

UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

KAROLAYNE ROCHA DA COSTA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE *QUANTUM DOTS* COMO NANOSONDAS
FLUORESCENTES PARA APLICAÇÕES BIOANALÍTICAS**

Maceió - AL
2020

KAROLAYNE ROCHA DA COSTA

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE QUANTUM DOTS COMO NANOSONDAS
FLUORESCENTES PARA APLICAÇÕES BIOANALÍTICAS

Dissertação de mestrado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Química
(PPGQB) e Biotecnologia da Universidade
Federal de Alagoas (UFAL) como requisito para
obtenção do grau de mestre em Ciências.

Maceió - AL
2020

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

C837s Costa, Karolayne Rocha da.

Síntese, caracterização e aplicação de *Quantum Dots* como nanosondas fluorescentes para aplicações bioanalíticas / Karolayne Rocha da Costa. – 2020.

106 f. : il., figs. e tabs. color.

Orientador: Josué Carinhanha Caldas Santos.

Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 87-106.

1. Quantum dots. 2. Fluorescência. 3. Protamina. 4. Tripsina. I. Título.

CDU: 54



Universidade Federal de Alagoas
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

ATA N° 324

Ata da sessão referente à defesa de dissertação intitulada Síntese, caracterização e aplicação de quantum dots de CdTe como nanosondas fluorescentes para aplicações bioanalíticas: determinação de proteínas catiônicas e tripsina, para fins de obtenção do título de MESTRA EM CIÊNCIAS, área de concentração: Química Analítica e linha de pesquisa: Química biológica e medicinal, pela discente Karolayne Rocha da Costa (início do curso em julho de 2018) sob orientação do Prof. Dr. JOSUÉ CARINHANHA CALDAS SANTOS (PPGQB/IQB/UFAL).

No vigésimo primeiro dia do mês de dezembro do ano de 2020, às 9 h, por meio de videoconferência realizada através da ferramenta Google Meet, reuniu-se a Banca Examinadora em epígrafe, aprovada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação. Tendo o orientador declarado aberta a sessão, mediante o prévio exame do referido trabalho por parte de cada membro da Banca, a discente procedeu a apresentação de sua dissertação e foi submetida à arguição *on-line* pela Banca Examinadora que, em seguida, deliberou sobre o seguinte resultado: APROVADA.

Nada mais havendo a tratar, o orientador declarou encerrada a sessão de Defesa, sendo a presente Ata lavrada e assinada pelos senhores membros da Banca Examinadora e pela discente, atestando ciência do que nela consta.

Dr. RODOLFO DE MELO MAGALHÃES SANTANA, UFBA
Examinador(a) Externo(a) à Instituição

Dr. ISIS MARTINS FIGUEIREDO, UFAL
Examinador(a) Interno(a)

Dr. JOSUÉ CARINHANHA CALDAS SANTOS, UFAL
Presidente

KAROLAYNE ROCHA DA COSTA
Mestrando



FOLHA DE CORREÇÕES

ATA Nº 324

Autor: KAROLAYNE ROCHA DA COSTA

Título: Síntese, caracterização e aplicação de quantum dots de CdTe como nanosondas fluorescentes para aplicações bioanalíticas: determinação de proteínas cationicas e tripsina

Banca examinadora:

Prof. RODOLFO DE MELO M. SANTANA

Examinador(a) Externo(a) à
Instituição

Prof. ISIS MARTINS FIGUEIREDO

Examinador(a) Interno(a)

Prof. JOSUE CARINHANHA CALDAS SANTOS

Presidente

Os itens abaixo deverão ser modificados, conforme sugestão da banca

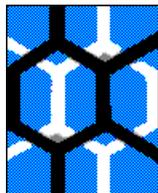
1. [] INTRODUÇÃO
2. [] REVISÃO BIBLIOGRÁFICA
3. [] METODOLOGIA
4. [] RESULTADOS OBTIDOS
5. [] CONCLUSÕES

COMENTÁRIOS GERAIS:

A candidata apresentou em 35 min o trabalho. O processo de arguição ocorreu por 2:40 h. Não foram sugeridas alterações profundas no texto, apenas questões pontuais durante o processo de arguição. Por fim, a banca em sala virtual se reuniu e deliberou pela aprovação da mestranda. A defesa contou com a presença de outras pessoas, caracterizando-se por ser um ato público.

Declaro, para fins de homologação, que as modificações, sugeridas pela banca examinadora, acima mencionada, foram cumpridas integralmente.

Prof. JOSUE CARINHANHA CALDAS SANTOS
Orientador



PPGQB

Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia



APROVAÇÃO DE VERSÃO FINAL CORRIGIDA DA DISSERTAÇÃO

Eu, **Josué Carinhanha Caldas Santos**, orientador do aluno de mestrado, venho por meio desta encaminhar o arquivo digital da dissertação intitulada “*Síntese, caracterização e aplicação de quantum dots como nanosondas fluorescentes para aplicações bioanalíticas*”, apresentada pelo(a) discente em 21/12/2020 pela discente Karolayne Rocha da Costa.

O arquivo que está sendo entregue encontra-se com as devidas correções sugeridas pela banca examinadora, conforme exigência do Artigo 63º do Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia.

Maceió-AL, 14 de janeiro de 2021.

Josué Carinhanha Caldas Santos

Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos

Orientador

Prof. Dr. Josué Carinhanha C. Santos
SUAPO 05133338
Reg. UFAL 1550004

RESUMO

No processo de quantificação de biomoléculas, os métodos tradicionais de determinação apresentam algumas limitações, como alto custo operacional, complexidade de análise, necessidade de instrumentos especializados, complexidade de análise, entre outros fatores. Esses mesmos percalços estão presentes para detecção da protamina (PT) e da tripsina (TRIP), que são duas biomoléculas com grande importância e aplicação na área medicinal e farmacêutica, sendo imprescindível a realização do monitoramento em amostras *in vivo* e *in vitro* em ambos os casos. Apresentando alta versatilidade e propriedades ímpares, tais como como elevado rendimento quântico, alta estabilidade, largo espectro de absorção e emissão e baixa toxicidade se comparado aos fluoróforos orgânicos utilizados, os pontos quânticos (*quantum dots*, QD) são nanopartículas que tem sido explorados e aplicados como marcadores ou como sondas fotoluminescentes de variados componentes, como metais, biomoléculas, células e tecidos, onde usualmente o analito é detectado devido ao aumento ou a atenuação da fluorescência durante o processo de interação. Nesse sentido, visando a determinação de protamina, foram sintetizados QDs de CdTe funcionalizados com ácido mercaptosuccínico ($pK_{a1} = 3,30$ e $pK_{a2} = 4,60$). As nanosondas foram caracterizadas sendo observada relação direta entre o tempo de síntese e o tamanho do QD (2,61 – 3,04 nm). Os QD-CdTe de MSA foram capazes de interagir com a protamina (PT), uma proteína catiônica, formando um bioconjugado, e conseqüente supressão da intensidade de fotoluminescência (PL) e assim, gerando um sistema ON-OFF. A nanosonda produzida no tempo de síntese de 1 h (QD-CdTe₁) apresentou a melhor sensibilidade frente a PT em solução tampão succinato (25 mM, pH = 5). Sob as condições otimizadas, o método proposto apresentou faixa linear de 0,05 – 0,5 mg L⁻¹ (10 - 100 nM), com LOD de 0.01 mg L⁻¹ (2 nM) e RSD ≤ 2.01%. O processo de interação entre as nanosondas e a proteína catiônica levou a agregação devido a formação do bioconjugado, pois o raio hidrodinâmico dos sistemas variou de 4,31 ± 1,12 nm (QD-CdTe₁) para 30,50 ± 9,26 nm (QD-CdTe₁-PT). Uma vez que o método foi sensível a variação da força iônica e, baseado nos parâmetros termodinâmicos, ensaio de TEM e de DLS, foi comprovado que o mecanismo de interação ocorreu preferencialmente por forças eletrostáticas. Por fim, o método proposto mostrou-se rápido, sensível e viável para quantificação de PT em amostras de medicamento e de urinas sintéticas com variadas composições, com recuperações acima de 95%. O bioconjugado QD-CdTe₆-PT foi então explorado para a quantificação da tripsina (TP), uma enzima com clivagem específica nos aminoácidos lisina e arginina, através de um sistema ON-OFF-ON. Nesse sistema, o tamanho do QD variou entre 2,56 – 3,21 nm, onde o bioconjugado QD-CdTe₆-PT foi o que apresentou a melhor sensibilidade frente a TP em solução tampão amônio (75 mM, pH = 8,5). Sob as condições otimizadas, o método proposto apresentou faixa linear de 0,005 – 0,07 mg L⁻¹ (0,22 - 3,08 nM), com LOD de 0,0014 mg L⁻¹ (0,06 nM) e RSD ≤ 1,81%. O processo de interação entre o QD-CdTe₆-PT e a TP levou a liberação da nanopartícula devido a clivagem da TP, tendo uma variação no raio hidrodinâmico de 234 ± 37,13 para 83,20 ± 40,00, 30,90 ± 21,10 e 23,42 ± 12,43 nm (TP a 0,015, 0,03 e 0,05 mg L⁻¹, respectivamente). Por fim, o método proposto viável para quantificação de TP em amostras de plasma com recuperações acima de 91%.

Palavras-chaves: *quantum dots*, CdTe, fluorescência, protamina, tripsina

ABSTRACT

In the process of quantifying biomolecules, the traditional methods of determination have some limitations, such as high operational cost, complexity of analysis, need for specialized instruments, complexity of analysis, among other factors. These same mishaps are present for the detection of protamine (PT) and trypsin (TRIP), which are two biomolecules with great importance and application in the medicinal and pharmaceutical area, being essential to carry out monitoring in samples *in vivo* and *in vitro* in both cases. Featuring high versatility and unique properties, such as high quantum yield, high stability, broad spectrum of absorption and emission and low toxicity compared to the organic fluorophores used, quantum dots (quantum dots, QD) are nanoparticles that have been explored and applied as markers or as photoluminescent probes of various components, such as metals, biomolecules, cells and tissues, where the analyte is usually detected due to the increase or attenuation of fluorescence during the interaction process. In order to determine protamine, QDs of mercaptosuccinic acid functionalized CdTe were synthesized ($pK_{a1} = 3.30$ and $pK_{a2} = 4.60$). The nanoprobe was characterized by a direct relationship between synthesis time and QD size (2.61 - 3.04 nm). The QD-CdTe-MSA interacted with protamine (PT), a cationic protein, forming a bioconjugate, thus quenching the photoluminescence intensity and generating an ON-OFF system. The nanoprobe produced at a synthesis time of 1 h (QD-CdTe₁) presented PT's best sensitivity in a succinate buffer (pH = 5). Under the optimized conditions, the proposed method presented a linear range of 0.05 - 0.5 mg L⁻¹ (10 - 100 nM), LOD 0.01 mg L⁻¹ (2 nM), and RSD $\leq 2.01\%$ ($n = 10$). The interaction of the nanoprobe and PT led to aggregation due to a bioconjugate formation. The systems' hydrodynamic radius varied from 4.31 nm (QD-CdTe₁) to 30.50 nm for the bioconjugate (QD-CdTe₁-PT). The method was sensitive to variation in ionic strength and based on thermodynamic parameters; it was demonstrated that the interaction mechanism occurred preferentially through electrostatic forces. Finally, the method proved to be fast, sensitive, and viable for quantifying PT in drugs and synthetic urine samples with recoveries above 95%. The bioconjugate QD-CdTe₆-PT was then explored for the quantification of trypsin (TP), an enzyme with specific cleavage in the amino acids lysine and arginine, through an ON-OFF-ON system. In this system, the size of the QD varied between 2.56 - 3.21 nm, where the bioconjugate QD-CdTe₆-PT was the one that showed the best sensitivity compared to TP in ammonium buffer solution (75 mM, pH = 8.5). Under the optimized conditions, the proposed method had a linear range of 0.005 - 0.07 mg L⁻¹ (0.22 - 3.08 nM), with an LOD of 0.0014 mg L⁻¹ (0.06 nM) and RSD $\leq 1.81\%$. The interaction process between QD-CdTe₆-PT and TP led to the release of the nanoparticle due to TP cleavage, with a variation in the hydrodynamic radius from 234 to 37.13 to 83.20 \pm 40.00, 30.90 \pm 21.10 and 23.42 \pm 12.43 nm (TP at 0.015, 0.03 and 0.05 mg L⁻¹, respectively). Finally, the proposed method is feasible for quantification of PT in plasma samples with recoveries above 91%.

Keywords: quantum dots, CdTe, fluorescence, protamine, trypsin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de energia para (A) formação de um excitón e (B) necessária para haver a transição eletrônica em átomos, moléculas, <i>quantum dots</i> e semicondutores.....	21
Figura 2. Esquema relacionando ao a) aumento da E_g (energia de <i>band gap</i>) de acordo com a diminuição da dimensão do <i>quantum dot</i> b) comprimento máximo de emissão de <i>quantum dots</i> de acordo com sua composição e variação de seu diâmetro.....	22
Figura 3. Espectro de absorção e emissão de <i>quantum dots</i> de CdSe/ZnS com tamanhos variados.....	23
Figura 4. Espectro de absorção em função do comprimento de onda de <i>quantum dots</i> de CdTe de 2 nm com diferentes parâmetros de dispersão desse tamanho variando entre 5 e 35%.....	24
Figura 5. Esquema do mecanismo de MEG que ocorre nos QDs.....	25
Figura 6. Esquemas representando algumas formas de funcionalização, interação e bioconjugação de QDs.....	26
Figura 7. Esquema de diferentes aplicações de QDs no campo das ciências biomédicas. PET: tomografia por emissão de pósitrons; TEM: microscopia eletrônica de transmissão.....	30
Figura 8. Esquema geral dos sistemas de detecção do tipo (A) “on/off” e (B) “on/off/on”.....	31
Figure 9. Equilíbrio ácido-base do (a) ácido mercaptosuccínico e (b) estrutura química do ácido succínico.....	43
Figure 10. Espectro de (A) extinção molar e (B) fotoluminescência para QD-CdTe com diferentes tempos de síntese em meio aquoso. Condições: $\lambda_{ex} = 350$ nm, slit de $\lambda_{ex} / \lambda_{em}$ igual a 5 / 3 nm para QD-CdTe _{0,5} , QD-CdTe _{1,5} e QD-CdTe ₁ , e 3 / 3 nm para QD-CdTe ₂ e QD-CdTe ₄	44
Figure 11. Variação da intensidade de fotoluminescência do QD-CdTe (100 nM) após a adição de PT (1 mg L ⁻¹) ($n = 3$). Condições: Tampão Britton-Robinson (10 mM, pH = 7), $\lambda_{ex} = 350$ nm, slit de 5 / 3 nm ($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$, respectivamente).....	45
Figure 12. Influência do pH na (A) intensidade de fotoluminescência do QD-CdTe e (B) sensibilidade analítica do QD-CdTe na presença de PT. Condições :Tampão Britton-Robinson a 10 mM, QD-CdTe a 350 nM, $\lambda_{ex} = 350$ nm, slit de $\lambda_{ex} / \lambda_{em}$ de 1.5 / 5 nm para o QD-CdTe ₁ , e 3 / 3 nm para o QD-CdTe _{1,5}	46
Figure 13. Espectro de absorção UV-vis da PT (1 mg L ⁻¹) em meio aquoso. A linha verde corresponde ao comprimento de onda de excitação.....	47
Figure 14. (A) Influência da composição do tampão: acetate de sódio (AS), acetate de amônio (AA), citrate de amônio (CA) e succinate de sódio (SS); e (B) Concentração do tampão succinate. Condições: QD-CdTe ₁ a 350 nM e PT de 0,25 - 2 mg L ⁻¹ ($n = 5$), $\lambda_{ex} / \lambda_{em} = 350 / 523$ nm, slit de 1.5 / 5 nm ($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$, respectivamente).....	48
Figure 15. Efeito da (A) Concentração do QD-CdTe ₁ e (B) força iônica na sensibilidade analítica do método proposto. Condições: tampão succinato (25 mM, pH = 5), $\lambda_{ex} = 350$ nm, slit de 5 / 3 nm ($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$, respectivamente).....	49
Figure 16. Análise da (a) cinética e (B) fotoestabilidade do QD-CdTe ₁ e do bioconjugado QD-CdTe ₁ -PT. O sinal da fotoestabilidade foi medido depois de 20 min, equivalente ao tempo zero do teste. Condições: tampão succinato (25 mM, pH = 5), $\lambda_{ex} = 350$ nm / $\lambda_{em} = 523$ nm, slit de 5 / 3 nm ($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$, respectivamente).....	50

Figure 17. Perfil do espectro da intensidade de fotoluminescência do QD-CdTe ₁ com concentrações crescentes de PT e respectiva curva analítica (inserção do gráfico, n = 3). Condições: Tampão succinato (25 mM, pH 5), QD-CdTe ₁ a 450 nM, $\lambda_{ex} / \lambda_{em} = 350 / 523$ nm (faixa linear), slit de 5 / 3 nm ($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$, respectivamente).....	51
Figure 18. Imagem TEM da (a, b) nanossonda QD-CdTe ₁ na ausência de PT com diferentes resoluções, (c) histograma mostrando a distribuição de tamanho do QD-CdTe ₁ livre e (d) nanossonda QD-CdTe ₁ na presença de PT (agregação).....	53
Figure 19. Perfil do espalhamento dinâmico de luz (DLS) do QD-CdTe ₁ (A) sem PT, (B) com a adição de 0,2 mg L ⁻¹ of PT, e (C) com a adição de 0,4 mg L ⁻¹ of PT. Condições: tampão succinato (25 mM, pH 5) e QD-CdTe ₁ a 450 nM.....	54
Figure 20. Parâmetros de interação de QD-CdTe ₁ com PT a 23, 30 e 37°C. (A) Gráfico de Stern-Volmer, (B) Curva logarítmica dupla para calcular a constante de ligação e (C) gráfico de Van't Hoff. Condições: tampão succinato (25 mM, pH 5), QD-CdTe ₁ a 450 nM e PT at 0 – 60 nM.....	56
Figure 21. Espectros de PL resolvidos no tempo do QD-CdTe ₁ (450 nM) com PT a 0,0 e 0,5 mg L ⁻¹ , respectivamente.....	57
Figura 22. Representação esquemática do processo de adsorção da PT na superfície do QD-CdTe ₁	58
Figura 23. Espectro de fotoluminescência dos QD-CdTe ₁ (450 nM) na ausência e na presença das diferentes amostras de urina sintética (U1- U5). Condições: tampão succinato (25 mM, pH 5), QD-CdTe ₁ 450 nM.....	60
Figura 24. (a) Estrutura química da tripsina humana, onde os resíduos que formam a “tríade catalítica” e o sítio catalítico (Asp189) são destacados e (b) Disposição dos principais resíduos, incluindo a tríade catalítica.....	62
Figura 25. Representação do mecanismo de reação catalítico da tripsina frente à uma proteína, quebrando as ligações peptídicas entre os aminoácidos.....	63
Figura 26. Espectros de (a) absorção e (b) emissão para os novos QD de CdTe com diferentes tempos de síntese.....	65
Figura 27. Representação do (A) sistema on-off-on proposto e (B) espectros de emissão para o sistema QD-CdTe ₆ -PT com diferentes concentrações de TP (0-0,5 mg L ⁻¹). Condições:tampão Tris (50 mM, pH 8), QD-CdTe ₆ a 500 nM, PT a 8 mg L ⁻¹ , <i>slit</i> ($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$) de 3/3 nm.....	66
Figura 28. Sensibilidade analítica para os diferentes sistemas QD-CdTe-PT com a adição de TP (0-0,5 mg L ⁻¹) variando (A) concentração da PT e (B) concentração dos QD-CdTe. Condições experimentais: em (A) Para o QD-CdTe ₁ -QD-CdTe ₆ foi usado PT a 1- 8 mg L ⁻¹ ; (B) Para os QD-CdTe ₁ a QD-CdTe ₆ , as concentrações variaram de 600 a 100 nM. Os <i>slit</i> $\lambda_{ex} / \lambda_{em}$ utilizados foram 5/3 nm, 3/3 nm e 1,5/3 nm.....	67
Figura 29. Intensidade de fotoluminescência do QD-CdTe ₆ e do sistema QD-CdTe ₆ -PT na ausência e presença de TP (0,5 mg L ⁻¹) em diferentes valores de pH. Condições experimentais: QD-CdTe ₆ a 100 nM, PT a 2 mg L ⁻¹ , tampão Tris HCl/Tris base 50 mM, <i>slit</i> ($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$) 5/3 nm.....	68
Figura 30. Sensibilidade analítica do sistema QD-CdTe ₆ -PT com a adição TP (0-0,5 mg L ⁻¹) em (A) diferentes sistemas tampão e (B) diferentes concentrações do tampão CA. Condições experimentais: QD-CdTe ₆ e PT a 100 nM e 2 mg L ⁻¹ ; em (A) cada tampão estava a 50 mM. <i>Slit</i> $\lambda_{ex} / \lambda_{em}$ 5/3 nm.....	69

- Figura 31.** Sensibilidade analítica para TP (0-0,05 mg L⁻¹) para diferentes concentrações do QD-CdTe₆ (50-400 nM) e da PT (1-8 mg L⁻¹). Condições experimentais: Tampão amônia/amônio 75 mM, $slit_{ex}/em$ 5/3 nm.....71
- Figura 32.** Variação na sensibilidade analítica do sistema QD-CdTe₆-PT na presença da TP (0-0,05 mg L⁻¹) com o aumento da força iônica. Condições experimentais: QD-CdTe₆ a 100 nM, PT a 2 mg L⁻¹, tampão amônia/amônio 75 mM, $slit_{ex}/em$ 5/3 nm.....72
- Figura 33.** Avaliação da cinética e da fotoestabilidade do QD-CdTe₆ e do sistema QD-CdTe₆-PT na ausência e presença da TP a 0,07 mg L⁻¹. Condições experimentais: QD-CdTe₆ a 100 nM, PT a 2 mg L⁻¹, tampão amônia/amônio 75 mM, $slit_{ex}/em$ 5/3 nm.....73
- Figura 34.** Perfil espectral do sistema QD-CdTe₆-PT com a adição de tripsina ao longo do tempo (A) sem inibidor, (B) com a adição de NEM, (C) com a adição de BEM, (D) com a adição de OVO, (E) com a adição de SBTi e (F) com a adição de IBB.....75
- Figura 35.** Perfil espectral do sistema QD-CdTe₆-PT após (A) a adição de 0,03 mg L⁻¹ TP e diferentes concentrações de OVO, (B) com a adição de 0,03 mg L⁻¹ TP e 2×10^{-6} mol L⁻¹ OVO e (C) com a adição de 0,07 mg L⁻¹ de TP e 2×10^{-6} mol L⁻¹ de OVO.....76
- Figure 36.** Perfil do espalhamento dinâmico de luz (DLS) do (A) QD-CdTe₆, (B) QD-CdTe₆-PT, (C) QD-CdTe₆-PT com a adição de 0,015 mg L⁻¹ de TP, (D) QD-CdTe₆-PT com a adição de 0,03 mg L⁻¹ de TP, e (E) QD-CdTe₆-PT com a adição de 0,05 mg L⁻¹ de TP. Condições: tampão amônio (75 mM, pH 8,55) e QD-CdTe₆ a 100 nM e PT a 2 mg L⁻¹.....77
- Figure 37.** Espectros de PL resolvidos no tempo do QD-CdTe₆ (100 nM), QD-CdTe₆-PT (PT 2 mg L⁻¹) e QD-CdTe₆-PT com TP a 0,07 mg L⁻¹, respectivamente.....78
- Figura 38.** Fotoluminescência normalizada do QD-CdTe₆-PT após (A) a adição TP na presença de outras proteínas e (B) a adição de diferentes enzimas proteases e proteínas.....79
- Figura 39.** Curva analítica para quantificação de TP empregando QD-CdTe₆-PT. Condições experimentais: QD-CdTe₆ a 100 nM, PT a 2 mg L⁻¹, tampão amônia/amônio 75 mM, $slit_{ex}/em$ 5/3 nm.80
- Figure 40.** Espectro de (A) absorção e (B) fluorescência para amostras de urina. Condições: $\lambda_{ex} = 350$ nm, $slit$ de $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ igual a 5 / 3 nm, tampão amônia/amônio 75 mM pH 8,5.....83
- Figura 41.** Representação gráfica do desenvolvimento das mosas do tipo *Drosophila melanogaster* da fase embrionária até a adulta.....84
- Figura 42.** Representação gráfica das larvas na (A) pulpação do QD-CdTe₆ ao longo dos dias, (B) pulpação do QD-CdTe₆-PT ao longo dos dias, (C) pulpação do PT ao longo dos dias, (D) pulpação do QD-CdTe₆ total, (E) pulpação do QD-CdTe₆-PT total, (F) pulpação do PT total, (G) emergência de adultos do QD-CdTe₆, (H) emergência de adultos do QD-CdTe₆-PT e (I) emergência de adultos do PT.85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características gerais de alguns nanosensores para biomarcadores.....	17
Tabela 2. Composição, variação do tamanho e faixa de emissão de alguns QD comumente sintetizados.....	20
Tabela 3. Comparação das propriedades de fluoróforos orgânicos e pontos quânticos.....	20
Tabela 4. Composição química das urinas sintéticas preparadas.....	39
Tabela 5. Principais parâmetros dos QD-CdTe sintetizados.....	45
Tabela 6. Comparação de algumas estratégias analíticas para determinar PT e o método proposto com base no QD-CdTe ₁	52
Tabela 7. Parâmetros de interação do <i>quantum dot</i> sintetizado com a PT.....	58
Tabela 8. Determinação de PT em amostras de medicamentos ($n = 3$) usando o método proposto nas condições otimizadas.....	59
Tabela 9. Ensaios de recuperação e determinação de PT em amostras de urina sintética (U1 a U5) com diferentes composições ($n = 3$).....	59
Tabela 10. Parâmetros relativos aos QD sintetizados variando o tempo de síntese.....	65
Tabela 11. Principais parâmetros dos inibidores utilizados.....	74
Tabela 12. Comparação de algumas estratégias analíticas para determinar TP e o método proposto com base no QD-CdTe ₆ -PT.....	82
Tabela 13. Ensaios de recuperação e determinação de TP em amostra de plasma (P1).....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNPs	Nanopartículas de prata
AgSNPs	Nanoplacas triangulares de prata
AuNC	Nanocluster de ouro
AuNPs	Nanopartículas de ouro
AuNRs	Nanobastões de ouro
BBI	Inibidor Bowman-Birk
BEM	Benzamidina
BSA	Albumina do soro bovino
CD	Carbono dots
CL	Colorimetria
CMR2	Derivados de cumarina
CNQDs	Quantum dots de nitreto de carbono
CNTs	Nanotubos de carbono
CMR	Derivado cumarínico bem projetado
DHLA	Ácido di-hidrolipóico
DLS	Espalhamento de luz dinâmica
Eg	Energia de <i>band gap</i>
EC	Eletroforese capilar
FLICT	Fluoresceína 5(6)-isotiocianato
FLU	Fluoresceína
FRET	Ensaio por transferência de energia por ressonância de fluorescência
FWHM	Largura total à meia altura
GLU	Glutathione
GO	Óxido de grafeno
HDA	Hexadecilamina
HER2	Fator de crescimento epidérmico humano Receptor tipo 2
RP-HPLC	Cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa
HSA	Albumina do soro humano
LEDs	Díodos emissores de luz
LSPR	Ressonância de plasmon de superfície localizada
MEG	Geração múltipla de éxciton

Mn	Magnésio
MPA	Ácido mercaptopropiônico
MSA	Ácido mercaptosuccínico
NAA	Alumina anódica nanoporosa
NEM	<i>N</i> -etilmaleimida
OVO	Ovoalbumina
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PEG	Polietilenoglicol
PIET	Transferência de elétrons fotoinduzida
PL	Fotoluminescência
PP	Fosfoluminescência
PT	Protamina
QD	Quantum dots
QD-CdTe _{0.5}	Quantum dot de CdTe sintetizado em 30 minutos
QD-CdTe ₁	Quantum dot de CdTe sintetizado em 60 minutos
QD-CdTe _{1.5}	Quantum dot de CdTe sintetizado em 90 minutos
QD-CdTe ₂	Quantum dot de CdTe sintetizado em 2 horas
QD-CdTe ₄	Quantum dot de CdTe sintetizado em 4 horas
QD-CdTe ₆	Quantum dot de CdTe sintetizado em 6 horas
QD-CdTe-PT	Bioconjugado formado a partir da interação entre o QD e a protamina
RITC	Isotiocianato de rodamina
SBTI	Inibidor Kunitz
Sers	Dispersão de Raman
SiNPs	Nanopartícula de silício
SiQDs	Quantum dots de silício
TBA	Aptamer de ligação de trombina
TEM	Microscopia eletrônica de emissão
TGA	Ácido tioglicólico
TOP	Trioctilfosfina
TOPO	Óxido de trioctilfosfina
TP	Tripsina
UCNPs	Nanopartícula de conversão ascendente dopada com lantanídeo
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 QUANTUM DOTS.....	19
1.1.1. Mecanismo de transição eletrônica.....	21
1.1.2 Propriedades físico-químicas dos quantum dots.....	23
1.1.3 Superfície dos quantum dots: modificação química e bioconjugação.....	25
1.1.4 Aplicações dos quantum dots como nanosondas fluorescentes.....	29
2. JUSTIFICATIVA.....	33
3. IMPORTÂNCIA PARA A SOCIEDADE.....	33
4. OBJETIVOS.....	34
4.1 Objetivo geral.....	34
4.2 Objetivos específicos.....	34
5. EXPERIMENTAL.....	35
5.1 Reagentes e soluções	35
5.2 Síntese dos quantum dots de CdTe funcionalizados com MSA.....	35
5.3 Caracterização espectroscópica de CdTe-MSA.....	36
5.4 Procedimentos.....	37
5.4.1 Parâmetros físico-químicos.....	37
5.4.2 Ensaio de fotoluminescência para a protamina.....	37
5.4.3 Ensaio de fotoluminescência para a tripsina.....	38
5.4.4 Ensaio de inibição da tripsina.....	38
5.4.5 Ensaio de seletividade para a tripsina.....	38
5.4.6 Preparação de amostras.....	39
5.5 Ensaio de biotoxicidade das nanosondas.....	40
5.6 Tratamento estatístico.....	40
6. BIOCONJUGAÇÃO ENTRE QUANTUM DOTS DE CDTE FUNCIONALIZADOS COM ÁCIDO MERCAPTOSUCCÍNICO E PROTEÍNA CATIÔNICA: MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE PROTAMINA EM AMOSTRAS DE MEDICAMENTO E URINA	41

6.1	<i>Introdução</i>	41
6.2	<i>Resultados e discussões</i>	43
6.2.1	<i>Síntese do quantum dot de CdTe funcionalizado com MSA</i>	43
6.2.2	<i>Avaliação da interação do bioconjugado QD-CdTe-PT</i>	45
6.2.3	<i>Otimização dos parâmetros analíticos</i>	46
6.2.3.1	<i>Efeito do pH na interação QD-CdTe-PT</i>	46
6.2.3.2	<i>Avaliação do tipo e concentração do tampão utilizado</i>	48
6.2.3.3	<i>Avaliação da concentração do CD-CdTe₁ e influência da força iônica</i>	49
6.2.3.4	<i>Avaliação da cinética reacional e fotoestabilidade</i>	50
6.2.4	<i>Figuras de mérito do método proposto</i>	50
6.2.5	<i>Avaliação do mecanismo de formação do bioconjugado QD-CdTe₁-PT</i>	53
6.2.5.1	<i>Avaliação da agregação do nanomaterial</i>	53
6.2.5.2	<i>Tipo de quenching e ensaios termodinâmicos</i>	55
6.2.6	<i>Aplicações da nanosondas em amostras de medicamento e urina</i>	59
6.3	<i>Conclusão</i>	60
6.4	<i>Perspectivas</i>	61
7.	UTILIZAÇÃO DO BIOCONJUGADO QD-CdTe-PT COMO UM NANOSENSOR ON-OFF-ON PARA A QUANTIFICAÇÃO DE TRIPSINA EM AMOSTRAS DE URINA E PLASMA	62
7.1	<i>Introdução</i>	62
7.2	<i>Resultados e discussões</i>	64
7.2.1	<i>Síntese e caracterização dos quantum dots de CdTe funcionalizados com MSA</i>	64
7.2.2	<i>Avaliação da interação do sistema QD-CdTe-PT com a tripsina</i>	65
7.2.3	<i>Otimização dos parâmetros analíticos</i>	66
7.2.3.1	<i>Influência do tamanho do QD-CdTe e da PT na detecção de TP</i>	66
7.2.3.2	<i>Efeito do pH na interação QD-CdTe-PT com a TP</i>	67
7.2.3.3	<i>Tipo e concentração do tampão utilizado</i>	68
7.2.3.4	<i>Avaliação da concentração do QD e da protamina e efeito da força iônica</i>	70
7.2.3.5	<i>Cinética e estudo de fotoestabilidade</i>	72
7.2.3.6	<i>Aplicação de inibidores para a tripsina</i>	73
7.2.3.7	<i>Mecanismo de formação do QD-CdTe₆-PT-TP</i>	77

7.2.3.8 Avaliação da seletividade do método.....	78
7.2.4 Figuras de mérito do método proposto.....	80
7.2.5 Aplicações da nanosondas em amostras.....	83
7.2.6 Ensaio de biotoxicidade das nanosondas.....	84
7.3 Conclusão.....	85
7.4 Perspectivas do trabalho.....	86
8. REFERÊNCIAS.....	87

1. INTRODUÇÃO

No ramo científico, especialmente nas áreas químicas, biológicas e medicinais, um dos grandes objetivos é compreender as transformações químicas e os detalhes moleculares nelas envolvidos, uma vez que essa decodificação pode promover uma melhora significativa na eficiência, sustentabilidade e velocidade dos procedimentos de diagnóstico e terapêuticos já existentes, além de permitir o desenvolvimento de novos tipos de medicamentos que são mais seletivos ao órgão e tecido onde eles são necessários, promovem a produção de tecidos e órgãos semisintéticos como substitutos para órgãos danificados, levam ao aprimoramento da terapia genética e ajudam na resolução de uma série de problemas clínicos. De maneira geral, esses avanços são essenciais para a prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças. Nesse sentido, a compreensão da composição, estrutura, função, possíveis reações e local de atuação de proteínas e enzimas são de fundamental importância uma vez que estas biomoléculas desempenham papéis essenciais no metabolismo e são amplamente exploradas nos meios farmacêuticos e medicinais (National Research Council (US) Committee on Challenges for the Chemical Sciences, 2003).

As proteínas têm uma ampla gama de aplicações no organismo, como função estrutural, regulação da expressão gênica, transdução de sinal, catálise de reações, transporte e anticorpos. Além disso, são muito utilizadas em baixas doses como biofármacos para o tratamento e prevenção de doenças e para modular o sistema imunológico de forma a atingir a resposta terapêutica desejada. Podemos citar como exemplo seu uso como hormônios, fator de crescimento, fator de coagulação, anticoagulante, anticorpos monoclonais para vários tipos de câncer e doenças autoimunes, vacinas terapêuticas, entre outros. Apesar disso, as proteínas também estão associadas a várias condições patológicas, como diabetes, hipertensão e câncer (DEB et al., 2019; AGRAWAL et al., 2011).

De maneira análoga, as enzimas são responsáveis por uma série de reações bioquímicas e promover o metabolismo dos organismos, estando diretamente envolvidas em processos como digestão, absorção, respiração e reprodução. Além disso, essas biomoléculas possuem grandes aplicações medicinais e em procedimentos analíticos, sendo utilizadas como medicamentos e agentes terapêuticos, tendo por exemplo sua aplicação em casos de problemas digestivos, para aceleração na cicatrização, como antibiótico e antiviral, entre outras patologias as quais podem auxiliar. Ademais, podem auxiliar no diagnóstico de doenças através da medição de analitos e alterações de certas substâncias no corpo. Entretanto, assim como as

proteínas, as enzimas também estão envolvidas em patologias de várias doenças humanas, como anemia hemolítica, hiperplasia adrenal congênita, doença de Gaucher, deficiência de piruvato quinase, entre outras (COLTER, 2019; ROBINSON, 2015; DRAKE, MILLER, & JONES, 2011).

Devido as suas funções, possibilidade de aplicação medicinal e ao seu envolvimento em várias doenças, é imprescindível o desenvolvimento de métodos voltadas para a detecção e quantificação tanto de proteínas quanto de enzimas, o que pode auxiliar na compreensão de patologias, propiciar melhorias dos testes diagnósticos e ajudar no monitoramento da sua viabilidade quando utilizadas como medicamento. Por possuir uma alta sensibilidade, rapidez na análise, baixo custo se comparada a outras técnicas de análise e por não necessitar do uso de materiais radioativos, a espectroscopia de fluorescência é um método que vem sendo bastante empregado para realizar a análise dessas biomoléculas em sistemas *in vivo* e *in vitro*. Para isso, é utilizado uma sonda ou sensor fluorescente que é capaz de detectar, quantificar ou mostrar a localização da biomolécula alvo (LAKOWICZ, 2006).

Na química, um sensor é definido como um dispositivo analítico independente que transforma uma informação química de uma amostra em um sinal que pode ser mensurável, como, por exemplo, a concentração de um analito em uma amostra que é transformada em corrente elétrica e essa é proporcional à quantidade do analito (HULANICKI; GLAB & INGMAN, 1991). Os sensores são amplamente utilizados devido a sua sensibilidade, tempo de resposta rápido e simplicidade técnica, podendo ser constituídos por corantes fluorescentes, complexos de metais de transição, materiais de carbono, como o grafeno, ou pequenas moléculas, sendo utilizados para reconhecimento molecular de aminoácidos, nucleotídeos, proteínas, DNA e tumores (IMAMURA et al., 2017; YU et al, 2018; LAKSHMANA, KHANDAGALE & ASWATH, 2013).

Por outro lado, uma sonda é uma molécula que se liga reversivelmente a um alvo biológico, como o DNA, proteínas e células, e é usada para estudar e manipular esse sistema através da utilização de luz ou de um sensor ligado a algum equipamento, obtendo assim informações quantitativas e qualitativas sobre propriedades fisiológicas e bioquímicas, sendo também capaz de visualizar e quantificar eventos dinâmicos dentro de células vivas, tecidos ou mesmo órgãos com um mínimo de perturbação. (ARROWSMITH, 2015). Assim como os sensores, as sondas fluorescentes podem ser utilizadas para a determinação de aminoácidos, peptídeos, proteínas, enzimas, DNA, células, entre outras biomoléculas, podendo ser constituídas, por exemplo, por aminoácidos aromáticos, complexos metálicos, pequenas ou grandes moléculas orgânicas fluorescentes, como a rodamina e a fluoresceína e seus derivados,

e proteínas modificadas (GOLÇALVES & SAMEIRO, 2009; Ueno & Nagano, 2011; FRICKER et al., 1999).

Buscando o desenvolvimento de métodos mais sensíveis e econômicas para o monitoramento do meio biológico e determinação de biomoléculas que fossem mais sensíveis ou seletivas que os fluoróforos tradicionalmente utilizados., a nanotecnologia foi introduzida como um meio promissor para o alcance desse objetivo. Por convenção, define-se a nanotecnologia como a ciência que estuda, projeta, caracteriza, produz e encontra aplicações para materiais ou sistemas cuja uma de suas dimensões possua um tamanho entre 1 a 100 nm, de modo a contribuir na resolução de problemas presentes na sociedade como, por exemplo, a detecção precoce de doenças, a investigação e eliminação de contaminantes como microorganismos e pesticidas em alimentos, água e no ambiente e o desenvolvimento de meios de armazenamento de elevadas quantidades dados (PRATAP, 2019).

Devido ao seu pequeno tamanho, as nanopartículas conseguem circular por todo o corpo, incluindo adentrar em células, além de possuírem a capacidade de se ligar a diversas biomoléculas, o que permite uma determinação mais exata do analito, o desenvolvimento de novos procedimentos mais precisos e sensíveis no diagnóstico e tratamento de doenças, a obtenção de sistemas inovadores de administração orientada e o aperfeiçoamento de medicamentos. Por esse motivo, diferentes grupos científicos buscam um maior entendimento e desenvolvimento de nanosensores e nanosondas, visto o grande interesse no melhoramento da sensibilidade e eficiência dos métodos já existentes, ao mesmo tempo que analisam os riscos associados à sua utilização, já que estes ainda podem apresentar um certo grau de toxicidade e gerar respostas autoimunes (OLSSON et al., 2011).

Nanosondas ou nanosensores são materiais onde ao menos uma de suas dimensões estão em escala manométrica, sendo amplamente explorados para monitoramento de eventos de biorreconhecimento e biodetecção ultrasensível de proteínas, enzimas, ácido nucléicos, tumores e outras biomoléculas. Sua ampla aplicação é derivada de suas propriedades físicas e químicas adaptáveis, como grande número de locais de ligação, utilização de diferentes funcionalizantes de superfície seletivos ao analito, comprimento de onda de emissão ajustável de acordo com o tamanho e capacidade de detectar o analito usando quantidades extremamente limitantes de amostra devido a sua alta proporção de área de superfície/volume (XU et al., 2014). Os tipos de nanosenores são bastante variados, cada um com suas vantagens e desvantagens e características específicas, podendo ser categorizados por diferentes estratégias de detecção de sinal, as quais são relaxamento óptico, mecânico, elétrico e magnético (Tabela 1).

Tabela 1. Características gerais de alguns nanosensores para biomarcadores.

¹ Método de detecção	² Nanopartícula (NP)	³ Limite de detecção	Vantagens	Desvantagens
Óptico				
LSPR	NPs de metal, NPs de sílica aprimorados com Au	pM - 10 ⁻¹²	Detecção flexível	Partículas altamente uniformes
Colorimétrico	AuNPs, AgNPs	nM - 10 ⁻⁹	Sinal fácil de ler	Alta concentração de sonda
Fluorescência	AuNPs, QD, CD, CNTs,	pM - 10 ⁻¹²	Detecção in vivo	Sinal de branqueamento ou ruído
Sers	AuNPs aprimorado com nanodumbbells Ag, Au-A-shell	zM - 10 ⁻²¹	Detecção in vivo	Sinal ruidoso
Mecânico	Microcantilevers, ressonadores microcanais suspensos	fM - 10 ⁻¹⁵	Baixos volumes de amostragem	Sensibilidade afetada pelo fluido viscoso
Elétrico	Nanofios de silício e nanofios de carbono, nanotubos de carbono. folhas de grafeno	fM - 10 ⁻¹⁵	Tempo de análise rápida	Sensibilidade afetada pelas concentrações de sal
Ressonância Magnética	Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnetic	zmol - 10 ⁻²¹	Detecção in vivo	Sistema de detecção de sinal intrincado

¹Método de detecção: LSPR- ressonância de plasmon de superfície localizada; Sers- dispersão de Raman.

²Nanopartícula (NP): AuNP- nanopartícula de ouro; AgNP- nanopartícula de prata; CD- carbono dots; CNTs- nanotubos de carbono.

³Limite de detecção: pM- picomolar; nM- nanomolar; zM- zeptomolar; fM- femtomolar.

Fonte. Adaptado de SWIERCZEWSKA et al., 2012.

O enfoque, no entanto, será voltado para os nanosensores/nanosondas de detecção óptica, uma vez que esta categoria engloba a utilização de medidas de fluorescência, o qual é o método mais comumente explorado para determinação e monitoramento de biomoléculas, cujos métodos incluem espectroscopia de fluorescência molecular, transferência ressonante de energia por fluorescência (FRET), microscopia óptica de fluorescência, entre outras. Dentre os nanosensores ou nanosondas fluorescentes, podemos citar as nanopartículas de ouro (AuNPs), os nanotubos de carbono (CNTs), os *carbon dots* (CD) e os *quantum dots* (QD) devido a sua ampla utilização e exploração no meio científico. Entretanto, a última nanopartícula citada merece um maior destaque (RONG et al, 2019; SWIERCZEWSKA et al., 2012).

Descoberto no início da década de oitenta, os *quantum dots* (pontos quânticos, QD) são um dos nanomateriais que nos últimos 20 anos vem ganhando cada vez mais notoriedade no campo científico (NOHARA, 2012). Devido as suas características ímpares, como maior tempo de vida útil, resistência a fotodegradação e bandas de emissão estreitas e ajustáveis, esse nanomaterial são explorados em análises químicas, sendo especialmente utilizados como sondas e/ou sensores na detecção de diversos analitos, como íons, pequenas moléculas, proteínas, ácidos nucleicos e células, através da supressão ou do aumento da fluorescência, podendo ser aplicado em sistemas biológicos para a análise e monitoração de diversos processos, tais como imageamento e monitoração em sistemas vivos, desenvolvimento de novas terapias e diagnóstico clínico (CUI, HE & CHEN, 2015).

Apesar da versatilidade e das gamas de características que favorecem a sua aplicação, sua utilização em procedimentos de análise deve ser previamente estudada visto que, em matrizes que possuem uma alta diversidade de componentes, como próprio meio biológico, o *quantum dot* pode interagir com outros compostos e/ou mascarar o analito, além de provocar a diminuição do rendimento quântico e/ou a deterioração do nanomaterial. Por esse motivo, é primordial, além da utilização de agentes funcionalizantes com uma elevada seletividade, o entendimento das propriedades físico-químicas desses nanomateriais e de como elas podem ser modificadas dependendo do ambiente em que se encontram, de modo a se obter resultados precisos e exatos durante o procedimento de análise (LIMA; ALMEIDA, 2016).

1.1 QUANTUM DOTS

Pontos quânticos (*quantum dots*, QD) são nanopartículas fluorescentes formadas a partir de materiais semicondutores inorgânicos, possuindo suas três dimensões em nanoescala, as quais medem geralmente entre 1-10 nm, variando de acordo com o material utilizado em sua constituição (Tabela 2), e apresentando características intermediárias entre os materiais macroscópicos que os possuem e os átomos e/ou moléculas (VITORETI, 2017; FILHO, 2008).

Essas nanopartículas são geralmente compostas por elementos dos grupo II-IV (grupamento 1), III-V (grupamento 2) e IV-VI (grupamento 3) da tabela periódica, tendo como principais representantes do grupamento 1 *quantum dots* de CdSe e CdS, do grupamento 2 o InP e InAs e do grupamento 3 QDs de PbSe (ONYIA et al., 2018). Devido as suas características ímpares, como elevado rendimento quântico, largo espectro de absorção e emissão, alta estabilidade e capacidade de se conjugar a biomoléculas, os QD têm sido bastante empregados como marcadores fluorescentes em processos dinâmicos que ocorrem nos sistemas biológicos (LÓPEZ, 2014), como já anteriormente mencionado.

Apesar das vantagens quando comparados aos marcadores orgânicos atualmente utilizados, conforme pode ser observado na Tabela 3, estes possuem um certo grau de toxicidade uma vez que podem liberar ametais/metais tóxicos como selênio ou cádmio e levar a geração de espécies de oxigênio reativas em excesso. Entretanto, pesquisas mostram que, quando recobertos com biomoléculas ou polímeros biocompatíveis, sua toxicidade diminui consideravelmente (CANCINO, MARANGONI, ZUCOLOTTI, 2014).

Além de sua ampla aplicação em sistemas biológicos como marcadores fluorescentes de biomoléculas, os *quantum dots* também tem sido utilizados como sondas para análises de diferentes substâncias, em fotodetectores de infravermelho para uso na área computacional, na criptografia quântica, para a produção de diodos e lasers, melhoramento de células solares fotovoltaicas de alta eficiência, entre outros (MACHADO et al., 2015).

Tabela 2. Composição, variação do tamanho e faixa de emissão de alguns QD comumente sintetizados.

Composição	Tamanho (nm)	Intervalo de emissão
ZnSe	4.3 – 6.0	UV-vis (depende do tamanho)
ZnSe:Mn	2.7 – 6.3	UV-vis (depende do tamanho)
CdSe	1.0 – 25	Visível
CdS	1.0 – 6.0	UV-vis (depende do tamanho)
CdTe	2.0 – 8.0	Visível
InP	3.0 – 4.6 2.6 – 4.6	UV-vis, perto do infravermelho (depende do tamanho)
InAs	2.8 – 6.0	Infravermelho
GaP	2.0 – 3.0	UV-vis (depende do tamanho)
GaInP2P	2.5 – 6.5	UV-vis (depende do tamanho)
PbSe	3.0 – 12.0	Perto e no meio do Infravermelho
SnTe	4.5-15	Meio do infravermelho

Fonte. Adaptado de Shepard et al., 2009.

Tabela 3. Comparação das propriedades de fluoróforos orgânicos e pontos quânticos.

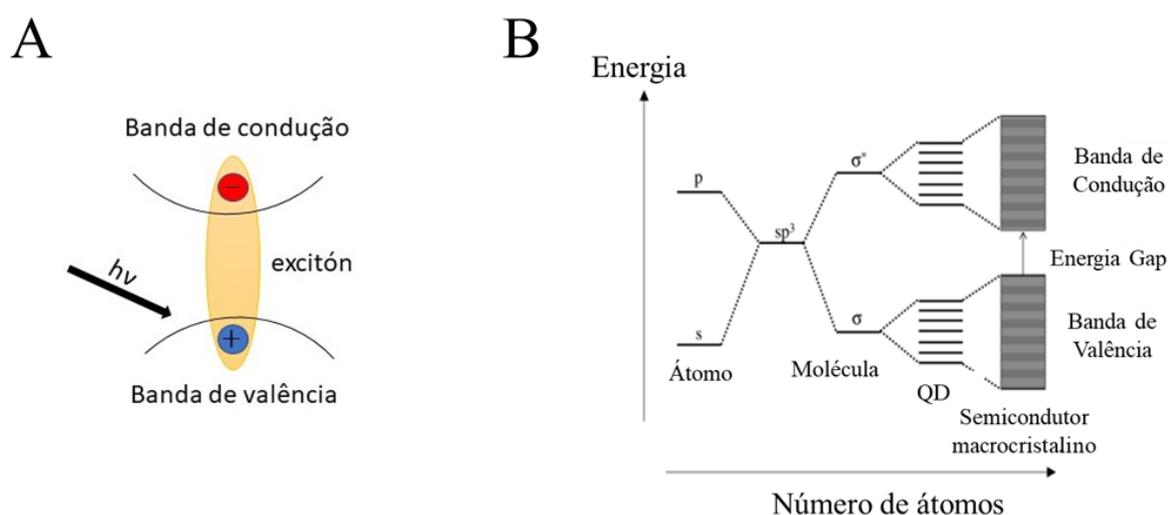
Propriedade	Fluoróforo orgânico	Quantum dot
Espectros de absorção	Variável / estreito- geralmente um espelho dos espectro de emissão	Espectros amplos, aumenta constantemente para o UV da primeira borda da banda de absorção
Rendimento quântico	Variável, de baixo a alto	Geralmente alta
Fotoestabilidade	Variável, geralmente baixa	Excelente, forte resistência a fotodegradação de várias ordens de magnitude que dos corantes
Capacidade de multiplexação	Raro	Alta capacidade
Resistência Química	Variável	Alta resistência
Reatividade	Múltipla reatividade comercialmente disponível	Química de conjugação limitada
Coefficiente de extinção molar	Variável, normalmente $<< 200,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	Alta, 10-100 vezes maior que a dos fluoróforos
Fluorescência- tempo de vida útil	Curta, $< 5 \text{ ns}$	Longa, 10-20 ns ou superior

Fonte. MARTÍN-PALMA, 2009.

1.1.1 Mecanismo de transição eletrônica

Assim como acontece com os materiais semicondutores macroscópicos, quando um QD é excitado, seus elétrons transitam da banda de valência para a banda de condução, provocando o surgimento de algo similar a uma “*lacuna*” ou “*espaço*” na banda de valência, a qual agora passa a ter uma carga positiva devido a perda do elétron, gerando assim uma espécie com comportamento semelhante ao átomo de hidrogênio denominada de excitón (Fig. 1A) (MEDONÇA, 2008).

Figura 1. Esquema de energia para (A) formação de um excitón e (B) necessária para haver a transição eletrônica em átomos, moléculas, *quantum dots* e semicondutores.



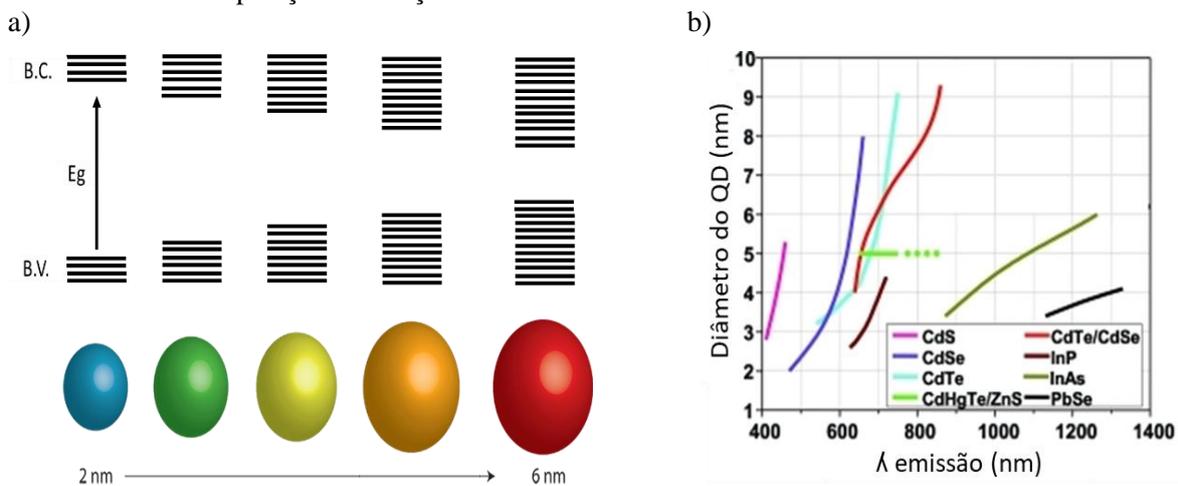
Fonte: adaptado de SANTOS, 2016 & adaptado de PARAK et al., 2004.

Devido aos QD possuírem suas três dimensões em nanoescala e por seu raio ser menor ou igual ao raio de Born do excitón, a banda de valência e de condução ficam extremamente próximas, o que faz com que haja uma atração eletrostática entre elas e que seus níveis eletrônicos e energéticos se assemelhem mais aos átomos e/ou moléculas do que os materiais semicondutores macroscópicos, conforme pode ser observado na Fig. 1B, o que faz com que os *quantum dots* possuem características tanto dos semicondutores inorgânicos que os constituem quanto dos átomos ou moléculas. Este fenômeno acima descrito é denominado como confinamento quântico e, devido ao QD possuir suas três dimensões em nanoescala e sua elevada razão superfície/volume, nos QDs é considerada do tipo 3D (MEDONÇA, 2008; TRINDADE & MARTINS, 2012).

De maneira simplificada, o confinamento quântico pode ser estruturalmente comparado a uma caixa esférica onde os elétrons encontram-se confinados, ou seja, as funções de onda do elétron estão espacialmente confinadas pela dimensão do próprio *quantum dot*.

Devido a esse confinamento, seus elétrons possuem uma energia quantizada em valores discretos e seguem o Princípio de Exclusão de Pauli, assim como nos átomos. Quanto menor for o QD, maior é o confinamento quântico e maior é a distância entre as bandas de valência e de condução, o que implica que é necessário fornecer uma maior energia para que haja a sua excitação (Fig. 2a), o que também implica que uma maior energia é liberada quando o QD retorna ao estado fundamental (CHAVES, 2006; ARNAUD, 2012).

Figura 2. Esquema relacionando ao a) aumento da E_g (energia de *band gap*) de acordo com a diminuição da dimensão do *quantum dot* b) comprimento máximo de emissão de *quantum dots* de acordo com sua composição e variação de seu diâmetro.



Fonte: adaptado de CHADWICK, 2019 & adaptado de MENDITZ, 2008.

Como a quantidade de energia é inversamente proporcional ao comprimento de onda ($E = hc/\lambda$), pode-se afirmar que *quantum dots* maiores tendem a emitir em regiões mais próximas do vermelho enquanto que os menores emitem em regiões mais próximas do azul. Dessa forma, como a região de emissão desse nanomaterial depende fortemente do seu tamanho, *quantum dots* constituídos por um mesmo material pode absorver/emitir luz em diferentes colorações, desde que haja um controle do seu tamanho durante a síntese, o que pode ser visualizado na Fig. 2-b.

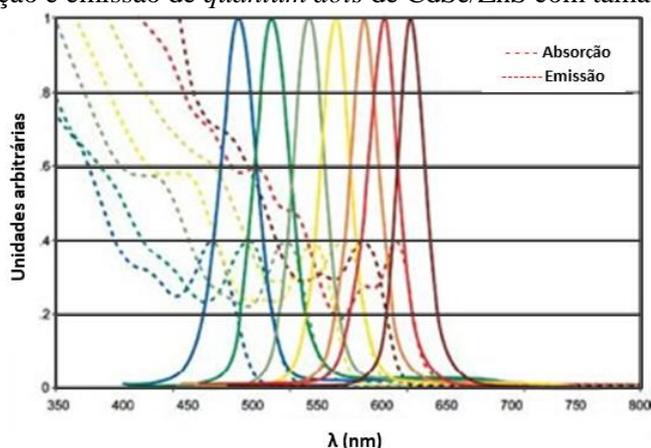
Logicamente, os materiais macroscópicos que compõem os QD também influenciam diretamente em seu espectro de absorção/emissão devido a variação dos estados de energia da banda de valência e de condução desses semicondutores (CLAPP, MATTOUSSI, MEDINTZ, 2012). Como pode ser observada na Fig. 2-b e conforme Tabela 2, diferentes *quantum dots* com um mesmo tamanho apresentam bandas de emissão diferentes e o material do qual o QD é constituído influencia em suas propriedades espectroscópicas e no seu tamanho.

1.1.2 Propriedades físico-químicas dos quantum dots

As propriedades físico-químicas desses nanomateriais, tais como comprimento de onda de absorção e emissão, temperatura de transição de fase e condutividade elétrica dependem, além dos semicondutores que o constituem, de seu tamanho. Essa dependência é decorrente de dois fatores: o primeiro está relacionado a quantidade de átomos presentes em sua superfície, o qual representa uma parte significativa do total de átomos no *quantum dot*, o que influencia diretamente em um aumento ou diminuição da energia livre, e determinando as variações termodinâmicas (CHAVES, 2011); o segundo, conforme já discutido, está relacionado ao confinamento quântico, onde os elétrons encontram-se espacialmente confinados e tem sua energia quantizada (OLIVEIRA, 2009).

Dentre suas características, a mais visada e estudada está relacionada ao processo de fotoluminescência, a qual depende dos fatores acima mencionados. No processo de emissão, assim como na maioria dos casos, o elétron passa para um estado excitado, perde energia de uma forma não-radioativa e depois retorna ao estado fundamental emitindo fóton. *Quantum dots* de uma mesma composição e tamanho pode absorver qualquer fóton cuja energia seja maior que a do seu hiato energético, entretanto, independentemente da quantidade de energia absorvida, os comprimentos de onda máximo de emissão são sempre os mesmos, variando apenas a intensidade de acordo com a quantidade de energia utilizada na excitação. Caso haja impurezas presentes na solução contendo os *quantum dots*, a emissão de um fóton ocorre após uma transição não-radiativa da banda de condução até o nível de impureza (SUMANTH,2018).

Figura 3. Espectro de absorção e emissão de *quantum dots* de CdSe/ZnS com tamanhos variados.

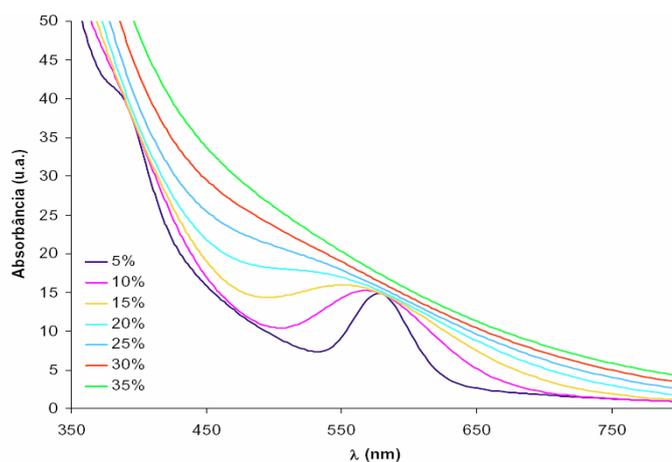


Fonte: TURKIN, 2010.

Para um mesmo QD, pode-se observar que há um deslocamento do comprimento de onda máximo de emissão para o vermelho se comparado ao comprimento de onda máximo de absorção, e esse padrão continua independentemente do tamanho do QD (Fig. 3). Isso ocorre

devido a a (re)normalização da energia do *band gap*. Essa (re)normalização ocorre devido a atração eletrostática existente entre as bandas de valência e condução, o que provoca a perda e a diminuição da energia do *band gap*, logo a energia do fóton emitido é menor em relação ao fóton absorvido. A diferença de energia entre o máximo de emissão e o de absorção é denominado de deslocamento Stokes (ALMEIDA, 2005).

Figura 4. Espectro de absorção em função do comprimento de onda de *quantum dots* de CdTe de 2 nm com diferentes parâmetros de dispersão desse tamanho variando entre 5 e 35%.



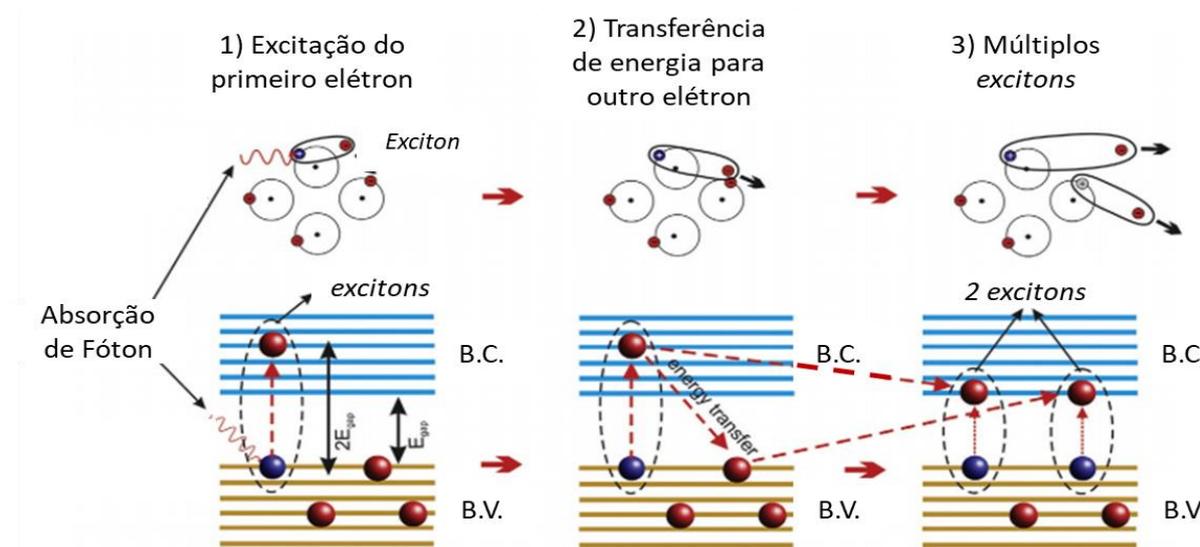
Fonte: ALMEIDA, 2005.

Observando exclusivamente os espectros de absorção na Fig. 4, pode-se notar que há um alargamento nos espectros obtidos de acordo com o grau de dispersão dos tamanhos dos QD em solução, ou seja, as soluções cujos quantum dots são monodispersos apresentam bandas bem resolvidos e estreitos, enquanto que com quantum dots polidispersos há a formação de bandas largas, chegando ao ponto onde não há o aparecimento de um pico característico. Esse fenômeno ocorre pelo fato dos QDs polidispersos absorverem energia em regiões próximas. Logo, em uma única análise, além de supor em que região do espectro o quantum dot irá emitir radiação e o seu tamanho, pode-se avaliar o grau de dispersão ou a pureza desse nanocrystal em solução (ALMEIDA, 2005).

Além dessas propriedades, a solubilidade dos *quantum dots* constitui um tema de grande relevância, uma vez que, de acordo com o meio ao qual possui uma maior estabilidade, diferentes aplicações podem ser propostas. De acordo com o agente funcionalizante ao qual o nanocrystal esteja ligado, ele pode ser solúvel em meio aquoso ou no meio orgânico. Se o agente funcionalizante possuir estrutura maiores e com características mais apolares, o *quantum dots* possuirá uma maior afinidade com solventes orgânicos, entretanto, caso o funcionalizante possua curtas cadeias e/ou apresenta grupos funcionais polares, o *quantum dot* deverá ser mais solúvel em meio aquoso (VALE, 2015).

Outra propriedade pertinente que pode ocorrer nos QDs e que se têm mostrado promissora em dispositivos fotovoltaicos para uma melhor eficiência é a geração múltipla de éxciton (MEG). O MEG é um fenômeno onde um único fóton incidente excita mais que um único elétron para a banda de condução (Fig. 5). Nos QDs, o MEG foi o primeiramente demonstrado no seleneto de chumbo (PbSe) e posteriormente também foi demonstrado em PbS, CdSe, CdSe e outros materiais. Se a eficiência do MEG puder ser aprimorada ainda mais e a separação e o transporte de carga puderem ser otimizados nos QD, as células solares com QD poderão levar a tecnologias de conversão de energia solar de terceira geração (SUMANTH,2018). Vale salientar que, neste trabalho, o mecanismo de excitação do QD está relacionado apenas à parte (1) presente na Fig. 5.

Figura 5. Esquema do mecanismo de MEG que ocorre nos QDs.



Fonte: Adaptado de SUMANTH, 2018.

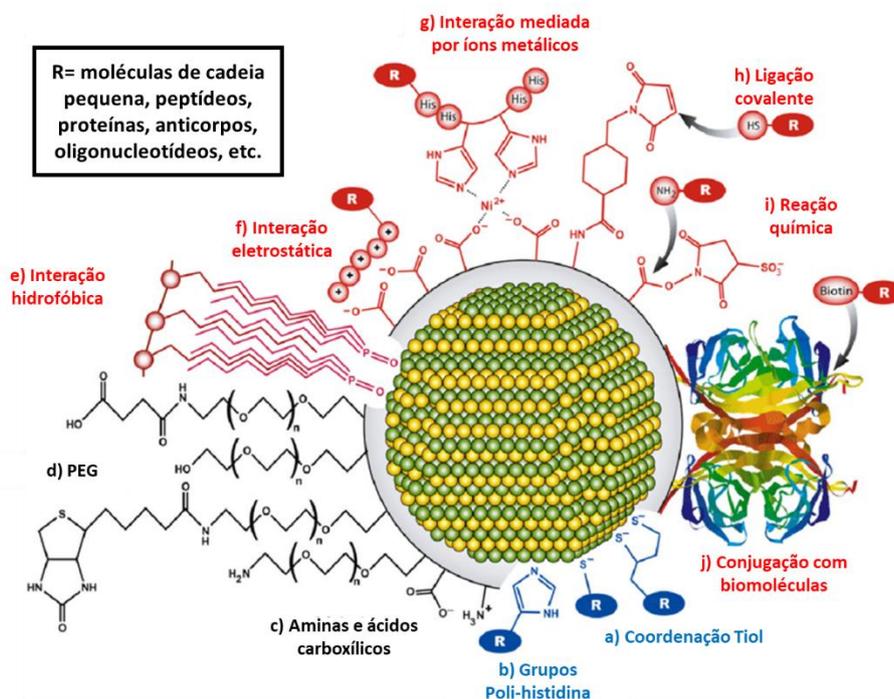
1.1.3 Superfície dos quantum dots: modificação química e bioconjugação

De maneira geral, os nanomateriais geralmente precisam passar por modificações em sua superfície, como reações químicas e/ou bioconjugação, de modo a realizar sua funcionalização e controlar e/ou melhorar as propriedades físico-químicas, toxicológicas e farmacológicas desses nanocompostos, além de propiciar grupos funcionais reativos que permitem realizar a conjugação com, por exemplo, agentes de contraste, anticorpos, peptídeos, ligantes, drogas e genes, e construir nanomateriais multifuncionais e híbridos para a geração de imagens e tratamento direcionados de cânceres. Dessa forma, de modo a propiciar um aumento na solubilidade em um determinado solvente, dificultar a agregação, manter a fotoestabilidade,

elevar o rendimento quântico, diminuir a toxicidade e proporcionar grupos funcionais que pode interagir seletivamente com um analito e/ou formar complexos com outras biomoléculas, os *quantum dots* podem ser funcionalizados com diferentes substâncias sem que estas interferiram nas propriedades espectroscópicas e na coalescência desses nanomateriais (ARNAUD, 2012; CHAVES, 2006).

No procedimento de funcionalização, utiliza-se geralmente pequenas moléculas orgânicas que em uma das extremidades são capazes de interagir especificamente com o analito enquanto que a outra consegue estabelecer fortes ligações com o QD através de atração eletrostática, quimissorção, interação hidrofóbica ou, preferencialmente, ligação coordenada. Podemos citar como exemplos de possíveis agentes funcionalizantes compostos do tipo alquil tióis, fosfato e fosfonatos orgânicos, amidas, aminas e ácidos carboxílicos. Entretanto, moléculas mais complexas, como polímeros, proteínas e oligonucleotídeos também podem ser utilizadas como agentes funcionalizantes, desde que não interfira no rendimento quântico do nanocristal. Dependendo do tipo e natureza da cadeia do funcionalizante utilizado, o *quantum dot* pode ter uma maior solubilidade em meio aquoso ou em meio orgânico (ROCHA, 2017). A Fig. 6 abaixo mostra alguns funcionalizações e formas de interação.

Figura 6. Esquemas representando algumas formas de funcionalização, interação e bioconjugação de QDs.



Fonte: Adaptado de KNOBLAUCH et al., 2014.

Como estes funcionalizantes apresentam um comportamento dinâmico, capaz de ativar e desativar esses nanomateriais (*on/off*) e ainda permitir ou bloquear o crescimento desses nanocristais, o comportamento desses ligantes na superfície ainda é motivo de estudo (SAPRA, ROGACH, FELDMANN, 2006). Dentre os agentes funcionalizantes, os mais comumente utilizados são os monodentados e, mais especificamente, os que apresentam os grupos funcionais aminas e tióis.

Com relação as aminas, sua fixação no QD ocorre de maneira direta através da doação do par de elétrons presentes no nitrogênio, o qual atua como base de Lewis. Xiaohui & Peng (2008) analisaram o comportamento de alguns funcionalizantes do tipo amina e determinaram que o desempenho dinâmico dessas moléculas está relacionado com a temperatura de reação, tipo do solvente utilizado na síntese, concentração e extensão da cadeia carbônica dos ligantes. Pode-se citar como exemplo, que quando a temperatura da reação utilizada era maior que a temperatura de ebulição das aminas, havia um aumento na taxa de crescimento dos nanomateriais, o que provavelmente ocorre devido aos ligantes permanecerem mais tempo não ligados da superfície e, portanto, favoreceram o crescimento dos mesmos (PRADHAN et al., 2007). Além disso, Huaping et al (2014) citam que aminas primárias podem extinguir ou aumentar a fluorescências dos QDs, dependendo de sua concentração no meio.

Nos grupamentos tióis, a interação ocorre devido à forte afinidade entre o enxofre e o metal constituinte do quantum dot, atuando como ácido e bases moles de Pearson. Dependendo da cadeia a qual o grupamento tiol está ligado, este pode atribuir diferentes características aos QDs. Por exemplo, tióis terminados com ácidos carboxílicos, como o ácido tioglicólico (TGA), são solúveis em meio aquoso, de fácil rota sintética, compactos, carregados e têm estabilidade coloidal por repulsão eletrostática, podendo ser conjugados com grupos amino em biomoléculas como peptídeos, proteínas, anticorpos ou DNA, mas não fornece nem os mais luminescentes ou mais estáveis QDs, levando a sua degradação e perda de fluorescência (ALGAR & KRULL, 2007). Contornando esse problema, Yildiz et al. (2010) utilizou o ligante bidentado polietilenoglicol (PEG) modificado contendo grupos tiol, os quais apresentaram um bom rendimento quântico (~40%) em uma faixa de valores de pH de 5 a 9. De maneira semelhante, Susumu e colaboradores (2009) utilizaram DHLA (ácido di-hidrolipóico) e PEG como agentes funcionalizantes e provocou a estabilização do QD em uma gama completa de valores de pH e reduziu a adsorção inespecífica desses nanomateriais. Apesar dos pontos citados, devido ao tamanho e adaptabilidade, ligantes menores como o ácido mercaptopropiônico (MPA), TGA e DHLA são preferíveis a outros ligantes, especialmente quando o objetivo é utilizar o QD como um biosensor (CHANDAN, SCHIFFMAN & BALAKRISHNA, 2018).

Além dos grupos funcionais, a cadeia molecular do agente funcionalizante também deve ser levada em consideração pois esta deve propiciar características adicionais aos QDs, como solubilidade, mobilidade e direcionamento ao analito (s) de interesse. Chen & Rosenzweig (2002), por exemplo, desenvolveram três QDs de CdS, um funcionalizado com polifosfatos, o qual apresentou sensibilidade a todos os cátions mono e divalentes, outro funcionalizados com tioglicerol, que foi sensível para ferro e cobre, e um funcionalizado com cisteína, que apresentou seletividade ao zinco. Por outro lado, Yan et al. (2010) sintetizou QDs usando como ligante um revestimento de hidrocarboneto e carboxilato altamente sensível a hipoclorito/ácido hipocloroso. Já Labebe e colaboradores (2018) sintetizaram QDs com TGA e cisteína como funcionalizantes sensíveis e seletivos para a detecção de íon Hg^{2+} . Entretanto, tem se tornando muito comum a utilização de moléculas cuja cadeia sirva como ancoragem para a realizar a funcionalização do QD com biomoléculas, como peptídeos, DNA, proteínas e medicamentos.

Levando em consideração os pontos acima citados, o ácido mercaptosuccínico (MSA), apesar de ser menos explorado que os ligantes anteriormente citados, surge como um agente funcionalizante eficaz e com uma ampla gama de aplicações. Possuindo um grupamento tiol e dois ácidos carboxílicos em sua estrutura, o MSA é capaz de se ligar-se covalentemente ao QD e lhe propiciar solubilidade em meio aquoso e uma superfície ativa com carga negativa, a qual é capaz de interagir com uma alta variedade de analitos e facilitar o processo de bioconjugação. Além disso, este funcionalizante também é capaz de estabilizar os QD em soluções ácidas fracas, ao contrário de outros compostos de sua mesma classe, como o TGA e o MPA, que são capazes de estabilizar apenas em soluções alcalinas (YING et al., 2008). Outros estudos também mostram que a utilização de MSA como agente funcionalizante melhora as propriedades ópticas dos QDs de CdTe em comparação com outros agentes amplamente utilizados, como GSH e TGA, como diminuição dos defeitos de superfície por diminuir a taxa de crescimento dos nanocristais, diminuição da taxa de emissão não radioativa e aumento da taxa de recombinação radiativa do elétron, provocando um aumento na fluorescência, no rendimento quântico e do tempo de vida dos QDs de CdTe, o que também propicia, no ponto de vista de imageamento, uma melhor qualidade de imagem (SOUSA et al., 2018).

Com relação ao processo de bioconjugação, existem três estratégias: ligação não covalente, ligação covalente e reações químicas. Na ligação não covalente, a bioconjugação pode ocorrer por adsorção, onde há fortes interações não-polares e/ou eletrostática, fixação direta na superfície do QD por interações dativas, onde se utiliza geralmente o anel imidazol ou um grupamento sulfidril, ou ligação avidina-biotina, em que os anticorpos e outros peptídeos

são pré-modificados com grupos biotina interagem com os QDs funcionalizados com estreptavidina ou vice-versa. Já para as ligações covalentes, a bioconjugação pode ocorrer por acoplamento do grupo carboxílico do QD com uma amina de uma biomolécula, conjugação de duas aminas com o auxílio de agentes de acoplamento homobifuncionais e acoplamento amina-tiol ou álcool-tiol com o auxílio de um agente de acoplamento heterobifuncional. Nas reações químicas, podemos citar a reação de azidas com alcinos, entre derivados da hidrazina e aldeídos ou cetonas e cicloadições de Diels-Alder envolvendo tetrazinas e alcenos (PEREIRA et al., 2019).

Dessa forma, para o MSA, a biconjugação do QD pode ocorrer tanto por ligação não covalente, através de adsorção por via eletrostática, quanto por ligações covalentes, através do acoplamento dos grupos carboxílicos com a biomolécula, não sendo necessário a realização de reações químicas ou etapas adicionais de síntese para a realização de uma bioconjugação.

1.1.4 Aplicações dos quantum dots como nanosondas fluorescentes

Como anteriormente mencionado, um sensor é definido como um dispositivo que transforma uma informação química de uma amostra em um sinal que pode ser mensurável enquanto que uma sonda é uma molécula que se liga reversivelmente a um alvo biológico (ARROWSMITH, 2015; HULANICKI; GLAB & INGMAN, 1991). Os sensores tradicionais são geralmente constituídos por corantes fluorescentes, complexos de metais de transição e materiais de carbono, como o grafeno. Comparado a esses materiais, o QD possui propriedades melhores e mais versáteis, como maior tempo de vida útil, resistência a fotodegradação e bandas de emissão estreitas, logo esses nanomateriais são explorados em análises químicas, sendo especialmente utilizados como nanosondas e/ou nanosensores na detecção de diversos analitos, como íons, pequenas moléculas, proteínas, enzimas, ácidos nucleicos e células, através da supressão ou do aumento da fluorescência, podendo ser aplicado em sistemas biológicos para a análise e monitoração de diversos processos, tais como imageamento e monitoração em sistemas vivos, desenvolvimento de novas terapias e diagnóstico clínico (CUI, HE & CHEN, 2015).

Dessa forma, os QDs e seus respectivos analitos tem sido monitorado por vários métodos analíticas, como eletroforese capilar (EC), reação em cadeia de polimerase (PCR), ensaios por transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET), transferência de elétrons fotoinduzida (PIET), entre várias outras. Dentre as citadas, a técnica que merece

destaque é aquela que envolvem a utilização da fluorescência devido a sua versatilidade, simplicidade, seletividade, sensibilidade e uma gama de aplicações (Fig. 7).

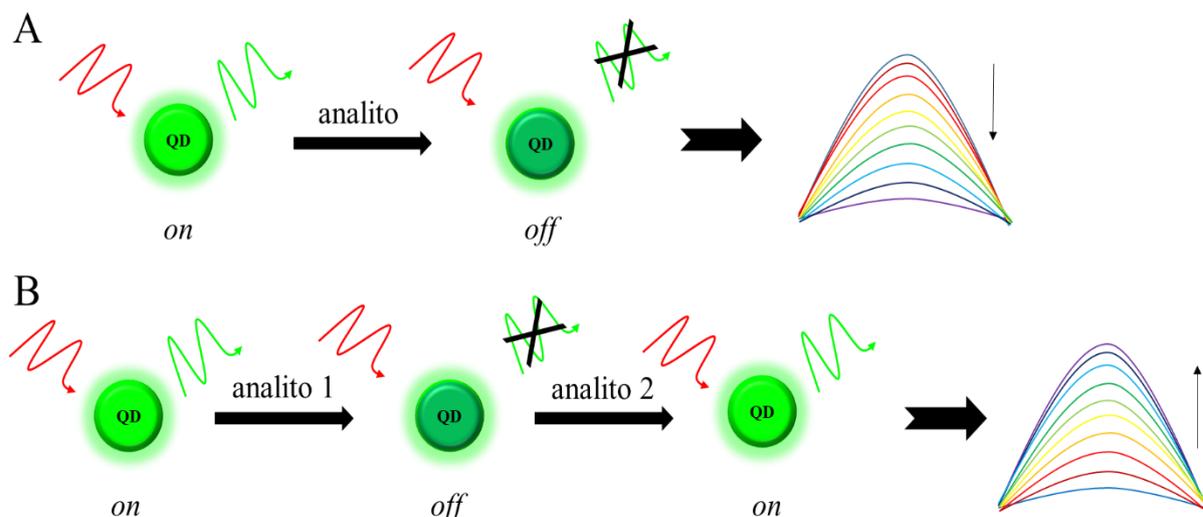
Figura 7. Esquema de diferentes aplicações de QDs no campo das ciências biomédicas. PET: tomografia por emissão de pósitrons; TEM: microscopia eletrônica de transmissão.



Fonte. Adaptado de SINGH et al., 2018.

Na detecção direta por fluorescência, os *quantum dots* podem atuar como sensores do tipo *on/off* e *on/off/on* para a quantificação de íon e micro ou macromoléculas. De maneira geral, em um sistema *on/off*, a fluorescência do QD (*on*) é atenuada quando na presença de um analito (*off*), sendo essa atenuação diretamente proporcional a concentração desse analito no meio. Por outro lado, em um sistema *on/off/on*, o *quantum dot* (*on*), diminui sua intensidade de fotoluminescência devido a presença de um analito ou intermediário (*off*), mas logo recupera essa intensidade máxima de fotoluminescência quando na presença de um segundo analito (*on*), sendo esse aumento proporcional a concentração desse último analito adicionado. A Fig. 8 esquematiza esses dois tipos de sistemas de detecção. Nos ensaios por FRET, realiza-se a detecção de várias biomoléculas através da transferência de energia de forma não-radiativa entre dois cromóforos, sem a necessidade de reabsorção de radiação eletromagnética, além de que a união da espectroscopia de fluorescência com a espectrofluorometria fornece imagens por fotoluminescência.

Figura 8. Esquema geral dos sistemas de detecção do tipo (A) “on/off” e (B) “on/off/on”.



Fonte. Autora deste trabalho, 2020.

São vários os trabalhos presentes na literatura que reportam a utilização do QD para a detecção de analitos através dos sistemas acima mostrados, especialmente quando se trata de proteínas ou enzimas, uma vez que estes nanomateriais apresentam um resultado mais sensível, boa seletividade, simplicidade na preparação das amostras, alta frequência analítica e maior estabilidade que os compostos orgânicos tradicionalmente utilizados, além da facilidade operacional e baixo custo do equipamento utilizado em sua análise (MA, LI & ZHANG, 2018).

Yang et al. (2014), obtiveram QD de CdTe funcionalizados com um polímero impresso molecularmente (EMIP) (*on*), que reconhecia especificamente e quantificava a proteína BSA através da supressão de fotoluminescência (*off*). Similarmente, Sales et al. (2018) sintetizaram QD de CdTe funcionalizados com MPA e modificados com um polímero molecularmente impresso (MIP) (*on*), que interage especificamente com a mioglobina, levando a supressão da fotoluminescência (*off*). Shao et al (2013), por outro lado, sintetizaram QD de CdTe funcionalizados com MPA e íons Cd^{+2} (*on*), o qual primeiramente interagia eletrostaticamente com TBA (aptamer de ligação de trombina), levando a supressão da fotoluminescência (*off*), a qual em seguida era recuperada com a adição de trombina (*on*), que interagia especificamente com TBA. De maneira análoga, Liu et al. (2014) sintetizaram QD de CuInS_2 funcionalizados com cisteína (*on*) que integia eletrostaticamente com heparina diminuindo sua fotoluminescência (*off*), a qual aumentava quando na presença de heparinase (*on*).

Além disso, também é relatado inúmeros trabalhos que demonstram a eficácia da utilização *quantum dots* em aplicações biológicas, diferindo entre si com relação aos semicondutores que compõe esse nanocristal e/ou o agente funcionalizante utilizado. Kai Yang

et al. (2010) sintetizaram *quantum dots* luminescente no infravermelho próximo conjugados a peptídeos, com comprimento de onda de emissão em 800 nm para marcar células BcaCD885 por endocitose. Arnaud (2012) e Cheng et al. (2012), por exemplo, desenvolveram *quantum dots* para detecção de tumores em meio biológico, entretanto, o primeiro utilizou *quantum dots* de quitosana enquanto que o segundo desenvolveu uma nanopartícula com um núcleo de fosfeto de índio e uma casca de sulfeto de zinco. Também é possível mencionar autores como Guo & Liu (2017), Joglekar et al. (2017) e Kim et al. (2015), onde realizaram a síntese de *quantum dots* de CdTe utilizando diferentes agentes funcionalizantes para estudos com hemoglobina e o grupo heme, hemoglobina, lizosima e BSA e avaliar atividade microbiana, respectivamente. Know et al. (2019), por outro lado, sintetizaram quantum dots de FeSe conjugados com polietilenoglicol e o anticorpo HER2 para a obtenção de imagens in vitro/vivo do câncer de mama.

Além das aplicações mencionadas acima, quando funcionalizados com agentes hidrofóbicos, os QDs são bastante utilizados como sistemas fluorescentes sólidos e são implementados de forma a aumentar a eficiência em, por exemplo, LEDs, painéis fotovoltaicos e vidros de fibra ótica, entre outros (BAGHER, 2016).

2. JUSTIFICATIVA

No que se diz respeito a métodos tradicionais de determinação de biomoléculas, estes apresentam certas limitações em sua aplicação, como elevado tempo de análise, alto custo operacional, baixa frequência analítica, complexidade na preparação da amostra, dentre outras circunstâncias, o que tornam esses métodos inviáveis quando se é necessária uma análise rápida, simples ou em tempo real. Tanto a protamina (PT) quanto a tripsina (TP) são biomoléculas muito empregadas na área medicinal e farmacêutica, as quais podem ocasionar riscos caso sejam usadas indevidamente, seja em alta dosagem no caso da protamina ou em baixas concentrações no caso da tripsina. Além disso, a tripsina possui grande papel biológico no organismo, o que torna ainda mais imprescindível o monitoramento e determinação dessa enzima nos meios biológicos.

Diante do que foi exposto, nota-se a necessidade do desenvolvimento de uma sonda capaz de realizar uma análise rápida, com alta frequência analítica e de simples preparação. Nesse sentido, os QDs surgem como uma alternativa devido a sua facilidade de síntese, a sua boa sensibilidade e especialmente a versatilidade de aplicação, podendo ainda ser mais explorados e aperfeiçoados e trazer ainda mais avanços em diversas áreas de pesquisa, especialmente no ramo biológico, medicinal e químico. Dessa forma, buscou-se realizar a síntese de *quantum dots* de CdTe funcionalizados com ácido mercaptosuccínico visando a produção de um único nanosonda capaz de realizar a determinação de ambas as biomoléculas. Para isso, foi-se otimizado diferentes parâmetros físico-químicos, como concentração dos precursores, temperatura e tempo de síntese.

Assim, no presente trabalho, utilizando-se da técnica de espectrometria de fluorescência, é visado primeiramente realizar a detecção e quantificação da protamina através de um sistema *on-off*. Em seguida, utilizando-se da bioconjugação do QD com a protamina, pretende-se desenvolver um nanosonda do tipo *on-off-on* para a determinação de tripsina.

3. IMPORTÂNCIA PARA A SOCIEDADE

O desenvolvimento de um nanosonda de fácil obtenção, baixo custo, alta sensibilidade e que é extremamente versátil, podendo ser aplicados para a detecção de diversas biomoléculas através de simples modificações, como no tamanho ou no agente funcionalizante. Nesse caso, foi utilizado como uma nanosonda para a quantificação de uma proteína catiônica (protamina-PT) e de uma protease (tripsina-TP), mas o modelo proposto pode ser explorado e aprimorado para ser empregado na detecção de diferentes analitos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Realizar a síntese de *quantum dots* de CdTe em meio aquoso funcionalizados com ácido mercaptosuccínico (MSA) de modo a realizar a determinação da protamina (proteína catiônica) através de um sistema *ON-OFF* e, a partir da bioconjugação QD-CdTe-PT, realizar a quantificação de uma protease (tripsina) em um sistema *ON-OFF-ON*.

4.2 Objetivos específicos

- i) Sintetizar e caracterizar *quantum dots* de CdTe de diferentes tamanhos funcionalizados com ácido mercaptosuccínico em solução aquosa;
- ii) Avaliar a sensibilidade dos diferentes *quantum dots* (CdTe-MSA) sintetizados frente ao sistema QD-CdTe-PT e QD-CdTe-PT-TP em função da variação da intensidade do sinal analítico (intensidade de fluorescência);
- iii) Otimizar os sistemas avaliados (QD-CdTe-PT e QD-CdTe-PT-TP) quanto aos principais parâmetros físico-químicos tais como: pH, tipo e concentração do sistema tampão, força iônica, concentração do *quantum dot*, tempo de reação, fotoestabilidade e parâmetros instrumentais de modo a se obter a melhor sensibilidade analítica;
- iv) Investigar a seletividade do sistema QD-CdTe-PT para a tripsina em relação a outras enzimas proteolíticas;
- v) Validar e estabelecer as principais figuras de mérito de cada sistema avaliado, assim como, aplica-los em amostras reais.

5. EXPERIMENTAL

5.1 Reagentes e soluções

Os seguintes reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA) ou Merck (Alemanha) com pureza igual ou superior a 96%: cloreto de cádmio (CdCl_2), citrato de trisódio dihidratado, ácido mercaptosuccínico (MSA), telurito de sódio (Na_2TeO_3), borohidreto de sódio (NaBH_4), sulfato de protamina, tripsina bovina, alfa-quimotripsina, trombina do plasma bovino, inibidor Kunitz, inibidor Bowman-Birk, hemoglobina, BSA (albumina do soro bovino), HSA (albumina do soro humano), ovoalbumina, glucose oxidase, catalase, caseína, gamaglobulina, heparina, heparina 2, insulina, fosfatase alcalina, pancreatina, prolina, tirosinase, lisozima, galactosidade, urease, Tris base e ácido succínico. Os demais reagentes utilizados apresentaram pureza mínima de 90% ou superior, com exceção do ácido fosfórico com 85% (m/m). A solução estoque de sulfato de protamina (200 mg L^{-1}), BSA (200 mg L^{-1}), hemoglobina (200 mg L^{-1}), HSA (200 mg L^{-1}), lisozima (195 mg L^{-1}), catalase (220 mg L^{-1}), ovoalbumina (150 mg L^{-1}), galactosidade (310 mg L^{-1}) e de tripsina (300 mg L^{-1}) foram preparadas a partir da pesagem de cada proteína e posterior solubilização em água. As soluções de trabalho dessas biomoléculas foram preparadas por diluição sequencial da solução estoque.

O tampão Britton-Robinson (10 mM de cada reagente) foi preparado pela mistura de ácido bórico, ácido acético e ácido fosfórico no intervalo de pH de 5 a 11. As soluções tampões a base de ácido succínico/succinato de sódio (5 a 100 mM), ácido cítrico/citrato de amônio (10 mM), ácido acético/acetato de sódio (10 mM), ácido acético/acetato de amônio (10 mM), ácido bórico/borato de sódio (50 mM), dihidrogenofosfato de sódio/hidrogenofosfato de sódio (50 mM), tris-HCl/tris base (50 mM) e amônia/cloreto de amônio (10 a 100 mM) foram preparados pela pesagem direta do respectivo sal e dissolução em água. Quando necessário, o pH foi ajustado pela adição de NaOH ou HCl 1 M. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura ($18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) obtida a partir ultrapurificador de água Master System MS2000 (Gehaka, Brazil).

5.2 Síntese dos quantum dots de CdTe funcionalizados com MSA

Para realização da síntese descrita neste trabalho, foram utilizados os seguintes equipamentos: manta de aquecimento (modelo 8370, LICiT, Brasil), medidor de pH (modelo PG1800, Gehaka, Brasil), balança analítica com precisão de 0,1 mg (modelo AG200, Gehaka, Brasil), balança analítica com precisão 0,01 mg (AG-245, Mettler Toledo, Alemanha),

centrífuga de bancada (modelo 80-2B, Centribio, Brasil), agitador magnético (RH basic KT/C, IKA, Brail) e freezer (CVU30, Consul, Brasil).

A síntese do quantum dot de CdTe foi realizada com base em Carvalho et al. (2017) com adequações. Neste procedimento, foram preparadas soluções (2 mL de cada) correspondentes a 100 μmol de cloreto de cádmio (CdCl_2), 765 μmol de citrato de sódio dihidratado, 100 μmol de MSA, 200 μmol de telurito de sódio (Na_2TeO_3) e pesada uma massa de borohidreto de sódio (NaBH_4) equivalente a 660 μmol . Em seguida, em um balão de fundo redondo (50 mL) contendo um volume de 17 mL de água ultrapura e sob agitação constante, foram adicionadas as soluções de CdCl_2 , citrato de sódio, MSA, Na_2TeO_3 e o borohidreto de sódio, nesta ordem. O sistema foi então aquecido sob refluxo até 90 °C e, permaneceu nesta temperatura por diferentes intervalos de tempo (0,5, 1, 1,5, 2, 4 e 6 h) a partir do momento que se iniciou o aquecimento. Os QD-CdTe-MSA foram precipitados com adição de etanol e separados/purificados por centrifugação com sucessivas lavagens com etanol (3 vezes por 15 min, a 3000 rpm). Por fim, os QD obtidos foram resuspensores em 10 mL de água e armazenados a 4 °C, sob proteção da luz.

5.3 Caracterização espectroscópica de CdTe-MSA

Os espectros de absorção no UV-vis foram obtidos usando espectrofotômetro UV-vis (modelo AJX-6100PC, Micronal, Brasil), no módulo de varredura (400 a 600 nm), usando água como referência e cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico. A partir dos parâmetros obtidos pelos espectros do UV-vis e através das equações (1-3) descritas por Peng et al. (2003) e Dagtepe et al. (2007), foi possível calcular o tamanho médio teórico e a concentração dessa nanopartícula.

$$D = \frac{1.3845 - 0.00066 \times \lambda}{1 - 0.00121 \times \lambda} \quad \text{equação (1)}$$

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda \times b \times C_{\text{QD}} \quad \text{equação (2)}$$

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

onde D é o tamanho do CdTe-MSA em nanômetros, λ (em nm) o comprimento de onda de maior absorção, A_λ o valor da absorvância do QD, ε_λ é o coeficiente de absorvância molar, C_{QD} é a concentração do QD (mol L^{-1}) e b é o caminho óptico (fixado em 1,0 cm).

Os espectros de emissão de foram obtidos a partir do espectrofluorímetro (RF 5301PC, Shimadzu, Japão), empregando cubetas de quartzo de 1,0 cm e $\lambda_{\text{ex}} = 350$ nm. Ensaios de

espalhamento dinâmico de luz (DLS) foram realizados utilizando um analisador de DLS Microtrac (OM0003, Microtrac Zetatrac, EUA). As análises de distribuição de tamanho das nanopartículas para a condição ideal foram realizadas usando um microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2 Spirit Twin (TEM) usando filamento LaB6 e operando a 120 kV. As medições do tempo de meia vida (τ) foram realizadas utilizando um fluorímetro NanoLogTM (Horiba, Japão) com lâmpada de Xe como fonte de excitação a 366 nm. A fotoluminescência (PL) emitida pelas amostras foi transferida para um monocromador equipado com uma rede de difração (Horiba, 600 ranhuras mm^{-1}) e blaze (a 1000 nm) para a seleção de comprimentos de onda e então detectada usando uma fotomultiplicadora (modelo R928P) na configuração TCSPC (contagem de fótons únicos correlacionada com o tempo). Todas as medidas de tempo de vida foram realizadas em temperatura ambiente e com os mesmos parâmetros instrumentais.

A curva do tempo de meia vida no estado excitado foi melhor ajustada com uma curva monoexponential (VAZ et al, 2019) representada pela equação 4.

$$PL(t) = PL_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad \text{equação (4)}$$

onde $PL(t)$ e PL_0 indica a fotoluminescência após um tempo t e a inicial do QD, respectivamente.

5.4 Procedimentos

5.4.1 Parâmetros físico-químicos

Tanto para o sistema QD-CdTe-PT quanto para o sistema QD-CdTe-PT-TRIP, foram realizadas a otimização dos principais parâmetros físico-químicos, tais como: pH, tipo e concentração do tampão, força iônica, concentração do *quantum dot*, tempo de reação e fotoestabilidade, de modo a se obter a melhor sensibilidade analítica.

5.4.2 Ensaio de fotoluminescência para a protamina

Para a determinação de PT e formação do bioconjugado com a nanosonda, se empregou QD-CdTe-MSA a concentração final de 450 nM, adicionando-se diferentes volumes da solução padrão ou amostra de PT a fim de se obter concentrações da proteína de 0.05 a 0.5 mg L^{-1} . O sistema foi avolumado com solução tampão succinato (25 mM, pH 5) até 2 mL e aguardou-se 20 min. Por fim, as medidas espectrofluorimétricas foram realizadas em estado estacionário ($\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}} = 350 / 523 \text{ nm}$, slit de 5 / 3 nm para $\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}}$, respectivamente).

5.4.3 Ensaio de fotoluminescência para a tripsina

Para a determinação da tripsina (TP), empregou-se o bioconjugado QD-CdTe₆-PT a concentração final de 100 nM (QD-CdTe₆) e 2 mg L⁻¹ (PT), adicionando-se diferentes alíquotas da solução padrão ou amostra de TP a fim de se obter concentrações dessa enzima de 0,005 a 0,07 mg L⁻¹. O sistema foi avolumado com a solução tampão amônio (75 mM, pH 8,5) até 2 mL e aguardou-se 40 min, momento onde foi adicionado a ovoalbumina a 2 μM para a inibição da TP. Por fim, as medidas espectrofluorimétricas foram realizadas em estado estacionário ($\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}} = 350 / 588$ nm, slit de 5 / 3 nm para $\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}}$, respectivamente).

5.4.4 Ensaio de inibição da tripsina

Para este ensaio, diferentes alíquotas das soluções estoques dos inibidores foram acrescentadas no sistema após a adição do bioconjugado QD-CdTe₆-PT e da TP no meio. O volume final de cada sistema foi aferido com tampão amônio (75 mM, pH 8,5) até 2 mL e as medidas espectrofotométricas foram realizadas em estado estacionário ($\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}} = 350 / 588$ nm, slit de 5 / 3 nm para $\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}}$, respectivamente) após 40 min de reação.

Após a escolha do inibidor, adicionou-se diferentes alíquotas de sua solução estoque a fim de obter diferentes concentrações desse inibidor ao sistema QD-CdTe₆-PT-TP, o qual foi aferido e analisado nas mesmas condições anteriormente citadas.

5.4.5 Ensaio de seletividade para a tripsina

Foi avaliado como outras proteínas iriam interferir na quantificação da TP no meio e como diferentes enzima-proteases iriam atuar no sistema. Para isso, foram acrescentadas diferentes alíquotas das soluções estoques dessas biomoléculas, de modo que, para as proteínas, estas possuam a mesma concentração molar da PT (400 nM) e, para as enzimas, estas possuem as mesmas unidades que a TP em sua última concentração no meio (700 U). Os interferentes analisados foram BSA, caseína, gamaglobulina, hemoglobina, HSA, heparina, heparina 2, insulina, fosfatase, pancreatina, proline, tirosinase, lisozima, catalase, galactosidade e urease. O volume final de cada amostra foi aferido até 2 mL com a adição da solução tampão apropriada e as medidas espectrofotométricas e as medidas espectrofluorimétricas foram realizadas em estado estacionário ($\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}} = 350 / 588$ nm, slit de 5 / 3 nm para $\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}}$, respectivamente) após 40 min de reação.

5.4.6 Preparação de amostras

As amostras de PT (10 mg mL^{-1}) foram obtidas a partir de três diferentes fornecedores comerciais, sendo então devidamente diluídas (10.000 vezes) em água ultrapura para a realização da análise. As amostras de urina sintética foram preparadas de acordo com diferentes protocolos, variando a composição química de cada sistema conforme a Tabela 4.

Tabela 4. Composição química das urinas sintéticas preparadas.

Composto	Concentração (mM)				
	U1	U2	U3	U4	U5
NaCl	55	51.3	78.7	50	78.7
KCl	67	26.8	21.5	21.5	21.5
CaSO ₄	2.6				
Na ₂ SO ₄	29.6	14.2	16.2	9.8	16.2
MgCl ₂			3.2		3.2
MgSO ₄	3.2				
NaH ₂ PO ₄	19.8				
Creatinina	9.8		9.7		9.7
Urea	310	420		416.2	417
Citrato de sódio			2.6		2.6
CaCl ₂		6.8	4.4	9.7	4.4
KH ₂ PO ₄		7.3	30.9	10.3	30.9
NH ₄ Cl		18.7		18.7	18.7
K ₂ HPO ₄					
Na ₂ C ₂ O ₄			0.15		0.15
Referência	GU et al. (2016)	SANTOS et al. (2015)	XU et al. (2011)	ULUSOY et al. (2019)	WILSENACH et al. (2007)

Fonte. Autora deste trabalho, 2020.

Para as amostras de plasma, houve liberação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFAL (CAAE 57998116.8.0000.5013). Sua preparação foi realizada segundo o procedimento mencionado por Shi et al. (2017) com modificações. Neste, a amostra de sangue foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 min a temperatura ambiente e, devido ao alto teor de proteínas, foi submetido a um pré-tratamento. O sobrenadante (plasma) foi separado e desproteinizado pela adição de acetonitrila na proporção 1:1, seguida de agitação constante por 2 min e centrifugação a 10.000 rpm por 10 min. Por sua vez, o sobrenadante foi filtrado e depois diluído 25 vezes em tampão amônio (75 mM, pH 8,5). Diferentes concentrações de tripsina foram adicionada às amostras de soro diluídas e a análise da amostra foi realizada usando o procedimento descrito acima para a tripsina.

5.5 Ensaio de biotoxicidade das nanosondas

Neste ensaio, foi seguido a metodologia realizada por Galeone et al. (2012) com adaptações. As moscas e larvas do tipo *Drosophila melanogaster*, as quais foram cultivadas a 25°C em alimento de *Drosophila* padrão, contendo ágar, fubá, açúcar, fermento e nepagina (metil-fidroxibenzoato). Para o estudo da biotoxicidade, o alimento recém preparado foi enriquecido com alíquotas das soluções de QD-CdTe₆ e QD-CdTe₆-PT (concentração final de 5, 10, 25, 50, 100 e 200 nM) e de PT (0,1, 0,2, 0,5, 1, 2 e 4 mg L⁻¹). As larvas foram então transferidas para os frascos contendo o alimento enriquecido e acompanhadas durante 15 dias, observando a pulpação e formação de adultos.

5.6 Tratamento estatístico

A otimização do método foi realizada a partir da curva analítica correspondente a cada condição avaliada, sendo a sensibilidade analítica (*slope*) obtida como critério de avaliação. Para a construção das curvas analíticas, foi usado no mínimo de seis níveis de concentração diferentes ($n = 6$). A curva analítica para a protamina foi construída a partir da equação 6, enquanto que a tripsina a partir da equação 7.

$$\left(\frac{PL_0 - PL}{PL_0} \right) = a_c \times C_{PT} + b \quad \text{equação (6)}$$

$$\frac{PL}{PL_0} = a_c \times C_{TP} + b \quad \text{equação (7)}$$

onde PL₀ e PL representa a fotoluminescência do QD-CdTe-MSA na ausência e presença de PT, respectivamente. Para os cálculos de limite de detecção (LOD), foi utilizada a relação $x_b - 3s_b$, onde x_b e s_b representam a média e o desvio padrão do branco analítico ($n = 10$), respectivamente (KHAN et al, 2017). O desvio padrão relativo (RSD) considerado a incerteza agrupada:

$$S_{(PL_0/PL)} = \frac{PL_0}{PL} \times \sqrt{\left(\frac{S_{(PL)}}{PL} \right)^2 + \left(\frac{S_{(PL_0)}}{PL_0} \right)^2} \quad \text{equação (8)}$$

No processo de otimização e validação do método os resultados quando necessários, foram avaliados aplicando-se teste-*t* de Student considerando distribuição normal (erro aleatório) e intervalo de confiança de 95%.

6. BIOCONJUGAÇÃO ENTRE *QUANTUM DOST* DE CDTE FUNCIONALIZADOS COM ÁCIDO MERCAPTOSUCCÍNICO E PROTEÍNA CATIÔNICA: MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE PROTAMINA EM AMOSTRAS DE MEDICAMENTO E URINA

6.1 Introdução

A protamina (PT) é uma proteína policatiônica de baixa massa molecular (de 5000 a 10000 Da) cuja composição é rica em aminoácidos como a arginina (> 67%), prolina, serina e valina, a qual pode ser obtida a partir do esperma do salmão e de outros peixes pertencentes a família *Salmonidae* (AKMAL et al., 2016; RODRÍGUEZ & BARCELONA, 2018). Esta proteína pode ser utilizada para a purificação de DNA, para aumentar o tempo de vida da insulina no organismo e como agente antibacteriano em alimentos (CASTILLO et al., 2018; POTTER, HANSEN & GILL, 2005). Além disso, a PT é a única molécula aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) para atuar como agente neutralizante da heparina, sendo administrada durante procedimentos que envolvem circulação extracorpórea, como a diálise e cirurgias cardíacas. Contudo, seu uso inadequado pode provocar hipotensão sistêmica, hipertensão pulmonar, hemorragias, queda súbita de pressão, bradicardia e dispneia (BOER et al., 2018; CARR J. & SILVERMAN, 1999; BARROSO, 2002). Devido a sua ampla gama de aplicações e importância medicinal, é imprescindível o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação e controle de qualidade da protamina, tanto em formulações farmacêuticas quanto em amostras biológicas.

A PT pode ser determinada por métodos espectrofotométricos (RAO et al, 2017), eletroquímicos (XIAO et al, 2001), por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) (SNYCERSKI, 1998), espectrometria de massa (EM) (GUCINSKI et al., 2014), eletroforese capilar (EC) (MALÝ & KŘÍŽEK, 2016), ensaio imunoenzimático (ELISA) (JUNKER et al., 1985), reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR) (HAMAD, 2019), dentre outros métodos. Todavia, algumas destas metodologias possuem limitações, como baixa precisão e frequência analítica, necessidade de instrumentação sofisticada, alto custo operacional e de manutenção, além da complexidade da análise, tornando necessário o desenvolvimento de novos métodos para a quantificação dessa proteína. Nesse sentido, a espectroscopia de fluorescência molecular, surge como uma poderosa alternativa de investigar parâmetros qualitativos e quantitativos associados a proteína e outras biomoléculas, pois apresenta simplicidade operacional, alta sensibilidade e seletividade instrumental, detecção em

tempo real e não ser uma técnica destrutiva (KOHLI & MITTA, 2019; JIANG, 2019). Além disso, permite monitorar diretamente ou através de sondas diferentes parâmetros fotoquímicos, viscosidade, mobilidade, orientação de macromoléculas, distâncias intermoleculares, localização e distribuição em sistemas complexos, dentre outros (ITAGAKI, 2000).

O desenvolvimento de um sensor ou sonda fluorescente estável e seletiva ao analito requer estratégia, estudo e planejamento, podendo envolver diversos campos científicos, como a fotoquímica, fotofísica, química supramolecular e nanotecnologia (VALEUR, 2009). Tendo um comprimento de onda de emissão ajustável, alta fotoestabilidade, adaptabilidade em sua funcionalização, elevado rendimento quântico e baixa toxicidade se comparado aos fluoróforos orgânicos mais utilizados (SCHIFFMAN et al., 2018), os *quantum dots* (QD) são nanomaterias que apresentam notoriedade no campo científico devido as suas características ímpares e seu potencial de aplicação nas diversas áreas. Os QD apresentam maior destaque quando utilizados como nanosondas fluorescentes para determinação e/ou detecção de diferentes biomoléculas, espécies metálicas, compostos orgânicos e até microrganismos. Assim, estes nanomateriais são aptos para a quantificação e monitoramento de uma variedade de analitos em amostras biológicas e ambientais, assim como em análises farmacêuticas e de alimentos.

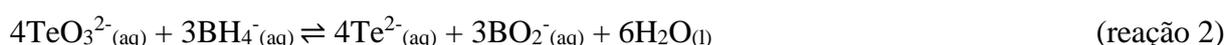
O desenvolvimento de nanosondas para quantificar ou monitorar um analito, especialmente para aplicações *in vivo* e de imageamento, comumente requer a formação de um bioconjugado para propiciar uma melhor estabilidade, eficiência e seletividade ao sistema. O processo de bioconjugação é decorrente da interação do agente funcionalizante (peptídeos ou proteínas, por exemplo) com o analito, a qual pode ocorrer a partir da adsorção do analito no QD por interações não-polares e/ou eletrostática, ligação coordenada do QD com o analito ou vice-versa, ligações específicas do tipo anticorpo-antígeno e formação de ligações covalentes (PEREIRA et al., 2019). Desta forma, o campo de possibilidades para o uso de CdTe, especialmente em sondas fotoluminescentes, ainda permite explorar muitos sistemas (analitos) e aplicações.

Dessa forma, neste trabalho, realizou-se a síntese e caracterização espectroscópica de QD de CdTe funcionalizados com ácido mercaptosuccínico (carregado negativamente), os quais permitiram uma quantificação rápida, precisa e com alta sensibilidade da PT (proteína catiônica) a partir da formação de um bioconjugado nanopartícula-proteína. Por fim, nas condições otimizadas, o mecanismo de interação foi proposto empregando diferentes técnicas e o método aplicado em amostras comerciais de medicamento de PT e de urina sintética.

6.2 Resultados e discussões

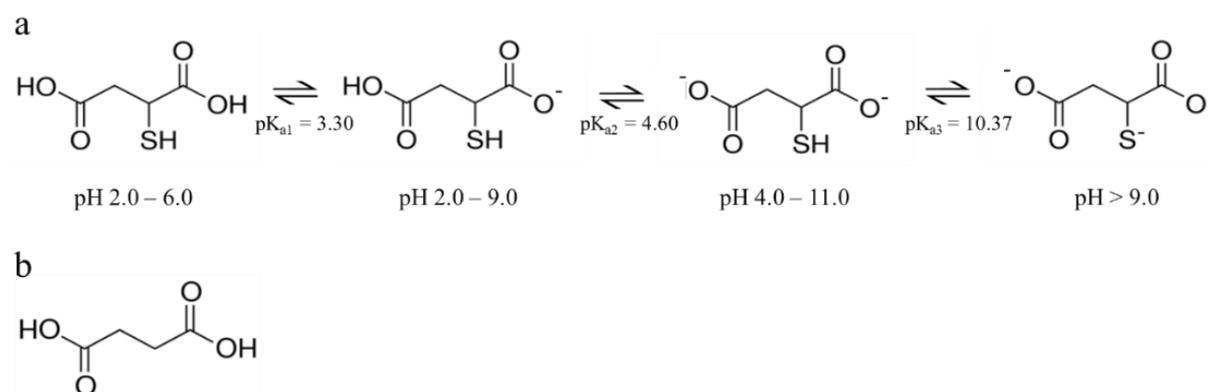
6.2.1 Síntese do quantum dot de CdTe funcionalizado com MSA

A síntese do QD-CdTe em meio aquoso envolve a formação do complexo entre o cátion metálico (Cd^{2+}) em solução (reação 1) na presença do ligante de superfície, seguida da redução química do telúrio pelo borohidreto de sódio (reação 2), e consequente formação da nanopartícula (reação 3). Assim, de forma genérica, ocorrem as seguintes reações:



Neste caso, o ácido mercaptosuccínico (MSA, Fig. 9a) se liga ao íon cádmio por meio do grupo tiol. O MSA foi selecionado devido a sua capacidade de se ligar ao cádmio pelo grupo tiol, e por possuir dois grupos ácidos carboxílicos, conferindo a nanopartícula duas cargas negativas por mol do ligante (a depender do pH), e assim, leva a uma maior interação com o analito (PT). O citrato de sódio, por sua vez, foi adicionado ao meio reacional para evitar a formação e deposição de CdTeO_3 (CARVALHO et al., 2017).

Figura 9. Equilíbrio ácido-base do (a) ácido mercaptosuccínico e (b) estrutura química do ácido succínico.

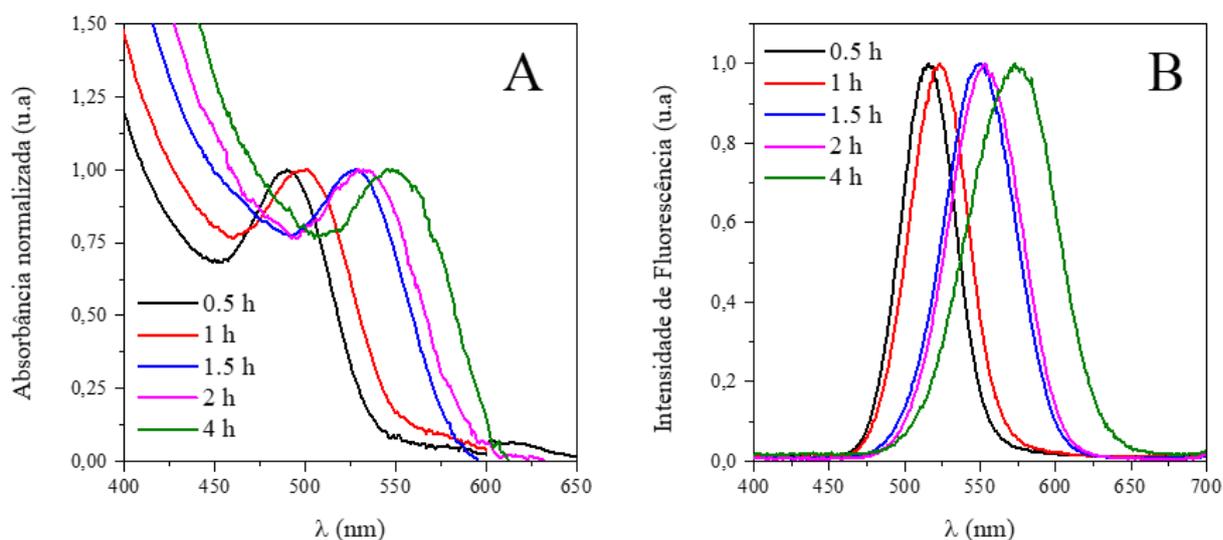


Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

A partir das medidas espectroscópicas, obteve-se os espectros de extinção molar e fotoluminescência (Fig. 10A-B). Para os sistemas produzidos se observou variação do comprimento de onda de extinção molar de 490 a 548 nm, fotoluminescência de 515 a 575 nm, e tamanho das partículas de 2,61 a 3,04 nm, de 0,5 a 4 h, de tempo de síntese, respectivamente (Tabela 5). Este perfil se deve ao aumento crescente no tamanho das nanopartículas decorrente de processo de difusão dos núcleos menores (mais instáveis) levando a formação de partículas

maiores (SUGIMOTO, 1987). Logo, maiores tempos de síntese produzem nanopartículas com maior tamanho e menor confinamento quântico, provocando um deslocamento gradual para maiores comprimento (red shift) (CHAVES, 2006; MASHINCHIAN et al, 2014). Esse comportamento está estabelecido para o QD de CdTe e pode ser observado em diversos trabalhos (CHENG, LI, & CHENG, 2017; VEAMATAHAU et al. 2015; ZHANG et al., 2015).

Figura 10. Espectro de (A) extinção molar e (B) fotoluminescência para QD-CdTe com diferentes tempos de síntese em meio aquoso. Condições: $\lambda_{ex} = 350$ nm, slit de $\lambda_{ex} / \lambda_{em}$ igual a 5 / 3 nm para QD-CdTe_{0.5}, QD-CdTe_{1.5} e QD-CdTe₁, e 3 / 3 nm para QD-CdTe₂ e QD-CdTe₄.



Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

A partir dos espectros de absorção (Fig. 10A) e das equações (1-3), foi possível calcular o tamanho e a concentração de cada QD sintetizado (Table 5). Com relação aos espectros de emissão, se observou que houve relação proporcional entre o tempo de síntese e o valor da largura total à meia altura (FWHM), o qual variou de 43 a 67 nm. Como o crescimento dessas nanopartículas não ocorreu uniformemente, o aumento do tempo de síntese pode levar a maior heterogeneidade, dificultando o processo de separação, e assim, levando a uma maior dispersão do tamanho destas no meio (FWHM > 50) (QU & PENG, 2002). O deslocamento Stokes variou de 21 a 25 nm, de maneira geral, isto se deve ao tamanho do QD-CdTe, além disto, este parâmetro pode ser influenciado pela composição, estado de superfície, natureza do agente funcionalizante utilizado e o dark exciton presentes na nanopartícula (WATANABE et al., 2017; RAKOVICH et al., 2003; BAGGA et al., 2007).

Tabela 5. Principais parâmetros dos QD-CdTe sintetizados.

Sistema	Tempo (h)	¹ λ_{abs} (nm)	² λ_{em} (nm)	Deslocamento de Stokes (nm)	³ FWHM (nm)	Diâmetro (nm)	⁴ C_{QD} (μM)
QD-CdTe _{0.5}	0,5	490	515	25	43	2,61	19,7
QD-CdTe ₁	1	500	523	23	46	2,67	13,2
QD-CdTe _{1.5}	1,5	528	550	22	56	2,87	11,1
QD-CdTe ₂	2	532	553	21	59	2,90	11,5
QD-CdTe ₄	4	548	573	25	67	3,04	10,7

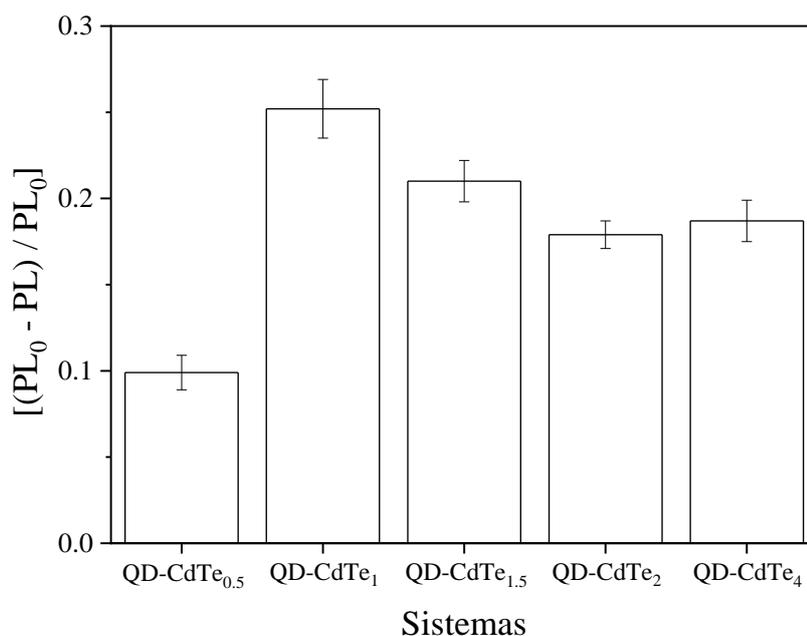
¹ λ_{abs} = comprimento de onda de absorção máxima / ² λ_{em} = comprimento de onda de emissão máxima / ³FWHM = largura a meia altura / ⁴ C_{QD} = concentração do QD-CdTe.

Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

6.2.2 Avaliação da interação do bioconjugado QD-CdTe-PT

Nos estudos iniciais, se fixou a concentração para todos os QD-CdTe sintetizados (Tabela 5) e avaliou-se como a intensidade do sinal de fotoluminescência frente a PT (Fig. 11).

Figura 11. Variação da intensidade de fotoluminescência do QD-CdTe (100 nM) após a adição de PT (1 mg L⁻¹) ($n = 3$). Condições: Tampão Britton-Robinson (10 mM, pH = 7), $\lambda_{\text{ex}} = 350$ nm, slit de 5 / 3 nm ($\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}}$, respectivamente).



Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

Em todos os casos, houve redução na intensidade do sinal analítico dos QD-CdTe, comprovando que de fato houve interação entre a nanopartícula e a proteína catiônica, possivelmente devido a interação eletrostática. Comportamento similar foi observado para QD de carbono (CHEN et al. 2020) e QD-CdTe funcionalizados ácido tioglicólico (XUE et al., 2016), onde em ambos os sistemas a supressão da fotoluminescência foi associada a agregação do nanomaterial. Contudo, perfil oposto foi observado para QD-CdSe funcionalizado com MPA, no qual se obteve aumento na intensidade de fotoluminescência na presença de PT (LIU

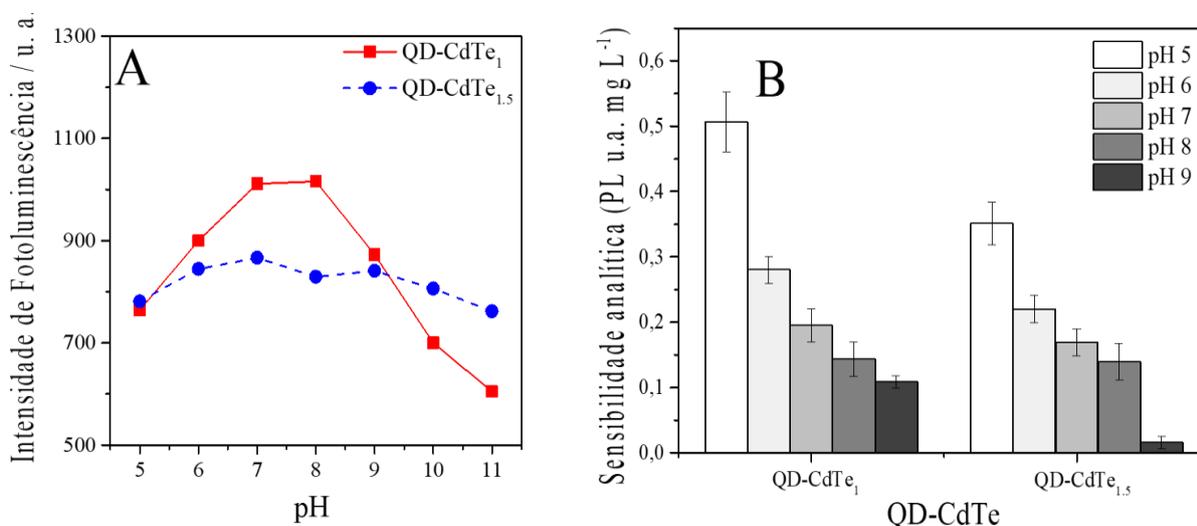
et al., 2019). Assim, os QD-CdTe₁ e QD-CdTe_{1,5} foram aqueles que apresentaram maior variação de intensidade de fotoluminescência, por esse motivo, foram selecionados para etapas de otimização subsequentes.

6.2.3 Otimização dos parâmetros analíticos

6.2.3.1 Efeito do pH na interação QD-CdTe-PT

A avaliação da influência do pH (5 a 11) na intensidade de fotoluminescência das nanosondas foi avaliada (Fig. 12A). Para o QD-CdTe₁ se observou aumento do sinal de pH 5 a 7, seguido de estabilização até pH 8. Para valores de pH < 7, ocorre protonação mais efetiva do grupo tiol e ácido carboxílico (MSA, pK_{a1} = 3,30, pK_{a2} = 4,60 e pK_{a3} = 10,37), reduzindo sua coordenação na superfície da nanopartícula, desestabilizando-a; enquanto que em meio básico (pH > 8), pode ter ocorrido a formação de hidróxido de cádmio (K_{ps} = 4,5 × 10⁻¹⁵) e os respectivos hidróxicomplexos (K_f = 1,95 × 10⁴⁷), levando a degradação do nanomaterial (MOREIRA, 2017).

Figura 12. Influência do pH na (A) intensidade de fotoluminescência do QD-CdTe e (B) sensibilidade analítica do QD-CdTe na presença de PT. Condições : Tampão Britton-Robinson a 10 mM, QD-CdTe a 350 nM, λ_{ex} = 350 nm, slit de λ_{ex} / λ_{em} de 1.5 / 5 nm para o QD-CdTe₁, e 3 / 3 nm para o QD-CdTe_{1,5}.

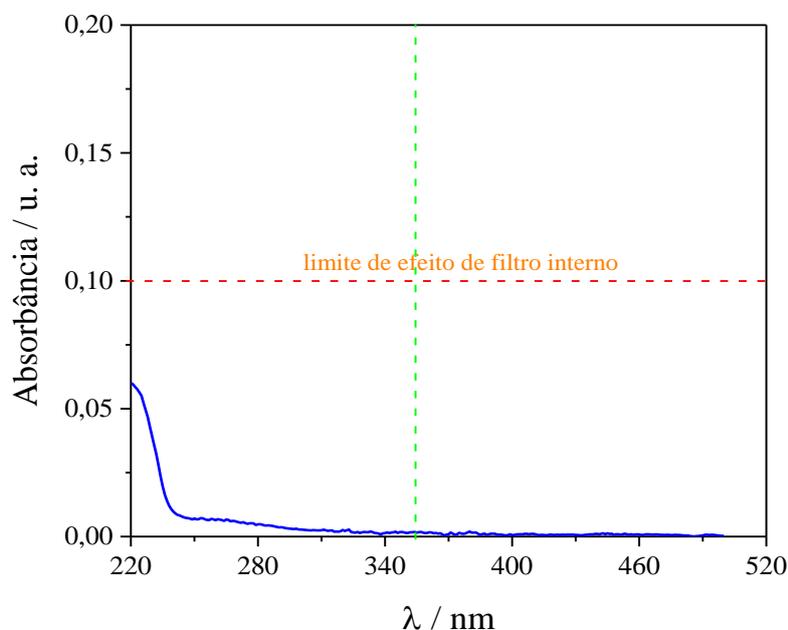


Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

Perfil distinto foi obtido para o QD-CdTe_{1,5}, uma vez que houve pequena variação na intensidade de emissão de fotoluminescência com a variação do pH. Este fato, pode estar relacionado ao tamanho das nanopartículas, evitando degradação em função do pH, nesse caso, relacionado a variação da concentração dos íons H⁺ e OH⁻ no meio, e também permitindo que um dos grupos carboxílicos existentes no agente funcionalizante (MSA) interaja com a superfície desse nanomaterial, dando-lhe uma maior estabilidade (SUBRAMANIAN et al., 2020).

A PT não apresenta absorção apreciável no comprimento de onda de excitação (350 nm) dos QD-CdTe avaliados (Fig. 13). Assim, a avaliação o efeito do pH na interação das nanosondas e proteína catiônica ocorreu sem possíveis interferências espectrais.

Figura 13. Espectro de absorção UV-vis da PT (1 mg L^{-1}) em meio aquoso. A linha verde corresponde ao comprimento de onda de excitação.



Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

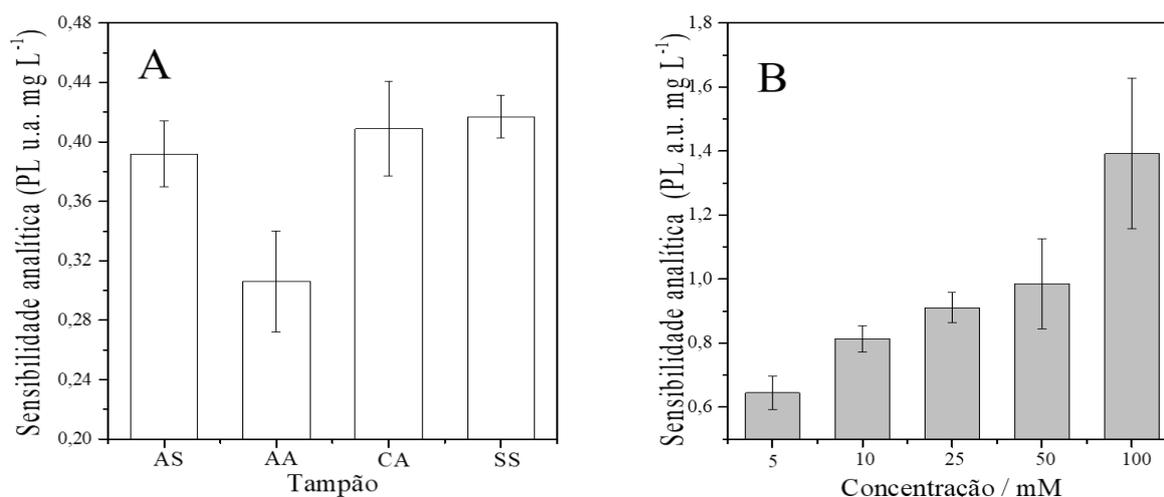
Neste ensaio, foi necessário empregar uma grande quantidade de proteína catiônica para promover a redução do sinal de fotoluminescência, uma vez que nem todos os parâmetros analíticos foram otimizados. De modo a avaliar o pH ótimo de análise, a sensibilidade analítica foi empregada como parâmetro de avaliação (Fig. 12B). Vale salientar que, independente do QD-CdTe a máxima sensibilidade analítica foi obtida em pH 5. Em meio ácido, é maior a fração de PT na forma protonada (carga positiva, $pI = 12$), o que deve gerar maior interação com o QD-CdTe com carga negativa devido ao MSA preferencialmente desprotonado. Com aumento do pH, se observou uma graduada redução da sensibilidade. Os valores de pH 10 e 11 não foram avaliados, uma vez que não se obteve linearidade frente a variação da concentração de PT.

De forma geral, a sensibilidade do método foi maior para Qd-CdTe₁. Este resultado, pode estar relacionado ao tamanho do nanomaterial, pois, seria necessária uma menor quantidade de PT para interagir com a superfície do Qd-CdTe₁, atenuando a intensidade de fotoluminescência, e assim, aumentando-se a sensibilidade do método. Similarmente, Jiao et al. (2014) usando QD-CdTe funcionalizado com *N*-acetilcisteína para a quantificação de citocromo *c*, obteve supressão da fotoluminescência mais efetiva com a diminuição do tamanho da nanopartícula. Portanto, o Qd-CdTe₁ em pH 5 foi selecionado para os estudos posteriores devido a maior sensibilidade ao analito.

6.2.3.2 Avaliação do tipo e concentração do tampão utilizado

A influência da composição do sistema tampão sobre a sensibilidade analítica foi avaliada empregando acetato de sódio, acetato de amônio, citrato de amônio e succinato de sódio (Fig. 14A).

Figura 14. (A) Influência da composição do tampão: acetato de sódio (AS), acetato de amônio (AA), citrato de amônio (CA) e succinato de sódio (SS); e (B) Concentração do tampão succinato. Condições: QD-CdTe₁ a 350 nM e PT de 0,25 - 2 mg L⁻¹ (n = 5), $\lambda_{ex} / \lambda_{em} = 350 / 523$ nm, slit de 1.5 / 5 nm ($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$, respectivamente).



Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

O sistema com acetato de amônio apresentou a menor sensibilidade, provavelmente associada ao íon NH₄⁺, o qual competia com a PT pelos sítios negativos da superfície do QD-CdTe₁, reduzindo a interação com a analito, e desta forma, atuando como um potencial interferente em concentrações elevadas. As soluções tampão a partir do ácido cítrico (pK_{a1} = 3,13; pK_{a2} = 4,76 e pK_{a3} = 6,40; $\beta = 6,50 \times 10^{-3}$ em pH 5), ácido succínico (pK_{a1} = 4,21 e pK_{a2} = 5,72; $\beta = 5,88 \times 10^{-3}$ em pH 5) e acetato de sódio (pK_a = 4,75; $\beta = 5,32 \times 10^{-3}$ em pH 5) apresentaram resultados similares, quanto à sensibilidade e índice tampão (β). Uma vez que os ligantes na superfície do QD-CdTe₁ estão em equilíbrio com o core, o processo de solvatação é reflexo das interações ligante-solvente e ligante-ligante, as quais, eventualmente competem com os ligantes na superfície (GRISORIO et al., 2019). Como a única diferença estrutural entre o MSA e o ácido succínico (Fig. 9A-B) consiste na presença do grupo tiol, este sistema tampão foi selecionado devido à similaridade com o ligante de superfície.

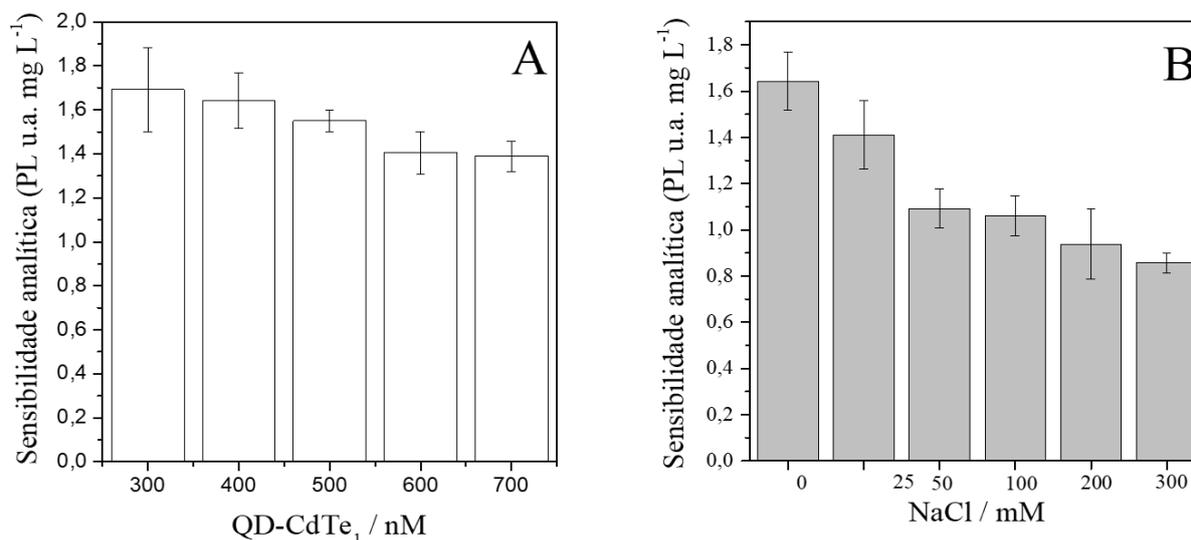
O efeito da concentração da solução tampão (5 a 100 mM) foi avaliado sobre a sensibilidade analítica do sistema QD-CdTe₁-PT (Fig. 14B), sendo que o aumento da concentração levou ao incremento da sensibilidade do método. Contudo, se observou uma

relação direta entre a concentração da solução tampão e a incerteza das medidas, possivelmente devido influência na formação do bioconjugado QD-CdTe₁-PT. Logo, a concentração de 25 mM da solução tampão succinato foi selecionada, devido a um menor erro associado ao procedimento e apresentar capacidade de tamponamento adequado ($\beta = 1,47 \times 10^{-2}$) para concentrações do QD-CdTe₁ e PT usadas.

6.2.3.3 Avaliação da concentração do CD-CdTe₁ e influência da força iônica

A influência da concentração do QD-CdTe₁ (250 - 650 nM) na sensibilidade do método foi avaliada (Fig. 15A). Obviamente, para menores concentrações do QD-CdTe₁, tem-se uma redução na intensidade de emissão de fotoluminescência e um aumento na sensibilidade, sendo necessário uma menor quantidade do analito para reduzir o sinal analítico, enquanto que ao aumentar a concentração da nanopartícula se faz necessário uma maior quantidade de PT, a fim de obter a mesma variação da intensidade de fotoluminescência. Foi observado que o FWHM variou de 49 a 52 nm (250 a 450 nM), assim se optou por usar uma concentração intermediária (450 nM, FWHM = 50 nm) QD-CdTe₁, e garantindo uma maior estabilidade da solução.

Figura 15. Efeito da (A) Concentração do QD-CdTe₁ e (B) força iônica na sensibilidade analítica do método proposto. Condições: tampão succinato (25 mM, pH = 5), $\lambda_{ex} = 350$ nm, slit de 5 / 3 nm ($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$, respectivamente).



Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

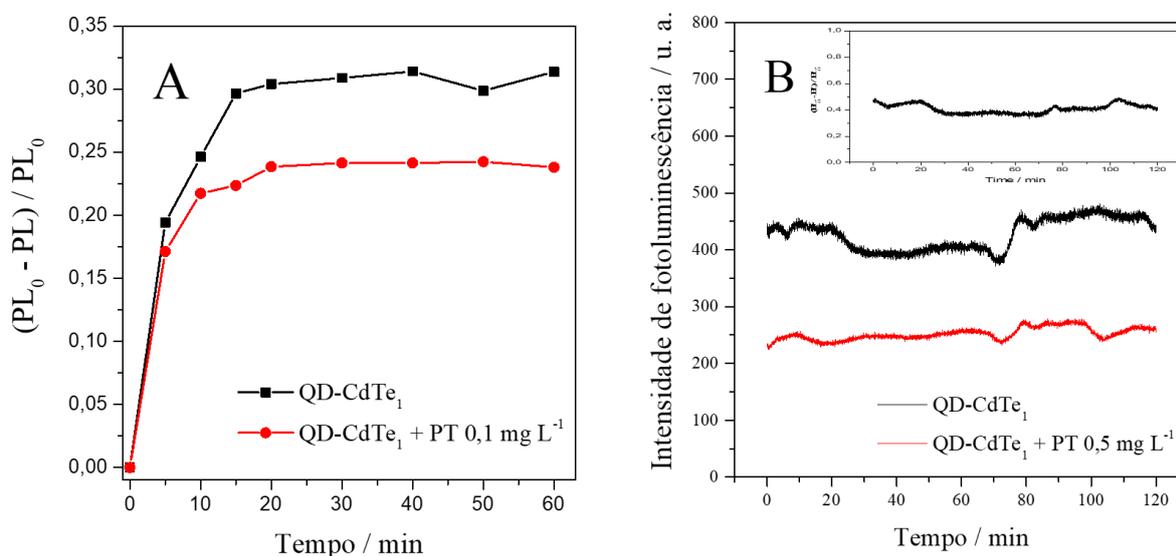
Como o processo de interação QD-CdTe₁ e PT e formação do bioconjugado nanosonda-proteína supostamente envolve forças eletrostáticas, avaliou-se o efeito da variação da força iônica no meio (NaCl de 0 a 300 mM) na sensibilidade do método (Fig. 15B). O aumento da concentração do sal levou a redução da sensibilidade, sendo que após 50 mM, se observou a formação de um platô, sem diferença estatística (ANOVA a 95% de confiança, F_{cal}

$= 3.69 < F_{\text{tab}} = 4.07$). A redução da sensibilidade ocorreu pois com o aumento da força iônica, devido à redução da atividade das espécies no meio, levando a uma interação QD-CdTe₁ e PT menos efetiva (BURGOT, 2012).

6.2.3.4 Avaliação da cinética reacional e fotoestabilidade

A intensidade de fotoluminescência do QD-CdTe₁ na ausência e na presença da PT (0,1 mg L⁻¹) até 60 min (Fig. 16A) foi avaliada. Houve aumento da razão $[(PL_0 - PL) / PL_0]$ até 20 min, seguida de formação de um patamar para ambos os sistemas avaliados. Logo, nos ensaios posteriores o tempo mínimo de interação foi estabelecido em 20 min.

Figura 16. Análise da (a) cinética e (B) fotoestabilidade do QD-CdTe₁ e do bioconjugado QD-CdTe₁-PT. O sinal da fotoestabilidade foi medido depois de 20 min, equivalente ao tempo zero do teste. Condições: tampão succinato (25 mM, pH = 5), $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} = 523 \text{ nm}$, slit de 5 / 3 nm ($\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}}$, respectivamente).



Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

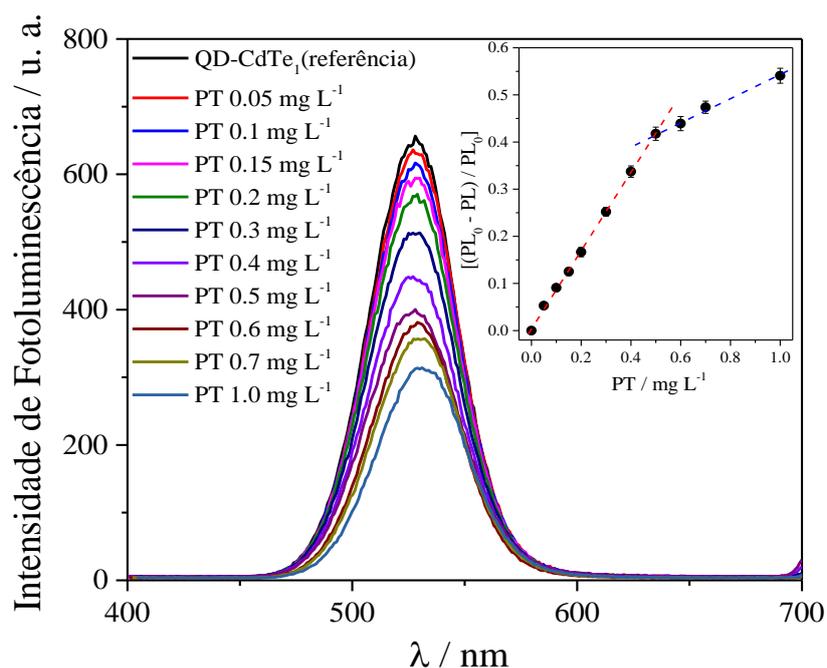
Em seguida, a fotoestabilidade do nanomaterial na presença e ausência da proteína (Fig. 16B) foi caracterizada a partir de contínua exposição à radiação eletromagnética ($\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$). Para os sistemas QD-CdTe₁ e QD-CdTe₁-PT se observou variação do sinal em torno de 10%, indicando fotoestabilidade no intervalo de tempo monitorado e nas condições avaliadas.

6.2.4 Figuras de mérito do método proposto

A partir das condições otimizadas, foi possível estabelecer a curva analítica para quantificação de PT (Fig. 17). As principais figuras de mérito foram estabelecidas para o método proposto, o qual apresentou curva analítica $[(PL_0 - PL) / PL_0] = 0,83(\pm 0,10) \times C_{\text{PT}} +$

0,005($\pm 0,002$), com $r = 0,999$ ($n = 8$), referente a faixa linear de 0,05 a 0,50 mg L^{-1} (10 - 100 nM), com limite de detecção (LOD) de 0,01 mg L^{-1} (2 nM). O aumento na concentração da proteína catiônica ($\text{PT} > 0,5 \text{ mg L}^{-1}$) causou uma perda de linearidade (Fig. 17), com o desvio para o vermelho no comprimento de onda máximo de emissão de QD-CdTe₁. Por fim, a precisão do método ($n = 10$) foi comprovada com base no $\text{RSD} \leq 2,01\%$ ($C_{\text{PT}} = 0.15 \text{ mg L}^{-1}$).

Figura 17. Perfil do espectro da intensidade de fotoluminescência do QD-CdTe₁ com concentrações crescentes de PT e respectiva curva analítica (inserção do gráfico, $n = 3$). Condições: Tampão succinato (25 mM, pH 5), QD-CdTe₁ a 450 nM, $\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}} = 350 / 523 \text{ nm}$ (faixa linear), slit de 5 / 3 nm ($\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}}$, respectivamente).



Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

O método proposto possui uma sensibilidade maior comparado a metodologia tradicional como cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos (DAD, $\lambda = 214 \text{ nm}$) (LEE et al., 2012). Em relação a outros métodos que empregam nanopartículas fotoluminescentes para determinação de PT em medicamentos e plasma humano, como QD-ZnS dopado com Mn (ZHANG et al, 2015), QD-CdTe-glutationa (ENSAFI et al., 2015) e QD-CdS-BSA (LI, H. & YANG. 2015), as figuras de mérito mostraram-se equivalentes ao método proposto. Para os demais sistemas analíticos relatados na literatura, a Tabela 6 resume os principais parâmetros e aspectos gerais de cada método, mostrando as vantagens do método proposto com base na nanossonda QD-CdTe₁.

Tabela 6. Comparação de algumas estratégias analíticas para determinar PT e o método proposto com base no QD-CdTe₁.

¹ Sistema	² Deteccção	pH	Faixa Linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	³ RSD (%)	Amostra	Comentários	Ref.
RP-HPLC	UV	2,0	500 - 5000	5	$\leq 2,00$	Fármaco	Baixa sensibilidade. Complexidade na instrumentação e baixa frequência analítica.	LEE et al. (2012)
QD-ZnS-Mn	PP	7,4	0,2 – 3,0	0,001	$\leq 3,24$	Soro	Complexidade na síntese da nanopartícula.	ZHANG et al. (2015)
QD-CdTe-GLU	PL	11	0,002 – 0,2	0,001	$\leq 1,40$	Soro	Alto tempo para a síntese da nanopartícula (14 h)	ENSAFI et al. (2015)
AuNPs + FLU	FL	9,0	0,01 – 0,8	0,0067	$\leq 1,77$	Soro	São necessárias duas sondas fluorescentes e um longo tempo de incubação (1.5 h) antes da análise.	ZHAO et al. (2013)
AuNPs + SiQD	FL	7,4	0,01 -1,2	0,0067	$\leq 0,85$	Soro	São necessárias duas sondas fluorescentes e há complexidade na síntese.	YAO et al. (2015)
QD-CdS-BSA + AuNPs	FL	8,2	0,01 – 0,35	0,0024	$\leq 4,00$	Soro	São necessárias duas sondas fluorescentes.	LI et al. (2015)
AgSNPs + UCNPs	FL	7,5	0,01 – 0,50	0,0031	$\leq 2,80$	Soro	São necessárias duas sondas fluorescentes e há complexidade na síntese.	CHEN et al. (2017)
AuNPs + CDs	FL and CL	7,2	0,01 – 0,22	0,0012	NI	Soro de porco	São necessárias duas sondas fluorescentes e há complexidade na síntese.	RAO et al. (2017)
AuNCs-GLU + SiNPs	FL	6,8	0,15 – 3,0	0,07	$\leq 2,40$	Soro	São necessárias duas sondas fluorescentes e um longo tempo de síntese para a AuNCs (24 h).	XUE et al. (2019)
AuNRs + GO	CL	7,4	0,1 – 0,7	0,063	NI	Fármaco	São necessárias duas sondas fluorescentes e há complexidade na síntese e na preparação da amostra.	SRISURAT et al. (2019)
QD-CdTe ₁	FL	5,0	0,05 – 0,5	0,035	$\leq 2,01$	Fármaco e Urina	Síntese simples e rápida; análise rápida e fácil da amostra; não requer reações adicionais ou um longo tempo de incubação para análise.	Este trabalho

¹Sistema: RP-HPLC = Cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa, QD-ZnS-Mn = *quantum dots* de ZnS dopados com Mn; QD-CdTe-GLU = *quantum dots* de CdTe funcionalizados com glutatona; AuSNPs = nanopartícula de ouro; FLU = fluoresceína; SiQD = *quantum dots* de silício; QD-CdS-BSA = *quantum dots* de CdS revestidos com albumina de soro bovino; AgNPs = nanoplaquetas triangulares de prata; UCNPs = nanopartículas de conversão dopadas com lantanídeos; CDs = pontos quânticos de carbono; SiNPs = nanopartículas de silício; AuNC-GLU = nanoclusters de ouro revestidos com glutatona; AuNRs = nanobastões de ouro; GO = óxido de grafeno; QDCdTe₁ = *quantum dots* de CdTe funcionalizados com ácido mercaptosuccínico.

²Deteccção: PP = fosforescência; PL = fotoluminescência; CL = colorimetria.

³RSD (desvio padrão relativo): NI = não informado.

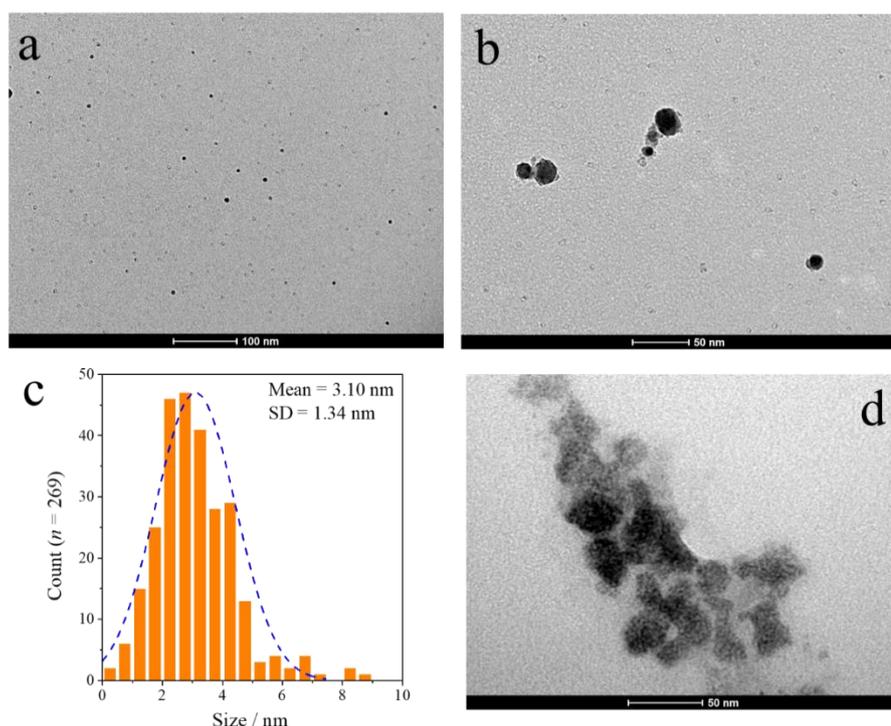
6.2.5 Avaliação do mecanismo de formação do bioconjugado QD-CdTe₁-PT

6.2.5.1 Avaliação da agregação do nanomaterial

Uma vez que o QD-CdTe₁ foi funcionalizado com MSA, em pH 5 a superfície da nanopartícula encontra-se preferencialmente com cargas negativas, enquanto a PT (pI = 10 - 12) tem carga global positiva. Portanto, supõe-se que a bioconjugação entre QD-CdTe₁ e PT ocorra preferencialmente por interação eletrostática, havendo assim agregação do nanomaterial e consequente supressão da emissão da fotoluminescência. A agregação do sistema QD-CdTe₁-PT foi avaliada a partir de experimentos de TEM e DLS.

A estrutura morfológica da superfície do CD-CdTe₁ produzido revelada por TEM (Fig. 18a-b) indica nanopartículas bem dispersas e quase esféricas apresentando uma distribuição de tamanho com um diâmetro médio de $3,10 \pm 1,34$ nm (Fig. 18c), semelhante a aquele calculado empiricamente (variação de 16%) usando a equação (1). Na presença de proteínas catiônicas (bioconjugação), foi observada a formação de agregados de nanossonda (Fig. 18d), confirmando o mecanismo proposto.

Figura 18. Imagem TEM da (a, b) nanossonda QD-CdTe₁ na ausência de PT com diferentes resoluções, (c) histograma mostrando a distribuição de tamanho do QD-CdTe₁ livre e (d) nanossonda QD-CdTe₁ na presença de PT (agregação).

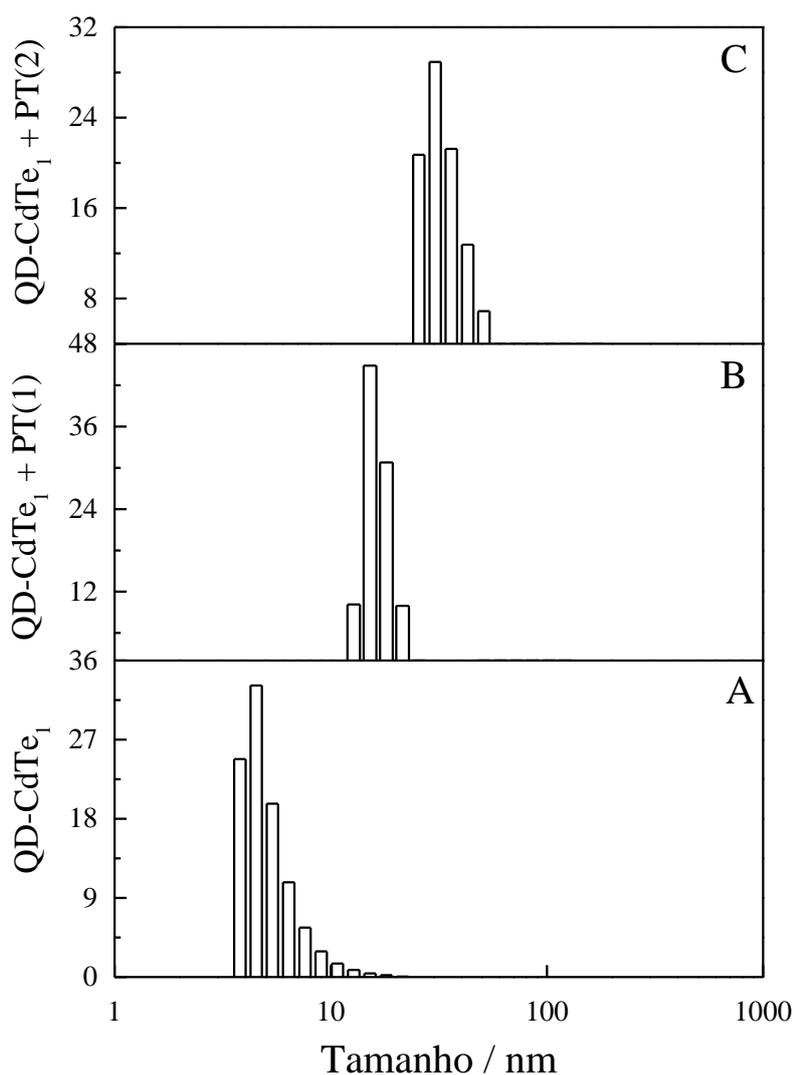


Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

Por DLS, o sistema QD-CdTe₁ apresentou raio hidrodinâmico de $4,31 \pm 1,12$ nm, o qual difere do tamanho calculado empiricamente (Tabela 5) e análise por TEM (Fig. 19) devido

a esta técnica considerar todas as espécies e interações interpartículas passíveis de ocorrer no meio (CHOUDHARY & NAGESWARAN, 2019). Quando se adicionou a proteína catiônica ao sistema (PT a 0,2 e 0,4 mg L⁻¹) houve aumento do tamanho para $14,86 \pm 2,34$ e $30,50 \pm 9,26$ nm (Fig. 19).

Figura 19. Perfil do espalhamento dinâmico de luz (DLS) do QD-CdTe₁ (A) sem PT, (B) com a adição de 0,2 mg L⁻¹ of PT, e (C) com a adição de 0,4 mg L⁻¹ of PT. Condições: tampão succinato (25 mM, pH 5) e QD-CdTe₁ a 450 nM.



Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

Estes resultados indicam que ocorreu agregação do sistema QD-CdTe₁-PT, corroborando com os resultados obtidos por Ipe et al. (2006) e Ag et al. (2014), os quais verificaram aumento no raio hidrodinâmicos dos QD de CdSe e CdTe@CdS-TGA, variando de 9 para 20 nm e 5.4 para 14.33 nm, após bioconjugação destes com citocromo P450 (heme proteína) e anticorpo anti-HER2, respectivamente.

6.2.5.2 Tipo de quenching e ensaios termodinâmicos

O quenching de fluorescência é um processo caracterizado pela supressão do sinal analítico na presença de um analito, o qual, pode ocorrer preferencialmente de duas formas, o quenching estático e dinâmico. No quenching dinâmico, a supressão da fluorescência ocorre devido a colisão do analito com a fluoróforo no estado excitado resultando na desativação desta, e transferência de energia não radioativa, enquanto que no quenching estático, a supressão ocorre pela formação de um complexo não fluorescente entre o analito e o fluoróforo no estado fundamental (LAKOWICZ, 2006). A determinação da natureza do processo fotofísico pode ser avaliada em função da variação de parâmetros de ligação em função da variação da temperatura (SURYAWANSHI, 2016) ou pela análise do tempo de vida do estado excitado da sonda na ausência e presença do analito (BEREZIN & ACHILEFU, 2010). Por meio da variação da intensidade de fotoluminescência do QD-CdTe₁ frente a concentrações crescentes de PT em diferentes temperaturas (23 a 37 °C), foi possível calcular a constante de Stern-Volmer (K_{sv}) e a constante de ligação (K_b) a partir das equações 7 e 8, respectivamente (Fig. 20a-b).

$$\left(\frac{PL_0}{PL}\right) = 1 + K_{sv}[PT] = 1 + \tau_0 k_q [PT] \quad \text{equação (7)}$$

$$\left(\frac{1}{PL_0 - PL}\right) = \frac{1}{PL_0} + \frac{1}{K_b \times PL_0} \cdot \left(\frac{1}{[PT]}\right) \quad \text{equação (8)}$$

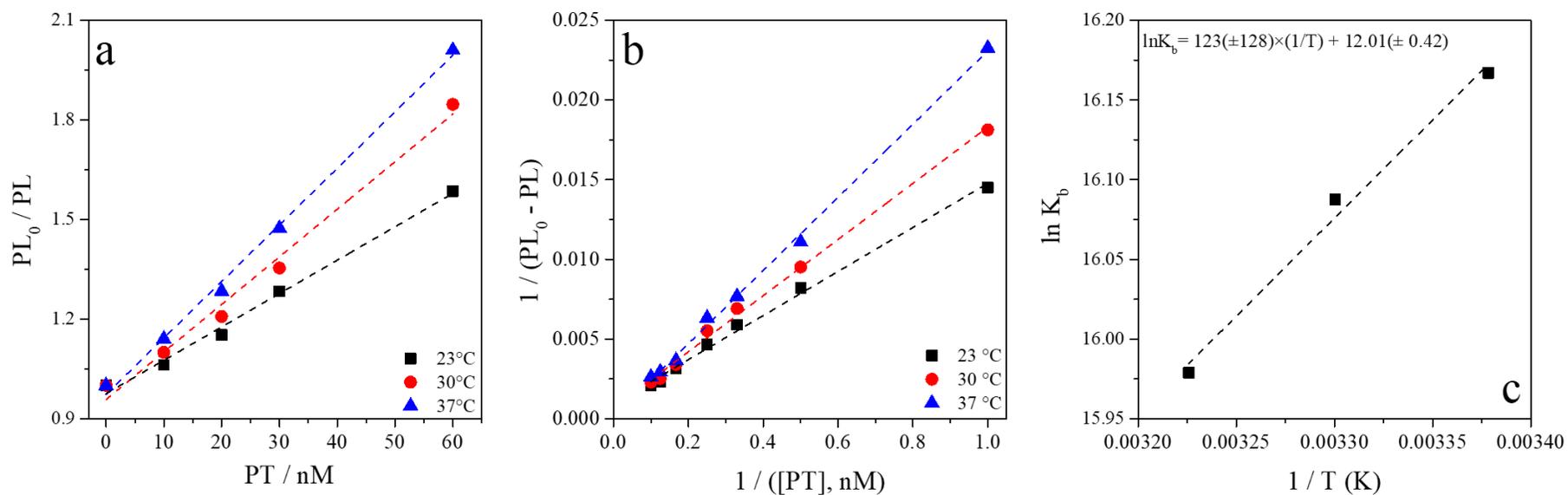
onde PL₀ e PL correspondem a intensidade de fotoluminescência do QD-CdTe₁ na ausência e presença de analito, respectivamente. Os τ₀ e k_q referem-se ao tempo de meia vida e a constante de quenching biomolecular, respectivamente. Além disso, foi possível calcular os parâmetros termodinâmicos referente a formação do bioconjugado QD-CdTe₁-PT (Fig 20c), baseado nas funções de estado, entalpia (ΔH), entropia (ΔS) e energia livre de Gibbs (ΔG):

$$\ln(K_b) = \frac{\Delta H}{R} \cdot \left(\frac{1}{T}\right) + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{equação (9)}$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{equação (10)}$$

onde R e T corresponde a constante universas dos gases ideais e a temperatura (K), respectivamente. A Tabela 7 sumariza todos parâmetros de ligação e termodinâmicos do processo de interação.

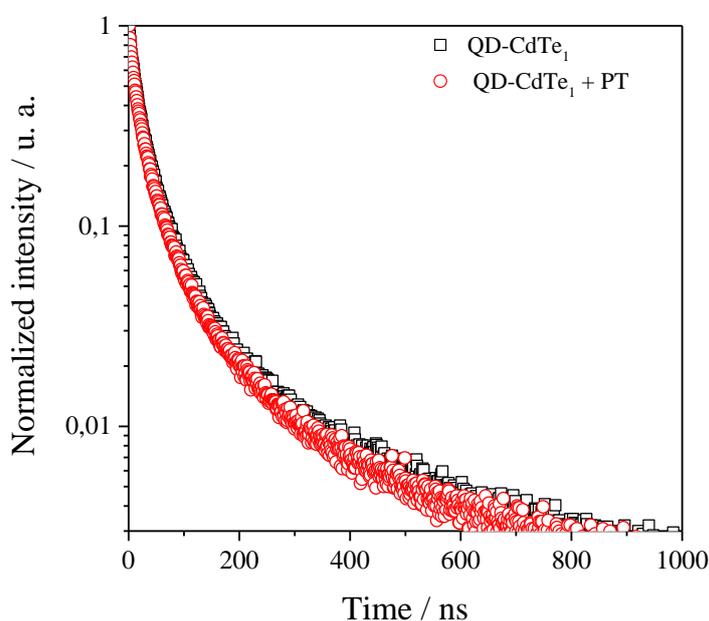
Figura 20. Parâmetros de interação de QD-CdTe₁ com PT a 23, 30 e 37°C. (A) Gráfico de Stern-Volmer, (B) Curva logarítmica dupla para calcular a constante de ligação e (C) gráfico de Van't Hoff. Condições: tampão succinato (25 mM, pH 5), QD-CdTe₁ a 450 nM e PT at 0 – 60 nM.



Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

A temperatura e valor de K_{sv} aumentaram proporcionalmente, sendo este perfil característico de quenching dinâmico. Contudo, uma vez que os valores de k_q (Tabela 7) são superiores a constante de quenching biomolecular difusional ($2.0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), o processo de quenching preferencial é estático, levando a formação de complexo e corroborando os resultados de DLS referentes a formação dos agregados. Estes resultados foram confirmados com base nos experimentos de tempo de vida (Fig. 21), pois o QD-CdTe₁ apresentou $29,7 \pm 0,2$ ns, enquanto o bioconjugado CD-CdTe₁-PT foi $28,5 \pm 0,1$ ns. A variação de 4,0% indica que ambos os sistemas tiveram uma vida útil semelhante.

Figura 21. Espectros de PL resolvidos no tempo do QD-CdTe₁ (450 nm) com PT a 0,0 e 0,5 mg L⁻¹, respectivamente.



Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

A constante de ligação (K_b) indicou alta afinidade do QD-CdTe₁ com a PT. Além disso, pode-se inferir a partir dos parâmetros termodinâmicos que a interação ocorreu espontaneamente ($\Delta G < 0$) e baseadas em forças eletrostáticas ($\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$) (SILVA et al, 2014), conforme hipótese inicial estabelecida, e concordante com os estudos da avaliação da influência da força iônica. Por fim, a partir dos resultados obtidos pôde-se propor o mecanismo de interação QD-CdTe₁ e PT (Fig. 22), considerando a adsorção da proteína catiônica na superfície das nanopartículas através de forças eletrostáticas, seguido de agregação do nanomaterial e por conseguinte, supressão da fotoluminescência. Similarmente sistemas com QD-CdTe com glutatona e QD-CdTe com ácido tioglicólico apresentam característica semelhantes frente a PT.

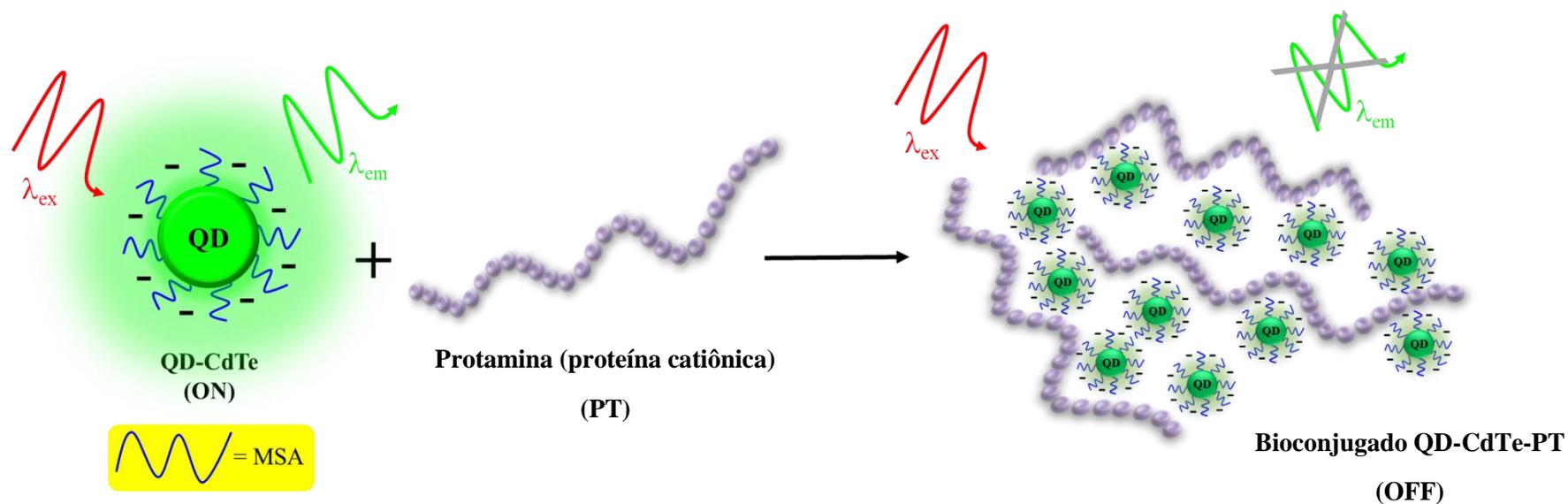
Tabela 7. Parâmetros de interação do *quantum dot* sintetizado com a PT.

¹ T (°C)	Parâmetros de Stern-Volmer			Parâmetros de ligação		Parâmetros termodinâmicos		
	K _{sv} (10 ⁷ M ⁻¹)	² r	³ k _q (10 ¹⁶ M ⁻¹)	K _b (10 ⁷ M ⁻¹)	² r	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J K mol ⁻¹)	ΔG (kJ mol ⁻¹)
23	1,40 ± 0,18	0,976	1,40 ± 0,18	1,05 ± 0,10	0,974			-39,80
30	1,45 ± 0,12	0,991	1,45 ± 0,12	0,97 ± 0,08	0,996	-10,46	99,13	-40,50
37	1,84 ± 0,16	0,989	1,84 ± 0,16	0,87 ± 0,07	0,997			-41,19

¹T= temperatura / ²r= coeficiente de correlação / ³k_q = constante de quenching biomolecular difusional / τ₀ = 10 ns, baseado em Haro-Gonzalez et al. (2012) QD de CdTe.

Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

Figura 22. Representação esquemática do processo de adsorção da PT na superfície do QD-CdTe₁.



Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

6.2.6 Aplicações da nanosondas em amostras de medicamento e urina

A aplicabilidade no nanosensor desenvolvido nas condições otimizadas para a quantificação de PT foi explorado em amostras de medicamento e urina sintética (Tabelas 8 e 9). Em amostras de medicamentos, o erro relativo variou de entre -0.70 a 2.60%, o que indica exatidão do método. Aplicando-se o teste *t* simples de Student (Tabela 8) não houve diferença significativa entre as concentrações encontradas e declarada para um intervalo de 95% de confiança.

Tabela 8. Determinação de PT em amostras de medicamentos ($n = 3$) usando o método proposto nas condições otimizadas.

Amostra	Método Proposto (mg mL ⁻¹)	Declarado (mg mL ⁻¹)	Erro (%)	¹ <i>t</i>
1	9,93 ± 0,24	10	- 0,70	0,50
2	10,26 ± 0,37	10	+ 2,60	1,22
3	10,06 ± 0,24	10	+ 0,60	0,43

¹ Teste *t* de Students, $t_{\text{tab}} = 4.30$ ($v = 2$).

Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

Tabela 9. Ensaios de recuperação e determinação de PT em amostras de urina sintética (U1 a U5) com diferentes composições ($n = 3$).

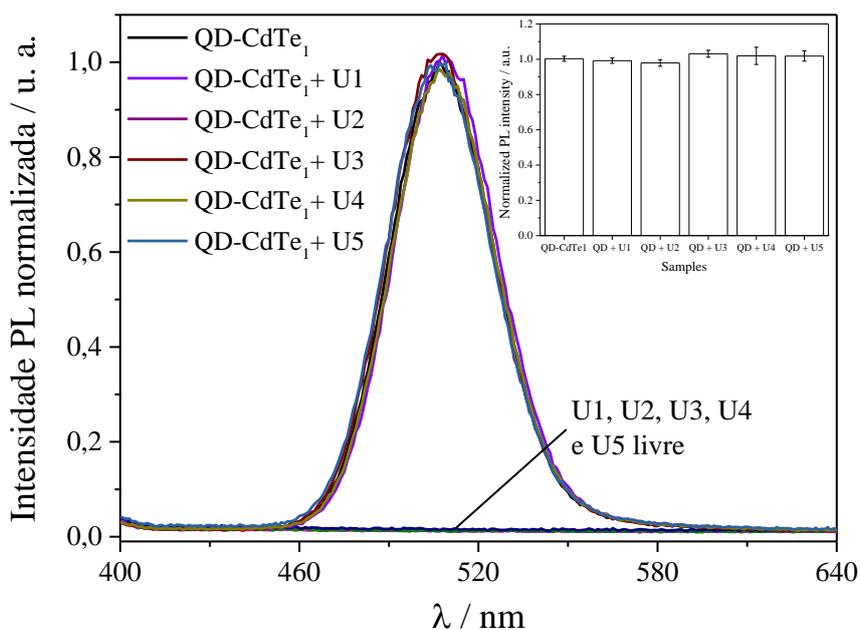
Amostra	PT adicionada (mg L ⁻¹)	PT encontrada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
U1	0,00	< LOD	-
	0,40	0,40 ± 0,02	100
	0,80	0,78 ± 0,03	98
U2	0,00	< LOD	-
	0,30	0,32 ± 0,02	107
	0,60	0,58 ± 0,02	96
U3	0,00	< LOD	-
	0,30	0,32 ± 0,02	108
	0,60	0,59 ± 0,02	98
U4	0,00	< LOD	-
	0,30	0,30 ± 0,02	100
	0,60	0,59 ± 0,02	98
U5	0,00	< LOD	-
	0,30	0,28 ± 0,01	95
	0,60	0,58 ± 0,01	96

Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

As diferentes amostras de urina sintética (U1-U5) avaliadas não apresentaram autofluorescência nas condições otimizadas do método. Além disso, ao comparar os sistemas QD-CdTe₁ (sinal de referência) e QD-CdTe₁+Urina (U1-U5), a variação máxima da

fotoluminescência na intensidade foi inferior a 3,4% (Fig. 23), portanto, a nanossonda foi considerada seletiva para a determinação do PT neste tipo de amostra. Além disso, a HSA (proteína sérica principal, pI = 4,6), que pode ser eliminada pela urina, tem carga global negativa no pH ideal do método, logo a interação com QD-CdTe₁ não seria favorecida.

Figura 23. Espectro de fotoluminescência dos QD-CdTe₁ (450 nM) na ausência e na presença das diferentes amostras de urina sintética (U1- U5). Condições: tampão succinato (25 mM, pH 5), QD-CdTe₁ 450 nM.



Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

Por fim, para as amostras de urina sintética com diferentes composições foram obtidas recuperações de 95 a 108%, comprovando a ausência de efeito de matriz e a exatidão do método proposto. Dessa forma, esta metodologia mostrou-se viável para quantificação de PT em amostras de diferentes níveis de complexidade.

6.3 Conclusão

Neste trabalho foi desenvolvido um método para determinação espectrofluorimétrica de proteína catiônica baseado no processo de bioconjugação entre o QD-CdTe₁ e a PT. Nas condições otimizadas, o método proposto mostrou-se rápido, simples, com boa repetibilidade, e simplicidade no preparo da amostra. Por sua vez, quando aplicado a amostras de medicamento e de urina sintética com diferentes graus de complexidade, o apresentou precisão e exatidão na determinação de PT com elevadas recuperações. Este método pode, portanto, ser uma alternativa para análises bioanalíticas e o controle de qualidade de proteínas catiônicas como a PT em diferentes tipos de amostra.

6.4 Perspectivas

Tendo em vista o sistema e a alta afinidade da protamina com o DNA, o bioconjugado QD-CdTe-PT poderia ser utilizado como um sistema *on-off-on* para a quantificação desse ácido nucléico.

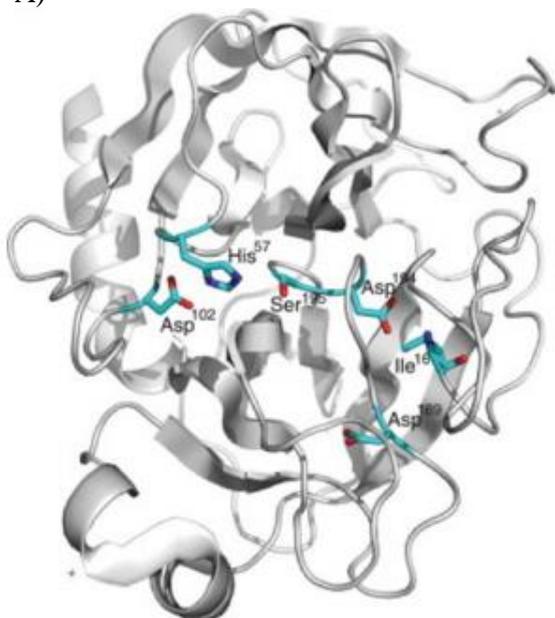
7. UTILIZAÇÃO DO BIOCONJUGADO QD-CdTe-PT COMO UM NANOSENSOR *ON-OFF-ON* PARA A QUANTIFICAÇÃO DE TRIPSINA EM AMOSTRAS DE URINA E PLASMA

7.1 Introdução

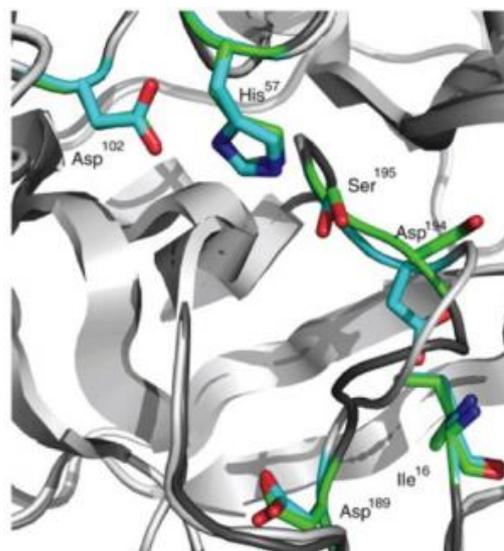
A tripsina (TP - Fig. 24A) é uma enzima do tipo serina protease presente no sistema digestivo, sendo sintetizada por células acinares do pâncreas sob a forma de um precursor inativo, denominada tripsinogênio, o qual é secretado no duodeno através do suco pancreático e convertido a tripsina pela enteroquinase no trato gastrointestinal (POLZONETTI et al., 2010). Essas enzimas, descobertas em 1876 por Kuëhne, possuem massa molecular no intervalo de 25 a 35 kDa, pI entre 4 e 5, um pH ótimo em torno de 8 e uma temperatura operacional ideal em torno de 37°C, variando de acordo com a sua fonte de origem (TERRA & FERREIRA, 2012).

Figura 24. (a) Estrutura química da tripsina humana, onde os resíduos que formam a “tríade catalítica” e o sítio catalítico (Asp189) são destacados e (b) Disposição dos principais resíduos, incluindo a tríade catalítica.

A)



B)

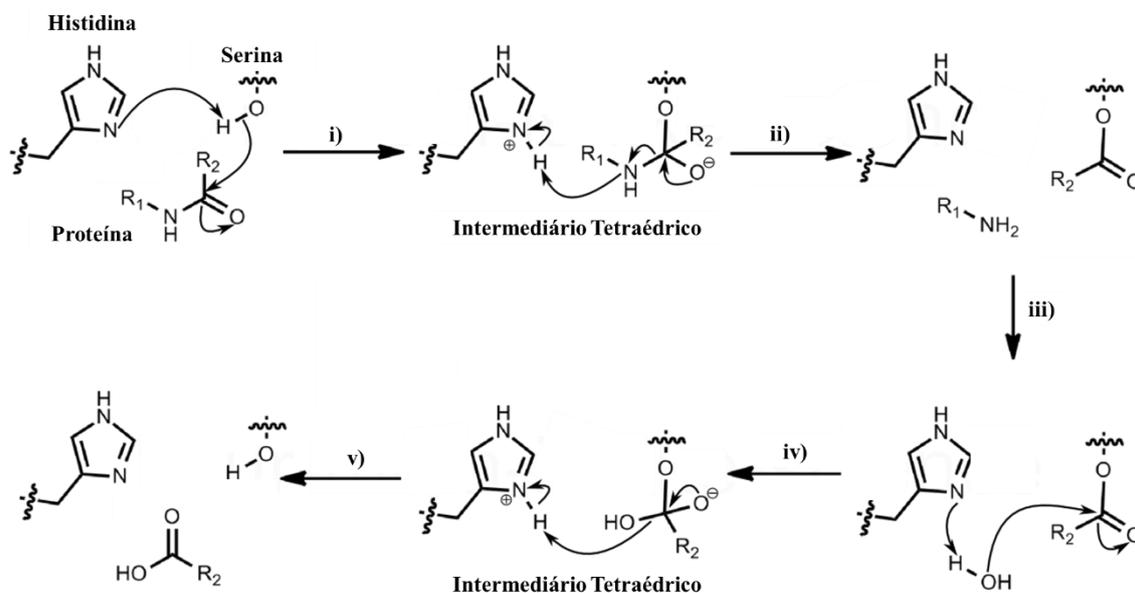


Fonte. BAIRD, 2017.

O mecanismo de ação da tripsina envolve três aminoácidos denominados de tríade catalítica, que são Ser195, His57 e Asp102 (Fig. 24B). O mecanismo envolve basicamente quatro etapas (Fig. 25): (i) o hidrogênio no grupo hidroxila da serina é removido, formando uma carga negativa no oxigênio, o qual passa a ser um nucleófilo mais efetivo e ataca a ligação peptídica; (ii) a ligação carbono-nitrogênio que forma o peptídeo é quebrada, liberando o

primeiro resíduo proteico da enzima; (iii) a amina formada é removida do sítio em prol da entrada de água; (iv) o hidrogênio da água é transferido para histidina e a hidroxila se liga ao carbono carboxílico da serina, (v) o oxigênio, agora carregado negativamente, forma uma ligação dupla com o carbono e a serina captura o hidrogênio anteriormente recebido pela histidina. Por fim, o aspartato atua na manutenção da histidina na posição correta para torná-lo um bom aceitador de prótons (BAIRD, 2017).

Figura 25. Representação do mecanismo de reação catalítico da tripsina frente a uma proteína, quebrando as ligações peptídicas entre os aminoácidos.



Fonte. Adaptado de PROTEOPEDIA-Life in 3D, 2010.

Disponível em: <https://proteopedia.org/wiki/index.php/Image:Serine_protease_mechanism_by_snellios.png>. Acesso em 27/12/19.

As tripsinas clivam preferencialmente substratos contendo ligações amida após resíduo P1 lisina e arginina, possuindo de 2 a 10 vezes maior preferência por arginina em relação a lisina a depender do substrato peptídico. No entanto, não há uma preferência significativa entre esses aminoácidos se o substrato for um éster uma vez que esta classe de compostos interfere na seletividade enzimática (CRAIK et al. 1985). Adicionalmente, um fator que pode interferir na atividade enzimática é a presença de prolina na posição P3, resultando na diminuição de 3 a 9 vezes na ação da enzima, enquanto que a presença de arginina, lisina, isoleucina, leucina ou fenilalanina na posição P2 provoca uma redução na atividade entre 2 a 16 vezes. P1, P2 e P3 são referentes, respectivamente, ao primeiro, segundo e terceiro resíduo ao lado N-terminal da ligação que sofre hidrólise por parte da enzima (HARRIS et al. 2000; BAIRD et al., 2000).

No organismo, a tripsina, quando ativada, contribui para a digestão da proteína consumida e é responsável pela ativação das pro-enzimas de todas as outras enzimas digestivas, como quimotripsina e elastase (BAIRD & CRAIK, 2013). Logo, caso o pâncreas não produza tripsina suficiente, haverá a diminuição da capacidade de digerir ou absorver alimentos, podendo levar a anemia e/ou desnutrição e ao desenvolvimento de fibrose cística em adultos. Curiosamente, em recém nascidos, essa enzima é um forte indicador de fibrose cística quando está em altas concentrações no sangue, sendo detectada através do exame do pezinho (NOONE et al., 2001). Além disto, a tripsina é frequentemente usada para digerir proteínas e, em seguida, identificar os peptídeos resultantes usando espectrometria de massa. No meio medicinal, é muito utilizada para, por exemplo, dissolver coágulos sanguíneos, cultura de células, isolamento de mitocôndrias, preparação de amostras para análise de DNA citométrico de fluxo e tratar a inflamação (WORTHINGTON, 1988). Logo, devido ao seu papel bilógico, farmacológico e medicinal, é imprescindível realizar o monitoramento desta enzima.

Vários são os métodos reportados na literatura para detecção da tripsina, como clivagem em fase sólida, colorimetria, radiometria, eletroquímica e titulações de seus sítios ativos utilizando geralmente *p*-nitrofenil-*p*-guanidinobenzoato ou 4-metilumbeliferil-*p*-guanidinobenzoato (BAIRD & CRAIK, 2013). No entanto, dentre estas técnicas, têm-se melhor explorado o ensaio fluorométrico por ser uma forma rápida e com alta sensibilidade para a quantificação dessa enzima.

Nesse sentido, nessa nova etapa, foi utilizado o sistema QD-CdTe-PT como um sensor fluorométrico do tipo *on-off-on* para realizar a detecção e quantificação da tripsina. O bioconjugado utilizado possui uma alta estabilidade e é passível de detectar mínimas variações dessa proteína no meio devido a alta sensibilidade do QD a ela, o que implica em um nanosensor de fácil preparação, barato e com uma alta sensibilidade à tripsina se comparada as técnicas tradicionais e aos compostos fluorescentes existentes para a sua detecção.

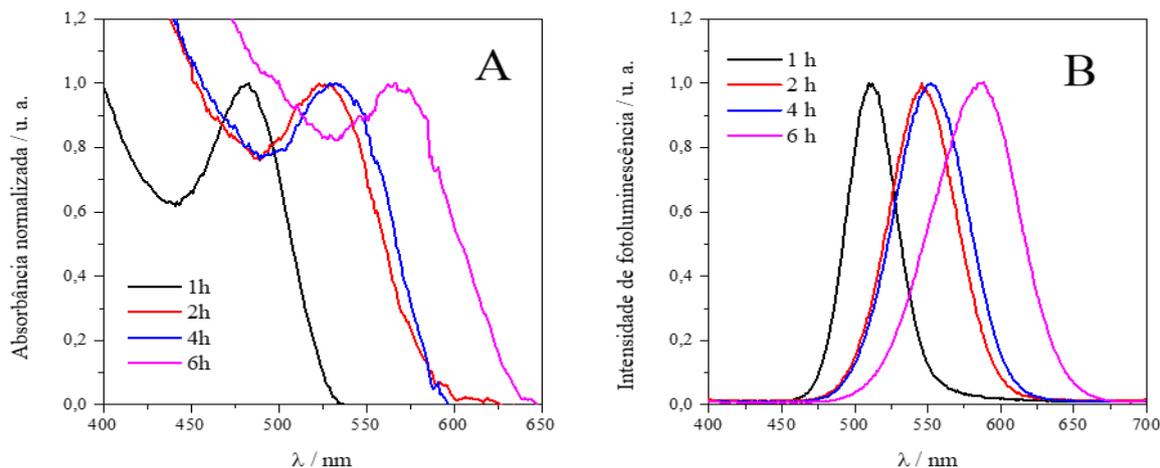
7.2 Resultados e discussões

7.2.1 Síntese e caracterização dos quantum dots de CdTe funcionalizados com MSA

Para síntese e caracterização dos *quantum dots* utilizados nesta etapa do trabalho, seguiu-se os procedimentos descritos no tópico 6.2.1, variando o tempo de síntese de 1 a 6 h. A partir das medidas espectroscópicas, obteve-se os espectros de extinção molar e fotoluminescência (Fig. 26A-B) dos QD-CdTe sintetizados. Seguindo o padrão das sínteses anteriores, o aumento do tempo de síntese provocou um deslocamento gradual para maiores

comprimento (red shift), o que implica em um maior tamanho e menor confinamento quântico das nanopartículas sintetizadas (TORCHYNSKA & VOROBIEV, 2011). Para os sistemas produzidos, obteve-se uma variação do comprimento de onda de extinção molar de 483 a 566 nm, emissão de fotoluminescência de 510 a 588 nm, e tamanho das partículas de 2,56 a 3,21 nm, de 1 a 6 h de tempo de síntese, respectivamente (Tabela 10).

Figura 26. Espectros de (a) absorção e (b) emissão para os novos QD de CdTe com diferentes tempos de síntese.



Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

Por meio das equações 1-3 (página 41), foi calculado o tamanho e a concentração desse QD, conforme pode ser observado na Tabela 10.

Tabela 10. Parâmetros relativos aos QD sintetizados variando o tempo de síntese.

Sistema	Tempo (h)	¹ λ _{abs} (nm)	² λ _{em} (nm)	Deslocamento Stokes (nm)	³ FWHM (nm)	Diâmetro (nm)	⁴ C _{QD} (μM)
QD-CdTe ₁	1	483	510	27	40	2,56	24,48
QD-CdTe ₂	2	523	546	23	49	2,83	12,12
QD-CdTe ₄	4	532	552	20	60	2,90	12,66
QD-CdTe ₆	6	566	588	22	70	3,21	7,61

¹λ_{abs}= comprimento de onda de absorção máximo / ²λ_{em}= comprimento de onda de emissão máximo / ³FWHM = largura a meia altura / ⁴C_{QD}= concentração do QD.

Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

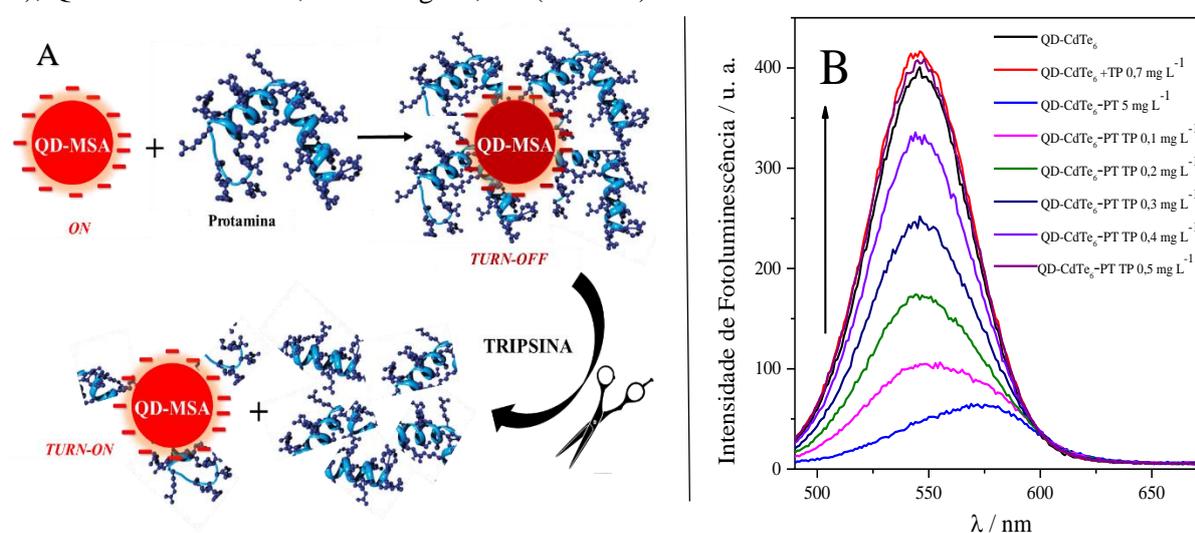
O deslocamento de Stokes variou de 20 a 27 nm e, como anteriormente obtido, houve relação proporcional entre o tempo de síntese e o valor da largura total à meia altura (FWHM), o qual variou de 40 a 70 nm devido a uma maior dispersão do tamanho dos QD-CdTe no meio (FWHM > 50).

7.2.2 Avaliação da interação do sistema QD-CdTe-PT com a tripsina

Nos ensaios iniciais com a TP, foi utilizada a bioconjugação por adsorção eletrostática do sistema QD-CdTe-PT para realizar sua quantificação explorando a estratégia ON-OFF-ON.

O método proposto considera que o QD-CdTe livre apresenta máxima intensidade de fotoluminescência (ON), contudo, após adição de PT, há a supressão da fotoluminescência (OFF) devido a formação do bioconjugado QD-CdTe-PT. Contudo, ao adicionar a TP ao sistema, a protease cliva a PT especificamente nas ligações peptídicas dos aminoácidos lisina e arginina, “liberando” a nanopartícula e reestabelecendo o sinal da fotoluminescência (ON), o qual é proporcional a concentração da TP (sistema ON-OFF-ON). Na Fig. 27A-B pode-se observar um esquema geral do processo e é verificado a validade da lógica utilizada.

Figura 27. Representação do (A) sistema on-off-on proposto e (B) espectros de emissão para o sistema QD-CdTe₆-PT com diferentes concentrações de TP (0-0,5 mg L⁻¹). Condições: tampão Tris (50 mM, pH 8), QD-CdTe₆ a 500 nM, PT a 8 mg L⁻¹, *slit* (λ_{ex} / λ_{em}) de 3/3 nm.



Fonte: Autora deste trabalho, 2020

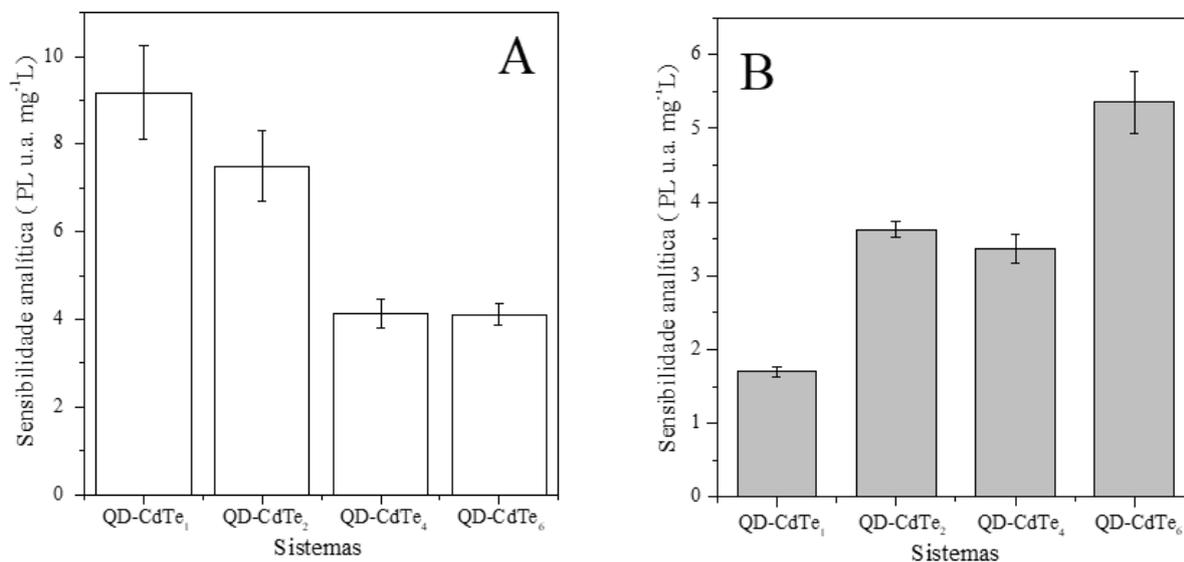
Tendo a base experimental estabelecida, os sistemas de QD-CdTe-PT foram avaliados e os parâmetros físico-químicos foram otimizados.

7.2.3 Otimização dos parâmetros analíticos

7.2.3.1 Influência do tamanho do QD-CdTe e da PT na detecção de TP

A influência do tamanho dos QD-CdTe e da concentração de PT sobre a sensibilidade à TP foi avaliada. Inicialmente, foi fixada a concentração dos QD-CdTe a 500 nM e acrescentada a PT de forma que intensidade de fotoluminescência de cada QD-CdTe reduzisse em cerca de 90%. Como o aumento do QD-CdTe provoca uma menor área superficial e menor interação com a PT, ou seja, uma menor sensibilidade a essa proteína, fez-se necessário acrescentar quantidades crescentes de PT no sistema de acordo com o aumento dos QD-CdTe a fim de obter a redução da fotoluminescência desejada. Por fim, a TP foi adicionada aos sistemas e avaliou-se como este atuava (Fig. 28A)

Figura 28. Sensibilidade analítica para os diferentes sistemas QD-CdTe-PT com a adição de TP (0-0,5 mg L⁻¹) variando (A) concentração da PT e (B) concentração dos QD-CdTe. Condições experimentais: em (A) Para o QD-CdTe₁-QD-CdTe₆ foi usado PT a 1- 8 mg L⁻¹; (B) Para os QD-CdTe₁ a QD-CdTe₆, as concentrações variaram de 600 a 100 nM. Os *slit* $\lambda_{ex} / \lambda_{em}$ utilizados foram 5/3 nm, 3/3 nm e 1,5/3 nm.



Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

Nesta avaliação, para uma mesma concentração de QD-CdTe, aquele que indicou uma maior sensibilidade frente a TP foi o QD-CdTe₁. Entretanto, a diminuição na sensibilidade provavelmente foi decorrente do aumento significativo da concentração da PT de um sistema para o outro. De modo a avaliar se a sensibilidade estava relacionada a concentração de PT no meio, um segundo estudo foi efetuado, no qual foi reajustada as concentrações de cada QD-CdTe de modo que a PT fixada a 2 mg L⁻¹ suprimisse o sinal inicial de fotoluminescência em pelo menos 85%.

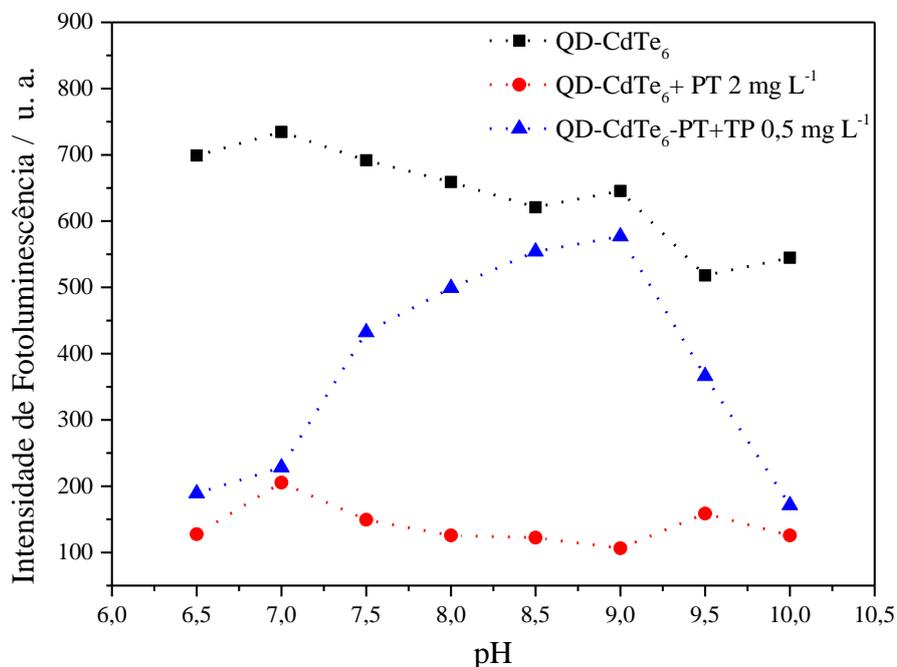
Conforme pôde ser observado na Fig. 28B, fixando a concentração da PT, o *quantum dot* que possui uma maior sensibilidade frente a TP foi o QD-CdTe₆. Este, além de apresentar uma maior sensibilidade (29B), foi utilizado em uma menor concentração (100 nM), sendo interessante para possíveis aplicações em ensaios de imageamento, uma vez que também possui emissão no vermelho (588 nm) (LI, 2013). Desta forma, o QD-CdTe₆ foi selecionado para estudos subsequentes visando a quantificação de TP.

7.2.3.2 Efeito do pH na interação QD-CdTe-PT com a TP

A avaliação da influência do pH (6,5 a 10) na intensidade de fotoluminescência das nanosondas e na atividade enzimática da TP foi avaliada (Fig. 29). Observa-se que em pH superiores a 7, houve uma redução na intensidade de fotoluminescência do QD-CdTe₆ livre (cerca de 30%), possivelmente associado a solubilidade desta nanopartícula, uma vez que altos

valores de pH leva a dissociação do QD e consequente liberação dos íons cádmio e do MSA para a solução, os quais irão reagir e formar complexos no meio (WANG et al., 2009).

Figura 29. Intensidade de fotoluminescência do QD-CdTe₆ e do sistema QD-CdTe₆-PT na ausência e presença de TP (0,5 mg L⁻¹) em diferentes valores de pH. Condições experimentais: QD-CdTe₆ a 100 nM, PT a 2 mg L⁻¹, tampão Tris HCl/Tris base 50 mM, *slit* ($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$) 5/3 nm.



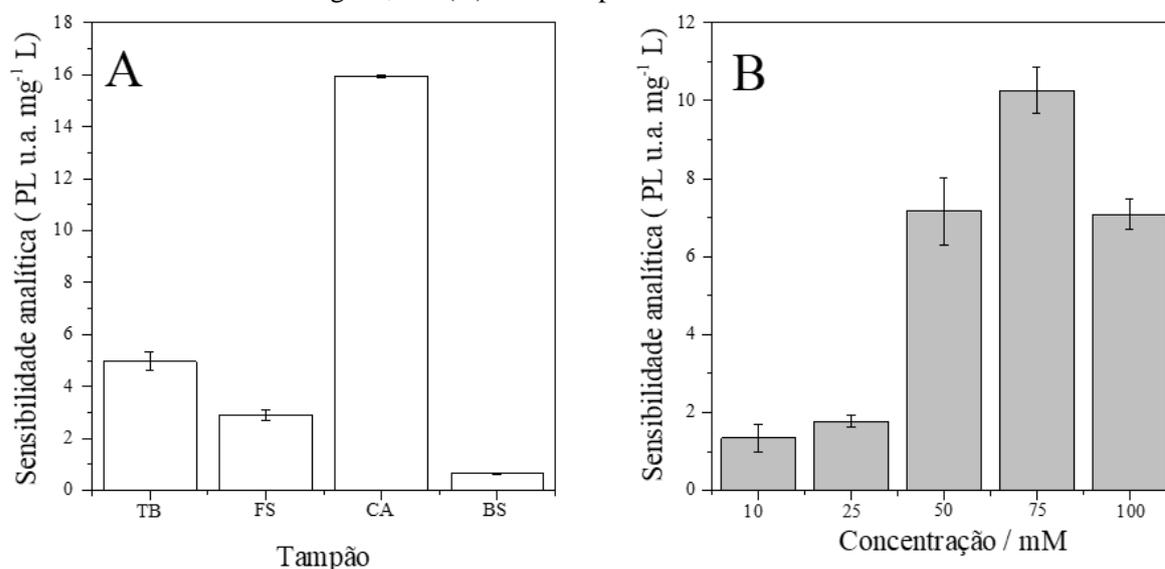
Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

Por outro lado, houve um aumento da atividade da enzima no meio até pH 9, seguido do seu decréscimo. Como os valores de intensidade de fotoluminescência referentes aos pH 8,5 e 9 são similares, e é reportado na literatura o pH 8,5 como o ótimo quanto a atividade da TP (GU et al., 2011; ZHENG et al., 2012) e há menor efeito da liberação de cádmio livre em solução, foi selecionado o pH 8,5 para os estudos posteriores.

7.2.3.3 Tipo e concentração do tampão utilizado

A depender da composição da matriz de análise, esta pode mascarar, interferir e/ou reagir com o analito, levando a erros experimentais e/ou falsos resultados, portanto a influência da composição do sistema tampão sobre a sensibilidade analítica foi avaliada empregando Tris HCl / Tris base (TB), dihidrogenofosfato / hidrogenofosfato de sódio (FS), cloreto de amônio / amônia (CA) e ácido bórico / borato de sódio (BS) (Fig. 30A).

Figura 30. Sensibilidade analítica do sistema QD-CdTe₆-PT com a adição TP (0-0,5 mg L⁻¹) em (A) diferentes sistemas tampão e (B) diferentes concentrações do tampão CA. Condições experimentais: QD-CdTe₆ e PT a 100 nM e 2 mg L⁻¹; em (A) cada tampão estava a 50 mM. *Slit* λ_{ex} / λ_{em} 5/3 nm.



Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

O sistema ácido bórico/borato de sódio foi aquele com menor sensibilidade uma vez que estas espécies possuem capacidade de liga-se ao sítio ativo protease (Ser95) e, conseqüentemente, inibir a atividade da TP (WEBB, 2007). A solução tampão Tris HCl/Tris base apresentou maior sensibilidade comparado ao sistema tampão composto por dihidrogenofosfato/hidrogenofosfato de sódio, corroborando com sistemas que avaliaram o efeito destes na atividade da protease (BARATTINI & HUMPHRYES, 2015; PERFINITY BIOSCIENCES, 2014). Uma possível explicação para o tampão fosfato ter uma menor sensibilidade pode estar relacionada ao seu estado de dissociação no pH trabalhado (H₂PO₄⁻ - HPO₄²⁻), o qual pode interagir com a enzima assim como o tampão borato, além de apresentar uma menor capacidade tamponante se comparado ao tampão Tris utilizado.

Comparando o tampão Tris com o amônio, ambos possuem um nitrogênio passível de protonação, contudo, o tampão amônio apresentou uma sensibilidade superior ao Tris em cerca de 3,20 vezes. Isso pode estar relacionado à própria estrutura dos compostos, uma vez que os grupamentos hidroxilas do tampão Tris podem interagir por ligação de hidrogênio com a enzima e diminuir essa sensibilidade (FERREIRA et al., 2015). Adicionalmente, destaca-se que em pH 8,5 (selecionado) o tampão Tris (pK_a = 8,1) está preferencialmente em sua forma dissociada (não protonado), o que confere ao nitrogênio um par de elétron livre; por outro lado, o tampão amoniacal (pK_a = 9,2) está preferencialmente na forma associada (carga positiva), o

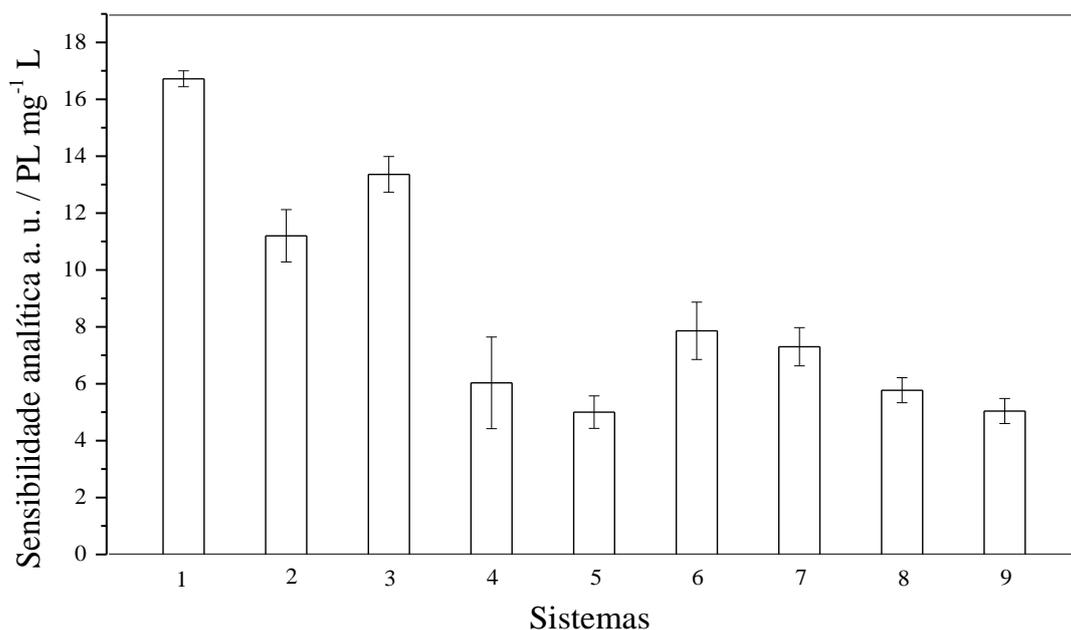
que pode levar a redução de possíveis interações com a enzima (HETHEY et al., 2002). Assim, selecionou-se o tampão amoniacal para as próximas etapas do processo de otimização.

O efeito da concentração da solução tampão (10 a 100 mM) foi avaliado sobre a sensibilidade analítica do sistema QD-CdTe₆-PT para a TP (Fig. 30B), sendo que em baixas concentrações há uma menor sensibilidade a presença da TP no meio até 25 mM, seguido de um aumento significativo até 75 mM e tendo uma diminuição ao atingir 100 mM. Isso pode ter ocorrido devido a baixa capacidade tamponante em menores concentrações, resultando em mudança no pH e perda da atividade enzimática. Por outro lado, ao aumentar demasiadamente a concentração leva a inibição da atividade enzimática (BIOLOGICALBUFFER, 2008). Dessa forma, foi selecionada a concentração de 75 mM de tampão amônio.

7.2.3.4 Avaliação da concentração do QD e da protamina e efeito da força iônica

Foi avaliado como a concentração do QD-CdTe (50-400 nM) e da PT (1-8 mg L⁻¹) podem influenciar na detecção/quantificação dessa enzima (Fig. 31). Quanto maior a concentração do QD-CdTe₆, maior é a quantidade de PT necessária para que haja uma supressão significativa da intensidade de fotoluminescência (~80%) e, conseqüentemente, uma maior concentração de TP é necessária para que ocorra aumento do sinal analítico, levando a uma diminuição na sensibilidade do método. Analogamente, para uma mesma concentração do QD-CdTe₆, ao se adicionar mais PT ao sistema, há uma supressão mais significativa da fotoluminescência e uma provável supersaturação dessa proteína no meio, provocando uma diminuição na sensibilidade a TP devido a necessidade de uma maior concentração desta para que haja a clivagem da PT e o aumento na fotoluminescência do QD-CdTe₆. Por outro lado, ao se fixar a concentração de PT e aumentar a concentração do QD-CdTe₆, há uma menor interação e uma maior facilidade de desfazer o bioconjugado, aumentando a intensidade de fotoluminescência, o que implica em uma maior sensibilidade do método proposto. Procurando balancear a concentração do QD-CdTe₆, sua intensidade de fluorescência e estabilidade relativa, foi fixada a condição com o QD-CdTe₆ a 100 nM e protamina à 2 mg L⁻¹.

Figura 31. Sensibilidade analítica para TP ($0-0,05 \text{ mg L}^{-1}$) para diferentes concentrações do QD-CdTe₆ (50-400 nM) e da PT (1-8 mg L^{-1}). Condições experimentais: Tampão amônia/amônio 75 mM, $slit \lambda_{ex} / \lambda_{em} 5/3 \text{ nm}$.



Legenda: 1- QD-CdTe₆ a 50 nM e PT a 1 mg L^{-1} ; 2- QD-CdTe₆ a 100 nM e PT a 1,5 mg L^{-1} ; 3- QD-CdTe₆ a 100 nM e PT a 2 mg L^{-1} ; 4- QD-CdTe₆ a 100 nM e PT a 3 mg L^{-1} ; 5- QD-CdTe₆ a 100 nM e PT a 4 mg L^{-1} ; 6- QD-CdTe₆ a 200 nM e PT a 3 mg L^{-1} ; 7- QD-CdTe₆ a 200 nM e PT a 4 mg L^{-1} ; 8- QD-CdTe₆ a 300 nM e PT a 6 mg L^{-1} ; 9- QD-CdTe₆ a 400 nM e PT a 8 mg L^{-1} .

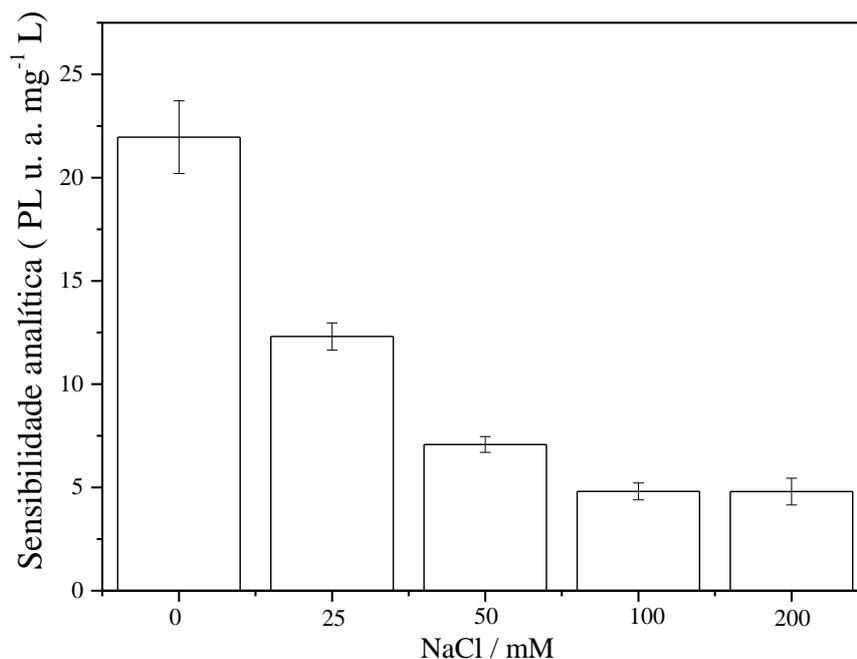
Fonte. Autora deste trabalho, 2020.

Os efeitos eletrostáticos são importantes no meio biológico, podendo, por exemplo, estabilizar estados de transição carregados e auxiliar no reconhecimento e ligação molecular. Além disso, foi observado no capítulo anterior que a formação do bioconjugado sofre variações com o aumento da força iônica do meio. Assim, avaliou-se o efeito da variação da força iônica no meio (NaCl de 0 a 200 mM) na atividade catalítica da enzima (Fig. 32).

Com o aumento da concentração do sal foi observado uma menor sensibilidade, resultante possivelmente por uma inibição da atividade enzimática. Segundo Castaneda-Agullo et al. (1961) e Tougu et al. (1994), cátions monovalentes são inibidores competitivos reversíveis da hidrólise triptica de substratos, assim, ao se aumentar gradativamente a concentração desses sais no meio, há um efeito inibidório gradual da enzima. Outro fator que pode estar relacionado a essa diminuição na sensibilidade é a formação do próprio bioconjugado QD-CdTe₆-PT, que sofre desestabilização com o aumento da força iônica e, conseqüentemente, interfere no processo de quantificação da tripsina. Entretanto, a partir de NaCl a 100 mM, há uma estabilização nessa sensibilidade. Vale salientar que, ao se realizar o teste ANOVA One Way ($F_{tab} = 3,26$), não houve diferença significativa na intensidade de fotoluminescência tanto do

QD-CdTe₆ ($F_{cal}= 1,58$) quanto do sistema QD-CdTe₆-PT ($F_{cal}=1,31$) com o aumento da força iônica quando comparada ao sistema livre desse efeito em um nível de 95% de confiança. Também foi realizado o teste de Tukey e obteve um Δ de 115,08 e 22,76 para o sistema QD-CdTe₆ e QD-CdTe₆-PT, respectivamente, e não houve diferença entre os grupos estudados.

Figura 32. Variação na sensibilidade analítica do sistema QD-CdTe₆-PT na presença da TP (0-0,05 mg L⁻¹) com o aumento da força iônica. Condições experimentais: QD-CdTe₆ a 100 nM, PT a 2 mg L⁻¹, tampão amônia/amônio 75 mM, *slit* $\lambda_{ex} / \lambda_{em}$ 5/3 nm.



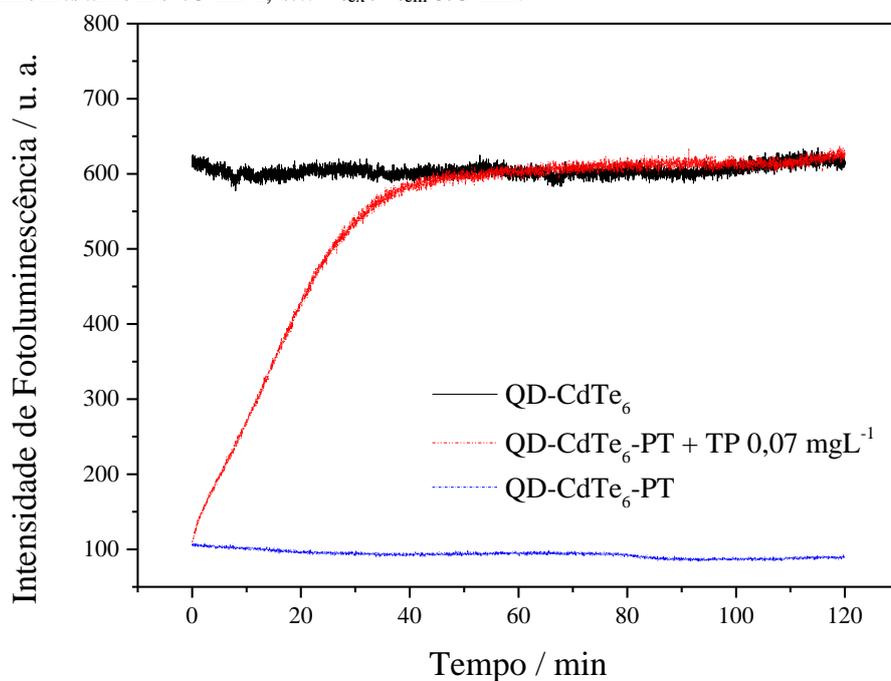
Fonte. Autora deste trabalho, 2020.

7.2.3.5 Cinética e estudo de fotoestabilidade

Todas as enzimas possuem um sítio ativo no qual o substrato se liga, sofre clivagem e em seguida é “liberado” para o meio novamente, momento este em que a enzima é restaurada a sua forma original. Como a enzima não é consumida durante a reação, quanto maior o tempo que ela estiver na presença do substrato, maiores quantidades deste sofrem clivagem. Nesse sentido, no método proposto, quanto maior o tempo de reação, maior seria o aumento da fluorescência com menores quantidades de tripsina adicionadas ao meio, o que implica em uma maior sensibilidade. Assim, é necessário conhecer o tempo mínimo requerido para que uma determinada concentração de TP consiga aumentar significativamente a fotoluminescência do QD-CdTe₆, de modo a conseguir uma boa sensibilidade com uma relativa rapidez do método proposto (Fig. 33). Observa-se um aumento gradual da fotoluminescência do sistema QD-CdTe₆-PT até alcançar uma estabilização desse sinal após 40 min de análise. Esse aumento no

sinal é decorrente da atividade enzimática, a qual, com o passar do tempo, cliva uma maior quantidade de PT, o que resulta em um aumento gradual da concentração do QD-CdTe₆ livre em solução e consequente aumento da fotoluminescência. Logo, como a estabilização do sinal foi alcançada em torno de 40 min de reação, esse deve ser o tempo mínimo de espera para a realização das análises. Com relação a fotoestabilidade, esta foi caracterizada a partir de contínua exposição à radiação eletromagnética ($\lambda_{ex} = 350$ nm) tanto para o QD-CdTe₆ quanto para o bioconjugado QD-CdTe₆-PT. Em ambos os sistemas se observou variação do sinal em torno de 5%, o que indica a fotoestabilidade no intervalo de tempo monitorado e nas condições avaliadas.

Figura 33. Avaliação da cinética e da fotoestabilidade do QD-CdTe₆ e do sistema QD-CdTe₆-PT na ausência e presença da TP a 0,07 mg L⁻¹. Condições experimentais: QD-CdTe₆ a 100 nM, PT a 2 mg L⁻¹, tampão amônia/amônio 75 mM, *slit* $\lambda_{ex} / \lambda_{em}$ 5/3 nm.



Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

7.2.3.6 Aplicação de inibidores para a tripsina

No meio reacional, as enzimas não são danificadas ou modificadas durante o processo de clivagem, o que implica que elas continuam a clivar o substrato por tempo indeterminado ou até que haja alguma mudança físico-química no meio de modo a parar sua atividade enzimática, como aumento da temperatura ou utilização de inibidor. O mesmo perfil é observado para a TP, a qual, independente da concentração utilizada, continua a clivar a PT ao longo do tempo até atingir a intensidade de fotoluminescência máxima (Fig. 34A).

No sistema proposto neste trabalho, a quantificação da TP está sujeita a erros de análise ou de quantificação devido a essa característica enzimática, uma vez que alterações no tempo de análise implica em uma variação na intensidade de fotoluminescência. De modo a evitar esses erros, garantir a reprodutibilidade e normalizar o tempo de análise, avaliou-se a eficiência de inibição de diferentes inibidores após 40 min de reação nas condições otimizadas (Fig. 34B-E). Os inibidores utilizados foram a ovoalbumina (OVO) (CUCCIOLONI et al, 2014), a benzamidina (BEM), o *N*-etilmaleimida (NEM), inibidor Kunitz (SBTI) e inibidor Bowman-Birk (BBI). A Tabela 11 abaixo sumariza os resultados obtidos.

Tabela 11. Principais parâmetros dos inibidores utilizados.

Inibidor	Natureza	IC ₅₀ (μM)	¹ Inibição completa de um 1 mg de TP (μM)
OVO	Competitivo reversível	0,00584	---
BEM	Competitivo reversível	253	500-4000
NEM	Irreversível	102	100-1000
SBTI	Competitivo reversível	0,000500	≤ 0,0498
BBI	Competitivo reversível	0,00563	≤ 0,126

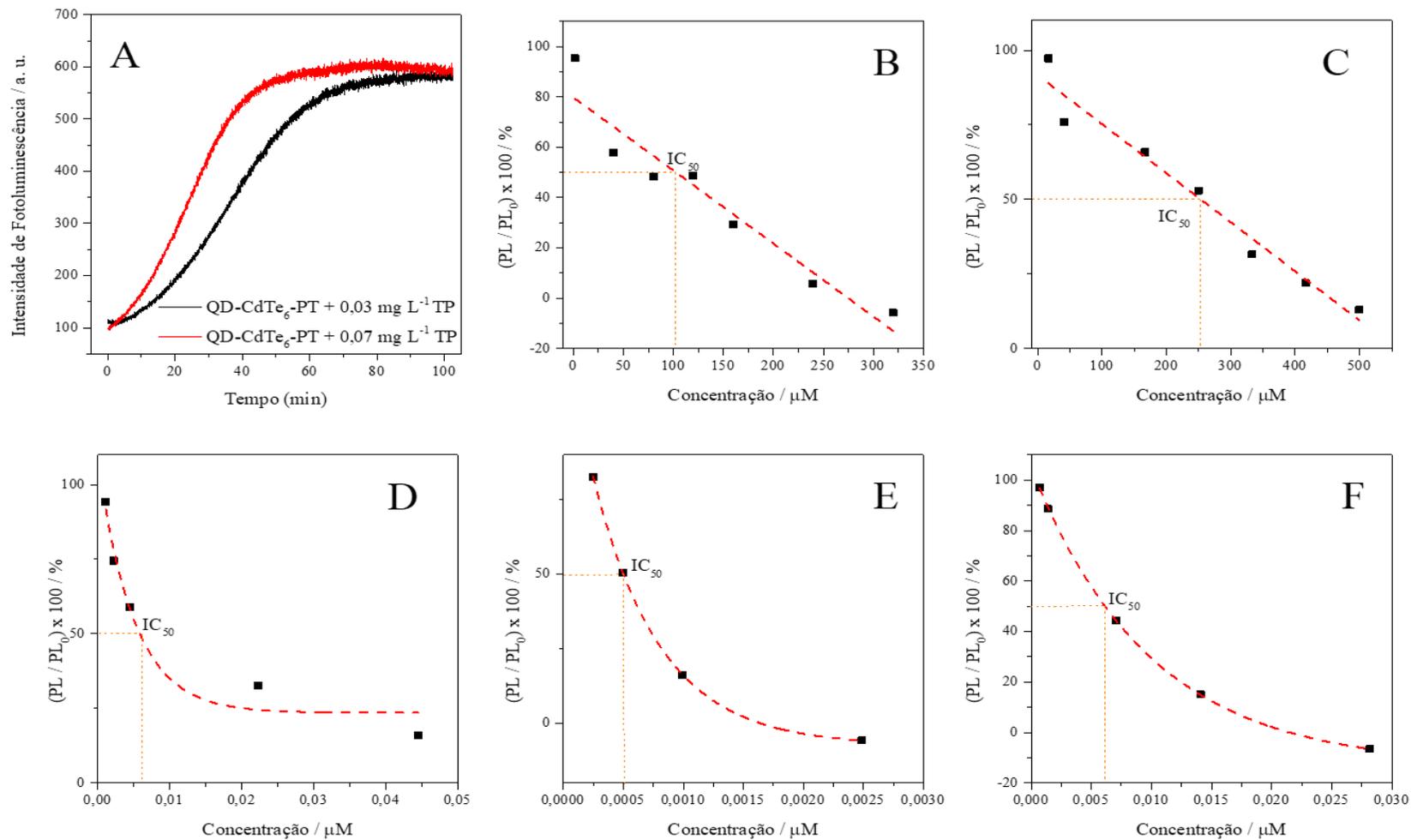
1- Referência: SMITH & GATES, 2009.

Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

Por a ovoalbumina apresentar um IC₅₀ próximo aos principais inibidores da tripsina, por ser de fácil obtenção e mais barato, ele foi selecionado como inibidor. De modo a avaliar qual a concentração necessária para inibir completamente a atividade enzimática, foi fixada a concentração da TP a 0,03 mg L⁻¹ e acrescentado diferentes concentrações da OVO (Fig. 35A).

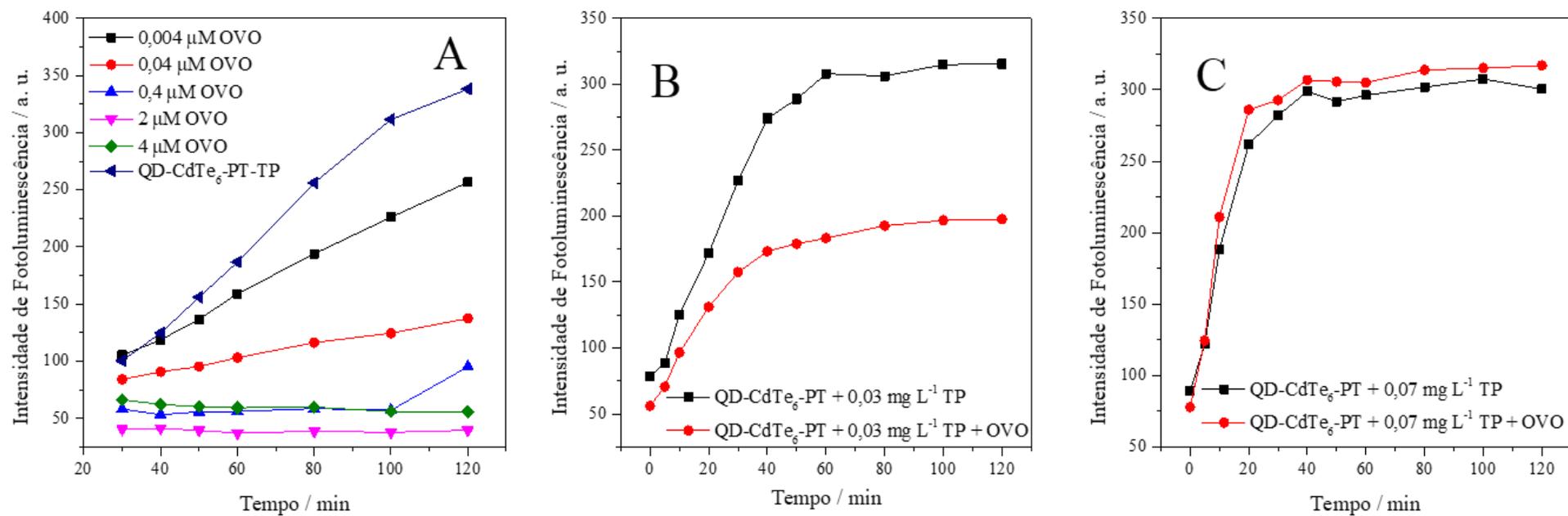
Conforme pode ser observado, a partir 0,4 μM, a ovoalbumina já conseguiu realizar a inibição de maneira eficiente (cerca de 72% de inibição após 2h de análise). De modo a garantir a inibição por um maior período de tempo, foi optado por usar OVA a 2 μM. De modo a verificar se a concentração escolhida para o inibidor foi apropriada, realizou-se outro ensaio com uma menor e uma maior concentração da tripsina no meio (Fig. 35B-C). Nele, observa-se uma diminuição significativa da atividade enzimática e uma constância na magnitude do sinal após a adição do inibidor (eficiência de inibição em torno de 86%), logo, a utilização do inibidor garante uma análise com boa reprodutibilidade e baixos erros experimentais mesmo passado um longo período do preparo da amostra.

Figura 34. Perfil espectral do sistema QD-CdTe₆-PT com a adição de tripsina ao longo do tempo (A) sem inibidor, (B) com a adição de NEM, (C) com a adição de BEM, (D) com a adição de OVO, (E) com a adição de SBTI e (F) com a adição de BBI.



Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

Figura 35. Perfil espectral do sistema QD-CdTe₆-PT após (A) a adição de 0,03 mg L⁻¹ TP e diferentes concentrações de OVO, (B) com a adição de 0,03 mg L⁻¹ TP e 2×10⁻⁶ mol L⁻¹ OVO e (C) com a adição de 0,07 mg L⁻¹ de TP e 2×10⁻⁶ mol L⁻¹ de OVO.

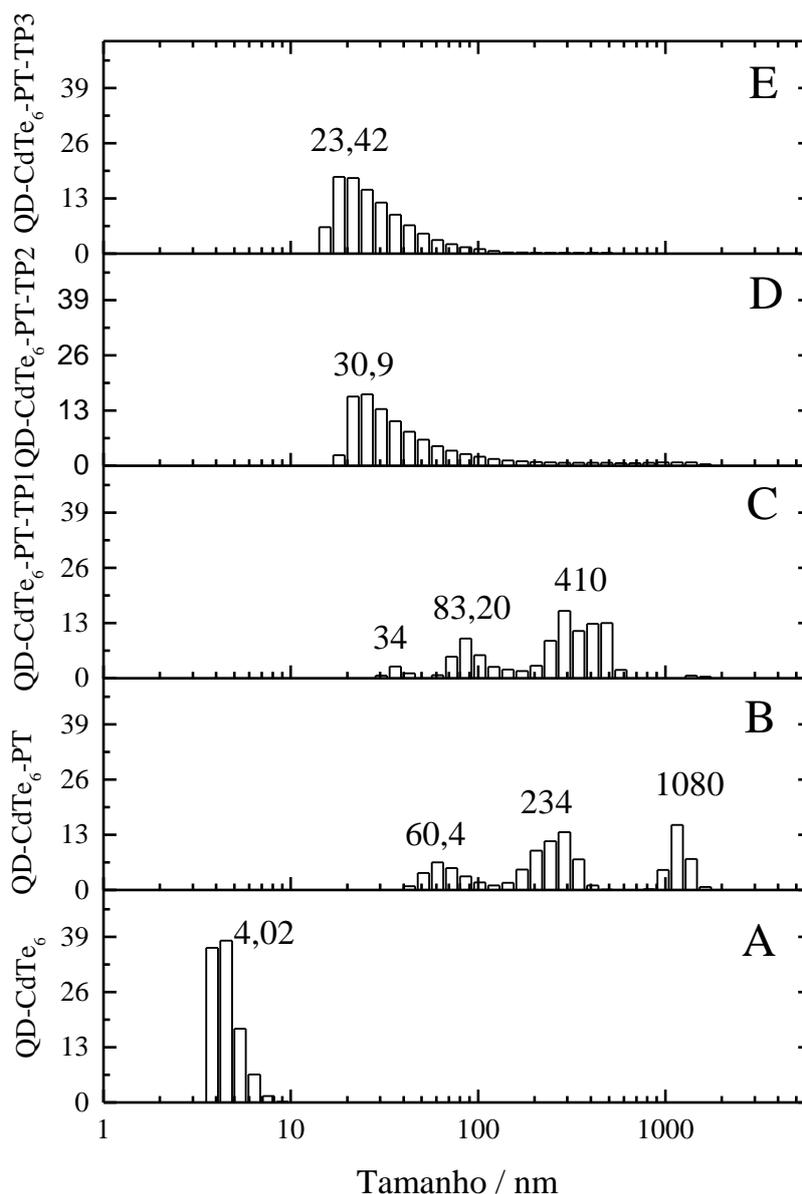


Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

7.2.3.7 Mecanismo de formação do QD-CdTe₆-PT-TP

De forma a verificar se o mecanismo de interação do QD-CdTe₆-PT é o mesmo que o anteriormente citado, sua agregação e “liberação” do QD-CdTe₆ após adição de TP foi avaliada por meio do DLS (Fig. 36).

Figura 36. Perfil do espalhamento dinâmico de luz (DLS) do (A) QD-CdTe₆, (B) QD-CdTe₆-PT, (C) QD-CdTe₆-PT com a adição de 0,015 mg L⁻¹ de TP, (D) QD-CdTe₆-PT com a adição de 0,03 mg L⁻¹ de TP, e (E) QD-CdTe₆-PT com a adição de 0,05 mg L⁻¹ de TP. Condições: tampão amônio (75 mM, pH 8,55) e QD-CdTe₆ a 100 nM e PT a 2 mg L⁻¹.



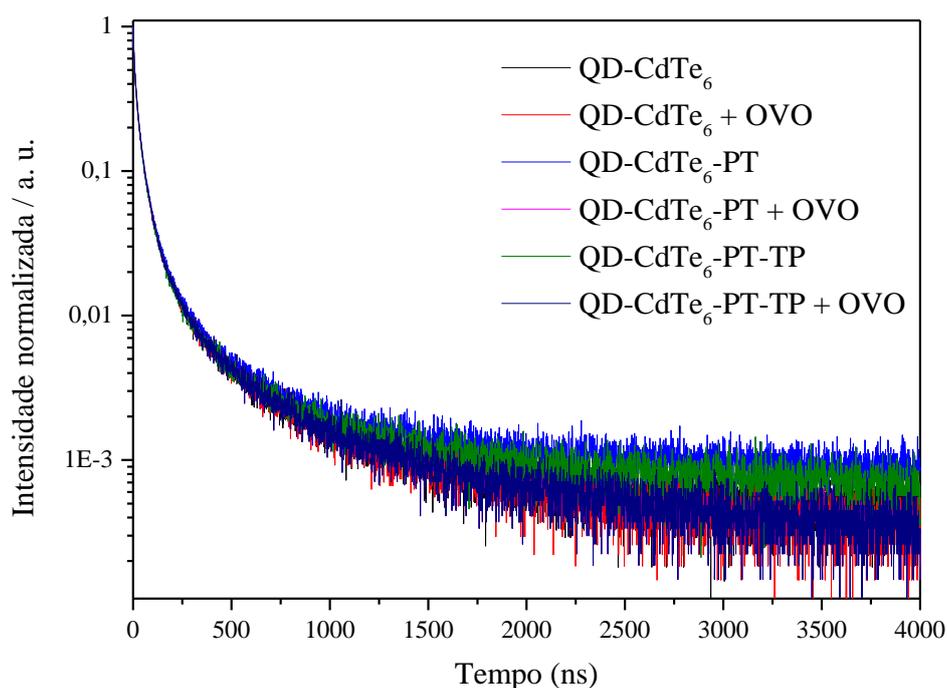
Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

Por DLS, o sistema QD-CdTe₆ apresentou raio hidrodinâmico de $4,02 \pm 0,70$ nm (diferindo do tamanho calculado empiricamente - Tabela 10), seguido do aumento do seu raio

para cerca de $234 \pm 37,13$ nm após acréscimo de PT, o que indica a agregação da nanopartícula. Após a adição de TP, há uma diminuição gradativa do raio hidrodinâmico do QD-CdTe₆ para $83,20 \pm 40,00$, $30,90 \pm 21,10$ e $23,42 \pm 12,43$ nm (TP a 0,015, 0,03 e 0,05 mg L⁻¹, respectivamente), corroborando com os resultados obtidos e com o mecanismo inicialmente proposto de “liberação” dessa nanopartícula.

Também foram realizados estudos avaliando o tempo de meia vida dos sistemas envolvidos (Fig. 37). Neste ensaio, foi observado que o tempo de meio vida para os sistemas QD-CdTe₆, QD-CdTe₆ + OVO, QD-CdTe₆-PT, QD-CdTe₆-PT + OVO, QD-CdTe₆-PT-TP e QD-CdTe₆-PT-TP + OVO foi, respectivamente, $33,66 \pm 0,25$, $34,28 \pm 0,12$, $35,20 \pm 0,18$, $33,97 \pm 0,23$, $34,24 \pm 0,33$ e $32,12 \pm 0,15$ ns, indicando que todos os sistemas possuem um tempo de vida útil semelhante (variação de 9%) e que as características do QD-CdTe₆ foram preservadas.

Figura 37. Espectros de PL resolvidos no tempo do QD-CdTe₆ (100 nM), QD-CdTe₆-PT (PT 2 mg L⁻¹) e QD-CdTe₆-PT com TP a 0,07 mg L⁻¹, respectivamente.

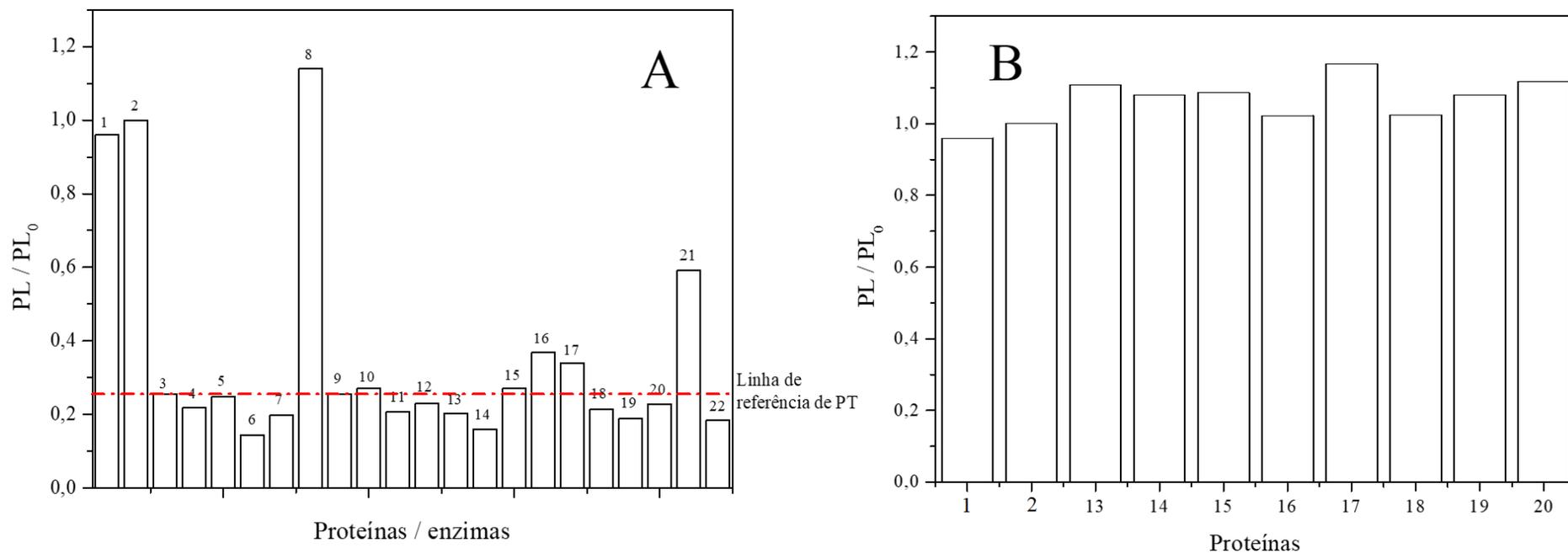


Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

7.2.3.8 Avaliação da seletividade do método

De modo a verificar se a presença de outras proteínas interfere no processo de quantificação da tripsina e se outras enzimas proteases aumentam a intensidade de fotoluminescência do sistema, foi avaliada a atividade enzimática da TP na presença de outras proteínas (Fig. 38A) e adicionado outras proteases ao sistema (Fig. 38B).

Figura 38. Fotoluminescência normalizada do QD-CdTe₆-PT após (A) a adição de diferentes enzimas proteases e proteínas e (B) a adição TP na presença de outras proteínas.



Legendas: 1- QD-CdTe₆; 2- Tripsina; 3- Protamina; 4- Fosfatase alcalina; 5- Galactosidase; 6- Glucose oxidase; 7- Lisozima; 8- Pancreatina; 9- Prolina; 10- Tirosinase; 11- Urease; 12- Catalase; 13- BSA; 14- Caseína; 15- Gamaglobulina; 16- Hemoglobina; 17- HSA; 18- Heparina 1; 19- Heparina 2; 20- Insulina; 21- Alfa-quimotripsina; 22- Trombina.

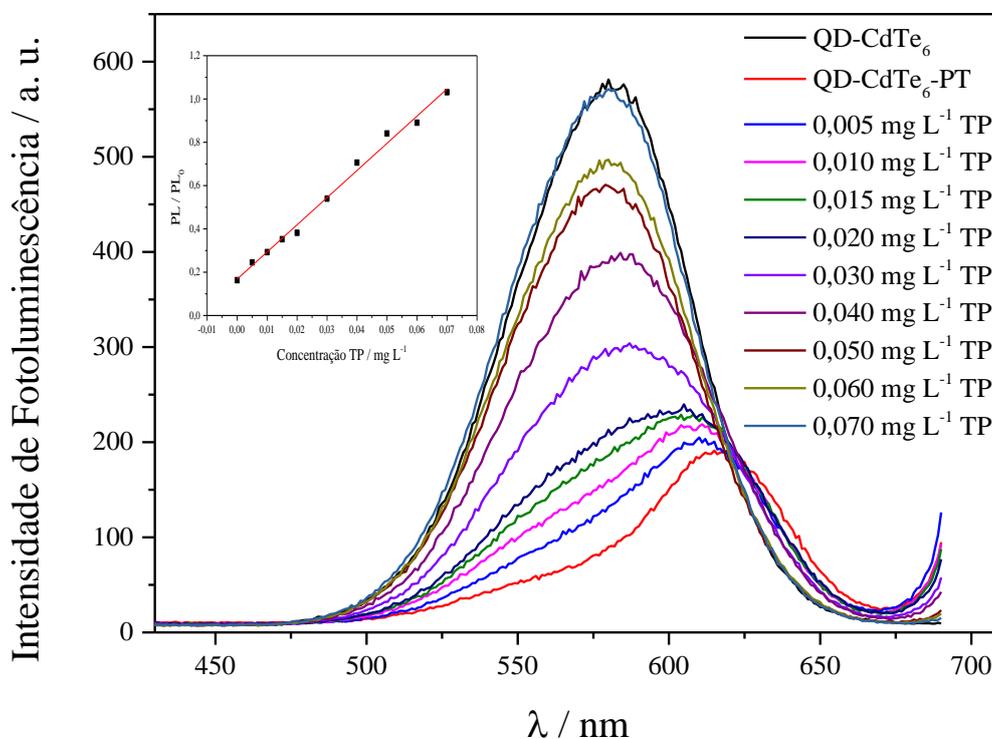
Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

Conforme pode ser observado (Fig. 38A), o sinal analítico para a TP não sofreu alterações significativas na presença de outras proteínas, o que indica que elas não interferem na atividade enzimática da TP e não atuam como interferentes. Com relação as outras enzimas proteases, estas não provocaram um aumento significativo na intensidade de fotoluminescência do sistema (Fig. 38B). Comparando ao aumento provocado pela adição de TP ao sistema ($\Delta F_N = 0,74$), a presença dessas enzimas proteases e de outras proteínas na ausência de TP obteve uma variação máxima de 0,11 (aumento de apenas 15% na intensidade de fotoluminescência). Apenas as enzimas proteases que alteraram significativamente a intensidade de fotoluminescência foram a pancreatina ($\Delta F_N = 0,89$), o que pode ser explicado devido a esta ser um mistura de amilase, lipase e tripsina, e a alfa-quimotripsina ($\Delta F_N = 0,34$).

7.2.4 Figuras de mérito do método proposto

A partir dos parâmetros otimizados, foi estabelecida uma curva analítica para quantificação de TP (Fig. 39).

Figura 39. Curva analítica para quantificação de TP empregando QD-CdTe₆-PT. Condições experimentais: QD-CdTe₆ a 100 nM, PT a 2 mg L⁻¹, tampão amônia/amônio 75 mM, *slit* $\lambda_{ex} / \lambda_{em}$ 5/3 nm.



Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

As principais figuras de mérito foram estabelecidas para o método proposto, o qual apresentou curva analítica $PL/PL_0 = 12,54 (\pm 0,38C_{TP} + 0,17 (\pm 0,01))$ ($r = 0,988$, $n = 9$). Foi

utilizado o sistema PL/PL₀ apenas para obter um sistema linear crescente, o qual é o padrão utilizado, onde PL é o sinal com diferentes concentrações de TP e PL₀ o sinal do sistema QD-CdTe₆. A faixa linear do método corresponde as concentrações da enzima de 0,005 a 0,07 mg L⁻¹ (0,22 - 3,08 nM), limite de detecção (LOD) equivalente a 0,0014 mg L⁻¹ (0,06 nM) e desvio padrão relativo menor que 1,81 e 0,65% (correspondente a 0,03 e 0,06 mg L⁻¹, respectivamente).

Adicionalmente, pode-se observar na Tabela 12 alguns sistemas de quantificação da tripsina e as respectivas propriedades analíticas. Com base nos resultados, o método proposto possui uma boa sensibilidade que os demais encontrados na literatura, inclusive melhor com os que utilizam o mesmo tipo de nanopartícula ou proteína e mais sensível que a maioria dos sistema duplo de análise. Comparando-se com os métodos que utilizam o *quantum dot* de CdTe, a maior sensibilidade apresentada pode estar relacionada a preferência da tripsina pela protamina se comparada as outras proteínas utilizadas devido a sua composição rica em arginina. Relacionando agora os métodos que utilizam a protamina como substrato, sua menor sensibilidade pode ser decorrente do pH utilizado ser abaixo da faixa de pH ótimo para se trabalhar da enzima e/ou da menor interação entre o nanosensor e a protamina, o que torna necessário uma maior quantidade desta no meio para uma supressão significativa da fluorescência e gera uma menor sensibilidade. Com relação ao ensaio de recuperação, os métodos se mostraram viáveis e precisos dentro do modelo proposto e em diferentes amostras.

Tabela 12. Comparação de algumas estratégias analíticas para determinar TP e o método proposto com base no QD-CdTe₆-PT.

¹ Sistema	² Deteção	pH	Faixa Linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	³ RSD (%)	Amostra	Comentários	Ref.
BSA-AuNC@CNQDs	PL	8	0,0 - 30,0	0,0015	≤ 5.4	Farinha de soja	São necessárias duas sondas fluorescentes, complexidade na síntese, longo tempo de incubação para análise (2 h)	HU et al. (2019)
QD CdTe e BSA-RITC	PL	8	0,007 - 0,11	0,00002	N. I.	Urina	São necessárias duas sondas fluorescentes, longo tempo de incubação para análise (3 h).	LIU et al. (2007)
Grafeno-CMR-BSA	PL	8	0 - 6	0,7	≤ 1.2	Urina	São necessárias duas sondas fluorescentes, complexidade na síntese.	POON et al. (2016)
QD Mn:ZnSe - Arg 6	PL	8,5	0,1 - 12,0	0,04	≤ 1.4	Soro e urina	Complexidade na síntese (borbulhamento e fluxo de N ₂)	GAO et al. (2012)
QD AgInZnS-MPA e PT	PL	8,5	0,1 - 4,0	0,04	≤ 2.0	Soro	Complexidade do método de deteção de TP (incubação a 37°C por 1h seguido de agitação constante por 200s).	LIU et al. (2019)
QD CdTe-N-acetil-cisteína-hemoglobina	PL	7,8	2,17 - 434,8	1,56	≤ 3.3	Soro	Complexidade na síntese (borbulhamento de N ₂)	SHI et al. (2018)
SiNPs@GLU-AuNCs e PT	PL	6,8	0,01 - 0,1	0,0045	≤ 2.4	Soro	São necessárias duas sondas fluorescentes, longo tempo de síntese (24h).	XUE et al. (2018)
AgSNPs-UCNPs e PT	PL	8,0	0,005 - 0,080	0,0018	≤ 2.5	Soro	São necessárias duas sondas fluorescentes, complexidade na síntese, .	CHEN et al. (2017)
QD CdTe-Glutationa e Citocromo C	PL	8,5	0,03 - 8,62	0,005	≤ 4.1	Soro	Complexidade na síntese (borbulhamento de N ₂ e seco a vácuo a 40°C).	ZHANG et al. (2014)
NCs BSA-Au	CL	8,0	0,9 - 1000	0,6	N.I.	Urina	Longo tempo de síntese (72h);	WANG et al. (2015)
NAA-urease-FLITC	IRS	6,4	0,25 - 20	0,06	$\leq 6,9$	Urina	Complexidade no preparo da amostra e na obtenção do material poroso.	MARSHAL et al. (2020)
QD-CdTe ₆ -PT	PL	8,5	0,005-0,070	0,0014	≤ 1.8	Plasma	Síntese simples, análise rápida e fácil da amostra, alta sensibilidade, não requer reações adicionais ou um longo tempo de incubação para análise.	Este trabalho

¹Sistema: BSA-AuNC@CNQDs- Nanocluster de ouro funcionalizado com albumina sérica bovina e dopado com quantum dots de nitreto de carbono; BSA-RITC-isothiocianato de rodamina conjugado à albumina de soro bovino; CMR- derivado cumarínico bem projetado; Arg 6- seis resíduos de arginine; SiNPs@GLU-AuNCs- nanoclusters de ouro funcionalizados com glutatona acionados por nanopartícula de silício; AgSNPs-UCNPs- Nanoplasmas triangulares de prata acionados com nanopartículas de conversão ascendente dopadas com lantanídeo.; NCs BSA-Au -nanocluster de ouro conjugado com albumina sérica bovina; NAA-FLICT- alumina anódica nanoporosa e fluoresceína 5(6)-isotiocianato.

²Deteção: PL= fotoluminescência; CL=colorimétrico; IRS - espectroscopia de reflectância interferométrica.

³RSD (desvio padrão relativo): NI = não informado.

7.2.5 Aplicações da nanosondas em amostras

A aplicabilidade do bioconjugado QD-CdTe₆-PT foi estudada nas condições otimizadas para a quantificação de TP em amostras de plasma humano (Tabela 13).

Tabela 13. Ensaios de recuperação e determinação de TP em amostra de plasma (P1).

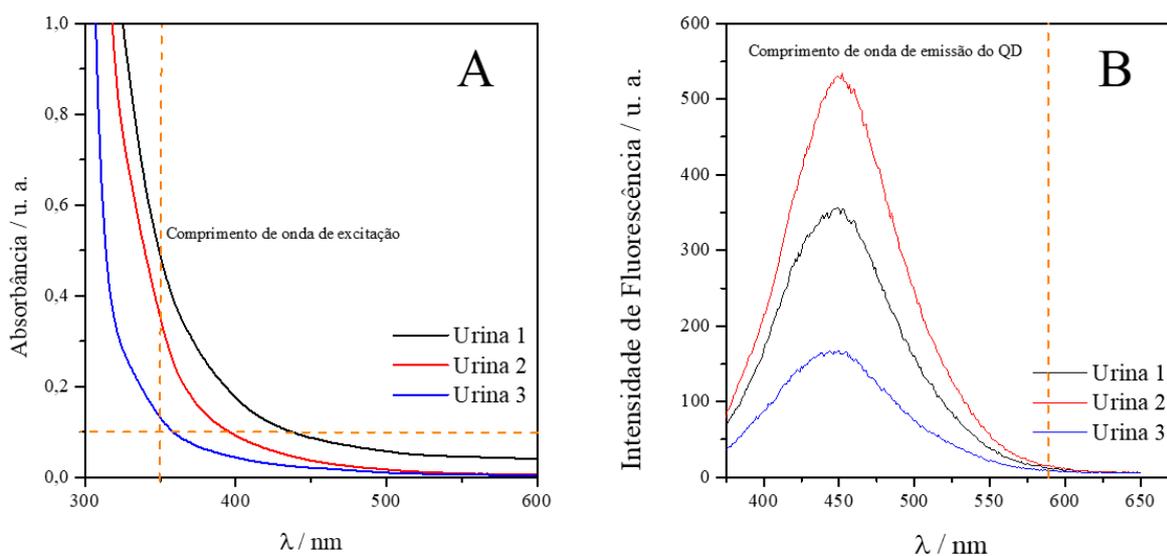
Amostra	TP adicionada (mg L ⁻¹)	TP encontrada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
P1	0,0000	<LOQ	-
	0,0150	0,0137 ± 0,0007	91
	0,0300	0,0274 ± 0,0007	91
	0,0600	0,0572 ± 0,0002	95

Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

Para essa análise, foram obtidas recuperações de 91 a 95% e não houve detecção de TP na amostra. Para realizar essa quantificação, novos parâmetros devem ser otimizados, como diminuição do fator de diluição, a incubação da amostra a 37°C (temperatura ideal para a atividade enzimática da TP) e o preparo da amostra para eliminar possíveis interferentes.

Também foi avaliado a possibilidade de aplicação do bioconjugado para detecção de TP em amostras de urina, entretanto, em análises preliminares, foi observado que as amostras absorvem no comprimento de onda de excitação do QD-CdTe₆ (Fig. 40A) e que também emitem na região de sua emissão (Fig. 40B), gerando assim um duplo efeito de filtro.

Figura 40. Espectro de (A) absorção e (B) fluorescência para amostras de urina. Condições: $\lambda_{ex} = 350$ nm, slit de $\lambda_{ex} / \lambda_{em}$ igual a 5 / 3 nm, tampão amônia/amônio 75 mM pH 8,5



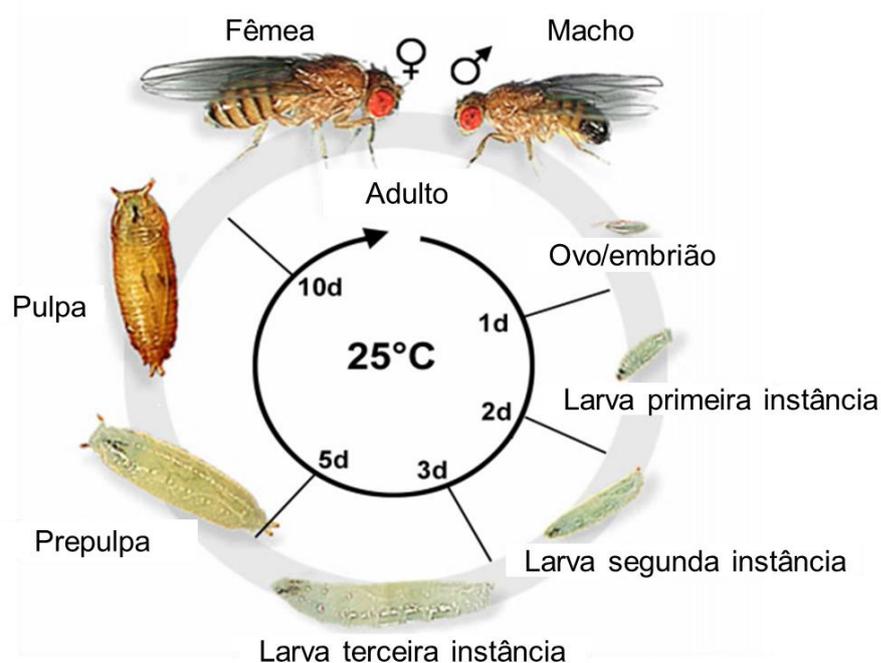
Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

Para realizar a quantificação da TP nas amostras de urina, será necessário aumentar o comprimento de onda de excitação, de modo a diminuir o efeito da absorção da urina, realizar um preparo da amostra para retirada de possíveis interferentes e realizar a incubação a 37°C.

7.2.6 Ensaio de biotoxicidade das nanosondas

A *Drosophila melanogaster* (Fig. 41), por possuir uma vida curta, ser bem caracterizada e ter uma alta homologia com DNA humano, pode ser considerada um poderoso meio para estudos de mutagênese e de nanotoxicidade, especialmente em exposição de longo prazo (RUBIN et al, 2000; JENNINGS, 2011; ADAMS & SEKELSKY, 2002).

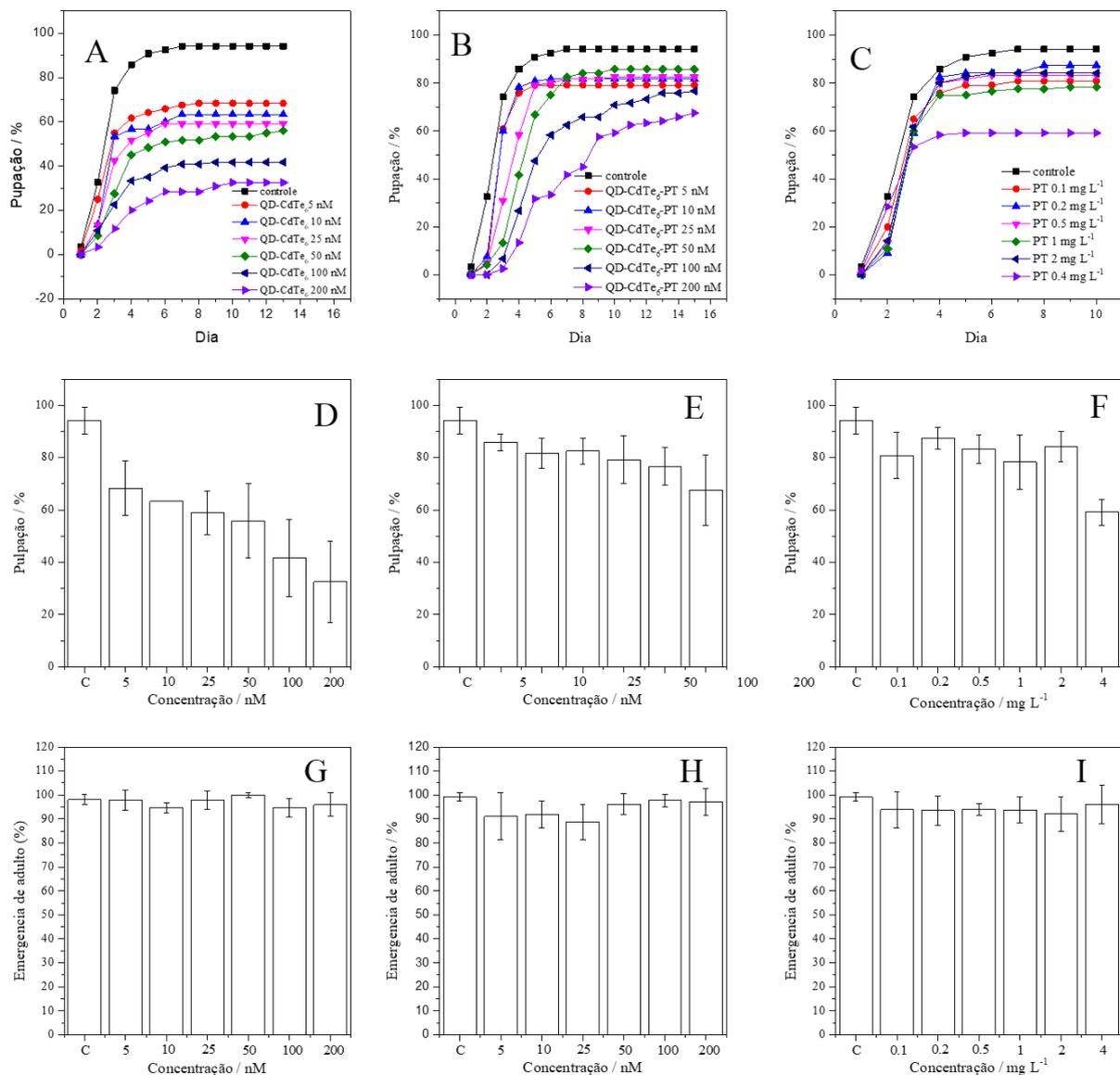
Figura 41. Representação gráfica do desenvolvimento das mosas do tipo *Drosophila melanogaster* da fase embrionária até a adulta.



Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

Assim, a biocompatibilidade do QD-CdTe₆, da própria PT e do bioconjugado QD-CdTe₆-PT foi avaliado através de estudos da mosca do tipo *Drosophila melanogaster* de sua pulpação até seu desenvolvimento a fase adulta. Conforme pode ser observado na Fig. 42A-F, quanto maior for a concentração da nanopartícula ou da proteína no meio, maior é o tempo necessário para a pulpação das larvas e também menor a porcentagem total de pulpação, o que indica uma maior toxicidade sobre esses organismos.

Figura 42. Representação gráfica das larvas na (A) pupação do QD-CdTe₆ ao longo dos dias, (B) pupação do QD-CdTe₆-PT ao longo dos dias, (C) pupação do PT ao longo dos dias, (D) pupação do QD-CdTe₆ total, (E) pupação do QD-CdTe₆-PT total, (F) pupação do PT total, (G) emergência de adultos do QD-CdTe₆, (H) emergência de adultos do QD-CdTe₆-PT e (I) emergência de adultos do PT.



Fonte: Autora deste trabalho, 2020.

Além disso, observa-se que a pupação para a nanopartícula QD-CdTe₆ foi inferior ao do bioconjugado QD-CdTe₆-PT e a PT, chegando a ter somente 30% em maiores concentrações (70% de mortalidade). Isso pode indicar que a toxicidade desse nanomaterial está associado à sua funcionalização e se está na forma de um bioconjugado ou não. Tal possibilidade foi estudado por Galeone et al. (2012), que demonstraram que a toxicidade dos QDs de CdSe-ZnS variava de acordo com o agente funcionalizante utilizado. Com relação a mortalidade pós pupação (Fig. 41G-I), foi observado que não houve atraso ou problemas no desenvolvimento das *drosophilas* independente da concentração e do sistema utilizado, o que implica que os

sistemas afetam apenas a fase larval desses invertebrados, logo, o bioconjugado QD-CdTe₆-PT pode ser utilizado para realizar o monitoramento *in vivo* da tripsina.

Aplicando o teste de ANOVA One Way e de Tukey ($F_{\text{tab}}=3,95$), foi observado que, para a pulpação a um nível de 95% de confiança, há diferença significativa com relação ao controle para o sistema QD-CdTe₆ nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 nM ($F=9,65$), para o bioconjugado QD-CdTe₆-PT na concentração de 200 nM ($F=4,59$) e para a PT nas concentrações de 2 e 4 mg L⁻¹ ($F=10,63$). Já para a mortalidade pós pulpação, não foi observada diferença significativa em nenhum dos sistemas ($F=1,02$, 1,80 e 0,65 para o QD-CdTe₆, QD-CdTe₆-PT e PT, respectivamente).

7.3 Conclusão

Neste trabalho foi desenvolvido um método para determinação espectrofluorimétrica da enzima protease tripsina baseado no sistema *on-off-on* utilizando o bioconjugado QD-CdTe₆-PT. Nas condições otimizadas, o método mostrou-se rápido, simples, seletivo e com alta sensibilidade a esta enzima. Quando aplicado em amostra de plasma, apresentou precisão e exatidão na determinação de TP com boas recuperações, podendo ser utilizado para a detecção de doenças oriundas de uma alta concentração dessa enzima no organismo.

7.4 Perspectivas do trabalho

Como as principais perspectivas deste trabalho, têm-se:

- (i) Avaliar a viabilidade de utilizar outras proteínas no método proposto em substituição ao sistema QD-CdTe₆-PT;
- (ii) Realizar estudos termodinâmicos, IR, TEM e de rendimento quântico;
- (iii) Otimização e aprimoramento de alguns parâmetro para aplicação em amostras de plasma e de urina.
- (iv) Analisar a possibilidade da utilização do sistema proposto em análises de imageamento de sistemas celulares;

8. REFERÊNCIAS

- ABOUELHAMD, Amira R.; AL-SALLAL, Khaled A.; HASSAN, Ahmed. Review of Core/Shell Quantum Dots Technology Integrated into Building's Glazing. **Energies**, vol. 12, 2019.
- ADAMS, M. D. & SEKELSKY, J. J. From sequence to phenotype: reverse genetics in *Drosophila melanogaster*. **Nat Rev Genet.**,3(3):189-98, 2002.
- AG, D., et al. Biofunctional quantum dots as fluorescence probe for cell-specific targeting. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, vol. 114, pag. 96–103, 2014.
- AGRAWAL, H., et al. **Parenteral Delivery of Peptides and Proteins**. Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics, 531–622, 2011. doi:10.1016/b978-0-12-384964-
- AKBARI, M., et al. CdTe quantum dots prepared using herbal species and microorganisms and their anti-cancer, drug delivery and antibacterial applications; a review. **Ceramics International**,vol. 46,pag.9979-9989,2020. doi:10.1016/j.ceramint.2020.01.051
- AKMAL, M., et al. The important role of protamine in spermatogenesis and quality of sperm: A mini review. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, vol. 5, nº 5, pag. 357–360, 2016.
- ALGAR, W. R., & KRULL, U. J.Luminescence and Stability of Aqueous Thioalkyl Acid Capped CdSe/ZnS Quantum Dots Correlated to Ligand Ionization. **ChemPhysChem**, vol 8, nº 4, pag. 561–568, 2007.
- ALMEIDA, Diogo B. **Produção e Funcionalização de Quantum Dots para uso em Microscopia de Fluorescência**. Projeto de Iniciação Científica-Instituto de Física Gleb Wataghin – Unicamp, 2005.
- ALVEZ, Oswaldo L; et al. Modernas Aplicações de Vidros. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola- Química de novos Materiais**, Unicamp, vol. 3, Campinas-SP, 2001.
- APPLEFIELD, Daniel & KRISHNAN, Sandeep. Protamine. StatPearls Publishing; 2019.
- ARAI, T.; FIJURMIRA, H.; UMEZU, I.; OGAWA, T.; Fuji, A.; **J. Appl. Phys.** 1989, 28, 484.
- ARNAUD, Thatiana M. S. **Preparação, caracterização e aplicação de nanocompósitos de quitosana/quantum dots fluorescentes**. Dissertação (Doutorado em Ciência de Materiais)-UFPE, 2012.
- ARROWSMITH, C.H., et al. "The promise and peril of chemical probes". **Nature Chemical Biology**,.vol. 11, nº 8, pag. 536–41, 2015.
- BAGHER, Askari M. Quantum Dots Applications. **Sensors & Transducers**, Vol. 198, Issue 3, March 2016, pag. 37-43.

BAGGA, A., CHATTOPADHYAY, P. K., & GHOSH, S. Stokes shift in quantum dots: Origin of dark exciton. **International Workshop on Physics of Semiconductor Devices**, 2007. doi:10.1109/iwpsd.2007.4472661

BAIRD, Jr., T. T. & CRAIK, C. S.. **Trypsin. Handbook of Proteolytic Enzymes**, pag. 2594–2600, 2013. doi:10.1016/b978-0-12-382219-2.00575-5

BAIRD, T. et al.. Generation of active trypsin by chemical cleavage. **Tetrahedron** 56, pag. 9477-9485, 2000.

BAIRD, T. T. Trypsin. **Reference Module in Life Sciences**, 2017. doi:10.1016/b978-0-12-809633-8.07310-6

BAKAR, N. A, et al. Fluorescence Gas Sensor Using CdTe Quantum Dots Film to Detect Volatile Organic Compounds. **Materials Science Forum**, vol. 663-665, pag. 276–279, 2010. doi:10.4028/www.scientific.net/msf.663-665.276

BAKER, S. N.; BAKER, G. A. Luminescent carbon nanodots: emergent nanolights. *Angewandte Chemie International Edition* 2010, 49, 6726.

BARATTINI, Valeria & HUMPHRYES, Phillip. Selecting Buffers to Remove Uncertainty in Tryptic Digestion. **Thermo Fisher Scientific**, Runcorn, UK, 2015.

BARROSO, Roberto C. Avaliação da protamina na neutralização da heparina após circulação extracorpórea. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, vol.17, no.1, São Paulo, 2002.

BEREZIN, M. Y. & ACHILEFU, S. Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging. **Chemical Reviews**, vol. 110, nº 5, pag. 2641–2684, 2010. doi:10.1021/cr900343z

BERNADES, Letício M. C. **Células Solares Sensibilizadas por Pontos Quânticos**. Dissertação (Graduação em Química Bacharelado)- Universidade Federal de São João del-Rei, 2015.

BERNSTEIN, Larry H. Quantum dots. **Medicine and Life Sciences Scientific Journal**, 2015.

BHAGIRATH, Vinai C.; O'MALLEY, Lauren; CROWTHER, Mark A. Management of Bleeding Complications in the Anticoagulated Patient. *Seminars in Hematology*, volume 48, Issue 4, pages 285-294, 2011.

Biological Buffers, AppliChem, 2008. Disponível em: <<https://www.applichem.com/fileadmin/Broschueren/BioBuffer.pdf>>. Acesso em 25/12/19.

BOER C, et al. Anticoagulant and side-effects of protamine in cardiac surgery: a narrative review. **Br J Anaesth**, vol. 120, nº 5, pag. 914-927, 2018.

BRAUN, M.; BURDA, C.; EL-SAYED, M. A. Variation of the Thickness and Number of Wells in the CdS/HgS/CdS Quantum Dot Quantum Well System. **J. Phys. Chem. A**, 2001, 105, 5548.

BROMFIELD, Stephen M.; et al. Nanoscale self-assembled multivalent (SAMul) heparin binders in highly competitive, biologically relevant, aqueous media. **Chemical Science**, 2014.

BURGOT, Jean-Louis. **Ionic Equilibria in Analytical Chemistry**, Edição 1. Springer Science & Business Media, 2012.

BUTTERWORTH, J., et al. Rapid disappearance of protamine in adults undergoing cardiac operation with cardiopulmonary bypass. **The Annals of Thoracic Surgery**, vol. 74, nº 5, pag. 1589–1595, 2002.

CANCINO, Juliana; MARANGONI, Valéria S.; ZUCOLOTTI, Valtencir. Nanotecnologia em medicina: aspectos fundamentais e principais preocupações. **Quim. Nova**, São Carlos-SP, Vol. 37, No. 3, 2014.

CARR J. & SILVERMAN N. The heparin-protamine interaction. A review. **J Cardiovasc Surg (Torino)**, vol. 40, nº 5, pag. 659-66, 1999.

CARVALHO, Melissa S. et al. The role that electrolytes play in the synthesis of water-soluble CdTe quantum dots prepared at ambient temperature. **J. Braz. Chem. Soc. [online]**. 2017, vol.28, n.7, pp.1167-1176. ISSN 0103-5053.

CASTANEDA-AGULLO, M et al. “Effect of ionic strength on the kinetics of trypsin and alpha chymotrypsin.” **The Journal of general physiology**, vol. 44, nº 6, pag. 1103-1120, 1961. doi:10.1085/jgp.44.6.1103

CASTILLO, B., et al. A. Pharmacologic agents in transfusion medicine. **Transfusion Medicine for Pathologists**, pag. 177–193, 2018. doi:10.1016/b978-0-12-814313-1.00011-3

CATANI, R. A; ALCARDE, J. C. O pH de soluções de Ácido Acético, Cítrico, Oxálico e Tartárico. Anais da E.S.A “Luis de Queiroz”, col XXIII, 1966.

CHADWICK, Luke, et al. **The Quest for the Luminescent Photonic Crystal: Formation of Monodisperse Supraparticles from Microfluidics Directed Self-assembly of Quantum Dots**. Research Gate, 2019. 10.13140/RG.2.2.34788.63368.

CHANDAN, H.R.; SCHIFFMAN, J.D. & BALAKRISHNA, R.G. Quantum dots as fluorescent probes: Synthesis, surface chemistry, energy transfer mechanisms, and applications. **Sensors and Actuators B: Chemical**, vol. 258, pag. 1191–1214, 2018. doi:10.1016/j.snb.2017.11.189

CHAVES, Claudilene R. **Síntese e caracterização de nanopartículas de sulfeto de cádmio: aplicações biomédicas**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Materiais)-UFPE, 2006.

CHAVES, Claudilene R. **Síntese, Sinalização e Caracterização de Pontos Quânticos de CdTe/CdS e CdS/Cd(OH)₂ para Aplicações em Sistemas Biológicos**. Dissertação (Doutorado em Ciências de Materiais)-UFPE, 2011

CHENG, C., LI, J., & CHENG, X.. Photoluminescence lifetime and absorption spectrum of PbS nanocrystal quantum dots. **Journal of Luminescence**, vol. 188, pag. 252–257, 2017. doi:10.1016/j.jlumin.2017.04.037

CHEN, Dangui, CHEN, Bing & YAO, Fusheng. Doxorubicin-Loaded PEG-CdTe Quantum Dots as a Smart Drug Delivery System for Extramedullary Multiple Myeloma Treatment. **Nanoscale Research Letters**, vol. 13, n° 1, pag. 373-381, 2018.

Chen, H., Fang, A., Zhang, Y., & Yao, S. Silver triangular nanoplates as an high efficiently FRET donor-acceptor of upconversion nanoparticles for ultrasensitive “Turn on-off” protamine and trypsin sensor. **Talanta**, vol. 174, pag. 148–155, 2017. doi:10.1016/j.talanta.2017.06.006

CHEN, X. B.; LOU, Y. B.; SAMIA, A. C.; BURDA, C. Coherency Strain Effects on the Optical Response of Core/Shell Heteronanostructures. **Nano Lett.** 2003, 3, 799.

CHEN, Y., & ROSENZWEIG, Z. Luminescent CdS Quantum Dots as Selective Ion Probes. **Analytical Chemistry**, vol. 74, n° 19, pag. 5132–5138, 2002.

CHEN, Y., et al. A simple fluorescence assay for trypsin through a protamine-induced carbon quantum dot-quenching aggregation platform. **RSC Advances**, vol. 10, n° 45, pag. 26765–26770, 2020. doi:10.1039/d0ra03970e

CHENG, Fang-Fang; et al. **Quantum Dots for DNA Biosensing**. Springer Science & Business Media, pág. 9-19, 2013. ISBN 978-3-642-44910-9 (e-Book).

CHENG, Zhen; et al. A Novel Clinically Translatable Fluorescent Nanoparticle for Targeted Molecular Imaging of Tumors in Living Subjects. **Nano Letters**, 2012.

CHOUDHARY, Y.S. & NAGESWARAN, G. Branched mercapto acid capped CdTe quantum dots as fluorescence probes for Hg²⁺ detection. **Sens. Bio-Sensing. Res.**, vol. 23, pag. 100278, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2019.100278>.

CLAPP, Aaron R.; MATTOUSSI, Hedi; MEDINTZ, Igor L. Potential clinical applications of quantum dots. **Int. J. Nanomed.**, 2008; 3: 151–167.

COLTER, Iva. **Why Enzymes Are Important in Clinical Diagnosis and Treatment?**. PharmiWeb.com - Global Pharma News & Resources, 2019.

CRAIK, C.S. et al. Redesigning trypsin: alteration of substrate specificity. **Science**, vol 228, pag. 291-297, 1985.

CUCCIOLONI, M., et al. Kinetic and equilibrium characterization of the interaction between bovine trypsin and I-ovalbumin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, 1702(2), 199–207, 2004. doi:10.1016/j.bbapap.2004.08.019

CUI, L., HE, X.-P. & CHEN, G.-R. Recent progress in quantum dot based sensors. **RSC Advances**, vol. 5, n° 34, pag. 26644-26653, 2015.

CUSHING, B. L.; KOLESNICHENKO, V. L.; O'CONNOR, C. J. Recent advances in the liquid-phase syntheses of inorganic nanoparticles. **Chem. Rev.**, 2004,

DAI, Xingliang; et al. Solution-processed, high-performance light-emitting diodes based on quantum dots. **Nature**, volume 515, pages 96–99, 2014.

DAGTEPE, P., et al.. Quantized Growth of CdTe Quantum Dots; Observation of Magic-Sized CdTe Quantum Dots. **The Journal of Physical Chemistry C**, 111(41), 14977–14983. 2007.

DALTON, Frank. Historical Origins of the Rotating Ring-Disk Electrode. *The Electrochemical Society Interface*, 2016. Download feito em 13/05/2018 com o IP 177.177.222.223.

DAUDIN, B.; WIDMANN, F.; FENILLET, G.; SANSON, Y.; PELEKANOS, N. Self organization of nitride quantum dots by molecular beam epitaxy. *Mater. Sci. Eng., B* 1999, 59, 330.

DEB, P. K., et al. **Protein/Peptide Drug Delivery Systems**. Basic Fundamentals of Drug Delivery, 651–684. 2019.

DONEGÁ, M. C.; LILJEROTH, P.; VANMAEKELBERGH, D. Physicochemical evaluation of the hot-injection method, a synthesis route for monodisperse nanocrystals. *Small*, 2005, 1, 1152.

DRAKE, C. R., MILLER, D. C. & JONES, E. F. Activatable Optical Probes for the Detection of Enzymes. *Current Organic Synthesis*, 8(4), 498–520, 2011.

DU, Y., et al. The effect of PEG functionalization on the in vivo behavior and toxicity of CdTe quantum dots. *RSC Advances*, vol. 9, nº 22, pag. 12218–12225, 2019. doi:10.1039/c9ra00022d

EDVINSSON, Tomas. Confinamento quântico óptico e propriedades fotocatalíticas em nanoestruturas de duas, uma e zero dimensões. *Royal Society open Science*, 2018.

ENSAFI, Ali A.; et al. A simple and rapid label-free fluorimetric biosensor for protamine detection based on glutathione-capped CdTe quantum dots aggregation. *Biosensors and Bioelectronics*, volume 71, pages 243-248, 2015.

EKIMOV, A. I.; ONUSCHENKO, A. A.; *Sov. Phys. Semicond.* 1982, 16, 1215.

ELMIZADEH, Hamideh., et al.. Ligand-Capped CdTe Quantum Dots as a Fluorescent Nanosensor for Detection of Copper Ions in Environmental Water Sample. *Journal of Fluorescence*, vol. 27, nº 6, pag. 2323–2333, 2017. doi:10.1007/s10895-017-2174-3

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Assessment report for Protamine containing medicinal Products**, Londres, 2012.

EYCHMULLER, A.; MEWS, A.; Weller, H. A quantum dot quantum well: CdS/HgS/CdS. *Chem. Phys. Lett.* 1993, 208, 59.

FERREIRA, Carlos M. H. et al. (Un)suitability of the use of pH buffers in biological, biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions – a review. *RSC Adv.*, vol. 5, 2015.

FILHO, Henrique D. F. Fabricação de nanoestruturas semicondutoras em defeitos produzidos por microscopia de força atômica. Dissertação (Doutorado em Física)-Departamento de Física, PUC, Rio de Janeiro, 2008.

FILHO, Paulo C. S.; SERRA, Osvaldo A. Metodologias de síntese em fase líquida para a obtenção de nanomateriais inorgânicos à base de terras raras. **Quím. Nova**, vol.38, no.5, São Paulo, 2015.

FRICKER, M. D. et al. **Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity - A Practical Guide to Technology for Quantitative Real-Time Analysis**. CHAPTER FORTY-TWO - Fluorescence and Luminescence Techniques to Probe Ion Activities in Living Plant Cells, 2 edição, Biological Techniques Series, pages 569-596, 1999.

GABBE, E. E., et al. Immunoreactive serum trypsin in diseases of the pancreas. **Klinische Wochenschrift**, 57(22), 1237–1238, 1979.

GALEONE, A., et al. In vivo assessment of CdSe–ZnS quantum dots: coating dependent bioaccumulation and genotoxicity. **Nanoscale**, 4(20), 6401, 2012. doi:10.1039/c2nr31826a

GAO, X., et al. A novel optical nanoprobe for trypsin detection and inhibitor screening based on Mn-doped ZnSe quantum dots. **Analytica Chimica Acta**, vol. 743, pag. 131–136, 2012. doi:10.1016/j.aca.2012.07.007

GE, J. P.; CHEN, W.; LIU, L. Formation of disperse nanoparticles at the oil/water interface in normal microemulsions. **Chem. Eur.**, 2006, 12, 6552.

GHADERI, Shirin. **Development of Fluorescent Nanoparticles ‘Quantum Dots’ for Biomedical Application**. Tese de Doutorado, University College London, 2012.

Gonçalves, M. & SAMEIRO, T. Fluorescent Labeling of Biomolecules with Organic Probes. **Chemical Reviews**, 109(1), 190–212, 2009.

GRAVLEE, G: **Cardiopulmonary Bypass**, Principles and Practice, ed 3, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2008.

GRISORIO, R. et al. The dynamic surface chemistry of colloidal metal chalcogenide quantum dots. **Nanoscale Advances**, edição 9, 2019.

Gu, X., et al. A New Fluorescence Turn-on Assay for Trypsin and Inhibitor Screening Based on Graphene Oxide. **ACS Applied Materials & Interfaces**, vol. 3, nº 4, pag. 1175–1179, 2011.

GU, X., et al. Sensing Glucose in Urine and Serum and Hydrogen Peroxide in Living Cells by Use of a Novel Boronate Nanoprobe Based on Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. **Analytical Chemistry**, vol. 88, nº 14, pag. 7191–7197, 2016.

GUCINSKI, A. C., & BOYNE, M. T.. Identification of site-specific heterogeneity in peptide drugs using intact mass spectrometry with electron transfer dissociation. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, vol 28, nº 15, pag. 1757–1763, 2014.

GUO D.; LIU R. Spectroscopic investigation of the effects of aqueous-phase prepared CdTe quantum dots on protein hemoglobin at the molecular level. **PubMed**, 2017.

HARO-GONZÁLEZ, P., et al. High-Sensitivity Fluorescence Lifetime Thermal Sensing Based on CdTe Quantum Dots. **Small**, vol. 8, n° 17, pag. 2652–2658, 2012. doi:10.1002/smll.201102736

HARRIS, J.L. et al. Rapid and general profiling of protease specificity by using combinatorial fluorogenic substrate libraries. **P. Natl. Acad. Sci. USA** 97, pag. 7754-7759, 2000.

HAMAD, M. F. Quantification of histones and protamines mRNA transcripts in sperms of infertile couples and their impact on sperm's quality and chromatin integrity. **Reproductive Biology**, 2019. doi:10.1016/j.repbio.2019.03.001

HETHEY, James, et al. Effects of Tricine, Glycine and Tris Buffers on Alkaline Phosphatase Activity. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology**, vol. 2, pag. 33-38, 2002.

HIGA, Felipe M. Nanotecnologia é avanço revolucionário ignorado por cientistas. **Ciência e Tecnologia**, edição n° 50, USO, 2013.

HINES, M. A.; GUYOT- SIONNEST, P. J. Synthesis and Characterization of Strongly Luminescing ZnS-Capped CdSe Nanocrystals. **Phys. Chem.** 1996, 100, 468.

HINES, M. A.; GUYOT-SIONNEST, P. Bright UV-blue luminescent colloidal ZnSe nanocrystals. **J. Phys. Chem., B** 1998, 102, 3655.

HU, X., et al. A ratiometric fluorescence sensor for ultra-sensitive detection of trypsin inhibitor in soybean flour using gold nanocluster@carbon nitride quantum dots. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, vol., 411, pag. 3341–3351, 2019. doi:10.1007/s00216-019-01806-1

HUAPING, Zhu; et al., “Synthesis and Optical Properties of Thiol Functionalized CdSe/ZnS (Core/Shell) Quantum Dots by Ligand Exchange,” **Journal of Nanomaterials**, vol. 2014, 14 pages, 2014.

HULANICKI, A.; GLAB, S.; INGMAN, F. Chemical sensors: definitions and classification. **Pure and Applied Chemistry**, v. 63, n. 9, p. 1247–1250, 1991.

IMAMURA, R., et al. A Label-Free Fluorescent Array Sensor Utilizing Liposome Encapsulating Calcein for Discriminating Target Proteins by Principal Component Analysis. **Sensors (Basel)**, 15;17(7):1630, 2017.

IPE, B. I et al. Dynamic Light-Scattering Analysis of the Electrostatic Interaction of Hexahistidine-Tagged Cytochrome P450 Enzyme with Semiconductor Quantum Dots. **ChemPhysChem**, vol. 7, n° 5, pag. 1112–1118, 2006.

ITAGAKI, H.. **Experimental Methods in Polymer Scienc - Fluorescence Spectroscopy**. Academic Press pag. 155–260, 2000. doi:10.1016/b978-0-08-050612-8.50009-x

JASIENIAK, J.; BULLEN, C.; EMBDEN, J.; MULVANEY, P. Phosphine-Free Synthesis of CdSe Nanocrystals. **J. Phys. Chem. B** 2005, 109, 20665.

JENNINGS, B. H. Drosophila – a versatile model in biology & medicine. **Materials Today**, 14(5), 190–195, 2011.

JIANG, R., et al.. Fluorescence detection of protamine, heparin and heparinase II based on a novel AIE molecule with four carboxyl. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.11.150

JIAO, Yong, LI, Rongxia & AN Wenting. Fluorescence Quenching Effect of the Interactions between CdTe Quantum Dots and Proteins. **Imaging Science and Photochemistry**, , vol. 32, n° 2, pag. 181-190, 2014.

JOGLEKAR, Shreeram S.; et al. The interactions between CdTe quantum dots and proteins: understanding nano-bio interface. **AIMS Journal**, 2017.

JUNKER, M.; HOBLER, H. & FEDERLIN K. ELISA-Nachweis von Protaminantikörpern [ELISA detection of protamine antibodies]. **Immun Infekt**, vol. 13, n° 2, pag. 80-82, 1985.

KHOSHKAM, M.,et al. Synthesis, characterization and in vivo evaluation of cadmium telluride quantum dots toxicity in mice by toxicometabolomics approach. **Toxicology Mechanisms and Methods**, vol. 28, n° 7, pag. 539–546, 2018.

KIM, Jandi; et al. Highly fluorescent CdTe quantum dots with reduced cytotoxicity-A Robust biomarker. **Sensing and Bio-Sensing Research**, vol 3, pag. 46-52, 2015.

KIM, Gae Baik & KIM, Young-Pil.. Analysis of Protease Activity Using Quantum Dots and Resonance Energy Transfer. **Theranostics**, vol. 2, pag. 127-38, 2012. 10.7150/thno.3476.

KNOBLAUCH, Chris; GRIEP, Mark & FRIEDRICH, Craig. Recent Advances in the Field of Bionanotechnology: An Insight into Optoelectric Bacteriorhodopsin, Quantum Dots, and Noble Metal Nanoclusters. **Sensors (Basel, Switzerland)**, vol. 14, pag. 19731-19766, 2014.

KNOW. J. et al. FeSe quantum dots for in vivo multiphoton biomedical imaging. **Science Advances**, vol. 5, n° 12, 2019.

KOHLI, Rajiv & MITTAL, K.L. **Developments in Surface Contamination and Cleanin-Methods for Assessing Surface Cleanliness**. Elsevier, volume 12, 23–105, 2019. doi:10.1016/b978-0-12-816081-7.00003-6

Kuang, H., et. al. Recent developments in analytical applications of quantum dots. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, vol. 30, n° 10, pag. 1620–1636, 2011.

KULVIETIS, V.; STRECKBYTE, G.; ROTOMSSKIS, R. Spectroscopic investigation of CdTe quantum dot stability in different aqueous media. **Lithuanian Journal of Physics**, vol. 51, No. 2, pp. 163–171, 2011.

LABEB, M., et al. Effect of capping agent on selectivity and sensitivity of CdTe quantum dots optical sensor for detection of mercury ions. **Optical Materials**, vo. 79, pag. 331–335, 2018.

LAKOWICZ, J.R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Fluorescence Sensing. Springer, Boston, MA, 2006.

LAKSHMANA, C., KHANDAGALE, K. & ASWATH, C. **Biosensors for analysis of biomolecules**, 2013.

Lauren Swalec. **Synthesis of CdTe Quantum Dots And Their Use in Environmental Monitoring**. Major (Chemical Engineering Bachelor of Science Degree), Worcester Polytechnic Institute, Worcester, Massachusetts, 2011.

LEE, S., et al.. Application of quality by design elements for the development and optimization of an analytical method for protamine sulfate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol. 62, pag. 61–67, 2012.

LI, Wenyu. Quantum Dots for Biological Imaging. *In* LI. TIAN, J. **Molecular Imaging**. Advanced Topics in Science and Technology in China, pag. 513-523, 2013.

Li, H., et al. Bovine serum albumin-capped CdS quantum dots as an inner-filter effect sensor for rapid detection and quantification of protamine and heparin. **Analytical Methods**, vol. 7, n° 19, pag. 8445–8452, 2015. doi:10.1039/c5ay01817j

LI, Y., et al. In vivo cancer targeting and imaging-guided surgery with near infrared-emitting quantum dot bioconjugates. **Theranostics**, vol. 2, pag. 769-776, 2012.

LIMA, Leonardo M.; ALMEIDA, Paola S. **Filmes de nanopartículas luminescentes em dispositivos microfluídicos visando o desenvolvimento em métodos analíticos para a determinação de substâncias de interesse clínico biológico**. XXIV Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica-PUC, Rio de Janeiro, 2016.

Liu, Chi-Wei & Chang, Huan-Tsung. Protein-Conjugated Quantum Dots for Detecting Trypsin and Trypsin Inhibitor Through Fluorescence Resonance Energy Transfer. **The Open Analytical Chemistry Journal**, 2007. 1. 10.2174/1874065000701010001.

LIU, H.; YE, T.; MAO, C. Fluorescent carbon nanoparticles derived from candle soot. **Angewandte Chemie International Edition**, 2007, 46, 6473.

LIU, Jin-Xia et al.. Aggregation-Induced Emission Enhancement of CdSe QDs by Protamine and its Application to Sensitively and Selectively Detect Heparin. **Current Analytical Chemistry**, vol. 15, pag. 599-604, 2019. 10.2174/1573411014666180330160743.

LIU, Y., et al. A novel and simple fluorescent sensor based on AgInZnS QDs for the detection of protamine and trypsin and imaging of cells. **Sensors and Actuators B: Chemical**, vol. 294, pag. 263–269, 2019. doi:10.1016/j.snb.2019.05.057

LIU, Z., et al. A novel fluorescent nanosensor for detection of heparin and heparinase based on CuInS₂ quantum dots. **Biosensors and Bioelectronics**, 54, 617–622, 2014.

LÓPEZ, C. Estupiñán; et al. **Avaliação da eficiência quântica da fluorescência de quantum dots de CdTe para diagnóstico: um estudo em função do pH usando espectroscopia de**

lente térmica. XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – CBEB, Minas Gerais, 2014.

MA, F., LI, C., & ZHANG, C. Development of quantum dot-based biosensors: principles and applications. **Journal of Materials Chemistry B**, 6, 6173-6190, 2018.

MACHADO, C. E.; et al. Pontos Quânticos de Carbono: Síntese Química, Propriedades e Aplicações. **Rev. Virtual Quim.**, vol 7, nº 4, 2015.

MADELUNG, O.; SCHULZ, M.; WEISS, H.; Landolt-Bornstein: numerical data and functional relationships in science and technology, new series, group III: crystals and solid state physics. **Springer**, 1982, vol. 13, (17b).

MAGALHÃES, Maria J. M.. **Síntese e modificação da superfície de nanocristais semicondutores para aplicação como sondas fluorescentes em meio não-aquoso.** Dissertação (Mestrado em Controle de qualidade)-Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, 2014.

MAITIL, Ankhi & BHATTACHARYYA, Sagarika. Review: Quantum Dots and Application in Medical Science. **International Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, volume 3, nº 2, pag. 37-42, 2013. ISSN 2248-9924

MALÝ, M., KRŮŽEK, T. Determination of Protamine and Insulin Using Short-End Injection Capillary Electrophoresis. *Chromatographia*, vol. 79, pag. 1643–1648, 2016.

MARSAL, L.F, et al.. Remote biosensor for the determination of trypsin by using nanoporous anodic alumina as a three-dimensional nanostructured material. **Sci Rep**, 10, 2356, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59287-7>

MARTÍN-PALMA, Raúl; MANSO-SILVÁN, Miguel; TORRES-COSTA, Vicente. Optical Biosensors Based on Semiconductor Nanostructures. **Sensors** (Basel, Switzerland), vol. 9, pag. 5149-72, 2009. DOI 10.3390/s90705149.

MASHINCHIAN, Omid et al. Impacts of Quantum Dots in Molecular Detection and Bioimaging of Cancer. **BioImpacts : BI.**, vol. 4., pag. 149-66, 2014. 10.15171/bi.2014.008.

MEKONEN, Tirfu zekarias & GOLLAPALLI, nageswara rao. Evaluation of protonation constants of mercaptosuccinic acid in aqueous solutions of propylene glycol and dioxan. **J. Chil. Chem. Soc., Concepción** , v. 57, n. 1, p. 1054-1057, 2012 .

MENDITZ, Igor L.; MATTOUSSI, Hedi; CLAPP, Aaron R. Potential clinical applications of quantum dots. *Int J Nanomedicine*, vol. 3, 2008.

MENDONÇA, Maria C. M. P. **Síntese e caracterização de quantum dots de CdTe.** Dissertação (Mestrado em Química)-Departamento de Química, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2008.

MOREIRA, Vinícius A. **Síntese e caracterização de carbono dots funcionalizados com cuprizona e sua aplicação na dterminação de Cu (II) em águas pela atenuação da**

intensidade fluorescente. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)-Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2017.

MURRAY, C. B.; NORRIS, D. J.; BAWENDI, M. G. Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E= sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, *115*, 8706.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US) COMMITTEE ON CHALLENGES FOR THE CHEMICAL SCIENCES IN THE 21ST CENTURY. **Beyond the Molecular Frontier: Challenges for Chemistry and Chemical Engineering.** Washington (DC): National Academies Press (US), 2003.

NEURATH, H. Willy Kuhne und die Anfänge der Enzymologie. Semper Apertus, **Berlin: Springer-Verlag**, 1986.

NICKSON, Chris. Thromboelastogram (TEG).Life in the Fastlane, 2019. Disponível em:<<https://litfl.com/thromboelastogram-teg/>>.

NOHARA, Evandro L. **Inovação, Tecnologia e Sustentabilidade para o Desenvolvimento:Avanços E Aplicações de Nanotecnologias.** ECO-SP, Universidade de Taubaté, 2012.

NOONE PG, et al. Cystic fibrosis gene mutations and pancreatitis risk: relation to epithelial ion transport and trypsin inhibitor gene mutations. *Gastroenterology*, vol. 121, nº 6, pag. 1310–1329, 2001. doi:10.1053/gast.2001.29673. PMID 11729110

OCAÑA, M.; RODRIGUEZ, C.; SERNA, C. J. Uniform colloidal particles in solution: Formation mechanisms. *Adv. Mater*, 1995

OLIVEIRA, André R. F. **Caracterização Óptica de Pontos Quânticos Semicondutores de CdS em Matrizes Poliméricas.** Dissertação (Graduação em Física de Materiais)-Instituto de Física, Universidade federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

OLSON. J. D. et al. College of American Pathologists Conference XXXI on Laboratory Monitoring of Anticoagulant Therapy. Laboratory monitoring of unfractionated heparin therapy. *Arch Pathol Lab Med*, 122(9):782-98, 1998. PMID: 9740136

OLSSON, Débora C.; et al. Marcadores fluorescentes coloidais: conceitos e aplicações. *Ciência Rural*, vol 41, nº 6, Santa Maria, 2011. ISSN 0103-8478.

ONYIA, A. I; IKERI, H.I.; NWOBODO, A. N. Theoretical study of the quantum confinement Effects on quantum dots using particle in a box model. *Journal of Ovonic Research*, vol. 14, nº. 1, p. 49 – 54, 2018.

PAIM, A. et al. Fluorescence probe for mercury(ii) based on the aqueous synthesis of CdTe quantum dots stabilized with 2-mercaptoethanesulfonate. *New Journal of Chemistry*, vol. 41, nº 9, pag. 3265–3272, 2017.

PAN, D. C.; WANG, Q.; JIANG, S. C.; JI, X. L.; AN, L. J. A novel two-phase thermal approach for synthesizing CdSe/CdS core/shell nanostructure. *Chem. Mater.* 2005, 17, 176.

PARAK, WJ , et al. **Nanopartículas - de Theory to Application** (ed. G. Schmid), 1a edn. Wiley-VCH, Weinheim , cap. 4, 2004 .

PARK, Nae-Man; KIM, Tae-Soo; PARK, Seong-Ju. Band gap engineering of amorphous silicon quantum dots for light-emitting diodes. **Appl. Phys. Lett.**, 78, 2001.

PEREIRA, Goreti et al. (Bio)conjugation Strategies Applied to Fluorescent Semiconductor Quantum Dots. **J. Braz. Chem. Soc.** São Paulo, v. 30, n. 12, p. 2536-2561, dezembro de 2019.

PERFINITY BIOSCIENCES. Trypsin Activity Varies 10x Depending on the Buffer Used. Application Notes, 2014.

PENG, Xiaogang. et al. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe and CdS nanocrystals. **Chemical Materials**, v. 15, p. 2854–2860, 2003.

PENG, X.; LI, J. J.; WANG, Y. A.; GUO, W. Z.; KEAY, J. C.; Mishima, T.D.; Johnson, M. B. Large-scale synthesis of nearly monodisperse CdSe/CdS core/shell nanocrystals using air-stable reagents via successive ion layer adsorption and reaction. **Am. Chem. Soc.** 2003, 125, 12567.

PILENI, M. P. Nanosized particles made in colloidal assemblies. *Langmuir* **1997**, 13, 3266.

POLIFKA, J. E. & HABERMANN, J. Anticoagulants, thrombocyte aggregation inhibitors, fibrinolytics and volume replacement agents. **Drugs During Pregnancy and Lactation**, pag. 225–249, 2015. doi:10.1016/b978-0-12-408078-2.00010-x

POLZONETTI, V. et al. **Modulatory Effect of Oleuropein on Digestive Enzymes. Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention**, pag. 1327–1333,2010. doi:10.1016/b978-0-12-374420-3.00148-0.

POON, C. et al. FRET-based modified graphene quantum dots for direct trypsin quantification in urine. **Analytica Chimica Acta**, vol. 917, pag. 64–70, 2016. doi:10.1016/j.aca.2016.02.032

POTTER, R.; HANSEN, L. T. & GILL, T.A.. Inhibition of foodborne bacteria by native and modified protamine: importance of electrostatic interactions, **Int. J. Food Microbiol**, vol. 103, pag. 23–34, 2005.

PRABAKAR, K., et al. CdSe quantum dots co-sensitized TiO₂ photoelectrodes: particle size dependent properties. **Journal of Physics D: Applied Physics**, vol. 43, nº 1, 2009.

PRADHAN, N.; REIFSNYDER, D.; XIE, R.; ALDANA, J.; PENG, X. Surface Ligand Dynamics in Growth of Nanocrystals. **J. Am. Chem. Soc.**, 2007, 129, 9500.

PRATAP, Abhijeet. Nano tecnologia: aplicações, vantagens e desvantagens. Notesmatic, 2019. Disponível em:< <https://notesmatic.com/2018/07/applications-advantages-and-disadvantages-of-nanotechnology/>>.

Qu, L., & Peng, X.. Control of Photoluminescence Properties of CdSe Nanocrystals in Growth. *Journal of the American Chemical Society*, vol 124, nº 9, pag. 2049–2055, 2002. doi:10.1021/ja017002j

QUINLAN, F. T.; KUTHER, J.; TREMEL, W.; KNOLL, W.; RISBUD, S.; STROEVE, P. Reverse Micelle Synthesis and Characterization of ZnSe Nanoparticles. *Langmuir*, 2000, 16, 4049.

RAKOVICH, Yury, et al.. Size selective photoluminescence excitation spectroscopy in CdTe quantum dots. *Proc SPIE.*, vol. 4876, pag. 432-437, 2003. 10.1117/12.463693.

RAO, H., et al. Colorimetric and fluorometric detection of protamine by using a dual-mode probe consisting of carbon quantum dots and gold nanoparticles. *Microchim Acta*, vol. 184, 3017–3025, 2017.

REISS, P.; CARAYON, S.; BLEUSE, J.; PRON, A. Low polydispersity core/shell nanocrystals of CdSe/ZnSe and CdSe/ZnSe/ZnS type: preparation and optical studies. *Synth. Met.* 2003, 139, 649.

ROBINSON, Peter K. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem*, 59, 1–41, 2015.

ROCHA, Gabriel D. A. **Síntese e caracterização de pontos quânticos coloidais de seleneto de cádmio e sua modificação superficial para aplicações em dispositivos fotovoltaicos.** Dissertação (Graduação em Engenharias de Materiais)- Departamento Acadêmico de Engenharia de Materiais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2017.

RODRIGUES, S. S. M., et al. Application of nanocrystalline CdTe quantum dots in chemical analysis: Implementation of chemo-sensing schemes based on analyte-triggered photoluminescence modulation. *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 330, pag. 127–143, 2017. doi:10.1016/j.ccr.2016.10.001

RODRÍGUEZ, A. G. & BARCELONA, R. R. Human Protamine Genes' Polymorphisms as a Possible Cause Underlying Male Infertility. *Reproductomics*, pag. 91–107, 2018. doi:10.1016/b978-0-12-812571-7.00007-1

ROGACH, A. L.; Semiconductor Nanocrystal Quantum Dots: Synthesis, Assembly, Spectroscopy and Application. **Springer Wien**: New York, 2008, cap. 2.

ROGACH, A. L.; EYCHMULLER, A.; Hickey, S. G.; Kershaw S. V. Infrared-emitting colloidal nanocrystals: synthesis, assembly, spectroscopy, and applications. *Small*, 2007, 3, 536.

ROGACH, A. L.; GAPONIK, N.; TALAPIN, D. V.; WELLER, H. Efficient phase transfer of luminescent thiol-capped nanocrystals: from water to nonpolar organic solvents. *Nano Lett.*, 2002, 2, 803.

ROGACH, A. L.; KATSIKAS, L.; KORNOWSKI, A.; SU, D.; EYCHMULLER, A.; Weller, H.; Ber. Bunsenges. Synthesis and characterization of thiol-stabilized CdTe nanocrystals. *Phys. Chem.*, 1996, 100, 1772.

RONG, G., et al. Recent Developments in Nanosensors for Imaging Applications in Biological Systems. **Annual Review of Analytical Chemistry**, 12(1), 109–128, 2019.

Rubin, G. M., et al. Comparative genomics of the eukaryotes. **Science**, 24, 287(5461):2204-15, 2000. doi: 10.1126/science.287.5461.2204. PMID: 10731134; PMCID: PMC2754258.

SALES, Goreti F., et al. Plastic antibodies tailored on quantum dots for an optical detection of myoglobin down to the femtomolar range. **Sci Rep**, 8, 4944, 2018.

SANDRI, Crislaine; et al. Pontos quânticos ambientalmente amigáveis: destaque para o óxido de zinco. **Quím. Nova**, vol.40, no.10, São Paulo, 2017.

SANTOS, B.S. **Obtenção de nanopartículas de CdS em sistemas amorfos e a investigação de suas propriedades óptico não-lineares em meio aquoso**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

SANTOS, José A. L. **Síntese e caracterização de pontos quânticos de CdS, CdSe e CdTe para aplicação em células solares**. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016.

SANTOS, M. C., et al. Electrochemical incineration of the antibiotic ciprofloxacin in sulfate medium and synthetic urine matrix. **Water Research**, vol. 83, pag. 31–41, 2015.

SAPRA, S.; ROGACH, A. L.; FELDMANN, J. Phosphine-free synthesis of monodisperse CdSe nanocrystals in olive oil. **J. Mater. Chem.**, 2006, 16, 3391.

SAPSFORD, Kim etl al. Biosensing with Luminescent Semiconductor Quantum Dots. **Sensors**, vol, 6, 2006. 10.3390/s6080925.

SCHIFFMAN, J. D., et al. Quantum dots as fluorescent probes: Synthesis, surface chemistry, energy transfer mechanisms, and applications. **Sensors and Actuators B: Chemical**, vol. 258, pag. 1191–1214, 2018. doi:10.1016/j.snb.2017.11.189

SHAO, N., et al. Label-free sensing of thrombin based on quantum dots and thrombin binding aptamer. **Talanta**, 107, 140–145, 2013.

SHAVEL, A.; GAPONIK, N. Efficient UV-blue photoluminescing thiol-stabilized water-soluble alloyed ZnSe (S) nanocrystals. **J. Phys. Chem.**, B 2004, 108, 5905.

SHEPARD, Jason R. E., et al. Quantum Dots for Live Cell and In Vivo Imaging. **Int. J. Mol. Sci.**, 10, 441-491, 2009.

SHI, F., Liu, S., & Su, X. l-Cysteine-capped CdTe quantum dots as a fluorescent probe for sequential detection of lysozyme and trypsin. **New Journal of Chemistry**, 41(10), 4138–4144, 2017.

SHI F., et al.. A simple “turn-on” detection platform for trypsin activity and inhibitor screening based on N -acetyl- l -cysteine capped CdTe Quantum Dots. **Sensors and Actuators B: Chemical**, vol. 255, pag. 2733–2741, 2018.

SHI, T., et al. Application of molecular imprinting polymer anchored on CdTe quantum dots for the detection of sulfadiazine in seawater. **Marine Pollution Bulletin**, vol. 146, pag. 591–597, 2019. doi:10.1016/j.marpolbul.2019.07.010

SIGMA-ALDRICH. Product Information - Protease Inhibitor Panel. Disponível em:<<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/inhib1bul.pdf>>. Acesso em 02/12/2020.

SILVA, Edvan C. **Apostila Análise Química Instrumental**. Centro de Ciências Exatas e da Natureza- Departamento de Química, UFPB, 2008.

SILVA, Fernanda O.; et al. O estado da arte da síntese de semicondutores nanocristalinos coloidais. **Quím. Nova**, vol.33, no.9, São Paulo, 2010.

SILVA, R. E, et al.. Interação do complexo de rutênio com albumina do soro bovino para detecção amperométrica de ácido ascrórbico. **Química Nova**, vol. 37, nº 10, pag. 1633-1638, 2014.

SINGH, Radha Dutt et al. Quantum Dot Based Nano-Biosensors for Detection of Circulating Cell Free miRNAs in Lung Carcinogenesis: From Biology to Clinical Translation. **Frontiers in Genetics**, vol. 9, 2018.

SHI, F., et al. A simple “turn-on” detection platform for trypsin activity and inhibitor screening based on N -acetyl- l -cysteine capped CdTe Quantum Dots. **Sensors and Actuators B: Chemical**, vol. 255, pag. 2733–2741, 2018. doi:10.1016/j.snb.2017.09.087

SILVA, Mychel G.; MESSIAS, Djalmer N. **Medidas de propriedades térmicas e óticas em vidros dopados com nanocristais semicondutores**. IX Encontro Interno e XIII Seminário de Iniciação Científica, Universidade Federal de Uberlândia, 2009.

SMITH, C. & GATES, R. Protease Inhibition and Detection. **Life Science – Biofiles**, vol. 4, nº 2, 2009.

SNYCERSKI, A., DUDKIEWICZ-WILCZYNSKA, J., & TAUTT, J. Determination of protamine sulphate in drug formulations using high performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol. 18, pag. 907–910, 1998.

SOUSA, J. C. L., et al. Effect of Mercaptosuccinic Acid Stabilizer Agent on the Optical Properties of Colloidal CdTe Quantum Dots. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, 18(1), 651–658, 2018. doi:10.1166/jnn.2018.13932

SUBRAMANIAN, S., et al. Tuning the optical properties of colloidal Quantum Dots using thiol group capping agents and its comparison. **Materials Chemistry and Physics**, vol. 249, 123127, 2020.

SUCCINIC ACID: ACS reagente. Missouri-EUA: SIGMA-ALDRICH. Bula de remédio.

SUGIMOTO, Tadao. Preparation of monodispersed colloidal particles. **Advances in Colloid and Interface Science**, volume 28, pages 65-108, 1987.

SUMANTH, D. Kumar; JAI, B. Kumar; MAHESH, H. M. Quantum Nanostructures (QDs): An Overview. **Synthesis of Inorganic Nanomaterials**, pag. 59–88, 2018. doi:10.1016/b978-0-08-101975-7.00003-8

SUN, Qingjiang; et al. Bright, multicoloured light-emitting diodes based on quantum dots. **Nature Photonics**, 2008.

SURYAWANSHI, V. D., et al. Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, vol. 6, n° 1, pag. 56–63, 2016. doi:10.1016/j.jpha.2015.07.001

SWIERCZEWSKA, Magdalena et al. “High-sensitivity nanosensors for biomarker detection.” **Chemical Society reviews**, vol. 41,7, 2012.

TALAPIN, D. V.; GAPONIK, N.; ROGACH, A. L.; HOPPE, K.; Weller, H. Thiol-capping of CdTe nanocrystals: an alternative to organometallic synthetic routes. **J. Phys. Chem.**, B 2002, 106, 7177.

TALAPIN, D. V.; POZNYAK, S. K.; GAPONIK, N. P. Synthesis of surface-modified colloidal semiconductor nanocrystals and study of photoinduced charge separation and transport in nanocrystal-polymer composites. **Physica E**, 2002, 14, 237.

TERRA, W. R. & FERREIRA, C.. **Biochemistry and Molecular Biology of Digestion. Insect Molecular Biology and Biochemistry**, pag. 365–418, 2012. doi:10.1016/b978-0-12-384747-8.10011-x

THUY, Ung Thi Dieu; et al. CdTe quantum dots for an application in the life sciences. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, vol. 1, n° 4, 2011.

TIAN, B., et al. **Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery Applications - Imaging, Targeting, and Delivery- Design and engineering of multifunctional quantum dot-based nanoparticles for simultaneous therapeutic-diagnostic applications**. Series: Nanostructure Science and Technology, Springer Science, pag. 345-365, 2012.

TORCHYNSKA, T., & VOROBIEV, Y. Semiconductor II-VI Quantum Dots with Interface States and Their Biomedical Applications. **Advanced Biomedical Engineering**, 2011.

TOUGU, V., et al. Electrostatic effects in trypsin reactions. Influence of salts. **European Journal of Biochemistry**, vol. 222, n° 2, pag. 475–481, 1994. doi:10.1111/j.1432-1033.1994.tb18888.x

TRINDADE, Tito; MARTINS, Manuel A. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico. *Quim. Nova*, Vol. 35, No. 7, Aveiro-Portugal, 2012.

TURKIN, Oleksandr. **The application of nanomaterials in cancer diagnostics and treatment**, Master Thesis—University of Groningen, 2010.

UENO, T. & NAGANO, T. Fluorescent probes for sensing and imaging. **Nature Methods**, 8(8), 642–645, 2011.

ULUSOY, H. İ., et al. Magnetic solid phase extraction of trace paracetamol and caffeine in synthetic urine and waste water samples by a using core shell hybrid material consisting of graphene oxide/multiwalled carbon nanotube/Fe₃O₄/SiO₂. **Microchemical Journal**, 2018doi:10.1016/j.microc.2018.11.056

U.S., Nithish & SUNITHA, Sarah. Bacteriological applications of quantum dots. **International Journal of Current Research and Review**, vol 4, n° 17, 2012.

VALE, Brener R.; et al. Efeito da estrutura molecular de ligantes de superfície em pontos quânticos de CdTe dispersos em água. **Quím. Nova**, vol.38 no.1, São Paulo, 2015.

VALEUR, B. Molecular Fluorescence. **Digital Encyclopedia of Applied Physics**, 2009. doi:10.1002/3527600434.eap684

VASUDEVAN, D.; GADDAM, R.R.; TRINCHI, A.; Cole, I. Core-shell quantum dots: Properties and Applications. **J. Alloys Compd.**, 2015, 636, 395–404.

VAZ, Roberto, et al. . High luminescent carbon dots as an eco-friendly fluorescence sensor for Cr(VI) determination in water and soil samples. **Journal Of Photochemistry And Photobiology A-Chemistry**, vol. 346, pag. 502-511, 2017.

VEAMATAHAU, Aisea, et al. Origin of surface trap states in CdS quantum dots: relationship between size dependent photoluminescence and sulfur vacancy trap states. **Physical Chemistry Chemical Physics**, vol. 17, n° 4, pag. 2850–2858, 2015. doi:10.1039/c4cp04761c

VISWANATHA, R.; SARMA, D. D. **In Nanomaterials Chemistry: Recent Developments and New Directions**. Editado por Rao, C. N. R.; Müller, A.; Cheetham, A. K.. eds. Wiley-VCH, 2007. Capítulo 4.

VITORETI, Ana; et al. Células solares sensibilizadas por pontos quânticos. **Quím. Nova**, vol.40, no.4, São Paulo, 2017.

WANG, H., et al. Synthesis of Two Different Sizes of CdTe Quantum Dots for Detection of Copper(II) in Seawater. **Advanced Materials Research**, vol. 610-613, pag. 1060–1065, 2012.

WANG, T., ZENG, L.-H., & LI, D.-L. A review on the methods for correcting the fluorescence inner-filter effect of fluorescence spectrum. **Applied Spectroscopy Reviews**, vol. 52, n° 10, pag. 883–908, 2017.

WANG, G.-L., et al. Intrinsic enzyme mimicking activity of gold nanoclusters upon visible light triggering and its application for colorimetric trypsin detection. **Biosensors and Bioelectronics**, 64, 523, 2015.

WANG, Yilin et al. . A fluorescence quenching method for determination of copper ions with cdte quantum dots. **J. Chil. Chem. Soc.**, v. 54, n. 3, p. 274-277, 2009 .

WATANABE, T. et al.. Influence of carrier localization at the core/shell interface on the temperature dependence of the Stokes shift and the photoluminescence decay time in CdTe/CdS type-II quantum dots. **Physical Review B**, vol. 96, n° 3, 2017. doi:10.1103/physrevb.96.035305

WEBB, Graham A. **Modern Magnetic Resonance: Part 2: Applications in Medical and Pharmaceutical Sciences**. Springer Science & Business Media, 2007.

WENG, J. et al. Highly luminescent CdTe quantum dots prepared in aqueous phase as an alternative fluorescent probe for cell imaging. **Talanta**, p. 397–402, 2006.

WILSENACH, J. A., et al. Phosphate and potassium recovery from source separated urine through struvite precipitation. **Water Research**, vol. 41, n° 2, pag. 458–466, 2007.

WORTHINGTON, Charles C. **Worthington enzyme manual: enzymes and related biochemicals**. Editora Worthington Biochemical Corporation, 1988.

XIAO, K.P., KIM, B.Y.& BRUENING, M.L. Detection of protamine and heparin using electrodes modified with poly(acrylic acid) and its amine derivative. **Electroanalysis**, vol. 13, n° 17, pag. 1447-1453, 2001.

XIAO-LI, Liu et al. Low-dose heparin as treatment for early disseminated intravascular coagulation during sepsis: A prospective clinical study. **Experimental and therapeutic medicine**, vol. 7, pag. 604-608, 2014. doi:10.3892/etm.2013.1466

XIAOHUI, J.; COPENHAVER, D.; PENG, X. Ligand Bonding and Dynamics on Colloidal Nanocrystals at Room Temperature: The Case of Alkylamines on CdSe Nanocrystals. **J. Am. Chem. Soc.**, 2008, 130, 5726.

XU, J.-J., et al. Functional nanoprobe for ultrasensitive detection of biomolecules: an update. **Chem. Soc. Rev.**, 43(5), 1601–1611, 2014.

XU, K., et al. Simultaneous removal of phosphorus and potassium from synthetic urine through the precipitation of magnesium potassium phosphate hexahydrate. **Chemosphere**, vol. 84, n° 2, pag. 207–212, 2011.

XUE, Fangfang;et al. Investigation the interaction between protamine sulfate and CdTe quantum dots with spectroscopic techniques. **The Royal Society of Chemistry**, vol 13, 2016.

XUE, F., et al. Aggregation-induced emission enhancement of gold nanoclusters triggered by silicon nanoparticles for ratiometric detection of protamine and trypsin. **Analytica Chimica Acta**, 2018. doi:10.1016/j.aca.2018.09.033

YAN, P., et al. pH-based sensor array for the detection and identification of proteins using CdSe/ZnS quantum dots as indicator. **The Analyst**,vol 144, pag 2891-2897, 2019.

YAN, Y., et al. Pontos quânticos CdSe-ZnS para detecção e quantificação seletiva e sensível de hipoclorito. **Analytical Chemistry**, vol. 82, n° 23, pag. 9775-9781, 2010.

YANG, Kai, et al. Quantum dot-based visual in vivo imaging for oral squamous cell carcinoma in mice. **Oral Oncology**, volume 46, n° 12, pages 864-868,2010.

YANG, Y. A.; WILLIAMS, K. R.; CAO, Y. C. Synthesis of CdSe and CdTe nanocrystals without precursor injection. **Angew. Chem., Int. Ed.**, 44, 6712, 2005.

YANG, Y.-Q, et al. Epitope imprinted polymer coating CdTe quantum dots for specific recognition and direct fluorescent quantification of the target protein bovine serum albumin. **Biosensors and Bioelectronics**, 54, 266–272, 2014.

YAO, Shouzhao; et al. “Turn on-off” fluorescent sensor for protamine and heparin based on label-free silicon quantum dots coupled with gold nanoparticles. **Sensors and Actuators B: Chemical**, volume 213, pages 131-138, 2015.

YI, Kui-Yu. Electrochemiluminescence of CdTe Quantum Dots and Sensitive Detection of Hemoglobin. **International Journal of Electrochemical Science**, vol. 12, pag. 3472-3482, 2017. 10.20964/2017.04.100

YILDIZ, I. et al. Hydrophilic CdSe- ZnS core- shell quantum dots with reactive functional groups on their surface. **Langmuir**, vol. 26, pag. 11503–11511, 2010.

YING, E, et al. Synthesis and Bio-Imaging Application of Highly Luminescent Mercaptosuccinic Acid-Coated CdTe Nanocrystals. **PLOS ONE**, 3(5), 2008.

YU, L. et al. Recent progress in fluorescent and colorimetric sensors for the detection of ions and biomolecules. *Chinese Chemical Letters*, 2018.

YU, W.; PENG, X. Formation of high-quality CdS and other II–VI semiconductor nanocrystals in noncoordinating solvents: tunable reactivity of monomers. **Angew. Chem., Int. Ed.**, 2002, 41, 2368.

ZHANG, H.; CUI, Z.; WANG, Y.; ZHANG, K.; JI, X.; LU, C.; YANG, B.; GAO, M. Y. From Water-Soluble CdTe Nanocrystals to Fluorescent Nanocrystal–Polymer Transparent Composites Using Polymerizable Surfactants. **Adv. Funct. Mater.**, 2003, 15, 777.

ZHANG, H.; WANG, L.; XIONG, H.; HU, L.; YANG, B.; LI, W. Hydrothermal Synthesis for High-Quality CdTe Nanocrystals. **Adv. Funct. Mater.** 2003, 15, 1912.

Zhang, Wenzhu et al. Label-free and real-time monitoring of trypsin activity in living cells by quantum-dot-based fluorescent sensors. **Analytical Methods**, vo. 6. 2014. doi 10.1039/c3ay41793j.

ZHANG, Z. et al. Facile and sensitive detection of protamine by enhanced room-temperature phosphorescence of Mn-doped ZnS quantum dots. **Analytical Biochemistry**, v. 478, p. 90–95, 2015.

ZHANG, Z. et al. Deposition of CdTe quantum dots on microfluidic paper chips for rapid fluorescence detection of pesticide 2,4-D. **The Analyst**, vol. 144, pag. 1282-1291, 2019. doi:10.1039/c8an02051e

ZHAO, Jiangna; et al. Gold nanoparticle coupled with fluorophore for ultrasensitive detection of protamine and heparina. **Talanta**, volume 116, pages 951-957, 2013.

ZHENG, F. et al. Peptide–quantum dot bioconjugates for label-free trypsin detection based on the exciton energy transfer. **Analytical Methods**, vol. 4, n° 12, 2012.

ZHU, Dongdong; SHA, Jishao; GUAN, Guimei. Heparin-MPA dual modified CdS quantum dots used as a simple and rapid label-free fluorescent sensor for protamine and hemim detection. *Microchemical Journal*, volume 133, páginas 391-397, 2017.

ZHU, J., et al. CdTe quantum dot-based fluorescent probes for selective detection of Hg (II): The effect of particle size. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, vol. 177, pag. 140–146, 2017.