

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana da quercetina bioconjugada com pontos quânticos de CdSe de tamanhos mágicos

Ana Luiza Silva Borges

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia

Uberlândia – MG

Julho – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana da quercetina bioconjugada com pontos quânticos de CdSe de tamanhos mágicos

Ana Luiza Silva Borges

Prof. Dr. Foued Salmem Espíndola

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG

Julho – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana da quercetina bioconjugada com pontos quânticos de CdSe de tamanhos mágicos

Ana Luiza Silva Borges

Prof. Dr. Foued Salmem Espíndola
Instituto de Biotecnologia (IBTEC)

Homologado pela coordenação do Curso de
Biotecnologia em ____/____/____

Edgar Silveira Campos

Uberlândia – MG

Julho – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana da quercetina bioconjugada com pontos
quânticos de CdSe de tamanhos mágicos

Ana Luiza Silva Borges

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, de de

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Fernando e Zilda, que fizeram de tudo para me dar a educação necessária para que eu chegasse até aqui e por sempre me apoiarem em minhas escolhas. À minha irmã, Fernanda, minha melhor amiga, que sempre esteve comigo, me apoiando e me fazendo rir. Aos meus tios e primos, que sempre estiveram por perto me incentivando.

Ao meu namorado e colega de TCC, Vinícius Bittar, que sempre me apoiou, me ajudou e me fez rir nas horas mais difíceis, além de me ajudar em todas as etapas do trabalho e aguentar meus estouros.

Aos meus amigos mais próximos, agradeço pelos momentos de alegria e por sempre estarem presentes em minha vida. Vocês significam muito pra mim.

Aos meus orientadores, prof^a Anielle Christine, prof. Foued Espíndola e prof^a Renata Roland, que me orientaram ao longo da minha graduação, me acrescentando conhecimento e experiência.

A equipe LABIBI, pela imensa ajuda, conversas e amizade, em especial Adrielle, Allisson, André, Camila, Danielle, Douglas, Heitor, Júlia, Pedro e Rodrigo.

E finalmente agradeço a Deus, pela paciência, perseverança e fé.

RESUMO

Os flavonoides são uma classe de compostos fenólicos que são identificados por possuírem estrutura química e propriedades únicas. Os flavonoides, quando em concentração ideal, tem ação antioxidante e, reagem com os denominados radicais livres, impedindo ou diminuindo o estresse oxidativo. A Quercetina se enquadra na classe dos Flavonóis e possui cinco hidroxilas ao redor de sua molécula e estima-se que é um dos flavonoides mais presentes na dieta humana. São substâncias com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobiana e anticarcinogênicas. Os Pontos Quânticos de Tamanhos Mágicos (PQTM)s são uma nova classe de Quantum Dots de estruturas termodinamicamente estáveis, amplo intervalo de luminescência e alta estabilidade do tamanho com o tempo. Entretanto, um dos maiores desafios no mundo Nanobiotecnológico é desenvolver nanomateriais com aplicabilidade biológica que não apresentem toxicidade. Embora sintetizados com 0.5 nmol de Selênio, os PQTM)s utilizados no trabalho ainda demonstraram citotoxicidade e formação de EROs. Por isso, a fim de tentar reduzir ainda mais essa citotoxicidade, os PQTM)s foram bioconjugados com a Quercetina utilizando EDC e NHS. Foram realizados ensaios para verificar o potencial antioxidante das moléculas bioconjugadas, como TBARS, FRAP, DPPH e ORAC, além dos ensaios de espécies reativas em macrófagos e concentração inibitória mínima. As moléculas bioconjugadas demonstraram atividade antioxidante significativa apenas no ORAC, e mesmo assim, é menos que a atividade da Quercetina isolada. Provavelmente porque, devido a bioconjugação, a ligação aos PQTM)s ocorre nos grupamentos hidroxila da Quercetina. Esses grupamentos estão relacionados com a atividade antioxidante da mesma, e com a bioconjugação, essas regiões são bloqueadas, impedindo sua ação. Além dos ensaios antioxidantes, ele não produziu EROs em macrófagos e não inibiu o crescimento bacteriano.

Palavras-chave: Quercetina, PQTM)s, Bioconjugação, antioxidante

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Quercetina: um flavonoide com potencial antioxidante.....	1
1.2. Flavonóides e a Nanotecnologia: uma alternativa contra bactérias resistentes.....	3
1.3. Nanobiotecnologia: Os Pontos Quânticos de Tamanho Mágico (PQTMs).....	5
1.4. Bioconjugação dos PQTMs à biomoléculas	6
2. OBJETIVOS.....	8
2.1. Objetivo Geral.....	8
2.2. Objetivos Específicos.....	8
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
3.1. Síntese e Caracterização física dos Pontos Quânticos de Tamanhos Mágicos (PQTMs).....	8
3.2. Bioconjugação dos Pontos Quânticos de Tamanhos Mágicos (PQTMs) com a Quercetina.....	8
3.3. Verificação e análise da bioconjugação através das técnicas de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e Microscopia de Força Atômica (AFM).....	9
3.4. Avaliação da atividade antioxidante da Quercetina isolada e bioconjugada com os PQTMs através de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	10
3.5. FRAP (Poder de redução do íon ferro).....	12
3.6. DPPH.....	12
3.7. ORAC (Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio).....	13
3.8. Espécies Reativas em Macrófagos.....	13
3.9. Avaliação da atividade antimicrobiana da Quercetina isolada e bioconjugada com o MSPQs.....	14
3.10. Análise estatística.....	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
4.1. Síntese e caracterização física dos Pontos Quânticos de Tamanhos Mágicos (PQTMs)	15
4.2 Verificação da Bioconjugação dos Pontos Quânticos de Tamanhos Mágicos (PQTMs) com a Quercetina através de análises de FT-IR e AFM.....	15

4.3 Avaliação da atividade antioxidante da Quercetina isolada e bioconjugada com o MSPQs através de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	19
4.4 FRAP	27
4.5 DPPH	28
4.6 ORAC	30
4.7 Espécies Reativas em Macrófagos.....	32
4.8 Avaliação da atividade antimicrobiana da Quercetina isolada e bioconjugada com o PQTMs	36
5. Conclusão.....	38
6. Referências	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do flavonoide Quercetina.

Figura 2 – Espectro FTIR da Quercetina (amarelo), PQTMs (vermelho) e moléculas bioconjugadas (azul).

Figura 3 – Imagem gerada através da técnica de AFM da Quercetina.

Figura 4 – Imagem gerada através da técnica de AFM dos PQTMs.

Figura 5 – Imagem gerada através da técnica de AFM das moléculas bioconjugadas.

Figura 6 – Histograma comparativo das amostras controle no teste de TBARS.

Figura 7 – Histograma comparativo das amostras em relação ao Homogeneizado no teste de TBARS.

Figura 8 – Histograma comparativo das amostras em relação ao controle do Ácido Ascórbico no teste de TBARS.

Figura 9 – Histograma comparativo das amostras em relação ao controle do Ferro no teste de TBARS

Figura 10 – Histograma comparativo das amostras em relação ao controle do Ascorbil (Ácido Ascórbico + Ferro) no teste de TBARS.

Figura 11 – Análise da capacidade antioxidante da Quercetina (1mg/mL), PQTMs (1 e 3 mg/mL) e moléculas bioconjugadas (1 e 3 mg/mL) pelo método de FRAP expressados em $\mu\text{mol Trolox eq/g}$.

Figura 12 – Análise da capacidade antioxidante em porcentagem da Quercetina (1mg/mL), PQTMs (1 e 3 mg/mL) e moléculas bioconjugadas (1 e 3 mg/mL) pelo método DPPH.

Figura 13 – Análise da capacidade antioxidante da Quercetina (0,1mg/mL), PQTMs (1 e 0,1 mg/mL) e moléculas bioconjugadas (1 e 0,1 mg/mL) pelo método ORAC.

Figura 14 – Histograma comparativo entre as amostras de Quercetina isolada ou em conjunto com o Zymosan.

Figura 15 – Histograma comparativo entre as amostras de PQTMs isolados ou em conjunto com o Zymosan.

Figura 16 – Histograma comparativo entre as amostras de Quercetina isolada ou em conjunto com o Zymosan.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração Mínima Inibitória avaliada das amostras Quercetina e PQTMs isolados e bioconjugados nas concentrações de 0,98 µg/mL a 2000 µg/mL em relação à *Escherichia coli* (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva).

Tabela 2 – O controle da técnica realizado com Tetraciclina nas concentrações de 0,0115 µg/mL a 5,9 µg/mL. Faixa esperada de CIM do controle para *Escherichia coli* ATCC BAA 198: 0,5-2,0 µg/mL. Faixa esperada de CIM do controle para *Staphylococcus aureus* ATCC BAA 44: 0,12-1,0 µg/mL

1. INTRODUÇÃO

1.1 Quercetina: um flavonoide com potencial antioxidante

Os flavonoides são uma classe de compostos fenólicos que são identificados por possuírem estrutura química e propriedades únicas. Recebem essa designação, pigmentos de plantas derivados da benzo-g-pirona, que é formado por um esqueleto de difenil propano com dois anéis benzênicos ligados a um anel pirano (BEHLING e SENDÃO, 2004).

As subclasses dos flavonoides são: calconas, dihidrocalconas, auronas, flavonas (apegenina, luteolina, diosmetina), flavonóis (quercetina, miracetina, kaempferol), dihidroflavonol, flavanonas (naringina, hesperidina), flavanol, flavandiol, antocianinas, isoflavonóides (genisteína, daizdeína), bioflavonóides e proantocianinas (SOURCES e SIGNIFICANCE, 1998).

Esses compostos são provenientes do metabolismo secundário de vegetais e estão presentes nas folhas, frutos, flores e raízes, dessa maneira, são muito comuns na dieta humana, estando presentes em frutas, como maçã, uva e blueberry; em bebidas, como café, vinho e cerveja; em vegetais como brócolis, espinafre, couve e cebola; em cereais e sementes, como linhaça, soja e nozes (HAVSTEEN, 1983).

Os flavonoides, quando em concentração ideal, tem ação antioxidante e, reagem com os denominados radicais livres, impedindo ou diminuindo o estresse oxidativo. São também quelantes de íons metálicos como o Ferro e possuem propriedades que estabilizam a membrana celular protegendo os tecidos de danos e peroxidação lipídica. Eles ainda possuem ação antitumoral, anti-inflamatória, antialérgica e antiviral. (BEHLING e SENDÃO, 2004; VIVIANE e colab., 2017).

O mecanismo antioxidante dos flavonoides ainda está sendo estudado, porém, existem muitas pesquisas sobre sua atividade. Propõe-se que os flavonoides atuam como doadores de átomos de Hidrogênio ou um elétron ao radical, formando um radical flavonoide estável, que previnam ou retardem as reações radiculares em cadeia (OLIVEIRA e colab., 2016).

Outro mecanismo antioxidante dos flavonoides está na propriedade de quelar íons metálicos, formando complexos estáveis insolúveis, impedindo com os esses metais participem como catalisadores na reação de Fenton, uma reação que na presença de íons metálicos, o peróxido de hidrogênio produz radicais hidroxila (LIMA, 2007).

Uma característica estrutural dos flavonoides que influencia em sua atividade antioxidante é a presença e posição de grupamentos hidroxila ao longo do anel fenólico, e esse caráter está muito associado à classe das Flavonas e Flavonóis, uma das principais classes que possuem atividade antioxidante e são caracterizadas como sequestradores de espécies reativas de oxigênio (SOUZA, 2009).

A Quercetina se enquadra na classe dos Flavonóis e possui cinco hidroxilas ao redor de sua molécula e estima-se que é um dos flavonoides mais presentes na dieta humana. Pode ser encontrado na cebola, maçã, chá verde e vinho. São substâncias com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobiana e anticarcinogênicas e estão presentes mais comumente nas plantas em sua forma hidrofílica glicosilada, principalmente como β -glicosídeos de vários açúcares (BEHLING e SENDÃO, 2004; CAO e colab., 1997; LESJAK, 2018).

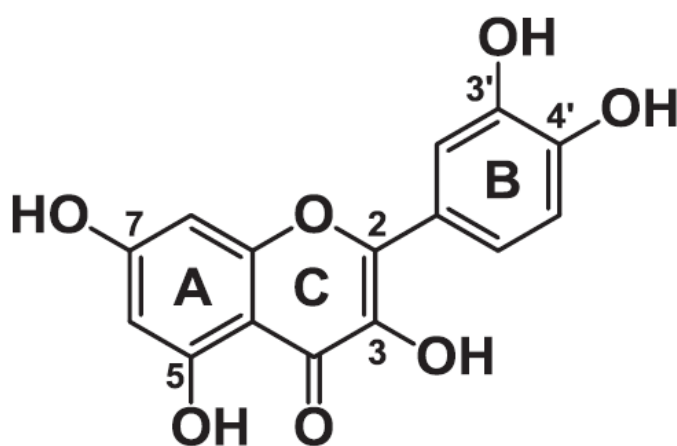


Figura 1 – Estrutura química do flavonoide Quercetina.

Esse flavonoide tem a capacidade de inibir a oxidação por radicais livres de três maneiras diferentes. Elas interagem com espécies reativas de oxigênio, como íons superóxido, O_2^- , quelam íons de Ferro e outros metais, e reagem com radicais peroxil inibindo a peroxidação lipídica (BEHLING e SENDÃO, 2004; KANIMOZHI e colab., 2016)

O uso de flavonoides na medicina antiga era muito comum e eficaz, o que fez com que esse conhecimento passasse de geração para geração. Essas moléculas chamam muito a atenção da indústria farmacêutica, que sempre está à procura de novos compostos ativos a fim de originarem um novo fármaco (HAVSTEEN, 2002).

Os radicais livres possuem um ou mais pares de elétrons livres em sua camada de valência, e que, para se tornarem estáveis, retiram átomos de hidrogênio de um substrato a fim de se tornar mais estável e a molécula doadora se torna oxidada. As espécies reativas de Oxigênio (EROs) são as mais conhecidas, como o superóxido e o peróxido de hidrogênio (BOOTS e colab., 2008).

Essas moléculas altamente reativas são produzidas constantemente durante as atividades metabólicas, e quando em excesso, são responsáveis por causar o estresse oxidativo, podendo resultar em diversas patologias como artrites inflamatórias, câncer, diabetes e processos degenerativos, como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson e o envelhecimento precoce (VIVIANE e colab., 2017).

A cadeia de peroxidação lipídica na membrana celular, por exemplo, pode ser iniciada pela presença desses radicais livres resultando em diversas patologias, como as cardiovasculares e neurodegenerativas e é considerado um importante fator no envelhecimento. Essa cadeia de eventos consiste na oxidação de ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares afetando sua integridade, fluidez e permeabilidade formando radicais livres (BAGHEL e colab., 2012; BUDNI e colab., 2007; PELOTAS e colab., 2016).

O nosso próprio organismo conta com uma linha de uma defesa contra os radicais livres, em especial as espécies reativas de oxigênio (EROs). Entre as enzimas responsáveis por esse controle, estão a Catalase, Glutathione Peroxidase e Superóxido Dismutase. A linha de defesa secundária inclui antioxidantes, como a Vitamina C, Vitamina A e os compostos ativos das plantas, incluindo os flavonoides (BAGHEL e colab., 2012).

1.2 Flavonóides e a Nanotecnologia: uma alternativa contra bactérias resistentes

Atualmente o uso excessivo e indiscriminado de antibióticos resultou em bactérias multirresistentes e representam altos riscos para a saúde pública e para o ambiente, uma vez que os antimicrobianos convencionais já não são eficazes nesses casos. No Brasil, cerca de 20 mil pessoas vão a óbito por ano devido às infecções hospitalares. (ANVISA, 2016; CHENG e colab., 2016).

A resistência aos antimicrobianos se dá de duas maneiras. A resistência celular é desenvolvida por mutação, assim como transferência horizontal de genes, que é a troca de material genético entre células ou genomas de espécies não relacionadas através da conjugação, transdução e transformação, sendo um processo muito comum em procariotos e

importante mecanismo de adaptação dos mesmos em determinado meio (BROWN, 2003; CHENG e colab., 2016; LAWRENCE, 2002).

Também pode ocorrer uma resistência em determinada comunidade de bactérias conferindo a elas certa tolerância ao estresse ambiental que uma célula isolada não conseguiria suportar. Um exemplo comum desse caso são os biofilmes, uma complexa agregação microbiana sobre uma superfície, muito associado a infecções de cunho hospitalar e devido a sua resistência, dificulta seu tratamento (PENESYAN e colab., 2015)

A perda da eficácia dos antimicrobianos convencionais no tratamento contra as cepas resistentes representa um desafio para o desenvolvimento de novas drogas que possam solucionar esse problema. Estudos utilizando Nanotecnologia e Flavonóides, por exemplo, têm mostrado bons resultados e podem ser uma alternativa (BEZERRA e SILVA, 2014; PINHEIRO, 2016).

As nanopartículas de Óxido de Zinco (ZnO) e Prata (Ag), por exemplo, demonstraram efeito antimicrobiano contra várias bactérias. A Prata possui ação biocida e sua atividade antimicrobiana se deve ao fato de que seus íons tem a capacidade de se ligar à proteínas, comprometendo a estabilidade da membrana celular e outras atividades metabólicas da célula. É também capaz de se ligar às proteínas do DNA, impedindo sua replicação, sendo considerado também um agente bacteriostático (RAI e colab., 2012).

O óxido de Zinco é um semicondutor, fotooxidante e fotocatalisador, apresentando baixa toxicidade e alta estabilidade. Ele é considerado um antimicrobiano em potencial, pois tem a capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) em sua superfície, liberam íons de Zinco com o tempo e causam danos na membrana (TAM e colab., 2008).

Os vegetais liberam metabólitos secundários, não associados ao crescimento e responsáveis pela adaptação ao ambiente. São eles alcaloides, cumarinas, ácidos fenólicos, flavonoides, óleos voláteis, quinonas, saponinas, taninos e terpenos. Muitos deles têm ação antimicrobiana e podem interferir no metabolismo de microorganismos, bloqueando a ação de uma enzima ou comprometendo a integridade da membrana plasmática (CARDOSO e colab., 2010).

Um estudo demonstrou que a Quercetina apresentou efeito antimicrobiano nas bactérias *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, entretanto, as doses de tratamento foram altas (SOUZA, 2009).

A quercetina também demonstrou efeito positivo contra a virulência exercida referente a alfa-toxina resultante da infecção pela bactéria Gram Positiva *Staphylococcus aureus*. Essa

toxina é responsável pela formação de biofilme e hemólise e esse flavonóide, de maneira ainda não explicável, diminuiu seus efeitos (CARRADA, 2018).

1.3 Nanobiotecnologia: Os Pontos Quânticos de Tamanho Mágico (PQTMs)

Em 1959, Feynman, um físico visionário, proferiu promissoras palavras, dizendo que um dia, seria possível manipular os átomos e criar novos materiais resultantes dessa técnica. Atualmente, a Nanotecnologia se apresenta como uma das ciências mais atraentes em relação ao desenvolvimento tecnológico. Ela se destaca na área de nanoeletrônica, nanobiotecnologia e nanomateriais (CADIOLI, 2015).

Os Quantum Dots (QDs) semicondutores são Nanocristais (NCs) que apresentam confinamento quântico em três dimensões que variam de 2 a 10 nm podendo ser de diferentes elementos, como de CdSe e CdS, e possuem elevada absorção, fotoestabilidade, baixa taxa de degradação, larga região do espectro de excitação e estreitas bandas de emissão e baixa tendência de fotodegradação (CHRISTINE, 2014; FRIENDLY e colab., 2017).

Apesar das várias possibilidades de aplicação e as vantagens que eles apresentam, vários estudos tem associado aos QDs a uma certa toxicidade relacionada à liberação de íons de Cádmio (GALDIERO e colab., 2016). Mahendra et al mostraram que os QDs são estáveis em pH neutro, no entanto, ele é desestabilizado quando em meio ácido ou alcalino, resultando na liberação dos íons de Cádmio. (MAHENDRA e ZHU, 2008)

A citotoxicidade dos QDs é algo importante a se considerar quanto aos ensaios biológicos, já que estudos mostraram que QDs de calcogenetos de Cádmio estão associados com a oxidação intracelular. Para reverter esse problema, materiais inertes, como a sílica, podem revestir os QDs evitando a oxidação e diminuindo sua citotoxicidade. Alterações no núcleo, casca, ligantes e tamanhos também auxiliam na diminuição da citotoxicidade devido os íons de Cádmio (CHRISTINE, 2014).

Já os Pontos Quânticos de Tamanhos Mágicos (PQTMs), também são nanocristais, entretanto, são de um tamanho ainda menor (< 2 nm) e possuem características diferentes dos Pontos Quânticos ou QDs. Eles têm estruturas termodinamicamente estáveis, amplo intervalo de luminescência e alta estabilidade do tamanho com o tempo (CHEN e colab., 2012; CHRISTINE, 2014; SILVA, 2014).

O termo “tamanho mágico” se refere a um número mágico de átomos em sua estrutura que os fazem serem tão estáveis. Seu tamanho surpreendentemente pequeno é uma das vantagens

em aplicações biológicas, somado a sua alta estabilidade e facilidade de penetração de diversos tipos de membranas, facilitando o estudo da migração de tumores *in vivo*, por exemplo (CHRISTINE, 2014; KUZNETSOV e colab., 2012).

Um dos maiores desafios no mundo Nanobiotecnológico é desenvolver nanomateriais com aplicabilidade biológica que não apresentem toxicidade. Por isso, várias técnicas de modificações na superfície dos QDs foram desenvolvidas, e mesmo assim, ainda são reportados toxicidade à esses nanomateriais (CHRISTINE, 2014).

1.4 Bioconjugação dos PQTMs à biomoléculas

A bioconjugação consiste em utilizar técnicas químicas para ligar covalentemente nanopartículas a biomoléculas sem alterar a sua conformação. Para que isso aconteça, as nanopartículas devem estar funcionalizadas com grupamentos químicos específicos, tais como tiol (-SH), ácido carboxílico (-COOH) e amina (-NH₃) (CHRISTINE, 2014; SOFIA, 2012).

A bioconjugação mais comum quando se trata de biomoléculas faz o uso de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) juntamente com N-hidroxisuccinimida (NHS) resultando em uma interação estável entre os grupamentos carboxílicos e com grupamentos amino das biomoléculas. O EDC faz parte da primeira etapa da reação, resultando em um éster semi-estável sendo assim capaz de acoplar aos grupamentos amino da proteína e o NHS é responsável por evitar a aglomeração de proteínas ou polímeros de QDs conjugados a proteínas (PEREIRA e LAI, 2008).

Também já foi descrito na literatura a utilização do EDC e NHS na bioconjugação entre o ácido gálico e a quitosana em que os reagentes de ligação iniciam espécies de éster reativas no ácido gálico e posteriormente ocorre uma reação nucleofílica em diferentes pontos da molécula de quitosana (PASANPHAN e CHIRACHANCHAI, 2008).

Esse procedimento permite a conjugação de diferentes moléculas, como anticorpos, ácidos nucleicos, polissacarídeos e peptídeos aos QDs, apresentando um amplo intervalo de luminescência, permitindo o estudo de migração de células tumorais, por exemplo (CHRISTINE, 2014).

A bioconjugação pode ser confirmada através da técnica de Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) que identifica compostos e interações orgânicos ou inorgânicos. Baseia-se na absorção quantizada da radiação infravermelha pela amostra, resultando na vibração das moléculas (AERON e colab., 2009).

No espectro eletromagnético, a radiação infravermelha situa-se entre as regiões do visível e das microondas, sendo o intervalo espectral de aproximadamente 12500 cm^{-1} a 200 cm^{-1} . A frequência de vibração e rotação de ligação entre os átomos produzem bandas de absorção do infravermelho que são registradas por espectro de absorção ou espectro de IR, desde que o espectrofotômetro possua um interferômetro que opere com Transformada de Fourier, um processo matemático que converte os dados no espectro de radiação (AERON e colab., 2009).

Os grupos funcionais absorvem a radiação na região do infravermelho do espectro eletromagnético e, dependendo da natureza das ligações químicas presente nesses radicais, resulta em comprimentos de onda característicos. A forma, posição e intensidade da banda pode informar a presença de grupamentos químicos orgânicos. Essa análise fornece informações qualitativas da amostra. Ainda, cada grupo químico possui um movimento vibracional independente da molécula que se encontra, fornecendo informações estruturais à amostra (AERON e colab., 2009).

Além da avaliação por FT-IR, a microscopia de força atômica (AFM) auxilia na verificação da bioconjugação. Esse procedimento analisa a superfície da amostra, podendo também estudar interações inter e intra-moleculares e gera imagens de alta resolução (APARECIDO e colab., 2006).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar os efeitos antioxidante e antimicrobiano da Quercetina isolada e bioconjugada aos Pontos Quânticos de Tamanhos Mágicos (PQTM) de CdSe.

2.2 Objetivos Específicos

- Bioconjugar os PQTMs funcionalizados à Quercetina.
- Avaliar a bioconjugação por Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR) e Microscopia de Força Atômica (AFM).
- Analisar o potencial antioxidante da Quercetina e PQTMs isolados e bioconjugados através da metodologia TBARS, ORAC, FRAP, DPPH e Espécies Reativas em Macrófagos.

- Analisar o potencial antimicrobiano da Quercetina e PQTMs isolados e bioconjugados em bactérias Gram positivas e Gram negativas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Síntese e Caracterização física dos Pontos Quânticos de Tamanhos Mágicos (PQTMs) de CdSe

Os PQTMs de CdSe (com 0.5 mmol de Selênio) foram cedidos pela Prof^a. Dr^a Anielle Christine Almeida Silva do Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores (LNMIS), localizado no Instituto de Física da Universidade Federal de Uberlândia.

As caracterizações físicas complementares já foram previamente publicadas no trabalho de SILVA et al, 2014.

3.2 Bioconjugação dos Pontos Quânticos de Tamanhos Mágicos (PQTMs) com a Quercetina

Os PQTMs foram funcionalizados com grupos carboxílicos (-COOH) em sua extremidade, facilitando assim, a bioconjugação com a Quercetina, que possui várias hidroxilas (-OH) ao redor da sua molécula.

A metodologia de bioconjugação utilizada neste trabalho foi baseada no estudo de PIOTROWSKA e colab., 2013, em que se mostrava a bioconjugação de Quantum Dots de ZnS funcionalizados com tioglicerol ao Ácido Fólico, utilizando os agentes de acoplamentos EDC e NHS (PIOTROWSKA e colab., 2013).

Foi utilizado 5 mg de PQTMs diluídos em 6 mL de tampão borato. Foi adicionado 1,025 µmol de Quercetina diluída em 1,6 mL de tampão borato, 0,38 mg de EDC (1,025 µmol) e 0,24 mg de NHS (1,025 µmol), ambos diluídos em 160 µL de tampão borato.

A solução permaneceu em atmosfera inerte na presença de gás Argônio com agitação constante durante 3 horas na ausência de luz. Em seguida, foi adicionado álcool etílico aos poucos ao sistema, até que ocorresse uma turvação da solução com leve formação de

precipitado, correspondente a formação de moléculas de PQTMs bioconjugadas à Quercetina. O álcool etílico também foi utilizado para retirar a Quercetina livre, que não foi bioconjugada.

O recipiente que contém a solução foi mantido ao abrigo da luz para que o precipitado decantasse totalmente, a fim de obter maior rendimento, e que ocorresse a secagem natural do líquido, sobrando apenas o precipitado. As análises de FT-IR e AFM foram realizadas posteriormente a fim de avaliar a bioconjugação.

3.3 Verificação e análise da bioconjugação através das técnicas de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e Microscopia de Força Atômica (AFM)

O precipitado resultante da bioconjugação da Quercetina aos PQTMs foi submetido à técnica de FT-IR para análise da posição e intensidade da banda, que informa a presença de grupamentos químicos orgânicos resultantes da bioconjugação. A Quercetina e os PQTMs também foram submetidos a tal análise como controles a fim de comparação com as moléculas bioconjugadas.

O FT-IR foi operado no modo ATR (Refletância Total Atenuada), onde a amostra sólida em pó foi posicionada em cima de um cristal com alto índice de refração e pressionada para atingir máximo contato. A radiação é direcionada a um ângulo específico, passa pelo cristal e reflete na superfície interna da amostra. O feixe de luz acaba perdendo energia nos comprimentos de onda que a amostra absorve.

O intervalo utilizado dos espectros de FT-IR no modo ATR corresponde a números de onda na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} para identificação de compostos químicos. A técnica utiliza pouca quantidade de amostra, não exige preparo dispendioso e é uma análise rápida.

Após o uso do FT-IR é importante a limpeza do cristal com um pedaço de algodão untado de álcool 70% para que não haja interferência na amostra seguinte ou descalibração do equipamento

A técnica de Microscopia de Força Atômica (AFM) foi realizada a fim da obtenção de imagens das moléculas bioconjugadas, tendo em vista que esse procedimento analisa a superfície da amostra, pode também estudar interações inter e intra-moleculares e gera imagens de alta resolução.

No AFM é empregado uma sonda constituída de uma fina ponteira que está acoplado ao cantilever, sendo que sua deflexão mostra as forças de interação atômicas entre a ponteira e a amostra analisada.

As amostras analisadas foram a Quercetina, os PQTMs e as moléculas bioconjugadas a fim de, visualmente, provar a bioconjugação dessas moléculas.

3.4 Avaliação da atividade antioxidante da Quercetina isolada e bioconjugada com os PQTMs através de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica foi quantificada através da formação de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS). A metodologia utilizada foi baseada nos estudos de YAGI, Kunio (YAGI, 1998).

A peroxidação lipídica via radicais livres, resulta em várias moléculas, entre elas, aldeídos, como o malondialdeído (MDA), que é considerado um marcador de estresse oxidativo. Sua quantificação é realizada através de reações com o ácido tiobarbitúrico (TBA), produzindo um composto dimérico de cor rósea que absorve a 532 nm, sendo quantificado por espectrofotometria (GHANI e colab., 2017).

Foram utilizados fígados de ratos do parecer do Comitê de Ética (número 015/17) saudáveis como fonte de lipídeos e o mesmo foi homogeneizado com tampão fosfato de sódio com cloreto de potássio pH 7,4. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 800g por 15 minutos a 4° C.

As amostras foram incubadas à 100°C por 2 horas contendo 100 µL de homogeneizado, 200 µL de ácido tricloroacético (10% TCA), 300 µL de ácido tiobarbitúrico (0,67% TBA) e 50 µL de Quercetina, PQTMs isolados ou bioconjugados.

A peroxidação lipídica foi avaliada de acordo com quatro situações diferentes: apenas homogeneizado; homogeneizado + ácido ascórbico; homogeneizado + ferro; homogeneizado + ácido ascórbico + ferro. Na primeira situação, não há indução da peroxidação lipídica. Na segunda é adicionado um antioxidante controle. Já na terceira e quarta situações, ocorre indução de peroxidação lipídica, uma vez que íons de Ferro e o radical Ascorbil, derivado da reação entre ácido ascórbico e ferro causam danos na membrana.

Em seguida, os ependorfs permaneceram em repouso para resfriar na câmara fria por 5 minutos e depois se adicionou 400 µL de Butanol, um solvente orgânico que extrai o complexo colorido.

Os tubos foram centrifugados à 5000xg por 3 minutos. O sobrenadante corresponde à fase orgânica que possui o pigmento rosa e 300 µL do mesmo foi transferido para a microplaca preta e posteriormente lida no fluorímetro com excitação a 515 nm e emissão a 553 nm.

Foi construída uma curva padrão de MDA com 12 pontos em duplicata utilizando o reagente TMP (1,1,3,3-Tetrametoxipropano), em que sua hidrólise resulta em MDA, submetidas aos mesmos procedimentos das outras amostras. Essa curva permite a quantificação de MDA na amostra por regressão linear e é analisada como nmol TBARS/mg de proteína.

O homogeneizado utilizado no TBARS foi posteriormente submetido à análise de Bradford, que se baseia na ligação do corante azul aniônico Coomassie Blue G250 à proteína.

Composição do reagente de Bradford: 100 mg de Coomassie Blue G250 + 50 ml de etanol + 100 ml de ácido orto-fosfórico e completar até 100 ml de água milli-Q. Para a metodologia de Bradford é necessária a realização de uma curva de 8 pontos com albumina bovina sérica (BSA) e água.

Foi pipetado 5 µl de cada ponto da curva e da amostra a ser analisada em diferentes poços de uma microplaca. Posteriormente foi adicionado 250 µl do reagente de Bradford em todos os poços e a placa ficou protegida da luz por 10 minutos em repouso. A leitura ocorreu no espectrofotômetro à 595 nm.

3.5 FRAP (Poder de redução do íon ferro)

O teste FRAP identifica substâncias capazes de reduzir o Ferro, refletindo na sua capacidade antioxidante. As amostras utilizadas foram a Quercetina, PQTMs e as moléculas bioconjugadas.

A redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} foi detectada através da adição de 250 µL do reagente de FRAP (10 vol. Tampão Acetato + 1 vol. TPTZ + 1 vol. De Fe^{3+}) em 10 µL de cada amostra e 25 µL de água, onde o Fe^{2+} é quelado pela 2,4,6-tri (2 piridil)-s-triazida (TPTZ) resultando em um complexo Fe^{2+} -TPTZ de coloração azul intensa.

Foi utilizado o reagente Trolox, um análogo solúvel em água de vitamina E, para a realização da curva padrão. A reação foi realizada na microplaca, incubada por 6 minutos à 37°C e posteriormente foi feita a leitura à 593 nm no espectrofotômetro.

3.6 DPPH

Esse método se baseia na capacidade de uma amostra antioxidante de reduzir o radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) em hidrazina através da habilidade de doar átomos de Hidrogênio, o estabilizando. O elétron desemparelhado do DPPH o confere uma cor violeta, e, quando é reduzido, sua coloração se torna amarelo pálido (ALVES e colab., 2010).

O DPPH deve ser diluído em metanol e preparado a uma concentração de 0,06 mM. O controle positivo utilizado foi o ácido ascórbico em 30 μ M e o controle negativo foi o veículo. As amostras utilizadas foram a Quercetina e os PQTMs, isolados e bioconjugados.

Em uma placa de 96 poços foram adicionados 75 μ L de amostra e 225 μ L de solução de DPPH e incubado por 30 minutos à 30 °C no escuro. Após esse tempo, foi medida a absorção das amostras em 517 nm no espectrofotômetro.

3.7 ORAC (Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio)

É um método de quantificação da capacidade antioxidante das amostras biológicas através do decaimento da fluorescência devido à presença de radicais peroxila, gerados através da presença do dicloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (APPH), resultando na oxidação da fluoresceína.

Para a realização deste teste foi utilizado o APPH (153 mM em tampão fosfato) como gerador de radical peroxila, a fluoresceína ($8,5 \times 10^{-5}$ mM em tampão fosfato) foi utilizada como uma sonda fluorescente e a curva padrão foi construída utilizando Trolox (250; 125; 62,5; 31,25; 15,625 μ M).

As amostras utilizadas (Quercetina, PQTMs e Bioconjugado) foram preparadas na concentração de 1 e 0,1 mg/mL. Em cada poço foi utilizado 150 μ L da solução de fluoresceína, 50 μ L de Trolox ou da amostra a ser analisada. No branco, utilizou-se 150 μ L da solução de fluoresceína e 25 μ L de tampão fosfato e seu valor deve ser descontado do valor da leitura de todas as amostras.

Acrescentou-se 30 μ L da solução Azobis (153 mM) e logo em seguida, foi feita a leitura em espectrofluorímetro com excitação a 485 nm e emissão a 528 nm a temperatura de 37°C durante 90 minutos (leituras a cada 1m30s).

O decaimento da fluorescência foi quantificado através do cálculo da área sobre a curva e o resultado expresso em μmol de equivalentes de Trolox g^{-1} .

3.8 Espécies Reativas em Macrófagos

Essa técnica permitiu investigar a produção de ROS em macrófagos através da emissão de luminescência em tempo real devido à oxidação do Luminol causada por espécies reativas.

O Zymosan, um polissacarídeo derivado da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, foi utilizado nesse teste como indutor de ROS, uma vez que ele é capaz de causar uma resposta inflamatória em macrófagos através de receptores Toll-like (TLR). Quando fagocitado gera uma longa resposta inflamatória (TAGHAVI e colab., 2016).

Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57 BL/6 foram pré-tratados com diferentes concentrações (0,1; 1 ;10 μg) de Quercetina e PQTMs isolados e bioconjugados. O cálculo de células por poço foi de $0,1 \times 10^6$ células. Foi utilizada uma placa de 96 poços para o ensaio, onde cada poço conteve um volume final de 200 μL .

As células foram tratadas com o Zymosan e as amostras 4 horas antes da realização do experimento. O luminol foi adicionado na hora e os resultados foram lidos no fluorímetro.

3.9 Avaliação da atividade antimicrobiana da Quercetina isolada e bioconjugada com o MSPQs

Concentração inibitória mínima (CIM) é a menor concentração necessária de um antimicrobiano para inibir o crescimento do microorganismo. Quanto menor o CIM, maior a potência do composto e menor chance da bactéria desenvolver resistência.

As bactérias utilizadas para determinação da atividade antimicrobiana dos compostos foram *Escherichia coli* (ATCC BAA198), *Staphylococcus aureus* (ATCC BAA44) e *Enterococcus faecium* (ATCC 700221) e suas cepas clínicas multi-resistentes foram isoladas do Hospital de Clínicas de Ribeirão Preto, São Paulo.

A CIM foi realizada através do método de microdiluição em caldo em uma placa de 96 poços, em triplicata (ABRÃO e colab., 2015). As amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) seguidas de diluição em caldo Mueller-Hinton. As concentrações testadas variaram de 0,98 a 2000 $\mu\text{g/mL}$.

O inóculo foi ajustado a 5×10^5 unidades de formadoras de colônia (CFU) por mL, de acordo com o Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI, 2012). O DMSO foi utilizado como controle negativo e a Tetraciclina como controle da técnica. Um poço com meio e inóculo foi adicionado para verificar se o crescimento da bactéria está adequado e outro apenas com meio para verificar a esterilidade do mesmo.

Depois de adicionar os componentes, as microplacas foram incubadas na estufa à 37°C durante 24 horas. Após a incubação, foi adicionado 30 µL da solução de Resazurina (0,02%) para observar o crescimento bacteriano. A cor azul indica inibição do crescimento e a cor vermelha mostra que há atividade celular ativa (SARKER e colab., 2007).

3.10 Análise estatística

Todas as análises estatísticas e formulação dos gráficos foram realizados com o uso do software GraphPad Prism versão 7.0. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média e a análise da variância foi realizado pelo teste One-Way ANOVA com pós teste de Tukey para comparações múltiplas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese e caracterização física dos Pontos Quânticos de Tamanhos Mágicos (PQTM)s

Os PQTM)s foram cedidos pela Prof^a. Dr^a Anielle Christine do Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores (LNMIS), sob sua orientação, localizado no Instituto de Física da Universidade Federal de Uberlândia.

Os PQTM)s possuem 0,5 mmol de Selênio em sua síntese e são funcionalizados com grupamentos carboxílicos em suas extremidades a fim de possibilitar a bioconjugação com o flavonoide Quercetina.

4.2 Verificação da Bioconjugação dos Pontos Quânticos de Tamanhos Mágicos (PQTM)s com a Quercetina através de análises de FT-IR e AFM

As moléculas bioconjugadas precipitadas, após secagem natural, resultaram em um pó, que foi submetido à análise de FT-IR para verificar a formação de ligação entre os grupos

carboxílicos dos PQTMs e as hidroxilas da Quercetina e imagens de AFM a fim de reforçar a bioconjugação.

A Figura 2 mostra as regiões onde cada grupamento orgânico absorve no espectro infravermelho, visto que cada grupo químico possui uma vibração específica resultando em uma banda com forma, posição e intensidade característica (AERON e colab., 2009).

A função álcool, que se caracteriza pela presença da hidroxila, apresenta banda entre 3200 a 3700 cm^{-1} . Já a ligação C = O e O – H dos grupamentos carboxílicos tem bandas nas regiões 1600 – 1800 cm^{-1} e 3000 cm^{-1} respectivamente. As bandas em torno de 1730 e 1640 cm^{-1} indicam ligações éster e amida, respectivamente. (PASANPHAN e CHIRACHANCHAI, 2008)

Os espectros de FT-IR mostrados na Figura 2 mostram a Quercetina e os PQTMs isolados e bioconjugados. A presença da banda em 3100-3500 cm^{-1} nos espectros da Quercetina, demonstram a presença de grupamentos –OH, muito presentes na parte externa da molécula, porém esse pico é quase ausente nas moléculas bioconjugadas, mostrando que esses grupamentos não estão mais disponíveis ou livres, ou seja, sofreram algum tipo de ligação.

A banda em torno de 1630-1820 cm^{-1} que mostra a presença de C = O em ácidos carboxílicos é presente nos PQTMs, pois são funcionalizados com esses grupamentos, entretanto é ausente nas moléculas bioconjugadas (CHART e colab., 2004). O pico de hidroxila dos PQTMs podem representar a ligação O – H do ácido carboxílico, ou indícios de água, visto que ele é uma solução aquosa de PQTMs.

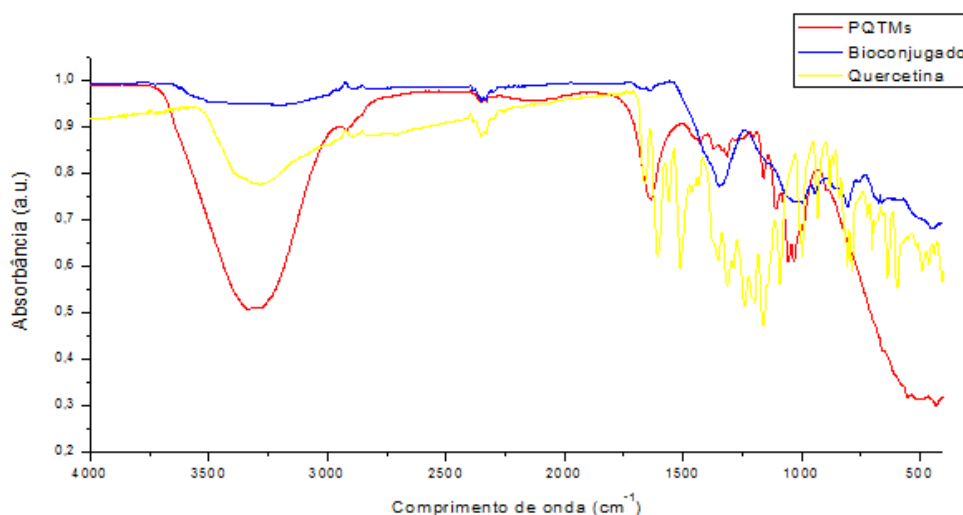


Figura 2 – Espectro FTIR da Quercetina (amarelo), PQTMs (vermelho) e moléculas bioconjugadas (azul).

A bioconjugação entre a Quercetina e o PQTM é possível através de reações de esterificação ou pela formação de uma ligação amida (PASANPHAN e CHIRACHANCHAI, 2008).

Nos espectros de FTIR não foi identificado um pico significativo referente à grupos amida ou éster. Contudo, a ausência dos picos de ácido carboxílico e hidroxila no espectro das moléculas bioconjugadas, sugere que existe sim uma ligação ou interação entre esses grupamentos.

As técnicas de bioconjugação que utilizam EDC geralmente também utilizam o NHS, a fim de impedir a formação de um intermediário instável, aumentar a solubilidade e o rendimento do processo (BLANCO-CANOSA e colab., 2014).

QDs encapsulados com sílica possuem grupos hidroxila em sua superfície, e, através do uso do EDC, é possível formar ligações éster entre as hidroxilas da superfície do QD com grupamentos carboxílicos de biomoléculas (SINGH e colab., 2015).

A bioconjugação do ácido gálico à quitosana foi possível através da presença do EDC e NHS, iniciando espécies reativas de éster para realização de uma reação nucleofílica (PASANPHAN e CHIRACHANCHAI, 2008).

As imagens adquiridas da AFM (Figuras 3, 4 e 5) auxiliaram ainda mais na visualização e análise das moléculas bioconjugadas. Essa técnica nos permitiu ver que existem moléculas de PQTMs e Quercetina ligadas.

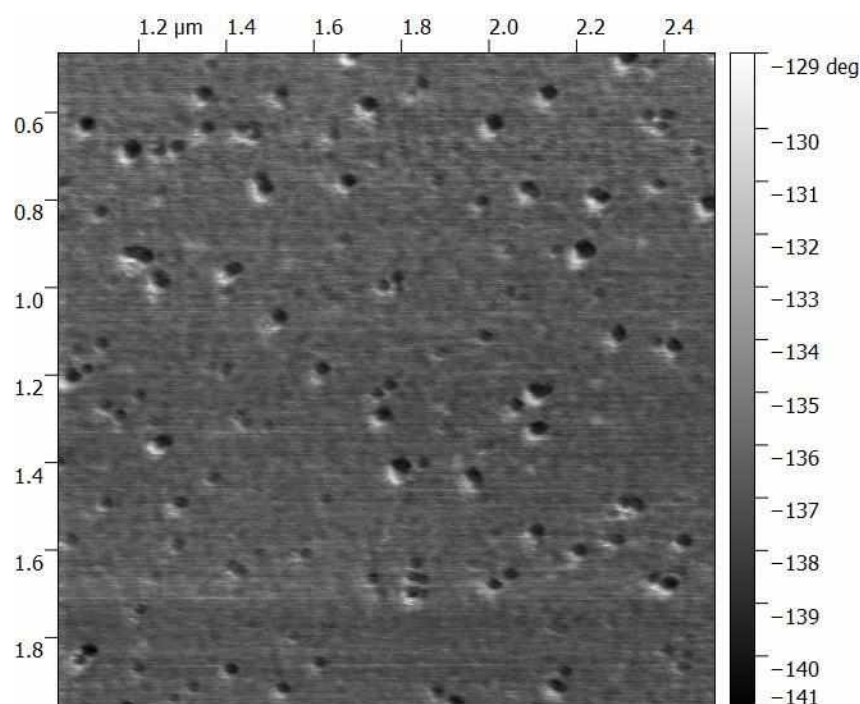


Figura 3 – Imagem gerada através da técnica de AFM da Quercetina.

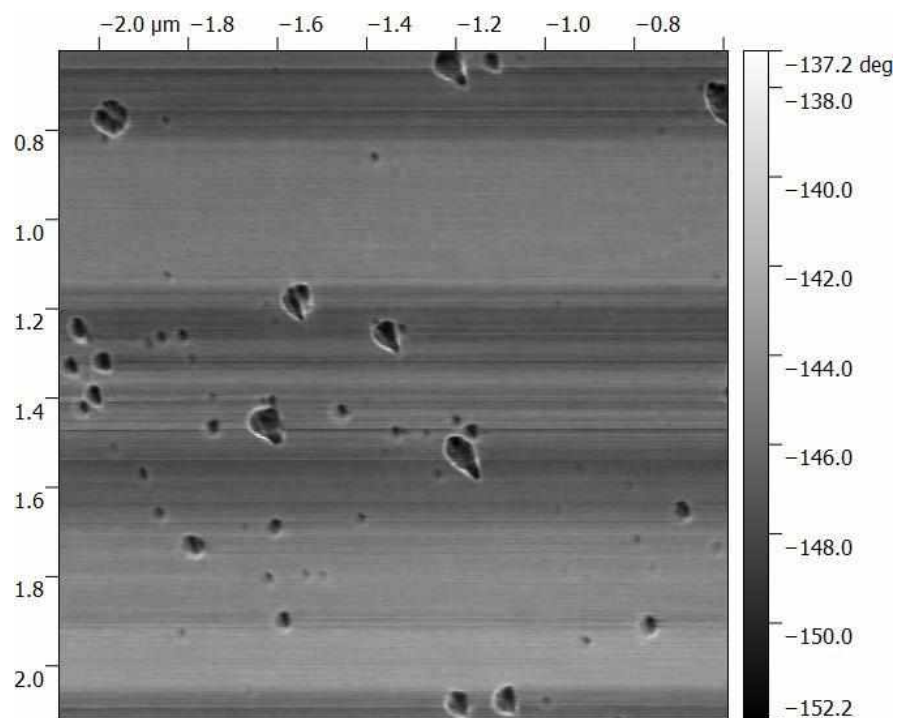


Figura 4 – Imagem gerada através da técnica de AFM dos PQTMs.

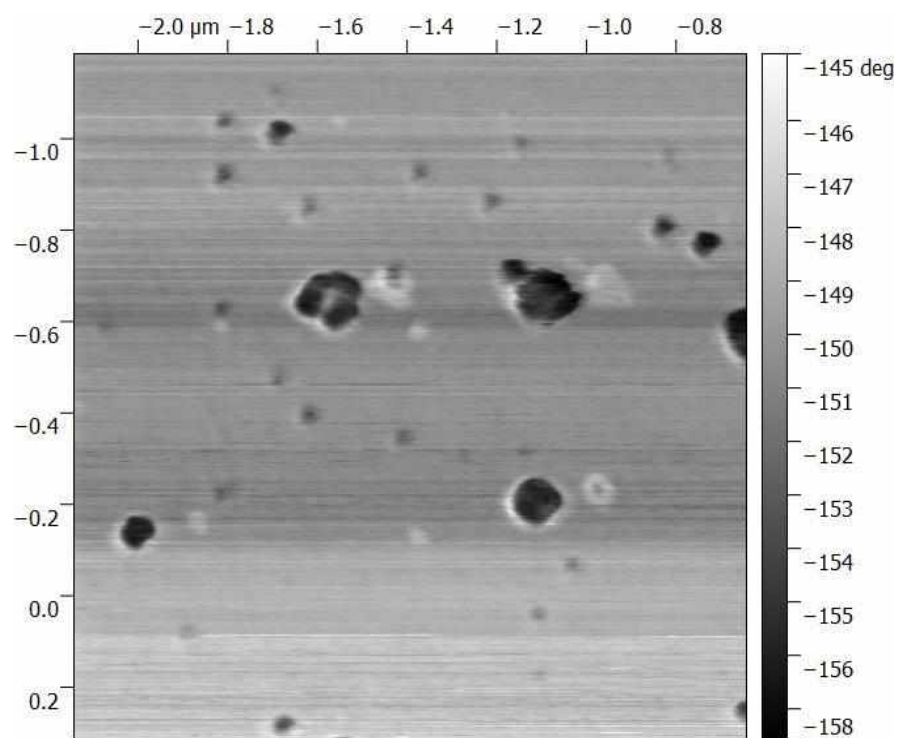


Figura 5 – Imagem gerada através da técnica de AFM das moléculas bioconjugadas.

4.3 Avaliação da atividade antioxidante da Quercetina isolada e bioconjugada com o MSPQs através de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica foi quantificada através da metodologia TBARS e expressa em nmol de MDA/ mg de proteínas. O MDA é um aldeído resultante da peroxidação lipídica e é um marcador de estresse oxidativo. Na presença de TBA ocorre a formação de um composto dimérico de cor rosa lido no fluorímetro com excitação a 515 nm e emissão a 553 nm. (GHANI e colab., 2017).

O processo de lipoperoxidação se dá através da abstração de um Hidrogênio de ácidos graxos poli-insaturados resultando em radicais livres, que por sua vez, são oxidados por oxigênio molecular, formando os radicais peroxil. Esses radicais, então, dão prosseguimento à peroxidação lipídica, fazendo dela um evento em cadeia. A presença de íons metálicos catalisa essa reação (YOUNG e MCENENY, 2001).

O controle do teste foi realizado com quatro diferentes situações: 1ª) Apenas o homogeneizado; 2ª) Homogeneizado + ácido ascórbico (antioxidante controle); 3ª) Homogeneizado + Ferro (indutor de peroxidação lipídica); 4ª) Homogeneizado + Ascorbil (indutor de peroxidação lipídica).

Na Figura 6 é possível ver os valores expressos em nmol de MDA/mg proteína dos controles. Os tubos controle com ácido ascórbico obtiveram menores níveis de MDA, visto que o ácido ascórbico é uma molécula antioxidante e neutraliza EROs e inibe a peroxidação lipídica (SHALATA e NEUMANN, 2001).

As amostras que continham apenas Ferro e a combinação do Ácido Ascórbico + Ferro formando o radical Ascorbil obtiveram maiores níveis de MDA formado. A reação de íons de Ferro com peróxido de hidrogênio (reação de Fenton) resulta em uma oxidação de Ferro e no radical hidroxil, uma espécie reativa de Oxigênio, causando peroxidação lipídica da membrana celular, e seus subprodutos resultam em danos em proteínas e DNA (PIETRANGELO, 2016).

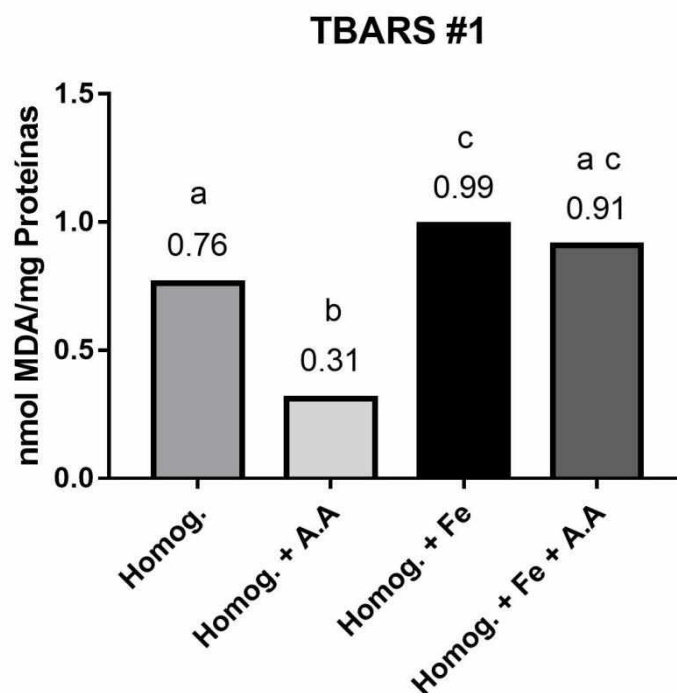


Figura 6 – Histograma comparativo das amostras controle no teste de TBARS. Letras iguais correspondem às amostras que não apresentaram significância entre si. A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$). Abreviações: Homog (Homogeneizado); AA (Ácido Ascórbico); Fe (Ferro).

Na figura 7, foi comparado o valor do Homogeneizado sem tratamento em relação ao valor do Homogeneizado tratado com a Quercetina, PQTMs e moléculas bioconjugadas. A única amostra que não inibiu a peroxidação lipídica foi o Bioconjugado a 1 mg/mL, pois ele não teve significância em relação ao controle.

A Quercetina foi a amostra que mais apresentou atividade antioxidante e inibidora da peroxidação lipídica, pois mesmo o controle não possuindo indutores de lipoperoxidação, os reagentes e a alta temperatura que submetemos as amostras pode causar danos na membrana.

Já o Bioconjugado 3 mg/mL, PQTMs 1 e 3 mg/mL apresentaram também capacidade inibidora de lipoperoxidação. A atividade do Bioconjugado é devido à presença da Quercetina, que, embora seus grupamentos hidroxila estejam ocupados com os PQTMs, não se tem absoluta certeza de que todas regiões estão realmente ligadas, conferindo às moléculas bioconjugadas de maior concentração, uma certa atividade antioxidante.

Os PQTMs não mostraram diferença significativa entre as concentrações de 1 e 3 mg/mL, porém, em relação ao controle, conseguiram diminuir o MDA formado. Esse fato se dá devido

à presença de Selênio em sua superfície, um elemento capaz de inibir o estresse oxidativo causado por íons Cádmio (GARCIA-SEVILLANO, 2014).

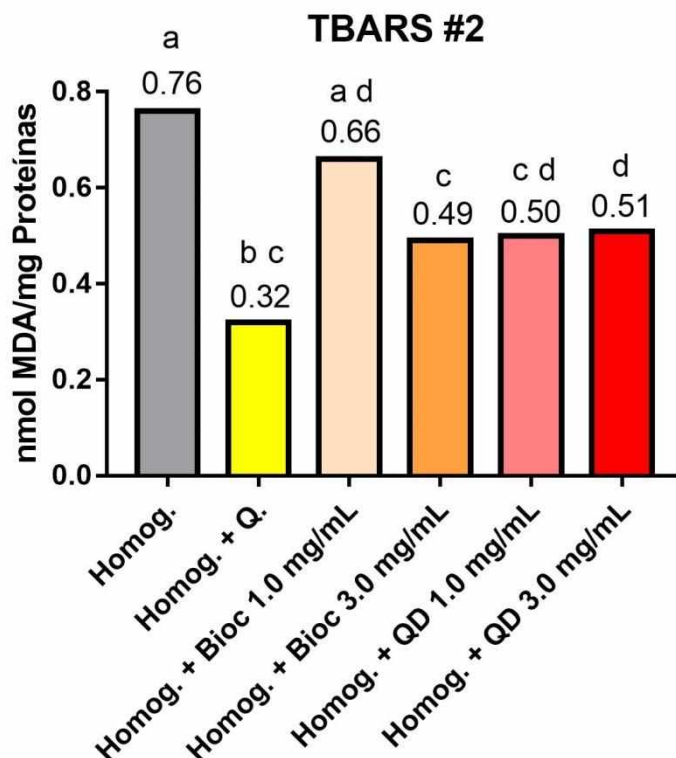


Figura 7 – Histograma comparativo das amostras em relação ao Homogeneizado no teste de TBARS. Letras iguais correspondem às amostras que não apresentaram significância entre si. A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$). Abreviações: Homog (Homogeneizado); AA (Ácido Ascórbico); Fe (Ferro); Q (Quercetina); Bioc 1.0 mg/mL (Bioconjugado 1.0 mg/mL); Bioc 3.0 mg/mL (Bioconjugado 3.0 mg/mL); QD 1.0 mg/mL (Pontos Quânticos de Tamanhos Mágicos 1.0 mg/mL); QD 3.0 mg/mL (Pontos Quânticos de Tamanhos Mágicos 3.0 mg/mL).

O homogeneizado na presença de Ácido Ascórbico teve diminuição significativa de níveis de MDA formados em relação ao homogeneizado sem tratamento (Figura 7). É notável uma potencialização na inibição da peroxidação lipídica quando o homogeneizado é tratado com Ácido Ascórbico associado a Quercetina.

A presença do Ácido Ascórbico nas amostras que continham moléculas bioconjugadas de 3.0 mg/mL e os PQTMs a 1.0 mg/mL não apresentou valores diferentes em relação às mesmas amostras apenas com o homogeneizado (Figura 7), mostrando que o antioxidante controle não promoveu atividade inibidora da lipoperoxidação significativa nesses dois casos.

Já nas amostras que continham as moléculas bioconjugadas a 1 mg/mL e PQTMs a 3 mg/mL, o Ácido Ascórbico conseguiu diminuir os níveis de MDA em relação às amostras sem o antioxidante controle (Figura 7).

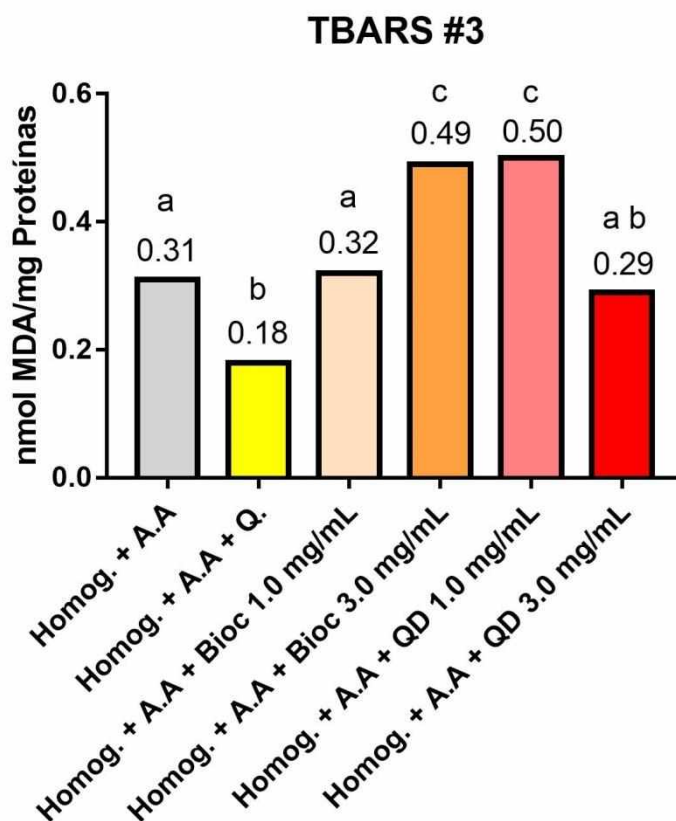


Figura 8 – Histograma comparativo das amostras em relação ao controle do Ácido Ascórbico no teste de TBARS. Letras iguais correspondem às amostras que não apresentaram significância entre si. A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$). Abreviações: Homog (Homogeneizado); AA (Ácido Ascórbico); Fe (Ferro); Q (Quercetina); Bioc 1.0 mg/mL (Bioconjugado 1.0 mg/mL); Bioc 3.0 mg/mL (Bioconjugado 3.0 mg/mL); QD 1.0 mg/mL (Pontos Quânticos de Tamanhos Mágicos 1.0 mg/mL); QD 3.0 mg/mL (Pontos Quânticos de Tamanhos Mágicos 3.0 mg/mL).

Na presença de íons metálicos, a lipoperoxidação é aumentada, como mostra a Figura 9. A Quercetina foi a única amostra a apresentar inibição da peroxidação lipídica na presença do Ferro, apresentando um valor significativo em relação ao controle (Figura 7). As outras amostras não foram significantes em relação ao controle.

Uma das propriedades antioxidantes da Quercetina é quelar íons de Ferro. Os grupos hidroxila do anel B e entre a carbonila no carbono 4 do anel C e hidroxila do carbono 5 no anel A, são as regiões que mais se relacionam com essa atividade. Complexos insolúveis são

formados e o metal em questão perde sua atividade (FIRUZI e colab., 2005; OBOH e ADEMOSUN, 2015).

As moléculas bioconjugadas não demonstraram atividade quando na presença de Ferro, pois as regiões do flavonoide responsáveis por quelar íons metálicos está ocupada com a ligação aos PQTMs. Com isso, as moléculas bioconjugadas perdem a atividade quelante da Quercetina presente (LESJAK e colab., 2018).

Os PQTMs também não foram eficientes em inibir a peroxidação lipídica induzida por Ferro. Na literatura, não há referências que mostram que PQTMs de CdSe tem atividade quelante ou redutora de íons metálicos.

Um estudo que reportou a síntese de Quantum Dots com cisteína, mostrou que esse QD apresentou atividade quelante e redutora de íons de Ferro, porém, esse efeito é resultado da presença desse aminoácido na superfície do QD, visto que ele auxilia na defesa antioxidante do nosso organismo (DUNPALL e colab., 2012).

A Figura 10 mostra os resultados das amostras frente à peroxidação lipídica induzida pelo Ascorbil, formado através da reação com Ácido Ascórbico e o Ferro. Apenas a Quercetina inibiu essa lipoperoxidação. As moléculas bioconjugadas a 3 mg/mL e o QD à 1 mg/mL não mostraram valores significativos em relação ao controle, portanto, não foram eficientes contra a peroxidação lipídica causada pelo Ascorbil.

As moléculas bioconjugadas a 1 mg/mL tiveram maiores níveis de MDA formados em relação controle Ascorbil. Já os QDs a 3 mg/mL, tiveram uma leve diminuição nos níveis de MDA formados em relação ao controle.

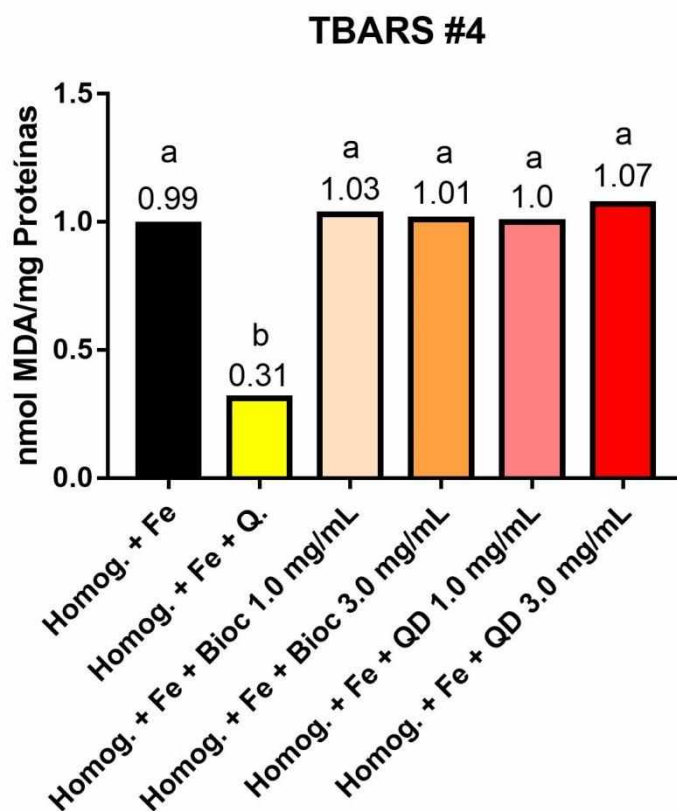


Figura 9 – Histograma comparativo das amostras em relação ao controle do Ferro no teste de TBARS. Letras iguais correspondem às amostras que não apresentaram significância entre si. A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$). Abreviações: Homog (Homogeneizado); AA (Ácido Ascórbico); Fe (Ferro); Q (Quercetina); Bioc 1.0 mg/mL (Bioconjugado 1.0 mg/mL); Bioc 3.0 mg/mL (Bioconjugado 3.0 mg/mL); QD 1.0 mg/mL (Pontos Quânticos de Tamanhos Mágicos 1.0 mg/mL); QD 3.0 mg/mL (Pontos Quânticos de Tamanhos Mágicos 3.0 mg/mL).

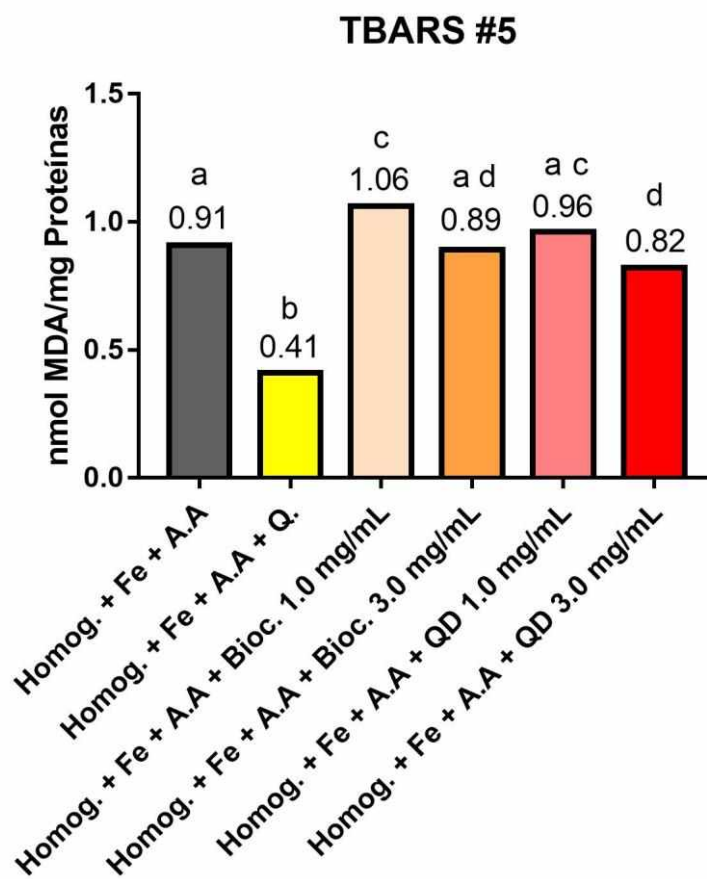


Figura 10 – Histograma comparativo das amostras em relação ao controle do Ascorbil (Ácido Ascórbico + Ferro) no teste de TBARS. Letras iguais correspondem às amostras que não apresentaram significância entre si. A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$). Abreviações: Homog (Homogeneizado); AA (Ácido Ascórbico); Fe (Ferro); Q (Quercetina); Bioc 1.0 mg/mL (Bioconjugado 1.0 mg/mL); Bioc 3.0 mg/mL (Bioconjugado 3.0 mg/mL); QD 1.0 mg/mL (Pontos Quânticos de Tamanhos Mágicos 1.0 mg/mL); QD 3.0 mg/mL (Pontos Quânticos de Tamanhos Mágicos 3.0 mg/mL).

No teste de TBARS, foi comprovada que a Quercetina tem capacidade de inibir a peroxidação lipídica e consequentemente inibir a formação de MDA. Esse flavonoide possui intensa atividade antioxidante devido à sua capacidade de sequestrar radicais livres, como o íon superóxido (O_2^-), quelar íons metálicos e inibir a peroxidação lipídica (BEHLING e SENDÃO, 2004; KANIMOZHI e colab., 2016).

Um estudo mostrou que a suplementação com a Quercetina diminuiu efetivamente os níveis de MDA produzidos após a indução de peroxidação lipídica (AL-AYED, 2018; KANIMOZHI e colab., 2016).

O estresse oxidativo causado pelos PQs é consequência da interação dos íons de Cádmio adsorvidos em sua superfície com moléculas de Oxigênio intracelular, causando danos na

membrana, mitocôndria, divisão celular, geração de radicais livres, peroxidação lipídica, entre outros. (SILVA, 2014).

De acordo com Mahendra et al (2008), os QDs são estáveis à pH neutro, porém em meios ácidos ou alcalinos exercem sua toxicidade através da liberação de íons de Cádmio. As propriedades físico-químicas dos QDs, como composição química, concentração, revestimento químico, tamanho ou carga da superfície também devem ser levados em consideração (MAHENDRA e ZHU, 2008; NEMERY e HOET, 2008).

A funcionalização dos QDs é uma prática amplamente utilizada para melhorar sua solubilidade em água e evitar a liberação de íons tóxicos. Entretanto, os PQTMs utilizados nessa pesquisa são funcionalizados com grupamentos carboxílicos, que apresentam alta taxa de citotoxicidade em relação à outros grupamentos (HOSHINO e colab., 2004; RYMAN-RASMUSSEN e colab., 2007).

De acordo com Tarrahi et al (2019), Quantum Dots de CdSe induziram peroxidação lipídica na planta aquática *Lemna minor*. Foi mostrado que os níveis de MDA aumentavam de acordo com a dose e o tempo aplicados (TARRAHI e colab., 2019). Outro estudo recente mostrou que Quantum Dots de CdTe aumentaram significativamente os níveis de MDA no fígado e rins de ratos (MENG, 2017).

Já os PQTMs não exerceram peroxidação lipídica por si só. Isso se deve pelo fato de que ele possui uma concentração de 0.5 mmol de Selênio em sua rota de síntese, diminuindo o Cádmio adsorvido e a liberação desses íons e consequentemente, não induzindo o estresse oxidativo (SILVA, 2014). Entretanto, ele também não apresentou alta capacidade antioxidante. Isso mostra que a modificação em sua superfície inibiu a indução da peroxidação lipídica.

As moléculas bioconjugadas não apresentaram atividade antioxidante frente aos agentes indutores de peroxidação lipídica. Como já discutido, o flavonoide presente no bioconjugado teve suas regiões responsáveis pela sua atividade antioxidante bloqueadas com a ligação aos PQTMs, fazendo com que essas moléculas não apresentassem a mesma potente atividade do flavonoide isolado (LESJAK e colab., 2018). Porém, em sua maior concentração testada, foi capaz de inibir a peroxidação lipídica apenas em relação ao homogeneizado sem tratamento.

A estimativa da quantidade de proteína no homogeneizado é importante para os cálculos para correção dos valores.

4.4 FRAP

O FRAP é um ensaio que avalia o potencial antioxidante de uma molécula através do seu poder de redução de íons de Fe^{3+} para Fe^{2+} , o qual forma um complexo com o TPTZ, resultando em uma coloração azul intensa, lido no espectrofotômetro à 593nm (GONZÁLEZ-MANZANO e colab., 2010).

A figura 11 mostra a capacidade de cada amostra de reduzir os íons de Ferro. A quercetina se mostrou altamente antioxidante nesse ensaio (506,15 $\mu\text{mol Trolox eq/g}$). Os PQTMs (1mg/mL: 0 $\mu\text{mol Trolox eq/g}$; 3mg/mL: 3,34 $\mu\text{mol Trolox eq/g}$) e as moléculas bioconjugadas (1mg/mL: 0 $\mu\text{mol Trolox eq/g}$; 3mg/mL: 9,77 $\mu\text{mol Trolox eq/g}$) não apresentaram capacidade de reduzir íons de Ferro.

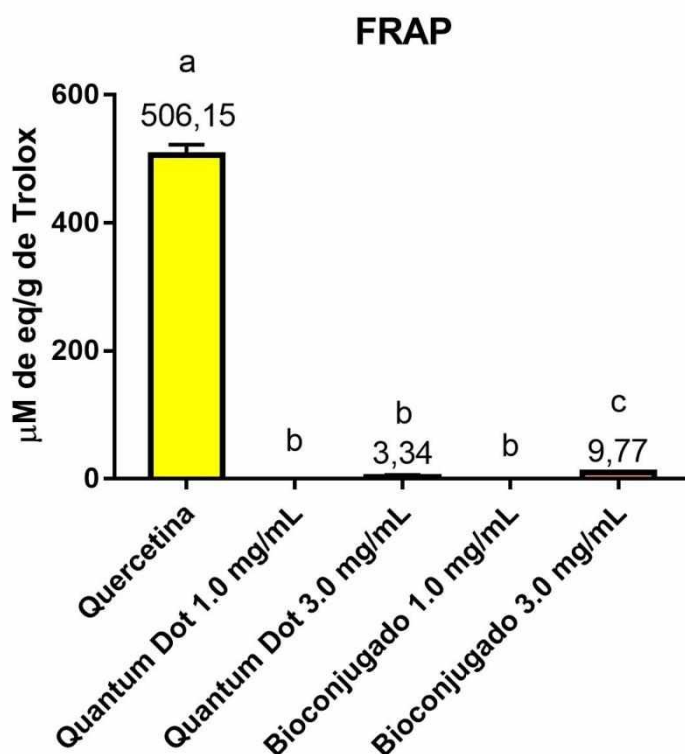


Figura 11 – Análise da capacidade antioxidante da Quercetina (1mg/mL), PQTMs (1 e 3 mg/mL) e moléculas bioconjugadas (1 e 3 mg/mL) pelo método de FRAP expressados em $\mu\text{mol Trolox eq/g}$. Letras iguais correspondem às amostras que não apresentaram significância entre si. A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$).

A quercetina, um flavonoide com alto potencial antioxidante, tem a capacidade de quelar e reduzir íons metálicos, como o Ferro. A quantidade de grupos hidroxila $-\text{OH}$ na molécula dos

compostos fenólicos reflete na sua atividade antioxidante, sendo que esse flavonoide possui 5 desses grupamentos em sua superfície (SURCO-LAOS e colab., 2011).

O grupo catecol no anel B, a presença de um grupo hidroxila no carbono 3, o grupo carbonila no carbono 4 do anel C e hidroxila no carbono 5 do anel A também mostraram ter relação com a sua capacidade redutora e quelante de Ferro, segundo um estudo que realizou o FRAP de diversos flavonoides (FIRUZI e colab., 2005; LESJAK e colab., 2018).

Já é conhecido o fato de que a região da quercetina mais relacionada com a propriedade de quelar íons metálicos está entre os grupamentos 3-hidroxil e 4-carbonila do anel C. Então, quando esses grupamentos estão livres, a atividade antioxidante do flavonoide é mais eficiente (LESJAK e colab., 2018).

Na bioconjugação, os grupamentos hidroxila da Quercetina se ligaram aos grupos carboxílicos que funcionalizam os PQTMs, fato mostrado através da técnica de FT-IR, revelando uma diminuição do pico referente aos grupamentos –OH e –COOH. Com isso, a atividade quelante e redutora desse flavonoide bioconjugado decai, visto que a região responsável pelo sequestro e redução de íons metálicos está ocupada (LESJAK e colab., 2018).

Embora tenha Selênio em sua superfície, um elemento que previne o estresse oxidativo induzido por íons de Cádmio, os PQTMs não apresentaram habilidade de reduzir íons de Ferro, uma vez que os íons de Selênio estão ligados com os de Cádmio (GARCIA-SEVILLANO, 2014).

Quantum Dots sintetizados com cisteína apresentaram atividade quelante e redutora de íons de Ferro, porém, esse efeito é resultado da presença desse aminoácido na superfície do QD, visto que ele auxilia na defesa antioxidante do nosso organismo (DUNPALL e colab., 2012).

4.5 DPPH

O DPPH é um radical livre estável que possui um elétron desemparelhado, responsável por sua coloração violeta, lido a 517 nm no espectrofotômetro. Uma amostra antioxidante que atua como doador de prótons, como átomos de Hidrogênio ou elétrons a esse radical, o estabiliza, formando a Hidrazina, uma molécula de coloração amarelo claro (ALVES e colab., 2010; LIU, 2010).

A atividade antioxidante das amostras foi medida em porcentagem (%), de acordo com a figura 12. O controle positivo do ensaio foi o ácido ascórbico a 30 μ M (93,59% de capacidade de sequestro do DPPH) e o controle negativo foi o metanol (1,9%). A quercetina foi testada a 1mg/mL e mostrou alta capacidade antioxidante (85,33%) ao conseguir estabilizar o radical DPPH.

Já os PQTMs e as moléculas bioconjugadas foram testados ambos a 1mg/mL e 3mg/mL. Os PQTMs não apresentaram capacidade de sequestrar o radical DPPH. As moléculas bioconjugadas tiveram 13,54% e 24,92% capacidade de sequestro do radical, sendo esses valores de menor para maior concentração respectivamente.

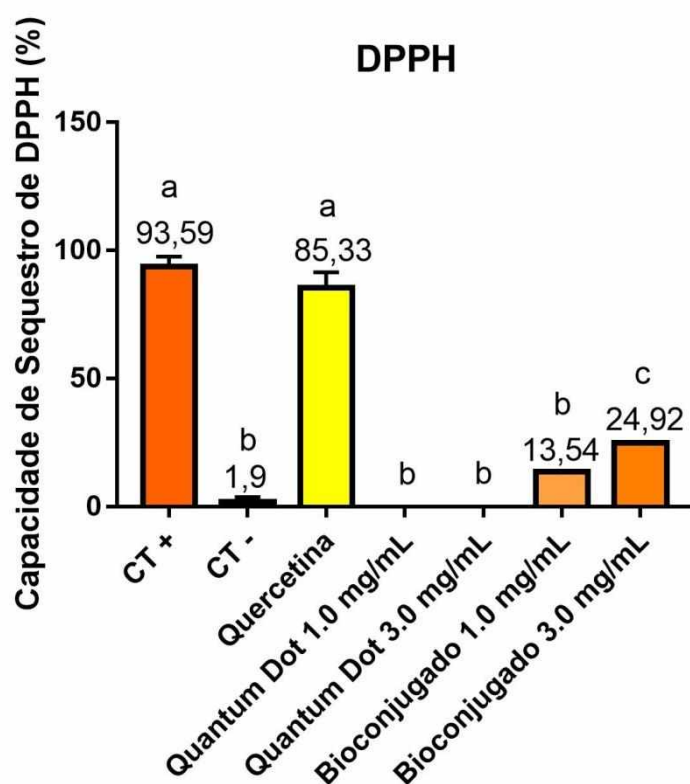


Figura 12 – Análise da capacidade antioxidante em porcentagem da Quercetina (1mg/mL), PQTMs (1 e 3 mg/mL) e moléculas bioconjugadas (1 e 3 mg/mL) pelo método DPPH. Letras iguais correspondem às amostras que não apresentaram significância entre si. A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$).

A quercetina é destaque devido a sua atividade de sequestro de radicais. Sua capacidade do sequestro de DPPH tem relação com seus grupos hidroxila de sua superfície, que estão envolvidos na transferência de átomos de Hidrogênio para a estabilização do radical (BUKHARI e colab., 2009; LESJAK e colab., 2018).

Assim como no FRAP, as moléculas bioconjugadas apresentaram diminuição significativa de sua atividade antioxidante em relação à Quercetina. Isso se explica devido ao fato de a maioria dos grupamentos hidroxila do flavonoide estarem ocupados ligados aos PQTMs, impedindo com que o mesmo exerça sua função, já que essas regiões não estão mais disponíveis para o sequestro do radical DPPH (LESJAK e colab., 2018).

Os PQTMs isolados não apresentaram atividade antioxidante em relação ao sequestro de DPPH. Em sua superfície, existem os elementos Selênio e Cádmio, e provavelmente não são capazes de doar elétrons ou prótons para estabilização do DPPH.

4.6 ORAC

A Figura 13 mostra os resultados obtidos no ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) e avaliou a atividade das amostras em μmol equivalentes/g de Trolox. O APPH reage com o Oxigênio do meio, resultando em radicais peroxil que reagem com as moléculas fluorescentes, formando um produto não fluorescente. Portanto a atividade antioxidante é avaliada através da inibição da oxidação causada por radicais peroxil por meio de doação de átomos de Hidrogênio (ALVES e colab., 2010).

A quercetina tem a capacidade de inibir o estresse oxidativo de várias maneiras, como o sequestro de EROs ou de íons metálicos causadores do estresse oxidativo, inibindo enzimas que estão envolvidas com a geração de espécies reativas ou estimulando as que tem a função de sequestrar essas espécies (ATALA e colab., 2017).

As regiões que mais se relacionam com a atividade antioxidante da quercetina são os grupos hidroxila dos carbonos 3 e 4 do anel B, outro grupo hidroxila no carbono 3 do anel C e um grupo carbonila no carbono 4 também no anel C (ATALA e colab., 2017; LESJAK e colab., 2018).

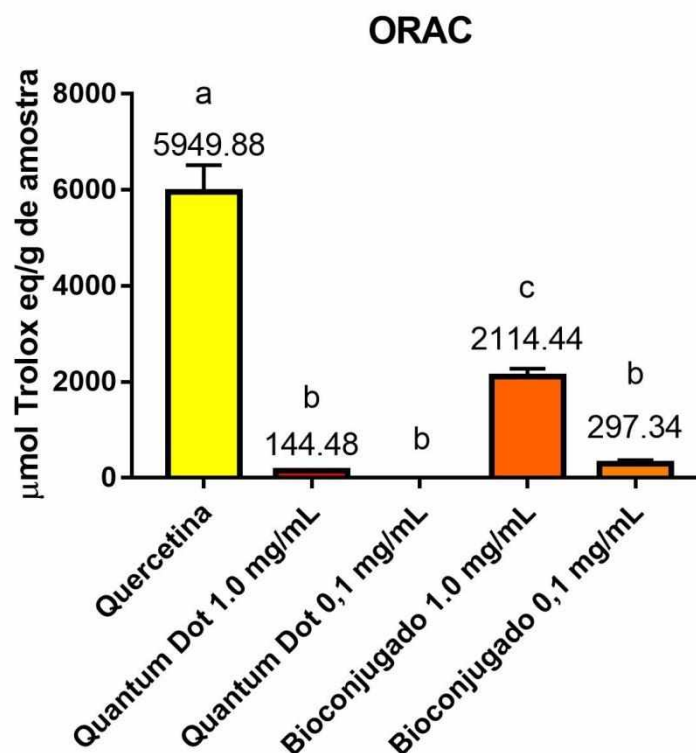


Figura 13 – Análise da capacidade antioxidante da Quercetina (0,1mg/mL), PQTMs (1 e 0,1 mg/mL) e moléculas bioconjugadas (1 e 0,1 mg/mL) pelo método ORAC. Letras iguais correspondem às amostras que não apresentaram significância entre si. A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$).

A Quercetina mostrou seu efeito protetor através da sua capacidade de inibir a oxidação da fluoresceína pela ação de radicais peroxil. Sua habilidade de sequestro desse tipo de radical está relacionada com o grupo catecol do anel B e grupamentos hidroxila e a estabilização do radical de baseia na transferência de átomos de Hidrogênio (AMORATI e colab., 2017; BEHLING e SENDÃO, 2004; LESJAK e colab., 2018).

Assim como nos testes antioxidantes anteriores, os PQTMs não demonstraram atividade antioxidante, e no ORAC, não foram capazes de sequestrar radicais peroxil. Já em relação às moléculas bioconjugadas, é notável uma atividade significativamente inferior à Quercetina, porém, significativamente superior aos PQTMs.

Como já explicado anteriormente, as moléculas de Quercetina presentes no bioconjugado tiveram sua estrutura alterada. A estabilização do radical peroxil se dá através da transferência de um átomo de Hidrogênio provindo dos grupamentos hidroxila da Quercetina, porém, esses grupos não se encontram mais disponíveis devido à metodologia de bioconjugação, portanto,

sua atividade antioxidante perante o sequestro desse radical é reduzida (LESJAK e colab., 2018).

Mesmo com a capacidade de sequestro de radicais peroxil reduzida, um valor 2114,44 $\mu\text{mol eq/g}$ de Trolox no ensaio ORAC é um valor significativamente alto e demonstra sim uma atividade antioxidante. As moléculas bioconjugadas também mostraram uma leve capacidade de sequestro de DPPH, e para estabilizar esse radical, o flavonoide pode doar tanto átomos de Hidrogênio quanto elétrons. No ORAC, a estabilização do radical se dá pela transferência de átomos de Hidrogênio. No FRAP, as moléculas bioconjugadas não reduziram o Ferro, e é necessária a doação de um elétron para tal atividade (LIU, 2010).

O que os resultados sugerem, é que possivelmente as moléculas bioconjugadas possuem capacidade de doação de um átomo de Hidrogênio e não de um elétron. Esse Hidrogênio provavelmente provém de grupamentos que não foram ligados aos PQTMs, visto que não temos garantia de que absolutamente todos os grupamentos sofreram ligação.

4.7 Espécies Reativas em Macrófagos

No teste de espécies reativas em macrófagos, a indução de EROs através da resposta inflamatória induzida pelo Zymosan é controlada na presença da Quercetina de concentração 0,1 $\mu\text{g/mL}$. Nas concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$, sua atividade diminui, até que, na maior concentração, o flavonoide não exerce sua função, mostrando que sua atividade depende da sua concentração, mostrado na figura 14.

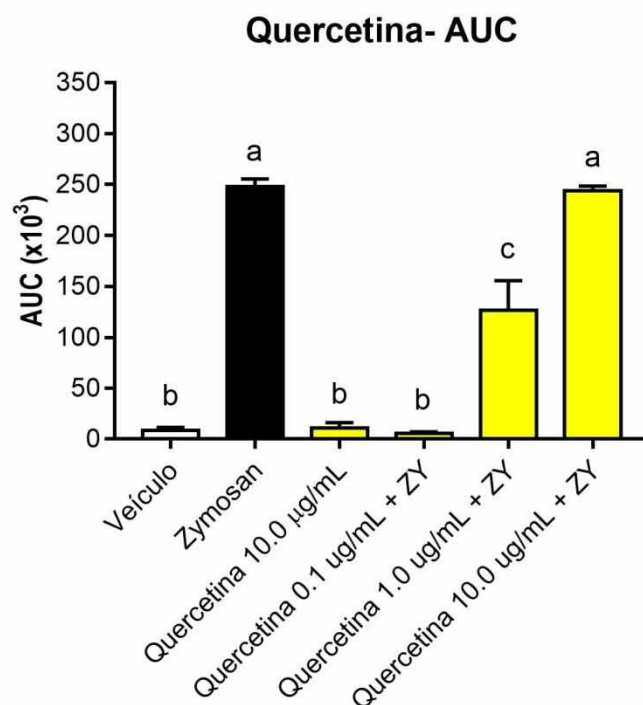


Figura 14 – Histograma comparativo entre as amostras de Quercetina isolada ou em conjunto com o Zymosan. Letras iguais correspondem às amostras que não apresentaram significância entre si. A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$).

A Quercetina é um flavonoide com alto potencial antioxidante. Ela protege a célula inibindo a formação ou sequestrando as EROs ou até mesmo inibindo enzimas responsáveis pela formação das mesmas. Durante a estabilização dessas espécies, o flavonoide atua transferindo átomos de Hidrogênio ou (AL-AYED, 2018; ATALA e colab., 2017).

Sadabady et al (2016) mostrou que a Quercetina conseguiu inibir quase totalmente o estresse oxidativo causado pelo hidroperóxido de cumeno (CHP), um composto tóxico à células MCF-7, no ensaio de viabilidade celular, MTT, aumentando o número de células viáveis, sendo que a Quercetina tem a habilidade de reagir com EROs, impedindo com que elas causem danos às células (REZAEI-SADABADY e colab., 2016).

A figura 15 mostra que os PQTMs não induziram EROs quando sozinhos na célula, porém, na presença do Zymosan, ele também não demonstra nenhum efeito antioxidante, assim como todos os testes anteriormente realizados.

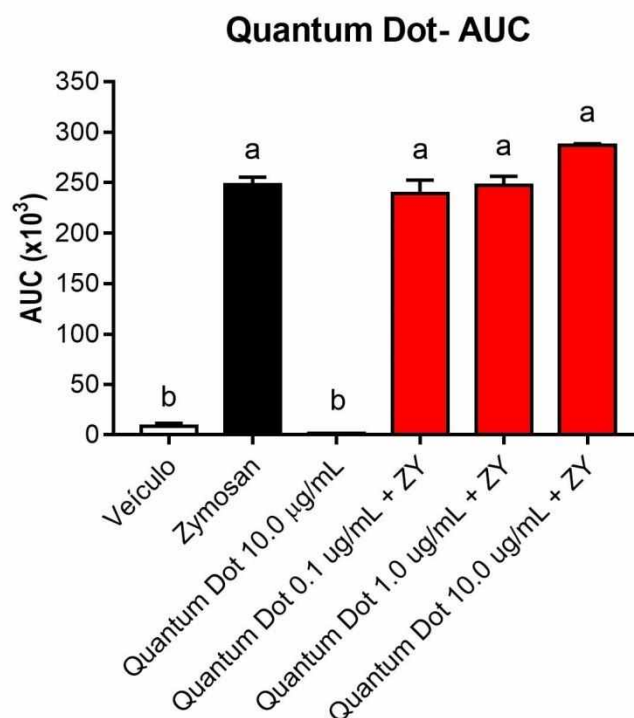


Figura 15 – Histograma comparativo entre as amostras de PQTMs isolados ou em conjunto com o Zymosan. Letras iguais correspondem às amostras que não apresentaram significância entre si. A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$).

Liu et al (2011) demonstrou que QDs de CdSe induziram ROS intracelular e aumento dos níveis de MDA em tecido hepático, onde parece ser um alvo para acumulo desses nanocristais. A citotoxicidade causada é resultado de íons de Cádmio liberados para o meio e presentes no núcleo do QD (LIU e colab., 2011).

O estresse oxidativo é consequência da interação dos íons de Cádmio adsorvidos na superfície dos QDs com moléculas de Oxigênio intracelular, causando danos na membrana, mitocôndria, divisão celular, geração de radicais livres, peroxidação lipídica, entre outros. (SILVA, 2014).

Os PQTMs constituem uma nova classe de QDs e são extremamente pequenos, têm tamanho e luminescência estáveis durante o tempo e amplo espectro de fluorescência. A fim de diminuir os efeitos citotóxicos reportados pela maioria dos QDs convencionais, esses PQTMs foram sintetizados com 0,5 mmol de Selênio, que possui ação preventiva contra o estresse oxidativo induzido por Cádmio, resultando em uma diminuição de íons de Cádmio adsorvidos em sua superfície, e, consequentemente, reduzindo sua toxicidade (GARCIA-SEVILLANO, 2014; SILVA, 2014).

Christine et al (2014) mostrou que as concentrações de 0,4 e 0,5 mmol de Selênio demonstraram menor produção de ROS e maior produção de metalotioneína, uma proteína com dois domínios de cisteína que se ligam em metais mono e divalentes e são responsáveis pelo transporte ou detoxificação causada por íons metálicos, como o Cádmio (SILVA, 2014).

Com isso, os PQTMs utilizados nesse trabalho se mostraram pouco danosos para a célula, embora o Selênio presente na superfície não tenha apresentado atividade antioxidante contras as espécies reativas de oxigênio geradas devido à presença do Zymosan.

Já as moléculas bioconjugadas, representadas na figura 16, apesar de não apresentarem indução de EROs isoladamente, em maiores concentrações, como em 10 µg/mL, é possível ver um efeito potencializador do Zymosan e mais EROs são formadas em relação ao Zymosan isolado.

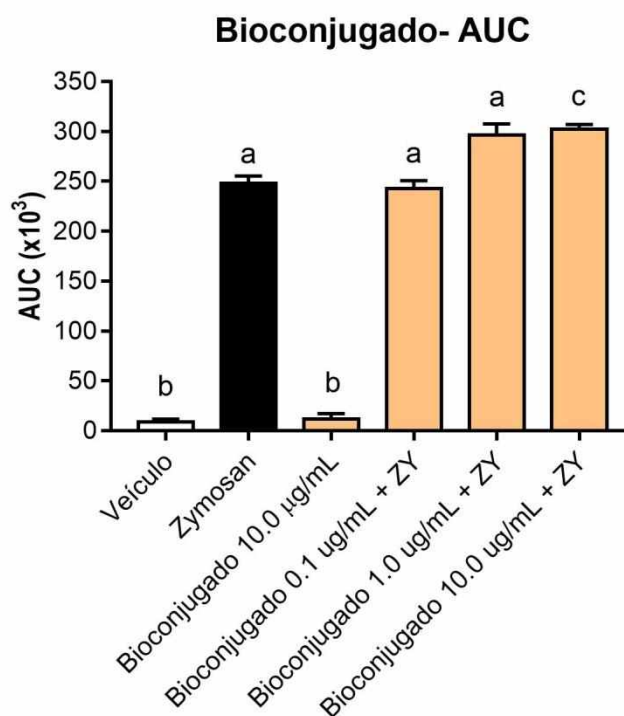


Figura 16 — Histograma comparativo entre as amostras de Quercetina isolada ou em conjunto com o Zymosan. Letras iguais correspondem às amostras que não apresentaram significância entre si. A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$).

O que pode explicar tal fato, é que o Zymosan pode ter interagido com as moléculas bioconjugadas, e, conseqüentemente, as desestabilizado. Com isso, a superfície dos PQTMs entrou em desordem e liberou íons de Cádmio para o meio, aumentando a geração de espécies reativas de oxigênio no meio intracelular.

4.8 Avaliação da atividade antimicrobiana da Quercetina isolada e bioconjugada com o PQTMs

A CIM da Quercetina, PQTMs e moléculas bioconjugadas foi determinada contra a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* ATCC BAA 198 e seu isolado clínico (378) e Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ATCC BAA 44 e seu isolado Clínico (208) nas concentrações de 0,98 µg/mL a 2000 µg/mL.

A concentração da Quercetina que apresentou atividade inibitória de crescimento para *Escherichia coli* tanto a cepa ATCC quanto para o isolado clínico foi apenas de 2000 µg/mL. Já as duas cepas de *Staphylococcus aureus* foram mais sensíveis à esse flavonoide, tendo seu crescimento inibido nas concentrações > que 1000 µg/mL. As moléculas bioconjugadas apresentaram o mesmo valor de CIM para as duas bactérias e seus dois tipos de cepa.

Os PQTMs tiveram surpreendentemente uma maior inibição que o flavonoide e as moléculas bioconjugadas. O valor da CIM para todas as bactérias testadas foi de 500 µg/mL.

O controle positivo utilizado na técnica foi a Tetraciclina nas concentrações de 0,0115 µg/mL a 5,9 µg/mL, um antimicrobiano em que ambas as bactérias são sensíveis. As análises dos controles do caldo e da bactéria mostraram que todos os parâmetros do teste estavam confiáveis.

Bactérias	Amostras em µg/mL		
	Quercetina	Bioconjugado	PQTMs
<i>Escherichia coli</i> ATCC BAA 198	2000	2000	500
<i>Escherichia coli</i> Isolado clínico (378)	2000	2000	500
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC BAA 44	1000	2000	500
<i>Staphylococcus aureus</i> Isolado Clínico (208)	1000	2000	500

Tabela 1 – Concentração Mínima Inibitória avaliada das amostras Quercetina e PQTMs isolados e bioconjugados nas concentrações de 0,98 µg/mL a 2000 µg/mL em relação à *Escherichia coli* (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva).

Controle da técnica - µg/mL	
Bactérias	Tetraciclina
<i>Escherichia coli</i> ATCC BAA 198	0,7375
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC BAA 44	0,3688

Tabela 2 – O controle da técnica realizado com Tetraciclina nas concentrações de 0,0115 µg/mL a 5,9 µg/mL. Faixa esperada de CIM do controle para *Escherichia coli* ATCC BAA 198: 0,5-2,0 µg/mL. Faixa esperada de CIM do controle para *Staphylococcus aureus* ATCC BAA 44: 0,12-1,0 µg/mL

Um estudo mostrou que as bactérias Gram-positivas são mais sensíveis à atividade bacteriostática da Quercetina, o que explica o valor do CIM ser menor para *S. aureus* do que para *E. coli*. Foi reportado que esse flavonoide causa danos na parede e membrana celular, comprometendo sua permeabilidade e inibindo a síntese de proteínas (WANG e colab., 2018).

O peptidoglicano foi um dos principais fatores afetados pela Quercetina na parede celular. As bactérias Gram-positivas possuem mais desse polímero em sua parede do que bactérias Gram-negativas, explicando o porquê da maior sensibilidade de *S. aureus* em relação à esse flavonoide (WANG e colab., 2018).

Os PQs são nanomateriais conhecidos por suas várias aplicações, mas o estudo sobre sua toxicidade vem sendo cada vez mais elucidado. Além dos efeitos da liberação de íons de Cádmio já discutidos, a formação de EROs no meio intracelular é outro motivo de sua toxicidade (GALDIERO e colab., 2016; GOMES e colab., 2011).

A suscetibilidade de algumas bactérias, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* em relação aos PQs de CdTe e CdSe já foi reportado. Alguns efeitos como despolarização da membrana, interação com a cadeia transportadora de elétrons e formação de radicais superóxido e hidroxil também foram confirmados (GOMES e colab., 2011).

Como já discutido, a perda da atividade da Quercetina nas moléculas bioconjugadas é mais uma vez notável. Porém, os PQTMs tiveram atividade superior nesse ensaio em relação à Quercetina. Aqui, temos mais um indício de que as duas moléculas estão ligadas, pois tanto o flavonoide quanto os PQTMs tiveram suas atividades alteradas e o valor de CIM aumentou.

A diminuição da atividade antimicrobiana das moléculas bioconjugadas se dá pelo fato dos PQTMs estarem em regiões responsáveis pela ação do flavonoide e essa ligação

possivelmente afetou os PQTMs, talvez o impedindo de induzir EROs ou liberar íons de Cádmio, que são as principais causas do seu efeito bactericida.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, a Quercetina foi bioconjugada aos PQTMs a fim de avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana tanto das moléculas isoladas quanto bioconjugadas, uma vez que um dos maiores desafios no mundo da Nanobiotecnologia é diminuir a citotoxicidade dos Quantum Dots, visto que são nanomateriais de ampla aplicabilidade nanobiotecnológica, desde novos diagnósticos e tratamentos até aplicações ambientais.

O método de bioconjugação empregado fez a utilização dos agentes de acoplamento EDC e NHS a fim de unir os grupamentos hidroxila da Quercetina e grupamentos carboxílicos dos PQTMs. Nos testes FRAP, DPPH, ORAC e TBARS, a Quercetina mostrou sua alta capacidade antioxidante, quelando íons metálicos, sequestrando e estabilizando radicais livres e inibindo a peroxidação lipídica. Os PQTMs não apresentaram atividade antioxidante em nenhum dos testes. As moléculas bioconjugadas mostraram uma suave habilidade de sequestro de radicais nos testes de DPPH e ORAC, porém não mostrou atividade quelante de Ferro no FRAP.

A fim de observar se as amostras produziram EROs, foi feito um ensaio de espécies reativas em macrófagos, em que baixas concentrações da Quercetina conseguiram inibir o estresse oxidativo induzido pelo Zymosan. Já os PTQMs e o bioconjugado não apresentaram dano celular sozinhos, porém, juntamente com o Zymosan, os PQTMs não alteraram os níveis de EROs e o bioconjugado potencializou a atividade do Zymosan. A atividade antimicrobiana dos PQTMs foi superior à da Quercetina e das moléculas bioconjugadas. Isso pode ser explicado através da citotoxicidade induzida através da liberação de íons de Cádmio e EROs para o meio.

Para melhorar a capacidade antioxidante das moléculas bioconjugadas são necessários testes com outras metodologias de bioconjugação envolvendo outros grupamentos orgânicos das moléculas, para que não haja interferência na atividade dos flavonoides.

6. REFERÊNCIAS

- ABRÃO, Fariza e colab. **Copaifera langsdorffii oleoresin and its isolated compounds : antibacterial effect and antiproliferative activity in cancer cell lines.** BMC Complementary and Alternative Medicine, p. 1–10, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12906-015-0961-4>>.
- AERON, Engenharia e colab. **Avaliação da aplicabilidade de técnicas FT-IR e análise térmica à caracterização e quantificação de elastômeros.** 2009. 2009.
- AL-AYED, Mohammed Suliman. **Effects of quercetin and arginine on the nephrotoxicity and lipid peroxidation induced by gold nanoparticles in vivo.** p. 7765–7770, 2018.
- ALVES, Clayton Q e colab. **Revisão.** v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.
- AMORATI, Riccardo e colab. **The Antioxidant Activity of Quercetin in Water Solution.** p. 6–9, 2017.
- ANVISA. **Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 15 : Incidentes Relacionados à Assistência à Saúde - 2016.** 2016.
- APARECIDO, Antonio e FERREIRA, Pupim e YAMANAKA, Hideko. **Divulgação.** v. 29, n. 1, p. 137–142, 2006.
- ATALA, Elías e colab. **Quercetin and related flavonoids conserve their antioxidant properties despite undergoing chemical or enzymatic oxidation.** v. 234, p. 479–485, 2017.
- BAGHEL, Satyendra Singh e colab. **I S S N 2278 – 4357 A REVIEW OF QUERCETIN : ANTIOXIDANT AND ANTICANCER PROPERTIES.** p. 146–160, 2012.
- BEHLING, Estela Beatriz e SENDÃO, Milena Cristina. **FLAVONÓIDE QUERCETINA : ASPECTOS GERAIS E.** p. 285–292, 2004.
- BEZERRA, Cristiane e SILVA, D A. **No Title.** 2014.
- BLANCO-CANOSA, Juan B e colab. **Recent progress in the bioconjugation of quantum dots.** Coordination Chemistry Reviews, v. 263–264, p. 101–137, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.030>>.
- BOOTS, Agnes W e HAENEN, Guido R M M e BAST, Aalt. **Health effects of quercetin : From antioxidant to nutraceutical.** v. 585, p. 325–337, 2008.
- BROWN, James R. **Ancient horizontal gene transfer.** Nature Reviews Genetics, v. 4, p. 121, 1 Feb 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrg1000>>.
- BUDNI, Patrícia e colab. **Estudos Preliminares da Atividade Antioxidante do Extrato Hidroetanólico de Folhas Jovens e Adultas de Tabebuia heptaphylla (Vell .) Toledo (ipê-roxo).** v. 26, n. 3, p. 394–398, 2007.
- BUKHARI, S Birjees e colab. **Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy Synthesis , characterization and antioxidant activity copper – quercetin complex.** v. 71, p. 1901–1906, 2009.

CADIOLI, Luiz Paulo. **Nanotecnologia : um estudo sobre seu histórico , definição e principais aplicações desta inovadora tecnologia.** 2015.

CAO, Guohua e SOFIC, Emin e PRIOR, Ronald L. **Original Contribution.** v. 22, n. 5, p. 749–760, 1997.

CARDOSO, Fernando Leite e colab. **Artigo Análise sazonal do potencial antimicrobiano e teores de flavonoides e quinonas de extratos foliares de Aloe arborescens Mill ., Xanthorrhoeaceae.** v. 20, n. June 2008, p. 35–40, 2010.

CARRADA, Gabriela. **Quercetina atenúa la virulencia de Staphylococcus aureus al disminuir la secreción de alfa toxina.** v. 50, n. 2, p. 131–135, 2018.

CHART, Flow e colab. **ESQUEMA PARA INTERPRETAÇÃO DE ESPECTROS DE SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO** Wilson Araújo Lopes* e Miguel Fascio. v. 27, n. 4, p. 670–673, 2004.

CHEN, Nan e colab. **Biomaterials The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots q.** Biomaterials, v. 33, n. 5, p. 1238–1244, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.070>>.

CHENG, Guyue e colab. **Antimicrobial Drugs in Fighting against Antimicrobial Resistance.** v. 7, n. April, p. 1–11, 2016.

CHRISTINE, Anielle. **Pontos Quânticos Semicondutores Sintetizados via Soluções Coloidais Aquosas: Estudos e Aplicações Nanobiotecnológicas.** 2014.

CLSI. **clinical and laboratory standards institute. methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.** 9 ed. CLSI document M7-A9. Wayne: CLSI; 2012. [S.l: s.n.], 2012. v. 32.

DUNPALL, Rekha e colab. **An In Vitro Assessment of the Interaction of Cadmium Selenide Quantum Dots with DNA , Iron , and Blood Platelets.** v. 64, n. December, p. 995–1002, 2012.

FIRUZI, Omidreza e colab. **Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by ‘ Ferric Reducing Antioxidant Power ’ assay and cyclic voltammetry Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by b ferric reducing antioxidant power Q assay and cyclic voltammetry.** n. February, 2005.

FRIENDLY, Environmentally e colab. **Revisão.** v. 40, n. 10, p. 1215–1227, 2017.

GALDIERO, Emilia e colab. **An integrated study on antimicrobial activity and ecotoxicity of quantum dots and quantum dots coated with the antimicrobial peptide indolicidin.** p. 4199–4211, 2016.

GARCIA-SEVILLANO, Et al. **Cadmium toxicity in Mus musculus mice based on metallomic study. Antagonistic interaction between Se and Cd in the bloodstream.** 2014.

GHANI, Ahsan e colab. **Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay.** Food Chemistry, v. 230, p. 195–207, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.127>>.

GOMES, Suzete A O e colab. **CdTe and CdSe Quantum Dots Cytotoxicity: A**

Comparative Study on Microorganisms. p. 11664–11678, 2011.

GONZÁLEZ-MANZANO, Susana e GONZÁLEZ-PARAMÁS, Ana e SANTOS-BUELGA, Celestino. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Antioxidant evaluation of O -methylated metabolites of catechin , epicatechin and quercetin.** v. 51, p. 443–449, 2010.

HAVSTEEN. **Flavonoids, a class of of natural products of high pharmacological potency.** 1983.

HAVSTEEN, Bent H. **The biochemistry and medical significance of the flavonoids.** [S.l: s.n.], 2002. v. 96.

HOSHINO, Akiyoshi e colab. **Physicochemical Properties and Cellular Toxicity of Nanocrystal Quantum Dots Depend on Their Surface Modification.** p. 15–18, 2004.

KANIMOZHI, Sivamani e BHAVANI, Pakkiri e SUBRAMANIAN, Perumal. **Influence of the Flavonoid , Quercetin on Antioxidant Status , Lipid Peroxidation and Histopathological Changes in Hyperammonemic Rats.** Indian Journal of Clinical Biochemistry, 2016.

KUZNETSOV, Aleksey E e colab. **Structural and Electronic Properties of Bare and Capped Cd n Se n / Cd n Te n Nanoparticles (n = 6 , 9).** 2012.

LAWRENCE, Jeffrey G. **Gene Transfer in Bacteria : Speciation without Species ?** v. 460, p. 449–460, 2002.

LESJAK. **Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives (1).** 2018.

LESJAK, Marija e colab. **Antioxidant and anti-in fl ammatory activities of quercetin and its derivatives.** v. 40, n. October 2017, p. 68–75, 2018.

LIMA, Andréia Alves De. **Estrutura e reatividade de complexos de íons metálicos com flavonols, antocianinas e antocianidina.** 2007. 2007.

LIU. **Chemical Methods To Evaluate Antioxidant Ability.** p. 5675–5691, 2010.

LIU, Wei e colab. **CdSe Quantum Dot (QD) -Induced Morphological and Functional Impairments to Liver in Mice.** v. 6, n. 9, 2011.

MAHENDRA, Shaily e ZHU, Huiguang. **Quantum Dot Weathering Results in Microbial Toxicity.** v. 42, n. 24, p. 9424–9430, 2008.

MENG, Peijun. **Dose and time effect of CdTe quantum dots on antioxidant capacities of the liver and kidneys in mice.** p. 6425–6435, 2017.

NEMERY, Benoît e HOET, Peter H M. **Acute Toxicity and Prothrombotic Effects of Quantum Dots : Impact of Surface Charge.** v. 116, n. 12, p. 1607–1613, 2008.

OBOH, Ganiyu e ADEMOSUN, Ayokunle O. **Comparative effect of quercetin and rutin on α -amylase , α -glucosidase , and some pro-oxidant-induced lipid peroxidation in rat pancreas.** p. 1103–1110, 2015.

OLIVEIRA, Aldaires e colab. **ANTIOXIDANT POWER OF CAROTENOIDS ,**

FLAVONOIDS AND VITAMIN. v. 2, n. 4, p. 320–324, 2016.

PASANPHAN, Wanvimol e CHIRACHANCHAI, Suwabun. **Conjugation of gallic acid onto chitosan : An approach for green and water-based antioxidant.** v. 72, p. 169–177, 2008.

PELOTAS, Universidade Federal De e CARNEIRO, R Gomes e PELOTAS, Universidade Federal De. **Impacto da suplementação de vitamina C sobre níveis de peroxidação lipídica e glutatona reduzida em tecido hepático de camundongos com imunossupressão induzida por ciclofosfamida Impact of vitamin C supplementation on lipid.** v. 29, n. 4, p. 579–587, 2016.

PENESYAN, Anahit e GILLINGS, Michael e PAULSEN, Ian T. **Antibiotic Discovery: Combatting Bacterial Resistance in Cells and in Biofilm Communities.** p. 5286–5298, 2015.

PEREIRA, Mark e LAI, Edward P C. **Capillary electrophoresis for the characterization of quantum dots after non-selective or selective bioconjugation with antibodies for immunoassay.** v. 15, p. 1–15, 2008.

PIETRANGELO, Antonello. **Mechanisms of iron hepatotoxicity.** JOURNAL OF HEPATOLOGY, n. January, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2016.01.037>>.

PINHEIRO, Cristiana Sousa. **NANOTECNOLOGIA : SOLUÇÃO ÀS RESISTÊNCIAS BACTERIANAS NANOTECNOLOGIA : SOLUÇÃO ÀS RESISTÊNCIAS BACTERIANAS.** 2016.

PIOTROWSKA, Hanna e MURIAS, Marek e BALAN, Lavinia. **Thioglycerol-capped Mn-doped ZnS quantum dot bioconjugates as efficient two-photon fluorescent nano-probes for bioimaging.** n. January, 2013.

RAI, M. K. e colab. **Silver nanoparticles: The powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria.** Journal of Applied Microbiology, v. 112, n. 5, p. 841–852, 2012.

REZAEI-SADABADY, Rogaie e colab. **Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of quercetin and quercetin-encapsulated liposomes Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of quercetin and quercetin-encapsulated liposomes.** v. 1401, 2016.

RYMAN-RASMUSSEN, Jessica P e RIVIERE, Jim E e MONTEIRO-RIVIERE, Nancy A. **Surface Coatings Determine Cytotoxicity and Irritation Potential of Quantum Dot Nanoparticles in Epidermal Keratinocytes.** Journal of Investigative Dermatology, v. 127, n. 1, p. 143–153, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/sj.jid.5700508>>.

SARKER, Satyajit D e NAHAR, Lutfun e KUMARASAMY, Yashodharan. **Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth , and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals.** v. 42, p. 321–324, 2007.

SHALATA, Abed e NEUMANN, Peter M. **Exogenous ascorbic acid (vitamin C) increases resistance to salt stress and reduces lipid peroxidation.** v. 52, n. 364, p. 2207–2211, 2001.

SILVA, A.C.A e colab. **Controlling the Cytotoxicity of CdSe Magic-Sized Quantum Dots as a Function of Surface Defect Density.** 2014.

SINGH, Ajay e colab. **Surface functionalization of quantum dots for biological applications.** *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 215, p. 28–45, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2014.11.004>>.

SOFIA, Ana. **Quantum Dots : Synthesis , Functionalization and Bioconjugation for Biological Applications.** 2012.

SOURCES, Dietary e SIGNIFICANCE, Nutritional. **Polyphenols : Chemistry , Dietary Sources , Metabolism , and Nutritional Significance.** v. 56, n. 11, 1998.

SOUZA. Alex Jardelino Felizardo de Souza **Avaliação dos efeitos antimicrobianos de rutina e quercetina in vitro** Orientador : Prof . Dr . Marcos Hikari Toyama Campinas – SP. 2009.

SURCO-LAOS, Felipe e GONZA, Susana e GONZA, Ana M. **Antioxidant properties of major metabolites of quercetin.** p. 103–111, 2011.

TAGHAVI, Mehdi e colab. **The efficacy of zymosan in pro-inflammatory cytokine production by peritoneal macrophages of melanoma-bearing mice.** *Comparative Clinical Pathology*, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00580-016-2269-2>>.

TAM, K. H. e colab. **Antibacterial activity of ZnO nanorods prepared by a hydrothermal method.** *Thin Solid Films*, v. 516, n. 18, p. 6167–6174, 2008.

TARRAHI, Roshanak e colab. **Evaluating the Toxic Impacts of Cadmium Selenide Nanoparticles on the Aquatic Plant Lemna minor.** p. 1–15, 2019.

VIVIANE, Vitória e colab. **Metabólitos Secundários e ação antioxidante de Croton heliotropiifolius e Croton blanchetianus** *Secondary metabolites and antioxidant action of Croton heliotropiifolius and Croton blanchetianus.* v. 1, n. 3, p. 7–10, 2017.

WANG, Shengnan e colab. **Bacteriostatic Effect of Quercetin as an Antibiotic Alternative In Vivo and Its Antibacterial Mechanism In Vitro.** v. 81, n. 1, p. 68–78, 2018.

YAGI, Kunio. **Simple Procedure for Specific Assay of Lipid Hydroperoxides in Serum or Plasma.** v. 108, p. 107–110, 1998.

YOUNG, Ian e MCENENY, Jane. **Lipoprotein oxidation and atherosclerosis.** n. May 2014, 2001.

