



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



MARIA ISABELA DE ANDRADE PEREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOSSONDAS BIFUNCIONAIS
BASEADAS EM PONTOS QUÂNTICOS PARA APLICAÇÕES NO
ESTUDO DA BIOLOGIA DO CÂNCER**

RECIFE

2021

MARIA ISABELA DE ANDRADE PEREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOSSONDAS BIFUNCIONAIS
BASEADAS EM PONTOS QUÂNTICOS PARA APLICAÇÕES NO
ESTUDO DA BIOLOGIA DO CÂNCER**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia e Bioinformática.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Fontes.

Co-orientadores: Profa. Dra. Giovannia A. L. Pereira e Prof. Dr. Paulo E. Cabral Filho.

RECIFE

2021

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Pereira, Maria Isabela de Andrade

Desenvolvimento de nanossondas bifuncionais baseadas em pontos quânticos para aplicações no estudo da biologia do câncer / Maria Isabela de Andrade Pereira. - 2021.

93 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Fontes.

Coorientadora: Profa. Dra. Giovannia A. L. Pereira.

Coorientador: Prof. Dr. Paulo E. Cabral Filho.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2021.

Inclui referências e apêndices.

1. Oncologia. 2. Câncer. 3. Ressonância magnética. I. Fontes, Adriana (orientadora). II. Pereira, Giovannia A. L. (coorientadora). III. Cabral Filho, Paulo E. (coorientador). IV. Título.

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-074-2022

MARIA ISABELA DE ANDRADE PEREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOSSONDAS BIFUNCIONAIS
BASEADAS EM PONTOS QUÂNTICOS PARA APLICAÇÕES NO
ESTUDO DA BIOLOGIA DO CÂNCER**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 17/09/2021.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Adriana Fontes
Departamento de Biofísica e Radiobiologia – UFPE (Presidente)

Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho
Departamento de Bioquímica – UFPE (Membro Interno)

Prof. Dr. Paulo Euzébio Cabral Filho
Departamento de Biofísica e Radiobiologia – UFPE (Membro Interno)

Profa. Dra. Dijanah Cota Machado
Departamento de Biofísica e Radiobiologia – UFPE (Membro Externo)

Dra. Cássia Regina Albuquerque da Cunha
Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Pernambuco - LFDA/PE
(Membro Externo)

*Às minhas filhas, Sofia e Luíza,
que me ensinam sobre o amor!
Às pessoas que luta(ra)m contra o câncer.
À minha sogra, Simone, em especial,
que me ensinou sobre o valor do viver!*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ser minha fortaleza e por mostrar-se presente ao longo da minha vida e jornada acadêmica, através de cada detalhe; momento; gesto e pessoas. Por meio de pessoas especiais, que me ajudaram de forma direta ou indireta, foi possível persistir no caminhar da minha grande conquista, aprendendo a ser mais resiliente, não desistir e chegar até o fim, para obter o título de Doutora.

Às minhas filhas, **Sofia e Luíza**, que me ensinaram o quanto é possível reinventar-se, me adaptando sempre a elas e conquistando incríveis momentos com simples atos e em pouco tempo de dedicação, porém de qualidade; com elas aprendi e senti sobre o mais puro, sincero e verdadeiro amor. À minha mãe, **Elinete**, que é minha grande base, uma jóia delicada, porém resistente, amiga para todas as minhas experiências pessoais e profissionais, que sempre me impulsiona a evoluir e acredita no meu potencial. Ao meu pai, **Josivalter** (*in memoriam*) que deixou um legado de exemplo de ser humano, a quem recorro espiritualmente nos momentos mais difíceis e decisivos. Ao meu irmão, **Walter**, que tem sido fundamental na minha vida, me apoiando da forma que for possível, um exemplo de homem de uma geração mais humana e acolhedora, através dele, uma cunhada, amiga, humilde e amorosa, **Geneseli**. Ao **Cássio**, que tem construído comigo a minha família, que tem aprendido o desafiador e encantador papel da paternidade; pela paciência e momentos vividos.

À **minha família e amigos**, às minhas avós, Bel, Lica; aos meus avôs Zezinho, Deildo; aos meus tios Lêda e Enir, Cileide e Almir e, Virgínia e Silva; aos sogros, Clodo e Simone (*in memoriam*); ao meu cunhado, Clodozinho; à Adriana, ao Adeilton e à Cláudia, aos que convive(ra)m no apt-201, Ninha, Marcelo, Toninho e Karen, Flá e Amanda, Fati, Jú; aos cunhados, Maria, Júnior, Kênia; aos compadres, Edsângela, Vivi, Melquides, Paulo; aos familiares que viraram meus, destaco alguns representando a Família Buscapé, Sara, Jú, Bibi, Bárbara, Pauliety e Salete; aos amigos eu levarei para a vida, Babi, Ani, João, Wadja, Polly; Job, Rosângela; aos que estiveram sempre comigo ou foram rede de apoio no meu maternar ou até mesmo amparo psicológico, de forma consciência ou não prestaram e partilhando momentos e conversas de alegrias ou tristezas, de saúde ou doença, compreendendo as ausências e os enfados da rotina e dos ciclos de vida.

À minha orientadora, Profa. Dra. **Adriana Fontes**, grande mestre e amiga, pelo dom do ensinamento, que nos conquista desde as primeiras aulas de Biofísica, pela humanização ao falar, ao ministrar aulas e ao lidar com situações delicadas, por ser um grande exemplo de

profissional dedicada e preocupada com a formação dos seus alunos, da escrita científica à treinamentos de formação complementar; graças à uma incrível intuição na minha seleção de iniciação científica, portas abriram-se para eu viver umas das melhores experiências de crescimento pessoal e profissional ao longo da minha formação acadêmica, pois engana-se quem pensa que a formação é apenas acadêmica, meu muito obrigada é uma simples representação de uma imensa gratidão.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. **Giovannia Pereira**, para mim é um exemplo de pesquisadora-mãe, que me fez compreender sobre a dimensão da vivência em dupla jornada, dividindo-se em mulher, pesquisadora, professora, mãe, filha; mesmo a vida não cabendo no *lattes*, mantém-se perspicaz, em busca de equilíbrio interno e com conquistas, projeto e cargos incríveis, minha gratidão pelos ensinamentos e abdições dedicadas ao longo do Mestrado e Doutorado.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. **Paulo Euzébio**, por ter sido meu primeiro orientador de bancada da iniciação científica, por ter me ensinado desde as coisas mais simples às mais complexas, com atenção, amor, dedicação e excelente condução no processo, principalmente, por trazer uma dose de alegria, descontração, dança e canto, tornando o ambiente de trabalho prazeroso e mais leve; pois quando amamos o que fazemos sentimos tudo isso e dissipamos a boa energia para os demais, que continue inspirando mais vidas, compartilhar um pouco da fé, alegrias nas atuações e vivências na sua jornada de sucesso que está apenas começando.

Aos professores que fizeram e ainda pertencem ao Laboratório de Biofísica-Química e compartilharam de experiências com o Grupo de Pesquisa de Nanotecnologia Biomédica (NanoBio), sou eternamente grata e lisonjeada em dividir meus dias com profissionais de excelência. À Profa. Dra. **Beate Santos**, por ser equilíbrio, paz, amor, ensinamentos breves, porém firmes, que fixaram na minha mente e me ajudaram a aprender e tornar a complexidade das coisas em corriqueiras. À Profa. Dra. **Goreti Pereira** pela atenção, exemplo de pontualidade, parceria de bancada, planejamentos e análises. Ao Dr. **Rogério Ribeiro**, pelo acolhimento e discussões eletroquímicas. À Profa. Dra. **Cláudia Sampaio**, pelo “Bom dia!”, único, especial e enérgico; pelas orientações, conversas e momentos de festividades embalados por sua belíssima voz. Ao Prof. Dr. **Ricardo Yara**, por ter se doado a buscar soluções e se empenhar para que minhas eletroforeses dessem certo, sem esquecer de seu maior apoio quando diz que “só quebra vidraria quem trabalha”.

Aos colaboradores, professores, colegas e instituições que contribuíram de alguma forma nessa jornada científica, meu reconhecimento. À Dra. **Denise Tenório**, pelo apoio nas

sínteses de PQs. À Profa. Dra. **Regina Celia Bressan**, pela microscopia de fluorescência. À **Diogo e Bruna**, pela análise por FTIR. À Prof. Dra. **Ana Mendonça**, Prof. Dr. **Elvis França** e **Crescêncio Andrade** pelas análises de ICP. Ao **Victor e Unicamp** pelas medidas de FCS. À **Patrícia** (CENAPESQ-UFRPE) pela contribuição nas medidas preliminares de RMN. À **UFPE, CB**, ao **PPGCB**, às agências de fomento (**FACEPE, CNPq**), pelo apoio ao longo da carreira acadêmica.

Aos amigos da graduação, pós-graduação, aos colegas do NanoBio, BioNat, e demais grupos de pesquisa, aos colegas dos cursos, eventos, treinamentos e curso de formação e trabalhos, pelo estímulo, momentos de descontração e trocas de experiências que levarei para toda a vida! A lista é gigante, destaco os que contribuíram diretamente nessa fase final e no âmbito acadêmico, **Bruno Raposo, Camila Monteiro, Rennan Mano, Rafaella Lima, Carlos Augusto, Wesley Felix, Jéssika Fernanda**, e às doutoras-mães Dra. **Natália Onofre** e Dra. **Clarissa França**, pelas trocas de experiências e discussões sobre maternidade.

Minha gratidão a todos!

RESUMO

Como o câncer é uma doença multifatorial, há uma busca por tecnologias capazes de contribuir para uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos biológicos envolvidos dessa doença. As singulares propriedades ópticas dos pontos quânticos (PQs) os tornam valiosos para o estudo das interações biológicas associadas à carcinogênese, especialmente se combinados a moléculas aptas a conferir novas funcionalidades. Nesta tese, desenvolveu-se nanossondas bifuncionais de PQs e quelatos de Gd(III), bem como PQs e D-glicosamina (D-GN), para aplicações no estudo da biologia do câncer. Os quelatos de Gd(III) quando conjugados aos PQs, originam nanossondas óptico-magnéticas que aliam vantagens das técnicas baseadas em fluorescência com as de ressonância magnética (RM), favorecendo estudos complementares de processos biológicos. Já a associação de PQs a derivados de glicose, como a D-GN, gera gliconanopartículas hábeis à investigação da captação desse carboidrato em nível celular, interessante para diagnóstico e terapia, devido ao metabolismo glicolítico alterado desse carboidrato em células de câncer. Para desenvolver a nanossonda óptico-magnética, preparou-se quelatos de DOTA-Gd(III) carboxilados, os quais incorporaram eficientemente o íon paramagnético (97%) e apresentaram estabilidade quanto à transmetalção na presença do íon Zn(II). Eles foram conjugados covalentemente aos PQs carboxilados via etilenodiamina. Os nanossistemas apresentaram alta fluorescência, rendimento de conjugação *ca.* 75% e elevada relaxividade, *ca.* 5× [por Gd(III)] e 100× [por PQ] superior a do quelato DOTA-Gd(III) molecular. Ademais, gliconanopartículas altamente fluorescentes foram preparadas através da conjugação covalente dos PQs à D-GN, e uma metodologia para confirmar esse processo também foi desenvolvida baseada na afinidade da glicose pela Concanavalina A, imobilizada em *Candida albicans*, a qual mostrou-se prática, rápida, reprodutível e quantitativa. Foram marcadas *ca.* 98% das leveduras pelo conjugado PQs-D-GN, reduzindo para *ca.* 34% após incubação com manopiranosídeo, confirmando a especificidade. Ambas nanossondas foram avaliadas utilizando células HeLa (adenocarcinoma cervical). Os resultados indicaram que os conjugados PQs-DOTA-Gd(III) marcaram eficientemente as células e não induziram citotoxicidade significativa. Os conjugados PQs-D-GN foram captados pelas células eficientemente (*ca.* 97%), com um padrão de marcação vesicular intracelular, mais intenso próximo ao núcleo. Assim, as nanossondas bifuncionais desenvolvidas apresentaram-se como ferramentas promissoras e estratégicas para estudos da biologia do câncer.

PALAVRAS-CHAVE: fluorescência; ressonância magnética; D-glicosamina; quelato de gadolínio; células.

ABSTRACT

Cancer is a multifactorial disease. Therefore, there is a search for technologies capable of contributing to a deeper understanding of the biological mechanisms involved in this disease. The unique optical properties of quantum dots (QDs) make them valuable for studying biological interactions associated with carcinogenesis, especially if they are combined with molecules capable of providing new functionalities. In this thesis, it was developed bifunctional nanoprobe formed by QDs and Gd(III)-chelates, or QDs and D-glucosamine (D-GN), for applications in the study of cancer biology. The Gd(III) chelates, when conjugated to QDs, give rise to optical-magnetic nanoprobe that combine the advantages of fluorescence-based techniques with those of magnetic resonance imaging (MRI), favoring complementary studies of biological processes. The association of QDs with glucose derivatives, such as D-GN, on the other hand, generates glyconanoparticles capable of being used to investigate the uptake of this carbohydrate at the cellular level. This is interesting for diagnosis and therapy due to the altered glycolytic metabolism of this carbohydrate in cancer cells. To develop the optical-magnetic nanoprobe, carboxylated DOTA-Gd(III) chelates were previously prepared. They efficiently incorporated the paramagnetic ion (97%), showing stability regarding transmetallation in the presence of the endogenous ion, Zn(II). The chelates were covalently conjugated to the carboxylated QDs *via* ethylenediamine. The nanosystems showed high fluorescence, conjugation yield of *ca.* 75%, and high relaxivity, *ca.* 5× [by Gd(III)] and 100× [by PQ] higher than the molecular DOTA-Gd(III) chelate. Furthermore, highly fluorescent glyconanoparticles were prepared through the covalent conjugation of the QDs to the D-GN. A methodology to confirm the conjugation process was also developed. It was based on the affinity of glucose for Concanavalin A, immobilized on *Candida albicans* yeasts, and proved to be practical, fast, reproducible, and quantitative. About 98% of yeasts were labeled by QDs-D-GN conjugate, reducing to *ca.* 34% after incubation with mannopyranoside, confirming the specificity. Both nanoprobe were evaluated with HeLa cells (cervical adenocarcinoma). The results indicated that the QDs-Gd(III)-DOTA conjugates labeled the cells efficiently and did not induce noteworthy cytotoxicity. The QDs-D-GN conjugates were efficiently internalized by HeLa cells (*ca.* 97%), with an intracellular vesicular labeling pattern, more intense close to the nucleus. Thus, the bifunctional nanoprobe developed hold potential as strategic tools for studies on cancer biology.

KEYWORDS: fluorescence; magnetic resonance; D-glucosamine; gadolinium chelate; cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Pontos quânticos (PQs) podem emitir fluorescência em vários comprimentos de onda do espectro de luz visível. Variando-se o tamanho dos nanocristais, quanto menor forem os PQs, menores serão os comprimentos de onda de fluorescência (em direção ao ultravioleta), e quanto maior forem os PQs, em maiores comprimentos de onda ocorrerá a emissão (em direção ao infravermelho próximo).23
- Figura 2** - Esquema didático de emissão de fluorescência em semicondutores: ilustra desde a excitação do elétron (e^-), por radiação eletromagnética ($h\nu$), quando sai da banda de valência (BV) para a banda de condução (BC), formando um *éxciton*, até a relaxação e a recombinação excitônica, que culmina na emissão de fluorescência ($h\nu$). Onde: h^+ representa o buraco gerado na BV, pela excitação do elétron; $h\nu$ é a energia (E) de um fóton capaz de excitar a amostra (onde h é a constante de *Planck* e ν é a frequência da luz).23
- Figura 3** - Níveis discretos de energia e aumento da energia do *bandgap* (E_g) com a redução do tamanho das nanopartículas de semicondutores quando em regime de confinamento quântico.24
- Figura 4** - Representação esquemática de espectros de absorção e emissão de pontos quânticos (PQs) e corantes orgânicos. Enquanto PQs podem ser excitados em vários comprimentos de onda, os corantes convencionais precisam de comprimentos de onda específicos. Os espectros de emissão dos corantes também são mais largos.26
- Figura 5** - Excepcional resistência dos pontos quânticos (PQs) à fotodegradação por longo período. Observa-se que o núcleo permaneceu marcado pelos PQs, em vermelho ($\lambda_{em} = 630$ nm), durante o estudo, enquanto os microtúbulos marcados pelo corante orgânico (AlexaFluor), em verde, fotodegradaram e foram detectáveis até 120 segundos.26
- Figura 6** - Aprimoramento das propriedades fluorescentes dos pontos quânticos ao formar a camada de passivação, o *shell*. Sem o *shell*, os elétrons interagem com as “armadilhas” (níveis intermediários de energia) formadas pelos defeitos de superfície. Com a estrutura *core/shell* há um melhoramento da qualidade e intensidade de emissão de fluorescência, com estreitamento da largura do espectro (FWHM). À direita, a linha cinza representa os espectros de absorção e a linha preta os de emissão.27
- Figura 7** - Representação esquemática do processo de nucleação, crescimento e formação de nanopartículas isoladas de semicondutores.29

Figura 8 - Esquema da nanoestrutura de um ponto quântico que possui tamanhos típicos de 2 a 10 nm, ilustrando núcleo, camada de passivação e de agentes estabilizantes/funcionalizantes.	30
Figura 9 - Esquema de possíveis (bio)conjugações de um ponto quântico (A), com possibilidade para aplicação em imagem por fluorescência e/ou ressonância magnética como uma nanossonda óptico-magnética versátil (B), quando associada com agentes paramagnéticos ou nanopartículas de óxido de ferro, por exemplo.	31
Figura 10 - Esquema de pontos quânticos carboxilados ativados por EDC e NHS para interação com componentes aminados.	33
Figura 11 - Propriedades óptico-magnéticas em uma única nanossonda para aplicações em estudos simultâneos por sinal paramagnéticos, como imagem por ressonância magnética (IRM), e por sinal fluorescente, como imagem óptica-fluorescente (IOF).	37
Figura 12 - (A): Orientação energética dos <i>spins</i> nucleares de ^1H . À esquerda, <i>spins</i> com orientação aleatória na ausência de campo magnético externo ($\mathbf{B}_0 = 0$). À direita, paralela e antiparalelamente, na presença de campo ($\mathbf{B}_0 > 0$). (B): Exemplos de imagens ponderadas nos tempos de relaxação longitudinal (T_1 - mais claras, à esquerda em B) e transversal (T_2 - mais escuras, à direita em B). (C): Exemplo de quelatos de Gd(III) baseados em ligantes linear (à esquerda, DTPA) e cíclico (à direita, DOTA).	39
Figura 13 - Esquema de moléculas de água interagindo com o centro do íon paramagnético (esfera interna) de quelato Gd(III) em solução e os tempos de residência da água coordenada ao íon metálico central (τ_M), rotacional do complexo (τ_R) e de difusão da água nas proximidades do íon (τ_D).	42
Figura 14 - Imagem esquemática de lipossoma como carreador de quelatos de Gd(III) distribuídos: (1) livres no seu citoplasma; (2) na superfície interna e externa e (3) em ambas opções (1, 2).	43
Figura 15 - Superfície ativa de PQs <i>core/shell</i> com grupos carboxílicos disponíveis para concentrar mais de um quelato de DOTA-Gd(III) com grupos aminas por conjugação direta e formar nanossondas bifuncionais óptico-magnéticas de PQs-DOTA-Gd(III).	44
Figura 16 - Imagem de células CHO (células de ovário de hamster chinês) marcadas com rodamina-concanavalina A (em vermelho - em A e D); PQs apenas com DPAA-Gd(III) (em verde, em B) e PQs com DPAA-Gd(III) e Mca (<i>maurocalcine</i> , em verde, em E). As sobreposições das imagens estão: imagem C (A e B) e imagem F (D e E).	46
Figura 17 - Imagem de cérebro de rato incubado com PQs-DPAA-Gd(III)-Mca (imagens superiores, em A) e com Dotarem (imagens inferiores, em B), por 15 min (imagens à esquerda)	

e ao longo de 4 h (imagens à direita), todas imagens de IRM ponderadas em T_1 foram obtidas a 7 T.....46

Figura 18 - Representação esquemática da nanossonda óptico-magnética desenvolvida por McAdams *et al.* (2017). Em A: esquema da preparação utilizando ligante linear DTPA complexados com quelatos de Gd(III). Em B: espectro de emissão dos PQs, linha em vermelho, e PQs-quelatos de Gd(III), linha em roxo ($\lambda_{exc} = 400$ nm). Em C: Imagens dos sistemas ponderadas em T_1 (3 T) mostrando aumento do contraste brilhante, de cinza ao branco, com o aumento da concentração de nanossonda.48

Figura 19 - Representação esquemática de transportadores da família GLUT e possíveis alterações nas células de câncer, como: aumento do número (GLUT-A, em azul), manutenção de quantidade e afinidade diferenciada por outras substâncias (GLUT-B, em vermelho), surgimento de novos (GLUT-C, em amarelo).....51

Figura 20 - Representação esquemática da nanossonda PQs-D-glicosamina (D-GN) desenvolvida por Ge *et al.* (2019). Em A: esquema da conjugação utilizando PQs carboxilados, EDC/NHS, D-GN. Em B: imagem de microscopia de fluorescência de células de câncer de mama (MCF-7), contraste à esquerda e sobreposição à direita.54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PQs	Pontos quânticos
QDs	<i>Quantum dots</i>
ACs	Agentes de contraste
NPs	Nanopartículas
IRM	Imagem por Ressonância Magnética
RMN	Ressonância magnética nuclear
T_1	Tempo de relaxação longitudinal
T_2	Tempo de relaxação transversal
DOTA	<i>1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetracetic acid</i>
DTPA	<i>acyclic diethylenetriamine -N,N',N',N''',N''''-pentaacetic acid</i>
PET	Tomografia por emissão de pósitron
Gd(III)	Íons gadolínio
^{18}F FDG	2-deoxi-D-glicose marcado com o emissor de pósitron ^{18}F
GLUT	Proteína transportadora de glicose
HeLa	Células de linhagem imortalizada de câncer cervical humano
D-GN	D-Glicosamina
nm	Nanômetro
UV	Ultravioleta
NIR	<i>Near Infrared</i>
BV	Banda de valência
BC	Banda de condução
E_g	<i>Bandgap</i> de energia
eV	Elétron-volt
h	Constante de Planck
e^-	Elétron
n	Frequência da luz
a_0	Raio de Bohr
CdSe	Seleneto de Cádmi
d	Diâmetro da nanopartícula
λ	Comprimento de onda
FWHM	<i>Full width at half maximum</i>
CdTe	Telureto de cádmio

AMS	Ácido mercaptossuccínico
CISTM	Cisteamina
RTf	Receptores de transferrina
Tf	Holo-transferrina humana
DBTRG	Célula de linhagem de glioblastoma recorrente
U87	Célula de linhagem de glioblastoma primária humano
ZnS	Sulfeto de Zinco
AF	Ácido fólico
5-FU	Droga anti-câncer, 5-fluorouracil
RF	Receptores de folato
MDA-MB-231	Célula de linhagem de adenocarcinoma de mama
T47D	Célula de linhagem de carcinoma ductal invasivo
MCF-7	Célula de linhagem de adenocarcinoma de mama
EDC	<i>N</i> -etil- <i>N'</i> -(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
Sulfo-NHS	<i>N</i> -hidroxisulfosuccinimida
FTIR	<i>Fourier-Transform Infrared Spectroscopy</i>
FCS	<i>Fluorescence Correlation Spectroscopy</i>
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
EFM	Ensaio Fluorescente em Microplacas
CT	Tomografia computadorizada
r_1	Relaxividade associadas à T_1
r_2	Relaxividade associadas à T_2
IOF	Imagem óptica-fluorescente
\mathbf{B}_0	Campo magnético
\mathbf{M}_0	Vetor de magnetização
\mathbf{M}_z	Magnetização resultante
\mathbf{B}_1	Campo magnético oscilante
τ_R	Tempo de rotação do complexo paramagnético
τ_D	Tempo de difusão da água nas proximidades do íon paramagnético
τ_M	Tempo de resistência da água coordena ao centro paramagnético
InP	Fosfeto de Índio
DPAA	<i>1,4,7-triazacyclononane-1,4-dibis(methylene)dipicolinic acid</i>

MCa	Peptídeo de penetração celular, <i>maurocalcine</i>
RGD	Arginina-glicina-ácido aspártico
DTDTPA	<i>2-[bis [2- [carboxymethyl-[2-oxo-2-(2-sulfanylethyl-amino) ethyl]amino] ethyl] amino] acetic acid</i>
CuInS ₂	Sulfeto de cobre e índio
λ_{exc}	Comprimento de onda de excitação
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
OPA	<i>Octylamine-polyacrylic acid</i>
PEG	Polietileno glicol
HMIT	<i>H⁺/myoinositol transporter</i>
SGLTs	Proteína transportadora de glicose dependente de Na ⁺²
NOS-1	Células de osteosarcoma humano
AMA	Ácido mercaptoacético

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL.....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1 PONTOS QUÂNTICOS	21
3.1.1 Fundamentos e Propriedades	21
3.1.2 (Bio)conjugação	32
3.2 NANOSSONDAS ÓPTICO-MAGNÉTICAS BASEADAS EM PONTOS QUÂNTICOS.....	34
3.2.1 Fundamentos da IRM e Agentes de Contraste Paramagnéticos	37
3.2.2 Nanossondas Óptico-Magnéticas Baseadas na Conjugação Direta de PQs-Quelatos de Gd(III)	44
3.3 GLICONANOPARTÍCULAS FLUORESCENTES.....	49
3.3.1 Aspectos Gerais da Captação da Glicose por Células de Câncer	49
3.3.2 Sondas Fluorescentes Baseadas em Pontos Quânticos e Glicose	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1 ARTIGO PUBLICADO	55
4.2 CAPÍTULO DE PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	57
4.3 ARTIGO EM PREPARAÇÃO	58
5 CONCLUSÕES	79
6 SÚMULA CURRICULAR	80
REFERÊNCIAS	83
APÊNDICES	92
APÊNDICE A - ARTIGO DE REVISÃO PUBLICADO NO JOURNAL OF THE BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY	92
APÊNDICE B - CAPÍTULO DE REVISÃO PUBLICADO NA ENCYCLOPEDIA OF NANOSCIENCE AND NANOTECHNOLOGY	93

1 INTRODUÇÃO

O câncer, assim como muitas doenças, é multifatorial e complexo, por isso, cada vez mais se busca desenvolver tecnologias e ferramentas que sejam capazes de propiciar uma maior compreensão dos vários mecanismos envolvidos em cada fase da doença, e como consequência, fornecer subsídios para que se possa propor aprimoramentos na forma de diagnosticá-lo e tratá-lo, de maneira personalizada (ALLAM; CAI; COSKUN, 2020; DI GREGORIO *et al.*, 2019).

As técnicas baseadas em fluorescência destacam-se nesse âmbito, uma vez que o uso de sondas fluorescentes pode proporcionar o monitoramento de processos biológicos, com especificidade química e em tempo real, tanto em níveis molecular e celular quanto em organismos inteiros. Sendo possível quantificar e visualizar as interações entre biomoléculas na superfície ou no interior celular, bem como propiciar o acompanhamento da dinâmica de atividades biológicas de forma altamente sensível. Uma aplicação eficiente das técnicas baseadas em fluorescência está, portanto, intrinsecamente relacionada à ação do fluoróforo utilizado (CHEN; XIAN, 2020; H. R; SCHIFFMAN; BALAKRISHNA, 2018; WANG *et al.*, 2021).

Dentro desse contexto, os nanocristais de semicondutores, também chamados de pontos quânticos (PQs), ou *quantum dots* (QDs), vêm se destacando por suas propriedades ópticas e físico-químicas singulares, tais como: (i) excelente resistência à fotodegradação, que permite realizar estudos e monitorar processos biológicos por tempos prolongados e (ii) superfície quimicamente ativa que viabiliza conjugações com biomoléculas, conferindo diferentes especificidades, como interação com anticorpos, lectinas, proteínas e carboidratos, bem como a outros compostos que possuam grupos funcionais, tais como fármacos, agentes de contraste (ACs) e outras nanopartículas (NPs) (ALBUQUERQUE *et al.*, 2021; CABRAL FILHO *et al.*, 2015, 2018; CUNHA *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2003).

Então, os PQs vêm sendo amplamente aplicados em ensaios bioanalíticos, biossensores, para aquisição de imagens *in vitro* de células e tecidos, imagens *in vivo* de pequenos animais, dentre vários outros estudos (ALADESUYI; OLUWAFEMI, 2020; CARVALHO *et al.*, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2021; SNEE, 2020; TABISH *et al.*, 2021). Além disso, nos últimos anos, com a crescente utilização de NPs no estudo do câncer, tem havido uma busca pela associação de PQs a outros compostos com a finalidade de desenvolver nanossistemas teragnósticos cada vez mais funcionais, como aqueles que contêm nanoestruturas que apresentem sinais duais para que sejam monitoradas por técnicas

complementares, a fim de favorecer uma visão mais completa dos processos biológicos. Nesse contexto, os PQs vêm sendo associados a compostos magnéticos, a fim de gerar nanossondas com propriedades ópticas e magnéticas, que possam ser exploradas tanto em análises por fluorescência como em imagem por ressonância magnética (IRM), por exemplo (ALBUQUERQUE *et al.*, 2021; VILLALVA *et al.*, 2021).

Na IRM, as imagens são formadas a partir de sinais de RMN (ressonância magnética nuclear) dos prótons (^1H) existentes nos tecidos, gerados por uso de gradientes de campo magnético e pela determinação dos tempos de relaxação (longitudinal e transversal) do *spin* nuclear (T_1 e T_2 , respectivamente) (GIL; GERALDES, 2002). Os tempos de relaxação do *spin* nuclear refletem a mobilidade local das moléculas de água presentes nos tecidos e são afetados pela vizinhança, permitindo visualizar e distinguir estruturas normais de patológicas (DAMADIAN, 1971; LAUTERBUR, 1973). A IRM fornece imagens com alta definição anatômica de tecidos profundos, mas não apresenta sensibilidade ou especificidade química para investigação de eventos em nível celular. Buscando-se uma maior sensibilidade e imagens com melhor contraste, pode-se utilizar ACs na IRM, cuja eficiência é medida em termos da “relaxividade”. Essa grandeza indica a capacidade dos ACs em reduzir os tempos de relaxação dos prótons das moléculas de água que se encontram próximas a este (WAHSNER *et al.*, 2019). Um dos ACs mais explorados na modalidade T_1 é o derivado do DOTA (*1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetracetic acid*) (AIME; BOTTA; ERMONDI, 1992).

Deste modo, o desenvolvimento de novos ACs que diminuam ainda mais os tempos de relaxação dos ^1H , continua a ser objeto de estudo. Uma das abordagens que tem sido estudada para aumentar a relaxividade dos ACs é o uso de sistemas nanoparticulados, os quais podem ainda ser capazes de aumentar a concentração local de ACs, de maneira mais eficiente (CASPANI *et al.*, 2020; STUEBER *et al.*, 2021; VERWILST *et al.*, 2015). Logo, o desenvolvimento de nanossistemas óptico-magnéticos baseados em PQs pode propiciar investigações complementares sobre a biologia do câncer, combinando-se vantagens das técnicas por fluorescência com as da IRM, favorecendo também a preparação de ACs nanoparticulados com propriedades otimizadas.

Por outro lado, ainda inspirando-se nas técnicas tradicionais de diagnóstico do câncer, nas potencialidades das metodologias baseadas em fluorescência e nos desafios ainda presentes na compreensão dos processos carcinogênicos, uma molécula de particular interesse é a glicose. Otto Warburg observou que as células de câncer apresentam uma maior

captação da glicose (efeito Warburg), devido ao uso da glicólise aeróbica para produzir energia, contrastando com o que ocorre nas células saudáveis (FADAKA *et al.*, 2017; MULLAPUDI *et al.*, 2020). O efeito Warburg vem sendo explorado clinicamente na tomografia por emissão de pósitron (PET), que combina um análogo de glicose, a 2-deoxi-D-glicose, com ^{18}F radioativo (^{18}F FDG), o qual é absorvido majoritariamente pelos tecidos tumorais, em relação aos saudáveis, favorecendo um diagnóstico, estadiamento e monitoramento de terapia tumoral (GALLAMINI; ZWARTHOED; BORRA, 2014; MADDALENA *et al.*, 2015).

Há, no entanto, muito ainda o que se compreender sobre a relação da glicose com o câncer, para que métodos de diagnóstico e terapia cada mais efetivos e personalizados possam ser propostos, uma vez que a captação desse carboidrato pode, por exemplo, depender do tipo de análogo da glicose utilizado, da linhagem celular e até mesmo da atuação diferencial de diferentes transportadores de glicose (GLUTs), que em geral atuam para suprir a maior demanda por esse carboidrato (BARRON *et al.*, 2016; KE *et al.*, 2021; PAJAK *et al.*, 2019). Assim, nanossondas baseadas na associação de PQs e glicose são ferramentas atraentes para fortalecer o entendimento dos mecanismos de captação desse carboidrato, em nível celular, por diferentes linhagens celulares, bem como colaborar para compreender a interação de agentes terapêuticos nanoparticulados com esses sistemas biológicos (KOHNHORST *et al.*, 2017; KOLENC; QUINN, 2019).

Dentro desse contexto, nessa Tese, apresentamos: (i) um artigo experimental, que engloba o desenvolvimento e as caracterizações de uma nanossonda óptico-magnética baseada na conjugação direta de PQs hidrofílicos com quelatos DOTA-Gd(III), publicado na revista *Scientific Reports*; (ii) um capítulo de protocolo experimental sobre a utilização da resazurina em ensaios de viabilidade celular com PQs e (iii) um artigo experimental, em preparação para submissão, sobre o desenvolvimento de uma nova gliconanopartícula baseada em PQs e no análogo da glicose, a D-glicosamina. Por fim, também se encontra no apêndice dois trabalhos de co-autoria, sendo um deles, um artigo de revisão sobre (bio)conjugação de PQs, publicado na revista *Journal of the Brazilian Chemical Society* e outro, um capítulo de revisão, publicado na *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, sobre nanossondas óptico-magnéticas constituídas por PQs.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver nanossondas bifuncionais constituídas por PQs e quelatos de Gd(III), bem como PQs e D-glicosamina, para aplicações no estudo da biologia do câncer.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar PQs carboxilados e caracterizá-los por técnicas ópticas;
- Preparar quelatos paramagnéticos do tipo DOTA-Gd(III) e avaliar a eficiência de complexação, bem como a sua resistência à transmetalção;
- Desenvolver nanossistemas constituídos pelos quelatos de Gd(III) e PQs, por interação covalente, e caracterizá-los por técnicas ópticas e relaxométricas;
- Estudar a interação das nanossondas óptico-magnéticas com células de linhagem imortalizada de câncer cervical humano (HeLa);
- Desenvolver nanossondas baseadas na conjugação covalente de PQs com a D-glicosamina (D-GN);
- Estabelecer uma metodologia de avaliação da eficiência e especificidade das gliconanopartículas desenvolvidas baseada na interação carboidrato-lectina;
- Caracterizar as gliconanopartículas por técnicas ópticas;
- Estudar a interação das nanossondas PQs-D-GN com células HeLa, como modelo.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PONTOS QUÂNTICOS

3.1.1 Fundamentos e Propriedades

Na década de 60, Richard Feynman, físico americano, ministrou uma palestra (*There's Plenty of Room at the Bottom*) proferindo que não há princípios físicos que possam impedir a escrita de todos os volumes da Enciclopédia Britânica na cabeça de um alfinete. Desde então, hipotetizou-se sobre a possibilidade de manipulação da matéria em escala atômica. O físico não imaginava que essa idealização culminaria em uma das áreas de maior domínio (bio)tecnológico, atrativo e de elevado crescimento, que é a nano(bio)tecnologia, nomeada primeiramente por Norio Taniguchi somente em 1974 (DAVIDOVITS, 2019; MARTINS; TRINDADE, 2012).

A nanotecnologia tem desfrutado de grande sucesso, devido ao contínuo avanço tecnológico e científico do século XXI, com marco nas primeiras descobertas de rotas sintéticas de nanomateriais até o melhoramento dos equipamentos, como os microscópios (os quais possibilitaram a caracterização dos sistemas nanoestruturados desenvolvidos) (AFTAB *et al.*, 2021; FORCHHEIMER *et al.*, 2014; QIAO; LIU; MAX LU, 2017). Essa área do conhecimento também tem evoluído como Ciência e consiste em uma grande área multidisciplinar que engloba desde a compreensão das propriedades das nanoestruturas até o desenvolvimento de nanomateriais duais e até multifuncionais com grande versatilidade e aplicabilidade (DAVIDOVITS, 2019; STEVENS; ETHERINGTON, 2019).

No contexto do desenvolvimento e síntese de nanomateriais, há nanopartículas (NPs) que vêm atraindo o interesse para atuarem como nanossondas fluorescentes, tais como os Pontos Quânticos (PQs), ou *Quantum dots* (QDs), os quais vêm se destacando nas pesquisas de Ciências Básicas à Aplicadas, bem como na área comercial, devido a sua vasta aplicação em diversas áreas do conhecimento, dentre elas: a Medicina e a Biologia (RIBEIRO *et al.*, 2021; STEVENS; ETHERINGTON, 2019; VILLALVA *et al.*, 2021).

No início da década de 90, segundo teorias de Efros e Brus, foi identificado que os PQs exibem propriedades ópticas distintas dos mesmos materiais semicondutores quando estão em escala macroscópica (*bulk*). Em geral, os PQs são nanocristais com diâmetros de *ca.* 2 a 10 nm, onde 1 nm refere-se à bilionésima parte de um metro ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). As propriedades óptico-eletrônicas desses PQs são fortemente dependentes do seu tamanho

(MARTINS; TRINDADE, 2012; SMITH; GAO; NIE, 2007). Além do tamanho, o perfil espectral de absorção e fluorescência dos PQs são dependentes da composição desses nanocristais. E, no geral, as características óptica dos PQs estão intrinsecamente relacionadas ao fenômeno/efeito de confinamento quântico (MICHALET; BENTOLILA; WEISS, 2008).

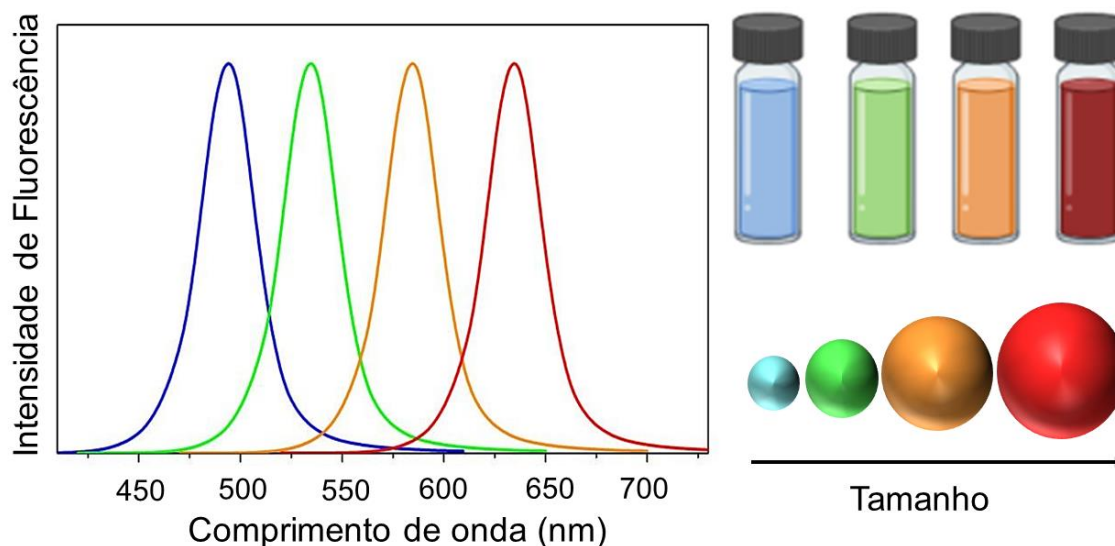
Alterando-se a composição química dos PQs e/ou o seu tamanho, pode-se sintonizar sua emissão de fluorescência em vários comprimentos de onda, varrendo o espectro eletromagnético, desde regiões próximas ao ultravioleta (UV), luz visível (400-700 nm), até o infravermelho próximo (*Near Infrared* - NIR). Considerando PQs de mesma composição química, os nanocristais menores, vão emitir fluorescência em menores comprimentos de onda (em direção à região UV), enquanto os PQs de tamanhos maiores, vão ter emissão em maiores comprimentos de onda (em direção à região do NIR), como mostra a Figura 1 (SMITH; GAO; NIE, 2007).

Em termos energéticos, os sólidos semicondutores apresentam uma banda de valência (BV) separada de uma banda de condução (BC) por uma diferença de energia denominada de *bandgap* (E_g). Geralmente, essa diferença de energia (E_g) entre as bandas é expressa em eV (elétron-volt) e está relacionada ao mínimo de energia necessária para excitação dos elétrons, para passarem da BV para a BC (Figura 2). Tipicamente os sólidos semicondutores apresentam uma E_g menor que *ca.* 3 eV, ou seja, utilizando-se luz no UV ou visível pode-se promover elétrons da BV para a BC à temperatura ambiente (SMITH; GAO; NIE, 2007).

Ainda nesse contexto, quando há excitação dos elétrons, ao incidir energia na forma de fótons sob o material, eles migram da BV (menor energia) e vão para a BC (maior energia), deixando um “buraco” (h^+) na BV, formando o *éxciton*, também chamado de par elétron-buraco ($e^- h^+$), movendo-se de forma dependente, devido à atração de Coulomb¹, como mostra a Figura 2 (BRUS, 1984; CHUKWUOCHA; ONYEAJU; HARRY, 2012; MICHALET *et al.*, 2005). Os fenômenos que estão esquematizados na Figura 2 que culminam na emissão de luz (fluorescência) ocorrem em tempo da ordem de nanossegundos nesses materiais. Na recombinação excitônica, os elétrons excitados, localizados na BC, retornam ao estado fundamental se recombinando com os buracos na BV, sendo esse fenômeno observado tanto na escala nanométrica quanto no *bulk* (sólido macroscópico).

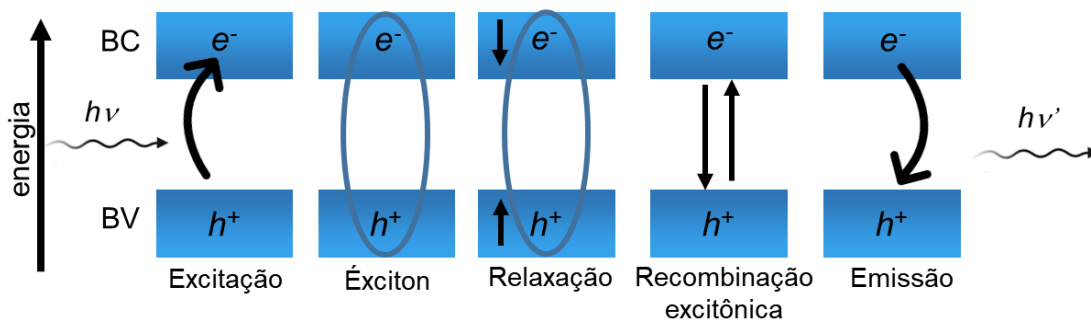
¹ Entende-se por atração de Coulomb como uma interação eletrostática entre espécies de carga positiva e negativa, que os mantém a certa distância. É isso que mantém o par elétron-buraco (éxciton) se movendo de forma dependente.

Figura 1 - Pontos quânticos (PQs) podem emitir fluorescência em vários comprimentos de onda do espectro de luz visível. Variando-se o tamanho dos nanocristais, quanto menor forem os PQs, menores serão os comprimentos de onda de fluorescência (em direção ao ultravioleta), e quanto maior forem os PQs, em maiores comprimentos de onda ocorrerá a emissão (em direção ao infravermelho próximo).



Fonte: Autoria própria.

Figura 2 - Esquema didático de emissão de fluorescência em semicondutores: ilustra desde a excitação do elétron (e^-), por radiação eletromagnética ($h\nu$), quando sai da banda de valência (BV) para a banda de condução (BC), formando um *éxciton*, até a relaxação e a recombinação excitônica, que culmina na emissão de fluorescência ($h\nu'$). Onde: h^+ representa o buraco gerado na BV, pela excitação do elétron; $h\nu$ é a energia (E) de um fóton capaz de excitar a amostra (onde h é a constante de Planck e ν é a frequência da luz).

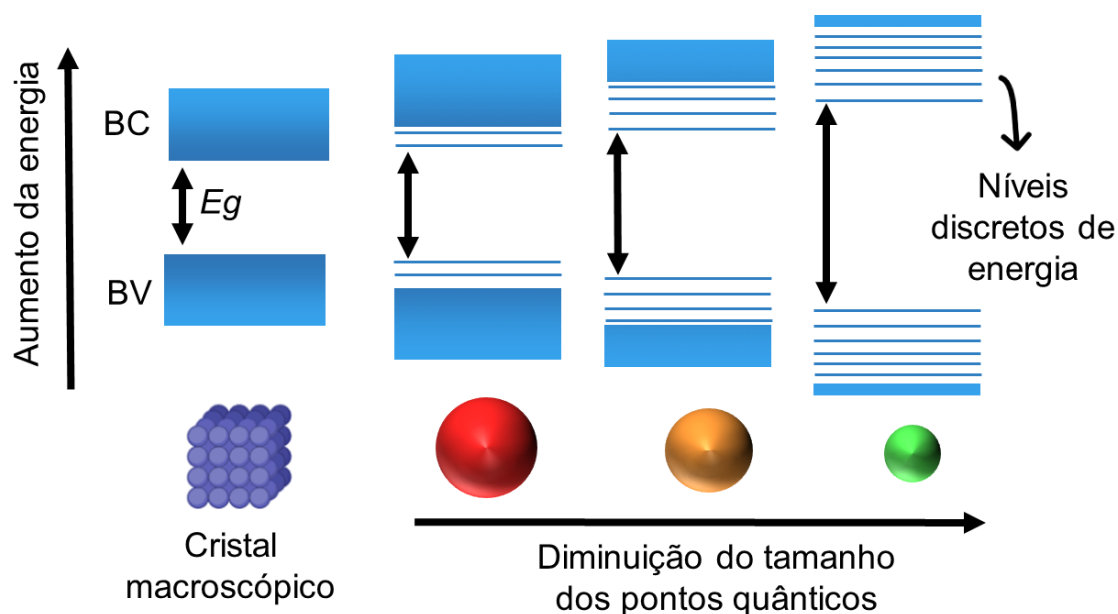


Fonte: Autoria própria.

Quando um semicondutor está em forma de cristais macroscópicos, há uma variedade de possíveis estados energéticos que estão distribuídos praticamente de modo contínuo (Figura 3). No entanto, quando as três dimensões do material se tornam fisicamente menores que o raio de Bohr (a_0)², há confinamento quântico, sendo a nanopartícula de semicondutor chamada de PQ. Nessa configuração, os materiais semicondutores apresentam distintas propriedades fotoluminescentes (BENTOLILA; MICHALET; WEISS, 2008).

O a_0 é característico de cada semicondutor, podemos exemplificar com o cristal macroscópico do seleneto de cádmio (CdSe) que tem a_0 de cerca de 5 nm, então, logo, apenas podemos considerar PQ de CdSe se o diâmetro dessa nanopartícula for inferior à aproximadamente 10 nm. Além disso, quando o material está em um regime de confinamento quântico tridimensional (x, y e z), ou seja, a medida em que possuem menor tamanho, os seus estados energéticos tornam-se discretos, como mostra a Figura 3, assemelhando-se a átomos artificiais, por isso, também são chamados de tal forma (BENTOLILA; MICHALET; WEISS, 2008; SANTOS; FARIAS; FONTES, 2008).

Figura 3 - Níveis discretos de energia e aumento da energia do *bandgap* (E_g) com a redução do tamanho das nanopartículas de semicondutores quando em regime de confinamento quântico.



Fonte: Autoria própria.

² Em analogia aos átomos de hidrogênio (composto por um elétron e um próton), o raio de Bohr é definido como a distância média entre o elétron e o buraco do *éxciton* e é típico de cada semicondutor.

Sendo assim, o regime de confinamento quântico, além de levar a uma discretização dos estados energéticos, desempenha um papel chave na relação do tamanho dos PQs com as suas propriedades ópticas. Isso porque outra consequência do fenômeno de confinamento é o aumento do E_g do nanocristal em função da diminuição do tamanho dos PQs (Figura 3) (YU *et al.*, 2004). Visto que: $E_g \propto 1/d^2$ (sendo, d o diâmetro da nanopartícula) e $E_g \propto 1/\lambda$ (sendo, λ o comprimento de onda de emissão de fluorescência), então “ d ” e “ λ ” são inversamente proporcionais a E_g . Enquanto, PQs menores, vão emitir em direção à região espectral do UV (comprimentos de onda menores), devido à maior E_g . Já os PQs maiores emitem fluorescência mais para a região do NIR (comprimentos de onda maiores), por apresentarem menor E_g (SANTOS; FARIAS; FONTES, 2008).

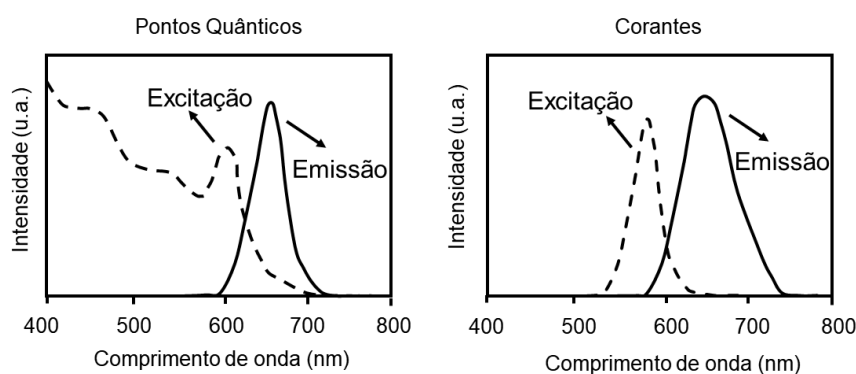
Essas características ópticas que os PQs adquirem quando estão em escala “nanométrica”, os tornam ferramentas versáteis para aplicações biomédicas (WAGNER *et al.*, 2019). Assim como a redução do tamanho à essa ordem de magnitude confere aos PQs propriedades ópticas únicas, e também viabiliza a interação desses nanocristais com os sistemas biológicos, por apresentam estruturas e processos dinâmicos ocorrendo também nessa escala nanométrica (RADAIC *et al.*, 2016). O monitoramento da interação dos nanomateriais com estruturas biológicas vem impulsionando o desenvolvimento de novas tecnologias (RADAIC *et al.*, 2016). Nesse contexto, as técnicas baseadas em fluorescência são umas das que mais se destacam, como microscopias, fluoroensaios e citometria de fluxo (MONTEIRO *et al.*, 2020a; RADAIC *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2021).

Ao comparar os PQs com os corantes convencionais, esses nanocristais apresentam vantajosas características que os tornam interessantes para aplicabilidade, tais como: (i) a fluorescência dos PQs pode ser excitada por uma única fonte de luz (os corantes necessitam de uma fonte de luz de excitação em comprimento de onda específico), devido ao seu estreito espectro de absorção, (Figura 4); (ii) ao variar o tamanho da partícula, emitem fluorescência em diferentes regiões do espectro, possibilitando imagens multicoloridas simultaneamente e (iii) são bastante resistentes à fotodegradação (permitindo estudos de monitoramento de eventos biológicos por tempos prolongados de análises e mantendo alta intensidade de fluorescência, enquanto corante rapidamente fotodegradam), como observamos na Figura 5 (CABRAL FILHO *et al.*, 2018; RESCH-GENGER *et al.*, 2008; WANG; LIU; LAN, 2019).

Quando os PQs são aplicados como nanossondas fluorescentes, suas propriedades ópticas podem aprimorar a versatilidade das técnicas de análise baseadas em fluorescência, as quais são altamente sensíveis, conferindo também variadas especificidades bioquímicas,

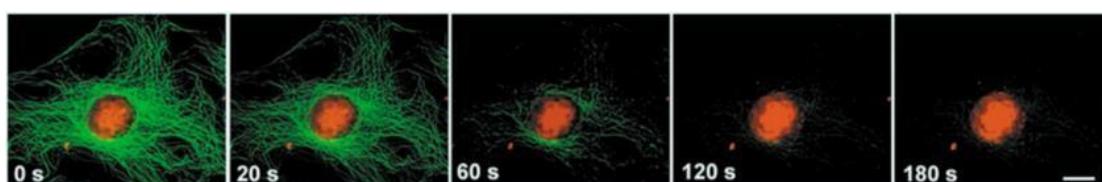
dependendo da biomolécula associada a eles, e viabilizando o estudo e monitoramento prolongado de dinâmica de eventos biológicos, através de aquisição de imagens ou detecção de sinais fluorescentes (ALLAM; CAI; COSKUN, 2020; CAI *et al.*, 2021; SAMBRANO *et al.*, 2018; WEGNER; HILDEBRANDT, 2015).

Figura 4 - Representação esquemática de espectros de absorção e emissão de pontos quânticos (PQs) e corantes orgânicos. Enquanto PQs podem ser excitados em vários comprimentos de onda, os corantes convencionais precisam de comprimentos de onda específicos. Os espectros de emissão dos corantes também são mais largos.



Fonte: Autoria própria.

Figura 5 - Excepcional resistência dos pontos quânticos (PQs) à fotodegradação por longo período. Observa-se que o núcleo permaneceu marcado pelos PQs, em vermelho ($\lambda_{em} = 630$ nm), durante o estudo, enquanto os microtúbulos marcados pelo corante orgânico (AlexaFluor), em verde, fotodegradaram e foram detectáveis até 120 segundos.



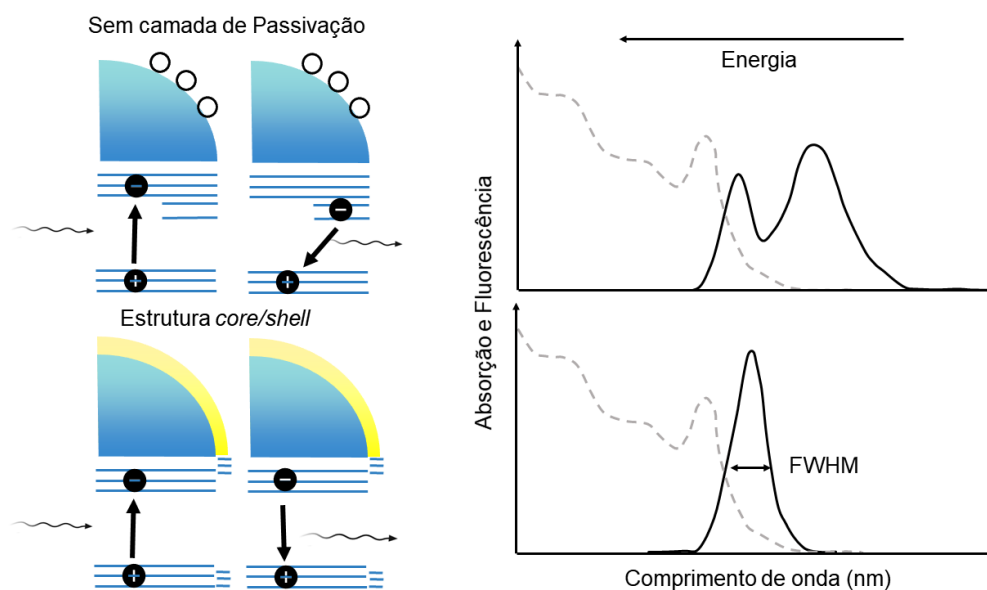
Fonte: Adaptada de WU *et al.*, (2003).

Como observamos até aqui, há uma série de vantagens associadas à redução do tamanho desses nanomateriais, com isso também temos um aumento da área superficial em relação ao volume. Esse aspecto contribui para que átomos com ligações não compartilhadas, conhecido como defeitos de superfície, como ilustrado didaticamente na Figura 6, exerça um papel relevante nas propriedades ópticas dos PQs. Tais defeitos interferem na intensidade de fluorescência dos PQs, porque eles geram níveis de energia entre a BV e a BC, chamados de níveis intermediários de energia, os quais favorecem a perda de energia do elétron pouco a pouco ao se deslocar da BV para a BC (MARTINS;

TRINDADE, 2012). Do contrário, se não houvesse ligações não-compartilhadas, ou seja, essas “armadilhas” dos níveis de energia intermediários oriundos dos defeitos de superfície, os elétrons iriam se deslocar diretamente da BV para a BC, garantindo boa intensidade de fluorescência. Desta forma, com esses defeitos de superfície, observa-se redução da qualidade e intensidade de emissão de fluorescência pelos PQs (Figura 6).

Algumas alternativas são propostas para solucionar ou reduzir os impactos dos defeitos de superfície. Uma possibilidade se baseia na formação de uma camada ao redor do núcleo do nanocristal. Para isso, utilizando um outro material semiconductor, geralmente de maior E_g que o semiconductor que compõe o núcleo do PQ, cresce-se uma “casca” ao redor no núcleo, formando uma estrutura núcleo/casca (*core/shell*). Isso reduz os defeitos que interfeririam na qualidade da emissão dos PQs e ainda aprimora as propriedades fluorescentes, reduzindo a largura à meia altura (FWHM, do inglês *full width at half maximum*) dos espectros de emissão, estreitando-o para larguras menores que *ca.* 60 nm (a depender do comprimento de onda de emissão) e otimizando a intensidade de fluorescência, como observamos na Figura 6. Em geral, os espectros de emissão de PQs maiores, que emitem em direção ao NIR, apresentam maior FWHM (MARTINS; TRINDADE, 2012).

Figura 6 - Aprimoramento das propriedades fluorescentes dos pontos quânticos ao formar a camada de passivação, o *shell*. Sem o *shell*, os elétrons interagem com as “armadilhas” (níveis intermediários de energia) formadas pelos defeitos de superfície. Com a estrutura *core/shell* há um melhoramento da qualidade e intensidade de emissão de fluorescência, com estreitamento da largura do espectro (FWHM). À direita, a linha cinza representa os espectros de absorção e a linha preta os de emissão.



Fonte: Autoria própria.

Diante desse contexto, observamos o quanto é importante a etapa de formação da nanoestrutura dos PQs. Por isso, eles têm sido sintetizados com o interesse em melhorar as suas características ópticas e a estabilidade química, para a obtenção de NPs aprimoradas, apresentando estreito FWHM, população homogênea em termos de tamanho e alta intensidade de emissão, e isso inclui etapas para a redução de defeitos de superfície (H. R; SCHIFFMAN; BALAKRISHNA, 2018; SHI *et al.*, 2020; SOUSA *et al.*, 2018; STEVENS; ETHERINGTON, 2019).

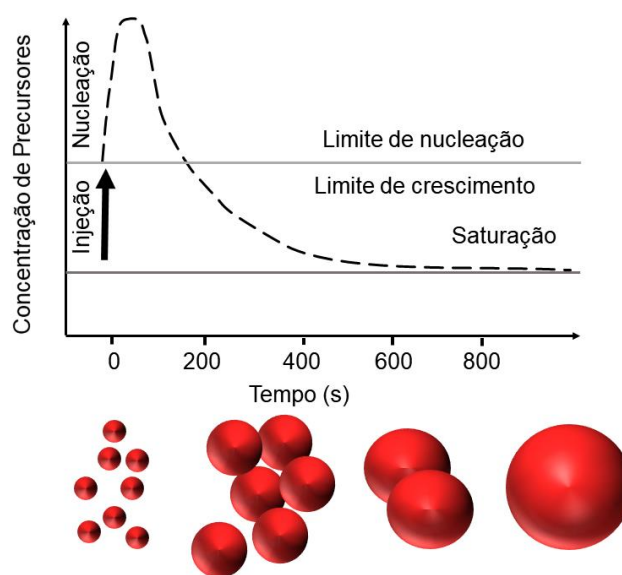
Um dos procedimentos de síntese dos PQs pode ser realizado baseando-se no método *bottom-up*, o qual utiliza técnicas de química coloidal, que consiste na reação de precipitação de NPs (fase dispersa), preferencialmente em água (meio de dispersão ou dispersante). As primeiras descrições sobre as sínteses de PQs em meio aquoso foram divulgadas por Rogach e colaboradores (2007), as quais apresentam algumas vantagens, tais como: o custo reduzido e praticidade de preparação, inclusive pode dispensar etapas posteriores para dispersão em meio aquoso, pois já gera um produto hidrofílico, sendo portanto aplicável diretamente em estudos envolvendo interação com sistemas biológicos (AL *et al.*, 2007; ALLAM; CAI; COSKUN, 2020; QIAO; LIU; MAX LU, 2017).

Em relação à composição dos PQs, eles podem ser constituídos por vários tipos de materiais semicondutores baseando-se em combinações de átomos da tabela periódica. Dentre os principais PQs binários, temos os baseadas nos grupos: II – VI, III – V ou IV – VI (WEGNER; HILDEBRANDT, 2015). Podemos exemplificar PQs de CdTe (Telureto de cádmio) ou CdSe, como tipos de PQ binário que são do grupo II – VI (DROZD *et al.*, 2016; MONTEIRO *et al.*, 2020b). Atualmente, PQs também têm sido preparados combinando-se mais elementos à nanoestrutura, resultando nos PQs ternários e quaternários, os quais apresentam potencial para emissão na região do NIR (PEREIRA *et al.*, 2019a; WU *et al.*, 2018). Dentre esses novos PQs podemos citar as combinações de Cobre-Índio-Sulfeto (CuInS₂), que são PQs ternários do grupo I-III-VI, porém as propriedades ópticas desses nanocristais ainda são alvos de aprimoramento (ALADESUYI; OLUWAFEMI, 2020; TSOLEKILE *et al.*, 2017).

De forma geral, a síntese dos PQs envolve: uma primeira etapa, a nucleação, iniciada com rápida injeção rápida do precursor calcogênio (como, telúrio, selênio) em uma solução contendo elevada concentração de monômeros precursores (como, cádmio, zinco). À medida em que a síntese vai acontecendo, os pontos iniciais de nucleação vão se formando, e a concentração dos precursores e a velocidade de reação vão diminuindo, como ilustra a Figura

7. Essa etapa inicial é determinante no número total de PQs, bem como de tamanho médio deles, visto que os núcleos pré-formados crescem isoladamente, até o consumo total dos reagentes precursores. Durante a formação de NPs, elas ficam suspensas, como um coloide, e para que não agreguem umas às outras e precipitem, se utiliza os agentes estabilizantes (como o ácido mercaptossuccínico – AMS), os quais desligam-se para permitir o crescimento, e ligam-se para impedir aglomeração (comportamento dinâmico *on/off* em torno dos nanocristais) (MARTINS; TRINDADE, 2012).

Figura 7 - Representação esquemática do processo de nucleação, crescimento e formação de nanopartículas isoladas de semicondutores.

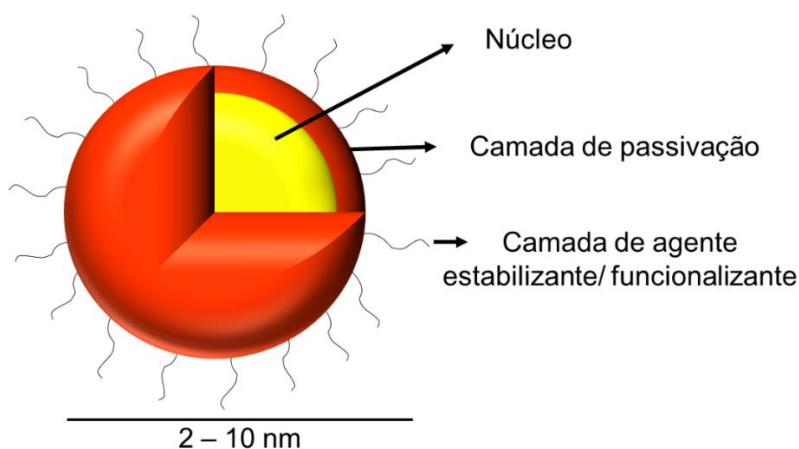


Fonte: Autoria própria.

Dentre os agentes estabilizantes mais utilizados nas suspensões coloidais de PQs coloidais hidrofílicos, a maioria apresenta um grupamento tiol ($-SH$), visto que o enxofre pode atuar como precursor da camada de passivação, ligando-se ao cádmio ou zinco, por exemplo. Eles também conferem carga às NPs, mantendo-as suspensas e afastadas umas das outras, por isso são chamados de estabilizantes. Além do tiol, esses agentes em geral apresentam outros grupos funcionais para atuar como ponte química para a interação dos nanocristais com (bio)moléculas, por exemplo. O tipo de interação dependerá dos grupos funcionais (ácidos carboxílicos ou aminas) dos agentes estabilizantes/funcionalizantes, como exemplo podemos citar a cisteamina (CISTM), a qual disponibiliza grupos aminas e carga positiva aos PQs (em pH próximo ao fisiológico), enquanto o AMS expõe grupos carboxílicos e carga negativa na superfície dos PQs (PEREIRA *et al.*, 2019a).

Como resultado da síntese, tipicamente os PQs apresentam uma nanoestrutura composta por camadas, sendo: (1) o núcleo que determina sua emissão; (2) a camada de passivação que determina a intensidade e qualidade da emissão e; (3) a camada mais externa formada pelos agentes estabilizantes/funcionalizantes, que determina a estabilidade química e o grau de funcionalidade para interação com compostos, conferindo também versatilidade para aplicações envolvendo sistemas biológicos de interesse (Figura 8).

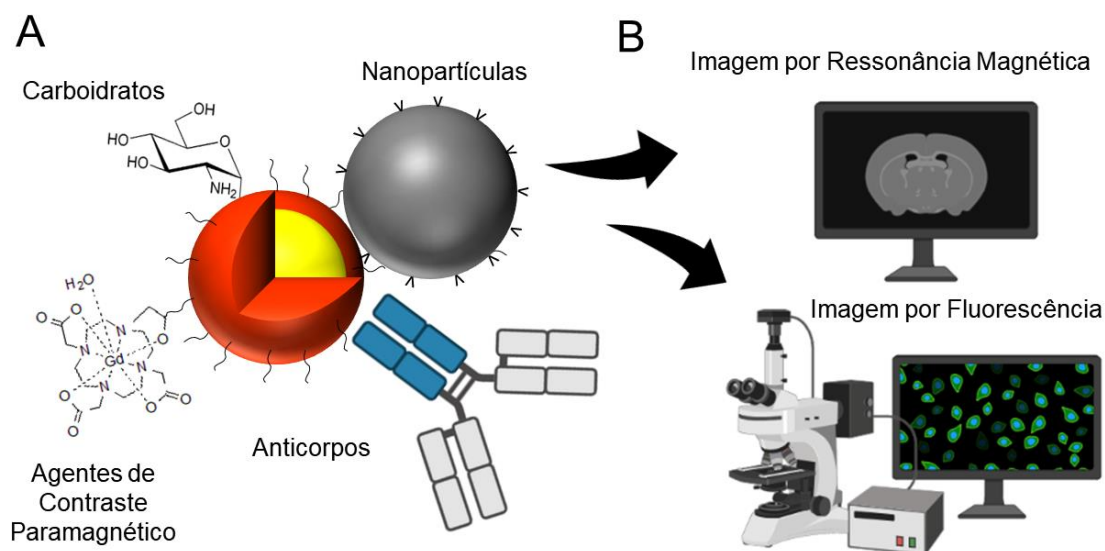
Figura 8 - Esquema da nanoestrutura de um ponto quântico que possui tamanhos típicos de 2 a 10 nm, ilustrando núcleo, camada de passivação e de agentes estabilizantes/funcionalizantes.



Fonte: Autoria própria.

Nas aplicações biomédicas utilizando os PQs como nanossondas, a camada mais externa é importante por ser responsável pela superfície ativa, expondo os grupos funcionais para viabilizar a interação desses nanocristais com (bio)moléculas, tais como carboidratos, anticorpos, proteínas e lectinas. Elas vão dar um direcionamento biológico mais específico à nanossonda bifuncional resultante, sendo útil em estudos de processos biológicos por meio de análises baseadas em fluorescência, como ilustra a Figura 9. Essa superfície ativa e funcional ainda permite a associação dos PQs à agentes de contraste (ACs), como os quelatos paramagnéticos de íons Gd(III), e também outras NPs, como as magnéticas de óxido de ferro, unindo em uma única nanossonda, mais um sinal para atuar em análises por fluorescência e na modalidade de IRM, como esquematizado na Figura 9 (ALBUQUERQUE *et al.*, 2021; CABRAL FILHO *et al.*, 2016; CUNHA *et al.*, 2018; MONTEIRO *et al.*, 2020b; ZANDWIJK *et al.*, 2021). Portanto, PQs têm atraído o interesse de pesquisadores das Ciências da Vida, sendo utilizados tanto em ensaios *in vitro* com células e tecidos quanto em estudos sistêmicos com pequenos animais (CARVALHO *et al.*, 2019; DÍAZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2020; MULLAPUDI *et al.*, 2020; VILLALVA *et al.*, 2021).

Figura 9 - Esquema de possíveis (bio)conjugações de um ponto quântico (A), com possibilidade para aplicação em imagem por fluorescência e/ou ressonância magnética como uma nanossonda óptico-magnética versátil (B), quando associada com agentes paramagnéticos ou nanopartículas de óxido de ferro, por exemplo.



Fonte: Autoria própria.

Na área da oncologia, os PQs têm também contribuído significativamente, agregando informações sobre o padrão de internalização de biomoléculas por diferentes linhagens de células de câncer, o monitoramento da dinâmica metabólica dessas substâncias-alvo, informando o quão essenciais são ou não para a manutenção celular, bem como com a identificação de biomarcadores em tecidos. Esses estudos são alicerces para avanços no diagnóstico específico e para terapias mais precisas (ALLAM; CAI; COSKUN, 2020; BALZAROTTI *et al.*, 2017; CABRAL FILHO *et al.*, 2016; H. R; SCHIFFMAN; BALAKRISHNA, 2018; MONTEIRO *et al.*, 2020b; WANG; LIU; LAN, 2019).

Um exemplo de trabalho que exemplifica a contribuição dos PQs no aspecto celular do câncer é o de Cabral Filho *et al.* (2016), que observaram uma maior expressão e taxa de internalização e reciclagem de receptores de transferrina (RTfs) na linhagem de células DBTRG (glioblastoma recorrente) do que nas células U87 (glioblastoma primária humano), quando incubadas com PQs de CdTe hidrofílicos conjugados covalentemente com a holo-transferrina humana (Tf). Essa análise indicou que os RTf possuem papel importante na manutenção do câncer e na recorrência do tumor (como visto na resposta do DBTRG) (CABRAL FILHO *et al.*, 2016).

Um outro estudo, utilizou os PQs como nanossonda para a entrega direcionada de fármacos intracelularmente contra a progressão do câncer. Bwatanglang *et al.* (2016) encapsularam PQs de ZnS dopados com manganês em biopolímero de quitosana e conjugaram com ácido fólico (AF) para melhor direcionamento e captação intracelular de uma droga anti-câncer, 5-fluorouracil (5-FU), em tecidos malignos via receptores de folato (RF). O nanossistema induziu níveis mais altos de apoptose no estudo *in vitro* da linhagem de adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231) do que o 5-UF isoladamente, bem como, reduziu mais o tamanho tumoral e proporcionou menor desenvolvimento de metástase nos ensaios *in vivo* em camundongos (BWATANGLANG *et al.*, 2016). Em um outro trabalho também com o AF, Monteiro *et al.* (2020) utilizaram PQs de CdTe associados a essa molécula com o objetivo de estudar a expressão, internalização e reciclagem de RFs em três linhagens de células de câncer de mama, sendo: T47D (carcinoma ductal invasivo) a que mais captou a nanossonda, seguida das células MDA-MB-231 (adenocarcinoma), contrastando com a captação praticamente ausente pelas células MCF-7 (adenocarcinoma) (MONTEIRO *et al.*, 2020b).

Nesse contexto, observamos a importância das associações de PQs, (bio)moléculas e outros compostos, seja com sinal para outras modalidades de imagem ou outras potencialidades, como a ação terapêutica incluída em um só sistema, e assim, salientamos a necessidade de um processo de conjugação eficiente para garantir dados confiáveis e ampla aplicabilidade desses nanocristais fluorescentes em estudos de sistemas biológicos.

3.1.2 (Bio)conjugação

A ampla aplicabilidade dos PQs nas Ciências da Vida deve-se primordialmente as suas propriedades ópticas (DÍAZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2020; PLESKOVA; MIKHEEVA; GORNOSTAEVA, 2018). Porém, outro fator essencial que confere versatilidade e especificidade para os PQ é o processo de conjugação, que consiste na sua associação com: (i) (bio)moléculas (tais como aminoácidos, carboidratos, lectinas e anticorpos); (ii) outras NPs (como, as magnéticas); (iii) ACs (radioativos ou com sinal magnético) ou (iv) agentes terapêuticos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2021; CABRAL FILHO *et al.*, 2018; CARVALHO *et al.*, 2019; CUNHA *et al.*, 2018; FERREIRA *et al.*, 2019; H. R; SCHIFFMAN; BALAKRISHNA, 2018; PANDEY; BODAS, 2020; PEREIRA *et al.*, 2019a; QUARTA *et al.*, 2019; ZANDWIJK *et al.*, 2021).

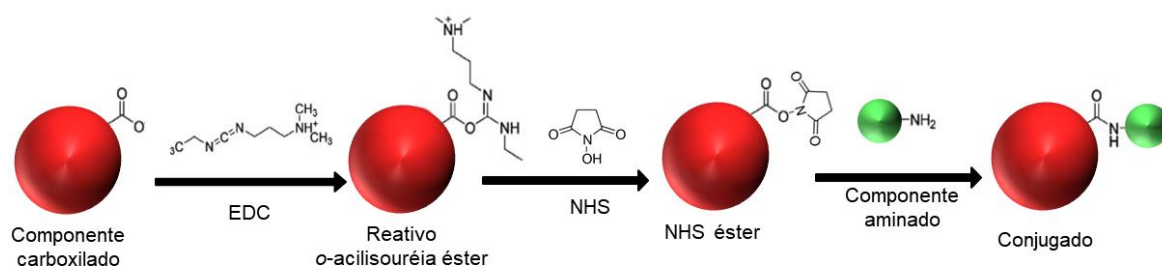
O processo de conjugação é desafiador e deve ser realizado através de metodologias padronizadas e reprodutíveis que preservem, ao mesmo tempo, as propriedades ópticas dos

PQs e as potencialidades e funcionalidades dos demais componentes, e ainda gere um conjugado final estável, sem precipitações ou aglomerações até a realização da aplicação de interesse (PEREIRA *et al.*, 2019a).

Existem várias estratégias para a conjugação de PQs a outros componentes, tais como: (i) adsorção simples (por meio de interações eletrostáticas, por exemplo); (ii) ligação covalente que necessita de mediadores, sendo comumente usados agentes de acoplamento como o *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e o *N*-hidroxisuccinimida (NHS) e (iii) interação avidina/estreptavidina à biotina.

Na interação covalente, os mediadores são escolhidos com base nos grupos funcionais dos PQs e dos demais componentes, e podem ser utilizados em uma ou mais etapas. Os agentes de acoplamento EDC e NHS (pode-se usar também o Sulfo-NHS - *N*-hidroxisulfosuccinimida), são utilizados para ativar grupos carboxílicos, como os grupos funcionais dos PQs estabilizados/funcionalizados com AMS. Utilizando essa combinação de EDC/NHS (ou Sulfo-NHS) há um aumento no rendimento e na cinética do processo, comparando com o uso de EDC isoladamente, por formar intermediários mais estáveis que irão interagir com as aminas primárias, promovendo a formação da ligação amida e consequentemente conjugações mais eficientes (Figura 10) (HERMANSON, 2013).

Figura 10 - Esquema de pontos quânticos carboxilados ativados por EDC e NHS para interação com componentes aaminados.



Fonte: Adaptada de Wang *et al.*, (2012).

Além de escolher uma estratégia eficiente de conjugação, visando a manutenção da qualidade da fluorescência dos PQs e a funcionalidade dos componentes que se deseja associar a esses nanocristais, é indispensável o uso de metodologias e técnicas de avaliação da conjugação, para monitorar e aperfeiçoar esse processo. Existem alguns métodos e ferramentas para avaliar esse processo, como: espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR - *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*); espectroscopia por correlação de fluorescência (FCS - *Fluorescence Correlation Spectroscopy*);

dispersão/espalhamento dinâmico de luz (DLS – *Dynamic Light Scattering*); potencial zeta; eletroforese e ensaio fluorescente em microplacas (EFM) (CABRAL FILHO *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2019a, 2019b). Em geral, é interessante a combinação de mais de uma técnica de avaliação da conjugação para elas se complementarem, além de corroborarem, para que se possa avaliar o nanossistema como um todo. No caso de associações com (bio)moléculas, como as lectinas, pode-se monitorar a atividade delas através de atividade hemaglutinante, por exemplo (OLIVEIRA *et al.*, 2020). Vale ressaltar que avaliações envolvendo marcação de micro-organismos ou outras células que apresentem, ou que não possuam, alvos para biomoléculas envolvidas são também relevantes para evitar falsos positivos e negativos, podendo ser realizados por meio de ensaios de inibição dos conjugados ou saturação dos sistemas biológicos. Por exemplo, pode-se citar a saturação de RTfs das células com excesso de Tf antes da incubação com conjugados PQs-Tf, ou a inibição de sítios de lectinas com carboidratos em nanossistemas baseados em PQs, antes da interação com os sistemas biológicos (CABRAL FILHO *et al.*, 2016; CARVALHO *et al.*, 2019). Por outro lado, se o componente associado for um quelato de íon Gd(III) ou NPs magnéticas deve-se avaliar o sinal magnético, através de metodologias específicas, como relaxometria de ^1H . Essas avaliações são importantes para garantir o sucesso na aplicação com PQs (CABRAL FILHO *et al.*, 2016; CARVALHO *et al.*, 2014; DE THOMAZ *et al.*, 2015; GE *et al.*, 2019; MAXWELL *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*, 2019b).

Para um maior aprofundamento das diferentes estratégias de conjugações, interações entre os grupos funcionais dos componentes envolvidos nesse processo, bem como entendimento das principais técnicas de monitoramento da (bio)conjugação, pode-se consultar o artigo de revisão publicado em co-autoria na revista *Journal of the Brazilian Chemical Society* intitulado “(Bio)conjugation Strategies Applied to Fluorescent Semiconductor Quantum Dots”, o qual está inserido no apêndice A dessa Tese. Nesse contexto das conjugações, algumas associações vêm atraindo bastante interesse, como dos PQs com compostos magnéticos, formando nanossondas óptico-magnéticas.

3.2 NANOSSONDAS ÓPTICO-MAGNÉTICAS BASEADAS EM PONTOS QUÂNTICOS

Nas últimas décadas, a busca por versáteis nanossondas que possam agregar mais de um sinal em um único sistema está em constante crescimento. Com essas sondas, espera-se explorar simultaneamente vários sinais e compensar as limitações particulares de cada

modalidade de técnica, quando elas são usadas separadamente. Em geral, o propósito dessas nanossondas envolve, por exemplo, adquirir respostas complementares sobre interações e eventos biológicos para melhor estudar doenças complexas e multifatoriais em nível celular, tais como o câncer (QUARTA *et al.*, 2019; VERWILST *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2021).

Nesse contexto, têm surgido as associações de PQs com outros sistemas com o objetivo de desenvolver nanossistemas óptico-magnéticos, unindo sinal para as técnicas fluorescentes e IRM. Por um lado, as técnicas baseadas em fluorescência possuem sensibilidade e especificidade bioquímica, viabilizando estudos de processos biológicos a nível celular e sub-celular em tempo real com alta resolução, podendo chegar a menos de 200 nm nas microscopias ópticas que quebram o limite de difração. No entanto, a utilização da luz limita a obtenção de imagens anatômicas e de tecidos mais profundos (BALZAROTTI *et al.*, 2017; CABRAL FILHO *et al.*, 2018; CAI *et al.*, 2021; PEREIRA *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2021).

Por outro lado, a IRM, que é uma técnica muito utilizada para diagnósticos, apresenta alta resolução anatômica e espacial, ao compararmos com outras técnicas como as baseadas em raios-X (como a tomografia computadorizada - CT) ou em radiação gama (PET). Além disso, a IRM não é invasiva e não utiliza radiação ionizante. A limitação da IRM refere-se a estudos de processos moleculares e celulares, devido à: (i) baixa sensibilidade e (ii) contraste insuficiente, mesmo ao utilizar ACs, pois é desafiador a entrega eficiente desses compostos localmente para adquirir imagens com esse nível de detalhes. As imagens na IRM são formadas a partir do monitoramento de sinais dos tempos de relaxação (longitudinal – T_1 e transversal – T_2) do *spin* nuclear dos prótons de ^1H das moléculas de água existentes nos tecidos, gerados por uso de gradientes de campo magnético (GIL; GERALDES, 2002). A eficiência dos ACs é medida em termos da grandeza relaxividades r_1 e r_2 (associadas, respectivamente, à T_1 e T_2). Quanto maior r_1 e r_2 , maior a capacidade do AC de reduzir os respectivos T_1 e T_2 e mais eficiente é o AC. A classificação se um AC atua em T_1 ou T_2 é dada pela razão $a = r_2/r_1$. Exemplos de AC que atuam em T_2 são as NPs de óxido de ferro e que atuam em T_1 são os quelatos de Gd(III) (ALBUQUERQUE *et al.*, 2021; CABRAL FILHO *et al.*, 2018).

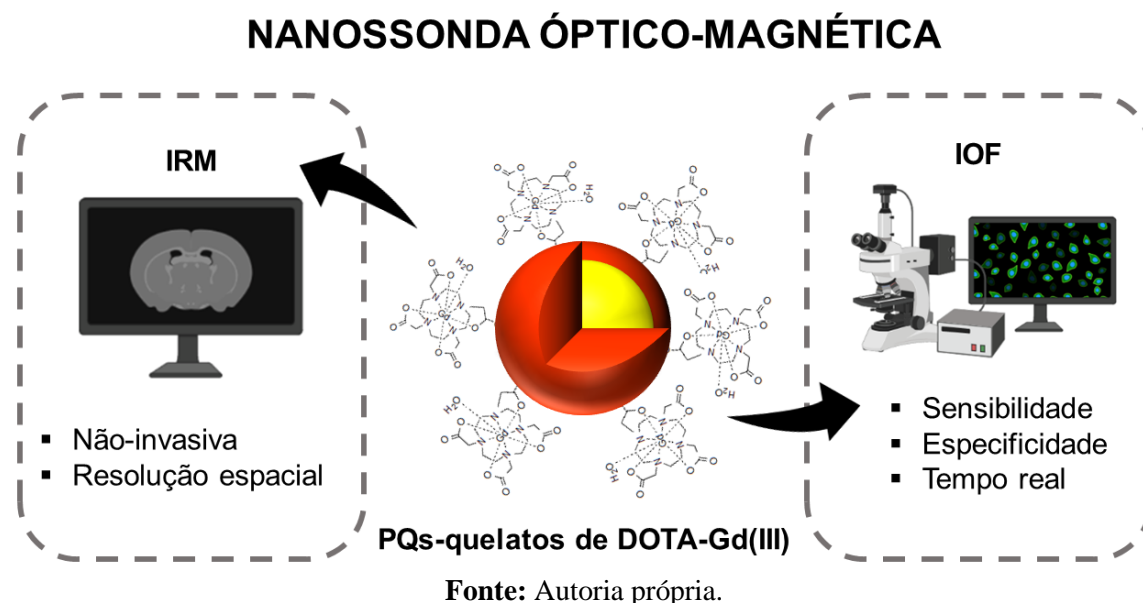
Então, para unir as potencialidades dessas técnicas, nanossistemas baseados em PQs e materiais paramagnéticos, ou superparamagnéticos, têm sido desenvolvidos, tais como: (i) íons complexados a ligantes, como na forma de quelatos de Gd(III) e (ii) NPs de óxido de ferro. Nesse contexto, há também PQs dopados por íons paramagnéticos, como Gd(III),

Mn(II) e Fe(III). Quando PQs são associados com NPs de óxido de ferro, além de potencial para IRM, também viabilizam (bio)separação e detecção de analitos, bem como estudos em hipertermia (CABRAL FILHO *et al.*, 2018; MCADAMS *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2018). De forma geral, para se usufruir de todo potencial das nanoestruturas bifuncionais óptico-magnéticas, é interessante que: (i) envolvam métodos de preparação pouco laboriosos; (ii) tenham tamanho apropriado para aplicações biológicas; (iii) apresentem boa estabilidade coloidal e (iv) possuam alta relaxividade na IRM e alta fluorescência.

Em relação à associação dos PQs aos quelatos de Gd(III), existem algumas estratégias que vêm sendo desenvolvidas, tais como: (i) revestimento de PQs com moléculas contendo quelatos-Gd(III), como lipídeos, (ii) encapsulamento de PQs de quelatos-Gd(III) livremente dentro de nanoestruturas, como micelas e lipossomas, e (iii) conjugação direta de quelatos-Gd(III) na superfície de PQs (GHAGHANDA *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2011; MULDER *et al.*, 2005). As duas primeiras, no entanto, não têm apresentado grandes incrementos na relaxividade na IRM, devido à dificuldade de troca da água coordenada diretamente ao centro paramagnético com a água do meio, principalmente quando estão encapsulados. Além disso, geralmente, essas estratégias não originam sistemas com tamanho nanométrico ideal para aplicações biológicas. Em relação à última abordagem, como exemplificada na Figura 11, apresenta-se como a mais promissora, porque mantém o diâmetro hidrodinâmico final das nanossondas mais compatíveis com as estruturas e sistemas biológicos a serem estudados, além de favorecerem a dinâmica de troca da água, pois não há barreira que interfira na troca de moléculas de água, o que é relevante para se atingir maiores relaxividades.

Por essas razões, a abordagem de conjugação direta à superfície dos PQs foi escolhida para desenvolver a nanossonda bifuncional óptico-magnética dessa tese, baseada em quelatos de Gd(III). Vale mencionar que essa abordagem é também interessante por concentrar vários íons de Gd(III) por unidade de NP, intensificando o sinal de RMN com mais eficiência e contribuindo para uma melhor relaxividade e, portanto, contraste observável nas imagens. Para uma melhor compreensão dos fundamentos e vantagens dessa proposta, a próxima seção introduzirá sobre a técnica de IRM, propriedades relacionadas a ela e aos seus principais AC paramagnéticos.

Figura 11 - Propriedades óptico-magnéticas em uma única nanossonda para aplicações em estudos simultâneos por sinal paramagnéticos, como imagem por ressonância magnética (IRM), e por sinal fluorescente, como imagem óptica-fluorescente (IOF).



3.2.1 Fundamentos da IRM e Agentes de Contraste Paramagnéticos

A técnica de IRM se baseia no fenômeno da RMN, descoberto desde a década de 40, somente teve uma primeira imagem demonstrada na década de 70. Desde então, a IRM é considerada como uma importante ferramenta para o diagnóstico clínico e está em constante evolução para melhoria de suas propriedades (DAMADIAN, 1971; LAUTERBUR, 1973).

Em geral, a IRM reconstrói imagens projetadas em três ângulos (sagital, coronal e transversal), as quais são registradas através da rotação eletrônica do magneto e reconfiguração das bobinas emissoras e receptoras no ângulo desejado para captar o sinal das estruturas de interesse, em torno do paciente ou animal na experimentação. Uma outra possibilidade é a obtenção de imagens de estruturas anatômicas sob diferentes angulações, em vários planos (tridimensionais) (NARSUDE *et al.*, 2016).

A imagem obtida através da RMN é baseada na diferença de tempos de relaxação longitudinal e transversal (T_1 e T_2 , respectivamente) dos *spins* nucleares dos ^1H presentes em tecidos normais e alterados. É possível obter sinal a partir dos ^1H , por serem (i) abundantemente presentes no corpo humano (80%) e (ii) sensíveis ao fenômeno de RMN, ocorrendo alinhamento dos *spins* nucleares quando expostos a um campo magnético (\mathbf{B}_0)

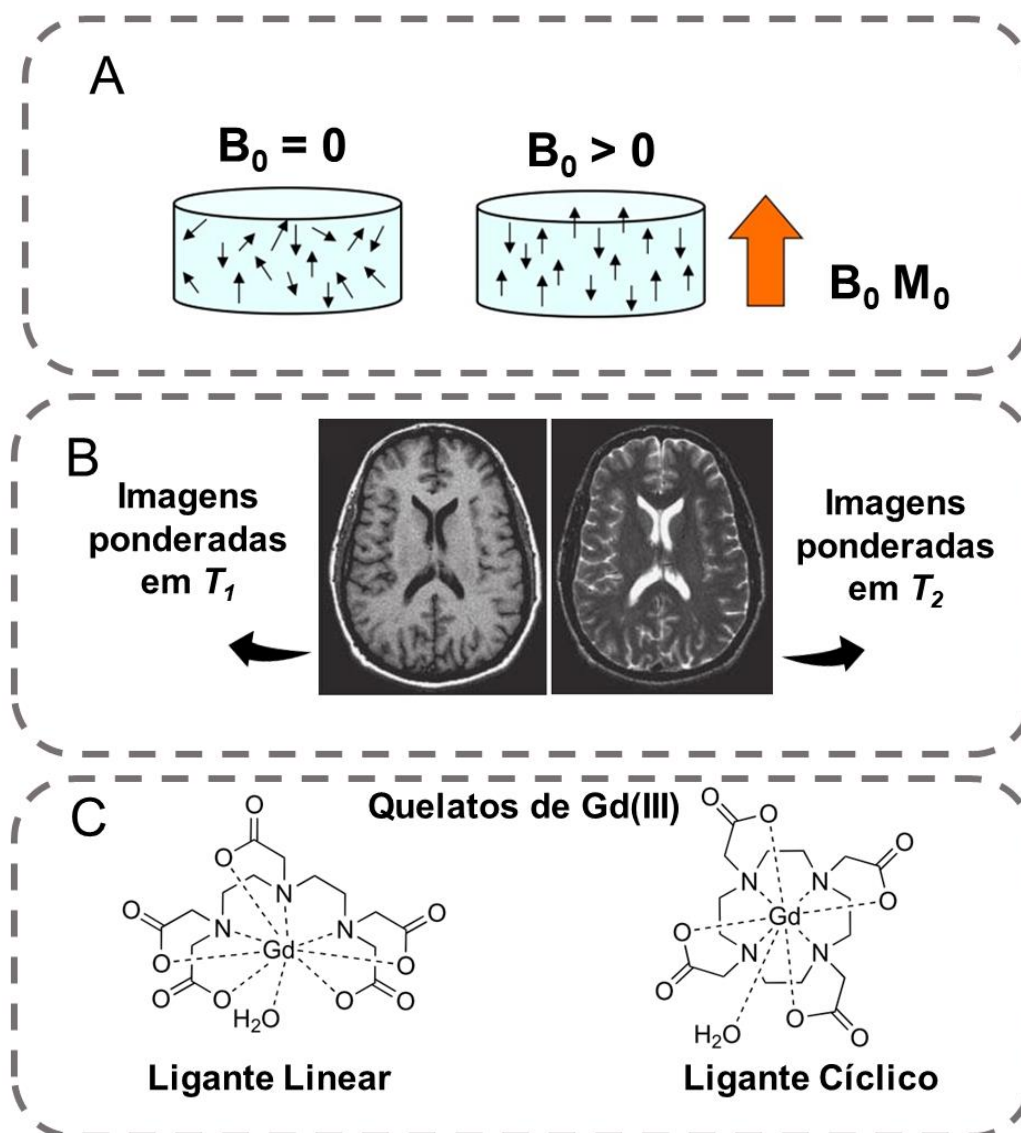
como mostra a Figura 12 (ALBUQUERQUE *et al.*, 2021; TERRENO *et al.*, 2010).

Quanto aos *spins* nucleares dos ^1H , há dois possíveis alinhamentos na presença de um campo magnético \mathbf{B}_0 : paralelo (estado de menor energia, spin $+\frac{1}{2}$) ou antiparalelo (estado de maior energia, spin $-\frac{1}{2}$). Quando em temperatura ambiente, o número de *spins* nucleares alinhados paralelamente a \mathbf{B}_0 é ligeiramente superior, resultando em uma magnetização \mathbf{M}_0 paralela ao campo magnético (\mathbf{B}_0). Sabendo-se que em equilíbrio $\mathbf{M}_0 = M_z \mathbf{z}$ e \mathbf{z} é o eixo longitudinal, para que seja possível mensurar \mathbf{M}_0 , aplica-se um campo oscilante (\mathbf{B}_1) perpendicular, ressonante à frequência de Larmor (ou de precessão) dos prótons de ^1H , com o intuito de deslocar o vetor magnetização resultante para o plano transversal (\mathbf{xy}). Quando \mathbf{B}_1 é cessado, a magnetização resultante retorna ao estado de equilíbrio, ocorrendo a liberação da energia absorvida (na região de radiofrequência), sendo esse processo denominado de relaxação (PEREIRA; GERALDES, 2007).

Esse processo de relaxação quando os ^1H retornam ao equilíbrio é modulado pelas constantes exponenciais de tempo (T_1 e T_2), enquanto a primeira (T_1) reflete o retorno/recuperação da magnetização \mathbf{M}_0 no eixo longitudinal \mathbf{z} , a última (T_2) reflete o desaparecimento/perda do sinal no eixo transversal \mathbf{xy} . Na IRM, isso depende das propriedades físico-química e morfológicas das estruturas biológicas e microambiente, resultando em imagem com contrastes diferentes (PEREIRA; GERALDES, 2007).

Para que as imagens obtidas apresentem melhor contraste e qualidade, pode-se administrar ACs, os quais podem ser compostos paramagnéticos ou superparamagnéticos. No entanto, essa finalidade não depende somente do AC escolhido, e sim da afinidade dos tecidos por eles, como por exemplo, os tecidos tumorais apresentam elevada vascularização e metabolismo característicos que propiciam uma maior retenção/captação desses ACs, comumente, aumentando-se o contraste comparado aos tecidos normais.

Figura 12 - (A): Orientação energética dos *spins* nucleares de ^1H . À esquerda, *spins* com orientação aleatória na ausência de campo magnético externo ($\mathbf{B}_0 = 0$). À direita, paralela e antiparalelamente, na presença de campo ($\mathbf{B}_0 > 0$). (B): Exemplos de imagens ponderadas nos tempos de relaxação longitudinal (T_1 - mais claras, à esquerda em B) e transversal (T_2 - mais escuras, à direita em B). (C): Exemplo de quelatos de Gd(III) baseados em ligantes linear (à esquerda, DTPA) e cíclico (à direita, DOTA).



Fonte: Autoria própria e adaptações em B de IRM de Buxton (2002).

A grandeza que avalia a eficiência desses ACs é em termos de relaxividade (r_i , dada em $s^{-1} \cdot mM^{-1}$, $i = 1,2$), que indica o quanto o AC é capaz de reduzir os tempos de relaxação dos 1H das moléculas de água por unidade de concentração (mM) do íon paramagnético. Essa grandeza pode ser obtida a partir da seguinte equação:

$$r_{1,2} = \frac{R_{1,2}^{obs} - R_{1,2}^{dia}}{C} \quad \text{Equação 1}$$

na qual, C é a concentração de íons magnéticos e $R_{1,2}^{obs}$ é a taxa de relaxação longitudinal e transversal ($1/T_{1,2}$) dos 1H da água observada na presença de íons magnéticos. Enquanto $R_{1,2}^{dia}$ refere-se à contribuição diamagnética, ou seja, na ausência do íon magnético. De acordo com a Equação 1, quanto menores os valores de T_1 e T_2 , maiores serão as relaxividades (r_1 ou r_2) e maior a eficiência do AC.

Essas relaxividades do eixo longitudinal (r_1) e transversal (r_2) diferem entre si e dependem do campo B_0 . Quando os materiais atuam em T_1 (tempo de relaxação longitudinal), fornecem imagens com contraste positivo (claro), devido ao contraste hiperintenso. Isso ocorre, por exemplo, em estruturas ricas em gordura (1H ligados ao carbono), como a massa encefálica (Figura 12-B, à esquerda). Enquanto materiais atuantes em T_2 (tempo de relaxação transversal), geram imagens com contraste negativo (escuro), devido ao contraste hipointenso. Isso pode ser observado nas estruturas ricas em água (1H ligado a oxigênio), como o líquido (Figura 12-B, à direita). É importante salientar que T_1 e T_2 não são independentes, logo, ACs apresentam atuação em ambos, mas podem predominar para o contraste ser positivo ou negativo. Para exemplificar, temos ACs conhecidos como ponderados em T_1 , como os ACs contendo íons Gd(III), e ACs ponderados em T_2 , como NPs de óxido de ferro. No caso de nanossondas multifuncionais envolvendo NPs, também relaciona-se essas grandezas à concentração de NP, fornecendo relaxividade por unidade de NP em mM (PEREIRA; GERALDES, 2007; PEREIRA *et al.*, 2019b).

Com o objetivo de aprimorar o contraste na IRM utiliza-se os ACs. Os ACs mais estudados e aplicados clinicamente são ainda aqueles de baixo peso molecular, os quais, apresentam incrementos nos efeitos de relaxação, com contribuições importantes de esfera interna e, geralmente, contribuição insignificante da esfera externa. O aumento da relaxividade (r_i) surge da interação do momento magnético dos elétrons desemparelhados do Gd(III) com o momento magnético nuclear dos 1H (CARAVAN *et al.*, 1999; MERBACH; HELM; TÓTH, 2013). Temos os ACs que apresentam íons Fe(III) e Mn(II)

(metais de transição), e, íon Gd(III) (metais de transição interna), os últimos se destacam, devido ao elevado paramagnetismo (apresentando sete elétrons desemparelhados, ou seja, maior densidade de *spin*), o que resulta em elevada eficiência como AC (MERBACH; HELM; TÓTH, 2013; SHOKROLLAHI, 2013).

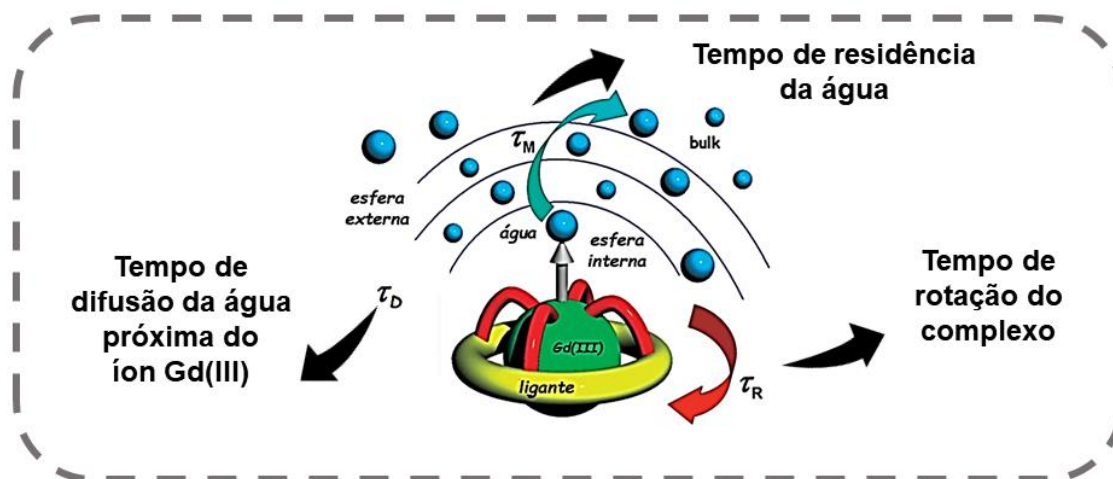
Dessa forma, os ACs baseados em quelatos de Gd(III) são muito atrativos, devido a algumas características estruturais e físico-químicas, como podemos citar: (i) hidrofiliabilidade; (ii) estabilidade química, (iii) elevada relaxividade em solução aquosa; (iv) baixa toxicidade (*in vivo*) e (v) rápida e eficiente taxa de filtração e excreção. Ainda nesse contexto, tais características podem estar relacionadas à dose necessária do AC para se obter resposta na IRM. Quando em contato com meio biológico, pode ocorrer liberação dos íons, devido à competição com íons endógenos, tais como, o zinco – Zn(II), processo chamado de transquelatamento/transmetalatamento, o qual pode ser simulado *in vitro* visando aplicabilidade mais segura (PEREIRA *et al.*, 2019b). No entanto, em relação à essa última observação, os quelatos cíclicos se destacam por apresentarem: (i) maior afinidade pelo Gd(III), mesmo na presença desses íons endógenos, (ii) estabilidade cinética e termodinâmica, (iii) baixo risco de dissociação em fluidos biológicos, sendo (v) bem tolerados e com (vi) menor efeito tóxico (AIME; BOTTA; ERMONDI, 1992; HERMANN *et al.*, 2008; NWE *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2019b).

De forma geral, esses quelatos de Gd(III) são definidos como compostos de coordenação, que estruturalmente apresentam um ligante multidentado (mais comumente, poliaminocarboxilados), cíclico (como o DOTA, derivado do comercial *Dotarem*) ou linear (como o DTPA, comercialmente conhecido como *Magnevist -acyclic diethylenetriamine-N, N',N',N'',N''-pentaacetic acid*), complexados ao íon paramagnético Gd(III), como ilustra a Figura 12-C. Os ligantes lineares, como as triaminas acíclicas derivam da dietilenotriamina (*diethylenetriamine pentaacetic acid*), enquanto os ligantes cíclicos (ou tetraazamacrocíclicos), são derivados do cicleno (*1,4,7,10-tetraazaciclododecano*) (HERMANN *et al.*, 2008).

Esses ligantes podem possuir múltiplos números de coordenação (8 a 12), a depender tanto do tamanho do íon quanto do ligante (tamanho, volume, número de átomos doadores e rigidez). Além do íon coordenado ao ligante, há a presença de pelo menos uma molécula de água na esfera interna diretamente coordenada ao centro do íon paramagnético (HERMANN *et al.*, 2008). O processo de relaxação paramagnética pode ser exemplificado pela Figura 13, o qual consiste nas contribuições: (i) da esfera interna – relacionada com a

quantidade de moléculas de água coordenadas ao íon central, (ii) da taxa de troca ($1/\tau_M$) dessas moléculas com aquelas presentes no meio (*bulk*) e (iii) da esfera externa, que são as moléculas que se difundem nas proximidades do íon central. Logo, os fatores que influenciam na relaxividade dos sistemas, são: (i) o número de águas presentes na esfera interna de coordenação, (ii) o tempo de rotação do complexo paramagnético (τ_R), correlacionado com o tamanho, a mobilidade e a massa do mesmo, e (iii) o tempo de difusão de moléculas de água nas proximidades do complexo contendo o íon paramagnético (τ_D) (Figura 13).

Figura 13 - Esquema de moléculas de água interagindo com o centro do íon paramagnético (esfera interna) de quelato Gd(III) em solução e os tempos de residência da água coordenada ao íon metálico central (τ_M), rotacional do complexo (τ_R) e de difusão da água nas proximidades do íon (τ_D).



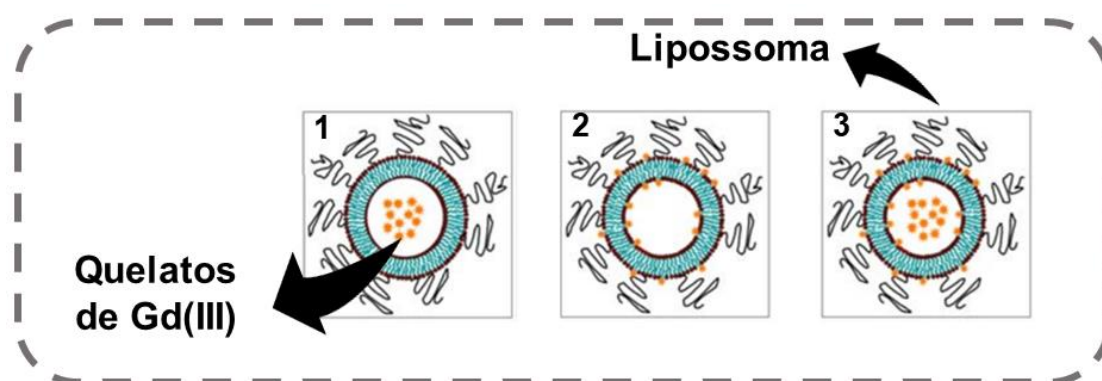
Fonte: Adaptada de Hermann *et al.* (2008).

Esse processo da dinâmica da taxa de troca de água coordenada ao centro metálico com as moléculas de água do meio (*bulk*) é um dos mecanismos que explica o fenômeno de relaxação desses compostos, os quais podem ser alterados quando eles estão associados a macromoléculas (como proteínas e polissacarídeos) ou NPs. Nesse caso, podem interferir nos tempos de difusão de moléculas de água da esfera externa próximas ao sistema (τ_D), e consequentemente nos valores de relaxividade transversal (r_2), visto que resultam em um sistema com uma ordem de grandeza a maior em tamanho que os ACs moleculares, que também depende do tipo de interação com essas estruturas, se é diretamente na superfície ou através de ligantes ou intermediários, onde nesse caso pode alterar a mobilidade do complexo, que por sua vez reflete-se na variação do tempo de rotação (τ_R), consequentemente influenciando em r_1 (FERREIRA *et al.*, 2012; LIPARI; SZABO, 1982;

PEREIRA *et al.*, 2019b).

Essa coordenação e dinâmica de troca de moléculas de água interferem na relaxividade dos ACs e são influenciadas por alguns aspectos, como a localização deles quando estão em contato direto com as moléculas de água do *bulk*, ou não (quando encapsulados em vesículas, como lipossomas), como exemplificado no esquema da Figura 14-B. Essa última condição, reduz a troca de água do *bulk* com água coordenada diretamente com o centro Gd(III), devido à presença de uma barreira de permeabilidade imposta pela membrana (ZHOU; LU, 2013). Ghaghanda *et al.* (2009) observaram um aumento da relaxividade quando os ACs estavam conjugados na superfície das nanoestruturas como no exemplo central da Figura 14-B, pois limita a mobilidade e τ_R , além de viabilizar uma efetiva troca de água do *bulk* com a água coordenada com o centro magnético (GHAGHANDA *et al.*, 2009). Ainda nesse esquema da Figura 14-B, quando o lipossoma apresenta tanto os quelatos conjugados na superfície quanto internamente, observa-se eficiência ainda maior na redução dos tempos de relaxação (em termos de relaxividade), devido a variação da taxa $1/\tau_M$, do τ_R , além de uma oferta de Gd(III) por unidade de lipossoma, diminuindo a dose para se obter contraste. Além de aumento na relaxividade longitudinal (r_1), por se tratar de sistema nanoparticulado, há interferência na relaxividade transversal (r_2), diferente da ação dos quelatos de Gd(III) quando sozinhos no meio na forma molecular (GHAGHANDA *et al.*, 2009; KARATHANASIS *et al.*, 2008).

Figura 14 - Imagem esquemática de lipossoma como carreador de quelatos de Gd(III) distribuídos: (1) livres no seu citoplasma; (2) na superfície interna e externa e (3) em ambas opções (1, 2).



Fonte: Autoria própria e adaptações de Hermann *et al.* (2008) e Ghaghanda *et al.* (2009).

No próximo tópico, serão exemplificados alguns trabalhos que envolvem ACs óptico-magnéticos estabelecidos por meio da estratégia de associar quelatos de Gd(III) a PQs

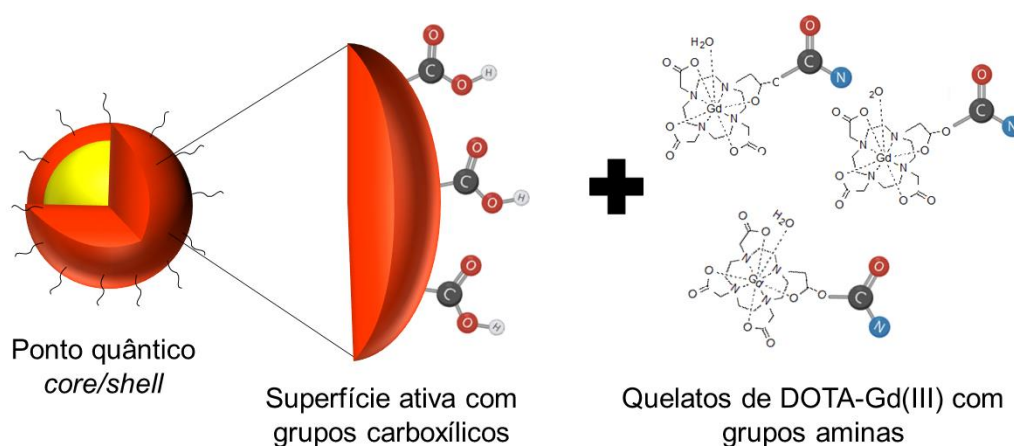
por meio de conjugação direta, visto que é uma abordagem de nosso interesse, pois é mais prática e favorece a dinâmica de troca de água do centro paramagnético com as moléculas de água presentes no meio, a qual foi explorada por um artigo experimental que compõe a seção de resultados dessa tese.

3.2.2 Nanossondas Óptico-Magnéticas Baseadas na Conjugação Direta de PQs-Quelatos de Gd(III)

Dentro do contexto do desenvolvimento de nanossondas óptico-magnéticas baseadas na conjugação direta de quelatos de Gd(III) a PQs, é importante salientar que a estratégia de conjugação deve seguir as orientações da seção 3.1. Visto que, ela aborda sobre conhecer a superfície ativa dos PQs, seus grupos funcionais e dos demais componentes que se deseja associar. Dessa forma, é possível escolher a melhor estratégia, tipo de ligação e condições experimentais mais adequadas para estabelecer uma efetiva conjugação.

Para exemplificar, na Figura 15, temos um PQ com a superfície funcionalizada com grupos carboxílicos, aptos a interagirem com aminas de quelatos paramagnéticos para a conjugação direta de vários desses ACs na superfície da NP. Como mencionamos na seção anterior (3.2.1), essa abordagem é vantajosa por permitir a concentração de vários ACs por unidade de PQs e a localização deles na superfície favorece o aumento da relaxividade, devido a melhor dinâmica de troca de água. A seguir, ilustraremos alguns estudos que utilizaram essa mesma abordagem de ligação direta que utilizamos neste trabalho.

Figura 15 - Superfície ativa de PQs *core/shell* com grupos carboxílicos disponíveis para concentrar mais de um quelato de DOTA-Gd(III) com grupos aminas por conjugação direta e formar nanossondas bifuncionais óptico-magnéticas de PQs-DOTA-Gd(III).



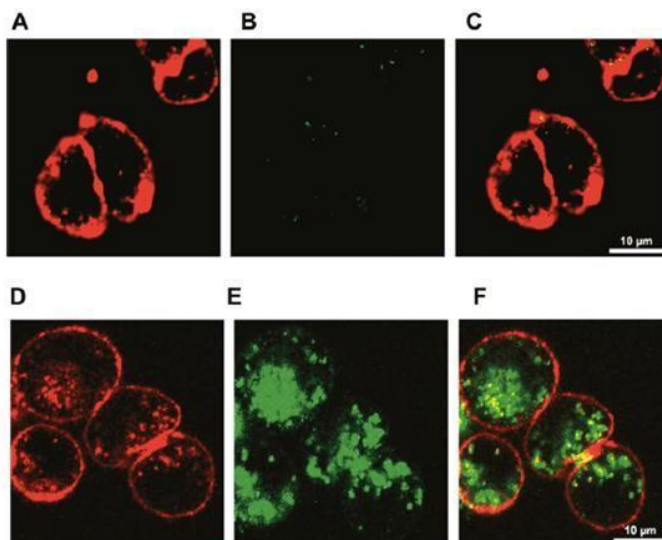
Fonte: Autoria própria.

Stasiuk e colaboradores conjugaram quelatos de Gd(III) na superfície de PQs hidrofóbicos de InP/ZnS, necessitando de etapa posterior para torná-los compatíveis com água, utilizando a penicilamina para promover troca de ligante. Inicialmente, eles prepararam quelatos de Gd(III) pela reação de derivados do DPAA (*1,4,7-triazacyclononane-1,4-dibis(methylene)dipicolinic acid*) e ácido lipóico. Confirmaram a ligação de íons de Gd(III) na superfície dos PQs com base em medidas de susceptibilidade magnética e espectroscopia de UV-visível, a qual aumentou o diâmetro das NPs de 6,9 a 8,6 nm (pelo DLS). A conjugação não levou a modificações no comprimento de onda máximo de emissão, em torno de 620 nm, porém, os autores reportaram uma redução significativa do rendimento quântico ao torná-los hidrofílicos. Isso demonstra o quanto é importante atentar para os parâmetros experimentais para o desenvolvimento desses sistemas nanoparticulados, pois precisa-se manter as propriedades de ambos os componentes. Ainda neste trabalho, os autores conjugaram PQs-DPAA-Gd(III) ao peptídeo de penetração celular (*maurocalcine*, MCa) com o intuito de promover a internalização deste sistema. Na Figura 16, se pode observar, em verde, PQs-DPAA-Gd(III)-MCa dentro das células de ovário de hamster chinês (células CHO, por 2 h de incubação), a membrana plasmática das células, em vermelho, está marcada com rodamina conjugada a concanavalina A (Figura 16). Pelas medidas relaxométricas, obtiveram: r_1 por PQ de $900 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; r_1 por Gd (III) de $13 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (a $0,81 \text{ T}$ e $25 \text{ }^\circ\text{C}$), essa última $3 \times$ maior que o AC comercial na forma molecular, associando um total de 80 Gd(III) por PQ. Na IRM, após 15 min da injeção dos PQs-DPAA-Gd(III)-MCa (Figura 17-A), o sinal foi distinto do contraste obtido apenas pelo Dotarem comercial (Figura 17-B), em cérebro de rato. Além disso, essa sonda PQs-Gd(III)-MCa teve um elevado tempo de retenção e manteve sinal de RMN intenso e mensurável após 4 h (à direita na Figura 17-A) (STASIUK *et al.*, 2011).

Como mencionado na seção anterior (3.2.1), quando os quelatos de Gd(III) estão ligados na superfície dos PQs, pode haver um aumento da relaxividade (aumento da eficiência do AC em reduzir os tempos de relaxação), devido à adequada troca de água pela restrição da rotação interna do complexo (HERMANN *et al.*, 2008). A partir dessa abordagem, Stasiuk *et al.* (2013) otimizaram a relaxividade das nanossondas utilizando o mercaptobenzóico como “ligante adaptador”, que é mais rígido, reduzindo a rotação interna do complexo, alterando a taxa de troca de águas coordenadas com os íons, melhorando a relaxividade em relação aos demais sistemas preparados, r_1 por PQ de $2.523 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; otimizada em comparação ao trabalho do mesmo grupo, em 2011, r_1 por Gd (III) de $31,5$

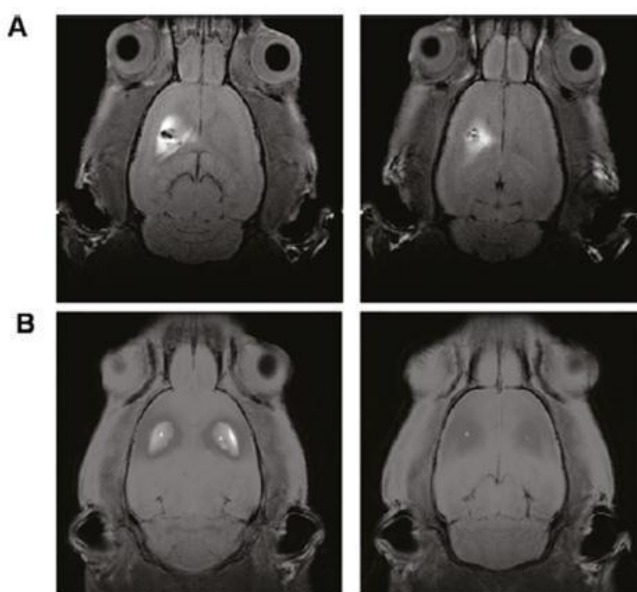
$\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$ (a 0,81 T e 25 °C), essa última quase $8 \times$ melhor que o quelato molecular, pois associou em torno de 115 íons por NP (STASIUK *et al.*, 2011, 2013).

Figura 16 - Imagem de células CHO (células de ovário de hamster chinês) marcadas com rodamina-concanavalina A (em vermelho – em A e D); PQs apenas com DPAA-Gd(III) (em verde, em B) e PQs com DPAA-Gd(III) e MCa (*maurocalcine*, em verde, em E). As sobreposições das imagens estão: imagem C (A e B) e imagem F (D e E).
 Fonte: Adaptada de Stasiuk *et al.*, (2011).



Fonte: Adaptada de Stasiuk *et al.*, (2011).

Figura 17 - Imagem de cérebro de rato incubado com PQs-DPAA-Gd(III)-Mca (imagens superiores, em A) e com Dotarem (imagens inferiores, em B), por 15 min (imagens à esquerda) e ao longo de 4 h (imagens à direita), todas imagens de IRM ponderadas em T_1 foram obtidas a 7 T.



Fonte: Adaptada de Stasiuk *et al.*, (2011).

Além dessa atuação do ligante ou intermediários utilizados na estratégia de conjugação, outras contribuições são relevantes em termos de eficiência do AC em fornecer contraste observável, principalmente, quando consideramos os sistemas óptico-magnéticos em ambiente intracelular. Starmans *et al.*, (2011) observaram que os PQs conjugados a RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) e Gd(III) associado à camada lipídica, quando internalizados pelas células, reduziram a relaxividade longitudinal (T_1), comparando-os com os mesmos sistemas em solução, porque nessa configuração, devido à endocitose, as células captam esses nanossistemas em endossomos, aprisiona-os e dificulta a troca de água do íons Gd(III) com o meio (STARMANS *et al.*, 2011).

Além dessa atuação do ligante ou intermediários utilizados na estratégia de conjugação, outras contribuições são relevantes em termos de eficiência do AC em fornecer contraste observável, principalmente, quando consideramos os sistemas óptico-magnéticos em ambiente intracelular. Starmans *et al.*, (2011) observaram que os PQs conjugados a RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) e Gd(III) associado à camada lipídica, quando internalizados pelas células, reduziram a relaxividade longitudinal (T_1), comparando-os com os mesmos sistemas em solução, porque nessa configuração, devido à endocitose, as células captam esses nanossistemas em endossomos, aprisiona-os e dificulta a troca de água do íons Gd(III) com o meio (STARMANS *et al.*, 2011).

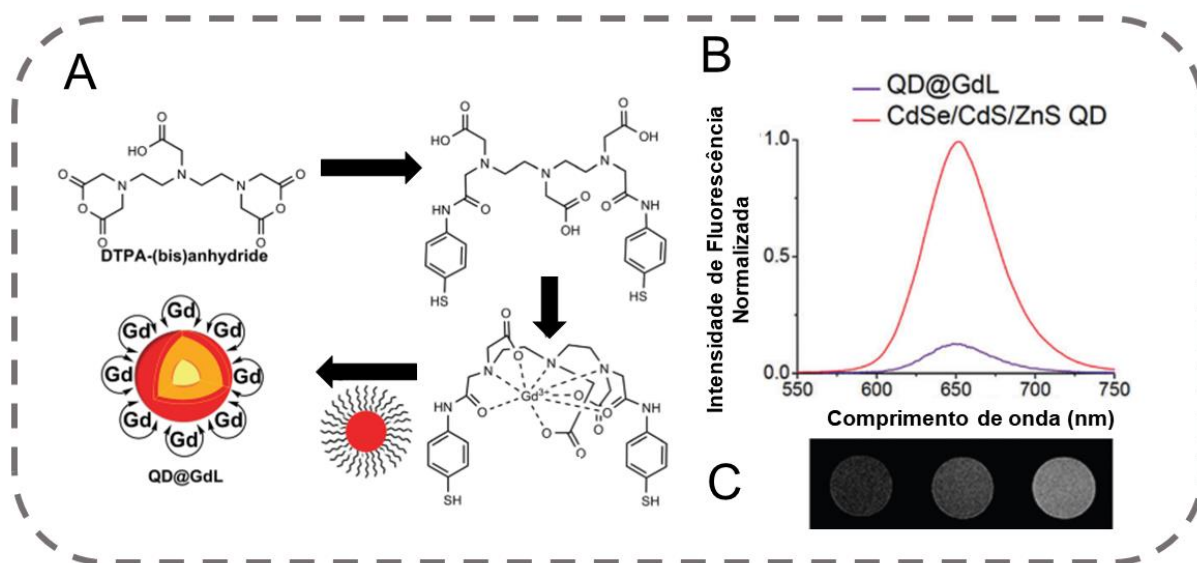
Yang *et al.* (2017) conjugaram o ligante linear DTDTPA (2-[bis [2- [carboxymethyl- [2-oxo-2-(2-sulfanylethyl-amino) ethyl]amino] ethyl] amino] acetic acid) à PQs ternários e hidrofóbicos de CuInS₂/ZnS, somente depois adicionaram os quelatos de Gd(III). As nanossondas óptico-magnéticas apresentaram diâmetro de 24.7 ± 2.7 nm, discreto *red shift* pelo espectro de emissão, discreta diminuição da intensidade de fluorescência, rendimento quântico reduzido de 29 para 19%. Além disso, observaram evidente marcação fluorescente de células HeLa após 24 h de incubação pela microscopia de fluorescência, r_1 por Gd(III) = $11 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (a 3 T), mais eficiente cerca de $2,5 \times$ do que o quelato molecular correspondente e marcação eficiente e prolongada de tumor *in vivo*, em ratos, por IRM e microscopia de fluorescência (YANG *et al.*, 2017).

Jin *et al.* (2017) prepararam um nanossistema com ligante cíclico do tipo DOTA-Gd(III) conjugado ao agente estabilizante/funcionalizante glutationa de PQs de CdSeTe/CdS sintetizados em meio orgânico seguido de troca de ligante. Esses autores apresentaram r_1 por PQs = $365 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (em campo elevado, 500 MHz, 25 ° C), os quais poderiam ser melhores em medidas relaxométricas em campos mais baixos. Os valores de r_1 por Gd(III) não foram

relatados.

McAdams *et al.* (2017) associaram 620 quelatos de Gd (III) à superfície dos PQs de CdSe/CdS/ZnS, valor estimado através de ICP-MS e usaram os quelatos formados a partir do ligante linear (DTPA) (Figura 18-A). As nanossondas apresentaram diâmetro de $8,4 \pm 0,9$ nm e evidente redução da intensidade de fluorescência após a adição dos DTPA-Gd(III), Figura 18-B. Os autores constataram potencial para obtenção de IRM ponderadas em T_1 , como observado na Figura 18-C, e pelas medidas de r_1 por PQs = $6800 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; r_1 por Gd(III) = $11 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (1,06 T, 37 °C), esse último foi superior ao DTPA-Gd(III) na forma molecular ($r_1 = 3,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

Figura 18 - Representação esquemática da nanossonda óptico-magnética desenvolvida por McAdams *et al.* (2017). Em A: esquema da preparação utilizando ligante linear DTPA complexados com quelatos de Gd(III). Em B: espectro de emissão dos PQs, linha em vermelho, e PQs-quelatos de Gd(III), linha em roxo ($\lambda_{\text{exc}} = 400$ nm). Em C: Imagens dos sistemas ponderadas em T_1 (3 T) mostrando aumento do contraste brilhante, de cinza ao branco, com o aumento da concentração de nanossonda.



Fonte: Adaptado de McAdams *et al.*, (2017).

Ma *et al.* (2018) prepararam PQs de Ag_2Se (Seleneto de prata) em meio orgânico, modificando-os com um ácido (*octylamine-polyacrylic acid* - OPA) e PEG (polietileno glicol) aminado. Em seguida, ativaram os PQs apenas com o EDC para conjugar a quelatos de DTPA-Gd(III). As sondas PQs-DTPA-Gd(III) apresentaram diâmetro final de 13,5 nm (pelo DLS), manutenção do perfil dos espectro de absorção e emissão, mas não mostraram o quanto a intensidade da fluorescência foi modificada após o processo de conjugação. Pela relaxometria, PQs-DTPA-Gd(III) apresentaram r_1 por Gd(III) = $2,98 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (3 T). De

acordo com os ensaios *in vitro*, com células MDA-MB-231, e *in vivo*, com ratas fêmeas, apresentaram baixa toxicidade e propriedades para atuarem como sondas duais em IRM e técnicas fluorescentes (MA *et al.*, 2018).

Por fim, para maiores informações, detalhes e discussão sobre os assuntos dos últimos tópicos abordados, incluindo as diferentes abordagens de associação de PQs com quelatos de Gd(III) também indicamos a leitura complementar do capítulo de livro publicado em co-autoria na “*Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*” intitulado “*Bimodal Nanostructured Materials Containing Quantum Dots for Optical and Magnetic Resonance Imaging*”, localizado no apêndice B dessa Tese (PEREIRA *et al.*, 2018). Por fim, ainda inspirando-se nos desafios impostos à compreensão da biologia do câncer, bem como nas potencialidades das novas nanossondas baseadas em fluorescência, outra molécula de interesse para associar aos PQs é a glicose.

3.3 GLICONANOPARTÍCULAS FLUORESCENTES

3.3.1 Aspectos Gerais da Captação da Glicose por Células de Câncer

O câncer apresenta uma reprogramação metabólica, tornando-se dependente de alguns nutrientes de forma diferente de quando as células estão em condições normais. Tais condições são fatores fundamentais para a nova demanda de energia, taxa de proliferação acelerada, além de aprimoramentos das estratégias de sobrevivência diante de condições adversas do microambiente, padrões de invasibilidade, metástase e resistência à agentes terapêuticos (BARRON *et al.*, 2016; DEBERARDINIS; CHANDEL, 2016; PHAN; YEUNG; LEE, 2014).

Para se desenvolver estratégias e ferramentas inovadoras para fins de estudo, diagnóstico e tratamento relacionados ao câncer, faz-se necessário uma melhor compreensão dessa reprogramação metabólica e vias alteradas, principalmente quando associadas a uma maior capacidade de metástase (DEBERARDINIS; CHANDEL, 2016).

Diante da complexidade dessa doença, tem-se buscado um maior entendimento da biologia do câncer, das alterações das vias metabólicas, do padrão de captação/internalização de nutrientes essenciais. Também se tem procurado por moléculas de direcionamento eficiente ao alvo de interesse para fins de diagnóstico e terapia do câncer. De forma geral, o metabolismo de muitos nutrientes encontra-se alterado nas células de câncer, dentre algumas (bio)moléculas já estudadas, carboidratos como a glicose, se destacam. Isso porque essas

células dependem fortemente da glicose como a principal fonte para produção de energia, isso também vale para células saudáveis de mamíferos (BARRON *et al.*, 2016).

Comumente, há um aumento na expressão e atividade de transportadores de glicose em células de câncer, em resposta ao microambiente tumoral de hipóxia e de acidez elevada (por conta da eliminação de ácido láctico a fim de evitarem o processo de apoptose). De forma geral, o processo de captação/internalização de glicose pelas células de câncer é considerado complexo diante das variações genéticas de seus transportadores e de subtipos presentes nas células e tecidos (PHAN; YEUNG; LEE, 2014; ZHAO; ZHANG, 2016).

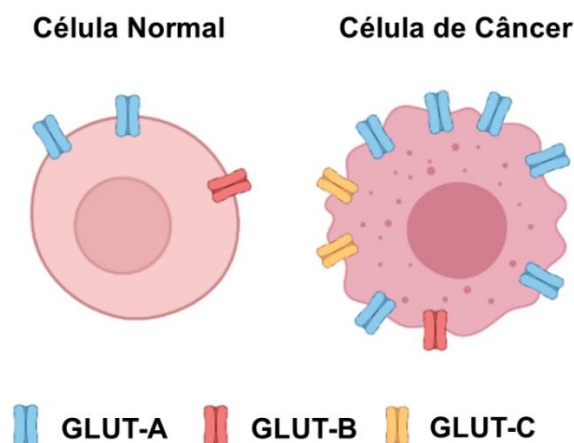
A internalização/captação da glicose pela célula pode ocorrer de duas formas: (1) passivamente, baseado no gradiente de concentração, ou (2) ativamente, favorecidos pelos transportadores de glicose dependentes de sódio (SGLTs 1 a 6, gene *SLC5A*) e transportadores de glicose independentes de sódio (GLUTs 1 a 14 e H⁺/*myo*inositol transporter (HMIT), gene *SLC2A*), os quais são diferentes em estrutura e em função, apresentando variações na afinidade aos substratos, propriedades cinéticas e expressão nos tecidos (POTTER; NEWPORT; MORTEN, 2016; ZHAO; ZHANG, 2016).

Os transportadores de glicose (SGLTs e GLUTs) atuam não somente na captação/internalização de glicose, mas sim de outras moléculas, como a glicosamina, frutose, xilose, manose, galactose, mioinositol; apresentando uma afinidade variável a cada uma delas. Sobre a família dos transportadores GLUT, em especial, eles se agrupam em subtipos de acordo com similaridade estrutural, como: (1) GLUT-1; GLUT-2; GLUT-3; GLUT-4; GLUT-14; (2) GLUT-5; GLUT-7; GLUT-9; GLUT-11; (3) GLUT-6; GLUT-8; GLUT-10; GLUT-12; GLUT-13 e HMIT. Além disso, os papéis dos GLUTs-6 em diante precisam ser mais estudados, enquanto os GLUTs de 1 a 4 já são considerados mais conhecidos (BARRON *et al.*, 2016; THORENS; MUECKLER, 2010a, 2010b).

Esses SGLTs e GLUTs são proteínas que estão envolvidas em diversos processos biológicos, apresentando: expressão aumentada nas células de câncer, alteração da afinidade por outras moléculas ou surgimento de novos transportadores, que não eram expressos na célula normal, como esquematizado na Figura 19. Isso porque eles têm sido fatores influenciadores no metabolismo e desenvolvimento tumoral. Estudos encontraram uma elevada quantidade de transportadores SGLT1 em tecido de pulmão, ovário, cólon e reto em comparação com tecidos saudáveis, apresentando forte correlação com o desenvolvimento do tumor (ZHAO; ZHANG, 2016).

Preferencialmente, as células de câncer escolhem a glicose como molécula para suprimento de suas necessidades energéticas, através da glicólise aeróbica (efeito *Warburg*), ao invés do metabolismo mitocondrial e a cadeia de fosforilação oxidativa para produção de energia, convertendo então o piruvato (proveniente da glicólise) em lactato/ácido láctico, mesmo em condições ricas em oxigênio. Em termos bioenergéticos, esse processo apresenta um rendimento baixo, no entanto, é mais rápido e produz o lactato, o qual pode ser utilizado em outras vias biossintéticas (como a produção de ácidos nucleicos e aminoácidos). Além disso, também há a compensação, através do aumentando a captação de moléculas de glicose. Tudo isso, visando suprir a demanda acelerada da célula alterada, quando comparadas às células normais. Na clínica, esse efeito *Warburg* tem sido utilizado para avaliar tumores através de sondas moleculares baseadas normalmente no derivado de glicose radiomarcada, ^{18}F FDG (COX; MACKIE; ELICEIRI, 2015; GANAPATHY; THANGARAJU; PRASAD, 2009; MACHEDA; ROGERS; BEST, 2005).

Figura 19 - Representação esquemática de transportadores da família GLUT e possíveis alterações nas células de câncer, como: aumento do número (GLUT-A, em azul), manutenção de quantidade e afinidade diferenciada por outras substâncias (GLUT-B, em vermelho), surgimento de novos (GLUT-C, em amarelo).



Fonte: Autoria própria.

O ^{18}F FDG sofre fosforilação ao entrar nas células, via GLUT, por hexoquinases, gerando o ^{18}F FDG-6-fosfato, que se acumula no meio intracelular, mesmo estando internalizado, o *feedback* é positivo para que mais ^{18}F FDG entre na célula de câncer, o que é mais acentuado em tumores mais malignos e avançados. Estudos dessas vias de captação por GLUT, hexoquinases, bem como de seus inibidores são interessantes para melhor diagnosticar/entregar/tratar os tumores (BARRON *et al.*, 2016; RIEDL *et al.*, 2007).

Sabe-se que GLUT-1 é encontrado em praticamente todas as células em condições normais, inclusive em altos níveis. No entanto, pode ocorrer uma expressão anormal quando as células se tornam cancerosas, por aumento da quantidade de GLUTs expressos, e até mesmo surgir outros tipos de GLUTs que antes não eram expressos no tipo celular quando no estado normal/saudável (Figura 19). Podemos exemplificar com as células epiteliais, que quando saudáveis expressam GLUT-1 e -3, mas não expressam GLUT-4 e -12, quando cancerosas superexpressam tanto GLUT-1 e -3, quanto outras GLUTs que normalmente não estavam presentes na condição normal (BARRON *et al.*, 2016).

A expressão de GLUTs tem apresentado dados discordantes, em termos de quantidade e, conseqüentemente, de afinidade pelos substratos. Enquanto Godoy *et al.*, (2006) encontraram alta quantidade de GLUT-1 em células de câncer de mama, Kang *et al.* (2002) detectaram baixa quantidade de GLUT-1 e Ravazoula *et al.* (2003) correlacionaram uma presença de GLUT-1 mais evidentemente nas células de câncer de mama de grau 2 ou 3 do que no grau 1. Inclusive, o primeiro trabalho mencionado, indica que a captação de ¹⁸FDG pelas células de mama pode ocorrer por outra via e não pelo GLUT-1, mesmo ele estando altamente expresso. Esses achados da literatura têm demonstrado a importância de estudar a via de internalização dos diferentes análogos de glicose dentre os diversos tipos de linhagem de câncer de malignidade variável.

Além disso, sabendo que as células de câncer em geral têm grande potencial para reprogramarem seu metabolismo, otimizando sua possibilidade de captarem energia por outras hexoses ou vias de captação e partindo da observação que alguns tipos de câncer de mama não expressam ou expressam baixos níveis de GLUT-1, Wuest *et al.* (2011) propuseram um radiofármaco baseado em frutose, alternativo ao tradicional da PET, observando eficiente captação dele via GLUT-5 em linhagens de câncer de mama (GODOY *et al.*, 2006; KANG *et al.*, 2002; WUEST *et al.*, 2011).

Com o intuito de se atingir o entendimento do metabolismo da glicose como um todo, bem como o papel e a expressão de seus transportadores, é relevante dominar a dinâmica de internalização/captação de diferentes análogos de glicose e suas vias nelas células. Dentro desse contexto, se inserem as pesquisas translacionais que visam o desenvolvimento de nanossondas que atuem especificamente e apresentem sinal para fomentar o embasamento necessário para o entendimento de doenças, como o câncer, baseados em aquisição de imagem e/ou biodeteções, com maior sensibilidade a fim de propor métodos que possam

detectar cada vez mais precocemente e terapias mais eficazes (COX; MACKIE; ELICEIRI, 2015; LIU; WELCH, 2012).

3.3.2 Sondas Fluorescentes Baseadas em Pontos Quânticos e Glicose

Para se obter análises celulares para entendimento do metabolismo da glicose no câncer, tem-se construído plataformas, dentre elas, a associação de NPs como os PQs, pelo fato desses nanocristais apresentarem diversas vantagens e grande potencial para uma compreensão mais aprofundada dos eventos biológicos de diversas doenças, em especial para o câncer (GUNASEKERA; PANKHURST; DOUEK, 2009).

Igawa *et al.* (2014) formularam uma nanosonda baseada em PQs de CdSe hidrofóbicos, estabilizados com AMS após troca de ligantes, e D-glicosamina. Para a conjugação os grupos carboxílicos dos PQs foram ativados apenas com EDC. Os conjugados foram aplicados em células de osteosarcoma humano (NOS-1), os quais foram internalizados e observadas no citoplasma dessas células após 3 h de incubação (IGAWA *et al.*, 2014).

Benito-Alifonso *et al.* (2014) também preparam PQs de CdSe/ZnS hidrofóbicos, mas utilizando apenas o EDC como agente de acoplamento. Visando torná-los hidrofílicos, os autores utilizaram a troca de ligantes, formulando três nanossistemas hidrofílicos compostos por moléculas tioladas derivadas de DHLA-PEG (ácido lipóico - DHLA) ou ácido mercaptoacético (AMA). Na conjugação com moléculas, utilizaram mais de um glicano, tais como um derivado de glicose aminado. De acordo com os resultados, ao incubar os conjugados PQs-glicose com o ligantes PEG-DHLA, não visualizaram marcação nas células HeLa, mesmo incubando por mais de 24 h (BENITO-ALIFONSO *et al.*, 2014).

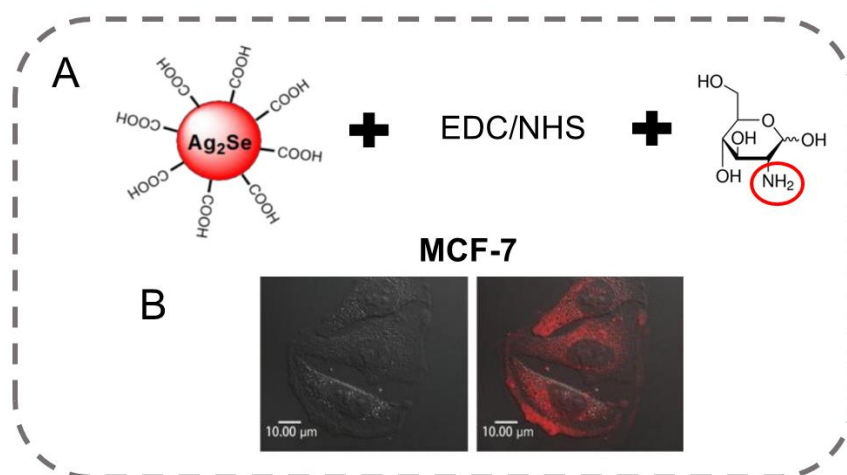
Como discutimos na seção de PQs (3.1), a síntese de nanocristais diretamente em meio aquoso apresenta vantagens, pois não precisa de etapas posteriores para tornarem os PQs hidrofílicos, as quais também têm impacto negativo na fluorescência. Além disso, discutimos na seção de (bio)conjugação (3.1.2) e no artigo de revisão (Apêndice A), a estratégia escolhida para associar os PQs às (bio)moléculas é um fator crucial para se obter nanossondas bifuncionais estáveis e eficientes para os estudos a longo prazo.

Ranjbar-Navazi *et al.* (2019) preparou PQs de InP/ZnS/AMS, também hidrofóbicos e com etapa de troca de ligantes, os quais foram conjugados com D-GN (associada ou não ao ácido fólico - AF). Os sistemas foram preparados utilizando os agentes de acoplamento EDC/NHS. Eles observaram que houve endocitose por células neoplásicas de ovário (OVCAR-3) e de pulmão (A549) através de técnicas complementares de fluorescência

(microscopia e citometria de fluxo), após incubar as nanossondas por 2 h (RANJBAR-NAVAZI *et al.*, 2018).

Ge *et al.* (2019) sintetizaram PQs de Ag_2Se , também conjugados à D-GN através do EDC/NHS para estudo em linhagem de células de câncer de mama humana (MCF-7), as quais foram incubadas com os nanossistemas por 4 h. Pela citometria de fluxo, eles observaram 93,9% das células MCF-7. As células foram marcadas pelas nanossondas e apresentaram uma marcação por microscopia de fluorescência, como mostra a Figura 20 (GE *et al.*, 2019).

Figura 20 - Representação esquemática da nanossonda PQs-D-glicosamina (D-GN) desenvolvida por Ge *et al.* (2019). Em A: esquema da conjugação utilizando PQs carboxilados, EDC/NHS, D-GN. Em B: imagem de microscopia de fluorescência de células de câncer de mama (MCF-7), contraste à esquerda e sobreposição à direita.



Fonte: Ge *et al.* (2019).

De acordo com o contexto, ainda há poucos trabalhos que utilizem PQs sintetizados diretamente em meio aquoso, bem como estratégias de conjugações práticas e eficientes que produzam conjugados duradouros e mantenham as propriedades dos componentes envolvidos. Estudos desse tipo, desenvolvendo nanossondas à base de PQs e a sua efetiva caracterização são importantes e precisam fornecer protocolos seguros para que os resultados sejam confiáveis e evitem falsas interpretações para serem traduzidos e úteis no contexto do câncer.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dessa tese estão apresentados na forma de: 1 artigo experimental publicado; 1 capítulo de protocolo experimental publicado e 1 artigo experimental em preparação para submissão e publicação.

4.1 ARTIGO PUBLICADO

O artigo *“Hydrophilic Quantum Dots Functionalized with Gd(III)-DO₃A Monoamide Chelates as Bright and Effective T₁-weighted Bimodal Nanoprobes”* foi publicado no periódico *“Scientific Reports”*, v. 9, n. 1, p. 1-5, 2019. Link de acesso: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38772-8>.

Hydrophilic Quantum Dots Functionalized with Gd(III)-DOTA Monoamide Chelates as Bright and Effective T₁-weighted Bimodal Nanoprobes

Maria I. A. Pereira¹, Goreti Pereira², Camila A. P. Monteiro¹, Carlos F. G. C. Geraldês^{3,4}, Paulo E. Cabral Filho¹, Carlos L. Cesar^{5,6}, André A. de Thomaz⁶, Beate S. Santos⁷, Giovannia A. L. Pereira², Adriana Fontes¹

¹ Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

² Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

³ Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.

⁴ Centro de Química de Coimbra, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.

⁵ Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

⁶ Departamento de Eletrônica Quântica, Instituto de Física Gleb Wataghin, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

⁷ Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

Resumo

A ressonância magnética (MRI) é uma ferramenta diagnóstica não invasiva poderosa que permite distinguir tecidos saudáveis de patológicos, com grande detalhamento anatômico. No entanto, a ressonância magnética é bastante limitada para investigação de eventos bioquímicos moleculares/celulares, que pode ser alcançada por técnicas baseadas em fluorescência. Assim, nesse estudo, desenvolvemos nanossistemas bimodais baseados em uma conjugação direta de quelatos de monoamida DOTA-Gd(III) com pontos quânticos (PQs) hidrofílicos, permitindo a combinação das vantagens das ferramentas de ressonância magnética e fluorescência. Esses sistemas nanoparticulados também podem melhorar o contraste da ressonância magnética, aumentando a concentração local de quelatos paramagnéticos. Ensaio de transmetalção, caracterização óptica e análises relaxométricas, mostraram que as nanossondas bimodais desenvolvidas têm grande estabilidade química, fluorescência intensa e altas relaxividades. Além disso, a análise de espectroscopia de correlação de fluorescência (FCS) nos permitiu distinguir os nanossistemas que contêm diferentes quantidades de quelatos/PQ. Ainda, a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) indicou um rendimento de conjugação superior a 75%. Nossos nanossistemas mostraram relaxividades longitudinais efetivas por PQ e por íon paramagnético, pelo menos 5 vezes [por Gd(III)] e 100 vezes (por QD) maior do que r_1 para quelatos Gd(III)-DOTA, adequado para imagens ponderadas em T_1 . Além disso, as nanopartículas bimodais não apresentaram citotoxicidade considerável e marcaram células HeLa de forma eficiente, conforme demonstrado por fluorescência. Assim, os nanossistemas desenvolvidos apresentam potencial como sondas estratégicas para análises de fluorescência e ressonância magnética, sendo úteis para a investigação de uma variedade de processos biológicos.

Palavras-chave: nanossistemas, fluorescência, ressonância magnética, bifuncional.

4.2 CAPÍTULO DE PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O capítulo de protocolo experimental “*Resazurin-based Assay to Evaluate Cell Viability after Quantum dot Interaction*” foi publicado na série *Methods in Molecular Biology* do livro “*Quantum dots: Applications in Biology*”, 2135: 214-222, 2019. Link de acesso: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0463-2_12.

Chapter 12 - Resazurin-based Assay to Evaluate Cell Viability after Quantum dot Interaction

Maria Isabela A. Pereira¹, Camila Aparecida P. Monteiro¹, Wesley Felix¹, Paulo E. Cabral Filho¹, Beate S. Santos¹, Adriana Fontes¹.

¹Biomedical Nanotechnology Group, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

Resumo

As crescentes aplicações de pontos quânticos (PQs) como ferramentas ópticas nas ciências da vida têm estimulado os pesquisadores a avaliar os efeitos dessas nanossondas na viabilidade celular por meio de uma variedade de métodos, especialmente os colorimétricos. Um dos testes mais aplicados é o ensaio MTT. Em comparação ao MTT, por exemplo, o método à base de resazurina tem a principal vantagem de não avaliar as células diretamente, eliminando assim os resultados falso-positivos que podem surgir da sobreposição das absorvâncias do PQ com o composto colorimétrico. Portanto, nesse capítulo, descrevemos o ensaio de resazurina como um teste alternativo, simples, rápido, de sensibilidade, reprodutível e não tóxico para avaliar a viabilidade celular *in vitro* após a exposição PQ. Além disso, este teste apresenta uma vantagem adicional; as células permanecem viáveis para procedimentos experimentais complementares, como migração ou adesão celular.

Palavras-chave: Citotoxicidade; Resazurin; Resorufin Nanocristais.

4.3 ARTIGO EM PREPARAÇÃO

Gliconanopartículas Fluorescentes Baseadas em Pontos Quânticos para Estudos de Captação da D-Glicosamina por Células de Câncer

Resumo: O relevante papel da glicose no metabolismo das células de câncer vem estimulando estudos sobre sua dinâmica em nível celular, os quais podem não só contribuir para uma melhor compreensão da biologia do câncer como também para o aprimoramento de métodos diagnósticos/terapêuticos focados neste carboidrato. Assim, neste estudo, exploramos a excepcional resistência à fotodegradação e a superfície quimicamente ativa para conjugação dos pontos quânticos (PQs) para desenvolver uma gliconanopartícula para estudos de captação da glicose por células de câncer guiados pela alta sensibilidade da fluorescência. Para tanto, PQs de CdTe carboxilados foram sintetizados em meio aquoso e conjugados covalentemente a um análogo aminado de glicose, a D-Glicosamina (D-GN). Os PQs e os conjugados foram caracterizados por espectroscopias de correlação por fluorescência, absorção e emissão. Adicionalmente, a eficiência e a especificidade da conjugação foram avaliadas por uma nova metodologia, baseada no monitoramento da interação dos conjugados com leveduras de *Candida albicans* funcionalizadas com concanavalina A por citometria de fluxo. Os conjugados apresentaram alta fluorescência, especificidade e permaneceram efetivos por pelo menos 4 meses. A nova metodologia proposta nesse estudo se mostrou prática, rápida, reprodutível e quantitativa para avaliar a eficiência e especificidade das gliconanopartículas fluorescentes. Os conjugados foram então incubados com células HeLa. A citometria de fluxo indicou uma alta captação da glicose, em um curto período de incubação, com cerca de 97% de células marcadas. As micrografias revelaram a presença de vesículas fluorescentes pelo citoplasma e áreas densamente marcadas próximas aos núcleos. Assim, podemos concluir que as nanossondas PQs-D-GN desenvolvidas apresentam grande potencial para a elucidação de processos celulares da carcinogênese por fluorescência.

Palavras-chave: fluorescência; glicosamina; câncer; células HeLa.

1 - Introdução

Os carboidratos constituem um grupo interessante e versátil de moléculas que podem atuar como principais fontes de energia das células. Os carboidratos também estão presentes na superfície celular e desempenham uma variedade de funções fundamentais, desde a sinalização, adesão, migração celular, até o desenvolvimento de doenças e processos de metástases [1,2]. Por essas razões, os carboidratos vêm sendo moléculas alvo de estudo em sistemas biológicos e guias para direcionar nanopartículas (NPs) a alvos biológicos com propósitos de diagnóstico e terapia para o câncer, por exemplo [3–5].

A possibilidade de associar carboidratos a NPs apresenta também potencial para estudos de processos biológicos, tais como os relacionados com a captação e o metabolismo dessas moléculas, especialmente por células de câncer. No entanto, ainda são poucos os estudos que exploraram NPs para desvendar essa complexa relação dos carboidratos com essas células [6–8].

Dentre os carboidratos, a glicose tem atraído interesse, e uma das razões é sua importância no contexto do câncer [9]. De acordo com a teoria proposta pelo fisiologista Otto Warburg décadas atrás, as células de câncer apresentam uma maior captação da glicose (efeito Warburg), devido ao uso da glicólise aeróbica para produzir energia, contrastando com as células normais [9,10]. Conseqüentemente, as células de câncer superexpressam transportadores de glicose (GLUTs) para suprir essa necessidade metabólica alterada, os quais podem ser alvos para estudos de processos intracelulares, diagnóstico e entrega de fármacos [10].

O efeito Warburg vem sendo explorado clinicamente na tomografia por emissão de pósitron (PET), que combina um análogo de glicose, a 2-deoxi-D-glicose, com ^{18}F radioativo, o qual é absorvido em quantidades maiores pelos tecidos tumorais, em relação aos saudáveis, proporcionando assim uma melhor visualização para diagnóstico, estadiamento e monitoramento de terapia tumoral [11,12].

Há ainda, no entanto, muito o que se compreender sobre a relação da glicose com o câncer, para assim desenvolver métodos diagnósticos e terapêuticos mais efetivos e personalizados, uma vez que a captação desse carboidrato pode também ser influenciada pelo tipo de análogo da glicose utilizado, pela linhagem celular e até mesmo pela atuação diferencial de diferentes GLUTs [13–15]. Assim, técnicas baseadas em fluorescência, devido

a sua alta sensibilidade e especificidade química, podem ser interessantes ferramentas para ajudar a desvendar essa complexa interação [16,17].

Nesse contexto, associações de corantes orgânicos à glicose foram descritas na literatura [18,19], o que estimulou o desenvolvimento de novos glicofluoróforos baseados em sondas fluorescentes que possuem propriedades ópticas aprimoradas, tais como os pontos quânticos (PQs) [4,6,20,21].

Os PQs possuem propriedades singulares que os tornaram nanoplataformas versáteis para estudos biológicos, tais como: (i) excepcional resistência à fotodegradação, o que pode também permitir o monitoramento de processos biológicos por longos períodos e (ii) superfície ativa, composta por grupos funcionais que propiciam a conjugação com diferentes biomoléculas [22–25]. Além disso, os PQs possuem tamanho nanométrico, podendo ser sintetizados diretamente em meio aquoso, sem necessitar de etapas adicionais para torná-lo hidrofílico, favorecendo a interação com as células.

Dessa forma, neste trabalho apresentamos a preparação de uma nanossonda constituída por PQs de CdTe carboxilados altamente fluorescentes conjugados covalentemente a um análogo de glicose aminado, a D-Glicosamina (D-GN). Aqui também propomos uma nova metodologia prática, rápida, reprodutível e quantitativa para avaliar a eficiência e especificidade de gliconanopartículas fluorescentes, tais como a nanossonda PQs-D-GN. A metodologia proposta se baseou na afinidade da glicose pela lectina Concanavalina A imobilizada em leveduras de *Candida albicans*, utilizadas como suporte biológico. Adicionalmente, a conjugação também foi caracterizada determinando-se os diâmetros hidrodinâmicos dos PQs e conjugados PQs-D-GN por espectroscopia de correlação de fluorescência (do inglês, *fluorescence correlation spectroscopy* - FCS). As nanossondas foram desenvolvidas visando aplicações em estudos de biologia do câncer envolvendo captação/metabolismo de glicose, por isso, a potencialidade destes conjugados foi também avaliada em ensaios com a linhagem celular de adenocarcinoma cervical humano (HeLa).

Acreditamos que essas gliconanopartículas fluorescentes baseadas em PQs e análogos de glicose podem propiciar estudos que não só levem a um melhor entendimento de mecanismos de captação e retenção diferencial desse carboidrato por diferentes linhagens de células de câncer, como também possam ser modelos para compreender a interação de potenciais agentes terapêuticos nanoparticulados com esses sistemas biológicos.

2 - Procedimentos Experimentais

2.1 - Síntese e Caracterização dos PQs

Os PQs de CdTe foram sintetizados em meio aquoso utilizando ácido mercaptosuccínico (AMS - Sigma-Aldrich) como agente estabilizante/funcionalizante em uma razão molar de 5:1:6 (Cd:Te:AMS). A síntese foi baseada em metodologia relatada anteriormente por Pereira *et al.* [22]. Resumidamente, o telúrio (Te^0 , 0,1 mmol - Sigma-Aldrich) foi reduzido a Te^{2-} usando borohidreto de sódio (NaBH_4 , 3 mmol - Sigma-Aldrich) como o agente redutor, em pH elevado ajustado com NaOH (2 M), sob uma temperatura de aproximadamente 90 °C em uma atmosfera inerte de nitrogênio (N_2). Simultaneamente, foi preparada uma solução contendo CdCl_2 (0,2 mmol - Alfa Aesar) e AMS (0,6 mmol), em $\text{pH} > 10$. Em seguida, a solução de Te^{2-} foi adicionada ao sistema $\text{Cd}^{2+}/\text{AMS}$ e a reação foi mantida por 5 h, sob agitação e alta temperatura (90 - 100 °C).

Os PQs foram caracterizados por espectroscopia de absorção (UV-Vis 1800 - Shimadzu). A partir dessas análises, estimou-se o tamanho e a concentração dos PQs [26,27]. Mais detalhes sobre as determinações podem ser encontrados em estudo anterior publicado por Tenório *et al.* [28]. Adicionalmente, os PQs também foram caracterizados por espectroscopia de emissão (LS55 - PerkinElmer), com excitação em 488 nm.

2.2 - Conjugação e Caracterização do Conjugado

Os PQs foram covalentemente conjugados com o análogo de glicose, a D-(+)-glicosamina clorídrica (D-GN - Sigma-Aldrich), usando cloridrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC - Sigma-Aldrich) e *N*-hidroxisuccinimida (NHS) como agentes de acoplamento para favorecer a interação covalente entre os grupos carboxílicos dos PQs e a amina da glicose escolhida. Para a preparação dos conjugados PQs-D-GN, o pH da suspensão de PQs (aprox. 0,7 μM ou 70 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi ajustado com AMS (4,9% m/v) para 5,5. Em seguida, a suspensão foi ultrafiltrada utilizando microtubos de 10 kDa (GE Healthcare) por 3 min, a 1106 $\times\text{g}$ (Hettich Zentrifugen - Universal 320 R), para retirada do excesso de reagentes. Em seguida, 1 mL de PQs foi ativado com 0,5 mL de EDC (2 mM), 0,5 mL de NHS (aprox. 10 mM) e a D-GN foi adicionada na proporção de 1:500 (PQs:D-GN) correspondente a 42 μL de solução D-GN (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Após essas etapas, os conjugados PQs-D-GN permaneceram incubando a 4 °C até o uso (após pelo menos 7 dias). Os conjugados PQs-D-GN foram monitorados semanalmente considerando aspectos visuais

da suspensão, como estabilidade coloidal e brilho de fluorescência sob excitação com luz UV (365 nm). Os nanossistemas PQs-D-GN foram também caracterizados opticamente por espectroscopias de absorção e emissão, conforme descrito na seção 2.1.

2.3 - Avaliação da Conjugação

2.3.1 - Espectroscopia de Correlação por Fluorescência

A análise de FCS para os PQs e conjugados PQs-D-GN foi realizada em um microscópio confocal (LSM 780 - Carl Zeiss) usando uma objetiva de imersão em água 40× (NA = 1,0) [32]. A partir de pelo menos 10 curvas de correlação, obtidas por excitação em 514 nm, foi possível extrair os tempos de difusão (τ_D) obtidos para cada amostra e, em seguida, o raio hidrodinâmico (R) foi calculado pela equação a seguir:

$$R = \frac{4 k_B T \tau_D}{6\pi\eta\omega_x^2} \quad \text{Eq. 1,}$$

onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura das amostras ($T \approx 303$ K), τ_D é o tempo de difusão, η é a viscosidade média (da água $\eta = 7,98 \times 10^{-4}$ Pa·s) e ω_x é o raio lateral do volume focal (300 nm). Esta análise permite a avaliação do processo de conjugação por determinação de R e de τ_D , uma vez que se espera que os valores τ_D e R do conjugado PQs-D-GN sejam maiores do que o PQ sozinho (DE THOMAZ *et al.*, 2015).

2.3.2 - Interação com Leveduras de *Candida albicans*

As leveduras de *Candida albicans* (American Type Culture Collection, ATCC 10231) foram utilizadas como suporte biológico para avaliar a eficiência de conjugação e a especificidade dos conjugados PQs-D-GN. Para isso, as leveduras foram semeadas em meio líquido Saboraud por 24 h. Em seguida, 1 mL de suspensão de células de *C. albicans* foi centrifugada com 1 mL de solução salina (NaCl a 0,9%) a 775 ×g (MiniSpin – Eppendorf) por 2 min. O precipitado foi então ressuspenso em 1 mL de solução salina e a densidade óptica da suspensão foi ajustada para aproximadamente 0,7 a 540 nm (Biotek μQuant MQX200). Em seguida, a suspensão celular foi incubada com a ConA (2,8 mg·mL⁻¹), uma lectina extraída de *Canavalia ensiformis* que tem afinidade por α-D-manose/glicose, por 30 min sob agitação. A parede celular da *C. albicans* é rica em resíduos de carboidratos possibilitando a interação com a ConA. Cada monômero da ConA possui 1 sítio de reconhecimento de carboidratos (DRC) e, em geral, em pH próximo a 7,0 essa lectina assume

uma forma tetramérica e entre pHs 5,0 – 7,0 apresenta-se como dímeros e tetrâmeros [29,30]. Assim, nas condições experimentais testadas, a ConA apresentará pelo menos dois DRCs, podendo interagir por um dos sítios com a superfície da *C. albicans* e ainda possuir outro para interação com os conjugados PQs-D-GN [31].

Após o período de incubação, o sistema *C. albicans*/ConA foi centrifugado ($775 \times g$, 2 min) e o precipitado foi ressuspense ao mesmo volume inicial com solução salina (1 mL). Somente após este processo, os conjugados PQs-D-GN – diluídos previamente em solução salina $5\times$ – foram incubados com a suspensão de *C. albicans*/ConA, a 1:1 v/v (PQs-D-GN:*C. albicans*/ConA; ~ 34 nM ou $3,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) por 15 min, em agitador orbital (BioSan - Bio RS-24), conforme ilustra a Figura 1A. Antes da incubação, os grupos carboxílicos ativados remanescente dos conjugados PQs-D-GN foram previamente bloqueados com TRIS base (0,4 mM), sendo 1:20 TRIS base:PQs-D-GN, v/v, por 2 h à temperatura ambiente (TA, ~ 25 °C), também em agitador orbital.

Adicionalmente, para avaliar a especificidade da interação entre *C. albicans*/ConA e os conjugados PQs-D-GN, foi realizada uma inibição dos sítios da ConA com metil- α -D-manopiranosídeo (Sigma-Aldrich), conforme ilustrado na Figura 1B. Para isso, a suspensão de *C. albicans*/ConA foi incubada com esse carboidrato na concentração final de aproximadamente 0,4 mM durante 60 min à TA, sob agitação. Em seguida, o sistema *C. albicans*/ConA/manopiranosídeo foi centrifugado ($775 \times g$, 2 min) e ressuspense em solução salina e incubado com os conjugados PQs-D-GN, seguindo o mesmo procedimento e proporções utilizadas sem inibição. Em seguida, os sistemas *C. albicans*/ConA/PQs-D-GN (teste) e *C. albicans*/ConA/Manopiranosídeo/PQs-D-GN (inibido) foram centrifugados ($775 \times g$, 30 s), ressuspense em solução salina e analisados em um citômetro de fluxo BD Accuri C6 (Becton Dickinson) com excitação em 488 nm e a emissão foi coletada utilizando o filtro *bandpass* (FL4 - 675/25 nm). Os ensaios foram realizados pelo menos em duplicata, o sistema *C. albicans*/ConA foi considerado como controle para delimitação da autofluorescência (células não marcadas pelo conjugado PQs-D-GN), e foram coletados 20.000 eventos (*in gate*) para cada sistema.

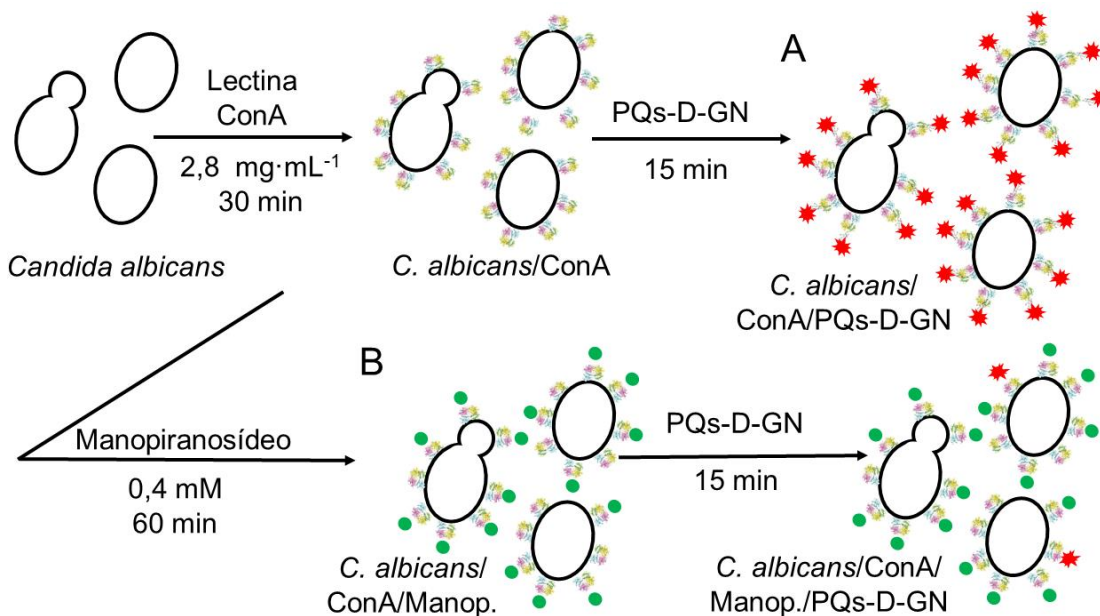


Figura 1. Esquema ilustrativo das etapas de interação dos conjugados PQs-D-GN com (A) *C. albicans*/ConA e (B) *C. albicans*/ConA/manopiranosídeo para avaliação da conjugação. Manop. corresponde ao manopiranosídeo.

2.4 - Interação dos Conjugados PQs-D-GN com Células de Câncer

2.4.1 - Cultura de Células

As células HeLa (*American Type Culture Collection*, ATCC), usadas aqui como um modelo de célula de câncer, foram cultivadas em DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium* - Sigma-Aldrich). O meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS - Gibco), $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de estreptomicina e $100 \text{ unidades} \cdot \text{mL}^{-1}$ de penicilina (Sigma-Aldrich). As células foram mantidas em incubadora a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ com atmosfera umidificada com 5% de CO_2 . Após atingir 80 - 90% de confluência, as células foram tripsinizadas (Tripsina 0,25% - Gibco), contadas em uma câmara de Neubauer e semeadas em uma placa de 6 poços (Corning Inc.) para cerca de 200.000 células/poço para análise por citometria de fluxo ou 50.000 células/poço para análise por microscopia de fluorescência em placa de 4 poços (Greiner Bio-One – REF. 3516). Em seguida, as células permaneceram na incubadora por 24 h para aderir à placa. Após este tempo, as células foram lavadas e incubadas com os conjugados PQs-D-GN para a análise.

2.4.2 - Marcação das Células de Câncer com Conjugados PQs-D-GN

Inicialmente, os grupos carboxílicos ativados dos conjugados PQs-D-GN também foram bloqueados, conforme descrito na seção 2.3.1. Em seguida, os conjugados PQs-D-GN foram incubados com células HeLa (previamente incubada sob privação de glicose por 30 min), nas seguintes condições experimentais: (A) células HeLa (controle) e (B) células HeLa:PQs-D-GN (1:2, v/v, ~110 nM ou 11,4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), por 60 min (a 37 °C, 5% de CO_2) para ambas as análises por fluorescência.

Para análise quantitativa por citometria de fluxo, as células, após incubação, foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS 1 \times - a partir de agora chamado de PBS), tripsinizadas até que se destacassem da placa (1 - 2 min), com inativação utilizando o respectivo meio de cultura, DMEM, suplementado com 10% de FBS. As células foram então lavadas por centrifugação a 775 $\times g$ (MiniSpin, Eppendorf), por 2 min. Um total de 20.000 eventos para cada sistema foi adquirido pelo menos em duplicata e a fluorescência foi excitada em 488 nm, enquanto a emissão foi lida utilizando o filtro *bandpass* FL4 (675/25 nm).

Para avaliação do padrão de marcação por microscopia de fluorescência, as células HeLa foram incubadas com os conjugados PQs-D-GN nas mesmas proporções e condições descritas acima. Após 60 min de incubação, as células foram lavadas com PBS e os núcleos das células foram corados com 300 μL do corante Hoechst (a 1.000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), por 5 min a 37 °C. Por fim, as células foram analisadas em microscópio de fluorescência (Leica, DMI 4000B) usando os filtros *bandpass* de 560/40 nm (excitação) e 645/75 nm (emissão).

3 - Resultados e Discussão

3.1 - Caracterização Óptica dos PQs e Conjugados

Os PQs mostraram um perfil de absorção característico para esses nanocristais, com um primeiro máximo em 610 nm, assim como ilustra a Figura 2A. A partir disso, um diâmetro médio em torno de 3,8 nm foi determinado. Ademais, usando o valor máximo da absorvância do primeiro máximo e o coeficiente de extinção molar para PQs de CdTe, uma concentração de aproximadamente 0,7 μM ($\sim 4,3 \times 10^{14}$ partículas $\cdot\text{mL}^{-1}$ ou 70 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi estimada [26–28]. Os nanocristais mostraram um máximo de emissão na região espectral do vermelho em torno de 645 nm e largura total a meia altura (FWHM) de aproximadamente 59,5 nm, conforme apresentado na Figura 2A (linha tracejada).

Após a conjugação com D-GN, não foram observadas diferenças significativas nos espectros de absorção. Em relação ao espectro de emissão (Figura 2B), os PQs mantiveram o máximo de emissão de fluorescência por volta de 645 nm e apresentaram uma diminuição de aproximadamente 35% na intensidade da emissão de fluorescência e o FWHM praticamente não teve alteração, em relação aos PQs, conforme mostra a Figura 2B.

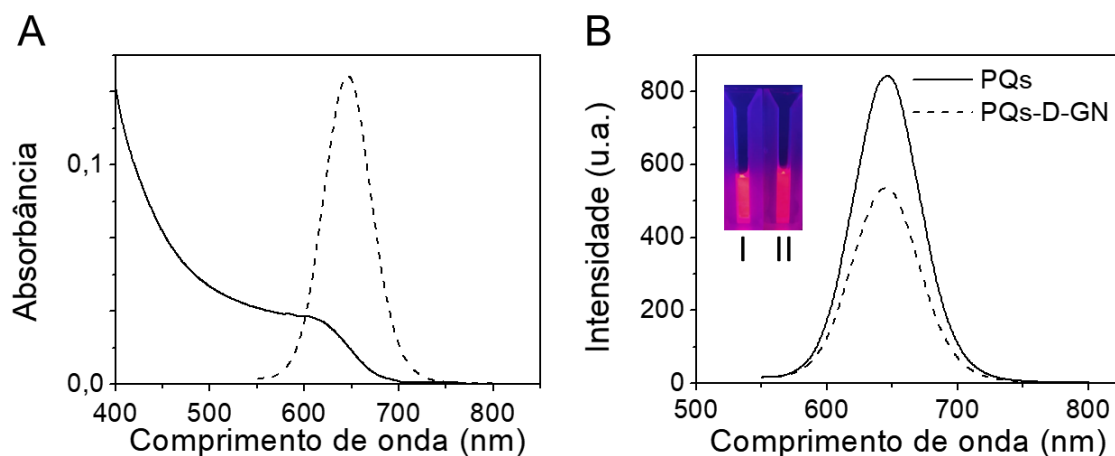


Figura 2. Caracterização óptica dos PQs e conjugados PQs-D-GN. (A) Espectros de absorção (linha cheia) e emissão (linha tracejada) de PQs sozinhos. (B) Espectros de emissão de PQs sozinhos (linha cheia, inserção I) e conjugados PQs-D-GN (linha tracejada, inserção II), $\lambda_{exc} = 488$ nm.

3.2 - Avaliação da conjugação

3.2.1 - Análise por Espectroscopia de Correlação por Fluorescência (FCS)

De acordo com a média das 10 curvas de correlação por fluorescência, os tempos de difusão (τ_D) médios adquiridos para as amostras foram em torno de 157 μ s para PQs sozinhos, em comparação com 648 μ s para os conjugados PQs-D-GN. Conforme observado, a técnica FCS permitiu distinguir os sistemas, ainda que a conjugação tenha sido realizada com pequenas moléculas de D-glicosamina ($\sim 0,215$ kDa) por possuir alta sensibilidade para essas finalidades [23,32,33].

Outra informação extraída foi o diâmetro hidrodinâmico médio, estimado através do τ_D e da Eq. 1 (seção 2.3.2), resultando em aproximadamente 3,9 nm para PQs sozinhos e 16 nm para os conjugados PQs-D-GN, respectivamente. Esses tamanhos concordam com os diâmetros estimados pelo espectro de absorção ($d = 3,8$ nm; seção 3.1). Esses dados indicam que os derivados de glicose foram conjugados de forma eficiente na superfície dos PQ. Vários trabalhos vêm utilizando o FCS para avaliar e confirmar a conjugação de PQs com diferentes (bio)moléculas, desde macromoléculas, como anticorpos [34,35], a pequenas

moléculas, como o ácido fólico [23], e agentes de contraste paramagnético derivado do DOTA-Gd(III) [22].

3.2.2 - Avaliação da Conjugação com Leveduras de *Candida albicans*

A nova metodologia de avaliação de conjugação de PQs a derivados de glicose por meio da interação dos conjugados com a ConA (lectina ligada à superfície de *C. albicans*), desenvolvida para este estudo, utilizando citometria de fluxo, tem se apresentado como uma ferramenta quantitativa, prática, rápida e reprodutível para triagem de gliconanopartículas fluorescentes. Essa metodologia versátil foi aplicada nesse estudo para avaliar conjugados baseados em PQs e D-GN, mas são passíveis de utilização para outros sistemas que se deseja estudar, desde que sejam fluorescentes e tenham afinidade por lectinas, que se liguem à *C. albicans*.

Os conjugados PQs-D-GN mostraram uma marcação média de $98,1\% \pm 1,4$ da levedura (*C. albicans*/ConA), conforme apresentado no perfil de histograma homogêneo na Figura 3B (controle na Figura 3A). Como esperado, na superfície da *C. albicans* existem resíduos de carboidratos específicos para ligação com a ConA que também permitem uma interação com os conjugados em associação à superfície da levedura. Tenorio *et al.* (2015), por exemplo, desenvolveram conjugados PQs-ConA e obtiveram marcação efetiva da parede celular da *C. albicans* diretamente, pela interação com resíduos de glicose/manose na superfície da levedura [28].

Após a inibição prévia dos sítios da ConA com manopiranosídeo no sistema *C. albicans*/ConA, com posterior adição dos conjugados PQs-D-GN (*C. albicans*/ConA/Manopiranosídeo) foi observada uma redução da marcação das leveduras para $34,3\% \pm 8,2$ (Figura 3C). Essa redução observada pela citometria de fluxo reflete que o manopiranosídeo interagiu com os DRCs da ConA, diminuindo a disponibilidade de sítios dessa lectina para o conjugado se ligar. Outras moléculas com afinidade pela ConA podem realizar essa função inibitória, como glicanos ricos em manose, como a manana (polímero de manose) [36]. Essa inibição contribui para comprovar que a interação de PQs-D-GN com *C. albicans*/ConA é específica e que a metodologia é sensível a esses tipos de ensaios baseados na detecção de sinais de fluorescência.

Essa nossa nova metodologia permitiu estudar a eficiência dos conjugados PQs-D-GN, bem como a especificidade após o ensaio de inibição com manopiranosídeo. Além disso, os conjugados permaneceram fluorescentes, com boa estabilidade coloidal e

funcional, por pelo menos 4 meses. Dessa forma, a levedura *C. albicans* foi um suporte biológico prático e acessível para avaliação da eficiência/especificidade dos conjugados PQs-D-GN, antes de prosseguir para as próximas etapas experimentais de incubações com as células de câncer. Essa abordagem traz vantagens em relação a metodologias que não envolvem interação direta com um sistema biológico, tais como análise de potencial zeta ou espectroscopia de transformada de Fourier por infravermelho (FTIR), utilizadas em alguns trabalhos que compartilham do nosso objetivo de desenvolver nanossondas fluorescentes baseadas em gliconanopartículas, pois avaliar a eficiência e, especialmente, a especificidade da interação é relevante antes das incubações com as células de câncer [4,20,37]. As nanossondas PQs-D-GN aqui desenvolvidas têm potencial para estudos de câncer e se beneficiam da alta fluorescência, do pequeno diâmetro hidrodinâmico e do caráter hidrofílico dos PQs utilizados nesse trabalho.

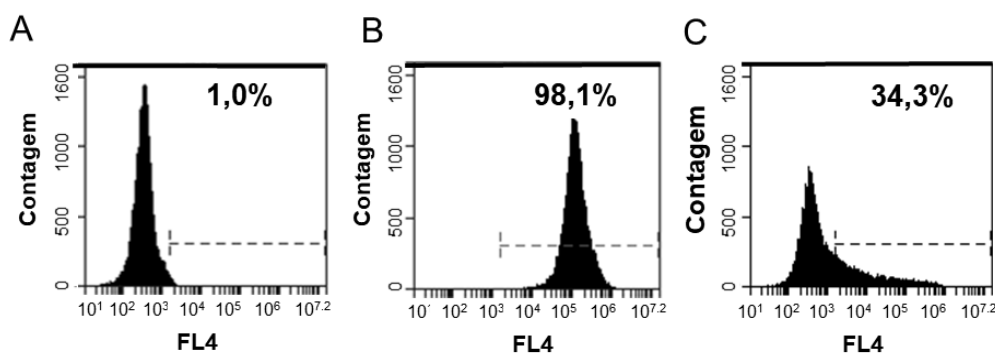


Figura 3. Histogramas representativos da marcação de *Candida albicans* revestida com a lectina ConA (*C. albicans*/ConA). Em: (A) controle *C. albicans*/ConA, (B) Sistema *C. albicans*/ConA/PQs-D-GN e (C) Sistema Inibido, *C. albicans*/ConA/Manopiranosídeo/PQs-D-GN.

3.3 - Interação dos Conjugados PQs-D-GN com Células de Câncer

Após as caracterizações ópticas e a confirmação da conjugação, avaliamos a interação dos conjugados com a linhagem de células de câncer HeLa por duas técnicas complementares baseadas em fluorescência, a citometria de fluxo e a microscopia de fluorescência (Figura 4). A primeira nos fornece um dado quantitativo com relação ao número de células marcadas e a segunda informa sobre a localização espacial dos conjugados ao interagirem com as células.

Ao incubar o PQs-D-GN com as células HeLa por 60 min para análise quantitativa por citometria de fluxo, observamos uma marcação de aproximadamente $96,6\% \pm 0,6$ conforme observado no histograma representativo na Figura 4B (controle na Figura 4A).

Adicionalmente, a análise dos *dot plots* que relacionam complexidade interna e tamanho celular (SSC vs. FSC), indicou que as células incubadas com PQs-D-GN apresentaram manutenção das suas características, indicando boa viabilidade (dados não mostrados).

De acordo com a análise de microscopia de fluorescência, as células HeLa foram marcadas intracelularmente pelos conjugados PQs-D-GN (fluorescentes no vermelho). Observamos marcações em forma de pequenos pontos isolados, com padrões vesiculares (indicados por setas amarelas), e outras áreas mais densamente marcadas, indicando uma maior concentração de nanossondas próximas ao núcleo (regiões indicadas por asteriscos amarelos na Figura 5D). Um padrão de marcação similar foi reportado por Korotcov e colaboradores (2012) ao incubar com D-glicosamina conjugada a corante orgânico [19]. O núcleo das células HeLa é mostrado em azul marcado pelo corante fluorescente Hoechst (Figura 4C e 4D). O uso do marcador nuclear é interessante para evidenciar a localização dos PQs-D-GN intracelularmente, indicando que uma incubação de 60 min foi suficiente para ocorrer a captação dos conjugados pelas células HeLa. É importante salientar que, durante as análises, as células HeLa apresentaram-se aderidas nas placas e com a morfologia característica preservada.

Vale também mencionar que a concentração utilizada de PQs no nosso estudo não levou a mudanças de viabilidade consideráveis de acordo com trabalhos de Cabral Filho *et al.* e Pereira *et al.*, utilizando o ensaio de resazurina [22,38]. Esse composto é permeável às células e é reduzido na mitocôndria a resorufin (cor rosa). Este ensaio baseado em resazurina avalia a viabilidade celular após interação de PQs, apenas pela leitura do sobrenadante, sem interferências da absorbância das próprias nanopartículas de PQs internalizadas pelas células, o que é relevante para se obter resultados sem interferentes [21,39].

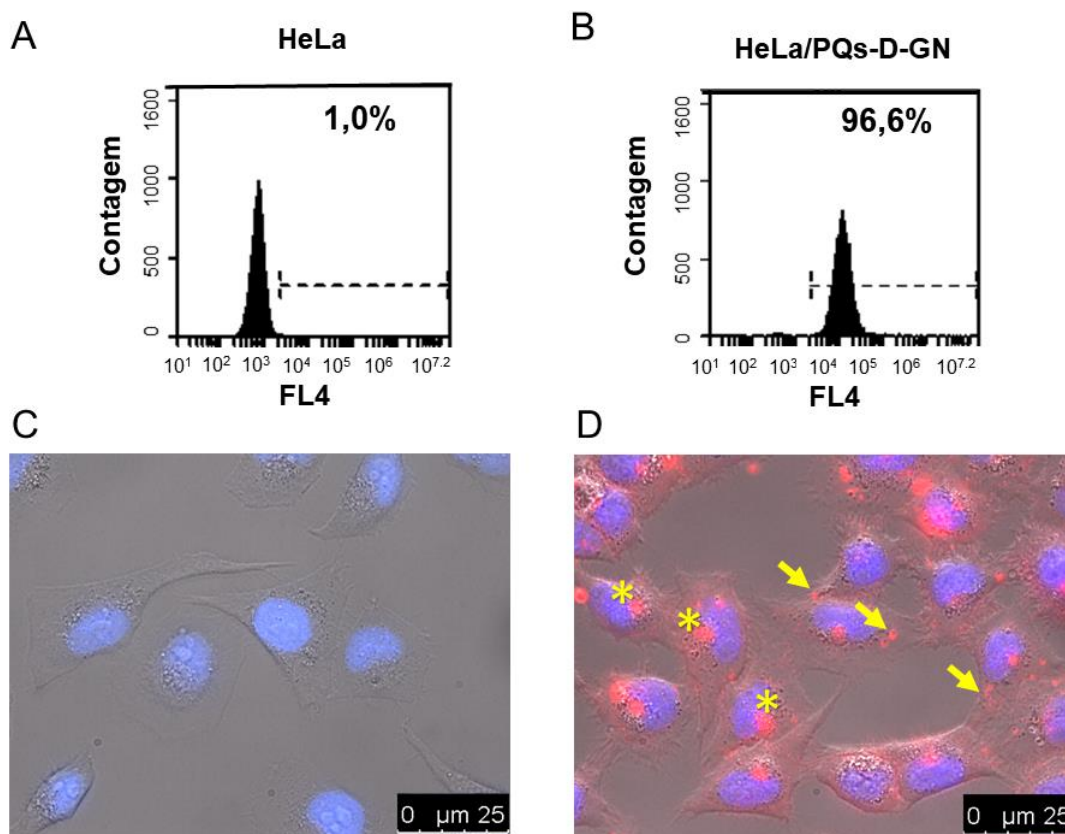


Figura 4. Marcação de células HeLa pelos conjugados PQs-D-GN. Na parte superior, histogramas representativos de citometria de fluxo, obtidos com o filtro FL4 ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$). Na parte inferior, imagens de microscopia fluorescente de células HeLa. Em: (A e C) células HeLa (controle) e (B e D) células HeLa marcadas por PQs-D-GN. Em (D) as setas e asteriscos em amarelo mostraram padrões de marcações fluorescentes em vermelho dos conjugados PQs-D-GN. A fluorescência em azul do núcleo das células indica marcação pelo corante Hoechst. Barra de escala: 25 μm .

A linhagem HeLa também tem sido escolhida como modelo de células de câncer por outros estudos [22–24]. Conjugados baseados em PQs, como o desenvolvido por nós, aplicados a essa linhagem de câncer, têm ajudado a elucidar a captação de diferentes moléculas essenciais ao metabolismo das células de câncer [23,24]. Podemos citar os estudos de Monteiro *et al.* e de Cabral Filho *et al.* que, respectivamente, utilizaram conjugados de PQs com ácido fólico (AF) e PQs e transferrina (Tf) para estudar a expressão, internalização e reciclagem de receptores específicos para essas moléculas em linhagens de células de câncer, incluindo a HeLa. Interessantemente, ambos estudos observaram a presença de pequenas vesículas na região perinuclear das células HeLa, assim como vimos para o conjugado PQs-D-GN. No entanto, a marcação pelos sistemas PQs-AF e PQs-Tf não se apresentou tão densamente localizada como para os conjugados PQs-D-GN. Cabral Filho *et*

al., também demonstrou que, quando incubou PQs não conjugados a moléculas com células HeLa, por 60 min, tempo semelhante ao desse estudo, houve marcação inferior a 25%.

Como anteriormente mencionado, a interação e a captação de glicose por células de câncer podem depender do análogo utilizado [14,19]. Alguns estudos descritos na literatura realizaram associações de corantes orgânicos, ou PQs, com glicosamina com o interesse em melhor elucidar processos intracelulares, assim como almejamos, ou explorar a captação desse carboidrato no desenvolvimento de sistemas para terapia e diagnóstico no contexto do câncer [4,6,18,20,40]. O desenvolvimento de gliconopartículas baseadas em PQs vem atraindo interesse principalmente devido às propriedades ópticas singulares desses nanocristais.

Assim, Igawa *et al.* conjugaram PQs de CdSe, sintetizados por via hidrofóbica, utilizando troca de ligantes com AMS para torná-los hidrofílicos, à D-GN, usando apenas EDC como intermediário da ligação. Eles estudaram a captação da nanossonda por células de osteosarcoma humano (NOS-1), observando que esta foi transportada para o citoplasma após 3 h [6]. Benito-Alifonso *et al.* sintetizaram PQs hidrofóbicos de CdSe/ZnS, gerando três diferentes sistemas hidrofílicos por meio de troca de ligantes com dois tipos de moléculas tioladas derivadas de DHLA-PEG (polietileno glicol – PEG e DHLA – ácido lipóico) ou AMA. Foi realizada a conjugação, utilizando somente EDC, com diferentes glicanos, incluindo derivado de glicose aminado. Nos ensaios foram utilizadas células HeLa. Os autores mencionaram resultados apenas para o conjugado PQs-glicose formados a partir de nanocristais estabilizados com um dos ligantes PEG-DHLA, informando que não visualizaram marcação nas células mesmo após 24 h de incubação [21].

Sabe-se que o EDC atua ativando grupos carboxila e o intermediário *O*-acilisouréia, que é instável, é formado. Assim, ao introduzir o éster NHS melhora-se a estabilidade, favorecendo uma conjugação mais eficiente com amins primárias. Por essa razão, diferente dos autores das aplicações descritas acima, nós elegemos essa estratégia, a utilização de EDC/NHS, para a conjugação aqui desenvolvida [22,41,42]. Vale mencionar que é importante realizar o bloqueio dos grupos carboxílicos ativados após a conjugação, caso contrário esses iriam reagir de maneira não específica com qualquer amina de moléculas presentes nas células. Ademais, sínteses por via hidrofóbica são laboriosas e o processo de conversão de PQs hidrofóbicos para hidrofílicos leva a perdas de fluorescência, muitas vezes consideráveis [43].

Ranjbar-Navazi *et al.* observou a endocitose de conjugados de PQs de InP/ZnS com D-GN (isoladamente ou combinado com AF), preparados via EDC/NHS, por células de ovário (OVCAR-3) e células neoplásicas de pulmão (A549) por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo, após 2 h de incubação a $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para tanto, os PQs foram sintetizados por via hidrofóbica e transformados em hidrofílicos por troca de ligantes com AMS [4]. Ge *et al.* prepararam conjugados constituídos por PQs e D-glicosamina, via EDC/NHS, assim como nós, incubaram esses nanossistemas em células cancerosas de mama humana (MCF-7) por 4 h a $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, as quais apresentaram o interior celular fluorescente por microscopia, e cerca de 93,9% das células foram marcadas como na citometria de fluxo [20]. Ambos os trabalhos não mencionam sobre os procedimentos utilizados para bloqueio dos grupos carboxílicos ativados nos PQs.

No nosso trabalho, observamos que os conjugados PQs-D-GN, preparados via EDC/NHS utilizando nanocristais sintetizados diretamente em meio aquoso, marcaram efetivamente as células HeLa utilizando um tempo de incubação cerca de 2 a 4× menor e concentrações aproximadamente 20 a 50× menor que Ge e Ranjbar-Navazi *et al.* Assim, acreditamos que gliconanopartículas versáteis e efetivas foram aqui desenvolvidas, promissoras para guiar estudos de elucidação de vias e padrões de internalização/metabolismo da glicose por diferentes linhagens de células de câncer por fluorescência.

4 - Conclusão

Os conjugados PQs-D-GN desenvolvidos neste trabalho apresentaram alta fluorescência e tamanho nanométrico compatível com vias de internalização da glicose, possibilitando estudos guiados por fluorescência relacionados à captação desse análogo por células de câncer. Eles mantiveram-se funcionais e fluorescentes, com boa estabilidade coloidal, por um longo período (pelo menos por 4 meses).

A nova metodologia de avaliação de conjugação, também desenvolvida nesse trabalho, utilizando o sistema *C. albicans*/ConA, permitiu confirmar a eficiência e especificidade dos conjugados PQs-D-GN. Esta metodologia é quantitativa e apresentou boa reprodutibilidade, praticidade e versatilidade, podendo ser personalizada e assim ampliar a sua aplicabilidade para outros conjugados que se deseja detectar.

Os conjugados PQs-D-GN também interagiram de forma eficiente com as células HeLa, relevando não só uma população celular marcada intensamente de forma homogênea

(97%) por citometria de fluxo, como também um padrão de fluorescência vesicular pelo citoplasma e áreas densamente marcadas próximas aos núcleos pela microscopia.

Assim, as gliconanopartículas aqui desenvolvidas apresentam potencial para serem aplicadas em estudos sobre a via e o padrão de captação/metabolismo da glicose guiados por fluorescência para elucidação de processos relacionados à biologia celular do câncer em diferentes linhagens. Vale ainda mencionar que essas nanossondas podem ser aplicadas em estudos com outros sistemas biológicos, nos quais a interação com a glicose seja relevante.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia (FACEPE); Institutos Nacionais de Fotônica (INFO); Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABIC); Departamento de Bioquímica (UFPE).

Referências

- [1] R.D. Cummings, “Stuck on sugars – how carbohydrates regulate cell adhesion, recognition, and signaling,” *Glycoconj. J.* 36 (2019) 241–257. <https://doi.org/10.1007/s10719-019-09876-0>.
- [2] S.V. Glavey, D. Huynh, M.R. Reagan, S. Manier, M. Moschetta, Y. Kawano, A.M. Roccaro, I.M. Ghobrial, L. Joshi, M.E. O’dwyer, The cancer glycome: Carbohydrates as mediators of metastasis, (2015). <https://doi.org/10.1016/j.blre.2015.01.003>.
- [3] C.R.A. Cunha, A.D.P.R. Oliveira, T.V.C. Firmino, D.P.L.A. Tenório, G. Pereira, L.B. Carvalho, B.S. Santos, M.T.S. Correia, A. Fontes, Biomedical applications of glyconanoparticles based on quantum dots, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1862 (2018) 427–439. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.11.010>.
- [4] Z. Ranjbar-Navazi, M. Eskandani, M. Johari-Ahar, A. Nemati, H. Akbari, S. Davaran, Y. Omid, Doxorubicin-conjugated D-glucosamine- and folate- bi-functionalised InP/ZnS quantum dots for cancer cells imaging and therapy, *J. Drug Target.* 26 (2018) 267–277. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2017.1365876>.
- [5] Q. Chen, M. Gao, Z. Li, Y. Xiao, X. Bai, K.O. Boakye-Yiadom, X. Xu, X.Q. Zhang, Biodegradable nanoparticles decorated with different carbohydrates for efficient

macrophage-targeted gene therapy, *J. Control. Release.* 323 (2020) 179–190. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2020.03.044>.

[6] K. Igawa, M.F. Xie, H. Ohba, S. Yamada, Y. Hayashi, D-glucosamine conjugation accelerates the labeling efficiency of quantum dots in osteoblastic cells, *Biomed Res. Int.* 2014 (2014). <https://doi.org/10.1155/2014/821607>.

[7] A.P.P. Kröger, M.I. Komil, N.M. Hamelmann, A. Juan, M.H. Stenzel, J.M.J. Paulusse, Glucose Single-Chain Polymer Nanoparticles for Cellular Targeting, *ACS Macro Lett.* 8 (2018) 95–101. <https://doi.org/10.1021/ACSMACROLETT.8B00812>.

[8] X.-D. Shi, Y.-Q. Tian, J.-L. Wu, S.-Y. Wang, Synthesis, characterization, and biological activity of selenium nanoparticles conjugated with polysaccharides. 61 (2020) 2225–2236. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1774497>.

[9] A. Fadaka, B. Ajiboye, O. Ojo, O. Adewale, I. Olayide, R. Emuowhochere, Biology of glucose metabolism in cancer cells, *J. Oncol. Sci.* 3 (2017) 45–51. <https://doi.org/10.1016/J.JONS.2017.06.002>.

[10] S.S. Mullapudi, D. Mitra, M. Li, E.-T. Kang, E. Chiong, K.G. Neoh, Potentiating anti-cancer chemotherapeutics and antimicrobials via sugar-mediated strategies, *Mol. Syst. Des. Eng.* 5 (2020) 772–791. <https://doi.org/10.1039/C9ME00175A>.

[11] A. Gallamini, C. Zwarthoed, A. Borra, Positron emission tomography (PET) in oncology, *Cancers (Basel)*. 6 (2014) 1821–1889. <https://doi.org/10.3390/cancers6041821>.

[12] F. Maddalena, G. Lettini, R. Gallicchio, L. Sisinni, V. Simeon, A. Nardelli, A.A. Venetucci, G. Storto, M. Landriscina, Evaluation of glucose uptake in normal and cancer cell lines by positron emission tomography, *Mol. Imaging.* 14 (2015) 490–498. <https://doi.org/10.2310/7290.2015.00021>.

[13] B. Pajak, E. Siwiak, M. Sołtyka, A. Priebe, R. Zieliński, I. Fokt, M. Ziemniak, A. Jaśkiewicz, R. Borowski, T. Domoradzki, W. Priebe, 2-Deoxy-d-Glucose and Its Analogs: From Diagnostic to Therapeutic Agents, *Int. J. Mol. Sci.* 2020, Vol. 21, Page 234. 21 (2019) 234. <https://doi.org/10.3390/IJMS21010234>.

[14] C.C. Barron, P.J. Bilan, T. Tsakiridis, E. Tsiani, Facilitative glucose transporters: Implications for cancer detection, prognosis and treatment, *Metabolism.* 65 (2016) 124–139. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.10.007>.

- [15] K.E. Hamilton, M.F. Bouwer, L.L. Louters, B.D. Looyenga, Cellular binding and uptake of fluorescent glucose analogs 2-NBDG and 6-NBDG occurs independent of membrane glucose transporters, *Biochimie.* 190 (2021) 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2021.06.017>.
- [16] C.L. Kohnhorst, M. Kyoung, M. Jeon, D.L. Schmitt, E.L. Kennedy, J. Ramirez, S.M. Bracey, B.T. Luu, S.J. Russell, S. An, Identification of a multienzyme complex for glucose metabolism in living cells, *J. Biol. Chem.* 292 (2017) 9191–9203. <https://doi.org/10.1074/JBC.M117.783050>.
- [17] O.I. Kolenc, K.P. Quinn, Evaluating cell metabolism through autofluorescence imaging of NAD(P)H and FAD, *Antioxidants Redox Signal.* 30 (2019) 875–889. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7451>.
- [18] Z. Cheng, J. Levi, Z. Xiong, O. Gheysens, S. Keren, X. Chen, S.S. Gambhir, Near-infrared fluorescent deoxyglucose analogue for tumor optical imaging in cell culture and living mice, *Bioconjug. Chem.* 17 (2006) 662–669. <https://doi.org/10.1021/bc050345c>.
- [19] A.V Korotcov, Y. Ye, Y. Chen, F. Zhang, S. Huang, S. Lin, R. Sridhar, S. Achilefu, P.C. Wang, Glucosamine-linked near-infrared fluorescent probes for imaging of solid tumor xenografts, *Mol. Imaging Biol.* 14 (2012) 443–451. <https://doi.org/10.1007/s11307-011-0520-4>.
- [20] X.L. Ge, B. Huang, Z.L. Zhang, X. Liu, M. He, Z. Yu, B. Hu, R. Cui, X.J. Liang, D.W. Pang, Glucose-functionalized near-infrared Ag₂Se quantum dots with renal excretion ability for long-term: In vivo tumor imaging, *J. Mater. Chem. B.* 7 (2019) 5782–5788. <https://doi.org/10.1039/c9tb01112a>.
- [21] D. Benito-Alifonso, S. Tremel, B. Hou, H. Lockyear, J. Mantell, D.J. Fermin, P. Verkade, M. Berry, M.C. Galan, Lactose as a “Trojan Horse” for Quantum Dot Cell Transport, *Angew. Chemie.* 126 (2014) 829–833. <https://doi.org/10.1002/ange.201307232>.
- [22] M.I.A. Pereira, G. Pereira, C.A.P. Monteiro, C.F.G.C. Geraldes, P.E. Cabral Filho, C.L. Cesar, A.A. de Thomaz, B.S. Santos, G.A.L. Pereira, A. Fontes, Hydrophilic Quantum Dots Functionalized with Gd(III)-DO₃A Monoamide Chelates as Bright and Effective T₁-weighted Bimodal Nanoprobe, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–5. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38772-8>.

- [23] C.A.P. Monteiro, A.D.P.R. Oliveira, R.C. Silva, R.R.M. Lima, F.O. Souto, M.O. Baratti, H.F. Carvalho, B.S. Santos, P.E. Cabral Filho, A. Fontes, Evaluating internalization and recycling of folate receptors in breast cancer cells using quantum dots, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 209 (2020) 111918. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111918>.
- [24] P.E. Cabral Filho, A.L.C. Cardoso, M.I.A. Pereira, A.P.M. Ramos, F. Hallwas, M.M.C.A. Castro, C.F.G.C. Geraldes, B.S. Santos, M.C. Pedroso De Lima, G.A.L. Pereira, A. Fontes, CdTe quantum dots as fluorescent probes to study transferrin receptors in glioblastoma cells, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1860 (2016) 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.09.021>.
- [25] X. Wu, H. Liu, J. Liu, K.N. Haley, J.A. Treadway, J.P. Larson, N. Ge, F. Peale, M.P. Bruchez, Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots, *Nat. Biotechnol.* 21 (2003) 41–46. <https://doi.org/10.1038/NBT764>.
- [26] P. Dagtepe, V. Chikan, J. Jasinski, V.J. Leppert, Quantized Growth of CdTe Quantum Dots; Observation of Magic-Sized CdTe Quantum Dots, *J. Phys. Chem. C.* 111 (2007) 14977–14983. <https://doi.org/10.1021/jp072516b>.
- [27] W.W. Yu, L. Qu, W. Guo, X. Peng, Experimental Determination of the Extinction Coefficient of CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals, 125 (2003) 2854–2860.
- [28] D.P.L.A. Tenório, C.G. Andrade, P.E. Cabral Filho, C.P. Sabino, I.T. Kato, L.B. Carvalho, S. Alves, M.S. Ribeiro, A. Fontes, B.S. Santos, CdTe quantum dots conjugated to concanavalin A as potential fluorescent molecular probes for saccharides detection in *Candida albicans*, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 142 (2015) 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.11.010>.
- [29] C.R. Yonzon, E. Jeoung, S. Zou, G.C. Schatz, M. Mrksich, R.P. Van Duyne, A comparative analysis of localized and propagating surface plasmon resonance sensors: The binding of Concanavalin A to a monosaccharide functionalized self-assembled monolayer, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 12669–12676. <https://doi.org/10.1021/ja047118q>.
- [30] S. Yan, L. Zhang, Y. Tang, Y. Lv, Synthesis of water-soluble Ag₂Se QDs as a novel resonance Rayleigh scattering sensor for highly sensitive and selective ConA detection, *Analyst.* 139 (2014) 4210–4215. <https://doi.org/10.1039/c4an00579a>.

- [31] A. Chatterjee, D.K. Mandal, Quaternary association and reactivation of dimeric concanavalin A, *Int. J. Biol. Macromol.* 35 (2005) 103–109. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2005.01.005>.
- [32] A.A. De Thomaz, D.B. Almeida, V.B. Pelegati, H.F. Carvalho, C.L. Cesar, Measurement of the Hydrodynamic Radius of Quantum Dots by Fluorescence Correlation Spectroscopy Excluding Blinking, *J. Phys. Chem. B.* 119 (2015) 4294–4299. <https://doi.org/10.1021/JP512214P>.
- [33] G. Pereira, C.A.P. Monteiro, G.M. Albuquerque, M.I.A. Pereira, M.P. Cabrera, P.E. Cabral Filho, G.A.L. Pereira, A. Fontes, B.S. Santos, (Bio)conjugation Strategies Applied to Fluorescent Semiconductor Quantum Dots, *J. Braz. Chem. Soc.* 00 (2019) 1–25. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190163>.
- [34] P.E. Cabral Filho, M.I.A. Pereira, H.P. Fernandes, A.A. de Thomaz, C.L. Cesar, B.S. Santos, M.L. Barjas-Castro, A. Fontes, Blood group antigen studies using CdTe quantum dots and flow cytometry, *Int. J. Nanomedicine.* 10 (2015) 4393–4404. <https://doi.org/10.2147/IJN.S84551>.
- [35] J. Wang, X. Huang, F. Zan, C.G. Guo, C. Cao, J. Ren, Studies on bioconjugation of quantum dots using capillary electrophoresis and fluorescence correlation spectroscopy, *Electrophoresis.* 33 (2012) 1987–1995. <https://doi.org/10.1002/elps.201200024>.
- [36] P. Biely, Z. Krátkú, Š. Bauer, Interaction of Concanavalin A with External Mannan-Proteins of *Saccharomyces cerevisiae* Glycoprotein Nature of β -Glucanases, *Eur. J. Biochem.* 70 (1976) 75–81. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1976.tb10957.x>.
- [37] M. Drozd, M. Pietrzak, D. Kalinowska, I. Grabowska-Jadach, E. Malinowska, Glucose dithiocarbamate derivatives as capping ligands of water-soluble CdSeS/ZnS quantum dots, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 509 (2016) 656–665. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.09.072>.
- [38] P.E. Cabral Filho, M.P. Cabrera, A.L.C. Cardoso, O.A. Santana, C.F.G.C. Geraldés, B.S. Santos, M.C. Pedroso de Lima, G.A.L. Pereira, A. Fontes, Multimodal highly fluorescent-magnetic nanoplatform to target transferrin receptors in cancer cells, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1862 (2018) 2788–2796. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.08.014>.

- [39] M.I.A. Pereira, C.A.P. Monteiro, W.F. de Oliveira, B.S. Santos, A. Fontes, P.E. Cabral Filho, Resazurin-Based Assay to Evaluate Cell Viability After Quantum Dot Interaction, in: *Methods Mol. Biol.*, *Methods Mol Biol*, 2020: pp. 213–221. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0463-2_12.
- [40] A. V Korotcov, Y. Ye, Y. Chen, F. Zhang, S. Huang, S. Lin, R. Sridhar, S. Achilefu, P.C. Wang, Glucosamine Linked Near-Infrared Fluorescent probes for Imaging of Solid Tumor Xenografts, *Mol. Imaging Biol.* 14 (2012) 443–451. <https://doi.org/10.1007/s11307-011-0520-4.Glucosamine-Linked>.
- [41] G.T. Hermanson, *The Reactions of Bioconjugation*, *Bioconjugate Tech.* (2013) 229–258. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382239-0.00003-0>.
- [42] G. Pereira, C.A.P. Monteiro, G.M. Albuquerque, M.I.A. Pereira, M.P. Cabrera, P.E. Cabral, G.A.L. Pereira, A. Fontesa, B.S. Santos, (Bio)conjugation Strategies Applied to Fluorescent Semiconductor Quantum Dots, *J. Braz. Chem. Soc.* 30 (2019) 2536–2561. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190163>.
- [43] R. Wu, T. Wang, M. Wu, Y. Lv, X. Liu, J. Li, H. Shen, L.S. Li, Synthesis of highly stable CuInZnS/ZnS//ZnS quantum dots with thick shell and its application to quantitative immunoassay, *Chem. Eng. J.* 348 (2018) 447–454. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2018.04.145>.

5 CONCLUSÕES

- Os quelatos baseados em ligante cíclico DOTA e Gd(III) foram preparados eficientemente, apresentando em torno de 97% de íons complexados e mantiveram-se estáveis em pH fisiológico, quanto à transmetalização na presença de Zn(II).
- Os PQs foram eficientemente conjugados aos quelatos de DOTA-Gd(III), com uma eficiência de conjugação de cerca de 75%, gerando-se nanossondas óptico-magnéticas.
- As nanossondas óptico-magnéticas apresentaram uma relaxividade r_1 em cerca de $5 \times$ por íon Gd(III) e $100 \times$ por PQ maior que o quelato molecular, sinal fluorescente intenso e estabilidade coloidal, mantendo essas propriedades por pelo menos 3 meses. Ademais, os nanossistemas mostram-se promissores para serem aplicados na aquisição de imagens por IRM e por fluorescência de células de câncer, sem induzir citotoxicidade nas condições avaliadas.
- Foi redigido e publicado um capítulo de protocolo experimental sobre a utilização da resazurina em ensaios de viabilidade celular com nanossondas envolvendo PQs.
- Foi desenvolvida uma metodologia baseada em *Candida albicans*/ConA que se mostrou quantitativa, prática, reprodutível e versátil para a avaliação da eficiência e especificidade da conjugação de PQs com D-GN, sendo personalizável para outras gliconanopartículas fluorescentes.
- As gliconanopartículas baseadas em PQs e D-GN foram eficientemente preparadas, mantendo-se funcionais, coloidalmente estáveis e fluorescentes por pelo menos 4 meses.
- As nanossondas PQs-D-GN foram captadas eficientemente pelas células HeLa, sendo observadas no citoplasma, com áreas mais densamente marcadas nas proximidades dos núcleos. Assim, foram desenvolvidas gliconanopartículas promissoras para estudar a(s) via(s) e o padrão de captação/metabolismo da glicose guiados por fluorescência, para elucidação de processos relacionados à biologia celular do câncer.
- Por fim, neste trabalho foram desenvolvidas nanossondas bifuncionais versáteis, baseadas em PQs hidrofílicos, com potencial para serem aplicadas em diferentes estudos relacionados à biologia do câncer.

6 SÚMULA CURRICULAR

Atividades acadêmicas e científicas realizadas durante o doutorado:

1. Artigos científicos e capítulos de livros:

- PEREIRA, M. I. A. *et al.* Hydrophilic Quantum Dots Functionalized with Gd(III)-DO₃A Monoamide Chelates as Bright and Effective T₁-weighted Bimodal Nanoprobos. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–5, 2019, <https://www.nature.com/articles/s41598-019-38772-8>.
- PEREIRA, M. I. A. *et al.* Resazurin-Based Assay to Evaluate Cell Viability After Quantum Dot Interaction. In: **Methods in Molecular Biology**, Quantum dots, v. 2135, p. 213–221, 2020, https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-0716-0463-2_12.
- PEREIRA, G.; PEREIRA, M. I. A. *et al.* (Bio)conjugation Strategies Applied to Fluorescent Semiconductor Quantum Dots. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 12, p. 2536–2561, 2019, <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190163>.
- PEREIRA, G.; CABRAL FILHO, P. E.; PEREIRA, M. I. A. *et al.* Bimodal Nanostructured Materials Containing Quantum Dots for Optical and Magnetic Resonance Imaging. In: American Scientific Publishers. (Org.). **Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology**, p. 407-434, 2017.
- CUNHA, C. R. A.; ANDRADE, C. G.; PEREIRA, M. I. A. *et al.* Quantum dot-Cramoll lectin as novel conjugates to glycobiology. **Journal Of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 178, p. 85-91, 2018, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29127943/>.
- RIBEIRO, J. F. F; PEREIRA, M. I. A. *et al.* Quantum dot-based fluoroassays for Zika. In: **Zika Virus Impact, Diagnosis, Control, and Models**. Academic Press, p. 283-292, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820267-8.00027-3>, 2021.

2. Participação em eventos:

- PEREIRA, M. I. A. I Congresso Nacional Multidisciplinar de Covid-19, Ouvinte, 2021.

- PEREIRA, M. I. A. **Atualização, Resignificação e Desenvolvimento de Competências Profissionais**, Ouvinte, 2021.
- PEREIRA, M. I. A. **VI Congresso Regional da Sociedade Brasileira de Biofísica (SBBf)**, Ouvinte, 2021.
- **II Workshop de Inovação em Câncer**, Fiocruz, Ouvinte, 2019.
- PEREIRA, M. I. A *et al.* **Gliconanopartículas Fluorescentes Para Estudo Da Biologia Celular Do Câncer**. In: Encontro Anual da Biofísica 2019, 2019, Recife. *Blucher Biophysics Proceedings*. São Paulo: Editora *Blucher*, p. 219, 2019.
- LIMA, R. R. M.; PEREIRA, M. I. A. *et al.* **Sistemas Multimodais Óptico-Paramagnéticos para o Estudo De Receptores De Transferrina**, Apresentação de Trabalho/Congresso, 2019.
- LIMA, M. V.; PEREIRA, M. I. A. *et al.* **Bioacumulação de Pontos Quânticos Em Molusco Biomphalaria Glabrata**, 2019, Apresentação de Trabalho/Congresso, 2019.
- PEREIRA, M. I. A. **Debate aberto sobre a Biomedicina e a Perícia Criminal**, Palestra/Mesa Redonda, 2018.
- LIMA, R. R. M.; PEREIRA, M. I. A. *et al.* **Agentes de Contraste Multimodais com Potencial para Estudo de Receptores de Ácido Fólico em Células Cancerígenas**, Apresentação de Trabalho/Outra, 2017.
- ASSIS, L. G.; RIBEIRO, J. F. F.; PEREIRA, M. I. A. *et al.* **Pontos quânticos conjugados a anti-IgG: aplicações em fluoroimunoensaios**, Semana de Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde, 2017.

3. Participação em Banca avaliadora:

- 26ª Edição do Ciência Jovem, 2020.
- III Jornada de Inovação e Pesquisa, UNISÃOMIGUEL, 2019.
- Jose Carlos da Silva: HIV X População Carcerária no Brasil: Uma Análise Integrativa. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, 2019.

- Lara Gonçalves de Assis: Bioconjugados de Pontos Quânticos para Imunoensaios - Aplicação Para Zika, Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, 2018.
- 24ª Ciência Jovem, Espaço Ciência de Pernambuco, 2018.
- Wadja Melo Alves Guimarães
Pontos Quânticos em Biossensores Eletroquímicos e suas Aplicações Biomédicas Bioconjugados de Pontos Quânticos para o Estudo dos Receptores de Folato em Células Cancerosas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, 2017.
- XXIII Semana de Biomedicina: "Cenário do Profissional Biomédico: Uma Visão Panorâmica", Universidade Federal de Pernambuco, 2017.

4. Projetos de pesquisa:

- Desenvolvimento de Agentes de Contraste Bimodais para imagem óptica e RMN baseados em nanotecnologia. Situação: em andamento (FCT-CAPES).
- Ensaio Bioanalítico para ZIKA Empregando Nanomarcadores Fluorescentes. Situação: em andamento (FACEPE), 2016-2021.
- Imunossensores utilizando Quantum Dots - Aplicações para a Detecção de Troponina Cardíaca. Situação: concluído (CNPq), 2013-2018.
- Aplicações de Nanossondas Multimodais e Ensino de Ciências em Biofísica. Situação: Em andamento (CNPq).

5. Orientações e supervisões:

- Rennan Ribeiro Mano de Lima: Bioconjugados de Pontos Quânticos para o Estudo dos Receptores de Folato em Células Cancerosas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, 2019.
- João Victor Costa de Lima: Aplicação de Pontos Quânticos em Imuno-hematologia. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, 2021.

6. Organização de evento:

- Encontro Anual da Biofísica, 2017.

REFERÊNCIAS

- AFTAB, S. *et al.* **Quantum dots: Synthesis and characterizations**. *Electroanalytical Applications of Quantum Dot-Based Biosensors*, p. 1–35, 2021.
- AIME, S.; BOTTA, M.; ERMONDI, G. **NMR Study of Solution Structures and Dynamics of Lanthanide(III) Complexes of DOTA**. *Inorganic Chemistry*, v. 31, n. 21, p. 4291–4299, 1992.
- AL, R. *et al.* **Infrared-emitting colloidal nanocrystals: synthesis, assembly, spectroscopy, and applications**. *Small* (Weinheim an der Bergstrasse, Germany), v. 3, n. 4, p. 536–557, 2007.
- ALADESUYI, O. A.; OLUWAFEMI, O. S. **Synthesis strategies and application of ternary quantum dots — in cancer therapy**. *Nano-Structures and Nano-Objects*, v. 24, p. 1-13, 2020.
- ALBUQUERQUE, G. M. *et al.* **Quantum Dots and Gd³⁺ Chelates: Advances and Challenges Towards Bimodal Nanoprobes for Magnetic Resonance and Optical Imaging**. *Topics in Current Chemistry*, Springer, p. 1-35, 2021.
- ALLAM, M.; CAI, S.; COSKUN, A. F. **Multiplex bioimaging of single-cell spatial profiles for precision cancer diagnostics and therapeutics**. *npj Precision Oncology*, v. 4, n. 1, p. 1–14, 2020.
- BALZAROTTI, F. *et al.* **Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes**. *Science*, v. 355, n. 6325, p. 606–612, 2017.
- BARRON, C. C. *et al.* **Facilitative glucose transporters: Implications for cancer detection, prognosis and treatment**. *Metabolism: Clinical and Experimental*, v. 65, n. 2, p. 124–139, 2016.
- BENITO-ALIFONSO, D. *et al.* **Lactose as a “Trojan Horse” for Quantum Dot Cell Transport**. *Angewandte Chemie*, v. 126, n. 3, p. 829–833, 2014.
- BENTOLILA, L. A.; MICHALET, X.; WEISS, S. **Quantum Optics: Colloidal Fluorescent Semiconductor Nanocrystals (Quantum Dots) in Single-Molecule Detection and Imaging**. *Single Molecules and Nanotechnology*, v. 12, p. 53–81, 2008.
- BRUS, L. E. **Electron-electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state**. *The Journal of Chemical Physics*, v. 80, n. 9, p. 4403–4409, 1984.
- BWATANGLANG, I. B. *et al.* **In vivo tumor targeting and anti-tumor effects of 5-fluororacil loaded, folic acid targeted quantum dot system**. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 480, p. 146–158, 2016.
- CABRAL FILHO, P. E. *et al.* **Blood group antigen studies using CdTe quantum dots and flow cytometry**. *International Journal of Nanomedicine*, v. 10, n. 1, p. 4393–4404, 2015.

CABRAL FILHO, P. E. *et al.* **CdTe quantum dots as fluorescent probes to study transferrin receptors in glioblastoma cells.** *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v. 1860, n. 1, p. 28–35, 2016.

CABRAL FILHO, P. E. *et al.* **Multimodal highly fluorescent-magnetic nanoplatform to target transferrin receptors in cancer cells.** *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v. 1862, n. 12, p. 2788–2796, 2018.

CAI, C. *et al.* **Visualization of integrin molecules by fluorescence imaging and Techniques.** *Biocell*, v. 45, n. 2, p. 229–257, 2021.

CARAVAN, P. *et al.* **Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: Structure, dynamics, and applications.** *Chemical Reviews*, v. 99, n. 9, p. 2293–2352, 1999.

CARVALHO, K. H. G. *et al.* **Fluorescence plate reader for quantum dot-protein bioconjugation analysis.** *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 14, n. 5, p. 3320–3327, 2014.

CARVALHO, M. E. T. *et al.* **Evaluating the glycophenotype on breast cancer tissues with quantum dots-Cramoll lectin conjugates.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 138, p. 302–308, 2019.

CASPANI, S. *et al.* **Magnetic Nanomaterials as Contrast Agents for MRI.** *Materials* 2020, v. 13, n. 11, 2586, p. 1-29, 2020.

CHEN, W.; XIAN, M. **Washington Red (WR) dyes and their imaging applications.** *Methods in Enzymology*, v. 640, p. 149–163, 2020.

CHUKWUOCHA, E. O.; ONYEAJU, M. C.; HARRY, T. S. T. **Theoretical Studies on the Effect of Confinement on Quantum Dots Using the Brus Equation.** *World Journal of Condensed Matter Physics*, v. 2, n. 2, p. 96–100, 2012.

COX, B. L.; MACKIE, T. R.; ELICEIRI, K. W. **The sweet spot: FDG and other 2-carbon glucose analogs for multi-modal metabolic imaging of tumor metabolism.** *American journal of nuclear medicine and molecular imaging*, v. 5, n. 1, p. 1–13, 2015.

CUNHA, C. R. A. *et al.* **Biomedical applications of glyconanoparticles based on quantum dots.** *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, Elsevier, 2018.

DAMADIAN, R. **Tumor Detection by Nuclear Magnetic Resonance.** *Science*, v. 171, n. 3976, p. 1151–1153, 1971.

DAVIDOVITS, P. **Nanotechnology in Biology and Medicine.** *Physics in Biology and Medicine*, p. 293–305, 2019.

DE THOMAZ, A. A. *et al.* **Measurement of the Hydrodynamic Radius of Quantum Dots by Fluorescence Correlation Spectroscopy Excluding Blinking.** *Journal of Physical Chemistry B*, v. 119, n. 11, p. 4294–4299, 2015.

DEBERARDINIS, R. J.; CHANDEL, N. S. **Fundamentals of cancer metabolism.**

Science advances, v. 2, n. 5, p. e1600200, 2016.

DI GREGORIO, E. *et al.* **Use of FCC-NMRD relaxometry for early detection and characterization of ex-vivo murine breast cancer.** Scientific Reports, v. 9, n. 1, 2019.

DÍAZ-GONZÁLEZ, M. *et al.* **Quantum Dot Bioconjugates for Diagnostic Applications.** Topics in Current Chemistry, v. 378, n. 2, 2020.

DROZD, M. *et al.* **Glucose dithiocarbamate derivatives as capping ligands of water-soluble CdSeS/ZnS quantum dots.** Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 509, p. 656–665, 2016.

FADAKA, A. *et al.* **Biology of glucose metabolism in cancer cells.** Journal of Oncological Sciences, v. 3, n. 2, p. 45–51, 2017.

FERREIRA, C. A. *et al.* **Radionuclide-Activated Nanomaterials and Their Biomedical Applications.** Angewandte Chemie (International ed. in English), v. 58, n. 38, p. 13232–13252, 2019.

FERREIRA, M. F. *et al.* **Gold nanoparticles functionalised with stable, fast water exchanging Gd³⁺ chelates as high relaxivity contrast agents for MRI.** Dalton Transactions, v. 41, n. 18, p. 5472–5475, 2012.

FORCHHEIMER, D. *et al.* **Determining surface properties with bimodal and multimodal AFM.** Nanotechnology, v. 25, n. 48, p. 485708, 2014.

GALLAMINI, A.; ZWARTHOED, C.; BORRA, A. **Positron emission tomography (PET) in oncology.** Cancers, v. 6, n. 4, 2014.

GANAPATHY, V.; THANGARAJU, M.; PRASAD, P. D. **Nutrient transporters in cancer: Relevance to Warburg hypothesis and beyond.** Pharmacology and Therapeutics, Elsevier Inc., 2009.

GE, X. L. *et al.* **Glucose-functionalized near-infrared Ag₂Se quantum dots with renal excretion ability for long-term: In vivo tumor imaging.** Journal of Materials Chemistry B, v. 7, n. 38, p. 5782–5788, 2019.

GHAGHANDA, K. B. *et al.* **New dual mode gadolinium nanoparticle contrast agent for magnetic resonance imaging.** PLoS ONE, v. 4, n. 10, 2009.

GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. G. C. **Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, Métodos e Aplicações.** Fundação Calouste Gulbenkian, 1987.

GODOY, A. *et al.* **Differential subcellular distribution of glucose transporters GLUT1-6 and GLUT9 in human cancer: Ultrastructural localization of GLUT1 and GLUT5 in breast tumor tissues.** Journal of Cellular Physiology, v. 207, n. 3, p. 614–627, 2006.

GUNASEKERA, U. A.; PANKHURST, Q. A.; DOUEK, M. **Imaging applications of nanotechnology in cancer.** Targeted Oncology, v. 4, n. 3, p. 169–181, 2009.

H. R, C.; SCHIFFMAN, J. D.; BALAKRISHNA, R. G. **Quantum dots as fluorescent probes: Synthesis, surface chemistry, energy transfer mechanisms, and applications.** Sensors and Actuators, B: Chemical, 2018.

HERMANN, P. *et al.* **Gadolinium(III) complexes as MRI contrast agents: ligand design and properties of the complexes.** Dalton Transactions, n. 23, p. 3027–3047, 2008.

HERMANSON, G. T. **The Reactions of Bioconjugation.** Bioconjugate Techniques, p. 229–258, 2013.

IGAWA, K. *et al.* **D-glucosamine conjugation accelerates the labeling efficiency of quantum dots in osteoblastic cells.** BioMed Research International, v. 2014, 2014.

KANG, S. S. *et al.* **Clinical Significance of Glucose Transporter 1 (GLUT1) Expression in Human Breast Carcinoma.** Japanese Journal of Cancer Research, v. 93, n. 10, p. 1123–1128, 2002.

KARATHANASIS, E. *et al.* **MRI mediated, non-invasive tracking of intratumoral distribution of nanocarriers in rat glioma.** Nanotechnology, v. 19, n. 31, p. 315101, 2008.

KE, H. *et al.* **Cellular binding and uptake of fluorescent glucose analogs 2-NBDG and 6-NBDG occurs independent of membrane glucose transporters.** Biochimie, v. 190, p. 1–11, 2021.

KOHNHORST, C. L. *et al.* **Identification of a multienzyme complex for glucose metabolism in living cells.** Journal of Biological Chemistry, v. 292, n. 22, p. 9191–9203, 2017.

KOLENC, O. I.; QUINN, K. P. **Evaluating cell metabolism through autofluorescence imaging of NAD(P)H and FAD.** Antioxidants and Redox Signaling, v. 30, n. 6, 2019.

LAUTERBUR, P. C. **Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance.** Nature 1973 242:5394, v. 242, n. 5394, p. 190–191, 1973.

LIPARI, G.; SZABO, A. **Model-Free Approach to the Interpretation of Nuclear Magnetic Resonance Relaxation in Macromolecules. 2. Analysis of Experimental Results.** Journal of the American Chemical Society, v. 104, n. 17, p. 4546–4559, 1982.

LIU, L. *et al.* **Multimodal imaging probes based on Gd-DOTA conjugated quantum dot nanomicelles.** Analyst, v. 136, n. 9, p. 1881–1886, 2011.

LIU, Y.; WELCH, M. J. **Nanoparticles labeled with positron emitting nuclides: advantages, methods, and applications.** Bioconjugate chemistry, v. 23, n. 4, p. 671–82, 2012.

MA, J.-J. *et al.* **Gd-DTPA-coupled Ag₂Se quantum dots for dual-modality magnetic resonance imaging and fluorescence imaging in the second near-infrared window.**

Nanoscale, v. 10, n. 22, p. 10699–10704, 2018.

MACHEDA, M. L.; ROGERS, S.; BEST, J. D. **Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer**. *Journal of Cellular Physiology*, v. 202, n. 3, p. 654–662, 2005.

MADDALENA, F. *et al.* **Evaluation of glucose uptake in normal and cancer cell lines by positron emission tomography**. *Molecular Imaging*, v. 14, n. 8, p. 490–498, 2015.

MARTINS, M. A.; TRINDADE, T. **Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico**. *Química Nova*, v. 35, n. 7, p. 1434–1446, 2012.

MAXWELL, T. *et al.* **Quantum Dots**. In: MAXWELL, T. *et al.* *Nanoparticles for Biomedical Applications: Fundamental Concepts, Biological Interactions and Clinical Applications*, p. 243–265, 2020.

MCADAMS, S. G. *et al.* **High magnetic relaxivity in a fluorescent CdSe/CdS/ZnS quantum dot functionalized with MRI contrast molecules**. *Chemical Communications*, v. 53, n. 76, p. 10500–10503, 2017.

MERBACH, A.; HELM, L.; TÓTH, É. **The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging**. John Wiley and Sons, 2013.

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

MONTEIRO, C. A. P. *et al.* **Quantum dots functionalized with 3-mercaptophenylboronic acids as novel nanoplateforms to evaluate sialic acid content on cell membranes**. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 193, p. 111142, 2020a.

MONTEIRO, C. A. P. *et al.* **Evaluating internalization and recycling of folate receptors in breast cancer cells using quantum dots**. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 209, p. 111918, 2020b.

MULDER, W. J. M. *et al.* **MR molecular imaging and fluorescence microscopy for identification of activated tumor endothelium using a bimodal lipidic nanoparticle**. *The FASEB Journal*, v. 19, n. 14, p. 2008–2010, 2005.

MULLAPUDI, S. S. *et al.* **Potentiating anti-cancer chemotherapeutics and antimicrobials via sugar-mediated strategies**. *Molecular Systems Design & Engineering*, v. 5, n. 4, p. 772–791, 2020.

NARSUDE, M. *et al.* **Three-dimensional echo planar imaging with controlled aliasing: A sequence for high temporal resolution functional MRI**. *Magnetic Resonance in Medicine*, v. 75, n. 6, p. 2350–2361, 2016.

NWE, K. *et al.* **Comparison of MRI properties between derivatized DTPA and DOTA gadolinium-dendrimer conjugates**. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 18, n. 16, p. 5925–5931, 2010.

OLIVEIRA, W. F. *et al.* **Bauhinia monandra leaf lectin (BmoLL) conjugated with quantum dots as fluorescent nanoprobe for biological studies:** Application to red blood cells. *Methods and Applications in Fluorescence*, v. 8, n. 3, 2020.

PAJAK, B. *et al.* **2-Deoxy-d-Glucose and Its Analogs: From Diagnostic to Therapeutic Agents.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 1, p. 234, 2019.

PANDEY, S.; BODAS, D. **High-quality quantum dots for multiplexed bioimaging:** A critical review. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 278, 2020.

PEREIRA, G. *et al.* **Bimodal Nanostructured Materials Containing Quantum Dots for Optical and Magnetic Resonance Imaging.** *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 26, p. 407–434, 2018.

PEREIRA, G. *et al.* **(Bio)conjugation Strategies Applied to Fluorescent Semiconductor Quantum Dots.** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 30, n. 12, p. 2536–2561, 2019a.

PEREIRA, G. A.; GERALDES, C. F. G. C. **Design and Optimization of Gadolinium Based Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging.** *Ann. Magn. Reson*, v. 6, n. 2, p. 1–33, 2007.

PEREIRA, M. I. A. *et al.* **Hydrophilic Quantum Dots Functionalized with Gd(III)-DO3A Monoamide Chelates as Bright and Effective T₁-weighted Bimodal Nanoprobes.** *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–5, 2019b.

PHAN, L. M.; YEUNG, S.-C. J.; LEE, M.-H. **Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies.** *Cancer biology & medicine*, v. 11, n. 1, p. 1–19, 2014.

PLESKOVA, S.; MIKHEEVA, E.; GORNOSTAEVA, E. **Using of quantum dots in biology and medicine.** *In: Advances in Experimental Medicine and Biology.* Springer New York LLC, v. 1048, p. 323–334, 2018.

POTTER, M.; NEWPORT, E.; MORTEN, K. J. **The Warburg effect: 80 years on.** *Biochemical Society Transactions*, v. 44, n. 5, p. 1499–1505, 2016.

QIAO, S. Z.; LIU, J.; MAX LU, G. Q. **Synthetic Chemistry of Nanomaterials.** *Modern Inorganic Synthetic Chemistry: Second Edition*, p. 613–640, 2017.

QUARTA, A. *et al.* **Nanoheterostructures (NHS) and their applications in nanomedicine:** Focusing on in vivo studies. *Materials*, v. 12, n. 1, 2019.

RADAIC, A. *et al.* **Como estudar interações entre nanopartículas e sistemas biológicos.** *Química Nova*, v. 39, n. 10, p. 1236–1244, 2016.

RANJBAR-NAVAZI, Z. *et al.* **Doxorubicin-conjugated D-glucosamine- and folate- bi-functionalised InP/ZnS quantum dots for cancer cells imaging and therapy.** *Journal of Drug Targeting*, v. 26, n. 3, p. 267–277, 2018.

RESCH-GENGER, U. *et al.* **Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels.** *Nature Methods*, v. 5, n. 9, p. 763–775, 2008.

RIBEIRO, J. F. F. *et al.* **Quantum dot-based fluoroassays for Zika.** *Zika Virus Impact, Diagnosis, Control, and Models*, p. 283–292, 2021.

RIEDL, C. C. *et al.* **^{18}F -FDG PET scanning correlates with tissue markers of poor prognosis and predicts mortality for patients after liver resection for colorectal metastases.** *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, v. 48, n. 5, p. 771–5, 2007.

SAMBRANO, J. J. *et al.* **Evaluating integrin activation with time-resolved flow cytometry.** *Journal of Biomedical Optics*, v. 23, n. 07, p. 1, 2018.

SANTOS, B. S.; FARIAS, P. M. A.; FONTES, A. **Semiconductor Quantum Dots for Biological Applications.** *Handbook of Self Assembled Semiconductor Nanostructures for Novel Devices in Photonics and Electronics*, p. 773–798, 2008.

SHI, X.-D. *et al.* **Synthesis, characterization, and biological activity of selenium nanoparticles conjugated with polysaccharides.** *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 61, n. 13, p. 2225–2236, 2020.

SHOKROLLAHI, H. **Contrast agents for MRI.** *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, v. 33, n. 8, p. 4485–4497, 2013.

SMITH, A. M.; GAO, X.; NIE, S. **Quantum Dot Nanocrystals for In Vivo Molecular and Cellular Imaging.** *Photochemistry and Photobiology*, v. 80, n. 3, p. 377–385, 2007.

SNEE, P. T. **Semiconductor quantum dot FRET: Untangling energy transfer mechanisms in bioanalytical assays.** *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 123, p. 115750, 2020.

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*, v. 18, n. 1, p. 651–658, 2018.

STARMANS, L. W. E. *et al.* **Influence of cell-internalization on relaxometric, optical and compositional properties of targeted paramagnetic quantum dot micelles.** *Contrast Media and Molecular Imaging*, v. 6, n. 2, p. 100–109, 2011.

STASIUK, G. J. *et al.* **Cell-permeable Ln(III) Chelate-functionalized InP quantum dots as multimodal imaging agents.** *ACS Nano*, v. 5, n. 10, p. 8193–8201, 2011.

STASIUK, G. J. *et al.* **Optimizing the relaxivity of Gd(III) complexes appended to InP/ZnS quantum dots by linker tuning.** *Dalton Transactions*, v. 42, n. 23, p. 8197–8200, 2013.

STEVENS, B.; ETHERINGTON, N. **Quantum Dots Quantum Dots. Nanoparticles for Biomedical Applications, Methods in Molecular Biology.** v. 1072, p. 1–36, 2019.

STUEBER, D. D. *et al.* **Magnetic Nanoparticles in Biology and Medicine: Past, Present, and Future Trends.** *Pharmaceutics*, v. 13, n. 7, 2021.

TABISH, T. A. *et al.* **Graphene quantum dot–based electrochemical biosensing for early cancer detection.** *Current Opinion in Electrochemistry*, v. 30, p. 100786, 2021.

TERRENO, E. *et al.* **Challenges for Molecular Magnetic Resonance Imaging.** *Chemical Reviews*, v. 110, n. 5, p. 3019–3042, 2010.

THORENS, B.; MUECKLER, M. **Glucose transporters in the 21st Century.** *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 2010.

TSOLEKILE, N. *et al.* **Evolution of ternary I–III–VI QDs: Synthesis, characterization and application.** *Nano-Structures & Nano-Objects*, v. 12, p. 46–56, 2017.

VERWILST, P. *et al.* **Recent advances in Gd-chelate based bimodal optical/MRI contrast agents.** *Chemical Society Reviews*, v. 44, n. 7, p. 1791–1806, 2015.

VILLALVA, M. D. *et al.* **Quantum dots as a theranostic approach in Alzheimer's disease: a systematic review.** *Nanomedicine*, v. 16, n. 18, p. 1595–1611, 2021.

WAGNER, A. M. *et al.* **Quantum dots in biomedical applications.** *Acta Biomaterialia*, v. 94, p. 44–63, 2019.

WAHSNER, J. *et al.* **Chemistry of MRI Contrast Agents: Current Challenges and New Frontiers.** *Chemical reviews*, v. 119, n. 2, p. 957, 2019.

WANG, K. *et al.* **Fluorescent probes for the detection of alkaline phosphatase in biological systems: Recent advances and future prospects.** *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, Elsevier, 2021.

WANG, W.; LIU, Z.; LAN, X. **Quantum Dot-Based Simultaneous Multicolor Imaging.** *Molecular Imaging and Biology*, v. 22, n. 4, p. 820–831, 2019.

WEGNER, K. D.; HILDEBRANDT, N. **Quantum dots: bright and versatile in vitro and in vivo fluorescence imaging biosensors.** *Chemical Society Reviews*, v. 44, n. 14, p. 4792–4834, 2015.

WU, R. *et al.* **Synthesis of highly stable CuInZnS/ZnS//ZnS quantum dots with thick shell and its application to quantitative immunoassay.** *Chemical Engineering Journal*, v. 348, p. 447–454, 2018.

WU, X. *et al.* **Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots.** *Nature Biotechnology*, v. 21, n. 1, p. 41–46, 2003.

WUEST, M. *et al.* **Radiopharmacological evaluation of 6-deoxy-6-[18F]fluoro-d-fructose as a radiotracer for PET imaging of GLUT5 in breast cancer.** *Nuclear Medicine and Biology*, v. 38, n. 4, p. 461–475, 2011.

YANG, Y. *et al.* **CuInS₂/ZnS Quantum Dots Conjugating Gd(III) Chelates for Near-Infrared Fluorescence and Magnetic Resonance Bimodal Imaging.** ACS Applied Materials and Interfaces, v. 9, n. 28, p. 23450–23457, 2017.

YU, W. W. *et al.* **Experimental Determination of the Extinction Coefficient of CdTe, CdSe and CdS Nanocrystals.** Chemistry of Materials, v. 14, p. 2854-2860, 2003.

ZANDWIJK, J. K. VAN *et al.* **Comparing the signal enhancement of a gadolinium based and an iron-oxide based contrast agent in low-field MRI.** PLoS ONE, v. 16, n. 8, p. e0256252, 2021.

ZHAO, M.; ZHANG, Z. **Glucose transporter regulation in cancer: A profile and the loops.** Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression, v. 26, n. 3, p. 223–238, 2016.

ZHAO, W. *et al.* **Construction of nanomaterials as contrast agents or probes for glioma imaging.** Journal of Nanobiotechnology, v. 19, n. 1, 2021.

ZHOU, Z.; LU, Z.-R. **Gadolinium-based contrast agents for magnetic resonance cancer imaging.** Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, v. 5, n. 1, p. 1–18, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A - ARTIGO DE REVISÃO PUBLICADO NO JOURNAL OF THE BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY

O artigo “*(Bio)conjugation Strategies Applied to Fluorescent Semiconductor Quantum Dots*” foi publicado no periódico “*Journal of the Brazilian Chemical Society*”. Link de acesso: <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20190163>.

(Bio)conjugation Strategies Applied to Fluorescent Semiconductor Quantum Dots

Goreti Pereira¹; Camila A. P. Monteiro¹; Gabriela M. Albuquerque¹; Maria I. A. Pereira¹; Mariana P. Cabrera¹; Paulo E. Cabral Filho¹; Giovannia A. L. Pereira¹; Adriana Fontes¹; Beate S. Santos¹.

¹Grupo de Pesquisa em Nanotecnologia Biomédica (NanoBio), Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

Resumo: Os pontos quânticos (PQs) são nanocristais semicondutores, que apresentam propriedades fotofísicas únicas, possibilitando a sua aplicação como novas plataformas fluorescentes em ciências biomédicas. Os PQs coloidais são revestidos com compostos orgânicos ou inorgânicos, não apenas para evitar a sua aglomeração, mas também para fornecer grupos funcionais para a ligação de (bio)moléculas de direcionamento, nanopartículas ou outras interfaces, para fins biológicos específicos. A (bio)conjugação pode envolver interações não covalentes ou covalentes, que podem ser realizadas por meio de diferentes estratégias. A preparação final precisa manter a estabilidade química e óptica e a funcionalidade bioquímica dos nanossistemas. Embora uma boa compreensão dos procedimentos experimentais já tenha sido estabelecida, o processo de bioconjugação ainda é um desafio. O presente manuscrito tem como objetivo revisar as principais estratégias de (bio)conjugação aplicadas com sucesso aos PQs, descrevendo as etapas necessárias para preparar nanoplataformas fluorescentes de direcionamento estável, bem como alguns métodos usuais usados para avaliar e otimizar este processo.

Palavras-chave: Nanocristais; Fluorescência; Agentes de acoplamentos; Estratégias de conjugação.

APÊNDICE B - CAPÍTULO DE REVISÃO PUBLICADO NA ENCYCLOPEDIA OF NANOSCIENCE AND NANOTECHNOLOGY

O capítulo intitulado “*Bimodal Nanostructured Materials Containing Quantum dots for Optical and Magnetic Resonance Imaging*” foi publicado na “*Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology - American Scientific Publishers*”, 3^a ed., v. 26, p. 407-434, 2018.

Goreti Pereira¹; Paulo E. Cabral Filho¹; Maria I. A. Pereira¹; Mariana P. Cabrera¹; Giovannia A. L. Pereira¹; Adriana Fontes¹; Beate S. Santos¹.

¹Grupo de Pesquisa em Nanotecnologia Biomédica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.