresponding author. Tel.: +49 621 60 5 64 19; fax: +49 621 60 5 81 34.

E-mail address: bennard.ravenzwaay@basf.com (B. van Ravenzwaay).

Biocompatible Water Soluble Quantum Dots as New Biophotonic Tools for Hematologic Cells: Applications for Flow Cell Cytometry

Rafael B. Lira^{#1}, Antonio T. de Sales Neto^{#2}, Kilmara H. G. Carvalho², Elisa S. Leite³, Aluizio G. Brasil Jr.², Denise P. L. Azevedo², Paulo E. Cabral Filho¹, Mariana B. Cavalcanti⁴, Ademir J. Amaral⁴, Patrícia M. A. Farias¹, Beate S. Santos², Adriana Fontes^{1*}

¹ Departamento de Biofísica e Radiobiologia, CCB – UFPE, 50670-901, Recife – PE, Brazil.

² Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS – UFPE, 50740-521, Recife – PE, Brazil.

³ Departamento de Engenharia Química, CTG – UFPE, 50740-521, Recife – PE, Brazil.

⁴ Departamento de Energia Nuclear, CTG – UFPE, 50740-540, Recife – PE, Brazil.

[#] these authors contributed equally to this work

ABSTRACT

Quantum dots (QDs) are a promising class of fluorescent probes that can be conjugated to a variety of specific cell antibodies. For this reason, simple, cheap and reproducible routes of QDs's syntheses are the main goal of many researches in this field. The main objective of this work was to demonstrate the ability of QDs as biolabels for flow cell cytometry analysis. We have synthesized biocompatible water soluble CdS/Cd(OH)₂ and CdTe/CdS QDs and applied them as fluorescent labels of hematologic cells. CdTe/CdS QDs was prepared using a simple aqueous route with mercaptoacetic acid and mercaptopropionic acid as stabilizing agents. The resulting CdTe/CdS QDs can target biological membrane proteins and can also be internalized by cells. We applied the CdTe/CdS QDs as biolabels of human lymphocytes and compared the results obtained for lymphocytes treated and non-treated with permeabilizing agents for cell membranes. Permeabilized cells present higher fluorescence pattern than non permeabilized ones. We associated antibody A to the CdS/Cd(OH)₂ QDs to label type A red blood cell (RBC). In this case, the O erythrocytes were used as the negative control. The results demonstrate that QDs were successfully functionalized with antibody A. There was a specific binding of QDs-antibody A to RBC membrane antigen only for A RBCs. We have also monitored QDs-hematologic cell interaction by using fluorescence microscopy. Our method shows that QDs can be conjugated to a variety of specific cell antibodies and can become a potential, highly efficient and low cost diagnostic tool for flow cell cytometry, very compatible with the lasers and filters used in this kind of equipments.

Keywords: red blood cells, lymphocytes, quantum dots, CdS/Cd(OH)₂, CdTe/CdS, bioconjugation, cytometry, fluorescence

1. INTRODUCTION:

Fluorescence is a powerful technique to study biological events. The high sensitivity of fluorescence, combined with advances in analytical techniques, permits the detection of ultra small quantities (even a single molecule) of species present in the biological systems^{1,2}. Usually, the precise location of intracellular components is done by using fluorophores that can target specific molecules presented in cells. Dyes and fluorescent proteins have been used as fluorophores, however they present one or more of the following disadvantages: lack of brightness, broad emission bands, high photobleaching rate and high cytotoxicity². Semiconductor quantum dots (QDs) are a promising class of fluorescent probes that can be conjugated to a variety of cell antibodies for specific recognition and labeling of biological systems³. Compared to organic fluorophores, QDs have an exceptional resistance to photodegradation, narrower emission spectrum with high quantum yield, broader absorption bands, larger effective Stokes shifts and

* adriana.fontes@pesquisador.cnpq.br; phone: 55 81 2126 7818.



New highly fluorescent biolabels based on II–VI semiconductor hybrid organic–inorganic nanostructures for bioimaging

B.S. Santos^{a,e,*}, P.M.A. Farias^{b,e}, F.D. Menezes^{a,c,e}, A.G. Brasil Jr.^{a,e}, A. Fontes^{b,e}, L. Romão^d, J.O. Amaral^d, V. Moura-Neto^d, D.P.L.A. Tenório^e, C.L. Cesar^f, L.C. Barbosa^f, R. Ferreira^{c,e}

^a Depto. de Ciências Farmacêuticas, UFPE, CDU, 50740-120 Recife, PE, Brazil

^b Depto. Biofísica e Radiobiologia, UFPE, CDU, 50670-901 Recife - PE, Brazil

^c Depto. Química Fundamental, UFPE, CDU, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^d Depto. Anatomia, UFRJ, 21941-590 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^e Grupo de Pesquisas em Nanoestruturas e Interfaces Biológicas, CDU, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^f Depto. Eletrônica Quântica, IFGW, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 4 July 2008

Keywords:

Quantum dots

Nanoparticles

CdS

CdTe

Biolabel

Bioimaging

ABSTRACT

Semiconductor quantum dots based on II–VI materials may be prepared to develop good biolabeling properties. In this study we present some well-succeeded results related to the preparation, functionalization and bioconjugation of CdY (Y = S, Se and Te) to biological systems (live cells and fixed tissues). These nanostructured materials were prepared using colloidal synthesis in aqueous media resulting nanoparticles with very good optical properties and an excellent resistance to photo-degradation.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Nanostructured materials based on semiconductor quantum dots (QDs) revealed to be a powerful tool for labeling biological systems in the last decade. Their nanoscale size range is compatible to most of the metabolic and internalization processes observed in cells [1,2]. Compared to organic fluorophores QDs show an exceptional resistance to photodegradation and photobleaching, narrower photoluminescence with high quantum yield, broader absorption bands, large effective Stokes shifts and higher absorption coefficients. In order to target them to a specific molecule (e.g. proteins, peptides, organic and inorganic polymers, DNA, carbohydrates) present in the biological system under study, their surface must be chemically modified with organic species. This procedure is called the functionalization of the nanoparticles and the resulting system may be considered a hybrid organic–inorganic nanostructure [3]. The resulting systems possess the

combined properties of both forming elements: the optical properties of the QDs and the biological functionalities leading to specific association to biosystems. These nanobiolabels may be used in monitoring biological processes at molecular level. In this work we show several well-succeeded examples of the functionalization of CdS/Cd(OH)₂, CdSe/CdS and CdTe/CdS nanoparticles (*d* = 2–6 nm) and their biolabeling to different biological systems (cancer cells and tissues, live parasites and yeast cells).

2. Experimental details

CdY (Y = S, Se, Te) nanocrystals were prepared in colloidal aqueous medium by a controlled precipitation procedure using polyphosphate (PolyP) or mercapto-acetic acid (MAA) as stabilizing agents [4,5]. In a typical CdSe (or CdTe) procedure, Se^{2−} (or Te^{2−}) ions were produced reducing the Se (or Te) metal with NaBH₄ in aqueous solution and adding it to a solution containing the Cd²⁺–MAA complexes. A further thermal treatment was performed to produce a CdS shell by the hydrolysis of the thiol groups of the MAA molecules [6]. The CdS/Cd(OH)₂ crystals were produced by adding H₂S(g) to a Cd²⁺ solution containing PolyP. The passivation procedure of the CdS particles consists of the controlled precipitation of a Cd(OH)₂ layer using OH[−] followed by

* Corresponding author at: Depto. de Ciências Farmacêuticas, UFPE, CDU, R. Prof. Artur de Sa, S/N, Cidade Universitária, 50740-120 Recife, PE, Brazil.

Tel.: +55 81 99688268; fax: +55 81 2126 8511.

E-mail address: beate_santos@yahoo.com.br (B.S. Santos).

CdTe/CdS QUANTUM DOTS CONJUGATED TO CONCAVALIN A LECTIN AS POTENCIAL PROBES FOR IMAGING AND DIAGNOSTICS

Denise P. L. A. Tenório¹, Camila G. Andrade², Paulo E. Cabral Filho³, Caetano P. Sabino⁴, Ilka T. Kato⁴, Martha S. Ribeiro⁴, Luiz B. Carvalho Jr.², Severino Alves Jr.^{1,6}, Adriana Fontes³, Beate S. Santos⁵

¹ Programa de Pós-graduação em Ciência de Materiais, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

² Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

³ Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

⁴ Centro de Lasers e Aplicações, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Centro Nacional de Energia Nuclear, São Paulo, SP, Brazil.

⁵ Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

⁶ Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

Corresponding Authors: Beate S. Santos, Av. Artur de Sá, S/N. Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS, UFPE, 50740-120, Recife, PE, Brazil - Phone: +55 81 21267818 - Fax: +55 81 21268510, e-mail: beate_santos@yahoo.com.br – Adriana Fontes, Av. Prof. Moraes Rego, S/N. Departamento de Biofísica e Radiobiologia, CCB, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil, e-mail: adri_fontes@uol.com.br

ABSTRACT

Semiconductor colloidal quantum dots (QDs) have been applied in biological analyses due to their optical properties and versatility. Compared to organic dyes, QDs present unique properties, such as photostability and size/composition-tunable emission, which makes them interestingly suitable for biological applications. These nanoparticles can be functionalized when conjugated to biological molecules, including lectins, proteins that selectively bind carbohydrates. Concanavalin A (Con A) lectin binds specifically to α -D-mannose and α -D-glucose in glycoconjugates (usually expressed on cell membranes). In this work, we present an efficient bioconjugation of CdTe/CdS-MSA QDs with Con A and applied them to label *Candida albicans* in planktonic suspensions and biofilms because its cell wall is rich in glycoproteins and mannoproteins. CdTe/CdS QDs were synthesized using Cd(ClO₄)₂ and tellurium as precursors and mercaptosuccinic acid (MSA) as stabilizing agent. QDs were characterized by absorption and emission spectroscopy before and after bioconjugation to Con A (0.028 g/mL) by adsorption. Accomplishing hemagglutination experiments and circular dichroism, we observed that the Con A biochemical properties were preserved after the bioconjugation and the bioconjugation was confirmed by fluorescence microplate reader. Fluorescence microscopy images showed yeast and biofilm cells incubated with QDs-(Con A) showed a bright orange fluorescence profile, indicating that the cell walls were specifically labeled. In contrast, non-conjugated QDs do not label any kind of cells. Our results show that QDs were effectively conjugated to Con A opening new possibilities to evaluate and study not only fungal infections, but also other micropathological conditions where carbohydrates expression is an important feature.

KEYWORDS: *Candida albicans*, Quantum dots, Concanavalin A, lectin, bioconjugation.

1. INTRODUCTION

Nanotechnology applications of novel nanomaterials, with unique physical or chemical properties, in diagnostics, in therapies or for monitoring and understanding biological processes are referred as Nanomedicine [1]. In this context, quantum dots (QDs) has been considered the most promising nanomaterial for clinical diagnosis. The quantum dots are semiconductor nanocrystals that, typically, have diameters between 2 and 10 nm and their emission wavelength is proportional to their size. Compared to organic dyes, QDs present unique optical properties, including high photostability, broad absorption band, size-tunable narrow emission spectra and active surface, which make them interestingly suitable for biological applications [2]. The large effective Stokes shift favors the separation of excitation from emission and the efficiency of emission signal collection [3]. When the QDs is associated to divers molecules, as proteins and antibody [4], in an integration called bioconjugation, the QDs has been used for label cancer cells, tissues and also to improve real-time fluorescence tracking and detection in live cells and animals [5], representing a major advances in medical diagnostics, therapeutics, molecular biology and cell biology [6], as an immunoassay for detection and identification fungal [7], for example.

Candida albicans is the most common opportunistic fungal pathogen present in humans. An infection progression depends on imbalances between *C. albicans* colonizing attributes and suppressed host defense leading to tissue invasion, blood contamination and potentially lethal systemic infections [8,9]. Early diagnosis for invasive candidiasis (IC) and candidaemia have a major importance mainly for immunosuppressed patients and blood cultures frequently do not show enough sensitivity, are not accurate quantifying fungal burden into tissues and require extended incubation time [10]. Furthermore, symptomatology is identical to other nosocomial infections, and more characteristic manifestations are rare and mainly observed in highly immunosuppressed patients. Prophylactic administration of hepatotoxic antifungal drugs for patients without any signs of infection and empirical administration of antifungal therapy, following a predefined duration of fever without clinical or laboratory diagnostics remains the standard therapeutic procedure in high risk patients [8].

This microorganism shows different cellular morphologies such as yeast and hyphae with a complex macromolecular cell wall structure. So, carbohydrates (mainly α -glucans, chitin and glycoproteins) representing approximately 80 to 90% of its composition being proteins (6 to 25%) and lipids (1 to 7%) present in minor amounts [11]. Some microorganisms creates a source of persistent infection, where they are protected to antibiotic treatment, in *C. albicans* biofilms, all forms of cells are presents [12]. Furthermore, the extracellular matrix formed in *C. albicans* biofilms also presents high concentrations of carbohydrates, making this specie an easy target for Con A [13].

Concanavalin A (Con A) is a legume lectin extracted of *Canavalia ensiformis*, has a large powerful agglutinating being broadly employed into diagnostics, which binds specifically to α -D-mannose and α -D-glucose residues [14]. Lectins are proteins that selectively bind carbohydrates; this unique class of proteins plays a major role as recognition molecules in biological events [15]. This biomolecules can be applied in biochemistry, cell biology, immunology and other areas. They also are used for structural characterization of glycoconjugates of unknown structure and identification of lectin, reactive structures in biological materials (body fluids, cells and tissues) [16].

Early diagnosis and monitoring treatments for invasive candidiasis are still in focus and are of vital importance mainly in immunosuppressed patients. We report in this work an efficient bioconjugation of CdTe/CdS-MSA QDs with Con A and we applied them to label *Candida albicans* yeast cells and biofilms.

2. EXPERIMENTAL PROCEDURES

2.1. Materials:

Mercaptosuccinic acid (MSA), cadmium perchlorate ($\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$), sodium borohidryde (NaBH_4), tellurium (Te) and concanavalin A (Con A) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Isopropyl alcohol and other routine chemicals were purchased from Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brazil). All the chemicals used were at analytical grade and ultrapure water (18.2 M Ω) was used in all experiments.

2.2. General procedure for CdTe/CdS-MSA QDs synthesis and characterization:

CdTe/CdS-MSA core/shell QDs were synthesized in aqueous colloidal dispersion according to the previously reported method with some modifications [17]. Briefly, QDs were prepared by the addition of Te^{2-} in a $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ solution of pH>10 in the presence of MSA (mercaptosuccinic acid) as stabilizing agents in a 2:1:6.1 ratio of Cd:Te:MSA respectively. The Te^{2-} aqueous solution was prepared using tellurium metallic and NaBH_4 , at a high pH and under nitrogen saturated inert atmosphere. The reaction proceeded, under constant stirring and heating at 90 °C during 12 hours. After synthesized, QDs were structurally characterized by X-ray diffraction (XRD) and transmission electron microscopy (TEM). The XRD powder analysis was carried out with Siemens Nixdorf D5000 diffractometer with $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=0.15418$ nm) radiation. The XRD pattern was obtained from CdTe/CdS-MSA QDs powders precipitated from an aqueous solution of QDs with isopropyl alcohol. TEM images were obtained on a Tecnai G2 20 FEI 2006 microscope operating at 200 kV. The samples were prepared dropping diluted solutions of CdTe/CdS-MSA QDs nanocrystals onto 200-mesh holey carbon-coated copper grids with the excessive solvent immediately evaporated. The optical characterization was

carried by absorption spectra on a spectrophotometer Evolution 600 UV-Vis, Thermo Scientific, and emission spectra were recorded using a fluorescence spectrometer LS 55, Perkin Elmer (λ_{exc} 365 nm).

2.3. CdTe/CdS-MSA QDs conjugation to Con A and Con A structural study:

The CdTe/CdS-MSA QDs were conjugated to Con A by adsorption. The QDs solution pH was adjusted at 8.0 and placed in contact with Con A for 2 h, at room temperature, with low stirring. For 3 mL solution, containing QDs concentration at $5.1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ Con A was added at 280 $\mu\text{g/mL}$. The QDs bioconjugated were optically characterized by absorption and emission spectra. Furthermore, to evaluate the Con A secondary structure the circular dichroism (CD) spectra (Con A alone and bioconjugated) were recorded on Jasco (J-815) spectropolarimeter over a wavelength range of 185–250 nm, under constant N_2 purging. The CD profiles were obtained at 25 °C in 1 cm path length cuvette by employing a scan speed of 50 nm/min and response time of 8 seconds and averaged over 10 scans to eliminate signal noise. The structural study was carried with lectin alone and its conjugates at $2 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ protein concentration in phosphate-buffered saline diluted.

2.4. Confirming the conjugation and protein activity:

The conjugation confirmation was performed in microplate based fluorescence measurements using a Wallac Victor² 1420 multilabel counter, Perkin Elmer, using the black 96 well Optiplate F HB microplates, PerkinElmer and the activity of the lectin conjugated to QDs was evaluated by hemagglutination assay. In order to confirm the conjugation by quantitative measurement of the fluorescence QDs-(Con A) and controls were incubated in 96 wells microplate for 2 hours at 37°C and screening for a microplate reader equipped with excitation filter at $480 \pm 31 \text{ nm}$ and emission filter at $595 \pm 60 \text{ nm}$. All experimental procedure was carried out in triplicates. For hemagglutination assay, the lectin, the QDs and the conjugates was serially diluted and incubated with 2% (v/v) trypsinated rabbit erythrocyte cell suspension in 150 mM NaCl, for 45 minutes in 96 well microplate at room temperature and the hemagglutination potency was expressed as hemagglutinating units (HU).

2.5. Cell culture and biofilm assay

Candida albicans ATCC 90028 cells were cultivated in Sabouraud dextrose broth (Difco Laboratories, Detroit, USA) for 24 hours at 37° C with shaking at 75 rpm. The fungal cells was centrifugated at $3.5 \times 10^3 \text{ rpm}$ for 3 minutes, and the resulting pellet was resuspended and cell concentration was adjusted to $2 \times 10^6 \text{ CFU/mL}$ in 0,15 mol L^{-1} phosphate-buffered saline (pH 7,2) (Sigma), employing transmission spectroscopy (Biospec) at 540 nm resulting 68.5% transmittance by a 1 cm optical path. Biofilms were grown on 96 wells microplates pretreated

overnight with 100 μL /well of fetal bovine serum (Sigma). After washing the wells with 0,15 mol L⁻¹ phosphate-buffered saline (pH 7,2), 200 μL of cell suspension was added. The microplates were left for 1:30 hours at 37° C in order to completely decant the cells encouraging adhesion before adding 150 μL of Sabouraud dextrose broth. Biofilms were grown over 72 hours at 37° C, gently shaking at 120 rpm.

2.6. Label *C. albicans* with QDs-(Con A):

The fungal cells labeling was performed for yeast cell suspension and biofilm of *C. albicans* ATCC 90028 toward QDs-(Con A), QDs alone and QDs-(inhibited Con A). To confirm the lectin specificity sugar in *C. albicans* cell wall and biofilms, a lectin binding inhibition assays were accomplished incubating QDs-(Con A) with methyl- α -D-mannopyranoside 0.3 mol L⁻¹ (Sigma) for 30 min prior to its incubation with the both systems, yeast cells and biofilms. The incubation of cell suspensions (10⁶ CFU/mL) with 200 μL QDs were performed at volume proportion of 1:1 for 1 hour. After incubation all systems (test and controls) were washed by centrifugation at 3.6 x 10³ rpm for 30 seconds for removing QDs free. For biofilm label, the Sabouraud dextrose broth was removed and the biofilm remaining was washed with 150 μL of phosphate-buffered saline (pH 7,2) for non-adhered cells exclusion. A volume of 150 μL of each system was added to biofilm wells and incubated for 1½ hours at 25 °C. After incubation all systems (test and controls) were removed and biofilms were again washed to remove QDs free. The fungal labelling was observed in a fluorescence microscope Leica DMI4000B and confocal microscope Olympus IX81. Furthermore, the flow cytometry, FACSCalibur, Becton Dickinson, was used for quantification these labeling yeast cells suspension. The software used for data cytometry processing was Cell Pro, Cell QuestTM Software, Becton Dickinson immunocytometry system. Around 20,000 events were acquired wonder exciting fluorescence at 488 nm and measured with FL2 filter 585 nm/21 nm.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Characterization of CdTe/CdS-MSA QDs

The structural and optical characterization was used to analyze the size and crystallinity of QDs. The XDR pattern of CdTe QDs showed three diffraction peaks observed at 2 θ values 24.2°, 40.02° and 46.42°, respectively, corresponding to the (111), (220) and (311) crystalline planes. This result is consistent with bulk cubic (zinc blende) CdTe structure (JCPDS No. 75-2086) [18]. Following literature methods [19], the particle-diameter was estimated at 3.0 nm according Scherrer formula, using the peak at 24.2°. The TEM image of CdTe/CdS-MSA QDs shown in Figure 2 shows that the size of the QDs is 3-4 nm, which is in agreement with the size estimated from crystallography data. The optical analyzes revealed an excitonic absorption peak

at 547 nm and photoluminescence at 600 nm, as shown in Figure 3. According to the relationship between the main absorbance and the size of the QDs [20] the size of the CdTe/CdS-MSA QDs can be estimated to be 3.2 nm, as observed by Dagtepe *et al.* and Rogach *et al.* [21,22]. The empirical fitting function: $D = (9,8127 \times 10^{-7})\lambda^3 - (1,7147 \times 10^{-3})\lambda^2 + (1,0064)\lambda - 194,84$, when D (nm) is the size of a given CdTe QDs sample, was employed in this analysis. The extinction coefficient per mole of QDs for the first peak absorption was calculated using the Lambert-Beer's law with absorbance at about 0.15-0.25. The extinction coefficient was estimated in $\epsilon = 1,09 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in according with the formula $\epsilon = 3450 \Delta E (D)^{2,4}$ when ΔE is the transition energy corresponding to the first absorption peak in eV unit and D is the diameter or size particle [20].

3.2 Characterization of CdTe/CdS-MSA QDs-(Con A) conjugates and confirmation of conjugation

The CdTe/CdS-MSA QDs conjugation with Con A lectin was performed at ratio 1000:1 (QDs:Con A). The optical characterization by absorption and emission spectra is showed in the Figure 2. Didn't significant alteration was observed in the absorption and emission spectra by electrostatic conjugation. However in the results presented by Wang and colleagues [23], a red shift was observed after using glutaraldehyde as coupling agent for CdTe-(Con A) conjugation. The protein activity was analyzed before and after CdTe/CdS-MSA QDs conjugation by hemagglutinating assay. The CdTe/CdS QDs alone did not show hemagglutinating activity. However, the CdTe/CdS QDs-(Con A) conjugate displayed an activity equal to Con A controls as exhibited in the Table 1, and suggest a biological activity preservation of the lectin in the conjugate. However a structural study was performed too. The CD spectra of Con A exhibited a negative band in the UV region at 220-230 nm and a positive one at 190-200 nm. These bands are characteristic of a β -strands structure of protein and represents $\pi \rightarrow \pi^*$ and $n \rightarrow \pi^*$ transitions of peptide bonds [24, 25]. This CD spectrum in the far UV region indicates no disruption of secondary structure, with $[\theta]_{222.5}$ being -4600° as compared to -4870° for the native protein (Figure 4). For the conjugation confirmation a fluorescence measurement of the conjugates was observed. For the conjugates with an increase in the fluorescence measurement higher than 100% when compared to controls (Tab. 2) was considered an efficient conjugation. Our results suggests a binding of the CdTe/CdS QDs-(Con A) conjugates on the microplate surface mediated by the protein because was showed an increase in the relative fluorescence intensity greater than 180 %.

3.3 Labeling *C. albicans* yeast and biofilms

The labeling *C. albicans* with QDs-(Con A), QDs alone and QDs-(inhibited Con A) were performed separately with yeast cells and its biofilm. An interaction between CdTe/CdS-MSA QDs and the fungal was observed by QDs-(Con A) conjugate only. No interaction was noted by QDs alone or QDs-(inhibited Con A) conjugate. Our results suggest a specific labeling *C. albicans* cell wall [26] because after cells incubation with QD-(Con A) was showed an intense peripheral fluorescence, as seen in confocal imaging (Figure 5A) and its optical phase contrast overlap (Figure 5B). On the other hand, when QD-(Con A) binding to cells was completely inhibited adding methyl- α -D-mannopyranoside at the concentration of 0.3 mol L^{-1} before the incubation procedure. After Con A inhibition, the yeast cell wasn't label. Therefore, this process confirms a possible lectin binding to carbohydrates in *C. albicans* cell wall. Particularly, *C. albicans* biofilms have a highly heterogeneous architecture composed of cells and extracellular elements with polysaccharide material [12] with an monosaccharides proportion increased in the biofilm (glucose, galactose and mannose) [13]. The biofilm label with QDs-(Con A) results showed a successfully labeling for all cellular morphologies (Figure 6A). The Con A inhibition experiment no shows label any kind of cell in its biofilm. This result can be very important for alternatives therapies, as PDT, when the destruction of the extracellular matrix of a microbial biofilm is crucial to an effectively treatment [27]. Furthermore, non-conjugated QDs do not label extracellular matrix and any kind of cells. Moreover, to quantify how many cells we had specific labeling was did flow cytometry analysis (Figure 7), that demonstrated more 93 % of yeast cells specific labeled. Past studies successfully labeled *C. albicans* cell walls specifically employing AlexaFluor 488-Con A applied the technique for monitoring phagocytes assays [28] and following biofilm growth [29]. Others studies employed FITC-Con A for a binding sites confirmation between enteric bacteria and probiotic yeast [30] and on the investigation about the occurrence of specific receptors in the cell wall in two different lichen phycobionts [31]. Additionally the QDs-lectin conjugate has been employed as fluorescent probes for diagnostic identification of leukemia cells [32], sensor for the detection of glucose [33] and for tumor recognition [34].

4. CONCLUSION

Our results suggest we efficiently conjugated Con A to MSA-capped CdTe/CdS QDs. The Con A conjugated QDs successfully labeled *Candida albicans* cells at any morphology without losing viability and biofilm extracellular structures. This work opens new possibilities to evaluate and study not only fungal infections, but also other pathological conditions where carbohydrates expression is an important feature by using QDs-Con A bioconjugates. Furthermore, the labeling of extracellular matrix is

important because we can monitor effects of therapies on pathogens that form biofilm. One of the principal characteristics of biofilms is their resistance to commonly used antifungal agents. Finally, QDs still can be bioconjugated with other lectins that recognize other carbohydrates in cell membranes or antibodies assisting in diagnostic specific candidiasis. The bioconjugates can also be used to evaluate therapies in fungal infections with biofilm formation in catheter tip or in immunosuppressed patients.

ACKNOWLEDGEMENTS

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 a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), 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. Additionally, we would like to thank the Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) and Academia Brasileira de Ciências (ABC).

REFERENCES

- [1] Wang, Y.; Chen, L. Quantum dots, lighting up the research and development of nanomedicine. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, 7: 385–402, 2011.
- [2] Azzazy, H. M. E.; Mansour, M. M. H.; Kazmierczak, S. C. From diagnostics to therapy: prospects of quantum dots. **Clinical Biochemistry**, 40: 917-927, 2007.
- [3]. Resch-Genger, U.; Grabolle, M.; Cavaliere-Jaricot, S.; Nitschke, R.; Nann, T. **Nature Methods**, 5 (9): 763-775, 2008.
- [4] Tothill, I. E. Biosensors for cancer markers diagnosis. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, 20: 55–62, 2009.
- [5] Mahmoud W.; Sukhanova, A.; Oleinikov, V.; Rakovich Y. P.; Donegan, J. F.; Pluot, M.; Cohen, J. H. M.; Volkov, Y.; Nabiev, I. Emerging applications of fluorescent nanocrystals quantum dots for micrometastases detection. **Proteomics**, 10: 700–716, 2010.
- [6] Chan, W, C. W.; Maxwell, D. J.; Gao, X.; Bailey, R. E.; Han, M.; Nie, S . Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. **Current Opinion in Biotechnology**, 13: 40–46, 2002.

- [7] Kattke, M. D.; Gao, E. J.; Sapsford, K. E.; Stephenson, L. D.; Kumar, A. FRET-based quantum dot immunoassay for rapid and sensitive detection of *Aspergillus amstelodami* **Sensors**, 11: 6396-6410, 2011.
- [8] Eggimann, P.; Barberini, L.; Calandra, T.; Marchetti, O. Candidiasis in the ICU. **Mycoses**, 55 (1): 65–72, 2012.
- [9] Mikolajewska, A.; Schwartz, S.; Ruhnke, M. Antifungal treatment strategies in patients with haematological diseases or cancer. **Mycoses**, 55: 2–16, 2011.
- [10] Kato, I. T.; Santos, C. C.; Benetti, E. A.; Tenorio, D.P.L.A; Cabral Filho, P. E.; Sabino, C. P.; Fontes, A.; Santos, B.S.; Prates, R. A.; Ribeiro, M. S. CdTe/CdS-MPA quantum dots as fluorescent probes to label yeast cells: synthesis, characterization and conjugation with concanavalin A. **Proceedings of SPIE**, 8232: 82320D, 2012.
- [11] Chaffin, W. L.-J.; López-Ribot, J. L.; Casanova, M.; Gozalbo, D.; Martínez, J. P. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 62 (1):130-180, 1998.
- [12] Chandra, J., Kuhn, D.M., Mukherjee, P.K., Hoyer, L.L., McCormick, T., Ghannoum, M.A. “Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance”, *J Bacteriol.* 183(18), 5385-5394 (2001).
- [13]. Baillie, G. S.; Douglas, L. J. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 46: 397-403, 2000.
- [14] Yin, R.; Han, J.; Zhang, J.; Nie, J. Glucose-responsive composite microparticles based on chitosan, concanavalin A and dextran for insulin delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 76: 483-488, 2010.
- [15] Khan, F.; Khan, R. H.; Sherwani, A.; Mohmood, S.; Azfer, M. A. Lectins as markers for blood grouping. **Med Sci Monit**, 8(12), RA293-300, 2002.
- [16] Wu, A. M.; Lisowska, E.; Duk, M.; Yang, Z. Lectins as tools in glycoconjugate research. **Glycoconj J**, 26, 899–913, 2009.
- [17] Santos, B. S.; Farias, P.M.A.;Menezes, F. D.; Brasil Jr., A. G.; Ferreira, R. C; Motta, M. A.; Castro Neto, A. G.;Vieirs, A. A. S.;Silva, D. C. N.; Fontes, A.; Cesar, C. L. Highly fluorescent semiconductor core-shell CdTe-CdS nanocrystals for monitoring living yeast cells activity. **Applied Physics A, Materials Science & Processing**, 89: 957-961, 2007.

- [18] Lalitha, S.; Sathyamoorthy, R.; Senthilarasu, S.; Subbarayan, A. Influence of CdCl₂ treatment on structural and optical properties of vacuum evaporated CdTe thin films. **Solar Energy Materials & Solar Cells**, 90: 694-703, 2006.
- [19] Cullity, B. D. **Elements of X-ray Diffraction**, A.W.P.C. Inc., Massachusetts, 1967.
- [20] Yu, W. W; Qu, L; Guo, W.; Peng, X. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. **Chemical Materials**. 15: 2854-2860, 2003.
- [21] Dagtepe, P.; Chikan, V.; Jasinski, J.; Leppert, V. J. Quantized Growth of CdTe Quantum Dots: Observation of Magic-Sized CdTe Quantum Dots. **Journal of Physical. Chemistry**, 111: 14977-14983, 2007.
- [22] Rogach, A. L.; Franzi, T. A.; Feldmann, J.; Gaponik, K. N.; Lesnyak, V.; Shavel, A.; Eychmuller, A.; Rakovich, Y. P.; Donegan, J. F. Aqueous synthesis of thiol-capped CdTe nanocrystals: State-of-the-art. **Journal of Physics Chemistry**, 111: 14628 – 14637, 2007.
- [23] Wang, J.-H.; Li, Y.-Q.; Zhang, H.-L.; Wang, H.-Q.; Lin, S.; Chen, J.; Zhao, Y.-D.; Luo, Q.-M. Bioconjugation of concanavalin A and CdTe quantum dots and the detection of glucose. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. 364: 82–86, 2010.
- [24] Kelly, S. M.; Price, N. C. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1338: 161–185, 1997.
- [25] Hammes, G. G. **Spectroscopy for Biological Sciences**. New Jersey/ USA: John Wiley & Sons, Inc. 2005. 172p.
- [26] Chaffin, W. L. *Candida albicans* cell wall proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 72 (3): 495–544, 2008.
- [27] Mantareva, V.; Angelov, I.; Kussovski, V.; Dimitrov, R.; Lapok, L.; Wöhrle, D. Photodynamic efficacy of water-soluble Si(IV) and Ge(IV) phthalocyanines towards *Candida albicans* planktonic and biofilm cultures. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 46: 4430-4440, 2011.
- [28] Katragkou, A.; Kruhlak, M. J.; Simitsopoulou, M.; Chatzimoschou, A.; Taparkou, A.; Cotten, C. J.; Paliogianni, F.; Diza-Mataftsi, E.; Tsantali, C.; Walsh, T. J.; Roilides, E.. Interactions between human phagocytes and *Candida albicans* biofilms alone and in combination with antifungal agents, phagocytes, antifungals, and *Candida* biofilm. **Infect Dis**. 201 (12): 1941-1949, 2010.

- [29] Nweze, E. I.; Ghannoum, A.; Chandra, J.; Mahmoud, A.; Mukherjee, P. K. Development of a 96-well catheter-based microdilution method to test antifungal susceptibility of *Candida* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 67: 149–153, 2012.
- [30] Gedek, B. R. Adherence of *Escherichia coli* serogroup O 157 and the *Salmonella Typhimurium* mutant DT 104 to the surface of *Saccharomyces boulardii*. ***Mycoses***, 42: 261-264, 1999.
- [31] Fontaniella, B.; Millanes, A.-M.; Vicente, C.; Legaz, M.-E. ConcanavalinA binds to a mannose-containing ligand in the cell wall of some lichen phycobionts. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42: 773–779, 2004.
- [32] Zhelev, Z.; Ohba, H.; Bakalova, R.; Jose, R.; Fukuoka, S.; Nagase, T.; Ishikawa, M.; Baba, Y. Fabrication of quantum dot–lectin conjugates as novel fluorescent probes for microscopic and flow cytometric identification of leukemia cells from normal lymphocytes. ***Chemical Communications***, 15:1980–1982, 2005.
- [33] Wang, J.-H.; Li, Y.-G.; Zhang, H.-L.; Wang, H.-Q.; Lin, S.; Chen, J.; Zhao, Y.-D.; Luo, Q.-M. Bioconjugation of concanavalin and CdTe quantum dots and the detection of glucose. ***Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects***, 364: 82–86, 2010.
- [34] Santos, B. S.; Farias, P. M. A.; Menezes, F. D.; Ferreira, R. C., Alves Jr, S.; Figueiredo, R. C. B. Q.; Carvalho Jr, L. B.; Beltrão, E. I. C. CdS-Cd(OH)₂ core shell quantum dots functionalized with Concanavalin A lectin for recognition of mammary tumors. ***Physica Status Solidi C***. 3 (11): 4017-4022, 2006.

TABLES AND ILLUSTRATIONS

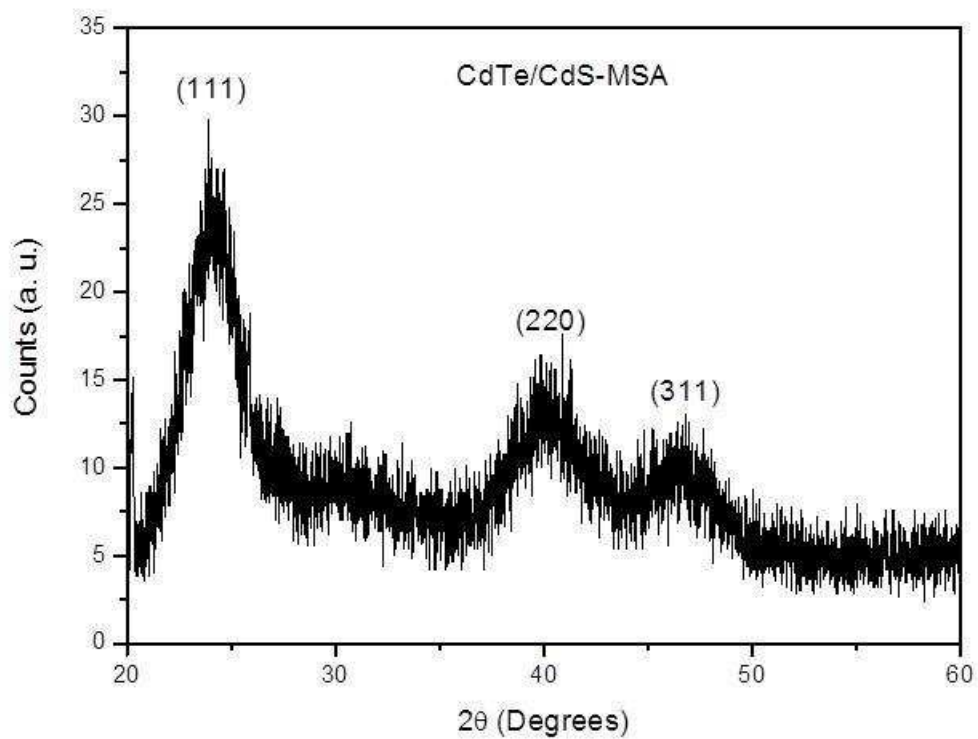


Figure 1: XRD pattern showed for CdTe/CdS-MSA as prepared.

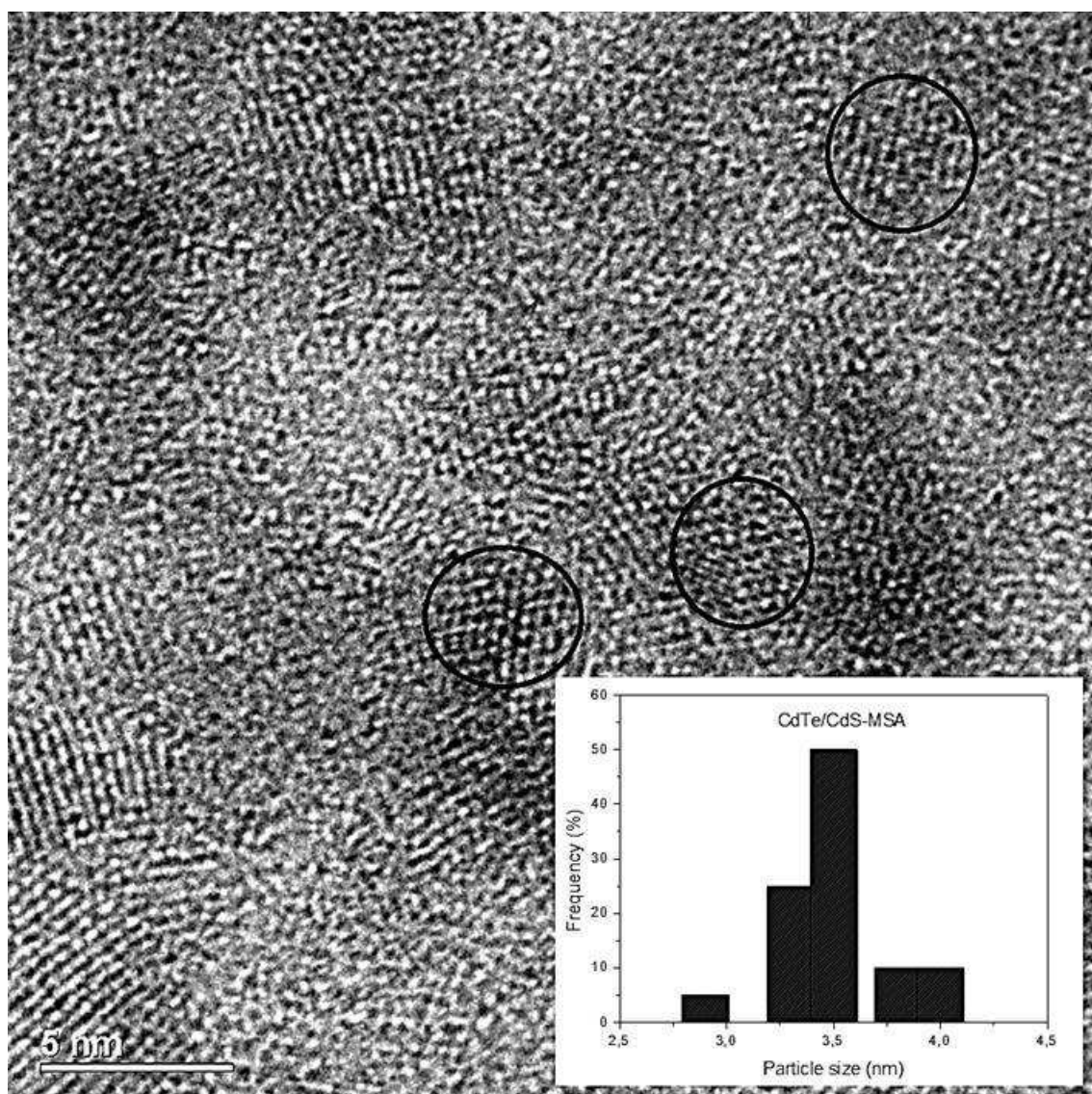


Figure 2: TEM image of CdTe/CdS-MSA, 3-4 nm average size. The size distribution (right) of the QDs. Scale bar: 5 nm.

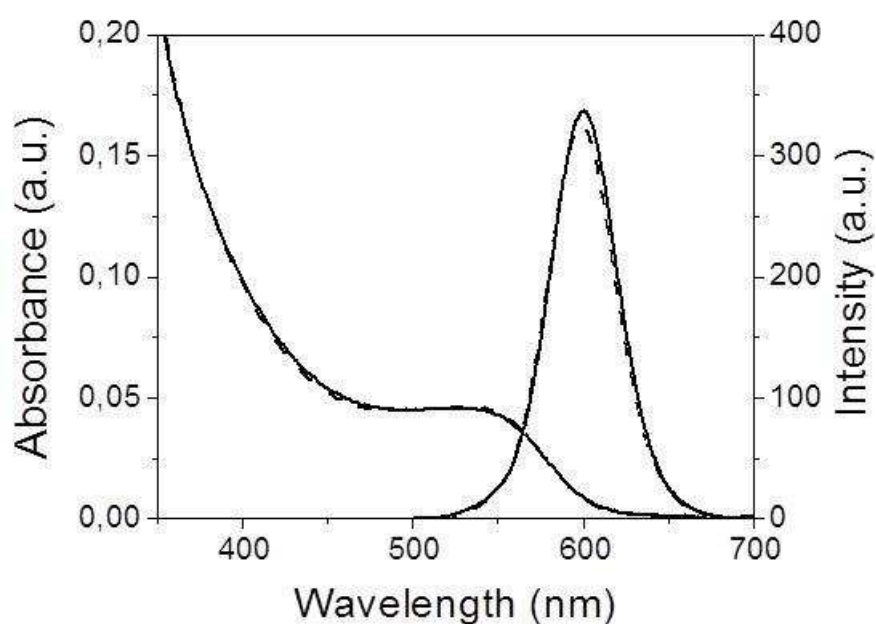


Figure 3: Absorption and photoluminescence spectra of CdTe/CdS-MSA QDs (dashed line) and CdTe/CdS-MSA-(Con A) QDs conjugate (line).

Table 1 – Hemagglutination potency of the Con A and its conjugate to CdTe/CdS-MSA QDs in 2 % (v/v) rabbit erythrocyte cell suspension. HU express the hemagglutinating potency.

Systems	Lectin activity (HU)
Con A	128
MSA-capped CdTe/CdS QDs	no activity
MSA-capped CdTe/CdS QDs-(Con A)	128

Table 2 – Fluorescence Microplate Reader results of fluorescence intensity from triplicate detection of free and bioconjugated QDs.

Samples	Average Fluorescence Intensity (u.a.)	Relative Fluorescence Intensity (%)
Control 1 (QD)	312	
Control 2 (Con A)	435.2	
Average Controls	374±75	
QD-(Con A)	1079±487	188%

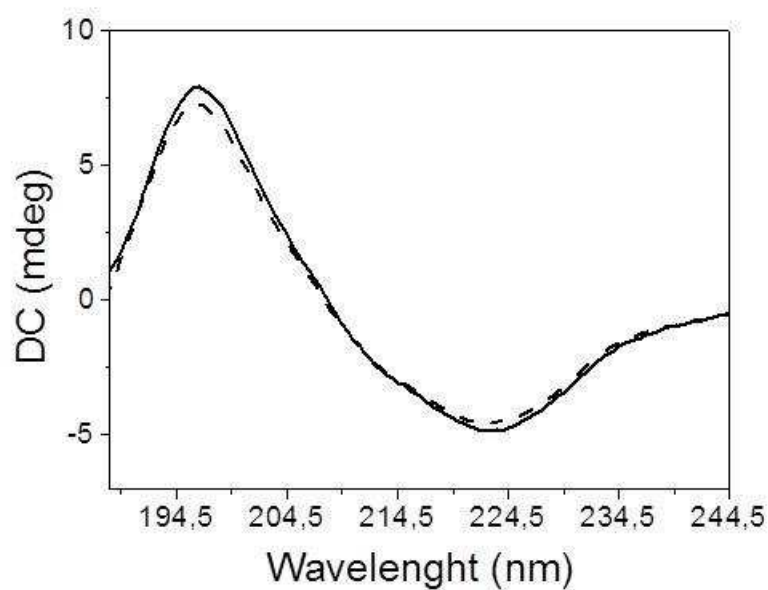


Figure 4: DC spectra of Con A native (dashed line) and conjugated to MSA-capped CdTe/CdS QDs (normal line).

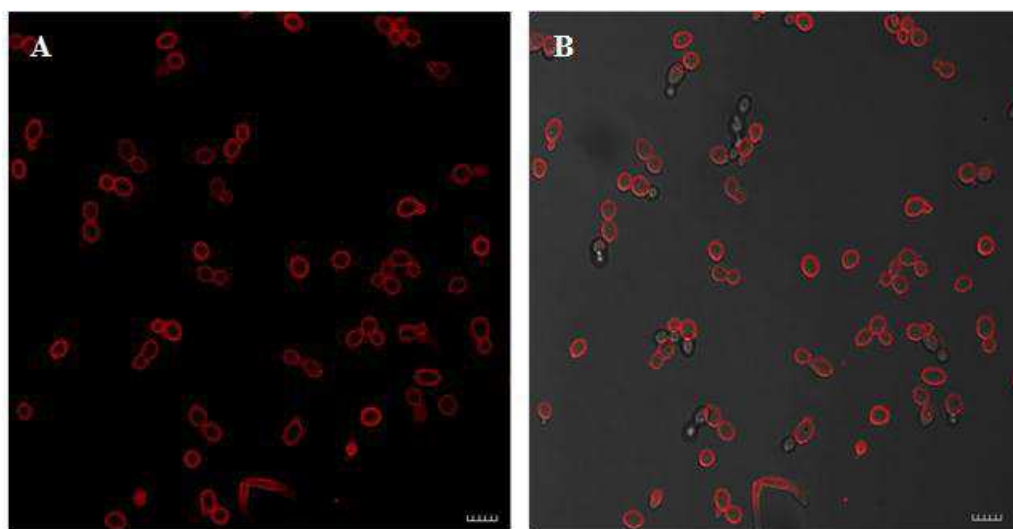


Figure 5: Confocal microscopy image of *C. albicans* cells. (A) Confocal fluorescence microscopy image of yeast suspension (excitation in 473 nm); (B) overlap of the confocal fluorescence microscopy image and optical phase contrast. Scale bar = 20 μ m

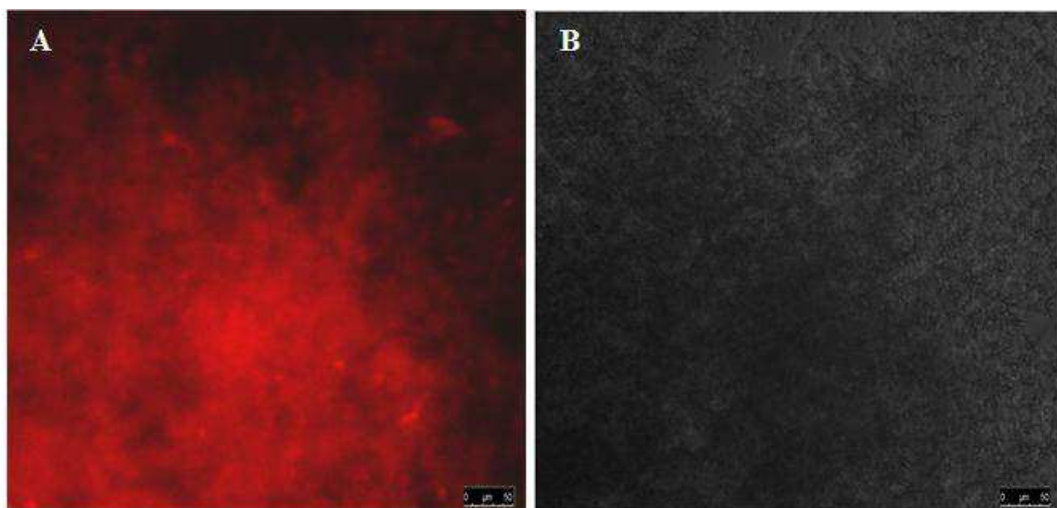


Figure 6: Fluorescence microscopy and phase contrast image of the *C. albicans* biofilm. In (A) fluorescence microscopy image (excitation in 560/40) and (B) phase contrast image of fungal biofilm. Scale bar = 50 μ m.

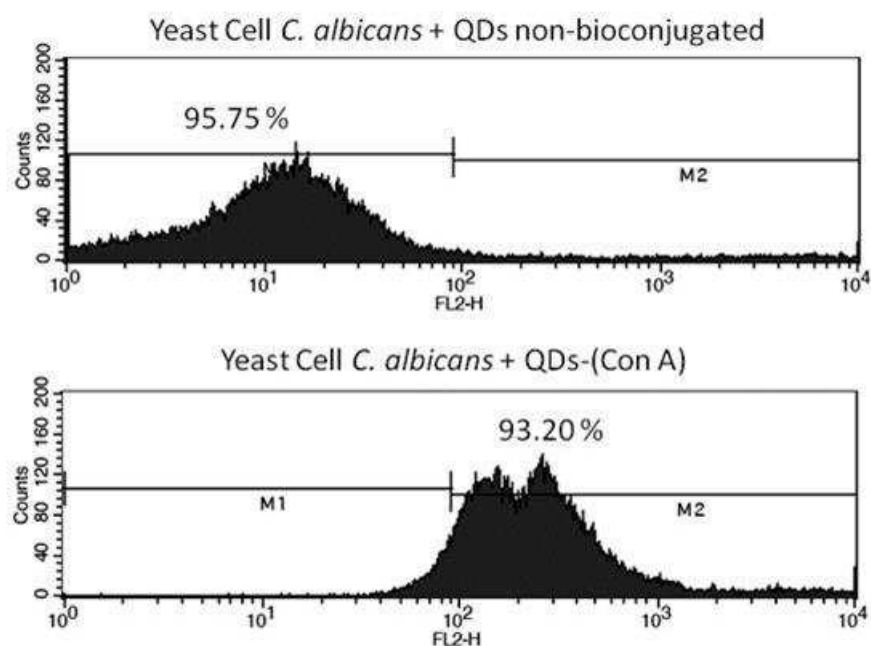


Figure 7: Histogram statistic of flow cytometry analysis. Yeast cells of *C. albicans* with QDs alone, 95.75 % did not show labeling. But when we used QDs-(Con A) conjugated more than 93 % yeast cells show labeling.