



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



Kilmara Higia Gomes Carvalho

**Obtenção e caracterização de imunocombinados baseados em
pontos quânticos de CdTe para diagnóstico da
Leishmaniose Tegumentar Americana**

Recife, 2014



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



Kilmara Higia Gomes Carvalho
(Bolsista FACEPE)

Obtenção e caracterização de imunocombinados baseados em pontos quânticos de CdTe para diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana

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

Orientadora: Prof^ª. Dra. Beate Saegesser dos Santos

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Adriana Fontes

Recife, 2014

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

- C331o Carvalho, Kilmara Higia Gomes.
Obtenção e caracterização de imunocombinados baseados em pontos quânticos de CdTe para diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana / Kilmara Higia Gomes Carvalho. – 2014.
91 f. il.; tab.; 30 cm.
- Orientadora: Beate Saegesser Santos.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2014.
Inclui referências, apêndices e anexos.
1. Pontos quânticos. 2. Imunoensaio. 3. Leishmaniose. I. Santos, Beate Saegesser (Orientadora). II. Título.
- 615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2017-050)

KILMARA HIGIA GOMES CARVALHO

Obtenção e caracterização de imunocombinados baseados em pontos quânticos de CdTe para diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana

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

Aprovada em: 01 / 09 / 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Beate Saegesser dos Santos (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dr^ª. Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo
Fundação Oswaldo Cruz (Examinadora Externa)

Prof^ª. Dr^ª. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro
Universidade Federal de Pernambuco (Examinadora Externa)

Prof^ª. Dr^ª. Claudilene Ribeiro Chaves (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof^ª. Dr^ª. Maria Goreti Carvalho Pereira (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho à Deus, à minha mãe,
ao meu esposo e aos meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, a razão da minha existência, por todas as bênçãos concedidas.

À minha mãe Terezinha Gomes Barros da Cruz, fundamental em todos os momentos de minha vida, por todo carinho, amor, dedicação, incentivo, compreensão e ajuda incondicional.

Ao meu esposo Aluízio Gonçalves Brasil Junior pelo amor, apoio, compreensão e parceria neste trabalho.

Aos meus irmãos Kleber, Kelaine e Katianny pelo incentivo, ajuda e compreensão por tantos momentos de ausência.

À professora Beate pela confiança, carinho, apoio, paciência e ajuda para realização deste trabalho.

À professora Adriana Fontes pelas valiosas discussões e contribuição no trabalho.

Aos professores Claudia Sampaio e Ricardo Lara pelo apoio, carinho e atenção.

À Maria Edileuza Felinto Brito por toda contribuição e colaboração na aplicabilidade do conjugado em imunodiagnósticos para leishmaniose tegumentar americana.

À Regina C. Bressan Q. de Figueiredo por todo carinho, paciência e colaboração nos experimentos em microscopia confocal.

À Valéria Rêgo Alves Pereira pela ajuda e colaboração na experimentação em citometria de fluxo.

À Marli Tenório Cordeiro pelas valiosas discussões.

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

A FACEPE pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de Biofísica-Química da UFPE, em especial a Anna Livia, Cida, Deivison, João Paulo, Osnir, Paulo e Thiago pela ajuda na realização de algumas caracterizações e/ou experimentos.

A Andresa Pereira de Oliveira, Beatriz e Diego pela ajuda na realização do experimento em citometria de fluxo

A Cinara, Mara, Karla e Ana pelo auxílio na realização dos experimentos de marcação em microscopia confocal.

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

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

Aos professores do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Amazonas, em especial, Silvana pela amizade e apoio.

Ao professor Emerson Lima da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas pelas análises.

Aos professores Darlison, Jucimary, Hugo Valério e Márcia Rubia da Universidade do Estado do Amazonas pelo apoio na conclusão do meu doutorado.

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

Obrigada!

“Ora, a fé é o firme fundamento das coisas que se esperam e a prova das coisas que se não veem”

Hebreus 11:1

Tudo o que tenho,
tudo o que sou,
o que vier a ser,
vem de ti Senhor.

(Trecho da música Vem de ti Senhor)

Diante do Trono

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma infecção causada por várias espécies de protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e ao gênero *Leishmania*, tendo *L. (Viannia) braziliensis* como agente etiológico de maior incidência no Brasil. A LTA é uma doença endêmica no país e que ainda apresenta dificuldades de diagnóstico laboratorial. Os pontos quânticos (PQ) são nanocristais fluorescentes de materiais semicondutores que recentemente vêm sendo empregados como fluoróforos no desenvolvimento de novos métodos imunológicos como alternativa diagnóstica, visando inovar e otimizar as técnicas atuais. O presente estudo demonstrou a viabilidade dos PQ como insumos fluoróforos em ensaios sorológicos para diagnóstico da LTA. PQ fluorescentes de Telureto de Cádmio (~3 nm) estabilizados com ácido mercaptosuccínico (AMS) foram preparados em meio coloidal e acoplados covalentemente à anti-imunoglobulinas G, via carbodiimida. Foi desenvolvida uma técnica de análise semiquantitativa para o monitoramento da bioconjugação baseada em leitura de fluorescência em microplacas negras. Os bioconjugados obtidos (PQ-Anti-IgG humana) foram submetidos à avaliação de desempenho para a pesquisa de anticorpos humanos anti-*L. (V.) braziliensis*. pelas técnicas de citometria de fluxo, imunofluorescência indireta (IFI) e por ensaio imunofluorescente de adsorção baseado em pontos quânticos (PQ-FLISA). Empregou-se as formas promastigotas da cepa de referência (MHOM/BR/75/M2903) de *Leishmania (V.) braziliensis* na IFI e citometria de fluxo, enquanto que no PQ-FLISA utilizou-se o antígeno solúvel bruto de *L. (V.) braziliensis*. Os experimentos realizados por meio das técnicas de citometria de fluxo, IFI e PQ-FLISA em imunodiagnóstico para LTA demonstraram a afinidade dos conjugados obtidos de CdTe/AMS-Anti-IgG em se ligar a imunoglobulinas G, fornecendo resposta diferencial entre controles e amostras analisadas demonstrando a capacidade destes materiais como novos insumos em imunodiagnósticos.

Palavras-chave: Pontos quânticos. Imunoensaio. Leishmaniose.

ABSTRACT

The American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is an infection caused by various species of protozoa belonging to the Kinetoplastida order, family Trypanosomatidae of the *Leishmania* genus. The *L. (V.) braziliensis* genus is the most prevalent etiologic agent of ATL in Brazil. ATL is endemic in the country and still presents difficulties in its laboratorial diagnosis. Quantum dots (QDs) are fluorescent semiconductor nanocrystals that have been applied as markers in the development of new immunochemical methods as diagnostic alternative protocols, aiming to innovate and optimize as current techniques. The present study demonstrated the feasibility of QDs as new fluoroimmunoassay active material for the serological diagnostic of ATL. Fluorescent CdTe QDs (~3 nm) stabilized with mercaptosuccinic acid (MSA) were prepared in aqueous colloidal media and coupled covalently to antiimmunoglobulin G by carbodiimide. A semiquantitative technique using a fluorescence plate reader was developed to monitor the bioconjugation procedure. The human QD-anti-IgG bioconjugates were tested for the detection of human antibodies against *L. (V.) braziliensis*, applying flow cytometry, indirect immunofluorescence (IIF) and adsorption fluoroimmunoassay (QD-FLISA). The promastigote forms of the reference strain (MHOM / BR / 75 / M2903) of *Leishmania (V.) braziliensis* were used in IFI and flow cytometry, whereas in the QD-FLISA the crude soluble antigen of *L. (V.) braziliensis* was used. The analysis of all the data demonstrated the capacity of the CdTe/MSA-Anti-IgG bioconjugates to bind to immunoglobulin G and successfully detect the LTA positive serum compared to the controls. The results showed that these materials may be applied as new tools in the diagnosis of LTA.

Keywords: Quantum dots. Immunoassay. Leishmaniasis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
AMS	Ácido mercaptosuccínico
Anti-IgG	Anti-imunoglobulinas G (anticorpo secundário imunoglobulina G)
BC	Banda de condução
BSA	Albumina sérica bovina (do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>)
BV	Banda de valência
Cd(ClO ₄) ₂	Perclorato de Cádmi
CdTe	Telureto de cádmio
CdTe/AMS	Telureto de cádmio estabilizado com ácido mercaptosuccínico
CdTe-Anti-IgG	Telureto de cádmio conjugado a anti-imunoglobulina G
CPS	Contagem de Fótons por Segundo (do inglês <i>Counting Photons per Second</i>)
cW	Centiwatts
EDC	Cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
<i>E_g</i>	Barreira energética ou <i>band gap</i>
ELISA	Ensaio de imunoadsorção ligado a enzima (do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
eV	Elétron-volt
FLISA	Ensaio imunofluorescente (do inglês <i>Fluorescence Linked Immunosorbent Assay</i>)
FL _{relativa} (%)	Fluorescência relative
FWHM	Largura de banda à meia altura (do inglês <i>Full Width at Half Maximum</i>)
<i>h+</i>	Carga virtual
IDRM	Intradermoreação de Montenegro
IFI	Imunofluorescência indireta

IgG	Imunoglobulina G
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LM	Leishmaniose mucosa (ou mucocutânea)
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MS	Ministério da Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salino (do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PFA	Paraformaldeído
PLL	Poli-L-Lisina
PQ-FLISA	Ensaio imunofluorescente de adsorção baseado em pontos quânticos (fluoroimunoensaio heterogêneo indireto com pontos quânticos)
PQ	Pontos Quânticos
SFB	Soro fetal bovino
Sinan	Sistema de Informações de Agravos de Notificação
Sulfo-NHS	<i>N</i> -hidroxisulfosuccinimida
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
u.a.	Unidades arbitrárias
UF	Unidade da Federação
UV	Ultravioleta
Λ	Comprimento de onda
Λ_{exc}	Comprimento de Onda de Excitação

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Formas evolutivas do protozoário Leishmania. Amastigota (A) e Promastigota (B).	21
Figura 2 Casos notificados de leishmaniose tegumentar americana no Brasil, durante o período de 1980 a 2005.	23
Figura 3 Esquema da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil, Classificação Clínica e Respectivos Agentes Etiológicos segundo Marzochi.	23
Figura 4 Esquema com características da resposta imune para as diferentes formas da Leishmaniose Tegumentar Americana.	25
Figura 5 Organograma com os grupos de exames laboratoriais empregados no diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana.	26
Figura 6 Representação da formação de um éxciton ligado num material semiconductor durante interação com luz ($h\nu$).	28
Figura 7 A. Espectros de absorção e emissão do fluoróforo orgânico FITC comparado aos pontos quânticos (PQ) de Seleneto de Cádmio (CdSe) de uma suspensão. B. PQ de CdSe/ZnS e Telureto de Cádmio (CdTe) apresentando diferentes comprimentos de onda de emissão, sintonizados através da variação de tamanho dos nanocristais.	31
Figura 8 Esquema de um bioconjugado típico empregando ponto quântico tipo <i>core-shell</i>	33
Figura 9 Fórmula estrutural do [cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC).	36
Figura 10 Estrutura química da <i>N</i> -hidroxisulfosuccinimida (Sulfo-NHS).	37
Figura 11 Esquema do processo reacional do grupo carboxilato presente nos pontos quânticos (PQ) de CdTe estabilizados com ácido mercaptosuccínico, via EDC e Sulfo-NHS, com a amina primária da proteína anti-imunoglobulina G (Anti-IgG) na formação da ligação amida.	37
Figura 12 Fórmula estrutural do ácido mercaptosuccínico utilizado como agente estabilizante/funcionalizante na preparação dos pontos quânticos de CdTe.	38
Figura 13 Esquema geral do procedimento de obtenção de suspensões coloidais aquosas de nanocristais de CdTe estabilizados com ácido mercaptosuccínico.	39
Figura 14 Esquema do método empregado para análise através de leitura de fluorescência em placas do conjugado CdTe-Anti-IgG.	42
Figura 15 Visualização esquemática a nível molecular da preparação da microplaca de poliestireno (A) e do ensaio realizado para avaliação da atividade biológica dos bioconjugados CdTe-Anti-IgG obtidos (B) e da especificidade (C).	43

- Figura 16** Esquema geral de ensaio imunofluorescente baseado em PQ (PQ-FLISA) indireto empregando conjugado de nanocristais fluorescentes de CdTe/AMS. 45
- Figura 17** Fotografia da montagem reacional utilizada na obtenção de pontos quânticos de CdTe realizado em atmosfera inerte e sob refluxo e atmosfera inerte (N₂) (A); formando suspensão de nanocristais com coloração vermelho-castanho (B). 47
- Figura 18** Difractograma de Raios-X de pó da amostra de nanocristais fluorescentes de CdTe preparado com o agente estabilizante ácido mercaptosuccínico. 50
- Figura 19** Microscopia eletrônica de transmissão representativa de nanocristais de CdTe preparados com o agente estabilizante ácido mercaptosuccínico. Barra = 10 nm. 51
- Figura 20** Imagem representativa da suspensão de CdTe/AMS sem (A) e sob excitação por lâmpada UV ($\lambda = 365$ nm) apresentando fluorescência laranja (B). 52
- Figura 21** Espectros de absorção e emissão representativos da suspensão de pontos quânticos de CdTe/AMS obtidos ($\lambda_{exc} = 365$ nm). 52
- Figura 22** Imagem representativa da anti-imunoglobulina G isolada (à esquerda) e do conjugado CdTe-Anti-IgG (à direita) sem excitação (A) e as mesmas amostras quando excitadas ($\lambda = 365$ nm) por lâmpada UV (B) com o bioconjugado apresentando fluorescência no laranja. 53
- Figura 23** Espectros de absorção e emissão comparativos das amostras da suspensão de pontos quânticos de CdTe/AMS e do conjugado CdTe/AMS-Anti-IgG ($\lambda_{exc} = 365$ nm). 54
- Figura 24** Esquema da Imunofluorescência indireta de promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* realizada com conjugado entre nanocristais fluorescentes de CdTe/AMS e anticorpos secundários, anti-imunoglobulinas G (Anti-IgG). 55
- Figura 25** Imunofluorescência indireta de promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* marcadas com conjugados CdTe/AMS-Anti-IgG completa (D) e fragmento Fab₂ (E₁ e E₂) em microscopia confocal, comparadas as amostras controles de leishmania com CdTe/AMS (A), do conjugado (B) e da não reagente, negativa (C). Excitação em 488 nm. 59
- Figura 26** (A) imunofluorescência indireta de promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* marcadas com conjugados CdTe/AMS-Anti-IgG completa e (B) imagem do contraste interferente diferencial (DIC - differential interference contrast). Excitação em 488 nm. 60

Figura 27 Imunofluorescência indireta de promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* marcada com o conjugado CdTe/AMS-Anti-IgG Fab₂ em microscopia confocal, apresentando emissão no azul. Excitação em 390 nm.

Figura 28 Histograma representativo do percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP) submetidos à experimentação sem fixação com paraformaldeído. Leituras realizadas para os controles (CLE = controle de leishmania e CC = controle do conjugado) e em diferentes diluições (D1 = 1:64 a D8 = 1:8192) para amostras de soro (+ = soro positivo e - = soro negativo). 63

Figura 29 Histogramas individuais representando o percentual de parasitos fluorescentes (PPFP) sem fixação em paraformaldeído obtidos com controle interno da reação (A), incubados com soro negativo (B) e positivo (C) na titulação 1:64. 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultado das leituras realizadas nos ensaios de detecção semi-quantitativa de fluorescência em microplacas para os conjugados CdTe/AMS-Anti-IgG e controles.	56
Tabela 2: Resultado do ensaio imunofluorescente indireto baseado em PQ aplicado para Leishmaniose Tegumentar Americana.	57
Tabela 3: Histograma estatístico – Percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP).	63
Tabela 4: Avaliação da reatividade dos ensaios em diferentes diluições das amostras.	64

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3. REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1. Leishmaniose	21
3.1.1 Diagnóstico	26
3.2 Pontos quânticos	28
3.3 Bioconjugação	33
3.3.1 Agentes de Comprimento Zero	35
3.3.1.1 Carbodiimidas	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Preparação de suspensões de pontos quânticos de CdTe	38
4.2 Bioconjugação de nanocristais de CdTe/AMS com Anti-IgG humana	39
4.3 Caracterização dos nanocristais fluorescentes de CdTe/AMS e dos bioconjugados CdTe-Anti-IgG	40
4.4 Avaliação dos bioconjugados obtidos como insumo em imunodiagnósticos para LTA	44
4.4.1 Ensaio imunofluorescente indireto baseado em PQ (PQ-FLISA)	44
4.4.2 Imunofluorescência indireta (IFI)	46
4.4.3 Citometria de fluxo	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 Considerações sobre a preparação coloidal de PQ de CdTe/AMS	49
5.2 Caracterização Estrutural dos PQ de CdTe/AMS	50
5.3 Caracterização Óptica dos nanocristais fluorescentes de CdTe/AMS e dos bioconjugados CdTe-Anti-IgG	52

5.4 Avaliação dos bioconjugados obtidos como insumo em imunodiagnósticos para LTA	55
5.4.1 Ensaio imunofluorescente indireto baseado em pontos quânticos (PQ-FLISA)	56
5.4.2 Imunofluorescência indireta (IFI)	58
5.4.3 Citometria de fluxo	62
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	66
REFERÊNCIAS	68
APÊNDICES	75
Apêndice 1 – Fluorescence Plate Reader for Quantum Dot-Protein Bioconjugation Analysis	75
Apêndice 2 – Semiquantitative Fluorescence Method for Bioconjugation Analysis	83
ANEXOS	91
Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	91

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses compreendem um grupo complexo de doenças causadas por várias espécies de protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*, os quais infectam macrófagos de uma variedade de mamíferos, incluindo humanos e cães. Dependendo da espécie do parasito e do estado de imunocompetência do hospedeiro humano, a doença pode variar em severidade e diversidade de manifestações clínicas. De modo geral, podem ser classificadas em leishmaniose visceral ou calazar e leishmaniose tegumentar americana (LTA). A LTA pode manifestar-se sob as formas de leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (ou mucocutânea) (LM) (BRASIL, 2014). Estas infecções são endêmicas em 88 países tropicais e subtropicais ao redor do mundo. Entre 1 e 1,5 milhões de novos casos de leishmaniose são registrados a cada ano e cerca de 350 milhões de indivíduos estão vivendo em locais onde há risco de contrair a doença. (HERWALDT, 1999; BRASIL, 2013).

A Organização Mundial da Saúde considera a LTA como uma importante doença infecciosa, devido à amplitude e alta capacidade de ocasionar deformidades no ser humano, levando a consequências psicológicas, bem como reflexos nas áreas social e econômica (BRASIL, 2007). No Brasil, a LTA é encontrada sob diferentes padrões de transmissão e perfis epidemiológicos em todos os Estados brasileiros (SILVA, 2012), constituindo um problema de saúde pública no país. Segundo dados do Sinan/ SVS/ MS, 20.296 casos de Leishmaniose Tegumentar foram registrados no Brasil em 2013. A região norte apresentou o maior número de casos (10.387), seguida das regiões nordeste (4.969), centro-oeste (3.038), sudeste (1.460), sul (373) e UF ignorada (69).

O diagnóstico na fase inicial da doença, juntamente com a terapia medicamentosa adequada, podem curar ou diminuir a probabilidade de danos ou óbito do paciente. Contudo, atualmente, o diagnóstico baseia-se na associação de critérios clínico-epidemiológicos e laboratoriais, tendo em vista as dificuldades inerentes às técnicas diagnósticas utilizadas. O diagnóstico laboratorial da leishmaniose em seres humanos compreende exames parasitológicos, imunológicos e moleculares. O diagnóstico de certeza é realizado pela detecção do parasito, ou de seus produtos, nos tecidos ou fluidos biológicos de pacientes (KAR 1995; BRITO, 2004, BRASIL, 2013).

A presença de anticorpos IgG anti-*Leishmania* específicos durante a infecção tem permitido o desenvolvimento de testes sorológicos, tais como: imunofluorescência indireta (IFI), *western blot*, ensaio de imunoadsorção ligado a enzima (ELISA) e citometria de fluxo (KUBAR, 2005; OLIVEIRA, 2011; BRASIL, 2013).

Diante do exposto, o desenvolvimento de abordagens diagnósticas inovadoras para doenças negligenciadas são cruciais. Visando suprir esta necessidade, a nova classe de fluoróforos baseada em nanocristais de semicondutores, conhecidos como pontos quânticos (PQ), do inglês *quantum dots*, surge como uma importante promessa em insumo para imunoenaios.

Desde 1998, quando foram descritas as primeiras publicações (BRUCHEZ et al. 1998; CHAN e NIE, 1998) sobre a utilização dos pontos quânticos como marcadores biológicos, estes têm sido estudados e aplicados na área biomédica. Por apresentarem diversas vantagens frente aos fluoróforos convencionais, os PQ têm-se revelado eficazes como novas sondas fluorescentes para finalidades diagnósticas e ensaios bioanalíticos (MICHALET, 2005; MEDINTZ, 2005; BRUCHEZ, 2007; HE, 2014; PISANIC, 2014; CHATTERJEE, 2014).

Ressalta-se que em aplicações na interface biológica, os PQ essencialmente inorgânicos requerem passar por um processo de bioconjugação. Este processo deve promover uma ligação entre o nanomarcador e a biomolécula, de modo que ambos permaneçam com suas características e funções após o processo (HERMANSON, 2008). Essas conjugações podem ser obtidas pelo emprego de agentes de acoplamento, dentre os quais citam-se as carbodiimidias como uma das principais classes (ULRICH, 2007).

No contexto apresentado, o presente trabalho volta-se ao emprego de PQ como insumo em ensaios imunodiagnósticos para a detecção de LTA.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Obter bioconjugados de pontos quânticos de telureto de cádmio (CdTe) com anti-imunoglobulinas G (anti-IgG) e avaliar seu emprego como insumo em imunoenaios para leishmaniose tegumentar americana.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar PQ de CdTe empregando como agente estabilizante o ácido mercaptosuccínico (AMS).
- Caracterizar óptica e estruturalmente os PQ obtidos.
- Realizar conjugação entre Anti-IgG e PQ de CdTe.
- Analisar os bioconjugados obtidos por meio de caracterização óptica e por método de fluorescência semiquantitativo.
- Avaliar o desempenho dos bioconjugados para pesquisa de imunoglobulinas G (IgG) anti-*Leishmania* em diagnóstico de LTA nos ensaios sorológicos: fluoroimunoensaio heterogêneo indireto com pontos quânticos (PQ-FLISA), imunofluorescência indireta (IFI) e citometria de fluxo.

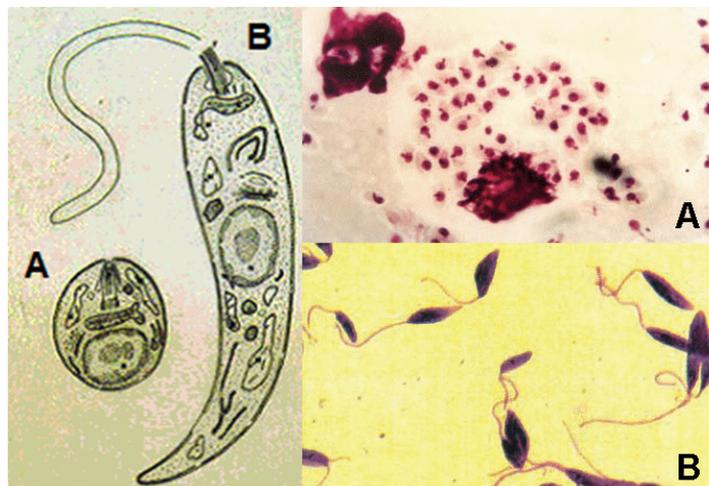
3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Leishmaniose

As leishmanioses são doenças infecciosas e não contagiosas, causadas por diferentes espécies de protozoários que pertencem a ordem Kinetoplastida, família Tripanosomatidae e gênero *Leishmania*. Estes são parasitos intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear. Os protozoários da ordem Kinetoplastida se caracterizam pela presença de uma estrutura rica em DNA, denominada cinetoplasto (LAINSON; SHAW, 1987).

O protozoário *Leishmania* apresenta duas formas no seu ciclo de vida. Uma é a forma amastigota, aflagelada, ovalada, encontrada no interior de células do sistema monocítico fagocitário, nos tecidos dos hospedeiros vertebrados. A outra é a forma extracelular promastigota, flagelada, fusiforme, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e em meios de cultura (MARZOCHI, 1992). A Figura 1 mostra as duas formas evolutivas do protozoário descritas.

Figura 1. Formas evolutivas do protozoário *Leishmania*. Amastigota (A) e Promastigota (B).



Fonte: Adaptado de PEREIRA (2011) e BRASIL (2013).

Os parasitos do gênero *Leishmania* são classificados em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*. Os parasitos do subgênero *Viannia* desenvolvem-se primeiramente no intestino posterior dos vetores e depois migram para o intestino médio e anterior. Os parasitos do subgênero *Leishmania* desenvolvem-se apenas no intestino anterior e médio. O gênero *Leishmania* abrange em torno de 30 espécies

catalogadas, das quais 20 estão implicadas em doenças de humanos (ASHFORD, 2000).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as leishmanioses acometem 12 milhões de pessoas no mundo, em 88 países tropicais e subtropicais, sendo 72 desses considerados em vias de desenvolvimento. Cerca de 350 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de se contrair a leishmaniose, com aproximadamente 2 milhões de novos casos registrados a cada ano (BRASIL, 2013).

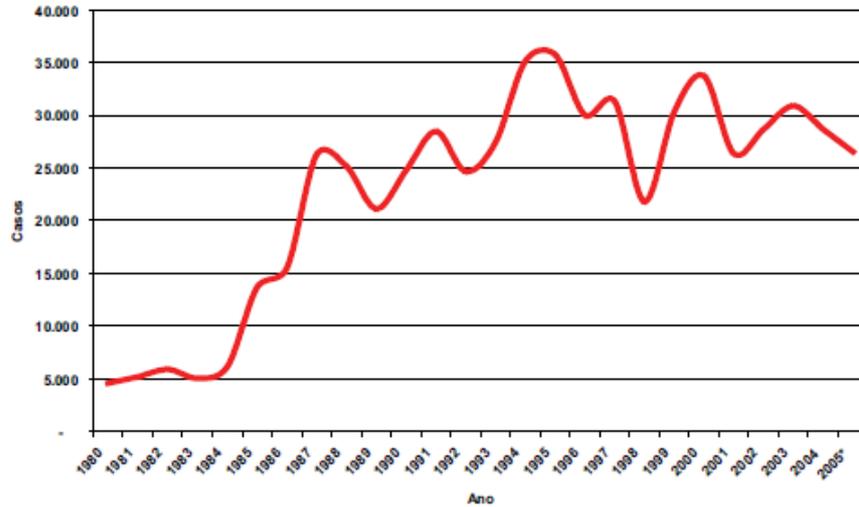
Uma das características mais marcantes do gênero *Leishmania* é a diversidade das manifestações clínicas. De modo geral, essas enfermidades se dividem em leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral (LV). A LV também chamada calazar, febre negra ou esplenomegalia tropical, é uma doença crônica e endêmica em várias regiões do mundo, que ataca órgãos internos e se caracteriza pelo aumento no volume do fígado e baço, anemia, perda de peso e febre, e que, se não tratada a tempo, pode ser fatal (HEPBURN, 2000, SILVA et al., 2001). A LTA acomete pele e mucosas, podendo ser observada sob a forma: cutânea (LC), também conhecidas como feridas bravas ou úlceras de Bauru, que se caracterizam por lesões únicas ou múltiplas na pele, geralmente no rosto, braços e pernas; cutânea difusa (LCD), com lesões nodulares persistentes, no corpo inteiro; e a mucocutânea (LMC), que afeta de maneira preponderante as mucosas da face, como fossas nasais e o palato (HERWALDT, 1999).

A LTA é considerada pela OMS como uma das mais importantes doenças infecciosas, devido a amplitude e alta capacidade de ocasionar deformidades no ser humano, levando a reflexos nas áreas psicológica, social e econômica. No Brasil, a LTA está entre as afecções dermatológicas que requerem maior atenção, apresentando ampla distribuição em todos os Estados do país com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica, representando um problema de saúde pública (Figura 2) (BRASIL, 2013).

A LTA é de difícil controle por possuir uma diversidade de agentes, de reservatórios e de vetores com padrões de transmissão diferentes, além de conhecimento limitado sobre alguns aspectos. No país, dentre as setes espécies identificadas que ocasionam a LTA, as três principais são *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. A primeira possui ampla distribuição no território brasileiro, sendo o principal agente etiológico no Nordeste e a única espécie

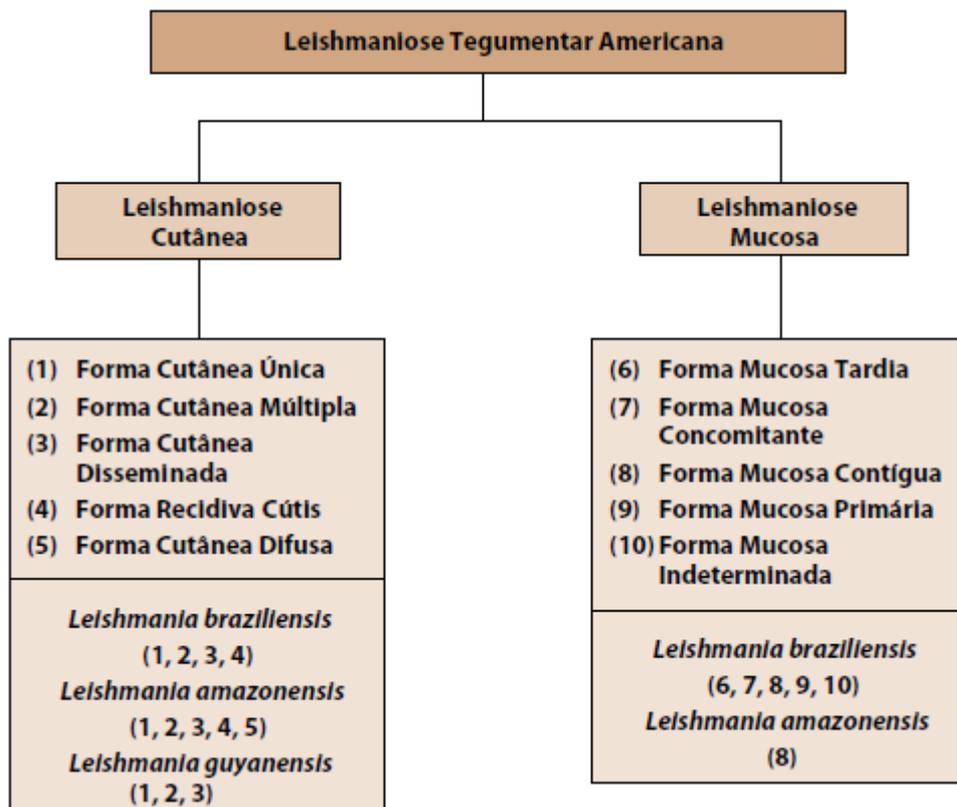
encontrada no estado de Pernambuco (BRASIL, 2013; BRITO *et al.*, 2008) (Figura 3).

Figura 2. Casos notificados de leishmaniose tegumentar americana no Brasil, durante o período de 1980 a 2005.



Fonte: Brasil, 2013.

Figura 3. Esquema da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil, Classificação Clínica e Respective Agentes Etiológicos segundo Marzochi.



Fonte: Brasil, 2013.

O ciclo biológico da *Leishmania* é heteroxeno, envolvendo um hospedeiro invertebrado e um vertebrado. Os vetores da LTA que atuam como hospedeiros invertebrados são flebotomíneos hematófagos, pertencentes à Ordem Díptera, Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae*, gênero *Lutzomyia* (ROBERTS; JANOBY, 2000). Estima-se que existam cerca de 400 espécies de flebotomíneos nas Américas, sendo que 50 dessas parecem estar envolvidas na transmissão da *Leishmania* (KILLICK-KENDRICK, 1999). Além de um vetor invertebrado, o parasito necessita de um hospedeiro vertebrado que atua como reservatório. Dentre esses, temos uma ampla variedade de roedores, canídeos, marsupiais e humanos. Geralmente o homem participa do ciclo de transmissão como um hospedeiro acidental, quando entra em ambientes de alta transmissão, onde a doença se mantém em função dos reservatórios naturais (MOLYNEUX; KILLICK-KENDRICK, 1987).

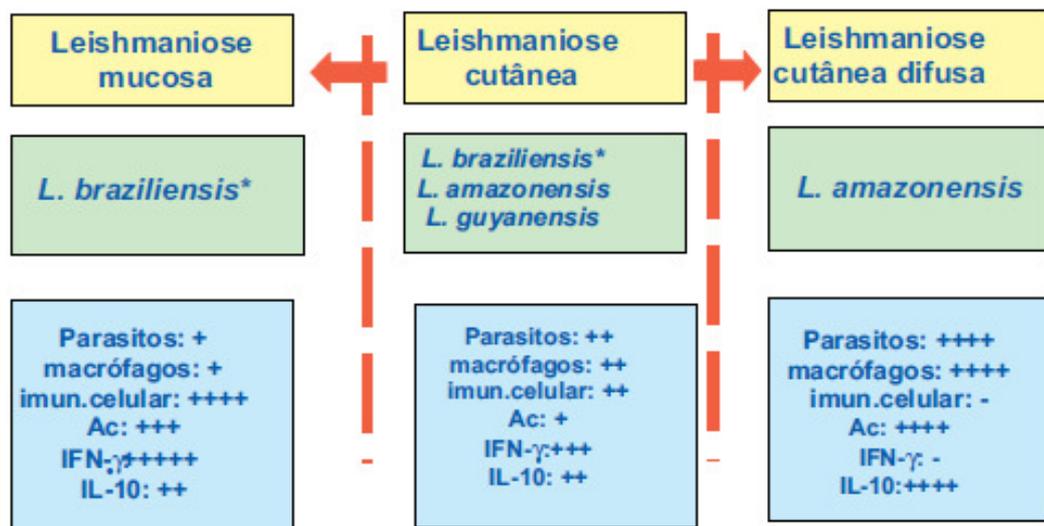
O vetor pode se infectar ao ingerir sangue de um hospedeiro vertebrado contendo macrófagos que possuem amastigotas no seu interior. Após a lise do macrófago infectado as amastigotas transformam-se em promastigotas, as quais aderem às microvilosidades do intestino médio do inseto. Nesta fase, os parasitos são denominados procíclicos, e caracterizam-se por se multiplicarem rapidamente por divisão binária, transformando-se, após alguns dias em promastigotas metacíclicos, que são muito móveis e não têm a capacidade de se dividir. Os promastigotas metacíclico, infectantes, migram para a probóscida do inseto e são injetados com a saliva durante o próximo repasto sanguíneo (SACKS; KAMHAWI, 2001). Os promastigotas inoculados sobrevivem aos mecanismos de defesa inatos do hospedeiro e então infectam os macrófagos. Dentro dos macrófagos forma-se o fagossomo, onde as formas promastigotas metacíclicas sobrevivem e estabelecem as condições favoráveis para a diferenciação em amastigotas, que se dividem, lisam o macrófago e infectam novas células, repetindo o ciclo (SACKS; KAMHAWI, 2001). A sobrevivência intracelular do parasito pode estar relacionada à rapidez de sua transformação em amastigota (LEWIS, 1974), uma vez que estas formas encontram-se melhor dotadas bioquimicamente e enzimaticamente para resistirem aos mecanismos leishmanicidas dos macrófagos (PEARSON et al., 1983).

O desenvolvimento da imunidade celular pelo hospedeiro tem atuação na proteção contra infecção por *Leishmania*. Todavia, ainda é pouco caracterizada a infecção por *L. (V.) braziliensis* na resposta imune mediada por células T. Isto se

deve ao fato do crescimento deste parasito *in vitro* ser difícil, sendo necessário para realizar a infecção em camundongos uma elevada carga parasitária (OLIVEIRA, 2011).

Anticorpos são ineficazes para o controle ou destino da infecção por *Leishmania*, devido às formas amastigotas estarem localizadas intracelularmente. Todavia, os títulos de anticorpos circulantes podem ser detectados nas diferentes formas da LTA, sendo diretamente proporcionais a gravidade da doença e a atividade da infecção, conforme exibido pela Figura 4. Em formas graves, multiparasitárias da doença, como na leishmaniose visceral e LCD, encontram-se títulos elevados de anticorpos específicos, seguidos por títulos menores na LM. Na LC em casos não complicados são observados níveis mais baixos ou indetectáveis de títulos de anticorpos, enquanto que em casos de lesões múltiplas têm-se níveis de anticorpos anti-*Leishmania* mais altos comparado aqueles com uma única lesão. Destaca-se ainda que, em poucos meses após a cura clínica, os títulos dos testes sorológicos tendem a diminuir rapidamente (BRASIL, 2013).

Figura 4. Esquema com características da resposta imune para as diferentes formas da Leishmaniose Tegumentar Americana.



Legenda: * Principal espécie causadora de leishmaniose cutânea no Brasil.

Ac: Anticorpos

IFN- γ : Interferon gama

IL-10: Interleucina 10

- ausência

+ Presença : + leve; ++ moderada; +++ intensa; ++++ muito intensa

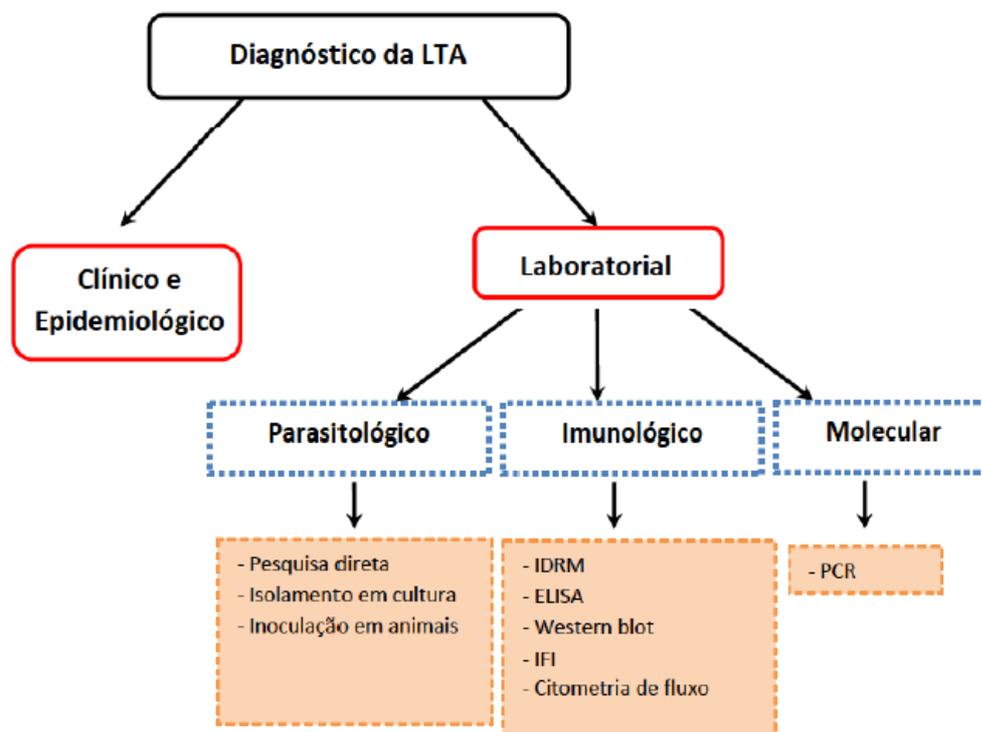
Fonte: Brasil, 2013.

3.1.1 Diagnóstico

O diagnóstico de leishmaniose é clínico, epidemiológico e laboratorial por não existir um método de detecção e diagnóstico de infecção por *Leishmania* que possa ser empregado como padrão-ouro (REIS, 2008). Contudo, o diagnóstico conclusivo depende da detecção de parasitas, ou de seus produtos, em tecidos ou fluidos biológicos do hospedeiro. (KAR 1995; BRITO, 2004).

Fatores como a qualidade do equipamento e dos insumos utilizados, o tempo de evolução das lesões, as formas clínicas e as diferentes espécies de *Leishmania* envolvidas podem interferir na sensibilidade de cada método diagnóstico. A Figura 5 apresenta o conjunto de exames (parasitológicos, imunológicos e moleculares) que constituem a base para o diagnóstico laboratorial da leishmaniose em seres humanos (BRASIL, 2013).

Figura 5 Organograma com os grupos de exames laboratoriais empregados no diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana.



Fonte: Oliveira, 2011.

Os exames parasitológicos podem ser através da demonstração direta do parasito, Isolamento em cultivo *in vitro* (meios de cultivo) e Isolamento *in vivo* (inoculações animais). A presença de anticorpos específicos durante a infecção de

Leishmania tem possibilitado o desenvolvimento de testes sorológicos. Assim, a sorologia pode contribuir com outros grupos de exames na avaliação de cura ou de previsão de recorrência para LTA. Dentre os exames imunológicos, tem-se o Teste intradérmico conhecido como Intradermoreação de Montenegro (IDRM) que se fundamenta na visualização da resposta de hipersensibilidade celular retardada. Os testes sorológicos detectam anticorpos anti-*Leishmania* circulantes no soro dos pacientes com títulos geralmente baixos. A técnica de ELISA (Ensaio Imuno Enzimático) ainda não está disponível comercialmente, devendo ter seu uso restrito a pesquisa. Nas lesões ulceradas por *L. (V.) braziliensis* a sensibilidade da IFI esta em torno de 70% no primeiro ano da doença. A imunofluorescência pode contribuir para o diagnóstico de LTA, podendo ser associada a IDRM ou técnicas parasitológicas, no diagnóstico diferencial com outras doenças, especialmente nos casos sem demonstração de qualquer agente etiológico. No grupo de exames moleculares, a reação em cadeia polimerase - PCR é pouco utilizada na rotina diagnóstica, sendo bastante empregada na área da pesquisa (KUBAR, 2005; BRASIL, 2013).

Nesse sentido, pesquisas têm sido direcionadas visando à obtenção de um diagnóstico precoce e eficiente. Rocha *et al.* (2002, 2006) descreveram um método de diagnóstico por citometria de fluxo para detecção de anticorpos anti-formas de *L. (V.) braziliensis*. Esta técnica permite uma análise quantitativa de células em suspensão, além de ser rápida e objetiva (NAKAGE, 2005).

Entretanto, apesar dos avanços, ainda são descritos problemas de reações cruzadas com outras doenças, devido alguns antígenos do parasita possuírem epítomos compartilhados por patógenos, dentre outros. Por isso, métodos com níveis mais adequados de sensibilidade e especificidade são desejáveis. Como uma estratégia visando desenvolver testes sorológicos específicos para leishmaniose, os genes codificados por alguns parasitas foram isolados, visando obter moléculas recombinantes adequadas para diagnósticos sorológicos (BRITO, 2001). Atualmente, as técnicas sorológicas que utilizam peptídeos recombinantes contendo epítomos específicos do parasito, obtidos através de clonagem gênica, têm sido alvo de pesquisas para métodos diagnósticos, tal como o teste imunocromatográfico, conhecido como teste rápido que utiliza a proteína recombinante (rK39) de *Leishmania chagasi*, complexo donovani-específico, que pesquisa anticorpos contra

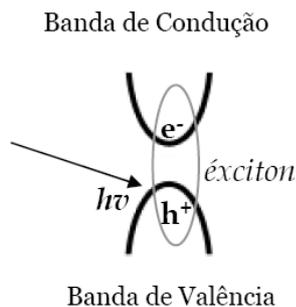
uma proteína da região quinase chamada de K39. A detecção de anticorpos contra a K39 indica LV em atividade (DOURADO, 2007).

No presente estudo é testada uma metodologia original inédita que utiliza bioconjugados de pontos quânticos de CdTe com antiimunoglobulinas G em imunoenaios sorológicos para detecção de leishmaniose tegumentar americana, por meio de FLISA, IFI e citometria de fluxo.

3.2 Pontos quânticos

Os pontos quânticos (PQ) consistem em nanocristais fluorescentes de materiais semicondutores, com dimensões na faixa de 1 a 10 nm, em regime de confinamento quântico tridimensional. Devido as suas dimensões reduzidas, estes materiais sólidos cristalinos possuem seus estados eletrônicos representados pelas bandas de energia - banda de valência (BV) e a banda de condução (BC) - oriundas da natureza ondulatória dos elétrons (e^-) nos cristais, apresentando diferença energética próximos ou menores do que as dimensões do raio de Bohr do seu éxciton (CHAVES, 2006) (Figura 6).

Figura 6. Representação da formação de um éxciton ligado num material semicondutor durante interação com luz ($h\nu$). Um elétron (e^-) é excitado para a banda de condução deixando para trás uma vacância positiva (h^+) na banda de valência.



Fonte: Chaves, 2011.

A separação dos estados energéticos em bandas permitidas e proibidas deve-se ao efeito do potencial periódico sobre a distribuição energética dos e^- livres. A diferença de energia que separa a banda de valência (BV), que apresenta menor energia e equivale aos orbitais ligantes, da banda de condução (BC), que equivale aos orbitais antiligantes e possui nível energético superior é denominada *band gap* (E_g). Assim, estas bandas são separadas energeticamente pelo E_g , região proibida, na qual nenhum elétron de valência pode transitar. Neste caso, é necessário o

fornecimento de um valor mínimo de energia que ultrapasse a barreira energética (E_g) para que e^- nos últimos níveis energéticos da BV seja promovido para a BC, deixando estados naquela que se comportam como portadores de carga elétrica positiva, conhecidos como buracos. O aumento da temperatura do sistema, bem como a existência de uma radiação incidente podem fornecer a energia necessária ao processo (CHAVES, 2006; DRBOHLAVOVA, 2009).

A ação de um campo externo sobre os e^- da BC e os buracos na BV produz corrente elétrica que possibilita a mudança dos estados dos e^- possibilitando a formação de pares elétron-buraco (vacância) denominados de éxcitons, proporcionando a formação um estado ligado (MORRINSON, 1976; SCHMID, 2004), conforme esquema apresentado na Figura 6.

Devido a este elevado confinamento ocorre o processo de recombinação excitônica, podendo originar fluorescência na região visível do espectro eletromagnético (BALLOU, 2004). Essa fluorescência apresentada pelos PQ decorre do processo de dissipação de energia por decaimento radiativo, descrito anteriormente.

Entretanto, devido ao éxciton possuir um tempo de vida muito curto, na ordem de poucos nanosegundos, seu decaimento energético para a BV pode ocorrer através de um processo denominado de recombinação excitônica, gerando luz (decaimento radiativo). Os modos de dissipação do excesso de energia podem ser também por meio de transferência para a rede cristalina na forma de energia vibracional (decaimento não radiativo) (SCHMID, 2004; DRBOHLAVOVA, 2009).

No estado fundamental ($T = 0$ K), há várias bandas cheias com e^- em um material cristalino. As propriedades de condução desse cristal são refletidas diretamente pelo preenchimento ou não da última banda. De modo que, o material é isolante ($E_g > 4$ eV) quando a última banda está preenchida por completo. Enquanto, o material é condutor quando ela estiver preenchida parcialmente. Todavia, os sólidos cristalinos são caracterizados por uma BV cheia e uma BC vazia, além de um E_g relativamente pequeno de aproximadamente 3 eV ou menor (REZENDE, 2004), no estado fundamental, quando à temperatura ambiente. Nestas condições, os materiais apresentam condutividade significativa intermediária entre a dos isolantes e dos condutores, sendo denominados de semicondutores. Exemplos desses materiais são os compostos binários (IV-IV, III-V, II-VI), terciários e quaternários que apresentam propriedades elétricas e ópticas de interesse. Destaca-

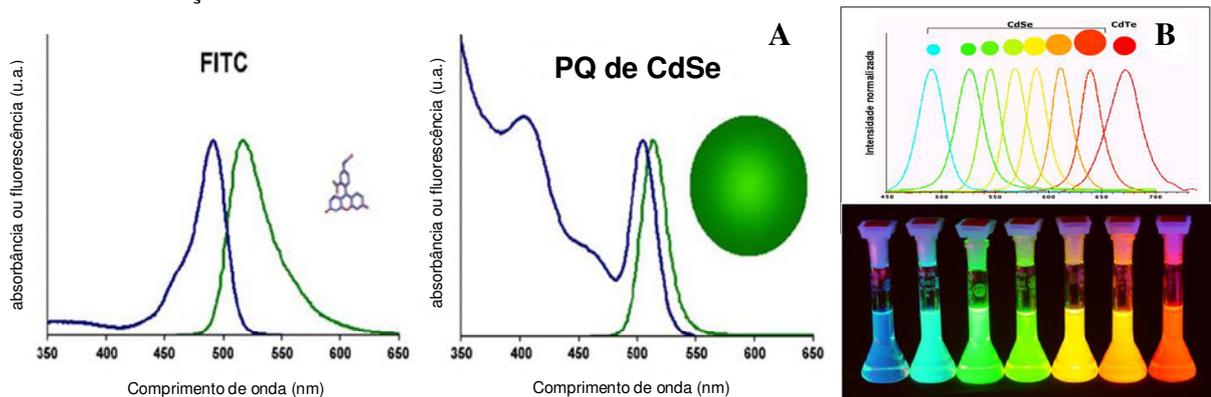
se a classe de compostos binários do tipo II-VI, constituídos pelos elementos da família VIA (calcogênios) e IIB (metais de transição) da tabela periódica (ORTON, 2004), tendo em vista que abrange o ponto quântico utilizado neste trabalho.

Devido a suas dimensões reduzidas comparadas ao de um mesmo material em escala macroscópica, os PQ apresentam alterações significativas em suas propriedades físico-químicas. Nestes sistemas, é possível modificar as propriedades ópticas, através da manipulação da estrutura, da composição química e, em especial do tamanho. Isto permite a emissão de fluorescência em diferentes comprimentos de onda do espectro eletromagnético visível (SANTOS, 2007), devido às diferenças entre os estados energéticos presentes nas duas bandas que variam segundo o tamanho dos PQ. De maneira que, a diferença de energia entre as bandas será tanto maior, quanto menor for o tamanho do nanocristal. Assim, enquanto as partículas menores tendem a fluorescer em regiões mais energéticas, próximas ao azul, aquelas que possuem dimensões maiores geralmente exibirão fluorescência nas regiões menos energéticas, próximas ao vermelho, conforme pode ser observado na Figura 7 B.

Os PQ vem sendo empregados em diversas aplicações como: diodos e lasers, células solares, detectores, dispositivos de telecomunicação e, mais recentemente como biomarcadores fluorescentes (SANTOS, 2008). A partir dos trabalhos publicados por Alivisatos e Nie (1998) relatando o emprego de ligantes conjugados com os PQ, estes nanomarcadores tem sido alvo de pesquisas voltadas para a área bioanalítica e de metodologias diagnósticas desde a década de 90 (MICHALET, 2005; MEDINTZ, 2005; BRUCHEZ, 2007).

O crescente interesse é justificado por uma série de vantagens apresentadas pelos PQ quando comparados ao fluoróforos convencionais, marcadores biológicos mais vendidos comercialmente. Dentre as quais podemos citar: (i) alto deslocamento *Stokes* (Fig. 7A); (ii) largo espectro de excitação e estreito espectro de emissão (Fig. 3A); (iii) baixa toxicidade; (iv) elevada fotoestabilidade; (v) emissão em diversos comprimentos de onda para um mesmo material, por meio da manipulação do tamanho da partícula (Fig 7B); (vi) marcação múltipla simultânea de diversos componentes e estruturas celulares em células vivas ou fixadas; (vii) os resultados podem ser obtidos com reduzido tempo de incubação da ordem de alguns minutos, além das (viii) superfície ativa possibilitando conjugação à biomoléculas (BRUCHEZ, 2007). A Figura 7 exemplifica algumas destas vantagens.

Figura 7. A. Espectros de absorção e emissão do fluoróforo orgânico FITC comparado aos pontos quânticos (PQ) de Seleneto de Cádmio (CdSe) de uma suspensão. B. PQ de CdSe/ZnS e Telureto de Cádmio (CdTe) apresentando diferentes comprimentos de onda de emissão, sintonizados através da variação de tamanho dos nanocristais.



Fonte: Adaptado de Chaves (2006).

O desenvolvimento da nanotecnologia, através do advento dos pontos quânticos como uma nova classe de fluoróforos tem permitido a pesquisa de novos métodos de detecção, tendo em vista as vantagens que apresenta frente ao fluoróforos orgânicos convencionais (Fig. 7A) (Alivisatos, 2003; Murphy, 2002; Niemeyer, 2001), sugerindo que os PQ podem ser marcadores em potencial para imunoenaios fluorescentes. (Goldman, Medintz, & Mattoussi, 2006). Nesse sentido, ensaios imunofluorescentes (FLISA) empregando materiais fluorescentes tem superado as desvantagens do ELISA. PQ podem simplificar a *performance* do imunoenasão, facilitando a automação, detectando maior quantidade de amostras, permitindo a diminuição do tempo gasto em sua realização, entre outros. Imunoenaios empregando PQ vem sendo desenvolvidos por diversos grupos de pesquisa para análise de analitos e resíduos de drogas veterinárias (Chen et al., 2009; Shen et al., 2007), cólera, toxina, ricina, toxina Shiga-1 e enterotoxina B de estafilococos (Goldman et al., 2004), micotoxinas (Zhang et al. 2014). Tully, Hearty, Leonard, & O’Kennedy (2006) tem desenvolvido anticorpos monoclonais conjugados com PQ-Anti-Internalina A para imunomarcagem de *Listeria monocytogenes*.

Os PQ podem ser obtidos por dois métodos, o *top down* e o *bottom up*. O primeiro ocorre pela redução das dimensões (ablação) de um cristal pré-existente, enquanto o segundo é uma técnica de crescimento controlado dos nanocristais em meio coloidal, a partir de átomos ou moléculas empregados que são ligados quimicamente. As rotas organometálicas, primeiras a serem utilizadas na obtenção de PQ (década de 80 e 90), apresentam diversas desvantagens se comparadas às metodologias baseadas na preparação por química coloidal em meio aquoso. Dentre

as desvantagens dos sistemas organometálicos, podemos citar: emprego de solventes orgânicos, insolubilidade em meio aquoso, incompatibilidade com sistemas biológicos, utilização de compostos pirofóricos e custo elevado. Diante do exposto, as rotas em meio aquoso, tornaram-se alternativas promissoras, principalmente devido a sua compatibilidade direta para aplicações biológicas (SANTOS, 2007; CHAVES, 2008).

De uma forma geral, os nanocristais de materiais semicondutores obtidos em sínteses coloidais seguem as seguintes etapas:

1) Formação dos complexos/associações entre os cátions metálicos e moléculas contendo grupamentos capazes de se associar aos cátions e continuar associados à superfície das nanopartículas finais (chamados agentes estabilizantes);

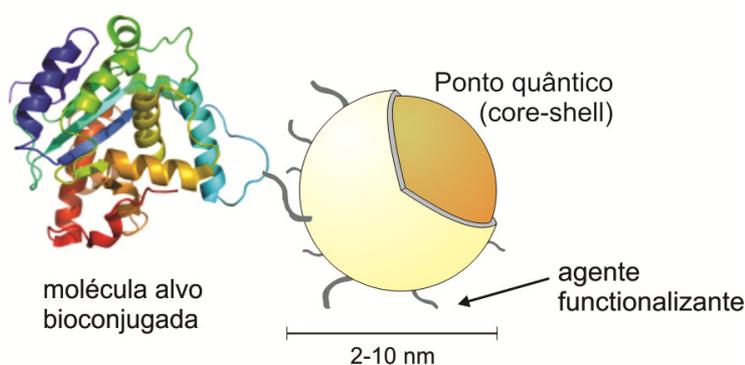
2) Formação dos núcleos de cristalização entre os cátions metálicos e os anions calcogenetos;

3) Crescimento destes núcleos em solução produzindo cristais nanométricos, através do consumo dos agentes precursores residuais em suspensão. Este crescimento pode ser feito através da manutenção do sistema reacional em refluxo por um tempo prolongado a uma temperatura suficiente para garantir o processo;

4) Após a produção dos nanocristais, a fluorescência dos sistemas pode apresentar baixa eficiência devido à presença de defeitos cristalinos de superfície associados à ligações não-compartilhadas, que resultam em novos níveis eletrônicos capazes de armadilhar os elétrons disponíveis para gerar a fluorescência. Neste caso torna-se necessária a indução do crescimento de monocamadas de um material capaz de minimizar os defeitos. Na maioria dos casos utiliza-se a deposição de camadas de um semicondutor de natureza semelhante ao PQ preparado, mas de maior *bandgap*, induzindo a produção de fluorescência pelo processo primário de recombinação elétrons-buraco na própria partícula. A utilização de estabilizante contendo grupos tióis pode induzir a formação de monocamadas de um semicondutor com estas características, através da incorporação dos íons sulfeto na vacância dos calcogenetos na presença em excesso do cátion metálico no meio reacional. Este processo é conhecido como passivação e resulta numa estrutura denominada de núcleo-casca (*core-shell*) (SANTOS, 2008).

Outra etapa importante necessária para o emprego do PQ como fluoróforos em sistemas biológicos é a funcionalização que consiste na incorporação de moléculas orgânicas na superfície dos PQ. As referidas moléculas permitem interações químicas entre o sistema inorgânico e o material de origem biológica, promovendo o acoplamento entre eles. Em geral, sobretudo em preparações em meio aquoso, o agente estabilizante já faz o papel de funcionalizante. Um esquema representativo de um material tipo núcleo-casca funcionalizado para aplicação biológica encontra-se representado na Figura 8.

Figura 8. Esquema de um bioconjugado típico empregando ponto quântico tipo *core-shell*.



Fonte: Fontes, 2012.

Algumas substâncias possuem a capacidade de atuar tanto como agentes passivantes quanto funcionalizantes, como ácido mercaptoacético, ácido mercaptopropiônico, ácido mercaptosuccínico, cisteína, cisteamina, dentre outros. Isto possibilita que, nos procedimentos de obtenção dos PQ em que se emprega algum desses agentes que possuem essa dupla ação, a passivação e funcionalização sejam realizadas em uma única etapa.

Ressalta-se que os PQ do tipo II-VI de Telureto de Cádmio (CdTe) utilizados neste trabalho foram obtidos pelo método *bottom up*, baseado em química coloidal.

3.3 Bioconjugação

Posteriormente à obtenção de PQ funcionalizados, faz-se necessário a realização da etapa denominada de bioconjugação. Esta consiste em ligar quimicamente duas ou mais moléculas por uma ligação covalente, promovendo a formação de um complexo que combina as características dos componentes

individuais. Além disso, os bioconjugados obtidos podem atuar como agentes modificadores de superfícies sólidas, fármacos, da estrutura nativa e das funções de ácidos nucleicos, oligonucleotídeos, açúcares, polissacarídeos, peptídeos, proteínas, entre outros (CHAN, 1998; MEDINTZ, 2005; HERMANSON, 2008).

Diante do que foi supracitado, a bioconjugação proporciona a obtenção de biomoléculas conjugadas ou modificadas que tem sido aplicadas com sucesso em diversas áreas, tais como: desenvolvimento de metodologias diagnósticas, detecção ultra-sensível, localização de componentes celulares específicos e purificação (HERMANSON, 2008).

Esse processo envolve agentes de acoplamento que possuem os grupamentos reativos que irão atuar em grupos funcionais específicos presentes na molécula alvo a ser modificada e que constituem o alvo na reação, podendo ser aminas primárias, sulfidrilas, carboxilatos, entre outros.

Podem-se empregar diferentes agentes de acoplamento e mecanismos de reação, a depender das moléculas de origem biológica (biomolécula) e sistemas inorgânicos ou orgânicos envolvidos (MEDINTZ, 2005). Nesse processo as funções características do sistema biológico e do material orgânico ou inorgânico devem ser mantidas, não devendo ocorrer desnaturações, modificações estruturais irreversíveis ou alterações químicas na biomolécula empregada (CHAN, 1998; MAMEDOVA, 2001).

Além disso, a seleção do agente deve ser baseada em critérios, tais como: solubilidade em água, reatividade espontânea, afinidade química com os grupamentos presentes no sistema de origem inorgânica ou orgânica, especificidade para um grupo funcional em particular disponível na molécula alvo, conhecimento do mecanismo básico pelo qual o grupamento reativo interage com o grupo funcional alvo, condições reacionais, compatibilidade da reação com a aplicação e definição da estequiometria reacional ideal (CHAN, 1998; MAMEDOVA, 2001; HERMANSON, 2008). Portanto, é imprescindível a compreensão da estrutura da molécula alvo, visando obter subsídios para uma escolha adequada dos agentes e, conseqüentemente, obtenção de um processo de bioconjugação bem sucedido.

Assim, considerando-se o grupamento carboxilato presente nos PQ de CdTe utilizados neste trabalho, serão destacados os agentes de comprimento zero, em especial as carbodiimidas, agentes empregados no processo de interação entre os grupamentos carboxilatos e as aminas primárias oriundas de uma molécula proteica.

3.3.1 Agentes de Comprimento Zero

Os reagentes que promovem a ligação entre duas moléculas, sem formar um composto adicional entre os dois sistemas são conhecidos como agentes de comprimento zero (HERMANSON, 2008). Eles promovem a ligação covalente direta entre os grupamentos químicos de duas moléculas, sem que ocorra a formação de um ligante adicional ou espaçamento entre os dois compostos, eliminando consideravelmente a reatividade cruzada. Por isso, podem ser considerados uma alternativa frente aos convencionais que promovem a adição de um composto entre as duas estruturas (ULRICH, 2007; HERMANSON, 2008).

As carbodiimidas, as hidroxisuccinimidas e as maleidoimidas são os agentes de acoplamento mais empregados em processos de bioconjugação. Eles possibilitam a conjugação de biomoléculas aminadas a compostos que contenham grupamentos fosfatos ou carboxilatos, através da obtenção de três tipos de ligações: (i) fosforamidato - intermediada pela reação entre um grupo fosfato e uma amina primária; (ii) amida - via condensação de uma amina primária com um ácido carboxílico e (iii) aminação redutiva - entre uma amina primária ou secundária ligada a aldeído (NAKAJIMA, 1995; MAMEDOVA, 2001; HERMANSON, 2008).

Em relação ao rendimento da reação, este irá depender exclusivamente do reagente empregado e da aplicação desejada, podendo ser realizadas em meio aquoso ou orgânico, de modo que todas as reações mencionadas anteriormente apresentam um bom rendimento (NAKAJIMA, 1995; MAMEDOVA, 2001; HERMANSON, 2008).

3.3.1.1 Carbodiimidas

As carbodiimidas podem ser consideradas formalmente como diimidas derivadas do dióxido de carbono ou anidridos de uréias 1,3-substituídas (YRAZO, 2001). Além de constituir a única classe de compostos orgânicos reativos que tem a estrutura heterocumuleno $R-N=C=N-R$. Elas promovem a formação de ligações covalentes do tipo amida, por ativar grupamentos carboxilatos ou fosfatos, os quais podem interagir com aminas primárias presentes em inúmeros compostos de origem biológica e mediar à formação de ligações amida ou fosforamidato, respectivamente.

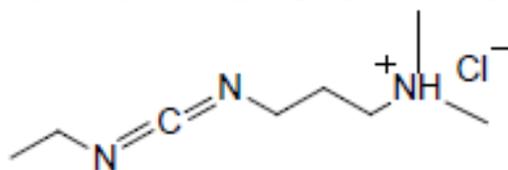
É importante ressaltar que independentemente do tipo de carbodiimida empregada, ocorrerá à formação do intermediário altamente reativo *o*-acilisouréia que promove o ataque da amina nucleófila no grupamento carbonila do éster formado, resultando na formação da ligação amida (ULRICH, 2007; HERMANSON, 2008), conforme representado no esquema da Figura 3.3. Contudo, moléculas de oxigênio presentes podem atuar como nucleófilos (OH^-), competindo com os grupamentos amina de interesse. Isto ocorre porque nos processos de bioconjugação em soluções aquosas, no qual a maior reação de competição é a hidrólise da água, os nucleófilos clivam o éster intermediário reativo, formando uma isouréia e regenerando o grupo carboxilato.

Eles são amplamente empregados em processos biotecnológicos, por causa da capacidade de formar conjugados entre duas proteínas, entre peptídeos e proteínas, e entre uma biomolécula e um sistema inorgânico biocompatível (HERMANSON, 2008), sendo esta última aplicação o foco deste trabalho. Para essa finalidade, empregou-se uma carbodiimida hidrossolúvel.

Os dois tipos básicos de carbodiimidas são as solúveis em meio orgânico e as hidrossolúveis. As primeiras são bastante empregadas em síntese peptídica e na obtenção de conjugados que envolvem moléculas solúveis em meio orgânico. Enquanto as últimas são as mais empregadas em conjugações de proteínas e demais macromoléculas de origem biológica. Os subprodutos das reações desses agentes, principalmente as isouréias, possuem boa solubilidade no meio reacional, o que proporciona uma maior facilidade no processo de purificação dos conjugados por diálise ou filtração a gel, por exemplo (ULRICH, 2007; HERMANSON, 2008).

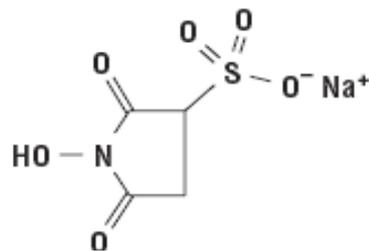
O reagente mais empregado na conjugação de compostos que possuem grupos carboxílicos e/ou aminas é o EDC ou EDAC [Cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida] (Figura 9), uma carbodiimida alifática *N*-substituída hidrossolúvel com massa molar de $191,7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. O EDC promove a formação de uma ligação amida, de caráter covalente, entre a molécula contendo amina e o grupo carboxilato.

Figura 9. Fórmula estrutural do cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC).



Atualmente, em processos de bioconjugação que envolvem compostos inorgânicos biocompatíveis, tais como PQ e complexos de íons terras raras, o éster Sulfo-NHS (*N*-hidroxisulfosuccinimida) tem sido bastante empregado em conjunto com o EDC (ULRICH, 2007). O Sulfo-NHS (Figura 10) é um aditivo de acoplamento, constituído por um grupo reativo hidrofílico que interage rapidamente com aminas em moléculas alvo e permite o aumento da estabilidade e solubilidade do intermediário reativo *o*-acilisouréia, durante o processo de acoplamento via EDC. Ele também promove a interação entre aminas primárias e o seu intermediário reativo formando ligações amida (ULRICH, 2007; HERMANSON, 2008).

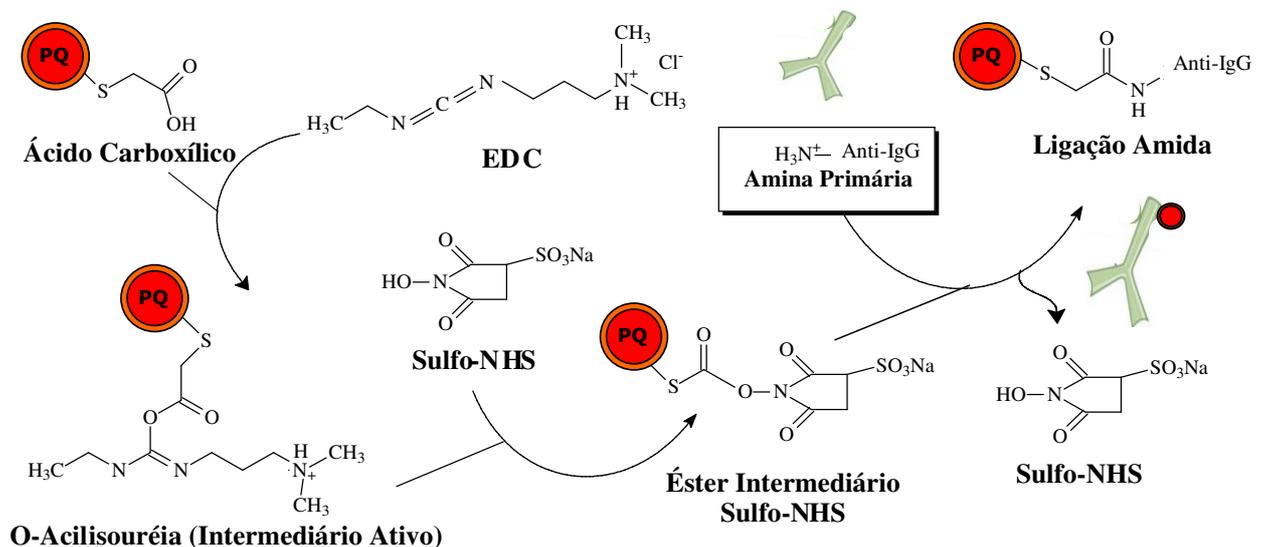
Figura 10. Estrutura química da *N*-hidroxisulfosuccinimida (Sulfo-NHS).



O EDC promove a interação entre os grupamentos amina na albumina e os grupamentos carboxilatos da superfície dos PQ CdTe/CdS (Figura 11).

Trabalhos indicam que a ativação do grupo carboxilato é promovido mais efetivamente com o EDC no pH entre 3,5 - 4,5. Todavia, um maior rendimento da ligação amida é obtido em meio reacional ótimo no intervalo de pH entre 4 e 6 Nakajima e Ikada (1995).

Figura 11. Esquema do processo reacional do grupo carboxilato presente nos pontos quânticos (PQ) de CdTe estabilizados com ácido mercaptosuccínico, via EDC e Sulfo-NHS, com a amina primária da proteína antiimunoglobulina G (Anti-IgG) na formação da ligação amida



Fonte: Adaptado de Carvalho, 2010.

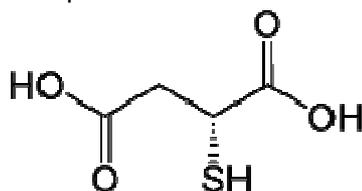
4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Preparação de suspensões de pontos quânticos de CdTe empregando o ácido mercaptosuccínico como agente estabilizante

Nos protocolos de preparação em meio aquoso de nanopartículas de CdTe empregou-se como agente estabilizante/funcionalizante o ácido mercaptosuccínico (AMS), baseado em procedimentos já descritos na literatura (YU, 2013; WANG, 2008). A figura 12 apresenta a fórmula estrutural do agente estabilizante/funcionalizante empregado.

A preparação foi realizada em meio aquoso (água ultrapura desionizada), processada em atmosfera inerte de nitrogênio grau 4.0 com reagentes sem nenhuma purificação adicional.

Figura 12. Fórmula estrutural do agente estabilizante/funcionalizante empregado no processo de preparação dos pontos quânticos de CdTe com ácido mercaptosuccínico.

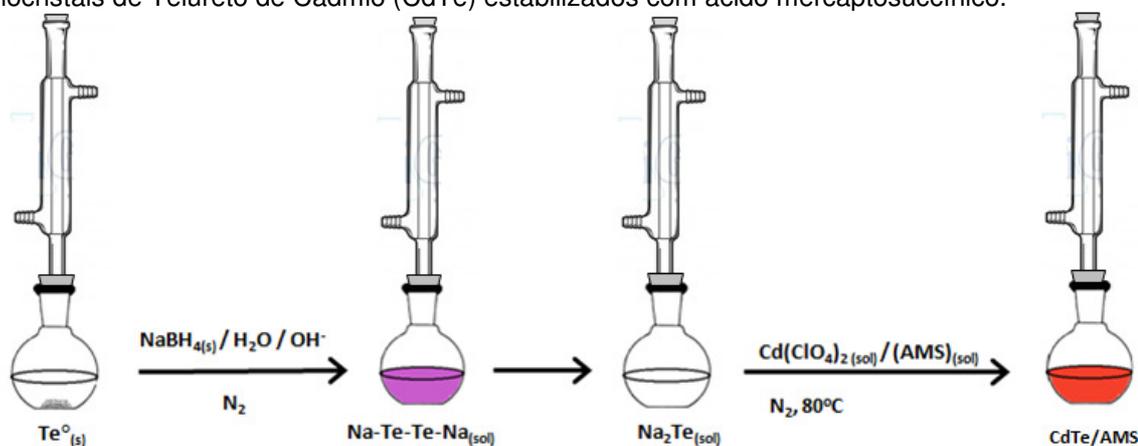


Um esquema geral do procedimento empregado na obtenção de suspensões coloidais de CdTe em meio aquoso, utilizando como agente estabilizante/funcionalizante MAS é apresentado na Figura 13.

Suspensões de PQ de CdTe empregando MSA foi preparada na proporção **Cd²⁺:Te²⁻:Estabilizante** de **1:0,5:3**. Numa preparação típica adicionou-se em um balão 1×10^{-4} mol do Telúrio elementar (Te⁰) (pó, 200 mesh, 99,8%, Aldrich) com 400 µL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol.L⁻¹ e $3,8 \times 10^{-3}$ mol de borohidreto de sódio (NaBH₄) (Venpure AF granules, 98+%, Sigma-Aldrich) como agente redutor, obtendo-se uma solução fonte de íons telureto (Te²⁻) – telúrio reduzido, sob temperatura de 70°C. Posteriormente, em outro balão contendo 6×10^{-4} mol de AMS (97%, Aldrich) e 2×10^{-4} mol de Cd²⁺ proveniente de perclorato de cádmio - Cd(ClO₄)₂ .6H₂O (99%, Sigma-Aldrich) solubilizados em água e com pH ajustado para 10,5 com NaOH 1 mol.L⁻¹, adicionou-se a solução de íons Te²⁻. Em

seguida, o sistema foi submetido a aquecimento (90°C) sob refluxo e agitação constante por 2 horas (BRASIL, 2014).

Figura 13. Esquema geral do procedimento de obtenção de suspensões coloidais aquosas de nanocristais de Telureto de Cádmio (CdTe) estabilizados com ácido mercaptosuccínico.



4.2 Bioconjugação de nanocristais de CdTe/AMS com Anti-IgG humana

Inicialmente na metodologia empregada, os PQ foram submetidos a um processo de purificação, através de dispositivos de ultrafiltração por força centrífuga (Thermo Scientific, pierce concentrator 20MWCO), a 2000 rpm por 3 minutos, com três repetições. Posteriormente, o pH da alíquota foi ajustado para 5,6 com solução de MSA 0,5 mol.L⁻¹. Pesou-se 0,0004 g de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) (98%, Sigma-Aldrich) e 0,0011 g de *N*-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS) (98%, Sigma-Aldrich) (Ver Figuras 3.4 e 3.5) para cada 1 mL do PQ a ser utilizado e solubilizou-se em água, obtendo-se as concentrações finais de aproximadamente 2 mmol.L⁻¹ e 5 mmol.L⁻¹, respectivamente. Em seguida, a amostra foi submetida à agitação orbital por 15 minutos em temperatura ambiente para promover a ativação dos grupamentos carboxílicos presentes na superfície dos PQ. Após, realizou-se uma centrifugação com a amostra utilizando dispositivo de ultrafiltração (Thermo Scientific, pierce concentrator 20MWCO) para eliminar EDC e Sulfo-NHS residual. O pH dos PQ ativados e purificados foi ajustado para 7,2 com PBS 1X (pH=7,2).

Preparou-se bioconjugados com diferentes anticorpos secundários, Anti-IgG humanas produzidas em caprinos [Anti-Human IgG (H+L), F(ab')₂ fragment, highly cross adsorbed antibody produced in goat (Sigma Aldrich)] e [Anti-Human IgG (H+L),

highly cross adsorbed antibody produced in goat (Sigma Aldrich)], ambos na concentração de 1mg/mL, por meio da adição de volume suficiente de PQ de CdTe/AMS ativados e purificados mais 50 ou 100 μL de Anti-IgG (1 mg/mL) para cada 1 mL de conjugado obtido. Deixou-se a amostra *overnight* em refrigerador (2-8 $^{\circ}\text{C}$) para reagir. Depois, adicionou-se para cada 1mL do conjugado 0,0012 g de tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) (ultra puro, Amresco) por 1h sob agitação orbital em temperatura ambiente para o bloqueio, obtendo-se concentração final de TRIS de 10 mmol.L⁻¹. Os conjugados CdTe/AMS – Anti IgG foram empregados em imunodiagnósticos para LTA humana.

4.3. Caracterização dos nanocristais fluorescentes de CdTe/AMS e dos bioconjugados CdTe-Anti-IgG

As propriedades ópticas das suspensões coloidais dos PQ de CdTe com AMS e dos conjugados CdTe-Anti-IgG foram analisadas por espectroscopias de absorção empregando-se o espectrofotômetro UV-Vis Thermo Scientific (modelo Evolution 600), e de excitação e emissão no fluorímetro Perkin Elmer (modelo LS 55).

Estimou-se o tamanho dos nanocristais fluorescentes de CdTe, baseado na interpolação numa curva empírica de crescimento dos PQ, descrito na literatura por Dagtepe e colaboradores (DAGTEPE, 2007) (Eq 1):

$$D = \frac{1.38435 - 0.00066\lambda}{1 - 0.00121\lambda} \quad (1)$$

onde D = diâmetro dos PQ de CdTe

λ = comprimento de onda (nm) do máximo de absorção característico da transição excitônica 1S-1S

A partir da relação empírica desenvolvida por Yu e colaboradores (YU, 2003), estimou-se a concentração dos PQ empregando-se a relação de Lambert-Beer (Eq. 2), onde o coeficiente de extinção molar (ϵ) dos PQ de CdTe foi estimado pela (Eq. 3):

$$A = \epsilon C l \quad (2)$$

Onde: **A** é a absorbância no primeiro máximo de absorção,

C é a concentração em mol.L⁻¹,

L é a distância percorrida pela luz (cubeta com caminho óptico de 1 cm) e

ε é o coeficiente de correlação tendo como unidade L.mol⁻¹·cm⁻¹.

$$\varepsilon = 10043 \times (D)^{2.12} \quad (3)$$

Onde: D é o diâmetro dos PQ de CdTe

Na caracterização estrutural dos nanocristais fluorescentes de CdTe empregou-se a difratometria de raios-X (DRX) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Submeteu-se a amostra de PQ obtidos a um processo de precipitação, no qual foi utilizado álcool isopropílico absoluto (P.A., Dinâmica). Em seguida, centrifugou-se a 4000 rpm por 5 minutos, visando a análise de DRX com varredura $2\theta = 20^\circ - 60^\circ$, radiação incidente $K\alpha_{(Cu)} = 1,544 \text{ \AA}$ e filtro de Níquel num difratômetro (Siemens Nixford D5000), obtendo-se o difratograma do CdTe/AMS. O cálculo teórico da estimativa do diâmetro médio dos nanocristais de CdTe obtidos foi realizado por meio da equação de Scherrer (Eq. 4):

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

Onde: **D** é o diâmetro médio das partículas em \AA ,

λ Comprimento de onda da radiação incidente ($K\alpha=1,5406 \text{ \AA}$),

β é a largura do pico de difração mais intenso a meia altura em radianos e

θ é o ângulo do pico mais intenso.

Na MET depositou-se gotículas da suspensão concentrada de CdTe/AMS em uma tela de cobre (200 *mesh*) revestida com filme fino de carbono. Em seguida, deixou-se secar a amostra na grade. A análise para fornecer informações sobre a morfologia, o tamanho médio e a dispersão dos PQ obtidos foi realizada em microscópio fabricado pela Jeol, modelo 200CX, com tensão de 200 KV e resolução de ponto 0,38 nm.

Determinou-se a carga superficial dos nanocristais fluorescentes de CdTe e do bioconjugado, por meio da obtenção do potencial zeta (ζ) das amostras analisadas em equipamento Malvern (modelo ZetaSizer Nano ZS90).

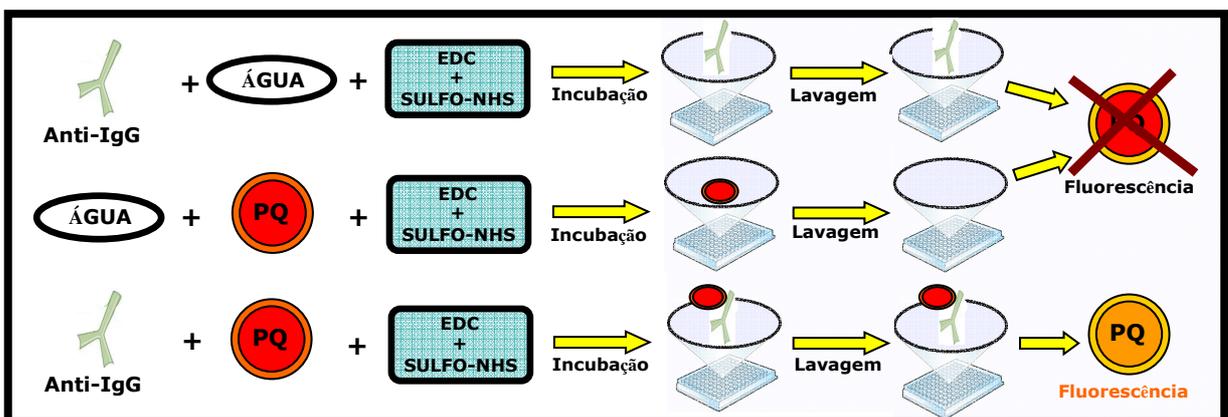
A análise dos conjugados obtidos foi realizada por método de detecção semi-quantitativo da intensidade de fluorescência em microplacas negras de poliestireno como fase sólida (CARVALHO *et al.*, 2014), em anexos, baseada nas interações eletrostáticas entre o polímero que as recobre e os resíduos hidrofóbicos presentes nas proteínas, conforme esquemas exibidos nas Figuras 14 e 15.

Sensibilizou-se microplacas negras de poliestireno de $\frac{1}{2}$ área contendo 96 poços ($\frac{1}{2}$ Area Plate 96F Black, volume máximo 200 μ L, Perkin Elmer) com amostras em triplicata de: Branco (vazio), Controle (sem PQ), Anti-IgG (0,05 mg/mL), CdTe/AMS e CdTe-Anti-IgG. Adicionou-se o volume de 50 μ L de cada amostra por poço e incubou-se a placa por 2 h a temperatura ambiente sob agitação orbital. Posteriormente, os poços foram lavados 3 vezes com tampão fosfato salino (PBS) 1X – Tween (0,05%) com o volume de 180 μ L por poço. Após, colocou-se as microplacas em leitor por fluorescência (Perkin Elmer -modelo Victor 2 Wallac) que foram submetidas a leituras com os filtros de excitação (F 355 nm) e de emissão (F 595 nm), com 15.000 cW de intensidade da lâmpada, 1 s.

As intensidades de fluorescências obtidas foram utilizadas para calcular a média e o erro padrão da média das amostras analisadas. Em seguida, obteve-se o percentual da fluorescência relativa – FL_{rel} (%), por meio dos valores da fluorescência (FL) de controles e bioconjugados, conforme Equação 5 a seguir:

$$FL_{rel} = FL \text{ Bioconjugado} - FL \text{ controle} / FL \text{ controle} \times 100\%. \quad (5)$$

Figura 14. Esquema do método empregado para análise do conjugado CdTe-Anti-IgG.

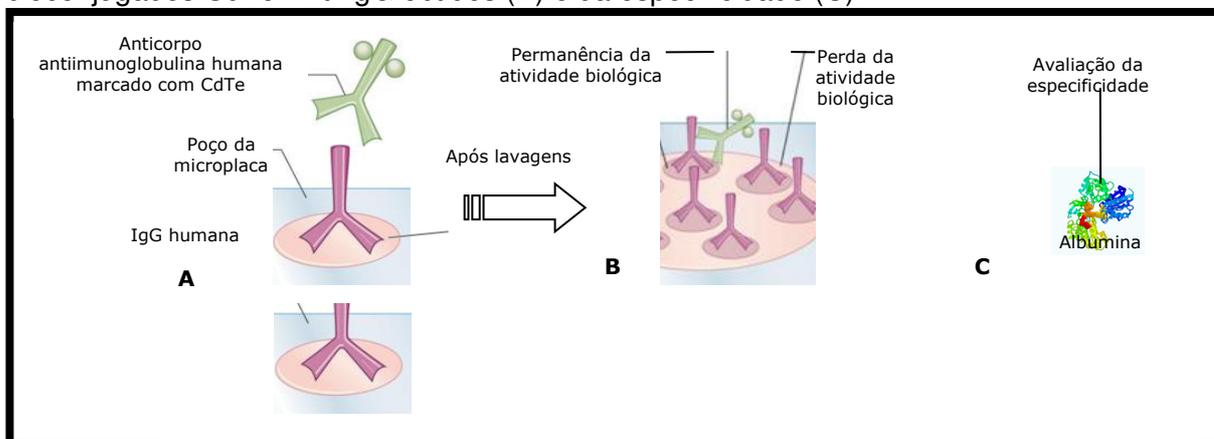


O resultado foi considerado positivo se a FL_{rel} (%) foi igual ou superior a 100%, e negativo se inferior a 100% (CARVALHO *et al.* 2014).

Em seguida, objetivando-se avaliar a atividade biológica da Anti-IgG nos conjugados com nanocristais fluorescentes de CdTe, realizou-se ensaio, conforme demonstrado na Figura 15.

Pipetou-se 4 μ L da IgG humana (IgG from human serum reagent grade – Sigma Aldrich) na concentração de 2 mg/ mL e adicionou-se 1996 μ L de PBS 1X (pH 7,2). A solução da IgG completa obtida (0,08 μ g/ μ L) foi empregada para sensibilizar as microplacas de $\frac{1}{2}$ área de poliestireno, por meio da adição de 50 μ L por poço, totalizando 4 μ g de IgG/poço e outros poços foram sensibilizados com albumina sérica bovina (BSA) [Bovine Serum Albumin lyophilized powder, \geq 98% (agarose gel electrophoresis), Essentially fatty acid free, essentially globulin free (Sigma-Aldrich)] a 4%, como controle de possível interação inespecífica. Ambos foram incubados entre 2-8°C overnight. Após, efetuou-se a lavagem dos poços com PBS 1X por três vezes. Em seguida, os poços sensibilizados com IgG foram bloqueados com 180 μ L de BSA 1% overnight de 2–8°C. Posteriormente, realizou-se nova etapa de lavagens com PBS 1X por três vezes e incubou-se 50 μ L do bioconjugado obtido na concentração de 0,05 mg/mL e deixou-se overnight de 2 – 8 °C. Por último, lavou-se os poços com PBS 1X três vezes e procedeu-se a leitura dos poços no leitor de microplacas empregando-se os mesmos parâmetros mencionados anteriormente no equipamento. Os ensaios foram realizados no mínimo em triplicata.

Figura 15. Visualização esquemática a nível molecular da preparação da microplaca de poliestireno (A) e do ensaio realizado para avaliação da atividade biológica dos bioconjugados CdTe-Anti-IgG obtidos (B) e da especificidade (C).



4.4 Avaliação dos bioconjugados obtidos como insumo em imunodiagnósticos para LTA

Os ensaios sorológicos para analisar o desempenho do bioconjugado como insumo em diagnóstico de LTA foram realizados em colaboração com a Dr^a Maria Edileuza Felinto Brito do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM)/ Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), empregando amostras de soro da soroteca da FIOCRUZ e antígenos, por meio de projeto com registro no CAAE sob nº. 0038.0.095.000-07, aprovado em parecer emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM/FIOCRUZ sob nº. 054/2007 (Anexo 1).

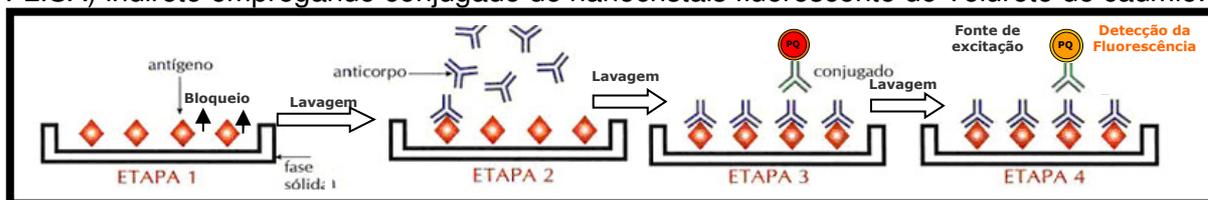
As formas promastigotas do parasita utilizadas nos ensaios foram da cepa *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M-2903), mantida *in vitro* no laboratório de imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ, Recife-PE. As células foram disponibilizadas pela pesquisadora Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo do CPqAM/ FIOCRUZ.

A obtenção das frações antigênicas solúvel e insolúvel dos parasitas partiu de promastigotas em fase de crescimento exponencial sedimentados por centrifugação a 3000 x g por 15 minutos a 4 °C e lavados três vezes em PBS pH 7,2 estocados a -70 °C. Descongelou-se e ressuspendeu-se os parasitas em água destilada contendo inibidores de proteases e foram lisados por ultrasonicação. Centrifugou-se o lisado protéico a 10.000 x g durante o período de 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi recentrifugado a 100.000 x g por 60 minutos a 4 °C, obtendo-se assim as frações protéicas solúvel (sobrenadante) que compreende predominantemente proteínas citoplasmáticas e a insolúvel (“pellet”) que contém as proteínas associadas à membranas. A concentração protéica de aproximadamente 0,85 µg/ µL após diálise do antígeno solúvel fornecido foi determinado pelo método de Bradford (1976), modificado por Read & Northcote (1981) (BRITO, 1998).

4.4.1 Ensaio imunofluorescente baseado em quantum dots (PQ-FLISA) indireto

Empregou-se o bioconjugado CdTe-Anti-IgG como insumo em ensaio sorológico inovador PQ-FLISA indireto para o diagnóstico de LTA, conforme apresentado na Figura 16.

Figura 16. Esquema geral de ensaio imunofluorescente baseado em quantum dots (PQ-FLISA) indireto empregando conjugado de nanocristais fluorescente de Telureto de cádmio.



Realizou-se protocolo adaptado de Brito (1998), conforme descrito a seguir. Sensibilizou-se microplacas negras de poliestireno de 1/2 área contendo 96 poços (1/2 Area Plate 96F Black, volume máximo 200 µL, Perkin Elmer) com 5 µg por poço do antígeno solúvel de *L. braziliensis* diluído em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6. Adicionou-se 50 µL em cada poço e deixou-se “overnight” de 2-8°C. Posteriormente, lavou-se os poços com 180 µL de PBS 1X – Tween 20 (0,05%) três vezes, seguidos de PBS 1X duas vezes. Realizou-se a etapa de bloqueio, na qual foi empregado 100 µL de BSA 1% diluído em água ultrapura por 2 horas a temperatura ambiente. Os poços foram lavados com 180 µL de PBS 1X (pH 7,2) – Tween 20 (0,05%) três vezes, seguidos de PBS 1X duas vezes. Descartou-se o excesso da placa. Incubou-se em câmara úmida 50 µL por poço do primeiro anticorpo (soro de paciente) diluído em PBS-Tween 20 (0,05%) título 1:100, durante 1 hora a 37°C. Lavou-se os poços com 180 µL de PBS 1X – Tween 20 (0,05%) três vezes, seguidos de PBS 1X duas vezes. O excesso da placa foi retirado. Após, o segundo anticorpo (conjugado Anti-IgG-humana-CdTe) foi incubado em câmara úmida com 50 µL por poço, diluídos em PBS 1X título 1:20, durante 1 hora a 37°C. Os poços foram lavados com 180 µL de PBS 1X – Tween 20 (0,05%) três vezes, seguidos de PBS 1X duas vezes. Retirou-se o excesso da placa que foi levada para realização da leitura dos poços no leitor de micriplacas. Empregou-se os filtros F355 e F595 e demais parâmetros já mencionados.

Calculou-se o ponto de corte baseado na média da intensidade de fluorescência dos valores das análises de soro negativo, por meio da Equação 6 a seguir:

$$\text{Ponto de corte} = \text{Média da intensidade das amostras negativas} + 2 \times \text{desvio padrão} \quad (6)$$

A razão ($R_{CP/NC}$) entre as amostras controles positivos (CP) e negativos (CN) foi calculada em termos de intensidade de fluorescência detectada, assim como em relação a Fluorescência Relativa apresentada frente ao controle (branco).

4.4.2 Imunofluorescência indireta (IFI)

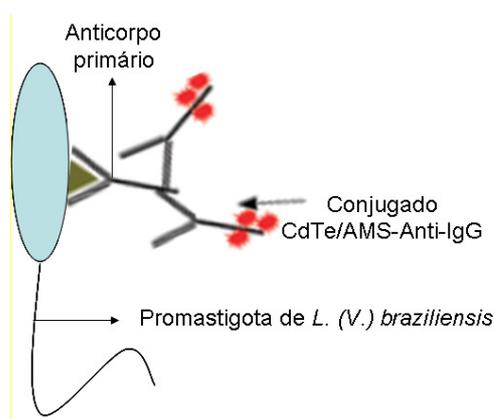
Inicialmente, recobriu-se lamínulas redondas (170 μm de espessura e 1.525 de índice de refração, 13 mm de diâmetro) com poli-L-Lisina (PLL) por 15 minutos à temperatura ambiente. Após, retirou-se o excesso de PLL com papel de filtro. Em seguida, as lamínulas foram inseridas em placa de 24 poços com a superfície recoberta voltada para cima. A cultura de células de formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* foram coletadas e lavadas 3x em PBS 100mM. Centrifugou-se as células a 3500 rpm por 8 min nas lavagens. Por fim, concentrou-se as células em um volume menor de solução fixadora de paraformaldeído (PFA) 4% em PBS 100 mM (pH = 7,2), recém-preparada. Deixou-se overnight a 4°C.

Posteriormente, efetuou-se a lavagem das células com PBS 100 mM três vezes, concentrando-as em um volume menor. Pingou-se gotas de células, aproximadamente 125 μL da suspensão de célula em cada lamínula, cobrindo-as. Seguiu-se com o emprego da solução de lavagem PBS 10mM com Glicina 20 mM, 2 vezes por 5 minutos, à temperatura ambiente. Depois, o bloqueio foi realizado com a solução de PBS 10 mM com Glicina 20 mM e BSA 2%, durante 20 minutos à temperatura ambiente. Incubou-se os parasitas fixados na lamínula com amostra de soros positivos e negativos para LTA diluídos (1:20) na solução de PBS 100 mM à 37°C em estufa com controle de umidade por 60 minutos. Os controles (parasita, parasita + PQ e teste sem soro + conjugados) foram incubados na solução de incubação. Procedeu-se a lavagem com a solução de PBS 10mM com Glicina 20 mM, 2 vezes por 5 minutos, à temperatura ambiente. Após, lavou-se com solução de bloqueio, 2 vezes por 5 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, incubou-se as lamínulas fixadas com promastigotas + amostras com os conjugados CdTe/AMS-Anti-IgG Fab₂ [50 ng/mL] e CdTe/AMS-Anti-IgG completa [100 ng/mL]. Deixou-se em incubação a 37°C por 45 minutos. Lavou-se com PBS 100mM, por 2 vezes durante 5 minutos. Verteu-se a lamínula em uma gota de meio de montagem próprio para fluorescência (Prolong. Gold). Levou-se as lamínulas para análise por Microscopia Confocal (equipamento *Leica SP1I-AOBS*), na qual empregou-se excitação em 488

nm e emissão em 595 nm. Empregou-se os mesmos parâmetros na análise das amostras. De acordo com Oliveira (2011) e Rocha *et al.* (2002), considerou-se as amostras empregadas na reação IFI com título 1:20 não reagentes como negativas e as reagentes como positivas.

A Figura 17 apresenta esquema ilustrativo de interação entre o antígeno da forma promastigota com anticorpo da amostra de soro, seguida de interação por anticorpo secundário conjugado a PQ de CdTe como biosensor fluorescente, relacionado ao imunoensaios IFI e citometria de fluxo.

Figura 17. Esquema da Imunofluorescência indireta de promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* realizada com conjugado entre nanocristais fluorescentes de Telureto de cádmio preparado com ácido mercaptosuccínico (CdTe/AMS) e anticorpos secundários, antiimunoglobulinas G (Anti-IgG).



4.4.3 Citometria de fluxo

Realizou-se ensaio de citometria de fluxo adaptado de Oliveira (2011) e Rocha *et al.* (2002), visando pesquisar anticorpos anti-formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*. Inicialmente, incubou-se overnight a 4°C 50 µL por poço das diluições 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048, 1:4096 e 1:8192 de amostras de soro positivas e negativas para LTA em placas de 96 poços, fundo em “U” (FALCON). Em seguida, adicionou-se aos poços a suspensão de parasitas (5×10^6 / poço) e deixou-se a 37°C, durante 30 minutos na presença das diferentes diluições das amostras empregadas. Posteriormente, lavou-se duas vezes com 150 µL de PBS-10% Soro Fetal Bovino (SFB) por meio de centrifugação a 2000 rpm por

7 minutos, a temperatura ambiente. Após, a placa foi colocada em vortex por 2 min e incubou-se a Anti-IgG humana conjugada aos nanocristais fluorescentes de CdTe em PBS com os parasitas, ressuspendendo as amostras em cada poço. A representação geral da interação antígeno-anticorpo deste imunoenensaio encontra-se na Figura 17. Depois, fixou-se os parasitas com paraformaldeído 1% por 30 minutos a temperatura ambiente antes de serem analisados no citômetro de fluxo (FACScalibur – Becton Dickinson). As leituras das amostras foram realizadas num período máximo de 4 horas após a fixação dos parasitos. Realizou-se a identificação por meio do software “Cell Quest Pro” interligado ao equipamento. Selecionou-se a população celular de interesse e ajustou-se os parâmetros de tamanho e granulosidade na escala Log, de modo a identificar o parasito em gráficos do tipo FSC (tamanho) x SSC (granulosidade). Analisou-se a população selecionada e obteve-se informações quanto ao tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência relativa a partir de 20.000 parasitas para cada amostra individual. Empregou-se na análise o detector de FL-2 que capta luz de comprimento de onda \cong 570 nm, correspondente à fluorescência laranja. Os resultados foram expressos sob a forma de percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP) observados para cada amostra individual em relação ao controle do conjugado (CC). Empregou-se como ponte de corte %PPFP > 20% para considerar o ensaio positivo, baseando-se em Oliveira (2011), Carvalho Neta (2006) e Martins-Filho (1995).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Considerações sobre a preparação coloidal de PQ de CdTe/AMS

Prepararam-se os PQ de CdTe em suspensões coloidais aquosas estabilizados com AMS baseando-se em metodologias de obtenção em meio aquoso descritas na literatura (ZHU, 2013; YU, 2013; YING, 2008; WANG, 2008). Dos vários estabilizantes observados na literatura (por exemplo, ácido mercaptoacético, ácido mercaptopropiônico, a cisteína) o ácido mercaptosuccínico apresenta em sua estrutura dois grupamentos carboxílicos com valores distintos de pK_{COOH} ($pK_{COOH1} = 3,30$ e $pK_{COOH2} = 4,94$) que confere maior carga superficial aos PQ de CdTe/AMS e maior quantidade de grupamentos carboxílicos superficiais disponíveis para a posterior bioconjugação através da formação de ligações covalentes com as aminas protéicas em reações de acoplamento via EDC/Sulfo-NHS. A desprotonação dos grupamentos sulfidrilas (SH) do estabilizante realizada na preparação dos PQ ocorre pelo ajuste do pH para 10,5. Este valor encontra-se acima do pK_a do grupamento -SH ($pK_a = 10,94$), proporcionando no meio reacional maior quantidade do agente estabilizante sob a forma ionizada (BRASIL JR.,2014). Ainda outra vantagem, o AMS pode ser utilizado em procedimentos experimentais em meios alcalinos ou levemente ácidos na faixa de pH de 5,0 a 8,0 sem sofrer alterações significativas na estabilidade e fluorescência, proporcionando robustez ao material. Isto se deve a forte interação das sulfidrilas com os íons Cd^{2+} presentes na superfície do PQ, pela carga superficial e pelo efeito estérico da cadeia carbônica. Desta forma, este estabilizante favorece o emprego dos PQ de CdTe/AMS em reações de bioconjugação via EDC e Sulfo-NHS na faixa de pH preferencial de 5,0-6,0 na etapa de ativação do material para o acoplamento (ZHU, 2013; YING, 2008; HERMANSON, 2008).

Todas as reações foram realizadas em meio inerte para a retirada do oxigênio molecular (O_2) dissolvido no meio (Figura 18). Especial cuidado deve-se ter para evitar que o Telúrio, altamente propenso a reagir com o oxigênio presente no meio, oxide formando seu respectivo óxido, ou ainda, que íon Te^{2-} retorne a seu estado elementar (GAPONIK, 2002).

A formação dos nanocristais resulta da rápida formação de monômeros de CdTe complexados aos ânions do ácido mercaptosuccínico e solvatados pela água,

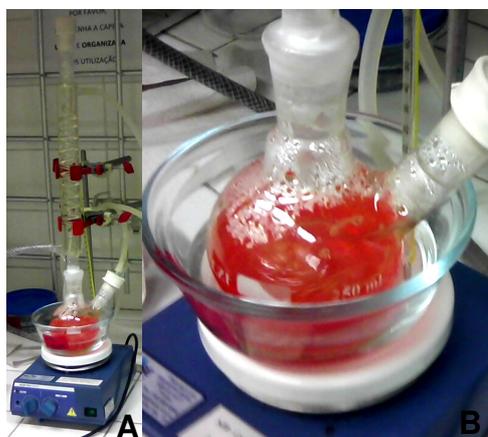
etapa denominada nucleação. Em seguida, a reação subsequente dos monômeros promove um lento crescimento dos PQ (DATGEPE, 2007) até a exaustão dos precursores presentes.

O sistema coloidal apresenta coloração vermelho-alaranjado com maior ou menor intensidade, como demonstrado na Figura 18.

As suspensões preparadas apresentaram-se estáveis por um período superior a um ano de sua obtenção quando mantidas entre 4-10°C e na ausência de luz direta. A estabilidade foi evidenciada observando-se os seguintes aspectos físico-químicos:

- (1) ausência de alteração de coloração;
- (2) ausência de separação de fase e
- (3) manutenção da fluorescência característica do sistema.

Figura 18. Fotografia da montagem reacional utilizada na obtenção de pontos quânticos de CdTe realizado em atmosfera inerte e sob refluxo e atmosfera inerte (N₂) (A); formando suspensão de nanocristais com coloração vermelho-castanho (B).



5.2 Caracterização Estrutural dos PQ de CdTe/AMS

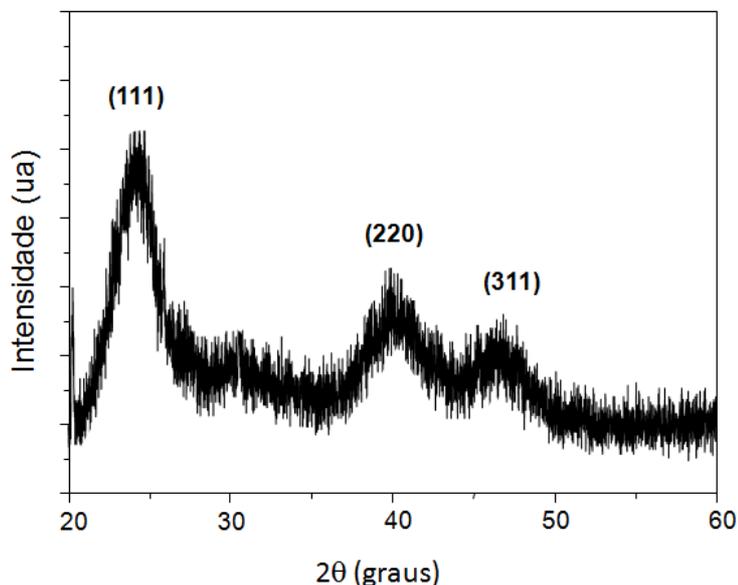
O potencial zeta (ξ) obtido para os PQ de CdTe/AMS em pH 7,2 foi de $\xi = -27$ mV. Esta carga negativa é esperada e está relacionado às cargas negativas presentes na superfície dos PQ devido aos grupamentos carboxílicos desprotonados do ácido mercaptosuccínico. Quanto maior a carga de superfície, maior em módulo será o valor do potencial zeta e menor será a frequência de interações entre os PQ, o que contribui para a estabilidade por retardar o processo de amadurecimento de Ostwald (PONS, 2006) que pode levar à desestabilização do sistema coloidal. Em

relação a caracterização estrutural dos PQ de CdTe/AMS, um difratograma representativo de raios-X de pó característico da referida amostra é mostrado na Figura 19.

A análise do padrão de difração de Raios-X dos PQ (Figura 19) na forma de pó mostrou uma baixa detecção de planos cristalinos, (ZHU, 2013; WANG, 2012) observou-se picos alargados, característicos de materiais de dimensões nanométricas demonstrando um reduzido fenômeno de difração coerente.

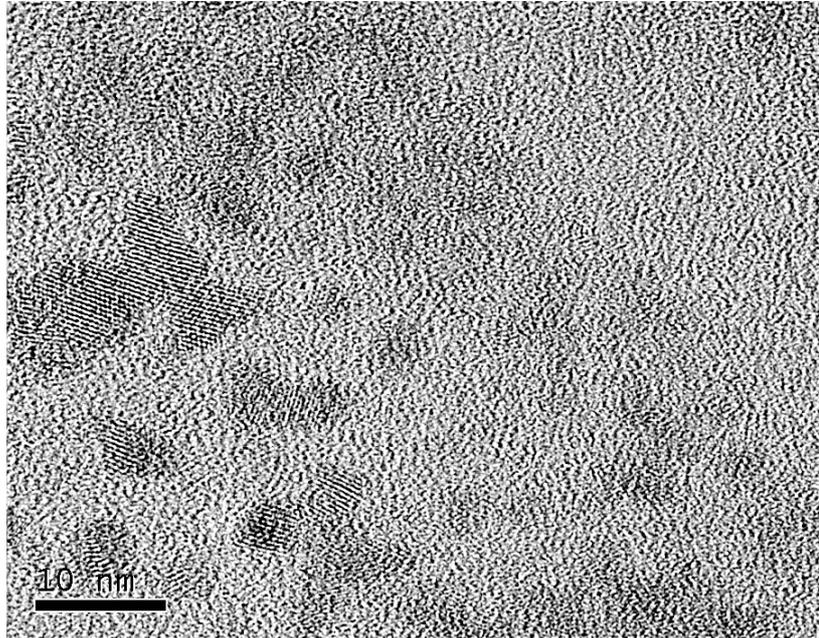
Confirmou-se por meio de comparação com dados da biblioteca cristalográfica JCPDS (Nº 65-1046) que os picos de difração $2\theta = 24,5^\circ$; $40,5^\circ$ e $47,2^\circ$ do material analisado podem ser atribuídos aos planos (111), (220) e (311), respectivamente, correspondentes ao sistema cúbico blenda de zinco do CdTe *bulk*. Utilizando-se a Eq de Scherrer (Seção 4.3) estimou-se o diâmetro médio (d) dos PQ de CdTe/AMS em aproximadamente $d = 3$ nm.

Figura 19. Difratograma de Raios-X de pó da amostra de nanocristais fluorescentes de CdTe preparado com o agente estabilizante ácido mercaptosuccínico.



Uma micrografia representativa dos PQ de CdTe/AMS é exibida na Figura 20. Observou-se regiões mais elétrons densas representativas dos pequenos aglomerados de nanocristais fluorescentes de CdTe/AMS, apresentando dimensões e formatos variáveis, alguns com tamanho próximo a 3 nm, corroborando a estimativa de tamanho obtida pela análise de DRX. Além disso, os planos atômicos podem ser visualizados na imagem, indicando a estrutura cristalina do material analisado.

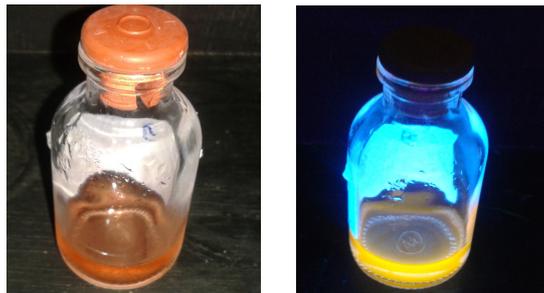
Figura 20. Microscopia eletrônica de transmissão representativa de nanocristais de CdTe preparados com o agente estabilizante ácido mercaptosuccínico. Barra = 10 nm



5.3 Caracterização Óptica dos nanocristais fluorescentes de CdTe/AMS e dos bioconjugados CdTe-Anti-IgG

A Figura 21 apresenta a suspensão de PQ de CdTe/AMS, sob luz direta (A) e sob a incidência de luz ultravioleta ($\lambda = 365$ nm) (B). Os espectros de absorção e emissão eletrônica destes sistemas estão apresentados na Figura 22.

Figura 21. Imagem representativa da suspensão de CdTe/AMS sob luz direta (A) e sob excitação por lâmpada UV ($\lambda = 365$ nm) apresentando fluorescência amarelo-laranja (B).



O tamanho e a concentração dos PQ de CdTe/AMS obtidos foram estimados através da espectroscopia de absorção UV-vis.

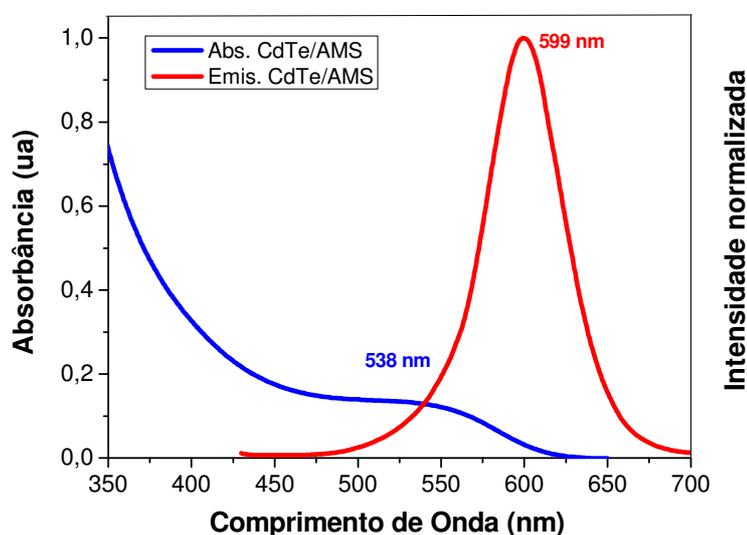
Estimou-se o tamanho dos PQ das amostras das suspensões por meio da equação apresentada por Datgepe (2007) (Seção 4.3) como sendo em torno de $d = 2,95$ nm, corroborando a estimativa através da difratometria de Raios-X. Em seguida, a concentração das suspensões de PQ de CdTe com AMS foi calculada por meio da lei de Lambert-Beer aplicada às suspensões de nanocristais de CdTe (YU, 2003). O valor experimental do trabalho de Yu *et al* (2003) foi ajustado em uma

função empírica do tamanho dos nanocristais de CdTe expresso através do cálculo da absorvidade molar do sistema (ϵ), permitindo a obtenção do valor $\epsilon = 1,1 \times 10^5$ L.mol⁻¹.cm⁻¹. A partir deste, calculou-se a estimativa da concentração da suspensão de CdTe/AMS que foi em torno de $1,5 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹, considerando a absorção de $A = 0,138$ em $\lambda = 538$ nm do primeiro máximo de absorção no espectro obtido. Assim, o número de partículas de nanocristais (N_c) estimado foi de $N_c = 9 \times 10^{14}$ PQ.mL⁻¹.

Em estudos realizados (YU, 2003), não foi detectada a influencia de métodos sintéticos, ligantes de superfície ou solventes nos valores de ϵ dos PQ. De modo que, nanocristais com o mesmo tamanho e composição inorgânica, sintetizados por diferentes métodos parecem indistinguíveis experimentalmente.

A Figura 22 mostra o espectro de emissão eletrônica ($\lambda = 365$ nm) da suspensão coloidal de CdTe/AMS, na qual destaca-se o comprimento de onda máximo de emissão em $\lambda = 599$ nm, na região do laranja na região do visível do espectro eletromagnético. Obteve-se uma largura de banda à meia altura (*Full Width at Half Maximum* – FWHM) para emissão da suspensão de CdTe/AMS em torno de FWHM = 55 nm. Segundo Ying (2008), nanocristais fluorescentes de semicondutores II-VI com baixa concentração de defeitos superficiais apresentam FWHM na faixa de 30 a 50 nm. Assim, sugere-se que os PQ obtidos apresentam uma quantidade de defeitos superficiais próximo ao intervalo aceitável, de modo a não comprometer a seu perfil de fluorescência.

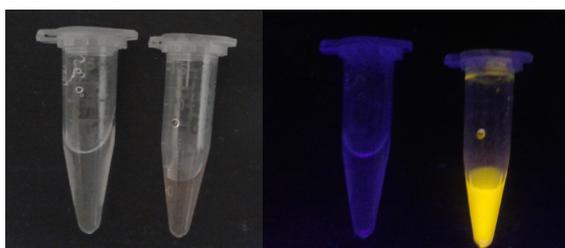
Figura 22. Espectros de absorção e emissão representativos da suspensão de pontos quânticos de CdTe/AMS obtidos ($\lambda_{exc} = 365$ nm).



A Figura 23 é uma fotografia representativa de sistemas contendo uma suspensão do anticorpo secundário empregado e do bioconjugado Anti-IgG-CdTe obtido observado sob luz direta e sob excitação UV ($\lambda = 365$ nm). Os conjugados permaneceram límpidos e fluorescentes, durante todo o tempo de sua obtenção e utilização, avaliados por período de 50 dias, sendo empregados nos ensaios imunodiagnósticos para detecção de leishmaniose. O processo de conjugação utilizado proporcionou a manutenção da atividade da proteína e a fluorescência e estabilidade dos PQ de CdTe/AMS, conforme resultados descritos neste capítulo.

Os espectros de absorção e emissão do bioconjugado obtido Anti-IgG-CdTe encontram-se exibidos na Figura 24. Realizou-se a análise comparativa dos espectros de absorção e emissão eletrônica ($\lambda_{exc} = 365$ nm) da suspensão coloidal de CdTe/AMS e do conjugado Anti-IgG-CdTe. Observando-se o perfil de fluorescência constatou-se que o material nanométrico não sofreu alteração significativa no processo de conjugação, mantendo as propriedades ópticas. Tendo em vista a manutenção dos FWHM, comprimento de onda e consequentemente do tipo de fluorescência emitida.

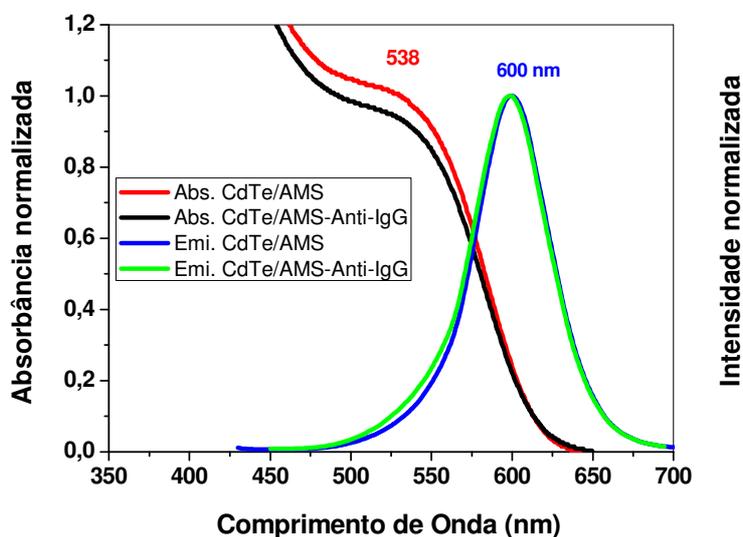
Figura 23. Imagem representativa da antiimunoglobulina G isolada (à esquerda) e do conjugado Anti-IgG-CdTe (à direita) sem excitação (A) e as mesmas amostras quando excitadas ($\lambda = 365$ nm) por lâmpada UV (B) com o bioconjugado apresentando fluorescência no laranja.



No processo realizado de conjugação, ultrafiltrou-se as suspensões de PQ a serem utilizados para minimizar os resíduos da síntese, bem como após sua ativação via EDC e Sulfo-NHS, visando remover as moléculas dos agentes de acoplamento empregados na reação. Estas em contato com a anti-imunoglobulinas G poderiam ativar seus grupos carboxílicos, ocasionando a polimerização da referida proteína (BRASIL JR., 2014; HERMANSON, 2008). Empregou-se o reagente TRIS que possui uma amina primária em sua estrutura na etapa de bloqueio na reação de conjugação final para reagir com os PQ ativados livres, isto é, aqueles que não formaram ligação amida com o anticorpo. Estes poderiam ligar-se

indesejadamente a outras proteínas, tais como as empregadas em bloqueios de imunoenaios, ocasionando interações inespecíficas e resultados alterados.

Figura 24. Espectros de absorção e emissão comparativos das amostras da suspensão de pontos quânticos de CdTe/AMS e do conjugado CdTe/AMS-Anti-IgG ($\lambda_{exc} = 365 \text{ nm}$).



O potencial zeta dos bioconjugados foi observado como sendo $\xi = -22,5 \text{ mV}$, apresentando uma discreta diminuição com relação ao valor dos PQ ($\xi = -27 \text{ mV}$). Este valor continua satisfatório para a manutenção da estabilidade dos sistemas. A pequena redução decorre provavelmente da diminuição dos grupamentos carboxilatos na superfície das partículas após a reação de conjugação com a proteína.

5.4. Avaliação dos bioconjugados obtidos como insumo em imunodiagnósticos para LTA

Analisou-se os conjugados preparados e sua atividade característica após o processo reacional, por meio da intensidade de fluorescência das amostras, empregando-se o método proposto no artigo (CARVALHO *et al*, 2014) em anexo, obtendo-se os resultados apresentados na Tabela 1.

Após diversos testes realizados, ajustou-se os procedimentos até a obtenção do protocolo final descrito. Na detecção da fluorescência nas amostras analisadas, o filtro de emissão F595 apresentou o melhor resultado para os nanocristais empregados de CdTe/AMS fluorescentes no laranja.

Tabela 1. Resultado das leituras realizadas nos ensaios de detecção semi-quantitativa de fluorescência em microplacas obtidos para os conjugados CdTe/AMS-Anti-IgG e controles.

Amostras		Média da intensidade (cps) ± erro padrão da média	Média dos controles (cps) ± erro padrão da média	FL _{rel} (%)
Controles	Poço vazio	218 ± 35	267 ± 31	-
	CdTe/AMS	183 ± 11		
	Anti-IgG	195 ± 6		
	IgG	302 ± 22		
	CdTe/AMS-Anti-IgG	325 ± 56		
	BSA 4% + CdTe/AMS-Anti-IgG	380 ± 18		
IgG + CdTe/AMS-Anti-IgG		1226 ± 76	-	359

Ainda, constatou-se que a quantidade de lavagens após a última etapa de incubação com o conjugado influenciou na detecção da fluorescência obtida, na qual observou-se em geral uma diminuição da intensidade de fluorescência a cada lavagem.

O procedimento adotado proporcionou bioconjugados com um aumento de 359% na emissão (Tabela 1), considerando a média da intensidade de fluorescência dos controles empregados de 267 cps, por meio do cálculo da fluorescência relativa (FL_{rel}) pela equação 5 (Seção 4.3).

O resultado obtido foi indicativo tanto da obtenção do conjugado quanto da manutenção da atividade biológica do anticorpo secundário e da fluorescência do ponto quântico.

Desta forma, o método empregado conseguiu detectar satisfatoriamente a interação do conjugado com a IgG aderida à superfície dos poços da microplaca. Isto permitiu a aplicação e avaliação do conjugado obtido como marcador em ensaios diagnósticos descritos a seguir.

5.4.1 Ensaio imunofluorescente indireto baseado em pontos quânticos (PQ-FLISA)

Analisou-se os conjugados preparados e sua atividade característica após o processo reacional, por meio da intensidade de fluorescência das amostras, empregando-se o método proposto no artigo (CARVALHO *et al*, 2014) em apêndice, conforme seção 4.4.1, obtendo-se os resultados apresentados na Tabela 2.

Em relação ao controle branco, a amostra positiva exibiu em média um aumento de 7,5 vezes, enquanto que a negativa apresentou um aumento em torno de 1,5 vezes. Ainda, a razão (R_{CP/CN}) entre as intensidades de fluorescência (cps) detectadas para as amostras controles positivas (CP) e negativas (CN) foi de 4,5.

Tabela 2. Resultado do ensaio imunofluorescente baseado em pontos quânticos indireto para Leishmaniose Tegumentar Americana.

Amostras	Média da intensidade (cps) ± erro padrão da média	Média das amostras (cps) ± erro padrão da média	FL _{rel} (%)
Branco	1533 ± 277	-	-
Negativa 1	1121 ± 135	2550 ± 1429	66
Negativa 2	3979 ± 77		
Positiva 1	10565 ± 3931	11488 ± 923	649
Positiva 2	12410 ± 4504		

Branco = antígeno solúvel *L. (v.) braziliensis* + diluente + CdTe/AMS-Anti-IgG

Negativa = antígeno solúvel *L. (v.) braziliensis* + soro negativo + CdTe/AMS-Anti-IgG

Positiva = antígeno solúvel *L. (v.) braziliensis* + soro positivo + CdTe/AMS-Anti-IgG

FL_{rel}(%) = Percentagem de fluorescência relativa

As amostras positivas e negativas apresentaram FL_{rel} de 649% e 66% (Tabela 2), respectivamente, em relação ao controle branco. Todavia, as positivas apresentaram uma fluorescência relativa diferencial de 583% quando comparada as negativas, sendo este um aumento significativo para a análise de amostras reagentes e não reagentes.

Empregando-se a equação 6 (seção 4.4.1), o limiar de reatividade ou ponto de corte calculado para o ensaio sorológico FLISA-PQ para LTA realizado foi de 6592 cps de intensidade de fluorescência. Constatou-se que os valores obtidos nos testes para as amostras negativas e positivas atenderam ao valor de referência (*cut-off*) estabelecido, demonstrando nesses testes preliminares uma capacidade de discriminar entre indivíduos infectados e não infectados.

Apesar da amostra negativa ter proporcionado detecção de considerável intensidade de fluorescência, devido a interações inespecíficas. Este fato pode estar relacionado a necessidade de purificar o conjugado por meio de outras técnicas que contribuía para a obtenção de um melhor rendimento da atividade do marcador como insumo em imunoenaios.

Os valores observados para a FL_{rel}(%) do bioconjugado CdTe/AMS-anti-IgG para as amostras positivas corrobora com a maior afinidade esperada da IgG anti-formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* com o antígeno solúvel da referida espécie aderida à superfície dos poços da microplaca. Desse modo, os conjugados empregados conseguiram detectar e diferenciar a referida imunoglobulina.

Sugere-se que o erro da média elevado entre as leituras pode ser devido a interferências pré-analíticas não fisiológicas como transporte, armazenamento e manipulação das amostras, bem como por interferências analíticas como pipetagem inexata das amostras controle e padrões com pipetas automáticas não calibradas, agitação ou lavagem imprópria das amostras, equipamentos desajustados ou com

defeitos, alterações de temperatura e/ou tempo nas fases dos processos analíticos, dentre outros (MOTTA, 2009). Dessa forma, constatou-se a necessidade da otimização dos ensaios em relação a parâmetros, tais como concentração de antígeno, titulação do anticorpo primário, diluição do conjugado, dentre outras condições para a realização dos imunoenaios.

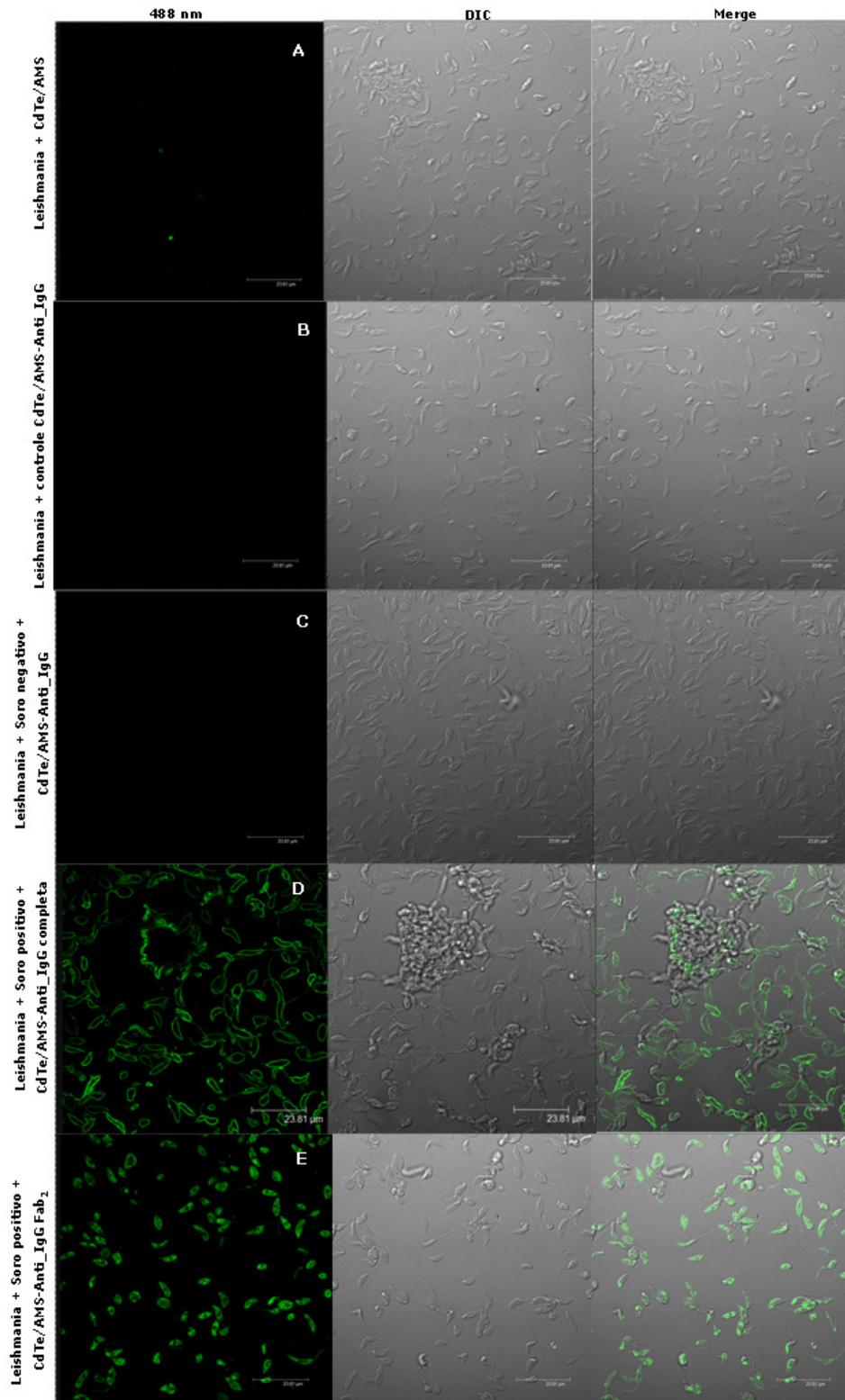
5.4.2 Imunofluorescência indireta (IFI)

Uma vantagem da técnica empregada comparada a imunofluorescência é a alta sensibilidade e maior amplificação do sinal devido a maior quantidade de anticorpos secundários que podem ligar-se ao primário. Ainda, seu relativo baixo custo de obtenção frente geralmente ao maior gasto e dificuldade na obtenção de conjugados marcados diretos a anticorpos primários específicos, quando estes estão indisponíveis comercialmente (KUMAR *et. al.*, 2009).

Por meio das imagens de microscopia confocal apresentadas na Figura 25, observou-se que o protocolo empregado na IFI promoveu a marcação das promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*. Não se observou fluorescência nas imagens dos controles dos parasitos, indicando que não houve autofluorescência. Observou-se a detecção de fluorescência nas imagens das amostras dos parasitas com soro positivo e bioconjugado. Entretanto, estas amostras apresentaram um padrão de marcação diferente. O bioconjugado preparado com o fragmento Fab₂ do Ac (Figura 25 E) marcaram todo o citoplasma do parasita, não sendo visualizada marcação de núcleo. No entanto, o conjugado obtido com a Anti-IgG completa (Figura 25 D) promoveu uma marcação específica da membrana plasmática e flagelo, apresentado pouca fluorescência interna no citoplasma da célula. Ainda, pode-se observar uma maior intensidade de marcação na membrana plasmática quando comparado com a marcação da membrana no flagelo (Figura 26).

Constatou-se para amostra na qual empregou-se o conjugado CdTe/AMS-Anti-IgG Fab₂ uma emissão de fluorescência na região do azul cuja intensidade depende da amplitude da janela de detecção da emissão, exibida na Figura 27, além da emissão no verde mostrada na Figura 25 E, atreladas as excitações empregadas.

Figura 25. Imunofluorescência indireta de promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* marcadas com conjugados CdTe/AMS-Anti-IgG completa (D) e fragmento Fab₂ (E₁ e E₂) em microscopia confocal, comparadas as amostras controles de leishmania com CdTe/AMS (A), do conjugado (B) e da não reagente, negativa (C). Excitação em 488 nm.



Imunoensaios podem sofrer interferências por diversos fatores ou substâncias que modifiquem a concentração do analito a ser determinado ou que alterem a ligação do anticorpo. Geralmente, ensaios que fazem uso de agentes de bloqueios neutralizam ou inibem o interferente, exibindo baixa prevalência de interferências. Entretanto, em imunoensaios novos e não testados é frequente a obtenção de interações inespecíficas elevadas (TATE e WARD, 2004). Nesse sentido, realizou-se etapas de bloqueio no procedimento, visando evitar ou minimizar a reatividade cruzada.

O processo de fixação realizado impediu a ocorrência do mecanismo de endocitose do marcador pelo parasita leishmania (GOMES, 2011; KITAKURA, 2011). Todavia, a utilização de componentes químicos para fixar as células objetivando estabilizar lipídeos e proteínas pode ocasionar a formação de poros e consequentemente a entrada do marcador, processo dependente do tamanho (JIANG, 2009; CHITHRANI, 2007; MEDINTZ, 2005).

Figura 26. (A) imunofluorescência indireta de promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* marcadas com conjugados CdTe/AMS-Anti-IgG completa e (B) imagem do contraste interferente diferencial (DIC - differential interference contrast). Excitação em 488 nm.

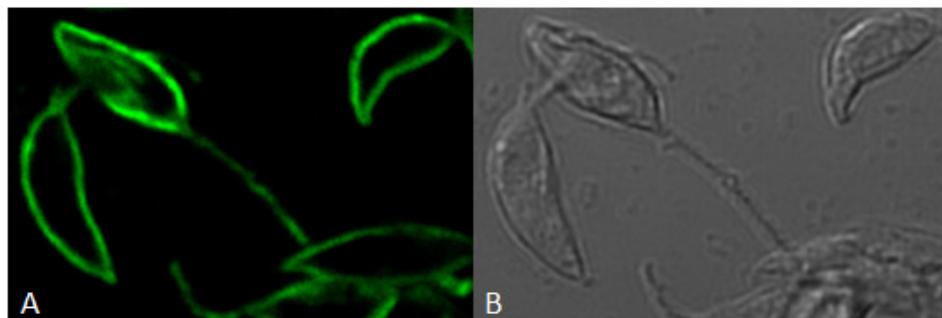
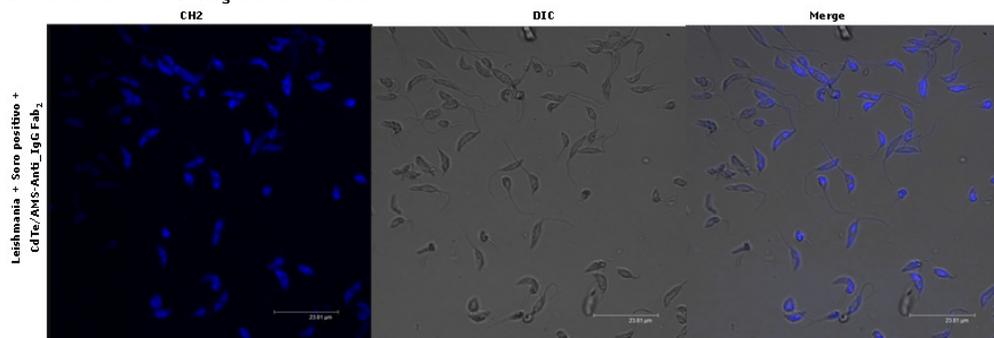


Figura 27. Imunofluorescência indireta de promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* marcada com o conjugado CdTe/AMS-Anti-IgG Fab₂ em microscopia confocal, apresentando emissão no azul. Excitação em 390 nm.



A emissão de fluorescência dependente do tempo de incubação foi relatada por Santos *et al.* (2006) em marcação de células promastigotas de *Leishmania amazonensis in vitro* empregando nanopartículas de CdS/Cd(OH)₂ funcionalizadas com ânions polifosfato e/ou moléculas de glutaraldeído que permitiu distinguir organelas e estruturas. Todavia, em ambos os casos o processo ainda não é totalmente compreendido, fazendo-se necessário investigações futuras para esclarecê-lo.

No estudo de Oliveira (2011), o ponto de corte do título 1:20 empregado para o IFI demonstrou sensibilidade de 78% e especificidade de 85%. Contudo, o procedimento adotado difere do realizado no presente trabalho, em especial em relação as etapas de bloqueio visando aumentar a especificidade, passos não mencionados no protocolo do primeiro, bem como em relação ao equipamento empregado para análise que foi em microscópio de fluorescência. A microscopia confocal usada proporcionou vantagens, tais como melhor contraste e resolução que a microscopia de luz convencional, imagens multidimensionais e seccionamento óptico.

As amostras na diluição 1:20 que apresentaram fluorescência na membrana dos parasitas mais intensa que o *background* observado na amostra não reagente (negativa) foram consideradas positivas, conforme metodologia estabelecida no laboratório de soropidemiologia e imunologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e adotado por Oliveira (2011). Contudo, outros trabalhos consideraram positivos títulos ≥ 40 (FERREIRA, 2006; SILVEIRA, 1999).

A autofluorescência das células não foi detectada nas imagens pela microscopia confocal (imagens não mostradas). Ainda, nas amostras não reagentes (controle do conjugado e soro negativo para LTA) foi observado pela análise no confocal pequena fluorescência indicativa de marcação diretamente no microscópio, cuja luz emitida ou refletida não foi significativa para ser detectada, transformada em sinais elétricos pela fotomultiplicadora e visualizada nas imagens mostradas no monitor do computador, ao se comparar com a fluorescência apresentada pelas amostras positivas, reagentes, conforme exibido pelas imagens da Figura 27.

A fixação com paraformaldeído tem sido aplicada em procedimentos de marcação para antígenos intracelulares em algumas técnicas (PEREIRA, 2007). Sugeriu-se que o processo de fixação pode ter levado a permeabilização da célula em maior ou menor extensão. Desse modo, o conjugado CdTe/AMS-Anti-IgG Fab₂

de menor dimensão e peso molecular pode ter tido facilidade muito maior para entrar e marcar o citoplasma na promastigota, mas incapaz de passar através dos poros da membrana nuclear, levando a não marcação nuclear, comparado ao conjugado CdTe/AMS-Anti-IgG completa (Fab₂ + Fc), cuja marcação foi mais concentrada a nível de membrana.

Outra hipótese para justificar a diferença observado na marcação entre os diferentes conjugados está relacionada ao processo de sua obtenção. No caso de ocorrer um bloqueio insuficiente deixando PQ ativados livres ou o emprego de menor concentração do anticorpo secundário na reação levando a uma maior formação de CdTe/AMS-TRIS, em ambos os casos não foram removidos da amostra conjugada pelo protocolo realizado.

A técnica de IFI em microscopia confocal demonstrou ser uma ferramenta importante na determinação e visualização da distribuição de antígenos, combinando alta sensibilidade e resolução no estudo das células (KUMAR *et. al.*, 2009).

5.4.3 Citometria de fluxo

O teste realizado sem paraformaldeído apresentou melhor resultado comparado ao ensaio com PFA (dados não mostrados). Este apresentou maior autofluorescência no controle de leishania, bem como não foi possível identificar uma região de reatividade diferencial entre amostras reagentes e não reagentes.

Os dados obtidos para os controles e amostras analisadas no experimento sem paraformaldeído foram expressos sob a forma de percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP), através do histograma da figura 28.

Os valores de PPFP para os controles e amostras obtidos nas experimentações sem paraformaldeído estão exibidos na Tabela 3.

Observou-se por meio da Figura 29 e Tabela 3 que o controle do conjugado (CC) apresentou considerável inespecificidade, bem como as amostras de soro negativa (C-), consistiram em interferências analíticas no ensaio por citometria de fluxo para análise da reatividade de anticorpos anti-formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*. Isto se deve ao fato que a média em torno de 25% de ligação inespecífica obtida para o controle interno da reação (CC) contrasta com o

limiar de reatividade de no máximo 2% estabelecido em trabalhos na literatura (OLIVEIRA, 2011; CARVALHO NETA, 2006).

Figura 28 Histograma representativo do percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP) submetidos a experimentação sem fixação em paraformaldeído obtidos para os controles (CLE = controle de leishmania e CC = controle do conjugado) e em diferentes diluições (D1 = 1:64 a D8 = 1:8192) para amostras de soro (+ = soro positivo e - = soro negativo).

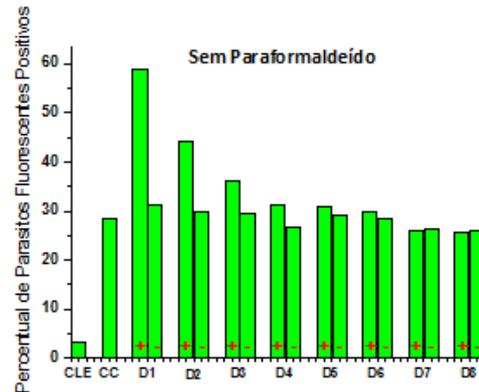


Tabela 3 Histograma estatístico – Percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP)

Amostras	Teste sem paraformaldeído	
CLe	3,2	
CC	28,6	
Soro	Positivo (+)	Negativo (-)
Titulação 1:64	59,03	31,10
Titulação 1:128	44,32	29,98
Titulação 1:256	36,27	29,58
Titulação 1:512	31,16	26,75
Titulação 1:1024	31,04	29,12
Titulação 1:2048	29,78	28,39
Titulação 1:4096	26,08	26,46
Titulação 1:8192	25,68	26,16

CLe = Controle de Leishmania; CC = Controle do Conjugado.

Sugere-se que a inespecificidade identificada no ensaio pode estar sendo ocasionada por alguns fatores, tais como pela não separação de possíveis PQ e Anti-IgG livres do conjugado por método de purificação adequado, bloqueio insuficiente do CdTe/AMS ativado (HERMANSON, 2008), além da não determinação da concentração ótima do conjugado CdTe-Anti-IgG a ser empregada no ensaio (TATE AND WARD, 2004).

Os testes individuais foram analisados em relação a inespecificidade do controle do conjugado e que para isso foi subtraído a % PFP referente ao CLE. Assim, avaliou-se as diferentes diluições dos soros em relação a reatividade apresenta nos ensaios com e sem PFA, conforme apresentado na Tabela 4.

A fixação com aldeídos pode resultar em aumento nos níveis de autofluorescência. No experimento observou-se um pequeno aumento. Segundo BACALLAO *et. al.* (2006), isto pode ser minimizado pela utilização de PBS com 0,1% de borohidreto de sódio na lavagem das células fixadas antes da incubação com o anticorpo.

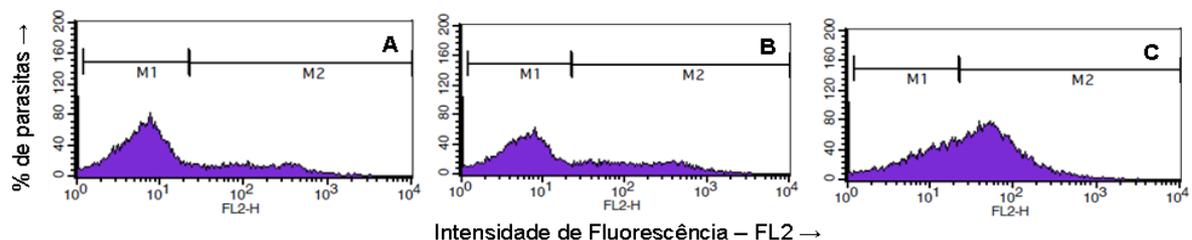
Tabela 4. Avaliação da reatividade dos ensaios em diferentes diluições das amostras

Ensaio	Teste sem paraformaldeído		
	Positivo (+)	Negativo (-)	Reatividade diferencial (+) - (-)
Amostras de soro			
Titulação 1:64	33,63	5,70	27,93
Titulação 1:128	18,92	4,58	14,34
Titulação 1:256	10,87	4,18	6,69
Titulação 1:512	4,41	1,35	3,06
Titulação 1:1024	5,64	3,72	1,92
Titulação 1:2048	1,39	2,99	-1,60
Titulação 1:4096	0,68	1,06	-0,38
Titulação 1:8192	0,28	0,76	-0,48

Em geral, verificou-se uma diminuição na reatividade diferencial e no %PPFP com o aumento da diluição do soro positivo.

Segundo Oliveira (2011), ao se considerar como ponto de corte PPFP > 20% para considerar positivo o ensaio, apenas a diluição D1 do experimento sem PFA atendeu ao referido parâmetro, segundo dados da Tabela 4 e histogramas da Figura 29. Os demais valores de PPFP ficaram restritos a uma região de baixa reatividade, isto é, negativos para o ensaio em citometria de fluxo, considerando os resultados obtidos para os CC.

Figura 29 Histogramas individuais representando o percentual de parasitos fluorescentes (PPFP) sem fixação em paraformaldeído obtidos com controle interno da reação (A), incubados com soro negativo (B) e positivo (C) na titulação 1:64.



Carvalho Neta *et al.* (2006), empregou citometria de fluxo para detecção de anticorpos antiformas promastigotas fixadas de *L. (L.) chagasi* no diagnóstico de leishmaniose visceral canina, no qual a região de reatividade diferencial foi na diluição 1:1028 do soro, distinguindo 96% de cães reativos como positivos e 100%

de cães não reagentes como negativos. No entanto, a diluição obtida por Oliveira (2011) capaz de distinguir pacientes com LTA antes e após tratamento foi de 1:256, através do emprego da citometria de fluxo por meio da pesquisa de anticorpos *L. (V.) braziliensis*.

O experimento realizado demonstrou que o conjugado foi capaz de marcar o parasita e ainda de conseguir identificar como região de reatividade diferencial a diluição 1:64 (diluição D1), tendo em vista que apresentou um aumento de 27,93% de PFP em relação ao teste com soro negativo e aos controles empregados. Nesse sentido, o conjugado apresentou potencial inicial para estudos posteriores visando a padronização para seu emprego como insumo na técnica de citometria em imunodiagnósticos.

Em todas as aplicações realizadas, conforme demonstrado no decorrer desta apresentação e discussão dos resultados, constatou-se a necessidade de realizar ensaios de otimização dos procedimentos para cada uma das técnicas empregadas.

6 - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Durante a realização deste trabalho, obtiveram-se as conclusões a seguir:

- O protocolo de síntese para nanopartículas de CdTe com o agente estabilizante ácido mercaptosuccínico empregado proporcionaram a obtenção de nanopartículas fluorescentes no laranja. Após um ano de sua obtenção, as amostras apresentavam-se estáveis em meio coloidal, límpidas e fluorescentes, indicativo de boa estabilidade do nanomarcador.
- O protocolo de conjugação de CdTe/AMS com Anti-IgG via EDC/Sulfo-NHS e a avaliação dos bioconjugados por meio da análise de detecção de intensidade de fluorescência proposto (CARVALHO *et al.*, 2014) proporcionaram resultados que confirmaram a obtenção dos conjugados.
- Os experimentos realizados por meio das técnicas de citometria de fluxo, IFI e PQ-FLISA em imunodiagnóstico para LTA demonstraram a capacidade dos conjugados obtidos de CdTe/AMS-Anti-IgG em se ligar a imunoglobulinas G, fornecendo resposta diferencial entre controles e amostras analisadas.
- Os resultados preliminares do emprego dos conjugados CdTe/AMS-Anti-IgG forneceram informações importantes sobre parâmetros iniciais dos conjugados em aplicações na área de diagnóstico sorológico contribuindo para estudos futuros.
- O emprego do bioconjugado demonstrou viabilidade na pesquisa de IgG anti-*Leishmania* nos ensaios sorológicos realizados PQ-FLISA,IFI e citometria de fluxo.

O trabalho desenvolvido tem como perspectivas:

- Purificar os bioconjugados, caracterizando-os, visando evitar e/ou minimizar inespecificidade nas análises, bem como obter imunocomplexos baseados em ligantes bioespecíficos.

- Realizar estudos para otimizar os parâmetros envolvidos no processo da conjugação e dos ensaios em imunodiagnóstico utilizados.
- Empregar o conjugado entre ponto quântico e anticorpo secundário obtido como um potencial insumo em diferentes sistemas e aplicações biológicas, atuando como marcadores fluorescentes específicos.
- Desenvolver novos protocolos de conjugação de PQ de CdTe como imunomarcadores a anticorpos antiimunoglobulina, empregando outros agentes de acoplamento.
- Obter colaborações para o fornecimento de células, antígenos e anticorpos específicos, visando dar continuidade e aprofundamento ao trabalho de pesquisa voltado ao diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar Americana.
- Desenvolver metodologia inovadora eficiente como alternativa em imunodiagnóstico empregando pontos quânticos.

REFERÊNCIAS

- ALIVISATOS, P. The use of nanocrystals in biological detection. *Nature Biotechnology*, **22**, 47 – 52, 2004.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Inter. J. Parasitol.*, **30**(12-13) 1269-1281, 2000.
- BACALLAO R, et al. Guiding principles of specimen preservation for confocal microscopy. In: Handbook of Biological Confocal Microscopy, 3rd ed. (J.B. Pawley. Ed), Plenum Press. New York. 2006. pp. 368-80.
- BALLOU, B.; LAGERHOLM, B. C.; ERNST, L. A. ; BRUCHEZ, M. P. and WAGGONER, A. S. Noninvasive Imaging of Quantum Dots in Mice. *Bioconjugate Chem.* **15**, 79-86, 2004.
- BAO, H., WANG, E., AND DONG, S. One-Pot Synthesis of CdTe Nanocrystals and Shape Control of Luminescent CdTe–Cystine Nanocomposites. *Small*, **2**(4), 476 – 480, 2006.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, 1976.
- BRASIL JR, A. G. Obtenção de bioconjugados anti-NS1 DENV com pontos quânticos fluorescentes como insumos para ensaios diagnósticos da dengue. 2014. f. *Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas*. Recife: Universidade Federal de Pernambuco - **UFPE**, 2014.
- BRASIL, A. G. Síntese e caracterização de nanopartículas de sulfeto de cádmio: aplicações biomédicas. 2006. 111 f. *Dissertação de Mestrado em Ciências de Materiais*. Recife: Universidade Federal de Pernambuco - **UFPE**, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 2. Ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
- BRITO, M. E. F. de *et al.* Clinical epidemiological profile of American tegumentary leishmaniasis at the Pinto Sugar Mill in Moreno Municipality, Greater Metropolitan Recife, Pernambuco State, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro **24**(10) 2445-2448, 2008.
- BRITO, M. E. F. Desenvolvimento de um método diagnóstico para a leishmaniose tegumentar americana com base em Western blot de frações antigênicas de *Leishmania braziliensis*. 1998. 93 f. *Dissertação de Mestrado em Anatomia Patológica*. Recife: Universidade Federal de Pernambuco - **UFPE**, 1998.
- BRITO, M. E. F. *et al.* *Trans. Royal Soc. Trop. Med and Hyg*, **95**, 203-206, 2001.

- BRUCHEZ, JR.; MORONNE, M.; GIN, P.; WEISS, S; ALIVISATOS, A. P. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science*, **281**, 2013-2016, 1998.
- BRUCHEZ, M. P.; HOTZ, C. Z. *Quantum Dots: Applications in Biology*. Humana Press Inc., 2007.
- BURNS, J.M. JR.; SHREFFLER, W.G.; BENSON, D.R.; GHALIB, H.W.; BADARO, R. & REED, S.G. - Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci*. **90**(2), 775-9, 1993.
- CABALLERO, Z.C.; SOUSA, O.E.; MARQUES, W.P.; SAEZ-ALQUEZAR, A. & UMEZAWA, E.S. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clin Vaccine Immunol*. **14**(8), 1045-9, 2007.
- CAMARGO, M. M. et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. *J. Immunol.*, **159**(12) 6131-6139, 1997.
- CARVALHO, K. H. G *et al.* Fluorescence Plate Reader for Quantum Dot-Protein Bioconjugation Analysis. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **14**(5), 3320-3327, 2014.
- CARVALHO, K. H. G. Bioconjugados de nanopartículas semicondutoras fluorescentes de CdTe/CdS com albumina sérica bovina: síntese e caracterização. Dissertação, Ciências Farmacêuticas, CCS-UFPE, 2010.
- CHAN, W. C. e NIE, S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*, **281**, 2016-2018, 1998.
- CHATTERJEE K, SARKAR S, JAGAJJANANI RAO K, PARIA S. Core/shell nanoparticles in biomedical applications. *Adv Colloid Interface Sci*. 2014 Jul;209:8-39. doi: 10.1016/j.cis.2013.12.008. Epub 2014 Jan 14.
- CHAVES, C. R. Síntese e caracterização de nanopartículas de sulfeto de cádmio: aplicações biomédicas. 2006. 111 f. *Dissertação de Mestrado em Ciências de Materiais*. Recife: Universidade Federal de Pernambuco - **UFPE**, 2006.
- 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, *App. Surf. Sci.*, **255**, 728-730, 2008.
- CHEN, Q. F., WANG, W. X., GE, Y. X., LI, M.Y., XU, S. K., ZHANG, X. J. Direct aqueous synthesis of cysteamine-stabilized CdTe quantum dots and its deoxyribonucleic acid bioconjugates. *Chin. J. Anal. Chem.*, **35**(1), 135 – 138, 2007.
- CHITHRANI, B.D.; CHAN, W.C.W. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett*. **2007**, **7**, 1542-1550.
- COSTA, C.H.; PEREIRA, H. F. & ARAÚJO, M. V. Visceral leishmaniasis epidemic in the State of Piauí, Brazil, 1980 – 1986. *Rev Saúde Pública*. **24**(5) 361-72, 1990.
- DAGTEPE, P., CHIKAN, V., JASINSKI, J., e LEPPERT, V. J. Quantized growth of CdTe quantum dots; Observation of Magic-sized CdTe quantum dots. *J. Phys. Chem. C*, **111**, 14977 – 14983,

2007.

DOURADO, Z. F. et al. Panorama Histórico do Diagnóstico Laboratorial da Leishmaniose Visceral até o Surgimento dos Testes Imunocromatográficos (rK39) **Revista de Patologia Tropical** 36(3), 205-214, 2007

DRBOHLAVOVA, J.; ADAM, V.; KIZEK, R.; HUBALEK, J. Quantum Dots - Characterization, Preparation and Usage in Biological Systems. *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 656-673, 2009.

FARAH, S. B: Segredos & Mistérios 2ª. Edição. Editora Sarvier, 2007.

FARIAS, P. M. A. et al. *Appl. Phys. A*, **89**, p. 957-961, 2007.

FERREIRA, M. P.; et al. Sensitivity of an immunoenzymatic test for the detection of anti-*L. braziliensis* antibodies compared to other test used for the diagnosis of american cutaneous leishmaniasis. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **48**(4), 215-217, 2006.

FONTES, A., DE LIRA, R. B., LOPES, M. A. B., DA SILVA, T. G., DE CASTRO NETO, A. G. E SANTOS, B. S. In "Quantum Dots in Biomedical Research" *InTech*, 2012.

FREIRE, C. C. DE M.; LOBO, L. T. C. XIMENES, M. DE F. F.de M. Uma abordagem bioinformática na avaliação da especificidade de antígenos utilizados em ensaios imunoenzimáticos para diagnóstico da leishmaniose visceral. *RBAC*, **41**(2) 139-142, 2009.

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

GOLDMAN ER¹, MEDINTZ IL, MATTOUSSI H. Luminescent quantum dots in immunoassays. **Anal Bioanal Chem.** 384(3) 560-3, 2006.

GOMES, S. A. O.; VIEIRA, C. S.; ALMEIDA D. B.; SANTOS-MALLET, J. R.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; CESAR, C. L. AND FEDER, D. CdTe and CdSe Quantum Dots Cytotoxicity: A Comparative Study on Microorganisms. *Sensors* **11**, 11664-11678, 2011

GOTO, Y.; COLER, R. N. & REED, S. G. Bioinformatic identification of tandem repeat antigens of the leishmania donovani complex. *Infection and Immunity.* **75**(2) 846-851, 2007.

GRIFFITHS, A. J. F., WESSLER, S. R., LEWONTIN, R. C., CARROLL, S. B. Introdução à Genética. 9a. edição – Guanabara Koogan, 2008.

HARBOE, M.; CHRISTENSEN, A.; AHMAD, S.; ULVUND, G.; HARKNESS, R.E.; MUSTAFA, A.S. & WIKER, H.G. - Cross-reaction between mammalian cell entry (Mce) proteins of Mycobacterium tuberculosis. *Scand J Immunol.* **56**(6) 580-7, 2002.

HE X, MA N. An overview of recent advances in quantum dots for biomedical applications. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2014 Dec 1;124:118-31. doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.06.002. Epub 2014 Jun 6.

HEPBURN, N. C. Cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Dermatol.*, **25**(5) 363-370, 2000.

HERMANSON, G. T. Bioconjugate techniques. 2nd ed. [S.I.] Elsevier, 215-223, 2008.

HERWALDT, B. L. "Leishmaniasis," *The Lancet*, **354**(9185), 1191–1199, 1999.

HIRAYAMA, K., AKASHI, S., FURUYA, M., AND FUKUHARA, K. I. Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and FRIT-FAB LC/MS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **173**, 639-646, 1990.

- JENSEN, A. T. R., GASIM, S., MOLLER, T. et al., "Serodiagnosis of *Leishmania donovani* infections: assessment of enzymelinked immunosorbent assays using recombinant *L. donovani* gene B protein (GBP) and a peptide sequence of *L. donovani* GBP," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **93**(2), 157–160, 1999.
- JIANG, D.; WANG, L.; JIANG, W. Quantitative detection of antibody based on single-molecule counting by total internal reflection fluorescence microscopy with quantum dot labeling. *Anal. Chim. Acta*, **634**, 83-88, 2009
- KAR, K. "Serodiagnosis of leishmaniasis," *Critical Reviews in Microbiology*, **21**(2) 123–152, 1995.
- KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.*, **17**(3), 279-289, 1999.
- KITAKURA, S.; VANNESTE, S.; ROBERT, S.; LÖFKE, C.; TEICHMANN, T.; TANAKA, H.; FRIML, J. Clathrin mediates endocytosis and polar distribution of PIN auxin transporters in Arabidopsis. *Plant Cell*, **23**, 1920-1931, 2011.
- KUBAR, J. E FRAGAKI, K.. "Recombinant DNA-derived *Leishmania* proteins: from the laboratory to the field," *The Lancet Infectious Diseases*, **5**(2) 107–114, 2005.
- KUMAR, G. L.; RUBDECK L. *Education Guide Immunohistochemical (IHC) Staining Methods*. 5th Edition. Dako North America, Carpinteria, California, 2009.
- LAISON, R.; SHAW, J. J. The Leishmaniasis in Biology and Medicine. In: London: Academic Press. Chap. *Evolution, classification and geographical distribution*, p. 1-120, 1987.
- LEWIS, D. H. Infection of tissue culture cells of low phagocytic by *Leishmania Mexicana mexicana*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **68**, 327-336, 1974.
- MAMEDOVA, N.N.; KOTOV, N.A. Albumin-CdTe Nanoparticle Bioconjugates: Preparation, Structure, and Interunit Energy Transfer with Antenna Effect. *Nano Letters*, **1**, 281-285, 2001.
- MARTINS-ILHO, O. A. et al. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in Human Chagas' disease. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **2**(5), 569-573, 1995.
- MARZOCHI, M. C. A. Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. *J. Bras. Med.* **63**, 82-104, 1992.
- MEDINTZ, I. L.; UYEDA, H. T.; GOLDMAN, E. R.; MATTOUSSI, H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing, *Nature Materials*, **4**, 435-446, 2005.
- MICHALET, X.; PINAUD, F. F. ; BENTOLIA, 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.
- MOLYNEUX, H. D.; KILLICKKENDRICK, R. The leishmaniasis in Biology and Medicine. In: London: Academic Press, cap. Morphology, ultrastructure and life cycles, p 551-582, 1987.
- MORAN M, GUZMAN J, ROPARS A-L, MCDONALD A, JAMESON N, OMUNE B, et al. (2009) Neglected Disease Research and Development: How Much Are We Really Spending? *PLoS Med* **6**(2): e1000030. doi:10.1371/journal.pmed.1000030
- MORENO, J., NIETO, J., MASINA, S., et al., "Immunization with H1,HASPB1 and MML

- Leishmania* proteins in a vaccine trial against experimental canine leishmaniasis,” *Vaccine*, **25**(29), 5290–5300, 2007.
- MORRINSON, M. A., ESTLE, T. L. e LANE, N. F. *Quantum States of Atoms, Molecules, and Solids*. Nova Jersey, Prentice-Hall, 1976.
- MURPHY C.J. Optical sensing with quantum dots. *Anal. Chem.* **74** 520–526, 2002.
- NAKAGE, A. P. M. Et al. Flow cytometry methodology and application in the veterinary hematology. *Ciência Rural*, **35**(4) 966-973, 2004
- NAKAJIMA, N.; IKADA, Y. Mechanism of amid formation by carbodiimides for bioconjugation in aqueous media. *Bioconjugate Chem.* **6**, 123 – 130, 1995.
- NIEMEYER, CM. Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: Biotechnology meets materials science. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **40**, 4128-4158, 2001.
- OLIVEIRA, A. P. Aplicação da citometria de fluxo no diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana. 2011. 97 f. *Dissertação de Mestrado em Inovação terapêutica*. Recife: Universidade Federal de Pernambuco - **UFPE**, 2011.
- ORTON J. The Story of Semiconductors. New York: Oxford University Press Inc., 2004.
- PEARSON, R. D. et al. Differential survival of *Leishmania donovani* amastigotes in human monocytes. *J. Immunol.*, **131**, 1994-1999, 1983.
- PEREIRA, I. de O.; SACRAMENTO, L. V. S. e MARQUES, M. J. LEISHMANIOSES: “ESTADO DA ARTE”. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações*, **9**(1) 220-238, 2011.
- PEREIRA, J.; BROCARD-LIMA, G. A.; BEITLER, B. e CHAMONE, D. A. F. Utilização de saponina em citometria de fluxo: uma alternativa factível para permeabilização celular *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2007;29(2):109-113.
- PETER, S. T. JR. Serum Albumin. *Adv. Protein Chem*, **37**, 161-245, 1985.
- PISANIC TR 2ND, ZHANG Y, WANG TH. Quantum dots in diagnostics and detection: principles and paradigms. *Analyst*. 2014 Jun 21;139(12):2968-81. doi: 10.1039/c4an00294f. Epub 2014 Apr 28.
- PONS, Thomas et al. Hydrodynamic dimensions, electrophoretic mobility, and stability of hydrophilic quantum dots. *The Journal of Physical Chemistry B*, **110**(41), 20308-20316, 2006.
- QUIJADA, L.; REQUENA, J.M.; SOTO, M.; GOMEZ, L.C.; GUZMAN, F.; PATARROYO, M.E. & ALONSO, C. Mapping of the linear antigenic determinants of the *Leishmania infantum* hsp70 recognized by leishmaniasis sera. *Immunol Lett.* **52** (2-3) 73-9, 1996.
- QUIJADA, L.; SOTO, M.; ALONSO, C. & REQUENA, J. M. Analysis of post-transcriptional regulation operating on transcription products of the tandemly linked *Leishmania infantum* hsp70 genes. *J Biol Chem.* **272**(7): 4493-9, 1997.
- READ, S. M., NORTHCOTE, D. H. Minimization of variation in the response to different proteins of the coomassie blue G dye binding assay for protein. *Anal. Biochem.* **116**, 53-64, 1981.
- REIS, Luiza de Campos et al . Clinical, epidemiological and laboratory aspects of patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Pernambuco. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **41**, 5, 2008.
- REZENDE, S. M. *Materiais e dispositivos eletrônicos*. São Paulo: Editora Livraria da Física: São

Paulo, 2^a ed. 2004.

ROBERTS, L. S.; JANOVY, J. J. Foundations of parasitology. In: New York: McGraw-Hill, cap. Kinetoplastida: Trypanosomes and their kin, 55-81, 2000.

ROBERTS, L.J.; HANDMAN, E. & FOOTE, S.J. – Science, medicine, and the future: leishmaniasis. *BMJ*. **321**(7264): 801-804, 2000.

ROCHA, R. D. R. *et al.* Anticorpos antipromastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, detectados pela citometria de fluxo, para identificação da infecção ativa na leishmaniose tegumentar ativa. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **35**(6) 551-562, 2002.

ROCHA, R. D. R. *et al.* Clinical value of anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G subclasses, detected by flow cytometry, for diagnosing active localized cutaneous leishmaniasis. *Trop Med Int Health*. **11**(2) 156-66, 2006.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol.*, **55**, 453-483, 2001.

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

SANTOS, B. S.; FARIAS, P. M. A.; MENEZES, F. D.; BRASIL JR, A. G.; FERREIRA, R. C.; MOTTA, M. A.; CASTRO-NETO, A. G.; VIEIRA, 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.

SANTOS, B.S.; FARIAS, P.M.A.; MENEZES, F.D.; FERREIRA, R.; GIORGIO, S.; BOSETTO, M.C.; MARIANO, E.A.; THOMAZ, A.A.; FONTES, A.; CESAR, C.L. Molecular differentiation of *Leishmania* protozoarium using CdS quantum dots as biolabels. *Proc. SPIE* **2006**.

SCHALLIG, H. D. F. H. and OSKAM, L. "Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification," *Tropical Medicine and International Health*, **7**(8) 641–651, 2002.

SCHMID, G. *Nanoparticles From Theory to Application*. Weinheim, WILEYVCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004.

SILVA, E. S. *et al.* Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **96**(3) 285-291, 2001.

SILVA, R. A.; *et al.* Magnitude e tendência da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de São Paulo, Brasil, 1975 a 2008. *Rev Bras Epidemiol*, **15**(3): 617-26, 2012.

SILVEIRA, *et al.* Observações sobre o diagnóstico laboratorial e a epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Estado do Paraná, sul do Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **32**(4), 413-423, 1999

SIMONE, S. G. de; SILVA JR, F. P.; PALMA, M. S.; MENDES, M. A.; SOUZA, B. M.; MARQUES, M. R.; DE AZEVEDO JR, W. F. ALVES, C. R. ; GUEDES, M. I. F. ; RAMOS, C. H. I. Separação e caracterização de proteínas/ peptídeos. In: Salvatore Giovanni De Simone. (Org.). *A arte de purificação e caracterização de proteínas*. 1^a Ed. Fortaleza: RDS, **1**, 1-215, 2008.

SOTO, M., RAMÍREZ, L., PINEDA, M. A., GONZALEZ, V. M., ENTRINGER, P. F, DE OLIVEIRA, C. I., NASCIMENTO, I. P., SOUZA, A. P. CORVO, L., ALONSO, C., BONAY, P., BRODSKYN, C., BARRAL, A., BARRAL-NETTO, M., AND IBORRA, S. Searching Genes Encoding Leishmania Antigens for Diagnosis and Protection Scholarly Research Exchange, Vol. 2009.

STAGER, S., SMITH, D. F. AND KAYE, P. M. "Immunization with a recombinant stage-regulated surface protein from *Leishmania donovani* induces protection against visceral leishmaniasis," *The Journal of Immunology*, **165**(12) 7064–7071, 2000.

TALMI-FRANK, D.; STRAUSS-AYALI, D.; JAFFE, C.L. & BANETH, G. - Kinetics and diagnostic and prognostic potential of quantitative Western blot analysis and antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assay in experimental canine leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol.* **13**(2) 271-6, 2006.

TATE, J.; WARD, G. Interferences in Immunoassay. *Clin Biochem Rev*, **25**, 105-120, 2004.

TULLY, E.; HEARTY, S.; LEONARD, P. & O'KENNEDY, R. The development of rapid fluorescence-based immunoassays, using quantum dot-labelled antibodies for the detection of *Listeria monocytogenes* cell surface proteins. **International Journal of Biological Macromolecules**, **39**, 127–134, 2006.

ULRICH, H. *Chemistry and Technology of Carbodiimides*, 1st edition, USA, Wiley, 2007.

VEXENAT, A.C.; SANTANA, J.M. & TEIXEIRA, A.R. - Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (viannia) braziliensis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* **38**(3):177-85, 1996.

WANG C, MA Q, SU X. Synthesis of CdTe nanocrystals with mercaptosuccinic acid as stabilizer. *J Nanosci Nanotechnol.* **8**(9):4408-14, 2008.

XIA, Y.-S. & ZHU, C.-Q. Interaction of CdTe nanocrystals with thiol-containing amino acids at different pH: a fluorimetric study. *Microchim Acta*, **164**:29–34, 2009.

XIMENES, M. F. F. M.; SILVA, V. P. M.; QUEIROZ, P. V. S.; REGO, M. M.; CORTEZ, A. M.; BATISTA, L. M. M.; MEDEIROS, A. S. & JERONIMO, S. M. B. Flebotomíneos (Díptera: Psychodidae) e Leishmanioses no Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil – Reflexos do ambiente antrópico. *Neotropical Entomology.* **36**(1) 128-137, 2007.

YING, Erbo et al. Synthesis and bio-imaging application of highly luminescent mercaptosuccinic acid-coated CdTe nanocrystals. *PloS one*, **3**, 5, e2222, 2008.

YU, W. W., QU, L., GUO, W., e PENG, X. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chem. Mater*, **15**, 2854 – 2860, 2003.

ZHANG, H. SUN, P., LIU, C., GAO, H., XU, L., FANG, J., WANG, M., LIUA, J. AND XUA, S. L- Cysteine capped CdTe–CdS core–shell quantum dots: preparation, characterization and immunolabeling of HeLa cells *Luminescence* **25**, 430, 2009.

ZHU, Yian et al. One-pot preparation of highly fluorescent cadmium telluride/cadmium sulfide quantum dots under neutral-pH condition for biological applications. *J. Col. Interf. Sci.*, **390**, 1, 3-10, 2013.

APÊNDICES

Apêndice 1 – Fluorescence Plate Reader for Quantum Dot-Protein Bioconjugation Analysis



Copyright © 2013 American Scientific Publishers
All rights reserved
Printed in the United States of America

Journal of
Nanoscience and Nanotechnology
Vol. 13, 1–8, 2013

Fluorescence Plate Reader for Quantum Dot-Protein Bioconjugation Analysis

Kilmara H. G. Carvalho^{1,2}, Aluizio G. Brasil, Jr^{1,2}, Paulo E. Cabral Filho^{2,3},
Denise P. L. A. Tenório^{2,4}, Ana C. A. de Siqueira², Elisa S. Leite^{2,5},
Adriana Fontes^{2,3,*}, and Beate S. Santos^{1,2,*}

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, CCS, UFPE50740–120, Recife, PE, Brazil

²Grupo de Pesquisa em Nanotecnologia Biomédica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

³Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, CCB, UFPE, 50670–901, Recife, PE, Brazil

⁴Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

⁵Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

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

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

1. INTRODUCTION

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

QDs are nanocrystals made up of elements from the II–VI (e.g., CdSe, CdTe, CdS, and ZnSe), III–V (e.g., InP and InAs) or IV–VI (e.g., PbSe) group. As their

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

Due to the improvement of the colloidal synthesis methodologies, especially the aqueous based, in the last 15 years, QDs have been successfully used as fluorescent probes in biological and medical field. In this time lapse we observed an exponential growth of the use of this new class of fluorophores in bioimaging (fixed cell, *ex vivo*

RESEARCH ARTICLE

*Authors to whom correspondence should be addressed.

live cell and *in vivo* animal targeting), bioanalytical assays, in immunofluorescence assays, as potential photosensitizers for photodynamic therapy and as probes to trace the pharmacological routes of some drugs.^{1–3}

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

Many research groups have been reporting different methods to characterize QDs bioconjugates. Sapsford et al. (2011)⁵ in a recent review article compiled bioconjugation characterization approaches for various nanomaterials and classified them as separation, scattering, microscopy and spectroscopy techniques. Among the most cited methods are the gel and capillary electrophoresis,⁶ the dynamic light scattering (DLS)⁷ and fluorescence correlation spectroscopy (FCS).⁸ However, these methods currently used still present one or other disadvantages: laborious methodologies, lack of standardization for the interpretation of the results or the use of expensive equipments. Electrophoresis, for example, is a laborious technique and, despite to be able to analyze and compare bioconjugation for various samples at same time, it can be applied only for qualitative analyses of charged specimens. Moreover, if the conjugated molecule has low or medium weight, the electrophoresis is no more appropriate.^{9,10} DLS can qualitatively answer if the bioconjugation happened, for one sample at a time, based on the average sizes, but has poor resolution and can only resolve particle populations (within the same sample) if they differ in size by at least a factor of 3.⁵ FCS technique is similar to DLS. However, although FCS is more sensitive than DLS for discriminating similar sizes, it needs a confocal microscopy, and then it is an expensive technique. Moreover, the FCS can answer if the bioconjugation happened, but it cannot give much information about the efficiency. Therefore, new and complementary methods are always welcome to evaluate bioconjugation process.

We present here an alternative optical method to confirm QDs bioconjugation by using a Fluorescence Plate Reader. This analytical approach is based on the native QDs' fluorescence detection of samples containing the bioconjugates and the absence of signal in all other samples named controls. The Fluorescence Plate Reader is routinely applied in immunoassays to detect (with accuracy) antigen-antibody interactions as already described in the literature.¹¹ This

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

Among the methods used to evaluate bioconjugation, electrophoresis is, by far, the most used approach. When compared to the most applied methods, especially with electrophoresis, our approach has the advantages to be able to evaluate and discriminate semi-quantitatively a great number of different types of bioconjugates simultaneously (for example, there are microplates with 96 wells). Moreover, it is a simple, practical, fast and sensitive method. Besides, it is not limited by size or charge of the bioconjugates. Therefore, why do not use this method as a complementary approach to detect and evaluate the QDs-protein bioconjugation? In order to demonstrate this alternative method, we tested CdTe QDs bioconjugated to different proteins: bovine serum albumin (BSA), anti-A antibody and concanavalin A lectin (ConA). We employed two different conjugation methodologies, one by using covalent binding¹⁰ and other by adsorption, a phenomenon mainly mediated by electrostatic and hydrophobic/hydrophilic interactions.¹³

2. EXPERIMENTAL PROCEDURES

2.1. General Experimental Details

All reagents for the QDs synthesis were purchased from Sigma Aldrich and used as received. Microplate-based fluorescence measurements were performed using a WALLAC 1420 microplate reader with the software Victor² (PerkinElmer). Black 96-well Optiplate F HB microplates were purchased from PerkinElmer. The biomolecules used were BSA (Sigma Aldrich), ConA (Sigma Aldrich) and anti-A antibody (DiaMed—Minas Gerais—Brazil). Absorption spectra of isolated and conjugated QDs were collected on a DU 7500 UV/VIS spectrophotometer (Beckman) or in a HR 4000 spectrophotometer (Ocean Optics) in the range of 200 to 600 nm. Emission spectra of isolated and conjugated QDs (excited at 365 nm) were recorded using a PC1, (a photon-counting fluorescence spectrometer from ISS with a xenon lamp of 300 W as excitation source), employing excitation and emission slits of 1 mm and voltage = 15 V.

2.2. CdTe QDs Synthesis

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

of Te^{2-} in a $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ solution of $\text{pH} > 10$ in the presence of TGA (thioglycolic acid), MPA (3-mercaptopropionic acid) or MSA (mercaptosuccinic acid) (Sigma Aldrich) as stabilizing agents in a 2:1:4.2/4.6/2.4 ratio of Cd:Te:TGA/MPA/MSA respectively. The Te^{2-} aqueous solution was prepared by using metallic tellurium (Sigma Aldrich) and NaBH_4 (Sigma Aldrich), at a high pH and under argon or nitrogen saturated inert atmosphere. The reaction proceeded, in argon or nitrogen, under constant stirring and heating at 80°C during 1 hour for TGA and 7 and 15 hours at 100°C for MPA and MSA.

2.3. Plate Reader Bioconjugation Detection Method

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

conjugation between carboxylate QDs and amine groups of biomolecules such as peptides, proteins and DNA¹ can be confirmed by comparing the conjugates and controls signals intensities values, according to Figures 1 and 2 respectively.

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

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

2.4. Conjugation by Covalent Binding

TGA-coated CdTe QDs were conjugated with BSA protein using EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimide) and Sulfo-NHS (*N*-hydroxysulfosuccinimide) as coupling reagents.^{9,10} Firstly, 20 nmol of CdTe was added to the activation buffer at 0.1 M MES (2-[morpholino]ethanesulfonic acid) at pH 6.0. After 15 minutes, 0.4 mg/ml EDC and 1.1 mg/ml Sulfo-NHS in ultrapure water were added to the system. Then, $1.4\ \mu\text{l}$ of 2-mercaptoethanol (20 mM) were used to quench

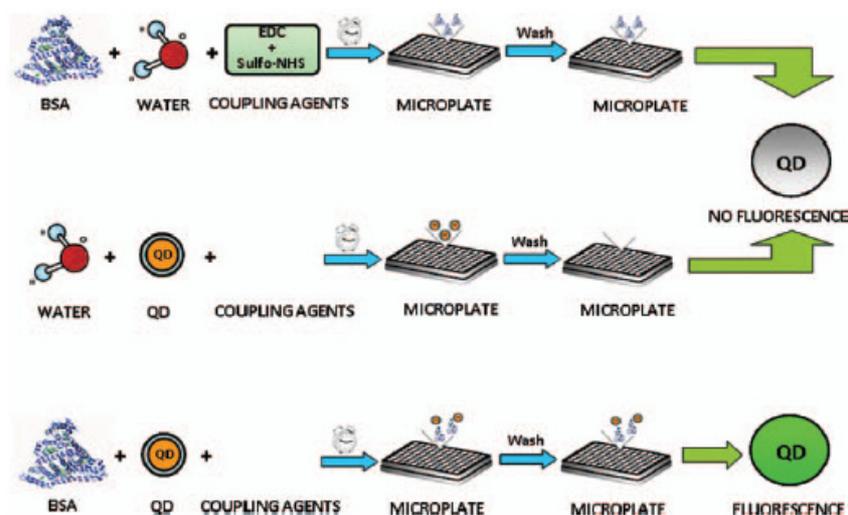


Fig. 1. Experimental procedure used in the fluorescence plate reader method for QDs-protein interaction by adsorption. The scheme shows the interaction process between the microplates with different samples: the two controls used in the experiment present no considerable fluorescence signal, while the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

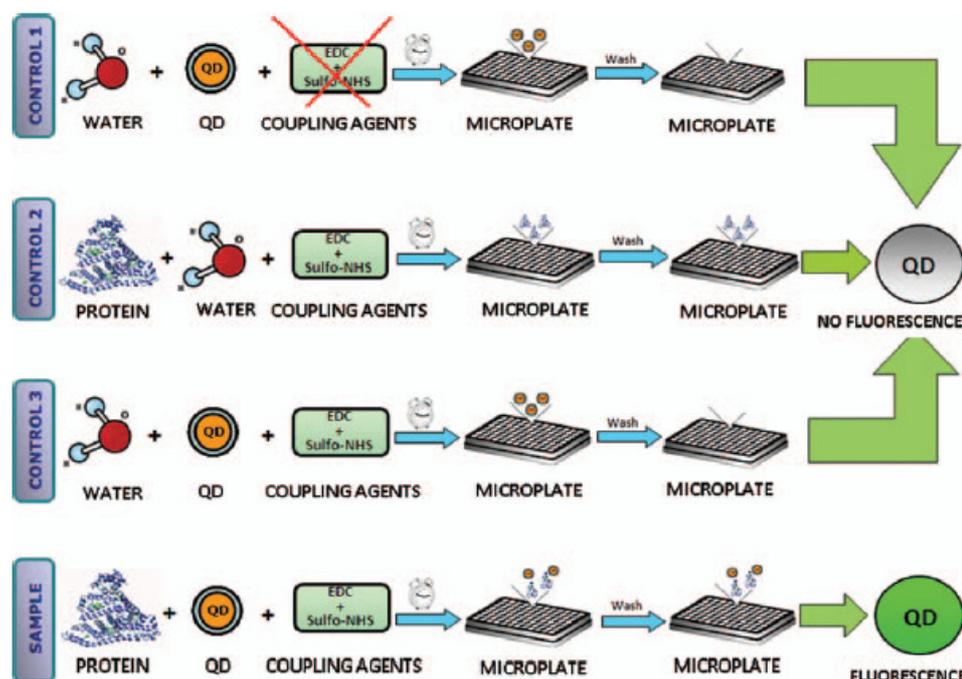


Fig. 2. Experimental procedure used in the fluorescence plate reader method for QDs-protein covalent binding bioconjugates. The scheme shows the interaction process between the microplates with different samples: the three controls used in the experiment present no considerable fluorescence signal and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

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

2.5. Conjugation by Adsorption

The MPA-coated or MSA-coated CdTe conjugations, by adsorption, with anti-A, BSA and ConA were performed by adjusting the QDs pH to 8.0 and placed the molecules in contact with QDs for 2 hours at room temperature without stirring. The QD:anti-A proportion was 50:1 (v/v). For ConA (0.2 mg/mL), the QD:ConA proportion was 7:1 (v/v) and QD:BSA (0.01 g/mL) was 60:1 (v/v). Con A is a lectin that targets sugars such as mannose and glucose.

2.6. Procedure of Bioconjugates Immobilization and Analysis

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

chamber) at 37 °C. After this time, the wells were washed 3 times with PBS. Then, the microplate was placed in the Plate Reader and the signals of each well (with controls and QDs-biomolecules samples) were analyzed under F480 (480 nm/15.5 nm) or F485 (485 nm/7 nm) excitation filters, F535 (535 nm/12.5 nm) or F595 (595 nm/30 nm) emission filters. The acquisition time was 1 s, the lamp was set to 20,000 or 60,000 and normal slits were used for excitation and emission.

2.7. Procedure for Confirmation of the Bioconjugation with Other Methods

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

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

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

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

(530 nm/15 nm) or FL2 filter (585 nm/21 nm). RBCs type A and type O collected in EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) tubes were used to prepare a 5% diluted suspension of cells using saline solution. After that, RBCs were incubated with QD-(anti-A) conjugates for one hour at 37 °C using a proportion of 3:1 v/v (QDs conjugate:cells). RBCs type O were the negative control, since they do not present A antigens in their membranes.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Initially, all QDs employed in the experiments were characterized by absorption and emission spectra which are shown in Figures 3 and 4. According to optical and structural characterizations (data not shown), CdTe-TGA, CdTe-MPA and CdTe-MSA nanoparticles maxima emissions were 540 nm (FWHM = 35 nm, where FWHM is

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

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

Notes: ^aAcquisition performed with the F485 nm excitation filter and F535 emission filter, acquisition time of 1 s, 60,000 and normal slits for excitation and emission. QDs employed were TGA capped CdTe.

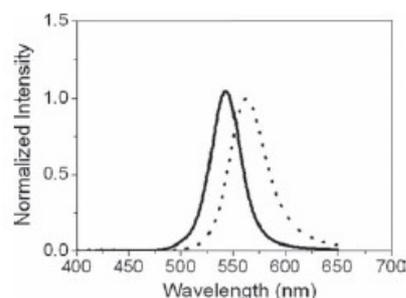


Fig. 3. Comparative emission spectra of isolated CdTe-TGA (dashed line) QDs and CdTe-TGA-BSA bioconjugates (solid line). The BSA protein shows no fluorescence in the wavelength range of the QD employed. Excitation at $\lambda = 365$ nm.

the full width half maximum), 550 nm (FWHM = 53 nm), 604 nm (FWHM = 50 nm), while the average diameters were 2.7 nm, 2.6 nm and 3.3 nm respectively.^{18,19} The QDs concentrations used were 1 μ M for CdTe-TGA, 13 μ M for CdTe-MPA and 6 μ M for CdTe-MSA.²⁰

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

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

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

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

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

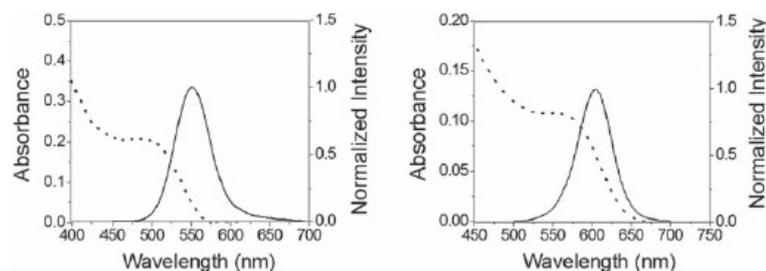


Fig. 4. Emission (solid line) and absorption (dashed line) spectra of CdTe-MPA (left) and CdTe-MSA (right) QDs.

for diagnosis purposes.^{11,12} Relative fluorescence intensity values show quantitative reproducibility (with standard errors smaller than 10%) when the same samples of bioconjugates were used, evidencing the effectiveness of this detection method.

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

In Figure 3, we present emission spectra for CdTe-TGA alone and CdTe-TGA-BSA bioconjugate (after 4 hours of reaction). The blue shift of the maximum emission peak from 560 to 540 nm (excitation at $\lambda = 365$ nm) confirms the bioconjugation. Both CdTe-TGA isolated QDs and CdTe-TGA-BSA QDs presented symmetric and narrow emission spectra. BSA shows no fluorescence in the wavelength range employed. The BSA fluorescence is related to tryptophan residues which provide major contribution to the intrinsic fluorescence of this protein near 340 nm.^{21,22} Also, it was observed a small decay in the fluorescence emission spectra intensity for bioconjugated QDs which may be explained by the effect of the surrounding environment pH. Previous study²³ reported the effect of various

factors on QDs fluorescence, including pH, after the conjugation procedure with BSA. Their results showed that the maximum relative fluorescence intensity (RFI) occurred at pH 6.83, while for lower pH the values of the RFI decreases. The authors described that this decay is also probably caused by depassivation, where the protonation of the surface-binding thiolates results in the deconstruction of the Cd²⁺-TGA complexes. This prior study corroborates with our results because we employed pH 6.0 in the covalent bioconjugation process (with EDC plus Sulfo-NHS) and obtained a small decrease in the intensity of the emission spectra when compared to the bare QDs.

As it can be observed in Table I, a value of 332% for the relative intensity demonstrated a more effective conjugation for QDs-MSA-(anti-A), while for QDs-MPA-(anti-A) it was observed a value of 164%. The flow cytometry analysis corroborated the results obtained using the Plate Reader. Figure 5 shows the labeling of approximately 60% of A erythrocytes by QDs-MSA-(anti-A), in contrast to around 30% for QDs-MPA-(anti-A). Erythrocytes type O did not present fluorescence, confirming the specific labeling (Fig. 5(2)). These results indicate that, when the properties of proteins are preserved, a greater signal obtained by our method can be related to a more efficient bioconjugation process. In fact, we believe that the flow cytometry and the Fluorescence Plate Reader approach are complementary. The analysis with the Plate Reader indicates if the bioconjugation of proteins to QDs was efficient, or not, and the flow cytometry results can be used as a contra proof to validate this methodology of evaluation of the bioconjugation. As higher is the signal observed in the Plate Reader, the more efficient is the bioconjugation procedure and a higher number of labeled cells is expected to be detected by flow cytometer.

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

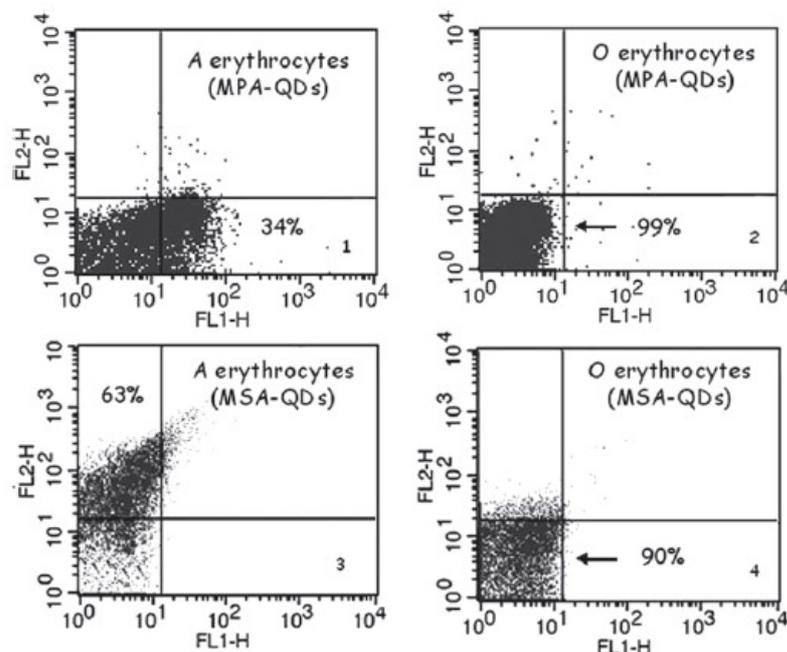


Fig. 5. Dot plots of A and O erythrocytes: (1) "A" cells labeled with MPA-(anti-A) QDs, (2) O erythrocytes presenting quite no labeling after incubation with MPA-anti-A QDs, (3) "A" cells labeled with MSA-(anti-A) QDs and (4) the same as (2) for O erythrocytes and MSA-(anti-A) QDs.

are not covered by antibodies and bare QDs do not label RBCs. The labeling of cells incubated with MSA-QDs was more efficient than the labeling of cells incubated with MPA-QDs, probably because the MSA agent presents two free carboxyl groups promoting a better interaction with biomolecules, while MPA has only one carboxyl group.

4. CONCLUSION

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

extrapolated for other fluorophores and for other kind of biomolecules, including uncharged biomolecules as well as uncharged pegylated QDs, which are hard to detect by standard non optical methods.

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

References and Notes

1. I. L. Medintz, H. T. Uyeda, E. R. Goldman, and H. Mattoussi, *Nat. Mater.* 4, 435 (2005).
2. X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolia, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, and S. Weiss, *Science* 307, 538 (2005).

3. B. S. Santos, P. M. A. Farias, and A. Fontes, *Handbook of Self Assembled Semiconductor Nanostructures Novel Devices in Photonics and Electronics*, edited by M. Henini, Elsevier, Amsterdam (2008), Vol. 1, pp. 771–798.
4. C. Chornokur, S. Ostapenko, E. Oleynik, C. Phelan, N. Korsunsk, T. Kryshab, J. Zhang, A. Wolcott, and T. Sellers, *Superlattices Microstruct.* 45, 240 (2009).
5. K. E. Sapsford, K. M. Tyner, B. J. Dair, J. R. Deschamps, and I. L. Medintz, *Anal. Chem.* 83, 4453 (2011).
6. X. Huang, J. Weng, F. Sang, X. Song, C. Cao, and J. Ren, *J. Chromatogr. A* 1113, 251 (2006).
7. W. T. Al-Jamal, K. T. Al-Jamal, A. Cakebread, J. M. Halket, and K. Kostarelos, *Bioconjugate Chem.* 20, 1696 (2009).
8. L. Shao, C. Dong, F. Sang, H. Qian, and J. Ren, *J. Fluoresce.* 19, 151 (2008).
9. H. Mattousi, J. M. Mauro, E. R. Goldman, G. P. Anderson, V. C. Sundar, F. V. Mikulec, and M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* 122, 12142 (2000).
10. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Elsevier, Amsterdam (2008), Vol. 2, p. 215.
11. M. G. Warner, J. W. Grate, A. Tyler, R. M. Ozanich, K. D. Millera, J. Loub, J. D. Marks, and C. J. Bruckner-Lea *Biosens. Bioelectron.* 25, 179 (2009).
12. H. Li, Z. Cao, Y. Zhang, C. Lau, and J. Lu, *Analyst.* 136, 1399 (2011).
13. Bangs Laboratories, Inc. Adsorption to Microspheres, *Tech Note* 204, 1 (2008).
14. B. S. Santos, P. M. A. Farias, F. D. de Menezes, A. G. B. Júnior, R. Ferreira, M. A. Motta, A. G. C. Neto, A. A. S. Vieira, D. C. N. Silva, A. Fontes, and C. L. Cesar, *Applied Physics A, Materials Science and Processing* 89, 957 (2007).
15. A. J. Pesce, D. J. Ford, M. Gaizutis, and V. E. Pollak, *Biochimica et Biophysica Acta—Protein Structure* 492, 399 (1977).
16. L. A. Cantarero, J. E. Butler, and J. W. Osborne, *Anal. Biochem.* 105, 375 (1980).
17. B. D. Fair and A. M. Jamieson, *J. Colloid Interface Sci.* 77, 525 (1980).
18. P. Dagtepe, V. Chikan, J. Jasinski, and V. J. Leppert, *J. Phys. Chem. C* 111, 14977 (2007).
19. A. L. Rogach, I. T. Franz, T. A. Klar, J. Feldmann, N. Gaponik, V. Lesnyak, A. Shavel, A. Eychmüller, Y. P. Rakovich and J. F. Donegan, *J. Phys. Chem. C* 111, 14628 (2007).
20. W. W. Yu, L. Qu, W. Guo, and X. Peng, *Chem. Mater.* 15, 2854 (2003).
21. N. N. Mamedova, N. A. Kotov, A. L. Rogach, and J. Studer, *American Chemical Society* 1, 281 (2001).
22. D. Wu, Q. Wei, Y. Li, B. Du, and G. Xu, *Int. J. Biol. Macromol.* 37, 69 (2005).
23. Y. Yu, Y. Lai, X. Zheng, J. Wu, Z. Long, and C. Liang, *Spectrochim. Acta, Part A* 68, 1356 (2007).

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

Apêndice 2 – Semiquantitative Fluorescence Method for Bioconjugation Analysis

Chapter 8

Semiquantitative Fluorescence Method for Bioconjugation Analysis

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

Abstract

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

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

1 Introduction

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

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

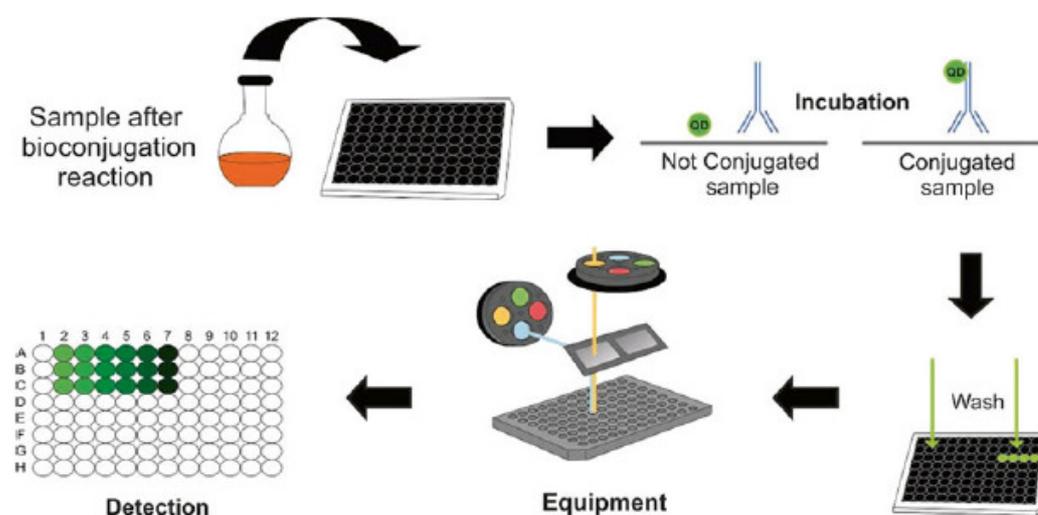


Fig. 1 Experimental procedure used in the Fluorescence Plate Reader method for QDs–protein covalent binding bioconjugates. The scheme shows the interaction process between the microplates with different samples: the two controls used in the experiment present no considerable fluorescence signal and QDs–protein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

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

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

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

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

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

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

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

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

2 Materials

2.1 CdTe QDs

Synthesis (See Note 2)

1. Thioglycolic acid (TGA), HSCH₂CO₂H_(l).
2. Cysteamine (CTM), HSCH₂CH₂NH_{2(s)}.
3. Cadmium Perchlorate, Cd(ClO₄)_{2(s)}.
4. Metallic tellurium, Te^o_(s).
5. Sodium borohydride, NaBH_{4(s)}.
6. Ultrapure water.

2.2 Bioconjugation

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

2.3 Bioconjugate Analysis

1. Fluorescence microplate reader. For example, we used Model Wallac Victor² (Perkin Elmer).
2. Black microplates. For example, we used polystyrene black microplates.
3. Phosphate buffer solution (PBS).
4. Negative controls (*see Note 5*).

3 Methods
3.1 General Procedure for CdTe QDs Synthesis

Aqueous colloidal dispersion of CdTe QDs could be synthesized by adapting a previously reported method [11]. Briefly, QDs can be prepared by the addition of Te^{2-} in a $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ solution of $\text{pH} > 10$ in the presence of TGA as stabilizing agent in a 2:1:4.2 ratio of Cd:Te:TGA and a pH in the range of 5.6–5.9 in the presence of CTM as stabilizing agent in a 2:0.2:2.4 ratio of Cd:Te:CTM. The Te^{2-} aqueous solution should be prepared using metallic tellurium and NaBH_4 , at a high pH and both under argon saturated inert atmosphere. We recommend to proceed the reaction in this way, under constant stirring and heating at 80 °C for at least 1 h. The time interval of the synthesis will depend on the expected size (and emission profile) of the QDs.

3.2 Bioconjugation Procedure

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

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

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

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

3.2.1 QD Conjugation by Covalent Binding to BSA

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

3.2.2 QD Conjugation by Covalent Binding to IgG

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

3.3 Procedure for Immobilized Bioconjugates and Analysis

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

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

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

^aAcquisition performed with the F485 excitation and F535 emission filters to BSA and F355 excitation and F595 emission filters to IgG, acquisition time of 1 s and normal slits. QDs used for BSA was TGA capped CdTe and for IgG was CTM capped CdTe

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

4 Notes

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

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

Acknowledgments

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

References

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

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



Título do Projeto: Utilização de Nanomarcadores Fluorescentes Conjugados a Novos Antígenos no Desenvolvimento de Técnicas de Diagnóstico Precoce de Leishmaniose Visceral e Tegumentar e o uso destes Nanomarcadores no Estudo do Processo Invasivo de *L. braziliensis* e *L. chagasi*
Pesquisador responsável: Maria Edileuza Felinto de Brito
Instituição onde se realizará o projeto: CPqAM/FIOCRUZ
Data de apresentação ao CEP: 29/05/2007
Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 38/07
Registro no CAAE: 0038.0.095.000-07

PARECER Nº 054/2007

O Comitê avaliou as modificações introduzidas e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 14 de novembro de 2010. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 14 de novembro de 2007.


 Dr.^a Zuzana Maria de Medeiros
 Bióloga
 Coordenadora
 CEP/CPqAM/FIOCRUZ

Observação:

Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 14/11/2008.

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n
 CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639
 Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639
 Recife - PE - Brasil
 comitedeetica@cpqam.fiocruz.br

