

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**RAFAEL BEZERRA DE LIRA**

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DE *QUANTUM DOTS* COM  
CÉLULAS E DIRECIONAMENTO INTRACELULAR MEDIADO POR LIPOSSOMAS**

Dissertação de Mestrado

**Recife, 05 de agosto de 2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DE *QUANTUM DOTS* COM  
CÉLULAS E DIRECIONAMENTO INTRACELULAR MEDIADO POR LIPOSSOMAS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Pernambuco, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Biológicas,  
para obtenção do título de mestre.

**Aluno:** Rafael Bezerra de Lira

**Orientadora:** Profa. Dra. Adriana Fontes

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Beate S. Santos

**Recife, 05 de agosto de 2011**

**Lira, Rafael Bezerra**

**Estudo da interação de *Quantum Dots* com células e direcionamento intracelular mediado por lipossomas/ Rafael Bezerra Lira. – Recife: O Autor, 2011.**

**96 folhas : il., fig., tab.**

**Orientadora: Adriana Fontes**

**Co-orientadora: Beate S. Santos**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Ciências Biológicas, 2011.**

**Inclui bibliografia e anexos**

**1. Nanotecnologia 2. Marcadores biológicos 3. Fosfolipídeos I. Título.**

**620.5**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2011-233**

**“Estudo da interação de quantum dots com células e direcionamento intracelular  
mediado por lipossomas”**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **Adriana Fontes**  
(Orientador/UFPE)

---

Prof. Dr. **Luiz Bezerra de Carvalho Júnior**  
(UFPE)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **Encida de Paula**  
(UNICAMP)

*“Podemos facilmente perdoar uma criança que tem medo do escuro; a real tragédia da vida é quando os homens têm medo da luz”*

**Platão**

## **AGRADECIMENTOS**

Essa jornada termina como se tivesse sido facilmente traçada. É fácil olhar para o hoje e esquecer tudo o que foi trilhado. Também é fácil esquecer as pessoas que ajudaram a percorrê-lo. Essas palavras estão aqui para dizer que tudo é, e sempre será lembrado com muito carinho, nostalgia e respeito; para demonstrar o quão grato sou às pessoas e à vida que me conceberam esse momento.

À Deus, pelas graças;

Aos meus pais e à minha avó, por terem-me dado a chance de ser educado;

Aos meus queridos amigos (alguns muito presentes, outros nem tanto);

Em especial à Marília, pelo companheirismo;

A Israel e Robson, meus irmãos de coração;

Allan, Marek, Igor e Afonso, pelas muitas gargalhadas;

Larissa Matos e Renata Vieira, a quem pude ouvir e ser ouvido;

À Larissinha Oliveira, que tantas vezes me hospedou em sua casa;

e tantos outros amigos sem os quais as coisas as histórias teriam sido sem graça, se existissem;

Aos companheiros de laboratório, em especial à Cidoca, que me ensinou muita coisa sobre lipossomas e sobre a vida (dentro e fora do laboratório), à Lívia, por aceitar ser “adotada”, e também a Paulo, com quem aprendi a ter as primeiras noções de orientação e pelo companheirismo de bancada;

À FACEPE e ao CNPq pelo auxílio financeiro,

Ao Professor Celso de Melo, à Renata e Etelino pelas medidas de fluorescência e tamanho de partículas;

À Professora Nereide e à Isabella Macário pela ajuda nas preparações iniciais;

À professora Regina Bressan, do Aggeu Magalhães pelas análises de microscopia de fluorescência confocal e sua aluna Jana Sandes pelo auxílio nos experimentos com células mononucleares;

A todos os membros do laboratório de *Biofísica de Membranas*, em especial ao Professor Oleg Krasilnikov pela colaboração e valiosas discussões;

À Professora Rosa Santiago e ao Professor Paulo Faltay, ambos no céu e olhando por seus alunos,

Às Professoras Eneida de Paula da Unicamp e Karin Riske da Unifesp, pelas valiosas contribuições;

À Professora Beate Santos, pela co-orientação e amizade;

E um agradecimento especial à minha orientadora, colega de trabalho e amiga pessoal, a Professora Adriana Fontes, que topou o desafio de encararmos uma novidade para ambos e tanto me estimulou no desenvolvimento do trabalho.

## **RESUMO**

O estudo dos processos que ocorrem nas células é vital para o entendimento de fenômenos biológicos em organismos inteiros. Tais informações requerem muitas vezes o uso de ferramentas que preservem tanto a morfologia quanto a viabilidade celular. Esse é o caso de técnicas baseadas em fluorescência, capazes de estudar um evento de forma específica e com elevada sensibilidade. Sua análise é baseada no uso das sondas fluorescentes, geralmente pequenas moléculas orgânicas. Entretanto, praticamente todas as sondas convencionais apresentam limitações. O desenvolvimento de nanocristais fluorescentes de semicondutores, mais conhecidos como *Quantum Dots* (QDs) surge como uma possibilidade de superar os problemas associados aos corantes convencionais. Por serem sondas relativamente novas em Biologia, algumas questões sobre eles ainda precisam ser abordadas. No presente trabalho, nós mostramos que QDs (CdTe/CdS-AMP sintetizados em água) são capazes de se ligar não especificamente à superfície de células sanguíneas periféricas mononucleares ou em estruturas intracelulares após permeabilização de membrana. Esses estudos foram feitos por combinação de técnicas ópticas e mostraram que QDs são potenciais ferramentas para estudo de células sanguíneas por citometria de fluxo. Através de medidas realizadas com pinças ópticas verificamos que a incubação com QDs diminui o potencial zeta, indicando que os mesmos podem causar alterações nesses sistemas biológicos. Além disso, desenvolvemos uma metodologia eficiente de encapsulação de QDs em lipossomas de diferentes composições por ciclos de congelamento e descongelamento e a utilizamos para entregar QDs ao interior de células vivas. Foi possível visualizar a fluorescência das nanopartículas dentro das vesículas para os sistemas QDs-lipossomas estudados. Ademais, o encapsulamento em lipossomas com propriedades fusogênicas (utilizando uma combinação de lipídeos catiônicos e lipídeos fluorescentes) permitiu a entrada das nanopartículas em células-tronco humanas. Pela análise das células por microscopia confocal, foi possível notar que a fluorescência dos QDs co-localizava com a fluorescência das membranas lipossomais. Esses resultados são inovadores; tanto porque podem ser estendidos para a encapsulação de outros tipos de nanopartícula em lipossomas de diferentes composições por um método ainda não descrito, como pela possibilidade de entregar essas nanopartículas diretamente no interior de células vivas.

**Palavras-chaves:** Sondas fluorescentes, *Quantum Dots*, Lipossomas, Interação não específica, Direcionamento intracelular.

## ***ABSTRACT***

The study of biological process which takes place in cells is crucial for understanding biological phenomenon in whole organisms. Such investigation commonly requires tools which preserve both morphology and cellular viability. This is the case of fluorescence-based techniques that are suitable for the study of such events specifically and sensitively. Fluorescence analysis is based on the use of fluorescent probes, usually small organic molecules. Nevertheless, almost all conventional probes present limitations. The development of semiconductor fluorescent nanocrystals, also known as Quantum Dots (QDs), emerged as an alternative to overcome problems associated to conventional dyes. As QDs are relatively novel probes in biology, many issues related to their use still need to be addressed. In the present work, we show that QDs (CdTe/CdS-AMP) are able to interact non-specifically with the surface of intact live peripheral blood mononuclear cells or with intracellular structures after membrane permeabilization. Such studies were conducted by the combination of optical techniques and showed that QDs are potential tools to study blood cells by flow cytometry. By using optical tweezers, we verified that QDs incubation reduces the zeta potential, an indication of possible cellular alterations caused by nanoparticles. Moreover, we developed an efficient method to encapsulate QDs in liposomes of different compositions using freeze-and-thaw cycles to deliver QDs into living cells. We visualized nanoparticle' fluorescence inside vesicles of QDs-liposomes systems studied. Furthermore, the encapsulation in liposomes with fusogenic properties (using a combination of cationic and fluorescent lipids) allowed nanoparticle to be delivered to human stem-cells. Cells analysis show that QDs fluorescence co-localized with liposomal membrane fluorescence. These results are innovative because they can be extended for the encapsulation of other nanoparticles in liposomes of different compositions by a method not yet described, as well as by the possibility of delivering these particles readily to the interior of live cells.

**Key-words:** Fluorescent probes, Quantum Dots, Liposomes, Non specific interactions, Intracellular delivery

## LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**Figura 1.** Representação simplificada de Luminescência. Um elétron no estado fundamental ( $S_0$ ) é excitado por luz (em roxo) para um nível de energia  $S_1$ . As linhas dentro de cada nível representam níveis vibracionais. A volta do elétron ao estado fundamental resulta na emissão de um fóton (em verde).

**Figura 2.** Espectros de absorção e emissão de corantes orgânicos. Em A, absorção normalizada de diferentes corantes Alexa Flúor (418, 514, 532, 555, 546, 568, 594, 610, respectivamente). Em B, emissão normalizada de Alexa Flúor 488 (1), Ficoeritrina R (2), Alexa Flúor 610 (3), Alexa Flúor 647 (4) e Alexa Flúor 680 (5) (InvitrogenCorp).

**Figura 3.** Dependência da emissão dos QDs com o tamanho. Em A, acima: microscopias eletrônicas de transmissão dos QDs mostrados na figura de baixo. A cor de emissão é característica do tamanho dos QDs, nesse caso de CdSe. Em B, comprimento de onda de emissão em função do tamanho para diferentes QDs. No detalhe, espectros de emissão de diferentes QDs - Figura 3A: <http://freshscience.org.au/wp-content/uploads/QDs-Microscopy-smaller.jpg>. Em 3B, adaptado de MICHALET et. al., 2005.

**Figura 4.** Características espectroscópicas dos QDs para detecção biológica. Em A, espectros de absorção (azul) e emissão (verde) do corante fluoresceína. Em B, espectros de absorção (azul) e emissão (verde) de QDs de CdSe. No detalhe dessas figuras, uma comparação de tamanho entre ambos fluoróforos. Em C, detecção de 5 alvos distintos em células por QDs excitados em um único comprimento de onda. Em D, comparação entre a fotoestabilidade de QDs (vermelhos) e o corante alexa Flúor (verde) (MEDINTZ et. al., 2005).

**Figura 5.** Transição eletrônica em QDs. A figura A mostra que os elétrons formados pela excitação podem decair por transições não radiativas pelos defeitos (setas coloridas) entre as bandas de condução e valência dos cristais. Em B, a passivação (ver texto) confina a emissão ao *caroço* dos QDs – MANSUR et al., 2010.

**Figura 6.** Estrutura física dos QDs. Em A, diferentes moléculas funcionalizantes, com estruturas lineares e tridimensionais. AMA (ácido mercaptoacético); AMP (ácido mercaptopropiônico); AMU (ácido mercaptoundecanóico); AMS (ácido mercaptosuccínico), DHLA (ácido dihidrolipóico), BSTPP (trifenilfosfina bis-sulfonada); mPEG<sub>5</sub>-SH e mPEG<sub>45</sub>-SH, PEG-metóxi de diferentes pesos moleculares e o peptídeo CALNN. Em B, estrutura de QDs *core/shell* (1 e 2, respectivamente), funcionalizados (3) e conjugados (4). Figura A, adaptado de SPERLING E PARAK, 2010. Figura B, MEDINTZ et. al., 2005.

**Figura 7.** Representação das quatro modificações químicas utilizadas para tornar os QDs redispersáveis em água. Da esquerda para a direita, técnica do trocador de ligante, interações hidrofóbicas, silanização e encapsulação em micelas ou lipossomas – SANTOS et al., 2008.

**Figura 8.** Em A, QDs (vermelhos) ligam especificamente receptores Her2 em tecido mamário. Em B, QDs (vermelhos) ligam os receptores EGF (verde) em células tumorais. Em C, visualização de tumores *in vivo*. Em A, WU et. al., 2003. Em B, LIDKE et. al., 2004. Em C, GAO et al., 2004.

**Figura 9.** Internalização de QDs em células monocíticas resulta em localização tamanho-dependente. Em A, QDs menores (verdes) têm acesso ao núcleo, enquanto os maiores (vermelhos) são retidos no citosol. Em B razão de localização nuclear/citoplasmática (valores positivos representam localização nuclear e negativos, citoplasmática). No detalhe, a marcação inespecífica de QDs de 2,1 nm nessas células. Em A, NABIEV et al., 2007. Em B, adaptado de WILLIAMS et al., 2009.

**Figura 10.** Aplicações para o direcionamento intracelular por diferentes metodologias. Em A, mostra que QDs de diferentes tamanhos no interior de células HeLa. Em B, fluorescência de uma única célula em embrião de *Xenopus*. C mostra a localização mitocondrial de QDs. Em D, a expressão da proteína fluorescente verde (em verde) 11 h após entrega intracelular, quando seu gene é veiculado por plasmídeo ligado a QDs (vermelhos) via lipossomas tipo lipoplex. Em A, DERFUS et al., 2004. Em B, DUBERTRET et al., 2002. Em C, HOSHINO et al., 2004. Em D, SRINIVASAN et al., 2006.

**Figura 11.** Estudo de proteínas intracelulares por QDs veiculados ao interior das células. Em A e B, QDs (vermelhos) localizados em endossomos e depois liberados, respectivamente. A endocitose de QDs cobertos com polímeros osmoticamente ativos (em C) causa um efeito tipo “bomba de prótons”, rompendo os lisossomas e liberando o material endocitado diretamente no citosol (em D). Em A e B, NELSON et al., 2009. Em C e D, YEZHELYEV et al., 2008.

**Figura 12.** Esquema de formação de lipossomas. Em A, fosfolipídeos, moléculas anfífilas com uma cabeça polar (azul) e duas caudas hidrofóbicas (amarelo). Em B, a interação entre as cadeias apolares de fosfolipídeos, formando bicamadas (b). Essa bicamada se rearranja em solução para não expor a região hidrofóbica, formando uma vesícula, como mostra a figura C. [1. material lipossolúvel, 2. material hidrossolúvel, 3. meio extravascular e 4. material ligado/ancorado à membrana]. A figura D mostra possíveis interações entre lipossomas e compostos carregados.;JESORKA &ORWAR, 2008.

**Figura 13.** Estrutura dos fosfolipídeos. Em A, uma molécula de um glicerofosfolipídeo com uma cadeia saturada (ácido palmítico) e outra insaturada (ácido oleico). O grupamento X representa uma molécula polar, que vai conferir caráter hidrofílico ao fosfolipídeo. Em B, moléculas de X encontrada nos fosfolipídeos (NELSON & COX, 2004).

**Figura 14.** Representação esquemática da geometria de moléculas anfífilas. Para lipídeos com geometria tipo cone (em A), estruturas com curvatura positiva, como micelas, são formadas. Para moléculas com morfologia cilíndrica (em B), bicamadas são formadas. Para morfologia como da figura C, fase estruturas com curvatura inversa são formadas – WASUNGU & HOEKSTRA, 2006.

**Figura 15.** Classificações dos lipossomas quanto ao tamanho e ao número de lamelas. TRESSET, et. al. 2009.

**Figura 16.** Relação entre função dos lipossomas e recobrimento de superfície. Em A1, lipossomas sem recobrimento, com anticorpos, polímeros, polímeros ligados a anticorpos e multifuncionais (carregados, contendo oligonucleotídeos, drogas e lipídeos fluorescentes – em vermelho), nas letras de a – e. Em B1, diferentes de entrega de materiais às células. Entrega mediada por ligação à superfície mediada por ancoragem (a) ou não (b), por fusão de membranas (c), liberação nas vizinhanças (d), troca de materiais com a membrana (e), endocitose (f) e liberação lisossomal (g) - (adaptado de TORCHILIN, 2005).

**Figura 17.** Diferentes formas de interação de lipossomas catiônicos com células. A figura A mostra que lipossomas catiônicos (DMPC:DOTAP) contendo QDs e sem recobrimento de superfície são internalizados pelas células. Quando esses lipossomas são recobertos com 0,5% de DMPE-PEG, ocorre fusão com a membrana celular, como mostrado em B – GOPALAKRISHNAN et al., 2006.

**Figura 18.** Interação *in vivo* de lipossomas contendo QDs. Em A, 5 minutos após administração intradérmica (região 2), lipossomas de fosfatidilcolina contendo QDs hidrofílicos localizam-se em nodos linfáticos axilares. Em B, lipossomas catiônicos localizados em estruturas intracelulares endocíticas. Em C, marcação de células tumorais após injeção de lipossomas catiônicos dentro do tumor *in vivo*. Em A, CHU et al., 2010. Em B, AL-JAMAL et al., 2008a. Em C, AL-JAMAL et al., 2008b.

**Figura 19.** Interação específica de lipossomas ligados a EGF com células EGF-positivas. Em A, o esquema do arranjo dos QDs nesses lipossomas funcionalizados. Em B, os planos y-z, com co-localização desses QDs logo abaixo a membrana. A figura C apresenta o perfil em linha (em branco) para fluorescência de 6 vesículas intracelulares, mostradas em intensidade de fluorescência em DF. Lipossomas contendo Cer-C8 (fusogênicos). O sinal verde indicado como “EGF-QD” é um QD livre que foi internalizado. SIGOT et al., 2010.

**Figura 20.** Interação celular de lipossomas fusogênicos de contendo QDs. A figura A mostra o perfil de marcação celular de QDs e lipossomas (marcação indireta após ligação do peptídeo CT-B), respectivamente após interação celular. A figura B mostra que os QDs são entregues às células em forma de aglomerados. Lipossomas de POPC:DOPC+:NBD-PC. DUDU et al., 2008.

**Figura 21.** Fusão de lipossomas fusogênicos com células vivas. À esquerda, células-tronco de rim humano (HEK293) incubadas com lipossomas no qual o Lipídeo-FL era DOPE-Rodamina. À direita, fusão com células musculares (SMC) onde o Lipídeo-FL era DHPE-Bodipi-FL – CSISZÁR et. al., 2010.

## ***LISTA DE TABELAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA***

**Tabela 1:** Questões críticas no uso de Quantum Dots em Biologia.

**Tabela 2.** Métodos de direcionamento intracelular de QDs.

## LISTA DE ABREVIATURAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>QDs:</b> Quantum Dots	<b>CdSe/ZnS:</b> Seleneto de Cádmio passivado com Sulfeto de Zinco	<b>DOTAP:</b> 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano
<b>PBMCs:</b> Células periféricas sanguíneas mononucleares	<b>DHLA:</b> Ácido dihidrolipóico	<b>DMPC:</b> 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
<b>CdTe:</b> Telureto de Cádmio	<b>Her2:</b> Receptor epidermal humano subtipo 2	<b>PEG:</b> Polietilenoglicol
<b>CdS:</b> Sulfeto de Cádmio	<b>EGF:</b> Fator de crescimento epidermal	<b>DSPE-PEG:</b> DSPE ligado a PEG
<b>CdTe/CdS:</b> Telureto de Cádmio passivado com Sulfeto de Cádmio	<b>EGFR:</b> Receptor do fator de crescimento epidermal	<b>DPPE-TR:</b> 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
<b>AMP:</b> Ácido Mercaptopropiônico	<b>PTs:</b> Peptídeos de translocação	<b>SUVs:</b> Vesículas unilamelares pequenas
<b>NADPH:</b> Dinucleotídeo reduzido de nicotinamida adenina	<b>GFP:</b> Proteína fluorescente verde <b>EGF-QD<sub>525</sub>:</b> Fator de crescimento epidermal ligado a quantum dots de pico de emissão em 525 nm	<b>LUVs:</b> Vesículas unilamelares grandes
<b>CdSe:</b> Seleneto de Cádmio	<b>PC:</b> Fosfatidilcolina <b>POPC+:</b> 1,2dioleil-sn-glicero-3-etilfosfatidilcolina	<b>MLVs:</b> Vesículas multilamelares
<b>BV:</b> Banda de valência	<b>PE:</b> Fosfatidiletanolamina	<b>OVV:</b> Vesículas oligovesiculares
<b>BC:</b> Banda de condução	<b>POPC:</b> 1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfocolina	<b>GUVs:</b> Vesículas unilamelares gigantes
<b>TOPO:</b> Óxido de trioctifosfina <b>TOP:</b> Trioctifosfina	<b>DOPC:</b> 1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina	<b>Tm:</b> Temperatura de transição de fase de lipídeos
<b>Cd<sup>+2</sup>:</b> Íon cádmio	<b>DOPE:</b> 1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina	<b>DSGS:</b> Succinil-1,2-diestearoil-sn-glicerol
<b>ZnS:</b> Sulfeto de Zinco	<b>DSPE:</b> 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina	<b>Lipídeo-FL:</b> Lipídeo covalentemente ligado a fluorocromo

# SUMÁRIO

## Capítulo I

Introdução .....	2
------------------	---

## Capítulo II

Fluorescência em Biologia .....	6
Marcadores Fluorescentes .....	7
Quantum Dots em Biologia .....	10
Superfície dos Quantum Dots – Passivação e Funcionalização .....	11
Obtenção dos QDs – Síntese .....	13
Questões Biológicas do Uso dos QDs .....	16
Ligação Inespecífica .....	18
Direcionamento (Intra)celular .....	21
Lipossomas – Fundamentos .....	25
Preparação dos Lipossomas .....	29
Entrega dos Materiais em Células .....	31
Lipossomas Encapsulando <i>Quantum Dots</i> .....	32
Referências .....	38

## Capítulo III

Objetivos .....	46
-----------------	----

## Capítulo IV

Artigo Publicado: Biological Water Soluble Quantum Dots as New Biophotonic Tools for Hematologic Cells: Applications for Flow Cytometry .....	48
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## Capítulo V

Carta de recebimento da submissão de artigo .....	54
Artigo Submetido: Non-Specific Interactions of CdTe/CdS Quantum Dots with Human Mononuclear Cell .....	55

## **Capítulo VI**

Artigo em preparação a ser submetido: Intracellular Delivery of Quantum Dots Mediated by Fusogenic Liposomes .....	68
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## **Capítulo VII**

Conclusões e Perspectivas .....	85
---------------------------------	----

## **Anexos**

Informações para os autores da Revista <i>Micron</i> .....	88
------------------------------------------------------------	----

# **CAPÍTULO I**

## 1. INTRODUÇÃO

A extração de informações biológicas requer o uso de ferramentas e técnicas capazes de medir e/ou manipular o sistema biológico em estudo. A medição pode ser feita após análises do conteúdo celular, enquanto a manipulação pode ser feita por alterações realizadas no sistema. Essas avaliações podem ser aplicadas em sistemas biológicos vivos, desde células a organismos inteiros, e em geral requerem o uso de técnicas sensíveis. Dentre estas, destacam-se as técnicas baseadas em fluorescência, especialmente a microscopia, que possibilita não apenas a visualização (com alta sensibilidade e especificidade) de um alvo biológico, mas também identifica sua localização precisamente.

As técnicas baseadas em fluorescência, na grande maioria das vezes requerem o uso de marcadores (normalmente corantes orgânicos fluorescentes), capazes de ligar a estruturas biológicas de forma específica e de revelar sua dinâmica. De fato, um grande diferencial de técnicas baseadas em fluorescência é a possibilidade de realizar estudos dinâmicos no momento em que o evento ocorre, sem a necessidade de paralisá-lo (por fixação, por exemplo). Entretanto, a escolha do marcador nem sempre é simples, e pode requerer características algumas vezes não disponíveis.

As propriedades espectroscópicas dos corantes (estrito espectro de absorção, largo espectro de emissão e principalmente elevada taxa de fotodegradação) apesar de permitirem o estudo de vários fenômenos de interesse biológico, tais como a identificação química de estruturas ou moléculas biológicas, podem também limitar muitas aplicações. Esse é o principal motivo pela busca constante por novas sondas fluorescentes, tais como as proteínas fluorescentes. Ainda assim, essas moléculas também apresentam desvantagens, que incluem exaustivas reações químicas para sua produção e manipulação genética do sistema biológico a ser estudado (NIENHAUS, 2008).

Há pouco mais de dez anos, o desenvolvimento de uma nova sonda fluorescente surgiu como alternativa aos corantes tradicionais (CHAN & NIE, 1998; BRUCHEZ et. al., 1998). Ao contrário das sondas moleculares, esses novos marcadores são partículas da ordem de 1 a 10 nm e apresentam propriedades ópticas únicas que podem superar algumas das desvantagens apresentadas pelos marcadores tradicionais (BRUCHEZ et. al., 1998). Essas

partículas de tamanho nanométrico são chamadas de *Quantum Dots* (QDs) ou pontos quânticos, e podem ser utilizadas em análises prolongadas de múltiplos alvos biológicos simultaneamente, pois não sofrem fotodegradação (MEDINTZ et. al., 2005).

No entanto, algumas questões desafiadoras das aplicações biológicas dos QDs começaram a surgir à medida que mais trabalhos eram realizados com essas novas sondas fluorescentes. Algumas dessas questões incluem a preparação de nanopartículas de boa qualidade óptica e com estabilidade físico-química, uma eficiente ligação a moléculas de reconhecimento específico, a inibição de interações inespecíficas indesejáveis com estruturas biológicas e o desenvolvimento de um meio de direcioná-los para o interior de células vivas.

Os QDs podem, por exemplo, ser utilizados para monitorar a dinâmica de proteínas em células vivas, pois permitem estudar seu comportamento com sensibilidade de até uma única molécula (DAHAN et. al., 2003), e principalmente por longos períodos de tempo (DAHAN et. al., 2003; MEDINTZ et. al., 2005). Entretanto, os estudos de dinâmica de moléculas, principalmente em células vivas, com QDs são quase que exclusivamente realizados para proteínas de membrana acessíveis pelo lado externo da célula. Essa característica é devida à incapacidade de passagem das sondas atravessarem a bicamada lipídica. Poucos métodos têm sido utilizados para direcionamento intracelular (DELEHANTY et. al., 2009) e poucos relatam, de fato, o estudo de tráfego de moléculas intracelulares (COURTY et. al., 2006).

Uma forma de entregar materiais para o interior das células é através do uso de lipossomas, vesículas compostas de uma ou mais bicamadas de fosfolipídeos, capazes de encapsular materiais hidrofílicos em seu interior e hidrofóbicos em sua bicamada lipídica (JESORKA & ORWAR, 2008). Uma característica singular dos lipossomas, que permite sua ampla utilização para entrega celular, é sua similaridade com as membranas biológicas. Há na literatura alguns trabalhos recentes relatando o uso de lipossomas associados aos QDs. Enquanto alguns desses trabalhos descrevem a simples encapsulação (KIM, 2006), outros relatam o direcionamento a uma linhagem celular específica (YANG, 2009) e até mesmo aplicações *in vivo* (CHU, 2010). Entretanto, até onde sabemos, não há trabalhos que relatem a liberação de QDs totalmente livres para o interior das células utilizando lipossomas. Além

do mais, pouco se sabe sobre o efeito da encapsulação lipossomal nas propriedades ópticas das nanopartículas e os tipos de interação com as células.

De forma geral, o trabalho descrito aqui aborda dois aspectos importantes do uso biológico dos QDs: a interação inespecífica de QDs sintetizados diretamente em água com células e o desenvolvimento de uma metodologia de entrega intracelular de QDs em células vivas utilizando lipossomas. Na primeira parte desta dissertação, é apresentada uma *Revisão Bibliográfica*, que descreve a síntese, as propriedades ópticas, a interação não específica e o direcionamento intracelular de QDs. Após a *Revisão Bibliográfica*, apresentamos um *artigo* publicado no *Proceedings of SPIE - Colloidal Quantum Dots for Biomedical Applications V* e em seguida um artigo submetido para publicação para a revista *Micron*. Esses artigos se referem a trabalhos sobre o estudo da interação não específica de QDs de CdTe/CdS-AMP (Telureto de Cádmio passivados com Sulfeto de Cádmio e estabilizados com ácido mercapto-propilônico) fluorescentes na região do verde (555 nm) com células sanguíneas mononucleares humanas. Enquanto o primeiro enfatiza a aplicação de QDs como potenciais ferramentas para estudos de células sanguíneas através de citometria de fluxo, o segundo estuda as interações inespecíficas entre esses QDs e células mononucleares e seus efeitos por medidas do potencial zeta das células. O estudo de interações inespecíficas é importante para se aprimorar trabalhos que utilizam QDs conjugados com biomoléculas para marcações específicas, pois após a conjugação podem restar QDs não funcionalizados capazes de alterar a especificidade e as conclusões do trabalho em destaque. O terceiro artigo, que está em preparação e será submetido para a revista *Physical Chemistry B*, aborda a encapsulação de QDs em lipossomas de diferentes composições químicas e sua entrega intracelular em células-tronco derivadas de cordão umbilical por lipossomas com propriedades fusogênicas.

## **CAPÍTULO II**

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Fluorescência em Biologia

Ainda hoje, alguns tipos de processos biológicos, até mesmo os que acontecem nas células mais simples, são pouco entendidos. O estudo de processos biológicos, desde células até organismos inteiros é, por exemplo, fundamental para o entendimento de algumas doenças (tais como as neoplasias) e para a descoberta de novas formas de tratamento. Muitas são as abordagens utilizadas para a investigação dos fenômenos biológicos em nível molecular. Dentre as principais, estão as técnicas baseadas em fluorescência, principalmente a microscopia. Mas por que estudar fenômenos biológicos por fluorescência? A natureza ondulatória e corpuscular da luz permite extrair informações morfológicas, estruturais e até mesmo biomecânicas remotamente e não destrutivamente de estruturas inerentes aos sistemas biológicos. As vantagens de técnicas baseadas em fluorescência são: a alta intensidade, permitindo monitoramento de processos em tempo real, e a especificidade (bio)química que advém da afinidade existente entre marcadores fluorescentes e as macromoléculas no objeto de estudo.

Algumas moléculas naturais, presentes em células e tecidos, são naturalmente fluorescentes. Essas moléculas são chamadas de fluoróforos intrínsecos. Esse é o caso de cofatores enzimáticos, como o NADPH, vitaminas como a riboflavina e proteínas ricas em aminoácidos aromáticos (CORRIDEN et. al., 2007). Entretanto, a detecção dessas (e outras) moléculas auto-fluorescentes em células é dificultada devido às suas propriedades espectroscópicas (baixo rendimento quântico e largo espectro de emissão que geralmente vai do azul ao vermelho) e/ou sua localização celular, inespecificamente distribuída por toda a amostra. Além disso, a maioria das moléculas de interesse biológico não são naturalmente fluorescentes. Por essa razão, marcadores fluorescentes externos (exógenos) com afinidade a alvos biológicos são comumente usados.

Os marcadores fluorescentes exógenos são geralmente pequenas moléculas orgânicas (os chamados corantes). No entanto, também podem ser utilizadas proteínas fluorescentes (NIENHAUS, 2008) e materiais derivados de arsênio (ADAMS & TSIEN, 2008). Esses marcadores são usados por conferirem afinidade a um alvo biológico. Essa interação do marcador a um alvo específico pode ser mediada por afinidade intrínseca (como

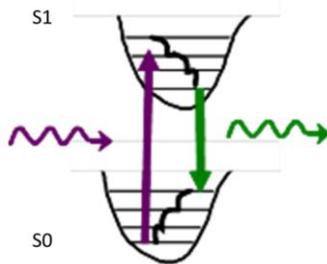
interações hidrofóbicas entre corantes e membranas, por exemplo) ou por estarem conjugados a moléculas de reconhecimento específico, como anticorpos que vão interagir com antígenos do sistema biológico. Por essa razão, técnicas baseadas em fluorescência podem ser além, de sensíveis, bastante específicas.

Além de detectarem um alvo biológico específico com elevada sensibilidade, essas são técnicas geralmente simples, envolvendo muitas vezes somente a adição do corante à amostra e a detecção por equipamentos, onde a análise pode ser traduzida em imagem (como na microscopia) ou apenas em um sinal (como na citometria ou em fluoroimunoensaios). São também consideradas técnicas seguras, principalmente quando comparadas a análises que usam materiais radioativos para ligação a um alvo e posterior detecção. Em conjunto, essas características permitem estudar vários tipos de eventos biológicos. Além do mais, não requerem que a amostra biológica seja fixada. Como resultado, é possível investigar e visualizar vários tipos de fenômenos biológicos dinamicamente (em tempo real) em sistemas biológicos vivos, o que é certamente a principal vantagem da fluorescência comparativamente a outras técnicas.

## 2.2 Marcadores Fluorescentes

Os marcadores que são utilizados na investigação de processos biológicos através de técnicas baseadas em fluorescência devem apresentar pelo menos duas características básicas: habilidade de ligar às estruturas de interesse e a capacidade de detectá-las. A primeira está relacionada a modificações químicas realizadas nas moléculas desses marcadores para torná-los direcionáveis, e a segunda é que esses marcadores devem emitir fluorescência.

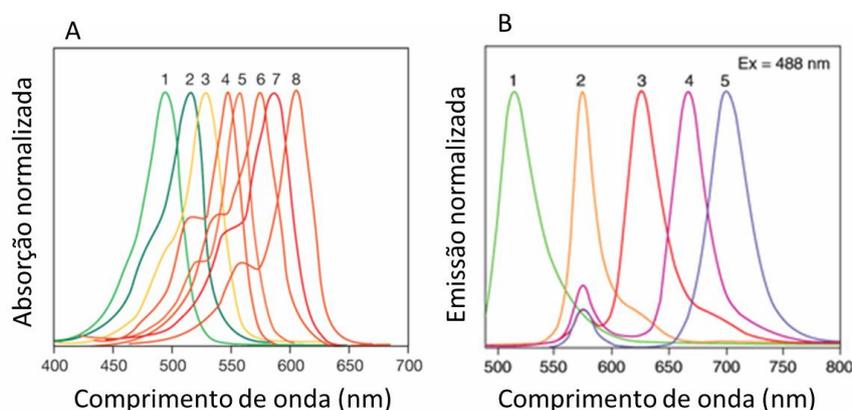
A fluorescência é um tipo específico de um fenômeno chamado *luminescência*. Esse fenômeno acontece da seguinte maneira: (1) elétrons de um material absorvem energia e são promovidos para estados excitados mais energéticos (a esse processo chamamos absorção) e (2) os elétrons são promovidos de estados excitados mais energéticos para o estado fundamental. Nessa etapa, o excesso de energia dos elétrons é liberado em forma de luz (radiação eletromagnética) chamada *luminescência* – Figura 1. Chamamos de fotoluminescência quando a promoção dos elétrons para o estado excitado é feita por absorção de energia luminosa (luz).



**Figura 1.** Representação simplificada de Luminescência. Um elétron no estado fundamental (S0) é excitado por luz (em roxo) para um nível de energia S1. As linhas dentro de cada nível representam níveis vibracionais. A volta do elétron ao estado fundamental resulta na emissão de um fóton (em verde).

A luminescência está normalmente dividida em duas categorias, fluorescência e fosforescência. Na fluorescência, o material só emite luz se for continuamente excitado (ou seja, se os elétrons forem continuamente levados para estados mais energéticos) – se pararmos de excitar o material, não haverá mais fluorescência. Já na fosforescência, a emissão de luz persiste por um certo tempo (que pode variar de microsegundos a segundos) mesmo quando se interrompe o processo de excitação (LAKOVICZ, 2006). A fluorescência também só ocorre por transições entre estados singletos da molécula.

As energias (em forma de luz) capazes de promover elétrons de um dado material do estado fundamental para um excitado é representada por um espectro de absorção (gráfico que relaciona a intensidade de energia que deve ser absorvida para que ocorra essa transição em função do comprimento de onda). Já a fluorescência é representada por um espectro de emissão, ou seja, um gráfico que relaciona a intensidade da luz emitida (quando os elétrons retornam ao estado fundamental) em função do comprimento de onda (LAKOVICZ, 2006). Um espectro de absorção e de emissão típicos para corantes são mostrados na Figura 2 .



**Figura 2.** Espectros de absorção e emissão de corantes orgânicos. Em A, absorção normalizada de diferentes corantes Alexa Fluór (418, 514, 532, 555, 546, 568, 594, 610, respectivamente). Em B, emissão normalizada de Alexa Fluór 488 (1), Ficoeritrina R (2), Alexa Fluór 610 (3), Alexa Fluór 647 (4) e Alexa Fluór 680 (5) (InvitrogenCorp).

Em uma molécula, cada nível eletrônico de energia é composto por vários níveis de energia vibracional, Figura 1. Assim, quando uma molécula absorve luz, o elétron é geralmente promovido para um nível eletrônico e vibracional mais excitado (pois há uma mudança de conformação dessa molécula). Depois decai para um nível vibracional menos excitado sem emitir luz (a molécula volta à sua conformação original) e daí finalmente os elétrons vão para o nível eletrônico fundamental, emitindo então a fluorescência. Vale lembrar que só há emissão de luz quando as transições são entre níveis eletrônicos.

Analisando a Figura 1, é possível notar que o espectro de emissão tem comprimentos de onda tipicamente maiores que o do espectro de absorção. Isso ocorre, pois a energia é inversamente proporcional ao comprimento de onda e pelo fato da molécula precisar absorver uma energia maior para atingir estados eletrônicos e vibracionais mais excitados e aí retornar ao seu estado fundamental. Isso explica porque se excita no azul os fluoróforos que emitem no verde e no verde os fluoróforos que emitem no vermelho. Como mostra a Figura 2, existe um deslocamento entre os máximos do espectro de absorção e emissão, chamado de deslocamento Stokes (*Stokes shift*).

Outras características que as sondas convencionais devem apresentar é uma elevada emissão e alta fotoestabilidade. A primeira está relacionada ao rendimento quântico do corante, que é a razão de fótons de luz emitidos pela quantidade de fótons absorvidos (LAKOWICZ, 2006). Esse é o parâmetro que define o quão fluorescente é a molécula. O segundo relaciona-se ao tempo em que a emissão persiste enquanto a molécula é excitada, ou seja, à fotodegradação da fluorescência. Portanto, esses parâmetros definem a sensibilidade e o tempo de detecção, respectivamente, fundamentais em estudos biológicos baseados em fluorescência.

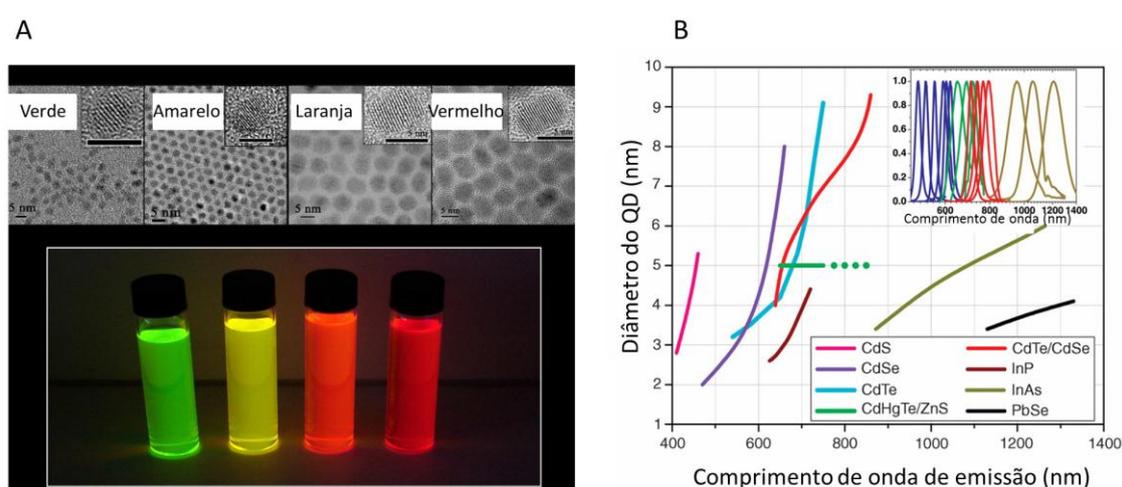
Além dos aspectos físicos, questões relacionadas à interação dos marcadores fluorescentes com as amostras são fundamentais no uso dessas moléculas. Elas devem interferir minimamente com o fenômeno estudado. Esse é o caso das proteínas fluorescentes, que apesar de serem relativamente grandes e estarem acopladas às proteínas de interesse, não interferem na função original dessa molécula-alvo (NIENHAUS, 2008). Outra questão é a liberação de produtos derivados da decomposição do corante quando esses são excitados. Quando os corantes fotodegradam, podem produzir oxigênio singleto e outros radicais livres, tóxicos para o sistema biológico (SALICE et al., 2010). Como

consequência, a possibilidade de dano associado ao uso dessas moléculas deve ser levada em consideração na escolha do marcador e/ou sistema biológico utilizado.

### 2.3 Quantum Dots em Biologia

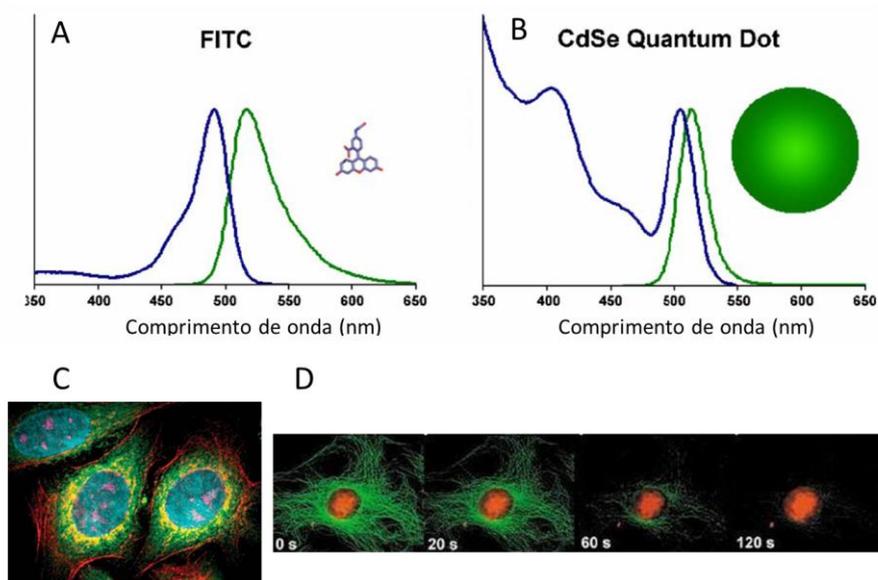
Existem disponíveis comercialmente vários tipos de corantes fluorescentes para os mais diferentes propósitos. Entretanto, raramente algum apresenta todas as características físicas e químicas desejáveis, simultaneamente. Como resultado, há uma clara necessidade do desenvolvimento de uma nova classe de sondas fluorescentes cujas propriedades superem os aspectos negativos do uso dos corantes convencionais. Esse parece ser o caso dos *Quantum Dots* (QDs), nanocristais fluorescentes de materiais semicondutores com tamanhos da ordem de 1 a 10 nm.

QDs são geralmente formados de materiais binários (dois elementos) de átomos dos grupos IIB e VIA da tabela periódica, podendo também ser compostos de mais de dois elementos e de átomos de outras famílias químicas. Suas vantagens em biologia advêm das características que materiais semicondutores apresentam quando seu tamanho é reduzido à ordem de nanômetros, e então suas propriedades espectroscópicas superam aquelas apresentadas pelos corantes convencionais. A principal diferença para as sondas tradicionais é que, no caso dos QDs, as propriedades não são determinadas apenas pela composição química, mas também pelo tamanho das nanopartículas (MEDINTZ, 2005 et al.; MICHALET et al., 2005), como mostra a Figura 3.



**Figura 3.** Dependência da emissão dos QDs com o tamanho. Em A, acima: microscopias eletrônicas de transmissão dos QDs mostrados na figura de baixo. A cor de emissão é característica do tamanho dos QDs, nesse caso de CdSe. Em B, comprimento de onda de emissão em função do tamanho para diferentes QDs. No detalhe, espectros de emissão de diferentes QDs - Figura 3A: <http://freshscience.org.au/wp-content/uploads/QDs-Microscopy-smaller.jpg>. Em 3B, adaptado de MICHALET et. al., 2005.

Entre as características que os tornam interessantes como sondas fluorescentes estão (1) o largo espectro de absorção, permitindo que vários tipos de QDs sejam excitados simultaneamente utilizando apenas um comprimento de onda, (2) seu estreito espectro de emissão, facilitando a separação (distinção) do sinal de cada tipo de QD – comparativamente aos corantes tradicionais (Figura 4 A e B). A Figura 4 C mostra que nanopartículas com diferentes emissões podem ser detectadas simultaneamente na mesma amostra quando uma única fonte de excitação é usada. Além do mais, (3) têm alto rendimento quântico de fluorescência e (4) praticamente não sofrem fotodegradação (Figura 4 D) - (MEDINTZ et al., 2005). Essas características tornam os QDs, ao menos do ponto de vista espectroscópico, sondas fluorescentes superiores aos corantes convencionalmente utilizados.

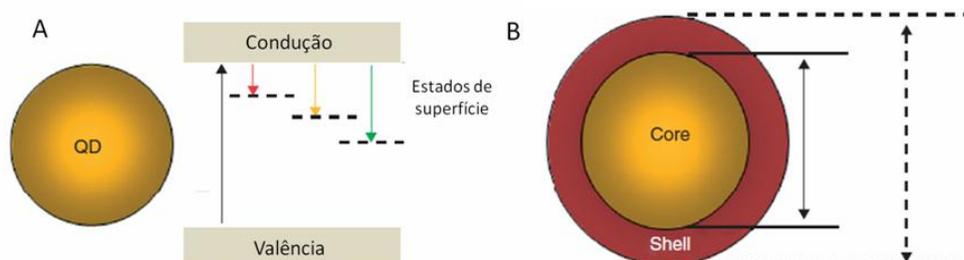


**Figura 4.** Características espectroscópicas dos QDs para detecção biológica. Em A, espectros de absorção (azul) e emissão (verde) do corante fluoresceína. Em B, espectros de absorção (azul) e emissão (verde) de QDs de CdSe. No detalhe dessas figuras, uma comparação de tamanho entre ambos fluoróforos. Em C, detecção de 5 alvos distintos em células por QDs excitados em um único comprimento de onda. Em D, comparação entre a fotoestabilidade de QDs (vermelhos) e o corante alexa Flúor (verde) (MEDINTZ et. al., 2005).

## 2.4 Superfície dos *Quantum Dots* – Passivação e Funcionalização

Em condições ideais, quando QDs são excitados (geralmente por luz), um elétron da banda de valência (BV) recebe energia para migrar para a banda de condução (BC) dentro da estrutura do cristal (Figura 5 A). Quando esse elétron retorna ao seu estado inicial, ele emite um fóton cuja energia e comprimento de onda sejam proporcionais à diferença de

energia entre as BV e BC (SMITH et al., 2004). Essa é a chamada recombinação radiativa, no qual luz (fluorescência) é produzida. Essa diferença de energia entre a BV e BC varia com o tamanho do nanocristal. Por essa razão, é possível variar seu comprimento de onda (cor) de emissão variando seu tamanho (como mostrado na Figura 3).

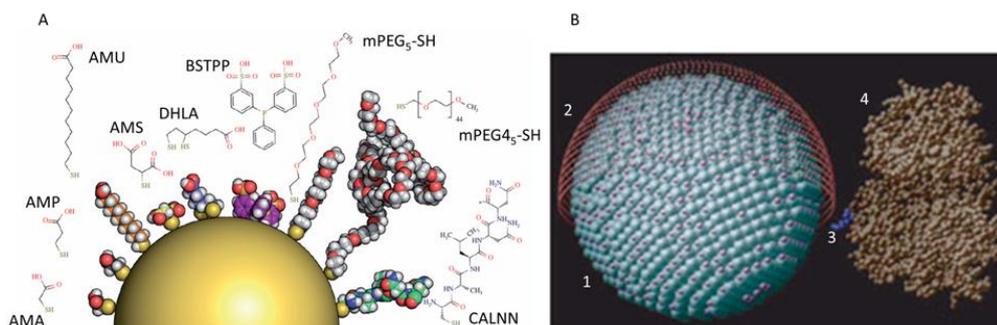


**Figura 5.** Transição eletrônica em QDs. A figura A mostra que os elétrons formados pela excitação podem decair por transições não radiativas pelos defeitos (setas coloridas) entre as bandas de condução e valência dos cristais. Em B, a passivação (ver texto) confina a emissão ao *caroço* dos QDs – MANSUR et al., 2010.

Por serem cristais nanométricos, uma fração significativa de seus átomos está localizada na superfície. Conseqüentemente, muitos desses átomos têm ligações químicas não compartilhadas, chamadas de “defeitos” do cristal (SANTOS et al., 2008). Como resultado, os elétrons podem decair para a BV de forma não radiativa pelos seus estados de superfície (Figura 5 A), diminuindo a eficiência de emissão dos QDs. Para formar as ligações não compartilhadas desses átomos, comumente recobre-se os cristais (*core*) com outro semiconductor de energia maior (*shell*) para completar as ligações não compartilhadas no *core*, etapa conhecida como passivação. Os nanocristais resultantes são então chamados de *core/shell* (Figura 5 B) e são mais fluorescentes (SANTOS et al., 2008).

Como estruturas inorgânicas podem se ligar a um alvo biológico para serem usados como sonda fluorescente em Biologia? Ao final das etapas sintéticas, os QDs apresentam grupamentos químicos de superfície (funcionalizante), resultantes de sua preparação. Esses grupos podem ser usados para ligação posterior à moléculas de direcionamento biológico, formando QDs conjugados (MEDINTZ, 2005; SANTOS, 2008). A ligação a biomoléculas pode ser mediada por carga, interações hidrofílicas/hidrofóbicas, pontes de hidrogênio, entre outras ligações fracas e até mesmo por ligações covalentes. O conjugado resultante deve aliar tanto as características espectroscópicas dos QDs quanto as biológicas do ligante (MEDINTZ, 2005), permitindo a detecção do alvo e aproveitando assim as vantagens desses nanocristais como sondas fluorescentes. A Figura 6 mostra o tamanho relativo de cada

componente estrutural dos QDs com diferentes moléculas funcionalizantes/estabilizantes (Figura 6 A) e de um conjugado QD-proteína (Figura 6 B).



**Figura 6.** Estrutura física dos QDs. Em A, diferentes moléculas funcionalizantes, com estruturas lineares e tridimensionais. AMA (ácido mercaptoacético); AMP (ácido mercaptopropiônico); AMU (ácido mercaptoundecanoico); AMS (ácido mercaptosuccínico), DHLA (ácido dihidrolipóico), BSTPP (trifenilfosfina bis-sulfonatada); mPEG<sub>5</sub>-SH e mPEG<sub>45</sub>-SH, PEG-metóxi de diferentes pesos moleculares e o peptídeo CALNN. Em B, estrutura de QDs *core/shell* (1 e 2, respectivamente), funcionalizados (3) e conjugados (4). Figura A, adaptado de SPERLING E PARAK, 2010. Figura B, MEDINTZ et. al., 2005.

## 2.5 Obtenção dos *Quantum Dots* – Síntese

QDs podem ser sintetizados basicamente por duas abordagens: (1) *top-down* (onde parte-se de um material macroscópico para chegar a um material nanométrico) ou *bottom-up* (onde se parte de átomos para se formar uma nanopartícula). A abordagem *top-down* é mais comum para QDs que são utilizados na telecomunicação e em dispositivos optoeletrônicos. Já a abordagem *bottom-up*, baseada em química coloidal, é utilizada para se produzir QDs utilizados em Ciências da Vida, pois permite o controle de parâmetros físico-químicos, como biocompatibilidade (SANTOS et. al., 2008).

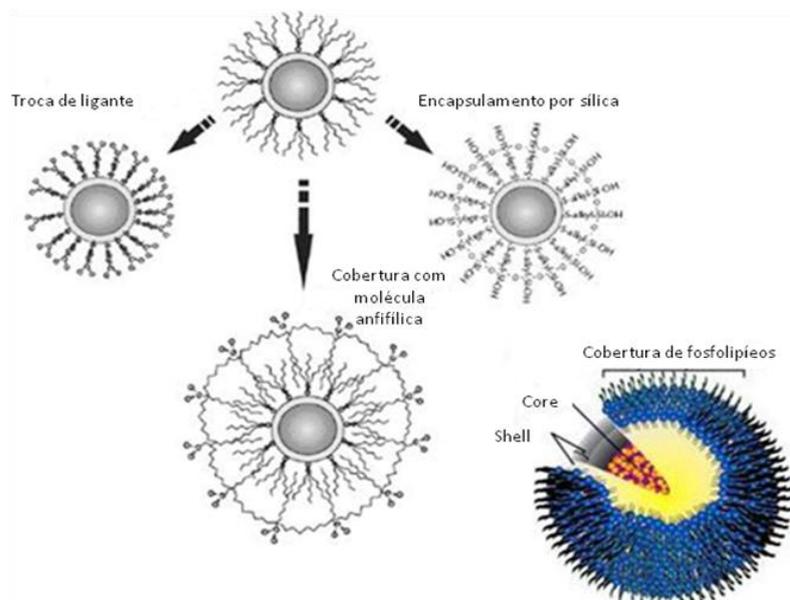
Dentre as várias rotas de sínteses, a mais utilizada é denominada organometálica. É baseada principalmente no controle do crescimento das nanopartículas via decomposição dos precursores (compostos orgânicos ligados a um metal) em temperaturas de aproximadamente 300°C, por um elevado período de tempo. As sínteses usando solventes organometálicos têm sido amplamente exploradas, principalmente com o solvente óxido de trioctilfosfina (TOPO) e o estabilizante trioctilfosfina (TOP) (HINES & GUYOT-SIONNEST, 1996).

Os principais fatores de síntese que influenciam as características das nanopartículas formadas são: pH, temperatura, tempo, concentração dos precursores e ligantes utilizados. Por exemplo, a carga resultante da partícula pode ser controlada pelo pH do meio ou

modificação do estabilizante, e a cinética de crescimento pode ser aumentada com o aumento da temperatura (ROGACH et. al., 2007). O ligante (algumas vezes referido como estabilizante) é sempre utilizado para manter as partículas em suspensão, evitando-se a formação de precipitados, já que se tratam de nanocristais coloidais. Na maioria das sínteses, o ligante atua também como agente funcionalizante – grupo químico utilizado para posterior conjugação a biomoléculas.

QDs surgiram para tentar superar os aspectos limitantes relacionados ao uso de corantes convencionais. No entanto, sua aplicação em larga escala estava limitada pelas dificuldades de se obter nanocristais hidrofílicos. De fato, antes de serem largamente usados como marcadores, QDs devem ter três propriedades nas condições biológicas: luminescência eficiente, estabilidade coloidal e baixa adsorção não específica.

Para tornar QDs organometálicos hidrofílicos, modificações de superfície podem ser obtidas de várias formas (MEDINTZ et. al., 2005 e HEZINGER et. al., 2008). Dentre as diferentes técnicas desenvolvidas para modificações de superfície em QDs, as quatro mais descritas na literatura são baseadas em: troca de ligantes de superfície, formação de interface hidrofílica com moléculas anfifílicas, micelização/encapsulamento em lipossomas e silanização dos nanocristais (HEZINGER et al., 2008). A Figura 7 ilustra essas técnicas.



**Figura 7.** Representação das quatro modificações químicas utilizadas para tornar os QDs redispersáveis em água. Da esquerda para a direita, técnica do trocador de ligante, interações hidrofóbicas, silanização e encapsulação em micelas ou lipossomas – SANTOS et al., 2008.

A primeira abordagem substitui completamente os ligantes de superfície remanescentes da síntese (por exemplo, o TOPO). A segunda abordagem cobre os ligantes presentes nos QDs com polímeros anfifílicos apropriados. Ambas as abordagens têm suas vantagens e desvantagens. Substituir o ligante hidrofóbico original por moléculas anfifílicas resulta numa partícula com diâmetro pequeno, um pouco maior que o *core* do QD. Entretanto, a troca do ligante de superfície freqüentemente resulta em uma baixa eficiência da luminescência e altera fortemente sua estabilidade físico-química e fotofísica em condições biológicas (MEDINTZ et. al., 2005 e HEZINGER et. al., 2008). A recobertura por ligantes anfifílicos produz partículas comparativamente maiores, dificultando muitas das aplicações como sondas biológicas. No entanto, essas partículas maiores têm uma boa estabilidade química e boa proteção contra agregação, além de preservar as propriedades fotofísicas do nanocristal. Essa cobertura também protege os QDs contra degradação em condições biológicas (MEDINTZ et. al., 2005; HEZINGER et. al., 2008; SANTOS et. al., 2008).

Encapsular QDs com materiais como macromoléculas anfifílicas (tais como certos polímeros, em micelas ou lipossomas - terceira abordagem para dispersá-los em água) geralmente preserva sua emissão, mas adiciona uma camada extra de material, aumentando o tamanho efetivo da partícula resultante (HEZINGER et. al., 2008; SANTOS et. al., 2008). Para imagens *in vivo*, nanocristais maiores podem ter acessibilidade diminuída aos sistemas desejados. Por fim, outra abordagem é a silanização de partículas contendo moléculas de superfície como os grupamentos  $-NH_2$  (amina) e  $-SH$  (tiol). Uma camada de sílica é formada na superfície pela hidrólise induzida de grupos silanol (WOLCOTT et. al., 2006).

A síntese feita diretamente em água elimina a etapa de redispersão das nanopartículas, além de possibilitar que moléculas hidrofílicas atuem simultaneamente como estabilizantes e agentes funcionalizantes. Sínteses recentes derivadas dos trabalhos de Rogach produzem QDs de Telureto de Cádmio (CdTe) diretamente em água, utilizando como estabilizantes moléculas contendo tiol (GAPONIK et al., 2002). Essa síntese apresenta diferenças significativas em relação àquelas realizadas em ambientes altamente hidrofóbicos. É bastante simples, não necessitando ambientes especiais para sua realização. Os nanocristais são naturalmente hidrofílicos e muitas vezes a síntese, passivação e funcionalização ocorrem em uma única etapa.

O diferencial das rotas que produzem QDs diretamente em água reside no uso de ligantes, pequenas moléculas capazes de controlar seu crescimento. As moléculas ligantes (contendo enxofre em sua estrutura) da maioria dessas sínteses são hidrolisadas durante o crescimento do cristal, e uma camada de enxofre é depositada sobre o *core* do QD (ROGACH et al., 2007). Quando o *core* é formado por cádmio, os átomos de enxofre formam ligações covalentes com os de  $Cd^{2+}$  da superfície do cristal e a camada de passivação resultante nesse caso é CdS (resultado da deposição de enxofre sobre os átomos de cádmio da superfície do nanocristal) (GAPONIK et al., 2002; ROGACH et al., 2007).

## 2.6 Questões Biológicas do Uso de *Quantum Dots*

Apesar de QDs hidrofílicos conferirem uma abordagem bastante atrativa nas primeiras aplicações em sistemas biológicos, ao decorrer dos anos se percebeu a existência de algumas questões limitantes para seu uso, listadas resumidamente na Tabela 1. Por serem sondas significativamente maiores que os corantes tradicionais, há um impedimento em aplicações específicas, quando é requerido acesso a determinadas estruturas celulares ou onde o espaço é limitado. Por exemplo, Howart e colaboradores (HOWARTH et. al., 2005) demonstraram que, ao contrário do corante Alexa, os QDs eram incapazes de se ligar a receptores glutamatérgicos em fendas sinápticas. Essa é a prova de que o tamanho limita o acesso. O mesmo deve valer para outras estruturas biológicas, como a travessia da barreira hematoencefálica (THORNE & NICHOLSON, 2006).

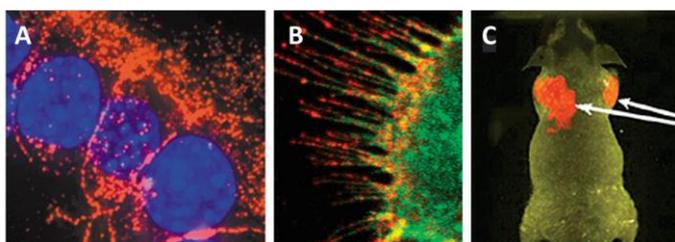
**Tabela 1.** Limitações no uso de Quantum Dots em Biologia.

Questão	Características	Alternativa
Modificação de propriedades após modificações químicas	Perda considerável de luminescência	Desenvolvimento de métodos que modifiquem minimamente suas propriedades
Dispersão em água e/ou (bio)conjugação	QDs significativamente maiores	Metodologias mais eficientes de dispersão em água
Estabilidade físico-química	Nanopartículas mais instáveis após substituição de moléculas de superfície	Síntese aquosa de QDs mais luminescentes
Ligação não específica	Tendência a ligar não especificamente. Mascara ligações direcionadas e pode interferir com o alvo não especificamente ligado	Recobrimento de superfície por polímeros. QDs com menor carga efetiva
Toxicidade (curto e longo prazo)	Reportada a toxicidade de diversos tipos de QDs por diversos mecanismos	Redução da liberação de seus constituintes elementares. Ausência de ligação inespecífica.
Entrega intracelular – Estudo de eventos no interior das células	Dificuldade de desenvolver um método eficaz para direcionar QDs a estruturas intracelulares	Uso de métodos físicos e químicos para transpor a(s) membrana(s)

À medida mais trabalhos com QDs eram publicados, outras questões biologicamente importantes apareceram. Provavelmente a mais desafiadora era a satisfatória conjugação com moléculas de reconhecimento específico (MEDINTZ *et. al*, 2005 E SANTOS *et. al*, 2008). Além disso, a manutenção das propriedades ópticas, estabilidade físico-química, ligação inespecífica, efeitos tóxicos e direcionamento intracelular são questões críticas no uso biológico dos QDs.

Ainda que nas primeiras aplicações, a simples ligação com estruturas biológicas, geralmente células, tenha sido explorada para marcação, essa propriedade tem se tornado indesejável algumas vezes, limitando a eficiência de marcação ao alvo específico (BIJU, 2010a). Jaiswal *et. al* reportaram a internalização de QDs de CdSe/ZnS recobertos com ácido dihidrolipóico (DHLA), uma molécula hidrossolúvel e (relativamente) pequena, para internalização em células de mamífero e protozoário (JAISWAL *et. al*, 2003). Eles foram um dos primeiros a demonstrar que a internalização celular de QDs era mediada por endocitose.

Enquanto a interação inespecífica era intensamente investigada na tentativa de esclarecer os mais diversos fenômenos biológicos (BIJU *et al.*, 2010a; FARIAS *et al.*, 2006), poucos estudos reportavam, inicialmente, marcações biológicas específicas. Essa característica deveu-se principalmente às dificuldades em conjugar os QDs a moléculas de reconhecimento específico, mantendo as propriedades iniciais das nanopartículas, e de caracterizar a conjugação. A primeira descrição de conjugação de QDs para detecção de um alvo biológico foi descrita por Wu *et. al.* (WU *et al.*, 2003). Esses autores mostraram a capacidade de QDs em detectar diferentes marcadores de câncer, especialmente um dos receptores do crescimento epidermóide humano (Her2) em células e tecidos tumorais (Figura 8 A). Essa foi, provavelmente, a primeira vez que usaram QDs para a identificação de um alvo específico.



**Figura 8.** Em A, QDs (vermelhos) ligam especificamente receptores Her2 em tecido mamário. Em B, QDs (vermelhos) ligam os receptores EGF (verde) em células tumorais. Em C, visualização de tumores *in vivo*. Em A, WU *et. al.*, 2003. Em B, LIDKE *et. al.*, 2004. Em C, GAO *et al.*, 2004.

Também com marcação direcionada, Lidke *et. al.* (LIDKE et al., 2004) mostraram que QDs ligados ao ligante do receptor de crescimento epidermal (EGFR) eram capazes de ativar o receptor (Figura 8 B). Nesse trabalho, foi possível visualizar pela primeira vez o tráfego desses receptores em células vivas. A partir de então, assim como para a síntese dessas nanopartículas, inúmeros trabalhos reportaram várias metodologias de conjugação de QDs para os mais diferentes propósitos. Biju *et al.* resume algumas das aplicações de QDs conjugados para aplicação no direcionamento específico (BIJU et al., 2010b). Só depois dessas modificações químicas, eles eram capazes de traçar especificamente um alvo biológico num sistema vivo, aproveitando todo o seu potencial como sonda biológica.

QDs são sondas potencialmente eficientes para imagens *in vivo*. Em experimentos como esses, é possível enxergar a fluorescência dos nanocristais por longos períodos de tempo sem a necessidade de cirurgia para exposição do órgão-alvo ou mesmo sacrificar o animal. Gao *et. al.* (GAO et al., 2004) ligaram os QDs especificamente a receptores específicos em células de câncer de próstata e puderam visualizar o destino celular final *in vivo* (Figura 8 C). Desde então, outras aplicações *in vivo* têm sido reportadas, como a cinética de ligação do conjugado QD-EGF em tumores (DIAGARADJANE et al., 2008).

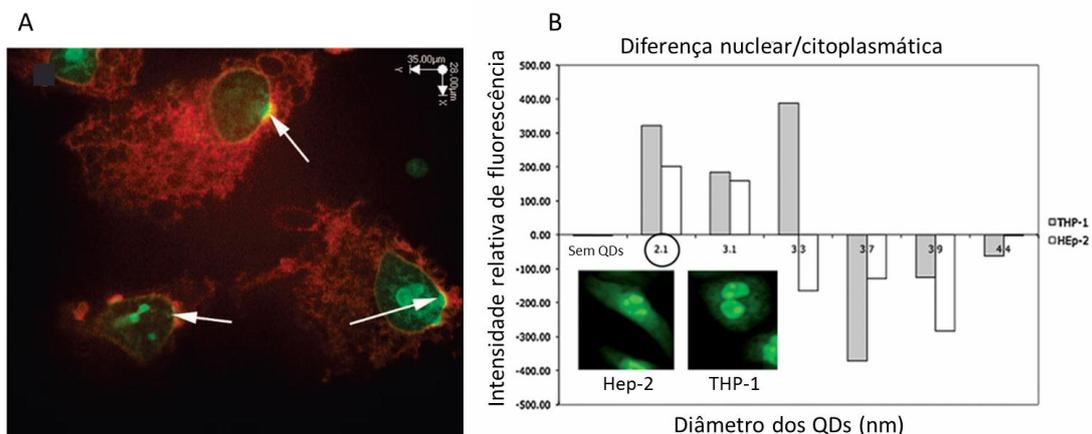
Outro ponto biologicamente interessante é que, por se tratarem de nanocristais sólidos e compostos de átomos de elevado número atômico (Cádmio, Selênio, Telúrio, etc.), os QDs são também eletrodensos. Isso significa que eles podem ser visualizados em microscopia eletrônica de transmissão (GIEPMANS et al., 2005). Essa característica é extremamente vantajosa, considerando que além de fornecerem imagens de fluorescência da amostra estudada, QDs permitem a visualização da localização ultraestrutural nessas amostras.

## **2.7 Ligação inespecífica**

Uma vez conjugados a moléculas de reconhecimento específico, os QDs deveriam se ligar apenas a seus alvos. Entretanto, isso nem sempre acontece. A ligação não desejada entre a sonda e o material é chamada de interação ou ligação não específica, geralmente mediada por interações hidrofóbicas e/ou eletrostáticas entre as moléculas de cobertura das partículas com biomoléculas em suspensão ou na superfície de ancoramento, geralmente as membranas biológicas (BIJU et al., 2010a).

A investigação da capacidade que QDs têm em se ligar não especificamente às estruturas biológicas é muito importante, por se tratar de uma propriedade crítica em análises de marcação específica e de possíveis efeitos adversos sobre os sistemas estudados. Interações não específicas podem ocorrer tanto com moléculas em suspensão (proteínas plasmáticas, por exemplo) quanto em superfícies, como no caso das membranas celulares. Ela é dependente de fatores como grupamentos químicos de superfície, carga da partícula, tipo celular, pH, meio de cultura, concentração, entre outros (BIJU et al., 2010a). A ligação inespecífica de fato pode ser usada para conjugar moléculas aos QDs (SHI et al., 2009), ou investigar as diferenças entre a capacidade que células saudáveis e tumorais têm em capturá-los (FARIAS et al., 2006), mas geralmente está associada a um desempenho muitas vezes desvantajoso como sonda fluorescente.

Nabiev *et al.* (NABIEV et al., 2007) reportaram que a localização intracelular de QDs não conjugados era dependente do tamanho. Enquanto QDs maiores (vermelhos) ficavam retidos no citoplasma, QDs menores (verdes) conseguiam ter acesso ao núcleo de monócitos (Figura 9 A). Já no núcleo, QDs ligavam-se fortemente às proteínas histonas. O tamanho não é importante apenas para a localização num tipo específico de célula, mas entre diferentes linhagens celulares. QDs de diferentes tamanhos tiveram acesso diferenciado ao núcleo em células de linhagens distintas (WILLIAMS et al., 2009), mostrando que, embora sempre haja uma barreira à entrada de QDs nas células, sua distribuição é célula-dependente. A Figura 9 B mostra a razão da fluorescência nuclear/citoplasmática para QDs de diferentes tamanhos.



**Figura 9.** Internalização de QDs em células monocíticas resulta em localização tamanho-dependente. Em A, QDs menores (verdes) têm acesso ao núcleo, enquanto os maiores (vermelhos) são retidos no citosol. Em B razão de localização nuclear/citoplasmática (valores positivos representam localização nuclear e negativos, citoplasmática). No detalhe, a marcação inespecífica de QDs de 2,1 nm nessas células. Em A, NABIEV et al., 2007. Em B, adaptado de WILLIAMS et al., 2009.

A entrada de QDs em células é geralmente descrita como sendo por endocitose. A endocitose é um mecanismo presente em todas as células eucariotas no qual materiais fluidos são internalizados por rotas especializadas de captura celular (CONNER & SCHMID, 2003). Compreende rotas (i) dependente de clatrina, (ii) dependente de caveolina, (iii) independente de clatrina e de caveolina e (iv) macropinocitose, no qual a escolha por uma dessas rotas depende de fatores como o tipo de material, tamanho, carga e a interação com moléculas ou receptores de superfície celular (ZHANG, et al., 2009). De fato, endocitose é a primeira possibilidade imaginada quando se trata de internalização de diversos materiais, como QDs; ao contrário da simples permeação pela membrana e dispersão por espaços intracelulares.

Várias abordagens podem ser usadas para investigar a rota endocítica escolhida pela célula para internalização do material, genericamente chamado de *cargo*. Uma delas inclui a inibição seletiva de uma dessas rotas usando drogas específicas, dentre as quais está a beta-metilciclodextrina, que interfere com caveolina (principal proteína da rota cavéola-dependente) por extração de colesterol de *rafts* de lipídeos (CONNER & SCHMID, 2003). Outra abordagem é o uso de moléculas acopladas a corantes fluorescentes, moléculas do qual a captura celular seja bem conhecida. A principal delas é a transferrina, seletivamente internalizada por rotas dependente de clatrina (CONNER & SCHMID, 2003). Usando essas abordagens, Zhang e Monteiro-Riviere (ZHANG & MONTEIRO-RIVIERE, 2009) mostraram que QDs recobertos com grupamentos carboxila são internalizados em queratinócitos humanos principalmente via receptores acoplados à proteína-G (clatrina-dependente) e receptores de lipoproteínas de baixa densidade. De fato, outras descrições reportam endocitose de QDs por rotas dependente de clatrina para outras linhagens celulares, mas com diferenças significativa entre diferentes tipos celulares com origem em comum – diferenças para três linhagens prostáticas (BARUA & REGE, 2009).

É de se esperar que a ligação indiscriminada interfira com certos mecanismos celulares, causando inibição ou ativação de determinados processos. De fato, tem sido reportado que a ligação inespecífica interfere com o tráfego normal de ligantes naturais (TEKLE et. al, 2008) ou é capaz de modular a despolarização de membrana em células excitáveis (ARVIZO et. al, 2010). Portanto, fica clara a necessidade de entender e controlar a habilidade de QDs (e outras partículas) de se ligarem a estruturas biológicas.

Algumas abordagens são usadas para evitar, ou ao menos reduzir, a tendência dos QDs em se ligarem indiscriminadamente, sendo a maioria delas baseada no recobrimento de superfície (HARRIS & CHESS, 2003 E VERMA & STELLACCI, 2010). A principal delas é o recobrimento por polímeros inertes de cadeia longa, como o polietilenoglicol (BENTZEN et al., 2005). Outras incluem ligação covalentemente com moléculas que reduzem a carga efetiva de superfície, como a substituição de grupamento carboxila por hidroxila (KAIRDOLF et al., 2008) ou por moléculas zwitteriônicas (BREUS et al., 2009). Em geral as abordagens usadas são tentativas de diminuir o efeito de carga entre a superfície das partículas e das células ou entre as partículas e as moléculas em suspensão já que esse parece ser o principal mecanismo de interação não direcionada entre QDs e biomoléculas.

O estudo da interação inespecífica entre os materiais, de forma geral, e sistemas biológicos, incluindo QDs e outros nanosistemas, é importante porque após a conjugação, algumas partículas resultantes podem ainda não estar completamente recobertas com a biomolécula. Conseqüentemente, QDs cuja superfície apresenta seus grupamentos originais expostos podem interagir de maneira semelhante aos seus pares não conjugados. Esse tipo de estudo é particularmente relevante para se entender como ocorre o processo de interação e quais suas conseqüências, mas também relevante para ajudar a esclarecer os fatores responsáveis pela correta conjugação de biomoléculas a nanopartículas.

## **2.8 Direcionamento (Intra)Celular**

Para aproveitar todas as vantagens potenciais dos QDs em biologia é necessário, além de suas propriedades ópticas, que eles estejam dispersos como partículas individuais (ao contrário de aglomerados), que não sejam tóxicos e que se liguem de forma específica. Preenchendo esses requisitos, é possível extrair o máximo dessas nanopartículas como sondas fluorescentes para o estudo dos mais diversos eventos biológicos, *in vitro* ou *in vivo*. Ainda assim, um ponto permanece em aberto: o direcionamento para o interior das células.

A grande maioria dos estudos com QDs que reporta a investigação de algum fenômeno específico, como o tráfego de moléculas em células ou movimento celular *in vivo*, o faz após a ligação dos QDs a um alvo extracelular (GAO et al., 2004). Se as nanopartículas conjugadas são capazes de se ligarem a um alvo extracelular, então a interação com essa

molécula se dá simplesmente pela incubação das células com os QDs. Por outro lado, o estudo de eventos intracelulares, que necessita de partículas livres no interior das células (ao contrário daquelas que foram internalizadas e estão confinadas em vesículas endocíticas) não é tão trivial. Como consequência, sua ligação a um alvo intracelular corresponde a um dos maiores desafios no campo de aplicação biológica dessas nanopartículas.

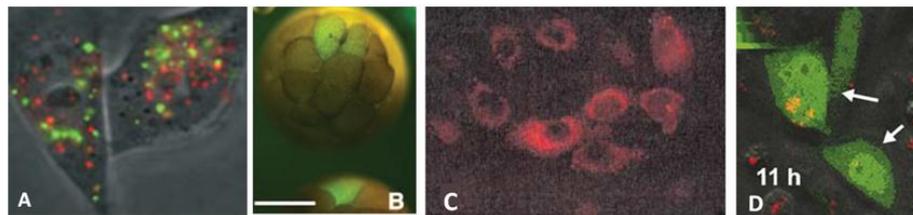
Algumas metodologias têm sido descritas para a entrega intracelular de QDs, umas para ligação específica de algum alvo intracelular, outras não. Abaixo, uma tabela dos principais métodos descritos.

**Tabela 2.** Métodos de internalização de QDs.

MÉTODO	MECANISMO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
<b>Eletroporação</b>	Formação de poros na membrana das células após aplicação de pulso(s) elétrico(s)	Altamente eficiente	Efeitos tóxicos significativamente alto
<b>Microinjeção</b>	Injeção de materiais diretamente na célula por micropipetas	Quantidades precisas podem ser veiculadas. O direcionamento intracelular pode ser controlado	Tediosa, com injeção em um número muito reduzido de células
<b>Peptídeos de translocação</b>	Se baseia na capacidade de determinados peptídeos atravessarem a membrana por mecanismos que independem de endocitose	O material é veiculado diretamente no citoplasma da célula	Especificidade intracelular mínima ou nula
<b>Sistemas de Transfecção</b>	Baseada na internalização do complexo nanopartícula-veículo (geralmente vesícula lipídica ou dendrímero) positivamente carregado e escape lisossomal	Simplicidade na formação do complexo. Usado para veicular o material em toda a população celular	Por dependerem geralmente de veículos positivamente carregados, está associado à interação com materiais de carga negativa. Precisa sofrer escape lisossomal, o que limita sua eficiência
<b>Lise osmótica de endossomos</b>	Liberação do material endocitado após choque osmótico	Simples, reprodutível e eficiente	Dependente de internalização. Possível alteração do estado fisiológico celular por choque osmótico
<b>Efeito esponja de prótons</b>	Liberação do material endocitado após rompimento lisossomal pelo uso de moléculas osmoticamente ativas (polietilenoimina, ex.)	Reportado como eficiente na capacidade de liberar o material para o citosol e promover transfecção	Lise vesicular expõe a célula ao conteúdo lisossomal, podendo causar efeitos tóxicos
<b>Lipossomas</b>	Entrega de materiais encapsulados ou adsorvidos em vesículas lipídicas (lipossomas)	Controle dos mecanismos de interação com o alvo	Geralmente associada à liberação endossomal do material encapsulado/adsorvido

Como a membrana plasmática constitui uma barreira a ser transposta em direção à entrega de (nano)materiais, deve ser óbvio imaginar um meio de perturbá-la à fim de entregá-los. Derfus *et al.* (DERFUS *et al.*, 2004) demonstraram que a eletroporação é um método eficiente na entrega de QDs em células vivas, entretanto, elas eram veiculadas como agregados, ao invés de partículas dispersas (Figura 10 A). Resultados similares foram descritos por Chen e Gerion (CHEN *et al.*, 2004). Outra alternativa é injetar QDs diretamente

no interior das células com o auxílio de micropipeta. Dubertret *et. al.* (DUBERTRET *et al.*, 2002) estudaram o desenvolvimento embrionário em *Xenopus sp.* após microinjeção de QDs em uma das células do embrião e seu desenvolvimento em estruturas teciduais derivadas dessa célula microinjetada (Figura 10 B). Entretanto a microinjeção restringe-se à manipulação de poucas células, por se tratar de uma técnica serial (uma por vez), trabalhosa e que requer uma alta qualificação do operador.



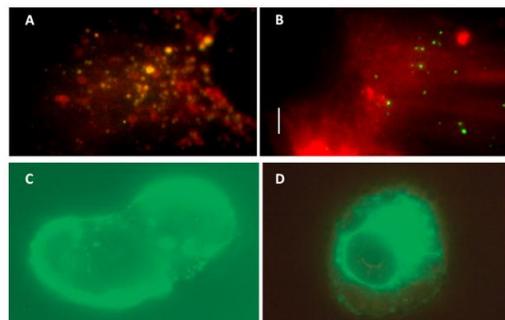
**Figura 10.** Aplicações para o direcionamento intracelular por diferentes metodologias. Em A, mostra que QDs de diferentes tamanhos no interior de células HeLa. Em B, fluorescência de uma única célula em embrião de *Xenopus*. C mostra a localização mitocondrial de QDs. Em D, a expressão da proteína fluorescente verde (em verde) 11 h após entrega intracelular, quando seu gene é veiculado por plasmídeo ligado a QDs (vermelhos) via lipossomas tipo lipoplex. Em A, DERFUS *et al.*, 2004. Em B, DUBERTRET *et al.*, 2002. Em C, HOSHINO *et al.*, 2004. Em D, SRINIVASAN *et al.*, 2006.

Uma ferramenta interessante para direcionamento intracelular é o uso de peptídeos de translocação (PTs), específicos para um compartimento celular. A primeira descrição de sistemas QDs-PTs foi provavelmente a de Hoshino *et. al.* (HOSHINO *et. al.*, 2004), dirigindo nanopartículas para mitocôndrias (Figura 10 C). Outros PTs também foram descritos como responsáveis pela entrada celular dos QDs, processo que independe da internalização das nanopartículas (LIU *et al.*, 2011). O direcionamento por PTs necessariamente exige a cobertura de superfície do material a ser veiculado. Isso dificultaria (ou mesmo impediria) que os QDs fossem também conjugados a moléculas de reconhecimento específico para uma molécula intracelular. Essa é a razão de ser considerada uma abordagem relativamente inespecífica, apenas carregando o material para o interior da célula.

QDs podem ser internalizados por interação com sistemas lipoplex. Esses sistemas são feitos de partículas lipídicas carregadas positivamente (geralmente lipossomas) para ligar eletrostaticamente a *cargos* (materiais) negativos, como oligonucleotídeos, no qual a carga final do complexo ainda é positiva, facilitando a ligação à superfície negativa de células e entrega intracelular do *cargo* após escape endossomal. Srinivasan *et. al.* (SRINIVASAN *et al.*, 2006) monitoraram a expressão da proteína fluorescente verde (GFP) em tempo real após entrega de QDs ligados ao plasmídeo que a codifica em sistema lipoplex

(Figura 10 D) via lipossomas catiônicos. Entretanto, a entrega celular mediada por sistemas lipoplex é dependente de endocitose (variável entre os diferentes tipos celulares) e está limitada à interação de materiais negativamente carregados apenas com um carreador catiônico.

Uma das primeiras descrições do estudo de um alvo intracelular foi reportada por Nelson *et. al.*, que estudaram o tráfego de vesículas endocíticas intermediado por miosina em células vivas. As figuras 11 A e 11 B mostram que, após endocitose, QDs (verdes) co-localizavam em vesículas endocíticas com dextran fluorescente (vermelho). O complexo QD-miosina é liberado do interior das vesículas endocíticas após lise osmótica, e sua fluorescência não é mais sobreposta com a do dextran (Figura 11 B) (NELSON *et al.*, 2009). Um ponto negativo é que essas metodologias envolvem a lise lisossomal quando a célula é submetida a condições de hipotonicidade, o que tem um grande potencial de acarretar danos às células.



**Figura 11.** Estudo de proteínas intracelulares por QDs veiculados ao interior das células. Em A e B, QDs (vermelhos) localizados em endossomos e depois liberados, respectivamente. A endocitose de QDs cobertos com polímeros osmoticamente ativos (em C) causa um efeito tipo “bomba de prótons”, rompendo os lisossomas e liberando o material endocitado diretamente no citosol (em D). Em A e B, NELSON *et al.*, 2009. Em C e D, YEZHELYEV *et al.*, 2008.

Um mecanismo um pouco diferente foi descrito para silenciamento gênico (YEZHELYEV *et al.*, 2008). Polímeros aminados osmoticamente ativos são capazes de provocar elevado influxo de água para os lisossomas, e então rompê-los, um efeito conhecido como “bomba de prótons”. QDs contendo RNAs de interferência foram endocitados em conjunto com um polímero dessa natureza (Figura 11 C) e posteriormente liberados no citosol (Figura 11 D), sendo capazes de reduzir significativamente a expressão de ciclofilina B em células de câncer de mama. Essa abordagem também é dependente de internalização e lise de lisossomos.

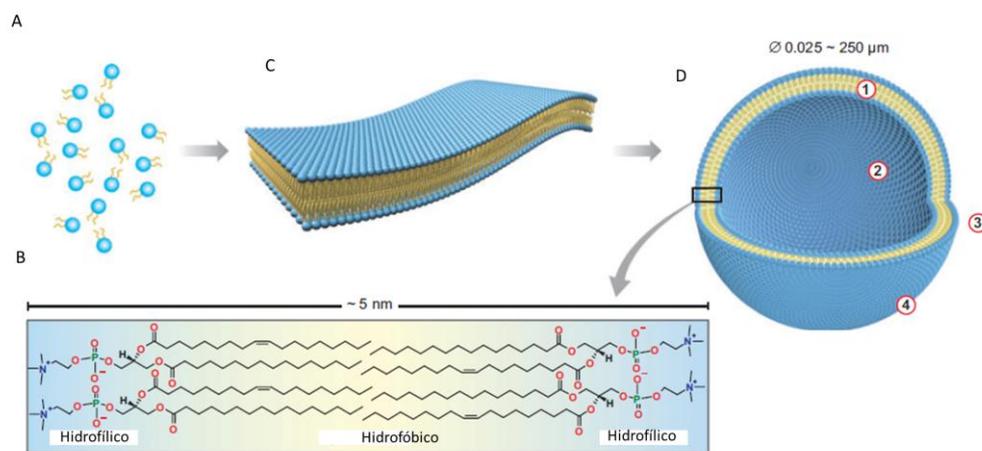
O desenvolvimento de um veículo seguro, simples, capaz de levar compostos para dentro de células vivas de forma eficiente, e universal (independente do tipo celular) superaria todas as questões associadas à entrega pelos métodos descritos. Enquanto alguns lesam a membrana (eletroporação), outros são caros e trabalhosos (microinjeção) ou “ocupam” a superfície das partículas com os PTs (impedindo que outras moléculas sejam conjugadas). Além do mais, grande parte dos métodos químicos (veículos de entrega) está ligada à endocitose e liberação citosólica, reduzindo a efetividade de entrega e está sujeita a variabilidades entre os diferentes tipos celulares, como no sistema “lipoplex” – carreador catiônico que interage eletrostaticamente com o material a ser entregue. No entanto, essa idéia do lipoplex pode ser reaproveitada e inspira um investimento em outros tipos de lipossomas (com outras composições) para a entrega celular de QDs, já que essas nanopartículas são capazes de carrear drogas, peptídeos e outras classes de moléculas para células.

## **2.9 Lipossomas – Fundamentos**

Desde sua descoberta por Banghan (BANGHAN, 1965), na década de 60, lipossomas têm se tornado ferramenta de estudo em várias áreas. Lipossomas são vesículas formadas por bicamadas de fosfolipídeos que se arranjam espontaneamente em água formando um compartimento aquoso fechado, separado de outro compartimento aquoso (o meio externo), por uma ou mais dessas bicamadas (VALENZUELA, 2007). Esse arranjo é espontâneo e os lipossomas são capazes de aprisionar o conteúdo da solução durante sua formação. Essa propriedade é de extrema importância em inúmeras aplicações.

Por serem análogos às membranas naturais, constituem uma ferramenta muito interessante para o estudo de funções biológicas básicas controladas por membrana (JESORKA & ORWAR, 2008), como o transporte de íons (GIRARD et al., 2004) e efeito de substâncias, como toxinas, sobre a membrana (SANCHEZ et al., 2002), etc. A Figura 12 A – D ilustra os processos básicos do arranjo de bicamadas para formação de lipossomas. As moléculas de fosfolipídeos (12 A) se arranjam em solução aquosa interagindo suas caudas apolares opostamente entre si (12 B), expondo ao meio a sua cabeça polar. Como resultado, uma bicamada é formada (12 C). Entretanto, uma bicamada plana ainda tem uma porção hidrofóbica exposta ao meio nas extremidades. Essa é a razão de formarem vesículas em

solução (12 D) (JESORKA & ORWAR, 2008; VALENZUELA, 2007). A interação entre as moléculas de lipídeo na membrana (que também dependem da composição e tipo de lipídeo), geralmente mediada por insaturações na cadeia apolar, ditam suas propriedades físicas fundamentais – elasticidade (capacidade que a membrana tem em deformar) e estado de fluidez da membrana (relacionada à viscosidade da membrana) (JESORKA & ORWAR, 2008), por exemplo. Nos lipossomas da figura abaixo, os fosfolipídeos têm uma instauração em uma de suas cadeiras acil (Figura 12 B).

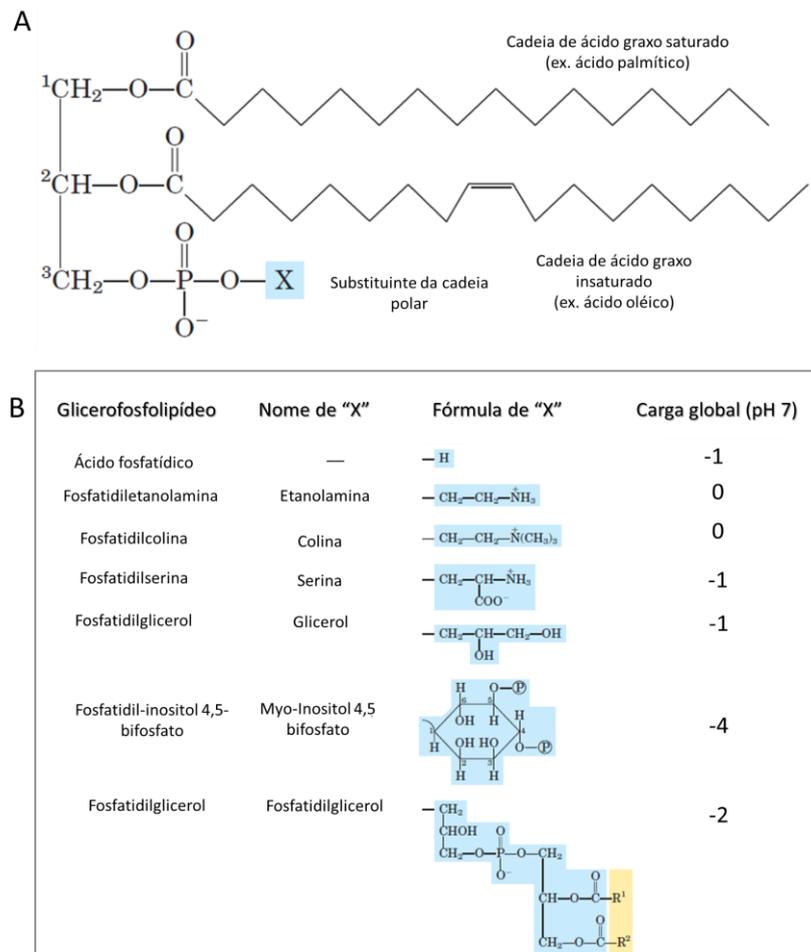


**Figura 12.** Esquema de formação de lipossomas. Em A, fosfolipídeos, moléculas anfifílicas com uma cabeça polar (azul) e duas caudas hidrofóbicas (amarelo). Em B, a interação entre as cadeias apolares de fosfolipídeos, formando bicamadas (b). Essa bicamada se rearranja em solução para não expor a região hidrofóbica, formando uma vesícula, como mostra a figura C. [1. material lipossolúvel, 2. material hidrossolúvel, 3. meio extravascular e 4. material ligado/ancorado à membrana]. A figura D mostra possíveis interações entre lipossomas e compostos carregados.;JESORKA &ORWAR, 2008.

O fechamento dessa bicamada para formar os lipossomas cria dois ambientes com solubilidades distintas – um hidrofóbico (Figura 12 D, número 1), capaz de conter moléculas lipossolúveis, e um aquoso interno (número 2), que pode encapsular materiais hidrossolúveis, além do próprio meio no qual as vesículas formadas estão dispersas (número 3). Outra possibilidade de carregamento é ligar moléculas na superfície da bicamada lipídica (número 4).

Os lipídeos de membrana são moléculas anfipáticas; polares em uma de suas extremidades e apolares na outra. As interações hidrofóbicas entre elas e a interação hidrofílica com a água fazem com que se arranjam em bicamadas (NELSON & COX, 2004). A maioria desses lipídeos são glicerofosfolipídeos, no qual duas moléculas de ácido graxo estão ligadas nos carbonos um e dois em uma molécula de glicerol por ligações tipo éster, e uma molécula polar carregada está ligada no terceiro carbono do glicerol (Figura 13 A)

(NELSON & COX, 2004). As cadeias de ácido graxo podem ser iguais ou diferentes no mesmo fosfolípídeo, bem como podem ser insaturadas em ambas, em uma ou nenhuma delas. A molécula polar ligada ao glicerol é geralmente carregada, anulando a carga negativa do grupo fosfato.

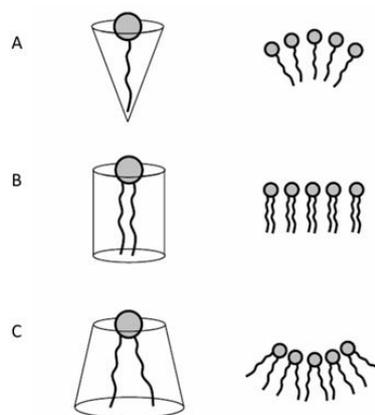


**Figura 13.** Estrutura dos fosfolípídeos. Em A, uma molécula de um glicerofosfolípídeo com uma cadeia saturada (ácido palmítico) e outra insaturada (ácido oleico). O grupamento X representa uma molécula polar, que vai conferir caráter hidrofílico ao fosfolípídeo. Em B, moléculas de X encontrada nos fosfolípídeos (NELSON & COX, 2004).

Considerando que a cabeça polar do fosfolípídeo da Figura 13 A fosse um grupamento colina, por exemplo, então a molécula resultante seria uma palmitoil-oleil fosfatidilcolina (do inglês POPC). Seguindo esse raciocínio, outros fosfolípídeos “comuns” são POPC, DOPC, DOPE, DSPE, onde “S” corresponde ao ácido esteárico e “E” à etanolamina. Além disso, lipídeos modificados também são bastante utilizados. Fosfolípídeos positivamente carregado como o DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano), ou ligados a grupamentos de polietilenoglicol como o DSPE-PEG, ou ainda acoplados a corantes fluorescentes, como DPPE-TR (dipalmitoil-fosfatidil etanolamina ligado ao corante *texas red*)

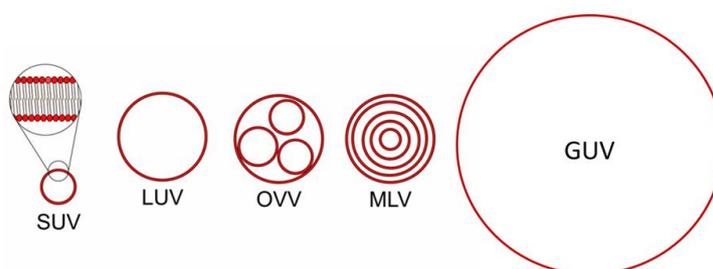
estão disponíveis comercialmente. A presença de lipídeos modificados confere aos lipossomas novas propriedades, como ser fluorescente, eletricamente carregado, sensível às variações de pH ou temperatura ou capaz de se ligar um alvo de maneira específica.

Além do mais, os próprios lipídeos mais comuns (Figura 13 B) podem alterar significativamente as propriedades dos lipossomas através do tamanho da cadeia e do número de insaturações, pois estas características determinam o estado de fluidez da membrana a uma determinada temperatura. Outra forma de mudar características do lipossoma, como a fluidez, é a presença de determinadas moléculas, como o colesterol (VEATCH & KELLER, 2002). Outro fator importante é a geometria da molécula – razão da área ocupada pela cadeia apolar e cabeça polar, podendo formar moléculas cilíndricas, cônicas, etc (Figura 14). Os lipídeos se arranjam diferentemente na bicamada a depender dessa geometria (CHESNOY et. al, 2000) e a bicamada resultante tem propriedades físicas distintas a depender da quantidade (razão molar) de seus lipídeos constituintes. Lipídeos PC (fosfatidilcolina) são cilíndricos, como mostra a Figura 14 B. Quando uma quantidade significativa de lipídeos como os da Figura 14 C está presente, pode ocorrer a conversão da fase lamelar (bicamadas de fosfolipídeos) para estruturas de curvatura inversa. Esse é o caso de lipídeos auxiliares (*helper lipids*), como fosfatidiletanolamina, usado para desestabilizar a membrana (WASUNGU & HOEKSTRA, 2006). A escolha dos componentes define as propriedades biológicas dos lipossomas, como maior ligação a membranas celulares para os positivamente carregados contendo 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP) ou desestabilização de membranas e liberação de materiais (DNA, por exemplo) após endocitose de vesículas contendo lipídeos etanolaminados (lipídeos PE).



**Figura 14.** Representação esquemática da geometria de moléculas anfífilas. Para lipídeos com geometria tipo cone (em A), estruturas com curvatura positiva, como micelas, são formadas. Para moléculas com morfologia cilíndrica (em B), bicamadas são formadas. Para morfologia como da figura C, fase estruturas com curvatura inversa são formadas – WASUNGU & HOEKSTRA, 2006.

Do ponto de vista morfológico, lipossomas podem ser divididos em vesículas pequenas unilamelares (SUVs), grandes unilamelares (LUVs), multilamelares (MLVs), oligolamelares (OVV) e gigantes unilamelares (GUVs), das siglas em inglês (Figura 15). A classificação em termos de tamanho varia na literatura, mas geralmente está compreendida entre 20 – 200 nm, 200 – 1000 nm e a partir de 10  $\mu\text{m}$  para SUVs, LUVs e GUVs, respectivamente. O tamanho das vesículas oligolamelares e multilamelares varia muito, sendo essas geralmente classificadas em termos do número de bicamadas ou lamelas (TRESSET et. al., 2009).



**Figura 15.** Classificações dos lipossomas quanto ao tamanho e ao número de lamelas. TRESSET, et. al. 2009.

## 2.10 Preparação dos Lipossomas

Várias são as metodologias descritas para produzir lipossomas. As mais tradicionais geralmente são simples e envolvem a obtenção de MLVs. Lipossomas são comumente obtidos por hidratação de filme lipídico, formado no fundo de um recipiente após a evaporação do solvente usado para dispersar os lipídeos (WALDE & ICHIKAWA 2001). A agitação vigorosa da solução de hidratação resulta em vesículas com grande distribuição de tamanho e lamelaridade. Vale ressaltar que o filme lipídico deve ser hidratado em temperatura acima da temperatura de transição de fase ( $T_m$ ) do lipídeo com maior  $T_m$ . Caso contrário, sua remoção do fundo do tubo (e por consequência a formação de vesículas) é dificultada (SZOKA JR. & PAPAHDJOPOULOS, 1980). Além dessa, outras técnicas são usadas para preparação de lipossomas com outras características morfológicas, sendo revisitadas por alguns trabalhos (WALDE & ICHIKAWA, 2001; RIAZ, 1996).

A principal vantagem do uso de lipossomas para entrega de compostos bioativos reside na sua habilidade de encapsulá-los. Considerando a formação de lipossomas após hidratação do filme lipídico, a encapsulação do composto depende das suas características de solubilidade. Se hidrofóbica, deve estar presente na solução orgânica a ser evaporada.

Assim, a molécula fará parte do filme de lipídeos. Se hidrofílico, deve estar presente na solução de hidratação (SZOKA JR. & PAPAHAADJOPOULOS, 1980). Geralmente, moléculas hidrofóbicas apresentam elevada capacidade de serem encapsuladas, enquanto que aquelas hidrofílicas apresentam capacidade variável, geralmente dependendo do seu tamanho ou da concentração de lipídeos usada (SZOKA JR. & PAPAHAADJOPOULOS, 1980).

Como as MLVs produzidas são vesículas muito grandes para determinadas aplicações, como de entrega de drogas, foram desenvolvidas técnicas para redução de tamanho e/ou número de lamelas. As principais são (1) extrusão, no qual a suspensão de MLVs é forçada a passar por uma membrana com poros de tamanho definido e (2) sonicação, onde a agitação mecânica por ultrassom rompe as lamelas das MLVs, formando vesículas menores (WALDE & ICHIKAWA 2001). Como resultado, lipossomas menores e geralmente unilamelares (ou oligolamelares) são formados. Os dois métodos formam vesículas com propriedades físicas semelhantes (SZOKA JR. & PAPAHAADJOPOULOS, 1980) ainda que lipossomas produzidos por sonicação sejam menores; conseqüentemente, mais instáveis.

Outras abordagens, como ciclos de congelamento-descongelamento (*freeze and thaw*) são usadas para diminuir o tamanho das MLVs, formando vesículas oligolamelares consideravelmente menores e mais homogêneas (WALDE & ICHIKAWA 2001). A técnica consiste em submeter os lipossomas a alguns ciclos de congelamento e descongelamento na presença do material a ser encapsulado. Adicionalmente, esse também é o método de escolha para aumentar a eficiência de encapsulação de substâncias hidrosolúveis (WALDE & ICHIKAWA 2001). Após a aplicação dos ciclos, as vesículas apresentam uma menor distribuição de tamanho, com vesículas consideravelmente menores e encapsulando o material disperso no meio. Em outras palavras, o procedimento aumenta a homogeneidade do sistema, tanto em termos de tamanho e número de lamelas, quanto na eficiência individual de encapsulação dos lipossomas.

Após descongelamento, as vesículas são reformadas. Este último passo apresenta dois pontos fundamentais: (1) no congelamento, as múltiplas lamelas são quebradas e obrigadas a se rearranjar, formando novas vesículas (como consequência, o tamanho e principalmente o número de lamelas diminui consideravelmente) e (2) quando congeladas,

as vesículas sofrem ruptura e expõem seu interior ao meio, englobando-o após descongelamento (isso propicia alguns ciclos de exposição do interior vesicular ao meio e a entrada dos materiais do meio nas vesículas). O material do meio tende então a equilibrar com o do interior dos lipossomas. Logo, os ciclos de congelamento-descongelamento aumentam consideravelmente a eficiência de encapsulação, sobretudo de materiais hidrofílicos (SZOKA JR. & PAPAHADJOPOULOS, 1980), no qual a concentração interna tende a ser igual à externa. Tipicamente, 5-8 ciclos são realizados (WALDE & ICHIKAWA, 2001 SZOKA JR. & PAPAHADJOPOULOS, 1980).

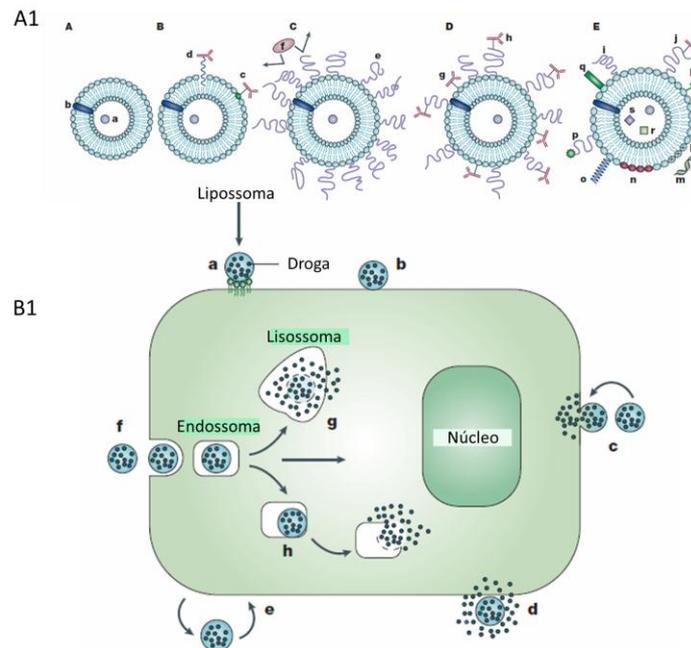
### **2.11 Entrega de Materiais em Células**

Entre as vantagens dos lipossomas para entrega de materiais - geralmente genes e drogas, estão (1) a capacidade de carrear moléculas hidrofílicas em seu interior aquoso e hidrofóbicas embebidas em sua bicamada (JESORKA & ORWAR, 2008), (2) habilidade de adsorver moléculas em sua superfície (AL-JAMAL & KOSTARELOS, 2007), (3) potencialidade de aliar agentes terapêuticos e diagnósticos num único sistema (AL-JAMAL & KOSTARELOS, 2007), (4) potencialmente aplicáveis *in vivo* (DEISSLER et al., 2008) e (5) suas propriedades podem ser ajustadas simplesmente pela escolha dos lipídeos usados durante sua formação (JESORKA & ORWAR, 2008; SZOKA JR. & PAPAHADJOPOULOS, 1980). De fato, lipossomas constituem os sistemas nanométricos mais usados na prática clínica para carrear drogas anti-fúngicas, citotóxicas e entrega de genes (AL-JAMAL & KOSTARELOS, 2007).

O tipo de interação com os sistemas biológicos é dependente do seu arranjo molecular e estado físico (fluido ou gel) e principalmente da sua capacidade de ligação mediada pela sua superfície. A Figura 16 (A1) ilustra diferentes recobrimentos de superfície que os lipossomas podem apresentar, que variam desde nenhum recobrimento, à ligação de polímeros, anticorpos ou pequenos ligantes de superfície.

Devido ao recobrimento, lipossomas são capazes de entregar materiais em células (ou tecidos) por diferentes rotas (Figura 16 B) (TORCHILIN, 2005). A maioria delas é dependente de interação mediada pela superfície e posterior internalização, como na Figura 16 (B1: a, b, c e em e), ainda que a simples liberação da droga nas vizinhanças da célula possa ocorrer sem necessária interação, como mostra a Figura 16 (B1 d). Os sistemas

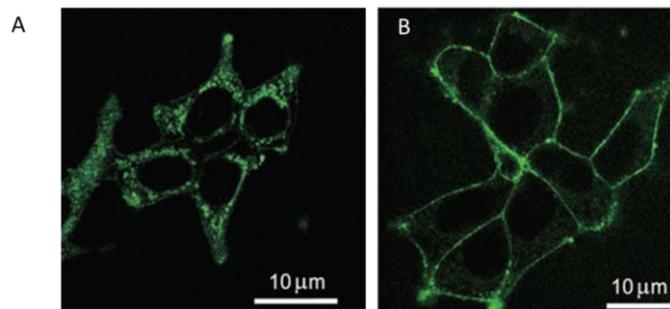
comerciais do tipo lipoplex, usados para transfecção e terapia gênica, são uma categoria de lipossomas (mas que também podem ser outras partículas, como dendrímeros) que contém cargas positivas em sua superfície, o que aumenta a capacidade de interagir com a superfície celular negativamente carregada (TORCHILIN, 2005).



**Figura 16.** Relação entre função dos lipossomas e recobrimento de superfície. Em A1, lipossomas sem recobrimento, com anticorpos, polímeros, polímeros ligados a anticorpos e multifuncionais (carregados, contendo oligonucleotídeos, drogas e lipídeos fluorescentes – em vermelho), nas letras de a – e. Em B1, diferentes de entrega de materiais às células. Entrega mediada por ligação à superfície mediada por ancoragem (a) ou não (b), por fusão de membranas (c), liberação nas vizinhanças (d), troca de materiais com a membrana (e), endocitose (f) e liberação lisossomal (g) - (adaptado de TORCHILIN, 2005).

## 2.12 Lipossomas Encapsulando Quantum Dots

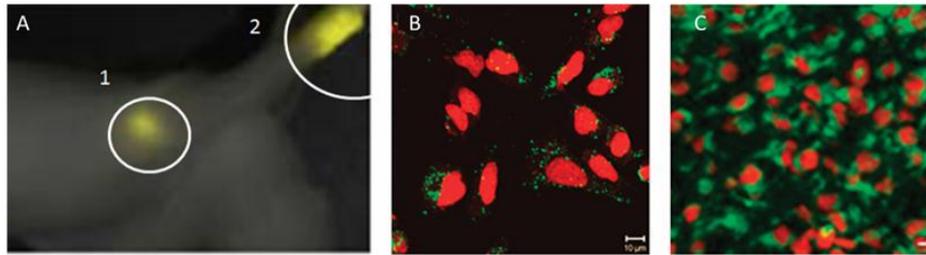
Por serem altamente versáteis e capazes de levar materiais hidrofílicos e hidrofóbicos às células, até mesmo ao seu interior, os lipossomas começaram a ser usados também para carrear QDs. Chen *et. al.* reportaram a encapsulação de QDs e nanopartículas fluorescentes de sílica (ambos hidrofílicos) em lipossomas (CHEN *et al.*, 2006). No mesmo ano, Gopalakrishnan *et. al.* descreveram a encapsulação de QDs hidrofóbicos na membrana de lipossomas catiônicos, usados para entrega celular (GOPALAKRISHNAN *et al.*, 2006). Nessa preparação, a diferença entre a internalização e a fusão do complexo lipossoma-QD com a membrana das células dependia apenas da presença de ou não de 0,5% em mol de PEG na superfície dos lipossomas (Figura 17).



**Figura 17.** Diferentes formas de interação de lipossomas catiônicos com células. A figura A mostra que lipossomas catiônicos (DMPC:DOTAP) contendo QDs e sem recobrimento de superfície são internalizados pelas células. Quando esses lipossomas são recobertos com 0,5% de DMPE-PEG, ocorre fusão com a membrana celular, como mostrado em B – GOPALAKRISHNAN et al., 2006.

A internalização, dependente de carga de superfície, do complexo lipossomas-QDs como foi descrita por Bothun *et. al.* (BOTHUN et al., 2009). Esses autores mostraram que complexos catiônicos eram capturados pelas células, enquanto os zwitteriônicos se aglomeravam e sofriam internalização em menor escala. Esse trabalho foi interessante por também demonstrar a encapsulação simultânea de QDs hidrofílicos e hidrofóbicos nas mesmas vesículas. Também dependente de interação de superfície, a ligação preferencial de lipossomas funcionalizados com ácido fólico em células tumorais foi demonstrada pela fluorescência dos QDs encapsulados (YANG et al., 2009). Entretanto, a encapsulação afetou a intensidade de luminescência dos nanocristais. Esse dado é contraditório, uma vez que outras publicações descrevem a manutenção de suas propriedades ópticas, mesmo para lipossomas também zwitteriônicos encapsulando o mesmo tipo de QDs, preparados em água e com igual grupamento de superfície (CHU et al., 2010).

A encapsulação de QDs também tem sido descrita *in vivo*. Chu *et. al.* usaram o complexo para visualizar o tráfego do sistema em direção aos nodos linfáticos (CHU et al., 2010) (Figura 18 A), enquanto Al-Jamal *et. al.* estudaram o *clearance* de diferentes preparações em camundongos após administração intravenosa (AL-JAMAL et al., 2009). O mesmo grupo demonstrou que tanto QDs hidrofílicos (AL-JAMAL et al., 2008a) quanto hidrofóbicos (AL-JAMAL et al., 2008b) encapsulados em lipossomas catiônicos eram capazes de se acumular especificamente em tecidos tumorais (Figura 18 B e C) após terem demonstrado que a captura celular direcionava-os para vesículas endocíticas (Figura 18 B).

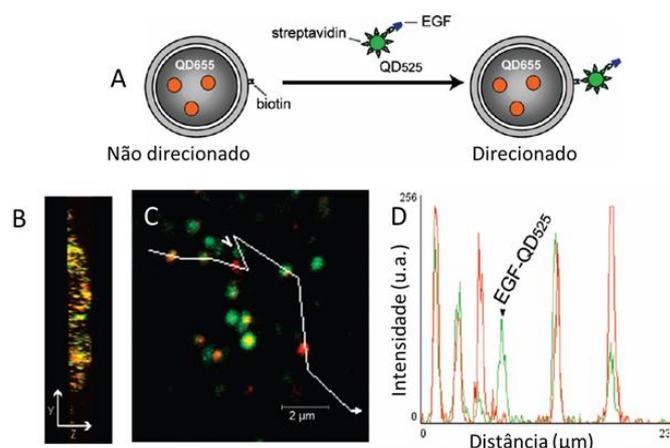


**Figura 18.** Interação *in vivo* de lipossomas contendo QDs. Em A, 5 minutos após administração intradérmica (região 2), lipossomas de fosfatidilcolina contendo QDs hidrofílicos localizam-se em nodos linfáticos axilares. Em B, lipossomas catiônicos localizados em estruturas intracelulares endocíticas. Em C, marcação de células tumorais após injeção de lipossomas catiônicos dentro do tumor *in vivo*. Em A, CHU et al., 2010. Em B, AL-JAMAL et al., 2008a. Em C, AL-JAMAL et al., 2008b.

Todos os trabalhos descritos envolviam a interação e internalização de lipossomas (independente de conter QDs) com células por interações mediadas por carga. Em preparações lipossomais dessa natureza, com internalização e aprisionamento endo/lisossomal, os materiais veiculados continuavam impossibilitados de alcançarem o citosol, semelhantemente à interação e internalização de QDs livres (sem o uso de qualquer veículo carreador, à exceção do trabalho de Gopalakrishnan *et al.* - GOPALAKRISHNAN et al., 2006). Mesmo nesse sistema lipossoma-QDs em que houve fusão, eles eram hidrofóbicos, ficando embebidos na bicamada da célula, ou seja, nenhum deles seria capaz de monitorar um evento intracelular.

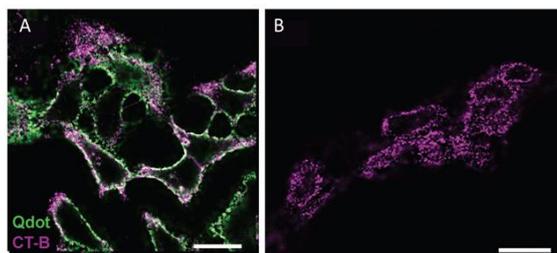
Num trabalho recente, Sigot *et al.* reportam uma preparação lipossomal diferente das “convencionais” (SIGOT et al., 2010). Nela, lipossomas fusogênicos (contendo Ceramida-C8) ou pH sensíveis (contendo DSGS) com QDs foram levados às células. O objetivo era promover a fusão com a membrana lisossomal após internalização. Outro diferencial é que dois tipos distintos de QDs foram veiculados: QDs vermelhos foram encapsulados nas vesículas, que eram funcionalizadas com biotina e QDs verdes (conjugados à estreptavidina e ao EGF) foram ligados fortemente à superfície dos lipossomas (Figura 19 A). Como resultado, um sistema complexo contendo QDs verdes e vermelhos e funcionalizados com EGF poderia ser direcionado especificamente a células EGFR positivas. O sistema foi capaz de ligar especificamente e ativar o receptor, sofrendo internalização (Figura 19 B). Entretanto, a fluorescência verde-vermelho (resultando em amarelo) não se desfez (Figura 19 C), mostrando que o complexo continuou aprisionado em vesículas endocíticas, não sendo liberado no interior das células. O sinal de fluorescência das seis vesículas (Figura 19

D) mostra que os QDs estavam sempre associados aos lipossomas (sinal verde-vermelho), a não ser quando eram internalizados como partículas livres (EGF-QD<sub>525</sub>).



**Figura 19.** Interação específica de lipossomas ligados a EGF com células EGF-positivas. Em A, o esquema do arranjo dos QDs nesses lipossomas funcionalizados. Em B, os planos y-z, com co-localização desses QDs logo abaixo a membrana. A figura C apresenta o perfil em linha (em branco) para fluorescência de 6 vesículas intracelulares, mostradas em intensidade de fluorescência em DF. Lipossomas contendo Cer-C8 (fusogênicos). O sinal verde indicado como “EGF-QD” é um QD livre que foi internalizado. SIGOT et al., 2010.

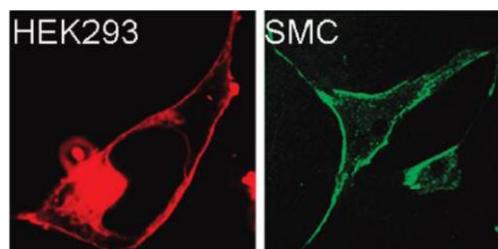
Em uma preparação lipossomal que interage de forma diferente, Dudu *et. al.* reportaram o que seria a entrada de QDs em células tumorais por um sistema catiônico (contendo POPC+) que eles supuseram sofrer fusão com a membrana da célula (DUDU et al., 2008). De fato, apesar de até então eles não assegurarem que a fusão era realmente o processo, que levava os QDs ao interior dessas células, parecia que o processo liberava os QDs no citosol (Figura 20 A). A marcação de membrana (pelo uso de um marcador específico) demonstrou que os QDs, apesar de estarem presentes em grande quantidade ali (co-localização), também se localizaram no interior da célula (Figura 20 A). Entretanto, os QDs eram veiculados como aglomerados de nanopartículas (Figura 20 B), num perfil concentração-dependente.



**Figura 20.** Interação celular de lipossomas fusogênicos de contendo QDs. A figura A mostra o perfil de marcação celular de QDs e lipossomas (marcação indireta após ligação do peptídeo CT-B), respectivamente após interação celular. A figura B mostra que os QDs são entregues às células em forma de aglomerados. Lipossomas de POPC:DOPC+:NBD-PC. DUDU et al., 2008.

Em 2010, Csiszár *et al.* (CSISZÁR *et al.*, 2010) descreveram uma formulação lipossomal capaz de fundir com diferentes tipos celulares. Eles estudaram a capacidade que esse sistema tinha em fundir com as células mesmo sem ter encapsulado (e conseqüentemente veiculado) qualquer material. Sua composição era de DOPE:DOTAP:FL (1:1:0,1 em massa de lipídeos), onde FL é uma molécula com grupamentos aromáticos (um corante fluorescente). Aqui, moléculas de PE eram os lipídeos auxiliares, o DOTAP promovia a interação de cargas com as células e o FL era o responsável por desestruir as membranas celulares e lipossomal, resultando na fusão. De fato, moléculas de PE são reconhecidamente moléculas desestabilizantes descritas como lipídeos *helper* (HUI *et al.*, 1996). Mas o desencadeamento do processo de fusão era promovido apenas na presença de moléculas fluorescentes na bicamada dos lipossomas.

Como esses lipossomas (diâmetro ~ 100 nm) eram naturalmente fluorescentes, a fusão era facilmente visualizada pela fluorescência da membrana nas células (Figura 21). Os autores não relatam outro tipo de interação com as células tal como endocitose, a não ser a própria fusão. Do ponto de vista de entrega em células vivas, essa formulação é extremamente interessante porque permitiria, ao menos em princípio, a entrega de materiais hidrossolúveis encapsulados no interior das vesículas diretamente no citosol da célula sem necessitar da funcionalização dos lipossomas. Além do mais, o processo seria rápido (poucos minutos) e independente de endocitose, ao contrário dos sistemas do tipo lipoplex. Por conseqüência, a exposição ao sistema seria rápida e a entrega do material independente do tipo celular



**Figura 21.** Fusão de lipossomas fusogênicos com células vivas. À esquerda, células-tronco de rim humano (HEK293) incubadas com lipossomas no qual o Lipídeo-FL era DOPE-Rodamina. À direita, fusão com células musculares (SMC) onde o Lipídeo-FL era DHPE-Bodipi-FL – CSISZÁR *et al.*, 2010.

Lipossomas como os descritos por Csiszár *et al.* (CSISZÁR *et al.*, 2010) poderiam ser modelos interessantes para entrega de QDs em células vivas. Eles não dependeriam de determinadas condições, como dependem outros sistemas de entrega, geralmente

associados à interações de carga, endocitose e liberação do material a ser carregado. Suas propriedades fusogênicas permitiriam entregar as nanopartículas diretamente no interior das células sem a necessidade de funcionalização dos QDs, que por sua vez poderiam ser usados para se ligarem a estruturas intracelulares. Esse é um tema bastante desafiador e de grande interesse atualmente.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, S. & TSIEN, R.; **“Preparation of the membrane-permeant biarsenicals FIAsH-EDT2 and ReAsH-EDT2 for fluorescent labeling of tetracysteine-tagged proteins”**. *Nature Protocols* 3 No 9, 1527-1534 (2008).
- AL-JAMAL, W.; KOSTARELOS, K.; **“Liposomes-Nanoparticles Hybrids for Multimodal Diagnostic and Therapeutic Applications”**. *Nanomedicine* 2 No. 1, 85-98 (2007).
- AL-JAMAL, W. T.; AL-JAMAL, K. T.; BOMANS, P. H.; FREDERIK, P. M.; KOSTARELOS, K.; **“Functionalized-Quantum-Dot-Liposome Hybrids as Multimodal Nanoparticles for Cancer”**. *Small* 4 No. 9, 1406–1415 (2008a).
- AL-JAMAL, W. T.; AL-JAMAL, K. T.; TIAN, B.; LACERDA, L.; BOMANS, P. H.; FREDERIK, P. M.; KOSTARELOS, K.; **“Lipid Quantum Dot Bilayer Vesicles Enhance Tumor Cell Uptake and Retention in Vitro and in Vivo”**. *ACS Nano* 2 No. 3, 408-428 (2008b).
- AL-JAMAL, W. T.; AL-JAMAL, K. T.; TIAN, B.; CAKEBREAD, A.; HALKET, J. M.; KOSTARELOS, K.; **“Tumor Targeting of Functionalized Quantum Dot-Liposome Hybrids by Intravenous Administration”**. *Molecular Pharmaceutics* 6 No. 2, 520–530 (2009).
- ARVIZO, R. R.; MIRANDA, O. R.; THOMPSON, M. A.; PABELICK, C. M.; BHATTACHARYA, R.; ROBERTSON, J. D.; ROTELLO, V. M.; PRAKASH, Y. S.; MUKHERJEE, P.; **“Effect of Nanoparticle Surface Charge at the Plasma Membrane and Beyond”**. *Nano Letters* 10, 2543–2548 (2010).
- BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C.; **“Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids”**. *Mol. Biol.* 13, 238-52 (1965).
- BARUA, S. E REGE, K.; **“Cancer-Cell-Phenotype-Dependent Differential Intracellular Trafficking of Unconjugated Quantum Dots”**. *Small* 5 No. 3, 370–376 (2009).
- BENTZEN, E. L.; TOMLINSON, I. D.; MASON, J.; GRESCH, P.; WARNEMENT, M. R.; WRIGHT, D.; SANDERS-BUSH, E.; BLAKELY, R.; ROSENTHAL, S. J.; **“Surface Modification To Reduce Nonspecific Binding of Quantum Dots in Live Cell Assays”**. *Bioconjugate Chem.* 16, 1488-1494 (2005).
- BIJU, V.; ITOH, T.; ISHIKAWA, M.; **“Delivering quantum dots to cells: bioconjugated quantum dots for targeted and nonspecific extracellular and intracellular imaging”**. *Chem. Soc. Rev.* (2010a).
- BIJU, V.; MUNDAYOOR, S.; OMKUMAR, R. V.; ANAS, A.; ISHIKAWA, M.; **“Bioconjugated quantum dots for cancer research: Present status, prospects and remaining issues”**. *Biotechnology Advances* 28, 199–213 (2010b).
- BOTHUN, G. D.; RABIDEAU, A. E.; STONER, M. A.; **“Hepatoma Cell Uptake of Cationic Multifluorescent Quantum Dot Liposomes”**. *The Journal of Phys Chem Letters* 113, 7725–7728 (2009).
- BREUS, V. V.; HEYES, C. D.; TRON, K.; NIENHAUS, G. U.; **“Zwitterionic Biocompatible Quantum Dots for Wide pH Stability and Weak Nonspecific Binding to Cells”**. *ACS Nano* 3 No 9, 2573–2580 (2009).

BRUCHEZ, M.; MORONNE, M.; GIN, P.; WEISS, S.; ALIVISATOS, A. P.; **“Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels”** *Science* 281, 2013–2015 (1998).

CHAN, W. C. W.; NIE, S.; **“Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection”**. *Science* 281, 2016–2018 (1998).

CHEN, CHIEN-SHENG; YAO, J.; DURST, R. A.; **“Liposome encapsulation of fluorescent nanoparticles: Quantum dots and silica nanoparticles”**. *Journal of Nanoparticle Research* 8, 1033–1038 (2006).

CHEN, F.; GERION, D.; **“Fluorescent CdSe/ZnS Nanocrystal-Peptide Conjugates for Long-term, Nontoxic Imaging and Nuclear Targeting in Living Cells”**. *Nano letters* 4 No. 10 1827–1832, (2004).

CHESNOY, S.; HUANG, L.; **“Structure and Function of Lipid-Dna Complexes for Gene Delivery”**. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 27–47 (2000).

CHU, M.; ZHUO, S.; XU, J.; SHENG, Q.; HOU, S.; WANG, R.; **“Liposome-coated quantum dots targeting the sentinel lymph node”**. *J. Nanopart Res.* 12, 187–197 (2010).

CONNER, S. D., E SCHMID, S. L., **“Regulated portals of entry into the cell”**. *Nature* 422, 37 - 44 (2003).

CORRIDEN, R.; INSEL, P. A.; JUNGER, W. G.; **“A novel method using fluorescence microscopy for real-time assessment of ATP release from individual cells”**. *Am J Physiol Cell Physiol* 293, C1420-C1425 (2007).

COURTY, S.; LUCCARDINI, C.; BELLAICHE, Y.; CAPPELLO, G.; DAHAN, M.; **“Tracking Individual Kinesin Motors in Living Cells Using Single Quantum-Dot Imaging”**. *Nano Letters* 6 No. 7, 1491-1495 (2006).

CSISZÁR, A.; HERSCH, N.; DIELUWEIT, S.; BIEHL, R.; MERKEL, R.; HOFFMANN, B.; **“Novel Fusogenic Liposomes for Fluorescent Cell Labeling and Membrane Modification”**. *Bioconjugate Chem.* 21, 537–543 (2010).

DAHAN, M.; LÉVI, S.; LUCCARDINI, C.; ROSTAING, P.; RIVEAU, B.; TRILLER, A.; **“Diffusion Dynamics of Glycine Receptors Revealed by Single-Quantum Dot Tracking”**. *Science* 302 No.5644, 442-445 (2003).

DESSLER, V.; RÜGER, R.; FRANK, W.; FAHR, A.; KAISER, W. A.; HILGER, I.; **“Fluorescent Liposomes as Contrast Agents for In Vivo Optical Imaging of Edemas in Mice”**. *Small* 4 No. 8, 1240–1246 (2008).

DELEHANTY, J. B.; MATTOUSSI, H.; MEDINTZ, I. L.; **“Delivering quantum dots into cells: strategies, progress and remaining issues”**. *Anal. Bioanal. Chem.* 393, 1091–1105 (2009).

DERFUS, A. M.; CHAN, W. C. W.; BATHIA, S. N.; **“Intracellular Delivery of Quantum Dots for Live Cell Labeling and Organelle Tracking”**. *Advanced Materials* 16 No. 12, 961-966 (2004).

DIAGARADJANE, P.; ORENSTEIN-CARDONA, J. M.; COLÓN-CASASNOVAS, N. E.; DEORUKHKAR, A.; SHENTU, S.; KUNO, N.; SCHWARTZ, D. L.; GELOVANI, J. G.; KRISHNAN, S.;

**“Imaging Epidermal Growth Factor Receptor Expression In vivo: Pharmacokinetic and Biodistribution Characterization of a Bioconjugated Quantum Dot Nanoprobe”**. *Clin. Cancer Res.* 14, 731-741 (2008).

DUBERTRET, B.; SKOURIDES, P.; NORRIS, D. J.; NOIREAUX, V.; BRIVANLOU, A. H.; LIBCHABER, A.; **“In Vivo Imaging of Quantum Dots Encapsulated in Phospholipid Micelles”**. *Science* 298, 1759-1762 (2002).

DUDU, V.; RAMCHARAN, M.; GILCHRIST, M. L.; HOLLAND, E. C.; VAZQUEZ, M.; **“Liposome Delivery of Quantum Dots to the Cytosol of Live Cells”**. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 8, 2293–2300 (2008).

EWERT, K., SLECK, N. L., AHMAD, A., EVANS, H. M., LIN, A. J., SAMUEL, C. E. E SAFINYA, C. R.; **“Cationic Lipid-DNA Complexes for Gene Therapy: Understanding the Relationship Between Complex Structure and Gene Delivery Pathways at the Molecular Level”**. *Current Molecular Chemistry* 11, 133 – 149 (2003).

FARIAS, P. M. A.; SANTOS, B. S., MENEZES, F. D.; FERREIRA, R.; FONTES, A.; CARVALHO, H. F.; ROMÃO, L.; MOURA-NETO, V.; AMARAL, J. C. O. F.; CESAR, C. L., FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; LORENZATO, F. R. B.; **“Quantum dots as fluorescent bio-labels in cancer diagnostic”**. *Phys. Stat. Sol. C* 3 No 11, 4001–4008 (2006).

GAO, X.; CUI, Y.; LEVENSON; R. M.; CHUNG, L. W. K.; NIE, S.; **“In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots”**. *Nature Biotechnology* 22, No. 8, 969-976 (2004).

GIEPMANS, B. N. G.; DEERINCK, T. J.; SMARR, B. L.; JONES, Y. Z.; ELLISMAN, M. H.; **“Correlated light and electron microscopy endogenous protein using Quantum dots”**. *Nature Methods* 2 No 10, 743-749 (2005).

GIRARD, P.; PÉCRÉAUX, J.; LENOIR, G.; FALSON, P.; RIGAUD, JEAN-LOUIS; BASSEREAU, P.; **“A New Method for the Reconstitution of Membrane Proteins into Giant Unilamellar Vesicles”**. *Biophysical Journal* 87 419–429 (2004).

HEZINGER, A.F.E.; TEßMAR, J; GÖPFERICH, A.; **“Polymer coating of quantum dots – A powerful tool toward diagnostics and sensorics”**. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 68, 138–152 (2008).

HUI, S. W.; LANGNER, M.; ZHAO Y. L.; ROSS, P.; HURLEY, E. e CHAN, K.; **“The Role of Helper Lipids in Cationic Liposome-Mediated Gene Transfer”**. *Biophysical Journal* 71, 590-599 (1996).

GAPONIK, N.; TALAPIN, D. V.; ROGACH, A. L.; HOPPE, K.; SHEVCHENKO, E. V.; KORNOWSKI, A.; EYCHMÜLLER, A.; WELLER, H. J.; **“Capping of CdTe Nanocrystals: An Alternative to Organometallic Synthetic Routes”** *J. Phys. Chem. B.* 106, 7177-7185 (2002).

GOPALAKRISHNAN, G.; DANELON, C.; IZEWSKA, P., PRUMMER, M.; BOLINGER, PIERRE-YVES; GEISSBÜHLER, I.; DEMURTAS, D.; DUBOCHET, J.; VOGEL, H.; **“Multifunctional Lipid/Quantum Dot Hybrid Nanocontainers for Controlled Targeting of Live Cells”**. *Angew. Chem. Int.* 45, 5478 –5483 (2006).

HARRIS, J. M.; CHESS, R. B.; **“Effect of Pegylation on Pharmaceuticals”**. *Nature Reviews Drug Discovery* 2, 214-221 (2003).

HINES, M. A., & GUYOT-SIONNEST, P.; **“Synthesis and Characterization of Strongly Luminescing ZnS-Capped CdSe Nanocrystals”**. *J. Phys. Chem.* 100 No 2, 468–471 (1996).

HOSHINO, A.; FUJIOKA, K.; OKU, T.; NAKAMURA, S.; SUGA, M.; YAMAGUCHI, Y.; SUZUKI, K.; YASUHARA, M.; YAMAMOTO, K.; **“Quantum Dots Targeted to the Assigned Organelle in Living Cells”**. *Microbiol. Immunol.* 48 No. 12 985-984 (2004).

HOWARTH, M.; TAKAO, K.; HAYASHI, Y.; TING, A. Y.; **“Targeting quantum dots to surface proteins in living cells with biotin ligase”**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 No 21, 7583–7588 (2005).

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Molecular-Probes.html>

JAISWAL, J. K.; MATOUSSI, H.; MAURO, J. M.; SIMON, S.; **“Long-Term Multiple Color Imaging Of Live Cells Using Quantum Dot Bioconjugates”**. *Nature Biotechnology* 21, 47-51 (2003).

JESORKA, A.; ORWAR, O.; **“Liposomes: Technologies and Analytical Applications”** *Annu. Rev. Anal. Chem.* 1, 801–32 (2008).

KAIRDOLF, B. A.; MANCINI, M. C.; SMITH, A. M.; NIE, S.; **“Minimizing Nonspecific Cellular Binding of Quantum Dots with Hydroxyl-Derivatized Surface Coatings”**. *Anal. Chem.* 80 No 8, 3029–3034 (2008).

KIM, S. J.; WI, H. S.; KIM, K.; LEE, K.; KIM, S. M.; YANG, HO-SOON; PAK, H. K.; **“Encapsulation of CdSe Nanoparticles inside Liposome Suspended in Aqueous Solution”**. *Journal of the Korean Physical Society* 49, S684-S687 (2006).

LAKOWICZ, J. R.; **“Introduction to Fluorescence”**, in Principles of Fluorescence Spectroscopy 3rd Edition, 1-26; Springer Science+Business Media, LLC (2006).

LIDKE, D. S.; NAGY, P.; HEINTZMANN, R.; ARNDT-JOVIN, D. J.; POST, J. N.; GRECCO, H. E.; JARES-ERIJMAN, E. A.; JOVIN, T. M.; **“Quantum dots ligand provide new insight into erbB/HER receptor-mediated signal transduction”**. *Nature Biotechnology* 22 No 2, 198-203 (2004).

LIU, B. R.; HUANG, YUE-WERN; WINIARZ, J. G.; CHIANG, HUEY-JENN; LEE, HAN-JUNG; **“Intracellular delivery of quantum dots mediated by a histidine- and arginine-rich HR9 cell-penetrating peptide through the direct membrane translocation mechanism”** *Biomaterials* 32 3520-3537 (2011).

MANSUR, H. S.; **“Quantum dots and nanocomposites”**. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 2, No 2, 113–129, (2010)

MEDINTZ, I. L.; UYEDA, H. T.; GOLDMAN, E. R.; MATTOUSSI, H.; **“Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing”**. *Nature Materials* 4, 435-446 (2005).

MICHALET, X.; PINAUD, F. F.; BENTOLILA, J. M.; TSAY, J. M.; DOOSE, S.; LI, J. J.; WU, A. M.; BAMBHIR, S. S.; WEISS, S.; **“Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics”**. *Science* 307, 538-544 (2005).

NABIEV, I.; MITCHELL, S.; DAVIES, A.; WILLIAMS, Y.; KELLEHER, D.; MOORE, R.; GUN'KO, Y. K.; BYRNE, S.; RAKOVICH, Y. P.; DONEGAN, J. F.; SUKHANOVA, A.; CONROY, J.; COTTELL, D.; GAPONIK, N.; ROGACH, A.; VOLKOV, Y.; **"Nonfunctionalized Nanocrystals Can Exploit a Cell's Active Transport Machinery Delivering Them to Specific Nuclear and Cytoplasmic Compartments"**. *Nano Letters* 7 No 11, 3452-3461 (2007).

NELSON, D. L., COX, M. M., **"Lipids"** in Lehninger 4th edition, W. H. Freeman, USA, 343-368 (2004).

NELSON, S. R.; ALI, M. Y.; TRYBUS, K. M.; WARSHAW, D. M.; **"Random Walk of Processive, Quantum Dot-Labeled Myosin Va Molecules within the Actin Cortex of COS-7 Cells"**. *Biophysical Journal* 97 509-518 (2009).

NIENHAUS, G. U.; **"The Green Fluorescent Protein: A Key Tool to Study Chemical Processes in Living Cells"**. *Angew. Chem. Int.* 47, 8992-8994 (2008).

RIAZ, M.; **"Liposomes Preparation Methods"**. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 19 No. 1, 65-77 (1996).

ROGACH, A. L.; FRANZL, T., KLAR, T. A.; FELDMANN, J.; GAPONIK, N.; LESNYAK, V.; SHAVEL, A.; EYCHMÜLLER, A.; RAKOVICH, Y. P.; DONEGAN, J. F.; **"Aqueous Synthesis of Thiol-Capped CdTe Nanocrystals: State-of-the-Art"**, *J. Phys. Chem. C* 111, 14628-14637 (2007).

SALICE, P.; ARNBJERG, J.; PEDERSEN, B. W.; TOFTEGAARD, R.; BEVERINA, L.; PAGANI, G. A.; OGILBY, P. R.; **"Photophysics of Squaraine Dyes: Role of Charge-Transfer in Singlet Oxygen Production and Removal"**. *J. Phys. Chem. A* 114, 2518-2525 (2010).

SANCHEZ, S. A.; BAGATOLLI, L. A.; GRATTON, E.; HAZLETT, T. L.; **"A Two-Photon View of an Enzyme at Work: Crotalus atrox Venom PLA2 Interaction with Single-Lipid and Mixed-Lipid Giant Unilamellar Vesicles"**. *Biophysical Journal* 82 2232-2243 (2002).

SANTOS, B. S.; FARIAS, P. M. A.; FONTES, A.; **"Semiconductor Quantum Dots for Biological Applications"** in *Handbook of Self Semiconductor Nanostructures for Novel Devices in Photonics and Electronics*. Elsevier, Oxford, 2008 (editado por Mohamed H.).

SHI, C.; HUANG, X. Y.; DONG, C. Q.; CHEN, H. J.; REN, J. C.; **"Interaction of CdTe/CdS quantum dots with antibodies"**. *Chinese Chemical Letters* 20, 1119-1122 (2009).

SIGOT, V.; ARNDT-JOVIN, D. J.; JOVIN, T. M.; **"Targeted Cellular Delivery of Quantum Dots Loaded on and in Biotinylated Liposomes"**. *Bioconjugate Chem.* 21, 1465-1472 (2010).

SMITH, A. M.; GAO, S. M.; NIE, S.; **"Quantum Dot Nanocrystals for In Vivo Molecular and Cellular Imaging"**. *Photochemistry and Photobiology* 80, 377-385 (2004).

SPERLING, R. A. & PARAK, W. J.; **"Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles"**. *Phil. Trans. R. Soc. A* 368, 1333-1383 (2010).

SRINIVASAN, C.; LEE, J.; PAPADIMITRAKOPOULOS, F.; SILBART, L. K.; ZHAO, M.; BURGESS, D. J.; **"Labeling and Intracellular Tracking of Functionally Active Plasmid DNA with Semiconductor Quantum Dots"**. *Molecular Therapy* 14 No. 2, 192-201 (2006).

SZOKA JR., F.; PAPAHDJOPOULOS, D.; **“Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes)”**. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9 467-508, (1980).

TEKLE, C., DEURS, B. V.; SANDVIG, K.; IVERSEN, TORE-GEIR; **“Cellular Trafficking of Quantum Dot-Ligand Bioconjugates and Their Induction of Changes in Normal Routing of Unconjugated Ligands”**. *Nano letters* 8 No 7, 1858-1865 (2008).

THORNE; R. G. & NICHOLSON, C.; **“In vivo diffusion analysis with quantum dots and dextrans predicts the width of brain extracellular space”** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 No 14, 5567–5572 (2006).

TORCHILIN, V. P.; **“Recent Advances With Liposomes as Pharmaceutical Carriers”**. *Nature Reviews Drug Discovery* 4, 145-160 (2005).

TRESSET, G.; **“The Multiple Faces of Self-assembled Lipidic Systems”**. *PMC Biophysics* 2 No 3, 1-25 (2009).

VALENZUELA, S., **“Liposome techniques for synthesis of biomimetic lipid membranes”** in Ferrari, M; Martin D (eds), *Nanobiotechnology of biomimetic membranes*, Springer, New York, USA, 75-87 (2007).

VEATCH, S. L.; KELLER, S. L.; **“Organization in Lipid Membranes Containing Cholesterol”**. *Physical Review Letters* 89 No. 26, 268101-268104 (2002).

VERMA, A.; STELLACCI, S.; **“Effect of Surface Properties on Nanoparticle–Cell Interactions”**. *Small* 6 No 1, 12–21 (2010).

WALDE, P., Ichikawa, S.; **“Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications”**. *Biomolecular Engineering* 18, 143–177 (2001).

WASUNGU, L.; HOEKSTRA, D.; **“Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes”**. *Journal of Controlled Release* 116, 255–264 (2006).

WILLIAMS, Y.; SUKHANOVA, A.; NOWOSTAWSKA, M.; DAVIES, A. M.; MITCHELL, S.; OLEINIKOV, V.; GUN'KO, Y.; NABIEV, I.; KELLEHER, D.; VOLKOV, Y.; **“Probing Cell-Type-Specific Intracellular Nanoscale Barriers Using Size-Tuned Quantum Dots”**. *Small* 5, No. 22, 2581–2588 (2009).

WOLCOTT, A.; GERION, D.; VISCONTE, M.; SUN, J.; SCHWARTZBERG, A.; CHEN, S.; ZHANG, J. Z.; **“Silica-Coated CdTe Quantum Dots Functionalized with Thiols for Bioconjugation to IgG Proteins”** *J. Phys. Chem. B* 110 No 11, 5779–5789 (2006).

WU, X.; LIU, H.; LIU, J.; HALEY, K. N.; TREADWAY, J. A.; LARSON, J. P.; GE, N.; PEALE, F.; BRUCHEZ, M. P.; **“Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots”**. *Nature Biotechnology* 21, 41-46 (2003).

YANG, C., DING, N.; XU, Y.; QU, X.; ZHANG, J.; ZHAO, C.; HONG, L.; LU, Y.; XIANG, G.; **“Folate receptor-targeted quantum dot liposomes as fluorescence probes”**. *Journal of Drug Targeting* 17 No.7, 502–511 (2009).

YEZHELYEV, M. V.; QI, L.; O'REGAN, R. M.; NIE, S.; GAO, X.; **"Proton-Sponge Coated Quantum Dots for siRNA Delivery and Intracellular Imaging"**. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 9006–9012 (2008).

ZHANG, L. W. E MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; **"Mechanisms of Quantum Dot Nanoparticle Cellular Uptake"**. *TOXICOLOGICAL SCIENCES* 110 No (1), 138–155 (2009).

ZHANG, S., LI, J., LYKOTRAFITIS, G., BAO, G. E SURESH, S.; **"Size-Dependent Endocytosis of Nanoparticles"**. *Adv. Mater.* 21, 419–424 (2009).

## **CAPÍTULO III**

### 3. OBJETIVOS:

Os objetivos gerais deste trabalho foram estudar a interação inespecífica de QDs a células sanguíneas mononucleares humanas (PBMCs) e aplicá-los como uma ferramenta para investigação de células sangüíneas através de citometria e o desenvolvimento de um método de entrega intracelular de QDs em células vivas através de lipossomas. Como objetivos específicos:

1. Síntese e caracterização de QDs de CdTe/CdS produzidos diretamente em água;
2. Estudo da interação não específica de QDs de CdTe/CdS-AMP com células sanguíneas mononucleares e seus efeitos;
3. Aplicação de QDs como sondas fluorescentes para investigação de células sangüíneas por citometria
4. Preparação e caracterização de lipossomas de diferentes composições químicas;
5. Encapsulação de QDs nos lipossomas;
6. Interação dos QDs encapsulados em lipossomas com células vivas (células-tronco humanas).

## **CAPÍTULO IV**

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

Rafael B. Lira<sup>#1</sup>, Antonio T. de Sales Neto<sup>#2</sup>, Kilmara H. G. Carvalho<sup>2</sup>, Elisa S. Leite<sup>3</sup>, Aluizio G. Brasil Jr.<sup>2</sup>, Denise P. L. Azevedo<sup>2</sup>, Paulo E. Cabral Filho<sup>1</sup>, Mariana B. Cavalcanti<sup>4</sup>, Ademir J. Amaral<sup>4</sup>, Patrícia M. A. Farias<sup>1</sup>, Beate S. Santos<sup>2</sup>, Adriana Fontes<sup>1\*</sup>

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

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

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

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

<sup>#</sup> these authors contributed equally to this work

## ABSTRACT

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

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

## 1. INTRODUCTION:

Fluorescence is a powerful technique to study biological events. The high sensitivity of fluorescence, combined with advances in analytical techniques, permits the detection of ultra small quantities (even a single molecule) of species present in the biological systems<sup>1,2</sup>. Usually, the precise location of intracellular components is done by using fluorophores that can target specific molecules presented in cells. Dyes and fluorescent proteins have been used as fluorophores, however they present one or more of the following disadvantages: lack of brightness, broad emission bands, high photobleaching rate and high cytotoxicity<sup>2</sup>. Semiconductor quantum dots (QDs) are a promising class of fluorescent probes that can be conjugated to a variety of cell antibodies for specific recognition and labeling of biological systems<sup>3</sup>. Compared to organic fluorophores, QDs have an exceptional resistance to photodegradation, narrower emission spectrum with high quantum yield, broader absorption bands, larger effective Stokes shifts and

---

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

higher absorption coefficients<sup>2-4</sup>. Classically, synthetic routes to produce QDs are not performed in aqueous media. Although high quality QDs are obtained by this approach, they cannot be applied directly in biological buffers<sup>3-4</sup>. For this reason, simple, cheap and reproducible routes of QDs's syntheses in aqueous media are the main goal of many research groups that work in this field. QDs have been widely applied for fluorescence microscopy, but they have not been much explored as a potential tool for flow cytometry. Fluorescence microscopy and flow cytometry are complementary techniques, while fluorescence microscopy can provide a morphological image of a few samples, flow cytometry is a powerful technique to detect and quantify a biological event in a large number of cells.

Moreover, according to the International Society of Blood Transfusion there are 308 known antigens, 270 of them are inscribed in 30 blood group systems<sup>5</sup>. The process to identify the blood type is called fenotyping and is based on the induced agglutination of red blood cells using antibodies, Anti-A or Anti-B. However, there are still some major problems due to the great variety of antigens found in the blood membrane, such as: (1) Different blood sub-groups (A<sup>+</sup>, A<sup>2+</sup>, A<sup>3</sup>B<sup>+</sup>, ...), (2) Immune-non-compatibility in transfusions causing unexpected blood agglutination and (3) Problems are even greater in organ transplants. In this way, alternative methodologies are still being pursued for the determination of the antigen expression<sup>6</sup>. On the other hand, lymphocytes are also important cells of the blood system and can be used as a bio-dosimeter for analyzing and measuring the consequences of exposures of ionizing radiation<sup>7</sup>.

In this work, we demonstrate the ability of CdS/Cd(OH)<sub>2</sub> and CdTe/CdS QDs for flow cell cytometry analysis. We have synthesized biocompatible water soluble QDs and applied them as fluorescent labels of hematologic cells. We covered CdS/Cd(OH)<sub>2</sub> QDs with antibody A to label specifically type A red blood cell (RBC) membrane using the antigen-antibody interaction. We applied CdTe/CdS QDs as biolabels of human lymphocytes and compared the results obtained for lymphocytes treated and non-treated with permeabilizing agents for cell membranes. The results obtained for RBCs showed that QDs were successfully functionalized with antibody A. On the other hand, permeabilized lymphocytes presented higher fluorescence pattern than non permeabilized ones, demonstrating an alternative methodology to deliver nanoparticles to intracellular media for cells that do not perform internalizations process. Our experiments show that QDs can be conjugated to a variety of specific cell antibodies and can become a potential, highly efficient and low cost diagnostic tool for flow cell cytometry, very compatible with the lasers and filters used in this kind of equipment.

## 2. EXPERIMENTAL DETAILS:

For CdS/Cd(OH)<sub>2</sub> QDs synthesis<sup>8</sup>, cadmium perchlorate (0.01M, Aldrich) was added to a sodium polyphosphate [NaPO<sub>3</sub>]<sub>9</sub> solution (0.0051g/mL, Aldrich) and the pH of the system was increased to 8.5. After that, 750 μL of H<sub>2</sub>S was introduced by a gas syringe, maintaining a Cd:S:Polyphosphate 1:1:1.6 ratio. The solution was vigorously mixed for 10 min. To passivate de CdS core with a Cd(OH)<sub>2</sub> shell, the solution pH was elevated to 10.5 and 0.1M Cd(ClO)<sub>4</sub> solution was added dropwise until a steady green fluorescence was obtained. CdTe/CdS core/shell nanoparticles was synthesized by mixing a solution of cadmium perchlorate and mercaptopropionic acid (MPA) at pH=10.3. The system was maintained under argon atmosphere and Te<sup>-2</sup> ions (obtained by the controlled reduction of Te with sodium borohydride) were added and the system refluxed at 95-100°C. The Cd:Te:MPA molar ration used was 2:1:2. The optical properties of the colloidal nanocrystals suspensions were obtained by electronic absorption, emission and excitation spectroscopy. The QDs structural properties were obtained by X-ray diffraction and transmission electron microscopy (TEM). We estimate a QD concentration of 10<sup>13</sup> and 10<sup>16</sup> particles/mL for CdS/Cd(OH)<sub>2</sub> and CdTe/CdS respectively. Synthesis of CdTe/CdS using MPA was chosen because this suspension is more stable under physiological pH compared to others mercaptoacids such mercaptoacetic acid and cysteine.

RBCs were obtained from Hematology and Hemotherapy Center of Pernambuco (HEMOPE). Cell concentration was diluted to a 5% cellular suspension in 0.9% NaCl. Human lymphocytes were obtained from PBMCs (peripheral blood mononuclear cells), 10 mL of whole blood sample was taken and PBMCs were separated from whole sample using Ficoll Paque (1.077 g/mL) gradient density. The cells were re-suspended at 1x10<sup>6</sup> cells/mL in RPMI medium supplemented with 10% fetal calf serum.

For incubation of the RBCs with CdS/Cd(OH)<sub>2</sub> bioconjugated to antibody A (AntiA), a 16.7 μM QDs suspension was incubated with glutaraldehyde (glut) at 0.1% (v/v). The antibody solution (Ab) (DiaMed, Lagoa Santa, MG, Brazil) was added to QD-glut and incubated overnight at room temperature forming a QD-Anti-A complex<sup>5</sup>. The proportion of QD:Ab (v/v) was chosen to be 100:1 and 20:1. For cellular incubation, a 250 μL of cells was incubated

with 250  $\mu\text{L}$  of QD-AntiA for 30 minutes at 37°C. Cells were washed three times in a PBS solution (pH 7.4) at 700g for 30 s. The QD-AntiA complex is able to bind superficial A antigens in RBCs.

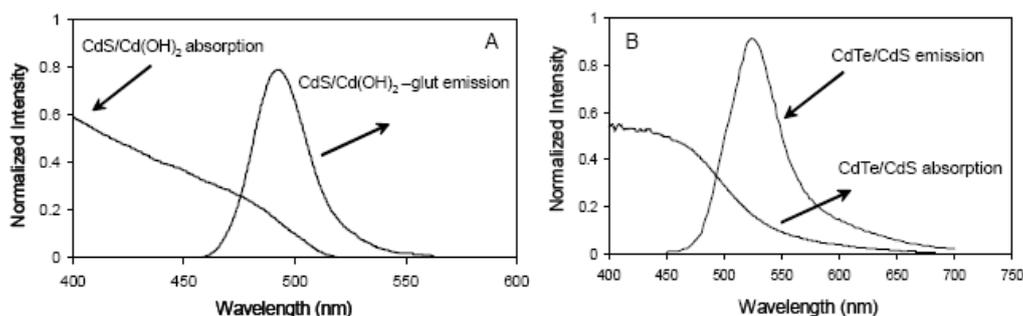
For CdTe/CdS-MPA cellular incubation, the nanoparticle suspension pH was reduced to physiological values (7.2-7.4) using HCl. We used 8.3  $\mu\text{M}$ , 1.66  $\mu\text{M}$  and 0.83  $\mu\text{M}$  of CdTe for 30 min of incubation time in a 5%  $\text{CO}_2$ /air humidified atmosphere at 37°C. Cells were washed three times in PBS (pH 7.4) and re-suspended in RPMI medium. For permeabilized cells, PBMCs were re-suspended in 4% paraformaldehyde-diluted FACS lysing solution (Becton Dickinson's, San Jose, CA, USA) and incubated for 10 min at 18-22°C. After, cells were washed two times in Tween-20 PBS solution (0.5% Tween-20 in PBS) at 400g for 5 min following a protocol already described<sup>6</sup>.

Stained cells were analyzed using flow cytometry (FACScan flow cytometer - Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) equipped with a 15 mW argon-ion laser (excitation wavelength 488 nm) and the fluorescence emission was detected in FL1 channel (green channel) by plotting FL1 versus FL2 (orange channel). Control cells (RBCs, normal and permeabilized lymphocytes) were employed to define the region of interest (gate) for lymphocytes or RBCs in the detection system. Each analysis included 10,000 events.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION:

Figure 1 shows the absorption and emission spectra for CdS/Cd(OH)<sub>2</sub> and CdTe/CdS-MPA QDs. After, glutaraldehyde functionalization, a small reduction in intensity was observed (Fig 1 A). Emission spectra were obtained using 365 nm excitation wavelength. For CdS/Cd(OH)<sub>2</sub> the maximum emission is in 490 nm and for CdTe/CdS in 540 nm. CdTe/CdS QDs have a higher fluorescence than CdS/Cd(OH)<sub>2</sub>. From structural analyses (data not shown), the resulting nanoparticles size is about 8 nm for CdS/Cd(OH)<sub>2</sub> and 3 nm for CdTe/CdS-MPA QDs.

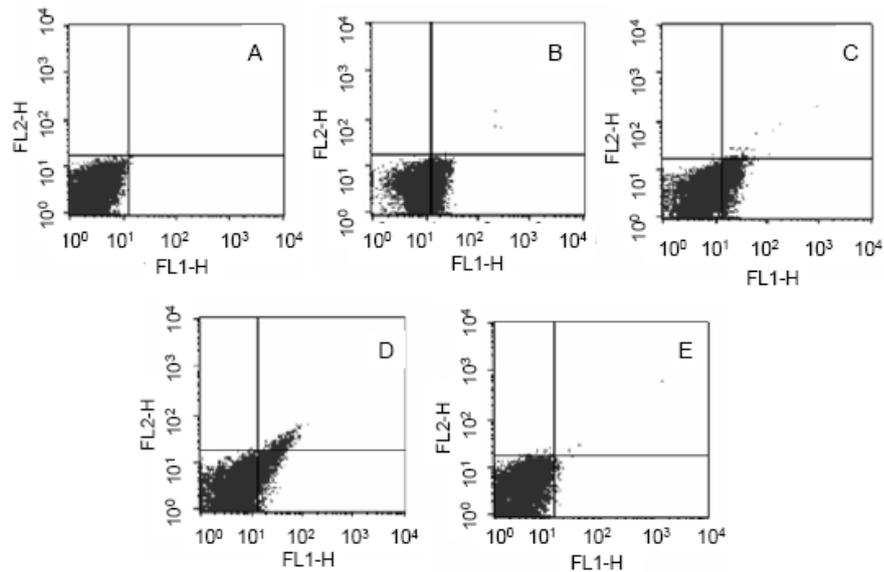
Figure 2 shows flow cytometry dot plots for QDs labeling erythrocytes. Figure 2A shows non labeled cells. Figures 2 C (100:1) and 2 D (20:1) show specific cell labeling profile of complex CdS/Cd(OH)<sub>2</sub>-AntiA cells in two different QDs:antibody proportions (detected in FL1 channel). Figure B shows glutaraldehyde non-specifically labeled RBCs. Figure E shows O RBCs incubated with CdS/Cd(OH)<sub>2</sub>-Anti A as control, since O erythrocytes do not present A antigen in cell membrane. As expected, O RBCs were not labeled, shown that the bioconjugation of QDs to Anti A was done effectively. C and D plots display a significant number of specific QDs labeled-cells in FL1 channel (28.4% for 100:1 and 19.30% for 20:1) compared to control groups (E – 99.2% do not present fluorescence). Probably, by raising the percentage of A RBCs labeled with QDs, we will have to increase the proportion of QDs-Anti A to each RBC. These data corroborate the results obtained by some of us in a previous work where the specific cellular labeling was analyzed using fluorescence microscopy<sup>8</sup>. However, in contrast to those results, using flow cytometry, we were able to analyze a huge number of cells simultaneously, which is important for blood analysis in Hematology and Hemotherapy centers. We do not detect significant differences between 100:1 and 20:1 proportions. These experiments were done at least 3 times to confirm the results.



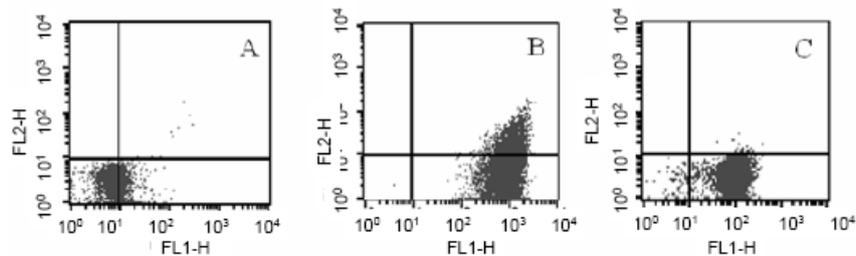
**Figure 1** – A) CdS/Cd(OH)<sub>2</sub> absorption and emission spectra (with glutaraldehyde) and B) CdTe/CdS-MPA absorption and emission spectra. Emission spectra were obtained using 365 nm excitation wavelength.

For demonstrating an alternative methodology to delivery QDs to intracellular media, we developed a method to artificially permeabilize lymphocytes cells for QDs staining. Figure 3 shows CdTe/CdS-MPA labeled-lymphocytes

cells: A, represent normal cells incubated with 1,66  $\mu\text{M}$ , while B, are permeabilized cells incubated with the same concentration as normal ones and C, show permeabilized cells incubated with 0,83  $\mu\text{M}$  of CdTe/CdS-MPA. The percentage of labeled cells increased from  $\sim 30\%$  (non permeabilized) to  $\sim 100\%$  (permeabilized) with enhancement of cellular fluorescence intensity. Using the parameters described here, non-labeled normal cells did not show fluorescence. These results are similar to the ones obtained with mercaptoacetic-capped CdTe QDs labeled lymphocytes (not shown). Further, microscopic analyses display a homogeneous distribution of nanoparticles for the whole cells (not shown). Our results pointed for different labeled patterns for permeabilized and non permeabilized cells. Based on differences in percentage and intensity presented in the dot plots (as well as using fluorescence microscopy), we concluded that CdTe/CdS-MPA QDs label membranes for lymphocytes non permeabilized (MPA as well glutaraldehyde target proteins) and label whole cells for permeabilized lymphocytes. Permeabilization allows delivery to intracellular media for all kind of QDs (and possibly other nanoparticles), mainly for cells that do not perform endocytosis.



**Figure 2** – Dot plots of labeled RBCs. A: non labeled cells, B: glutaraldehyde non-specifically labeled RBCs, C and D: cells respectively labeled with QD-Anti-A (100:1) and (20:1), E: are O RBCs type used as the control.



**Figure 3** - Dot plots for CdTe/CdS-MPA-labeled lymphocytes. A, normal cells labeled with 1,66  $\mu\text{M}$ ; B, permeabilized cells labeled with 1,66  $\mu\text{M}$  and C, permeabilized cells labeled with 0,83  $\mu\text{M}$  QDs suspension. Control cells (non labeled) did not show fluorescence in these parameters.

#### 4. CONCLUSION:

Applications of QDs nanocrystals in biological labeling are becoming very popular due to their appealing optical characteristics, such as large absorption, narrow emission spectra and high chemical and photostability<sup>2,4</sup>. We have developed a method for specific RBCs recognition using CdS/Cd(OH)<sub>2</sub>-AntiA and a method for delivery CdTe/CdS

QDs in intracellular media for lymphocytes cells. The obtained QDs present high emission intensity, colloidal stability and are intrinsically water soluble, allowing direct application in biological systems. Our method shows that QDs can be conjugated to a variety of specific cell antibodies and can become a potential, highly efficient and low cost diagnostic tool for flow cell cytometry, very compatible with the lasers and filters used in this kind of equipments, demonstrating the viability of the method to study biological events and diagnosis taking advantages of its whole capabilities, can offer long term imaging and multispectral detection overcoming tissue auto fluorescence and other limiting properties inherent of conventional probes.

**ACKNOWLEDGEMENTS:** The authors are grateful to CAPES, CNPq, FACEPE, L'ÓREAL, Brazilian Academy of Sciences, UNESCO, Philips and HEMOPE. This work is also linked with the National Institute of Photonics (INFO). The authors are also grateful to Professor Valeria Pereira from Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (FIOCRUZ) for the flow cytometry measurements.

## 5. REFERENCES:

- [1] Michalet, X., Weiss, S., Jäger, M., "Single-Molecule Fluorescence Studies of Protein Folding and Conformational Dynamics," *Chem. Rev.* 106, 1785-1813 (2006).
- [2] Santos, B. S., P. M. A., Farias, Fontes, A., "Semiconductor Quantum Dots for Biological Applications" in [Handbook of Self Assembled Semiconductor Nanostructures for Novel Devices in Photonics and Electronics], edited by Mohamed Henini, Elsevier, Kidlington, 773-798 (2008).
- [3] Chan, W. C. W., Nie, S., "Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive noisotopic detection," *Science* 281, 2016-2018 (1998).
- [4] Medintz, I. L., Uyeda, H. T., Goldman, E. R., and Matoussi, H., "Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing," *Nature Materials* 4, 435-446 (2005).
- [5] Daniels, G. L., Castilho, L., Flegel, W. A., Fletcher, A., Garratty, G., Levene, C., et al. "International society of blood transfusion committee on terminology for red blood cell surface antigens: macao report", *Vox Sang.* 96, 153-156 (2009).
- [6] Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pober, J. S., [Imunologia Celular e Molecular], Elsevier, Rio de Janeiro, 580 (2005).
- [7] Cavalcanti, M. B., Amaral, A. J., Fernandes, T. S., Melo, J. O. and Machado, C. G. F., "p53 Protein Expression Levels as Bioindicator of Individual Exposure to Ionizing Radiation by flow cytometry," *Molecular and Cellular Biochemistry* 308, 127-131 (2008).
- [8] Farias, P. M. A., Santos, B. S., Menezes, F. D., Ferreira, R. C., Barjas-Castro, M. L., Castro, V., Lima, P. R. M., Fontes, A. and Cesar, C. L., "Core-shell CdS/Cd(OH)<sub>2</sub> quantum dots: synthesis and bioconjugation to target red cells antigens," *Journal of microscopy* 219 (3), 103-108 (2005).

## **CAPÍTULO V**

Dear Professor Adriana Fontes,

Your submission entitled "NON-SPECIFIC INTERACTIONS OF CdTe/CdS QUANTUM DOTS WITH HUMAN MONONUCLEAR CELL" has been received by Micron

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/jmic/>.

Your username is: adrianaf

If you need to retrieve password details, please go to:

[http://ees.elsevier.com/jmic/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/jmic/automail_query.asp)

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System

Micron

For further assistance, please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

## NON-SPECIFIC INTERACTIONS OF CdTe/CdS QUANTUM DOTS WITH HUMAN MONONUCLEAR CELL

Rafael B. Lira<sup>a</sup>, Mariana B. Cavalcanti<sup>b</sup>, Maria A. B. L. Seabra<sup>c</sup>, Diego C. N. Silva<sup>a</sup>, Ademir J. Amaral<sup>b</sup>, Beate S. Santos<sup>c</sup>, Adriana Fontes<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Departamento de Biofísica e Radiobiologia – Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife – Brazil*

<sup>b</sup> *Departamento de Energia Nuclear - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife – Brazil*

<sup>c</sup> *Departamento de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife – Brazil*

\*corresponding author: Adriana Fontes – Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil, 50670-901, +55 (81) 21267818, e-mail: adriana.fontes@pesquisador.cnpq.br

**Highlights:** > Optical techniques to study non-specific QDs interactions. > Plasma membrane was labeled by QDs in live cells. > Intracellular staining in permeabilized cells > QD changed zeta potential of live cells.

### ABSTRACT

In order to study biological events, researchers commonly use fluorescence-based methods. These techniques generally are based on fluorescent probes, commonly small organic molecules or fluorescent proteins. However, these probes present some drawbacks, limiting detection. The development of quantum confined semiconductor nanocrystals - Quantum Dots (QDs) - has emerged as an alternative to conventional fluorescent dyes in biological detection due to its topping properties – large absorption cross section, high brightness and photostability. Some questions have emerged about the use of QDs in biological applications. Here, we use optical techniques to study non-specific interactions of aqueous synthesized QDs with peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). By fluorescence microscopy we observed that bare QDs stain cell membrane in live cells and also stain intracellular compartments in artificially permeabilized cells, indicating that non-specific labeling of substructures inside the cells must be considered when investigating an internal target by specific conjugation. Since fluorescence microscopy and flow cytometry are complementary techniques (fluorescence microscopy provides a morphological image of a few samples and flow cytometry is a powerful technique to quantify biological events in a large number of cells), in this work we also used flow cytometry to investigate non-specific labeling. Moreover, by using optical tweezers, we observed that QDs incubation changed zeta potential in live cells to a less negative value, which might indicate some adverse effects to the cell membrane.

**Key-words:** Quantum Dots; Fluorescence; Flow Cytometry; Non-specific interaction; Zeta Potential

## 1. INTRODUCTION

One of the most fundamental goals in Biology is the understanding of how biomolecules interact with each other in many levels, from cells to whole organisms [Michalet et. al., 2006]. In order to get a better comprehension of these interactions, researchers commonly use fluorescence-based techniques mainly because of some of its properties, such as high specificity and sensitivity even for single molecule detection [Michalet et. al., 2006; Giepmans et. al., 2006]. The evolution of tools based on fluorescence, including new techniques (such as multiphoton microscopy), new lasers and also new fluorescent probes, is allowing us to take advantages of the full potential of fluorescence. In fact, the high specificity of fluorescence is intrinsically linked to fluorescent probes. However, more conventional fluorophores, the organic dyes, present some or more limitations, such as narrow absorption and broad emission spectra with short stokes shift and principally poor photostability [Tsien et. al., 2006; Michalet et. al., 2005; Genger et. al., 2008].

Semiconductor nanocrystals, also known as Quantum Dots (QDs), are becoming extensively used in biological and biomedical field due to their intrinsically biocompatibility and topping optical properties [Michalet et. al., 2005; Genger et. al., 2008], including a broad absorption band (permitting a flexible cross section for multiphoton microscopy), size tunable emission wavelength (fluorescence color depends on the size of QDs), an active surface for molecular conjugation and high resistance to photobleaching (the major QDs' property) [Larson et. al., 2003; Sperling and Parak, 2010]. In general, water based QDs have been successfully used as fluorescent labels for imaging live cells and small animals, in immunoassays [Tian et. al., 2010], in the development of diagnostic methodologies [Yezhelyev et. al., 2006] and also for photodynamic therapy [Samia et. al. 2006].

In all these applications, QDs conjugated to proteins or antibodies play important roles, because they are inorganic-biological hybrids nanoparticles that combine characteristics of both materials, that is: the fluorescence properties of QDs with the biochemical functions of the proteins and antibodies. However, an incomplete conjugation may result in residual non-conjugated QDs in the same colloidal suspension which can bind or interact non-specifically with the biological system (mainly by the carboxyl groups presented in their surface due to stabilizing agents, such as thioglycolic acid or 3-mercaptopropionic acid, used in water dispersion QDs synthesis) and interfere in the desired results for the original application [Smith and Giorgio, 2010].

In this way, despite the successfully described biological applications of QDs, some drawbacks still exist. Synthesis of high quality water dispersed QDs, stability in aqueous media, biocompatibility, narrow size distribution and (only) specific interactions with target molecules are characteristically hard tasks to be achieved all together and now are part of a special topic of

research in the field of QDs biological applications. Moreover, little is still known about the mechanisms of QDs interactions with biological systems and how this can affect cellular functions. As well as in other classes of nanoparticles, cellular uptake of QDs is dependent of the surface coating and the cell type [Kelf et. al., 2010] and adverse effects is generally related to cell uptake capacity [Chang et. al., 2010]. Further, once internalized they can be released from endocytic vesicles and access nuclear structures, binding strongly histone proteins [Nabiev et. al., 2007]. In order to gain insights about possible risks associated with non-specific staining, it is very important to evaluate the capacity of nanoparticle interaction with cells.

In this work we present studies on non-specific interactions of water dispersed carboxyl-coated CdTe/CdS QDs with live and permeabilized human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using different optical techniques. PBMCs are good models to study non-specific interactions with cell membrane because they, in general, do not perform active internalization, such as endocytosis. This is important since unspecific interaction to these cells does not depend on the QD uptake.

Fluorescence microscopy is broadly applied to confirm morphological localization of a fluorescent probe that can be or not labeling a specific cell structure. Although it represents a powerful tool to investigate biological processes it usually lacks statistical measurements for the studied phenomenon. Moreover, QDs have been widely applied for fluorescence microscopy, but they have not been much explored as a potential tool for flow cytometry. So, in the present study we also performed a more quantitative investigation of the QDs-cell labeling by using not only fluorescence microscopy but also flow cytometry analysis. Fluorescence microscopy and flow cytometry are complementary techniques, since while fluorescence microscopy provides a morphological image of a few samples, flow cytometry is a powerful technique to detect and quantify a biological event in a large number of cells.

Lastly, we investigate effects of QDs in the membrane electrical charges of these cells through zeta potential measurements performed in an optical tweezers system [Fontes et. al., 2008], proposing that this kind of measurements could be a new and complementary way to analyze cell adverse effects caused due to QDs incubation.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### ***2.1 QDs Synthesis and Characterization***

Water colloidal dispersions of CdTe/CdS core/shell QDs were synthesized according to an adaptation of a previously reported method [Gaponik et. al., 2008]. Briefly, QDs were prepared by

the addition of  $\text{Te}^{2-}$  solution in a  $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$  0.01 M solution of pH above 10 in the presence of MPA (3-mercaptopropionic acid) (Sigma Aldrich) as the stabilizing agent in a 2:1:5.7 proportion of Cd:Te:MPA (molar ratio). The reaction proceeds under constant stirring for 7 hours in argon (White Martins) refluxing at 90 °C. The  $\text{Te}^{2-}$  solution was prepared using metallic tellurium (Sigma Aldrich) and  $\text{NaBH}_4$  (Sigma Aldrich), under argon saturated inert atmosphere. QDs optical characterizations were done by absorption and emission spectroscopy (using respectively Ocean Optics HR4000 and ISS K2 equipments). While, QDs structural characterizations were done by X-ray diffraction (Siemens Nixford D5000).

## **2.2 Mononuclear Cell Separation and Incubation with QDs**

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained accordingly to a previous report [Cavalcanti et. al., 2008]. These cells were chosen because this sample is mainly comprised of lymphocyte cells, which are not very active in performing endocytosis. Briefly, PBMCs were isolated by centrifugation (at 400 g for 35 min) using Ficoll Paque Plus (GE Healthcare, USA). PBMCs were washed twice in phosphate-buffered saline solution (PBS 0.1M, pH 7.2 - 7.4) and resuspended at  $1 \times 10^6$  cells/mL in RPMI medium. Before cell incubation, the pH of the QDs dispersion was adjusted to physiological values (pH 7 – 7.4).

In order to study QDs non-specifically interactions to live cells, we incubated live PBMCs ( $1 \times 10^6$ /mL) to different QDs concentrations (2.4  $\mu\text{M}$  and 4.8  $\mu\text{M}$ ) in serum free RPMI medium for 30 minutes in a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere at 37°C. After incubation, samples were washed three times with PBS buffer and resuspended in fresh serum-free RPMI medium. For optical trapping measurements, the same protocol was carried out except that cells were resuspended in compatible blood serum for both control cells (without QDs) and with 2.4  $\mu\text{M}$  QD concentration with cells.

For cellular permeabilization, PBMCs were resuspended in permeabilizing solution and incubated for 10 min at room temperature. After this step, cells were washed twice using Tween-20 PBS solution (0.5% Tween-20 in PBS) and centrifugated at 400 g for 5 minutes.

## **2.3 Optical Tools Applied for QDs-Cell Interactions**

Live and permeabilized cells were analyzed by fluorescence microscopy (Leica DMI4000B or a Leica SP11-AOBS confocal microscope) and also by flow cell cytometry (FACScalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). For confocal and cell cytometry analyses the QDs fluorescence excitation was performed by an argon laser (wavelength 488 nm). In cytometry experiments, the emission was detected in FL1-H channel (green emission channel). Each analysis included 10,000

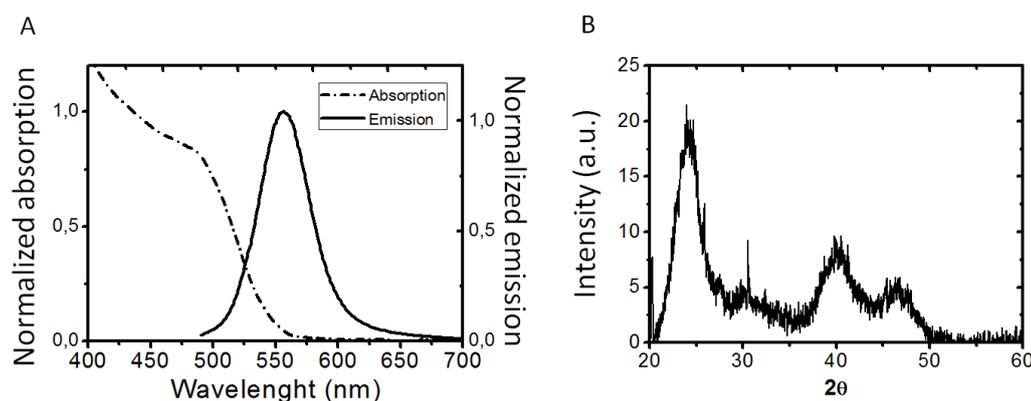
events. Control cells (live and permeabilized) were used to define the region for cell gate in the detection system by computational analysis of cells staining label, using Cell Quest software version 3.1 (Becton Dickinson immunocytometry systems, San Jose, CA, USA).

Membrane electrical charges on live PBMCs with or without (control cells) QDs incubation were analyzed by zeta potential measurements in an optical tweezers system. The optical tweezers system used consisted of a laser beam in the near infrared ( $\lambda = 1064 \text{ nm}$  – IPG Photonics) focused on the microscope (Axiolab – Carl Zeiss) through an objective of 100x. The microscope is equipped with motorized stage (Prior Scientific) and with a real time image capture system integrated to a computer. The zeta potential measurements were done accordingly to methodology described in a previous report [Fontes et. al., 2008], in which PBMCs were submitted to different applied voltages (30, 40, 50, 60, 70 and 80 V) and the optical trap was used to recapture the cell after each voltage. The terminal velocity was measured for each applied voltage and by using the Smoluchowski equation, the zeta potential was obtained (at least 10 cells were measured by group, with and without QDs).

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 QDs Synthesis and Characterization

Highly fluorescent CdTe/CdS QDs were produced in water by a simple preparation method. Figure 1 shows the normalized absorption and emission spectra of CdTe/CdS-MPA QDs after 7 hours of refluxing time. QDs suspension shows a bright green fluorescence emission with maximum at 555 nm and full width at half maximum (FWHM) of 49 nm.



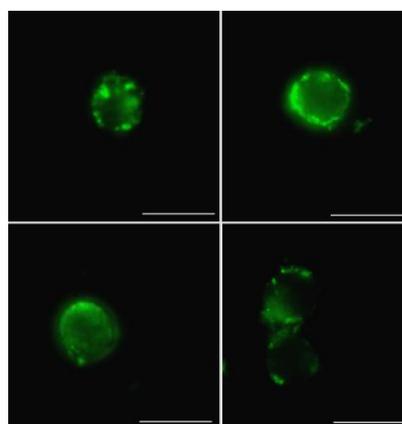
**Figure 1.** A. Absorption and emission spectra of typical nanocrystals of CdTe/CdS-MPA (excitation at 365 nm) and B. CdTe/CdS-MPA X-Ray diffraction.

Based on the first absorption peak position (479 nm), we estimated the average QDs' diameter ( $d$ ) as 2.2 nm using Rogach's sizing curve [Rogach et. al., 2007]. From the average size and based on QD's first absorption peak, we estimated that the original QD's concentration by using

Peng's equation [Yu et. al., 2003] as 48  $\mu\text{M}$ . The QDs structural characterization performed by X-Ray diffraction powder (Figure 1B) confirms the same size range ( $d = 2.6 \text{ nm}$ ) by applying Scherrer's equation.

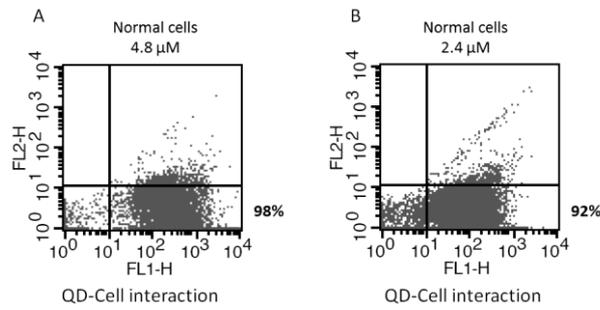
### 3.2 Live PBMCs Cells QDs Interaction

Figure 2 shows typical fluorescence microscopy image frames of live PBMC cells. The diffuse spotted-like pattern suggests that bare CdTe-MPA QDs interact non-specifically to live PBMC cells' membrane for the higher concentration used. Other information that supports this observation is that PBMCs, in general, do not perform active internalization such as endocytosis. We also observe some agglomerates of QDs on the cell surface and in the medium. The QD-cell interaction may be the result of the adsorption (electrostatic and hydrophilic/hydrophobic interactions) between chemical groups in the cell membrane and carboxyl groups on the QD surface.



**Figure 2.** Non-specific cell interaction of non-conjugated QDs to live PBMC cells. These figures represent a frame of common profiles of non-specific labeling of QDs in cells. Bars: 12  $\mu\text{m}$ .

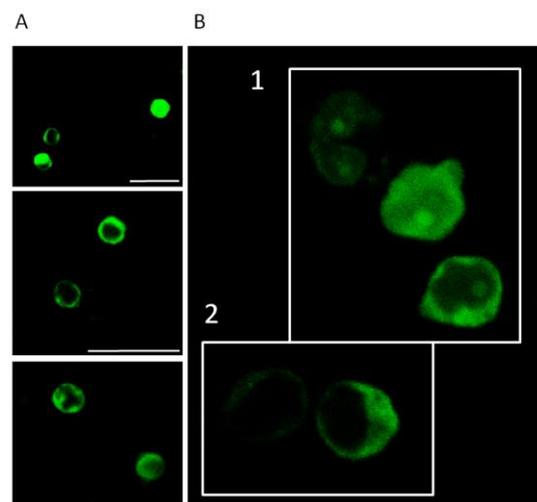
For a more quantitative analysis, we performed flow cytometry of the incubated cells. Figure 3 shows dot plots for PBMC cells incubated in conditions similar to those from Figure 2. Figures 3A and 3B show that the spots (individual cells) are shifted to the right side, confirming quantitatively that more than 90% of the cells are labeled by CdTe/CdS-MPA at both QDs' concentrations. Wide distribution of cells in the dot plots (horizontal FL1-H – green channel) means that individual cells are differentially labeled by the particles in the whole cell population as observed by microscopic images, a common feature for non-specific interactions.



**Figure 3.** Dot plots for non-specific cellular labeling of QDs in living cells. The percentage indicates the amount of labeled cells in the concentration used. The analyses show that more than 90% of cells are labeled regardless the two concentrations used.

In order to see more clearly changes in the cell labeling pattern and to better understand non-specific cell interaction, we permeabilized the cells allowing the QDs to cross the plasma membrane. If they were able to enter the cell, we would be able to observe fluorescence throughout the cell rather than only at the surface. Permeabilizing artificially cells can also be an alternative methodology to stain intracellular structures with nanoparticles, mainly in cells which do not perform active internalization processes.

In fact, Figure 4 shows that after cellular permeabilization the fluorescence profile shows a different staining pattern compared to Figure 2, suggesting that QDs entered the cell interior almost homogeneously and even interacted with intracellular structures. In some cells it is possible to observe a concentration of QDs in the cytoplasm only, but in other cells it is also possible to see that there are nanoparticles even inside the nucleus (Figure 4B). These cellular barriers (cytoplasmic and nuclear membrane) after the treatment define the final localization of the QDs, which might be a result of inefficient permeabilization of nuclear membrane in some cells or the ability of this membrane in allowing QD crossing among different cells in the whole population (as in the case of different cell lines) [Williams, 2009], or even a combination of both mechanisms.

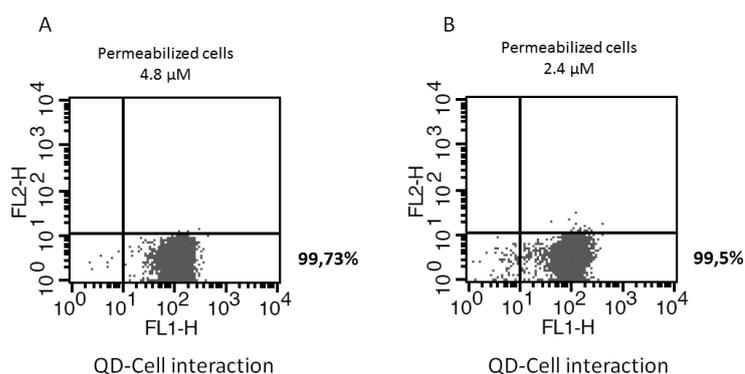


**Figure 4.** Interaction of QDs with intracellular structures in permeabilized PBMCs. After permeabilizing treatment, QDs are able to enter the cells, as shown in typical fluorescence image frames in A. In B, QDs can

interact with cytoplasmic (square 2) or even nuclear/nucleolar structures (square 1). Bars in A = 25  $\mu\text{m}$ ; Bar in B = 12  $\mu\text{m}$ .

In more detailed observations one can note that, once QDs cross nuclear membrane they present a high affinity interaction to nuclear structures such as cell nucleolus. Figure 4B shows representative confocal fluorescence images of nuclear/nucleolar labeling of QDs after nuclear membrane crossing (square 2). In contrast, QDs which did not cross this membrane are located only inside the cell cytosol (square 1). In general, a great number of cells from different experiments displayed nuclear/nucleolar staining. By analyzing the images, we consider that once inside the cells, QDs always interact with intracellular structures, since they can access the cytosol, which is clearly observed for the nucleoli (after reaching the nucleus). In fact, it has been reported that carboxylate coated QDs strongly interact with histone proteins in nucleus (or in free cell conditions) [Conroy et. al., 2008], but it is not known yet why and where they interact with structures in the cytosol. As a consequence, non-specific interactions in intracellular compartments have also to be considered when tracking internal targets.

As QDs can also enter and interact with some internal structures rather than just with cell surface, the average fluorescence signal from cells would be higher in permeabilized ones than those without permeabilization treatment. Also it would be expected that a higher number of cells would be labeled, which is true, as shown by the dot plots in Figure 5. This cellular staining has no dependence from the thiol stabilizing molecule used in QDs synthesis, since mercaptoacetic-acid QDs displayed similar interactions [Conroy et. al., 2008] In fact, virtually all cells are labeled with the lower and higher QD concentration used here after permeabilization, as can be seen from dot plots (Figures 5A and B).



**Figure 5.** Dot plots for CdTe/CdS-MPA cellular labeling after permeabilization. Almost the whole cell population was labeled regardless the concentration used.

### 3.3 Zeta Potential measurements after cell-QDs incubation

Results reported in the literature on the effects caused by QDs in cells are controversial. While first reports are based only on morphological changes [Lovrić et. al., 2005], later ones use

metabolic and biochemical assays to study QDs' toxicity [Yana et. al., 2011]. These last data is directly related to nanoparticle uptake [Chang et. al., 2006]). Glycoproteins of cell membranes are responsible for the negatively charged membrane surface. This negative cell surface induces a double layer of charges consisting of ions rigidly bonded to the cell and creates a repulsive electrical zeta potential ( $\zeta$ ) between the cells [Fontes et. al., 2008]. The zeta potential reflects the membrane electrical charges and can, for example, be used to study cell agglutination [Fontes et. al., 2008; Pollack and Reckel, 1977] and also to understand cancer diseases [Cartey and Coffey, 1988].

Here, we evaluate changes on membrane electrical properties (Zeta potential -  $\zeta$ ) after live cell incubation with QDs using optical tweezers measurements. These preliminary results show that control cells presented an average zeta potential of  $\zeta = -14.3 \text{ mV} (\pm 1.8 \text{ mV})$ , while those incubated with QDs displayed an average  $\zeta = -9.8 \text{ mV} (\pm 1.2 \text{ mV})$ . The negative zeta potential shifted to a less negative value after QDs incubation clearly is not related to the incorporation of negative nanoparticles on the cell surface. We suggest that the change of the  $\zeta$  value is related to membrane adverse effects caused by the QDs-cell incubation. The main responsible for the cell membrane negative charges is the sialic acid of the glycoproteins and the  $\zeta$  measurements suggest that the nanoparticles in some way may be collaborating to decrease sialic acid. Some reports in the literature suggest that a decrease of glycoproteins could be related to oxidative stress [Straface et. al., 2000]. Based on this, it is possible that the zeta potential changes observed could be related to oxidative damages.

#### **4. CONCLUSIONS**

Water dispersion semiconductor nanocrystals have emerged as an alternative to the traditional hydrophobic QDs' synthesis where toxic and pyrophoric agents are used. Here, we synthesized fluorescent green emitting carboxyl coated CdTe/CdS quantum confined nanocrystals ( $d \sim 2.3 \text{ nm}$ ) and evaluated their ability to interact non-specifically with plasma membrane on live PBMCs and also with intracellular compartments in permeabilized PBMCs. Further, we showed that live cell incubation alters cell membrane charges indicating that zeta potential measurements could be a new and complementary technique to analyze membrane cell integrity and eventual adverse effects caused on cell due to QDs incubation or even using other nanoparticles.

We demonstrate that there are non-specific interactions of bare CdTe/CdS QDs to the cell surface or inside PBMCs. Such interactions might interfere in biological conclusions when a specific target has to be detected if a non-effective conjugation processes occur. This is true for these or any other cell lineage when non-specific interaction is significant. These interactions may be the result of

adsorption (electrostatic and hydrophilic/hydrophobic interactions) between the chemical groups present in the cell membrane and carboxyl groups of QDs.

Closing, we showed that permeabilized PBMCs presented higher fluorescence pattern than non permeabilized ones, demonstrating an alternative methodology to stain intracellular structures localized in the cytosol or the nucleus of cells. This work also shows that QDs can become a potential, efficient and low cost diagnostic tool for cytometry, compatible with the lasers and filters used in this kind of equipment and that studies about non-specific cell-QDs interactions are still necessary to improve biological conclusions when a specific labeling is desired.

**ACKNOWLEDGEMENTS:** The authors are grateful to CAPES, CNPq, FACEPE, L'óreal, Brazilian Academy of Sciences and UNESCO. This work is also linked to CEPOF (Optics and Photonics Research Center, FAPESP), National Institute of Photonics Applied to Cell Biology and National Institute of Photonics. We also are grateful to Regina C. F. Bressan by the microscopy support.

## REFERENCES

Carter H. B., Coffey D. S., 1988. Cell-surface charge in predicting metastatic potential of aspirated cells from the dunning rat prostatic adenocarcinoma model. *J. Urol* 140, 173–175.

Cavalcanti, M., B., Amaral, A., J., Fernandes, T. S., Melo, J. A., Machado, C., G., F., 2008. P53 protein expression levels as bioindicator of individual exposure to ionizing radiation by flow cytometry. *Mol Cell Biochem* 308, 127–131.

Chang, E., Thekkek, N., Yu, W. W., Colvin, V. L., and Drezek, R., 2006. Evaluation of Quantum Dot Cytotoxicity Based on Intracellular Uptake. *Small* 2 No. 12, 1412 – 1417.

Conroy, J., Byrne, S. J., Gun'ko, Y. K., Rakovich, Y. P., Donegan, J. F., Davies, A., Kelleher, D., and Volkov, V., 2008. CdTe Nanoparticles Display Tropism to Core Histones and Histone-Rich Cell Organelles. *Small* 4 No. 11, 2006-2015

Fontes, A., Fernandes, H. P., de Thomaz, A. A. Barbosa, L. C., Barjas-Castro, M. L. and Cesar, C. L., 2008. Measuring electrical and mechanical properties of red blood cells with double optical tweezers. *Journal of Biomedical Optics* 13 No. 014001.

Gaponik, N., Talapin, D. V., Rogach, A. L., Hoppe, K., Shevchenko, E. V., Kornowski, A., Eychmüller, A. and Weller, H. J., 2002. Thiol-Capping of CdTe Nanocrystals: An Alternative to Organometallic Synthetic Routes. *J. Phys. Chem. B.* 106, 7177-7185.

Genger, U. R., Grabolle, M., Jaricot, S. C., Nitschke, R., Nann, T., 2008. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nature Methods* 5, 763-775.

Giepmans, B. N. G., Adams, S. R., Ellisman, M. E., Tsien, R. Y., 2006. The Fluorescent Toolbox for Assessing Protein Location and Function. *Science* 312, 217-224.

Kelf, T. A., Sreenivasan, V. K. A., Sun, J., Kim, E. J., Goldys, E. M. and Zvyagin, A. V., 2010. Non-specific cellular uptake of surface-functionalized quantum dots. *Nanotechnology* 21, 1-8.

Larson, D. R., Zipfel, W. R., Williams, R. M., Clark, S. W., Bruchez, M. P., Wise, F. W. and Webb, W. W., 2003. Water-Soluble Quantum Dots for Multiphoton Fluorescence Imaging in Vivo. *Science* 300, 1434-1436.

Lovrić, J., Bazzi, H. S., Cuie, Y., Fortin, G. R. A., Winnik, F. M., Maysinger, D., 2005. Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots. *J. Mol. Med.* 83, 377–385.

Michalet, X., Pinaud, F. F., Bentolila, L. A., Tsay, J. M., Doose, S., Li, J.J., Sundaresan, G., Wu, A. M., Gambhir, S. S., Weiss, S., 2005. Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics. *Science* 307, 538-544.

Michalet, X., Weiss, S., Jäger, M., 2006. Single-Molecule Fluorescence Studies of Protein Folding and Conformational Dynamics. *Chem. Rev.* 106, 1785-1813.

Nabiev, I., Mitchell, S., Davies, A., Williams, Y., Kelleher, D., Moore, R., Gun'ko, Y. K., Byrne, S., Rakovich, Y. P., Donegan, J. F., Sukhanova, A., Conroy, J., Cottell, D., Gaponik, N., Rogach, A., and Volkov, Y., 2007. Nonfunctionalized Nanocrystals Can Exploit a Cell's Active Transport Machinery Delivering Them to Specific Nuclear and Cytoplasmic Compartments. *Nano Letters* 7 No. 11, 3452-3461.

Pollack, W. and Reckel R. P., 1977. A Reappraisal of the Forces Involved in Hemagglutination *Int. Archs Allergy appl. Immun* 54, 29-42.

Rogach, A. L., Franzl, T., Klar, T. A., Feldmann, J., Gaponik, N., Lesnyak, V., Shavel, A., Eychmüller, A., Rakovich, Y. P. and Donegan, J. F., 2007. Aqueous Synthesis of Thiol-Capped CdTe Nanocrystals: State-of-the-Art, *J. Phys. Chem. C* 111, 14628-14637.

Samia, A. C. S., Dayal, S. and Burda, C., 2006. Quantum Dot-based Energy Transfer: Perspectives and Potential for Applications in Photodynamic Therapy, *Photochemistry and Photobiology* 82, 617-625.

Smith, R. A. and Giorgio, T. D., 2009. Quantitative Measurement of Multifunctional Quantum Dot Binding to Cellular Targets Using Flow Cytometry. *Cytometry Part A* 75A, 465-474.

Sperling, R. A. and Parak, W. J., 2010. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Phil. Trans. R. Soc. A* 368, 1333–1383.

Straface, E., Matarrese, P., Gambardella, L., Forte, S., Carlone, S., Libianchi, E., Schmid, G., Malorni, W., 2000. N-Acetylcysteine Counteracts Erythrocyte Alterations Occurring in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 279, 552–556.

Tian, J., Liu, R., Zhao, Y., Peng, Y., Hong, X., Xu, Q. and Zhao, S., 2010. Synthesis of CdTe/CdS/ZnS quantum dots and their application in imaging of hepatocellular carcinoma cells and immunoassay for alpha fetoprotein. *Nanotechnology* 21, 1-8.

Tsien, R. Y., Ernst, L., Waggoner, A., 2006. Fluorophores for Confocal Microscopy: Photophysics and Photochemistry, in: Pawley, J. B. (Third edition), *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Springer Science+Business Media, New York, pp. 338-352.

Williams, Y., Sukhanova, A., Nowostawska, M., Davies, A. M., Mitchell, S., Oleinikov, V., Gun'ko, Y., Nabiev, I., Kelleher, D., Volkov, Y., 2009. Probing Cell-Type-Specific Intracellular Nanoscale Barriers Using Size-Tuned Quantum Dots. *Small* 5 No. 22, 2581–2588.

Yana, M., Zhanga, Y., Xua, K., Fub, T., Qinb, H. and Zhenga, X., 2011. An in vitro study of vascular endothelial toxicity of CdTe quantum dots. *Toxicology* 282, 94–103.

Yezhelyev, M. V., Gao, X., Xing, Y., Al-Hajj, A., Nie, S. and O'Regan, R. M., 2006. Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. *The lancet oncology* 7 No. 8, 657-667.

Yu, W. W., Qu, L., Guo, W., and Peng, X., 2003. Experimental Determination of the Extinction Coefficient of CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals. *Chem. Mater.* 15, 2854-2860.

## **CAPÍTULO VI**

**INTRACELLULAR DELIVERY OF QUANTUM DOTS MEDIATED  
BY FUSOGENIC LIPOSOMES**

**ABSTRACT:** Fluorescent Semiconductor Nanocrystals, also known as Quantum Dots (QDs), have emerged as an advantageous alternative over applying conventional fluorescent dyes due to its topping properties (large absorption cross section, high brightness and photostability). When QDs are tracking a specific target in live cells, they are mostly applied in extracellular membrane labeling since they cannot passively cross plasma cell membrane. For studying intracellular molecules and structures it would be necessary to deliver free QDs into the cell cytosol. In order to overcome such constraints, in this work we presented a new methodology for encapsulation of water dispersed carboxyl-coated CdTe/CdS QDs in liposomes of different compositions by using freeze-and-thaw cycles. We confirmed the encapsulation by transmission electron microscopy and by conventional and confocal fluorescence microscopy. QDs encapsulated in liposomes with fusogenic properties were able to fuse with live human stem cells in an endocytic-independent way and deliver the QD nanoparticles to the interior of the cell. Image analysis of the images showed that QDs were not freely diffusing in the cytosol. On the contrary, we observed a co-localization of the QDs and the lipids suggesting an interaction between these components. Efficient delivery into cells could be reached by using less charged QD nanoparticles such as PEG coated, zwitterionic or positive QDs. The method described here is a potential approach to deliver drugs and genes readily to the cell interior by routes which do not depend on cell endocytosis and that can be applied for the encapsulation of virtually any kind of nanoparticle.

## **1. INTRODUCTION**

The use of Quantum Dots (QDs) as fluorescent probes for understanding biological functions has emerged as an advantageous alternative over applying conventional fluorescent dyes [1 - 3]. QDs have been applied for cellular labeling and biomedical research due to their wide excitation and narrow emission spectra, bright luminescence, great photostability, chemical active surface and size-controlled luminescence properties to emit at different regions of visible-light spectra [1 – 6]. These optical properties have allowed labeling many targets simultaneously for reconstruction of multiplexing images and long term analysis of biological molecules [7]. However, when used to track

a specific target in live cells, such target is usually located on the cell surface [8]. It is still a challenge to study intracellular molecules and structures because QDs cannot reach freely the cell cytosol, limiting their application for experiments of intracellular labeling. Therefore, development of methods to overcome the plasma membrane and/or escape from endo/lysosomal trapping after endocytosis is required to these purposes.

Some traditional methods have been used to deliver membrane impermeable compounds to the cell interior. They are classified as chemical, biological or physical approaches. Chemical strategies rely on the use of nanocarriers chemically prepared to deliver materials into cells. Biological methods are almost exclusively done by the use of viral vectors and physical approaches are based on cell membrane manipulations and modifications (such as electroporation and microinjection) [9 – 11].

Most of these conventional strategies have been tested to deliver QDs into cells and usually combine some advantages and disadvantages. For instance, while electroporation is able to overcome the plasma membrane of many cells at a time, it delivers QDs as agglomerates (furthermore, this method can also lead to cell damage) [12]. By microinjection, QDs can reach the cytosolic compartment, however this is a laborious cell by cell technique [13]. Some chemical QDs delivering strategies combine the use of osmotic lyses [14] or “proton-sponge” effects [15] for lysosome disruption, but they can induce cytotoxic adverse effects after the release of lysosomal content. In principle, QDs coating with translocation peptides could also be used, but it becomes difficult to label intracellular structures specifically since (at least) two different chemical molecules have to be conjugated to the nanoparticle surface for delivery and labeling purposes [16]. Another common approach relies on lipofection, which uses electrostatic interaction between the cationic (usually positively-charged liposomes) and a negatively charged material (to form a cargo-carrier complex) and release of endocytosed cargo after lysosomal destabilization [10, 11, 16]. However, lipoplex-based methods are multi-step approaches, usually resulting in low efficiency transfection capability.

Development of a platform for delivering freely nanoparticles into living cells, which does not depend on the cell uptake ability or material charge and minimally interferes in the cell physiology and in the carrier and nanoparticles properties would open up the possibility of new applications in the field of biomedical and life sciences. Recently, Csizár *et. al.* reported direct fusion between non-functionalized plain cationic liposomes to the plasma membrane of different cell lines [17]. These liposomes with fusogenic properties are a valuable tool to investigate membrane fusion mechanisms and could also be used to design delivering liposomal carriers for intracellular purposes without the need of further chemical modification such as surface functionalization.

In this work, we present a new methodology for the encapsulation of water synthesized carboxyl-coated CdTe/CdS QDs in liposomes of different compositions by using freeze-and-thaw cycles. We believe that this process could be applied as a general route for encapsulation of other kind of nanoparticles. Later, the encapsulation was confirmed by fluorescence and electron microscopy, we also encapsulated the QDs in cationic liposomes with fusogenic properties and tested their ability to deliver QDs into living cells by interacting them with human-derived umbilical stem cells. These cationic liposomes differ from the traditional lipoplex system, because they are able to fuse with the biomembranes regardless of endocytosis.

## **2. EXPERIMENTAL METHODS**

### **2.1 Synthesis of CdTe/CdS-AMP Quantum Dots**

Water colloidal dispersions of CdTe/CdS core/shell QDs were synthesized according to an adaptation of a previously reported method [18]. Briefly, QDs were prepared by the addition of  $\text{Te}^{2-}$  solution in a 0.01 M  $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$  solution of pH above 10 in the presence of MPA (3-mercaptopropionic acid) (Sigma Aldrich) as the stabilizing agent, in a 2:1:5.7 proportion of Cd:Te:MPA (molar ratio). The reaction proceeds under constant stirring for 7 hours under argon (White Martins) atmosphere and refluxing at 90 °C. The  $\text{Te}^{2-}$  solution was prepared using metallic tellurium (Sigma Aldrich) and  $\text{NaBH}_4$  (Sigma Aldrich), under argon saturated inert atmosphere. QDs optical characterization was done by absorption and emission spectroscopy (using respectively the Ocean Optics HR4000 and the ISS K2 equipments). While, QDs structural characterization was done by X-ray diffraction (Siemens Nixford D5000).

### **2.2 Liposomes Preparation and Quantum Dots Encapsulation**

Liposomes were first prepared by the film hydration method. The constituent lipids were dissolved in chloroform to make a stock solution which was used according to the desired final concentration of Egg phosphatidylcholine (EggPC), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP) and 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (DPPE-Rh) from Avanti polar Lipids. We prepared 3 different types of liposomes: zwitterionic EggPC, the cationic EggPC:DOTAP and the fusogenic DOPE:DOTAP:DPPE-Rh. For EggPC:DOTAP and DOPE:DOTAP:DPPE-Rh we have mixed the stock solutions to reach final concentrations of 8:2 (moles) and 1:1:0.1 (weight), respectively. The chloroform lipids were placed in a small vial glass and the solvent was evaporated under a  $\text{N}_2$  flow stream to form the lipid film. Any residual solvent was removed under a vacuum pump for ~ 4 hours. The film was hydrated with ultrapure water under vortexing (~ 10 minutes) to detach the lipids from

the vial wall. Typical 2 mg/mL lipid concentration was used to prepare plain (empty) multilamellar vesicles (MLVs). MLVs suspension was mixed with the same volume of a 16  $\mu$ M of QDs suspension. QDs encapsulation in liposomes was carried out after applying 6 freeze-and-thaw cycles using liquid nitrogen and a water bath (40°C) plus vortexing, sequentially. Liposomes were analyzed by fluorescence microscopy (Leica DMI4000B and Leica SPII-AOBS), transmission electron microscopy (Hitachi H-300 electron microscopy), and dynamic light scattering and zeta potential measurements (ZetaSizer Nano ZS90, Malvern). The liposome suspension was extruded through a 200 nm polycarbonate membrane 11 times at room temperature and analyzed by dynamic light scattering of their hydrodynamic size, zeta potential measurements and incubation with cells.

### **2.3 Liposome Preparation for Transmission Electron Microscopy**

Liposomes at 1 mg/mL were centrifuged (3000 RPM, 8°C) for 30 min prior to fixing with Glutaraldehyde (2.5%), *p*-Formaldehyde (4%) and Cacodylate Buffer (0.1 M). After this step, samples were washed with the same buffer three times, for 10 min each wash. Then, liposomes were fixed with a solution containing cold 2% Osmium Tetroxide (OsO<sub>4</sub>), 5 mM Calcium Chloride and 0.8% Potassium Ferrocyanide in 0.1 M Cacodylate buffer. All suspensions were washed twice with Cacodylate buffer 0.1 M for 10 min, and once with distilled water, for 10 min. The samples were stained with 5% Uranyl Acetate at 5% for 1 h and then washed three times with distilled water for 10 min. They were dehydrated in a series of increasing strength of acetone solutions (50%, 2 x 70%, 95%, 2 x 100%) for 15 min. Fixed liposomes were then infiltrated with three increasing concentrations of Epon LX 112 resin in acetone (2:1; 1:1; 1:2), ending in 100% resin overnight. All samples were embedded in Epon LX112 embedding medium at 60 °C for three days. Embedded liposomes were trimmed and sectioned on an Ultracut E-Reichert-Jung ultramicrotome. Thin sections (90 nm thickness, approximately) taken from each sample and retrieved to copper grids were allowed to dry, and then stained with 5%Uranyl Acetate for 35 min plus Lead Citrate for 1 min. These grids were examined with a Hitachi H-300 electron microscopy using Kodak 4489 electron microscopy film. Liposomes were not extruded for this analysis.

### **2.4 Cell Culture and Incubation with Fusogenic Liposomes**

Human-derived umbilical stem cells were obtained according to methodology recently described (submitted). The cells were cultivated in cover glasses displaced in well culture plates with Modified Eagle's medium (DMEM) at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> saturated atmosphere. Confluent cells samples, obtained after the third or fourth passages were used for liposome incubation. Plain or fusogenic liposomes encapsulating QDs were added to the cellular medium up to a 0.02 mg/mL final

concentration and incubated for 1 hour with or without serum-free medium. In order to test the ability plain liposomes fuse with the plasma membrane, we used fixed cells. For this, stem cells were washed twice with phosphate (PBS) buffer (137 mM NaCl, phosphate 10 mM, 2.7 mM KCl) and fixed with 4% paraformaldehyde. After that, samples were washed twice again with PBS. For QDs delivery using fusogenic liposomes, cellular incubation was carried out directly on the microscope stage and analyzed without fixation.

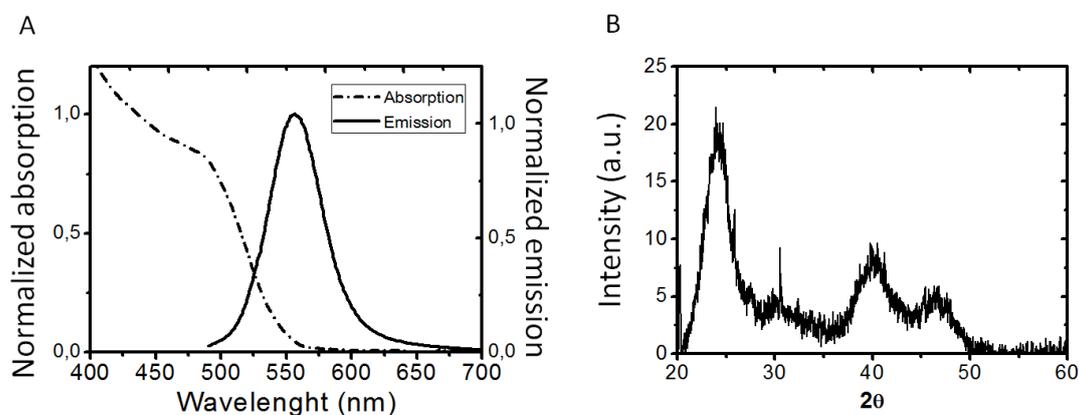
## 2.5 Optical Microscopy Analysis

Cells and liposomes were analyzed by conventional (Leica DMI4000B) and confocal fluorescence microscopy (multispectral Leica SPII-AOBS). For acquisition by conventional fluorescence microscopy, excitation filters of 480/40 nm and 560/40 nm were used to excite QDs and dyed lipids and emission filters of 527/30 nm and 645/75 nm were used to detect the QDs and dyed lipids emissions, respectively. For confocal images, cells labeled with the dyed liposomes encapsulating QDs were analyzed by 488 nm excitation. Fluorescence were acquired in the green (corresponding to QDs) and red (corresponding to dyed liposomes) channels, respectively, at 530 nm and 630 nm.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Quantum Dots Synthesis and Characterization

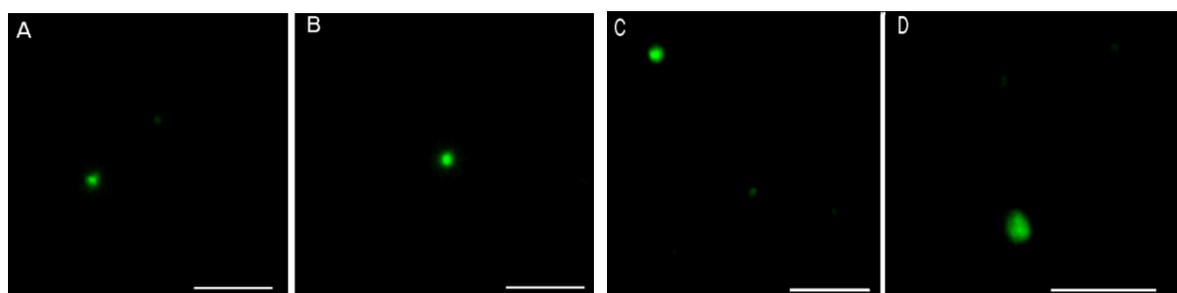
Synthesis of CdTe/CdS-AMP nanocrystal QDs was carried out as described early by us and presented a bright green emission with peak at 555 nm (Figure 1A). By the analysis of the first absorption peak at 479 nm, average size of particles was estimated to be 2.2 nm using the Rogach's sizing curve [19]. By X-Ray diffraction analyses (Figure 1B) applying Scherrer's equation, the average size was equal to 2.6 nm. The original QDs concentration was estimated as 48  $\mu$ M using the Peng's equation [20].



**Figure 1.** QDs Characterization. A) Absorption and emission spectra of typical nanocrystals of CdTe/CdS-MPA (excitation at 365 nm) and B) CdTe/CdS-MPA X-Ray diffraction.

### 3.2 Liposome Encapsulation of Quantum Dots

We tested the freeze-and-thaw method for encapsulation of QDs in liposomes. This method is known to encapsulate water soluble compounds efficiently [21, 22]. The simplest liposomal system consisted of the single component lipid, EggPC. Figure 2A and 2B show two frames of fluorescent PC liposomes containing QDs. From these images it is clear that liposomes were able to encapsulate QDs by the freeze-and-thaw method, either before (data not shown) or after extrusion. In contrast to some reports in the literature [23 - 26], simple lipid film hydration in our experiments was not sufficient for evident encapsulation of QDs in liposomes. Hence, we proceed using a better encapsulation method such as the freeze-and-thaw for an effective QD encapsulation in liposomes.



**Figure 2.** Fluorescent liposomes after QD encapsulation. In A and B, EggPC liposomes, and in C and D, PC:DOTAP liposomes visualized under fluorescence microscopy. Bars: 10  $\mu\text{m}$ .

In order to generalize the process of QDs encapsulation, we also tested the freeze-and-thaw method for more a complex system comprised of cationic liposomes of PC:DOTAP. Similarly to those made only by EggPC lipids, cationic liposomes have also shown a bright green fluorescence for vesicles extruded or not (Figure 2C and 2D). Interestingly, the more fluorescent the liposomes are, the darker they are under phase contrast, for all the compositions tested here. In other words, fluorescent liposomes are optically denser, that is, filled with particles. This is a further indication of the presence of nanoparticles inside the vesicles. Two aspects of QD-liposome system worth to be mentioned: simple QDs incubation with plain liposomes never results in fluorescent liposomes, even for the positively-charged PC:DOTAP system – that is, the process is not a result of simple electrostatically interaction. The second one is that either incubation or freeze-and-thaw cycles do not affect QD optical properties, such as emission intensity and peak position.

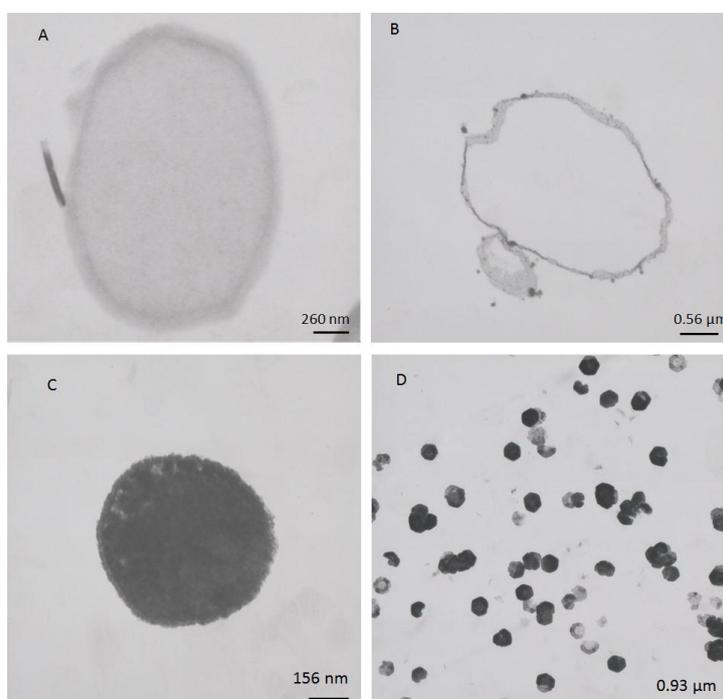
Liposomes were characterized by size and zeta potential measurements, as shown in Table 1, after extrusion through a 200 nm polycarbonate membranes. Asterisks indicate the most important peak contribution for the two populations. Vesicles containing QDs were smaller than plain ones, but the corresponding average size is in agreement with the pore diameter. Encapsulation also reduces the zeta potential, which is much clearer for cationic system.

**Table 1.** Average size and average zeta potential measurements of liposomes with and without QDs.

	PC	PC-QDs	PC:DOTAP	PC:DOTAP-QDs
Size (nm)	220*/830 (0.26)	130 (0.15)	145,7 (0.24)	97,8 (0.4)
Zeta (mV)	- 25,3	- 44*/ - 13,8	+ 10,4/ + 30,4*	-38,5

\*indicates the most significant vesicle population. Numbers in parenthesis represent polydispersion index.

We also probed encapsulation by transmission electron microscopy of liposomes composed of either PC or PC:DOTAP lipids (Figure 3). Figures 3A and 3 B show plain liposomes of PC and PC:DOTAP (without QDs), respectively. In figure 3C, there is a single EggPC vesicle containing QDs inside it. In Figure 3D, PC:DOTAP liposomes encapsulating different amounts of QDs – variation in efficiency from vesicle-to-vesicle are shown.



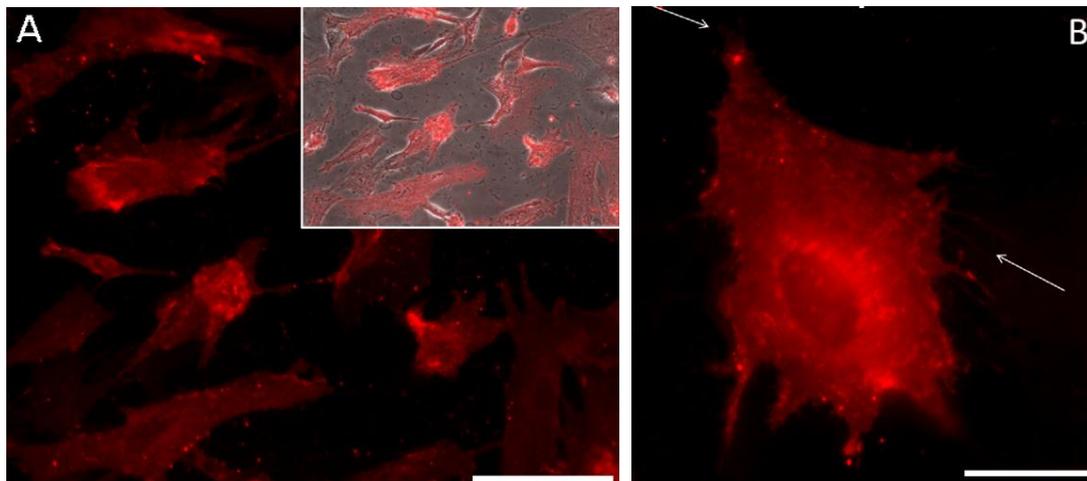
**Figure 3.** Transmission electron microscopy of liposomes, without extrusion. In A and B, plain PC and PC:DOTAP liposomes (without QDs). In C, a single PC liposome containing electron dense nanoparticles, corresponding to QDs. In D, an image of cationic PC:DOTAP liposomes with variable amount of encapsulated QDs.

### 3.3 Interaction of Fusogenic Liposomes with Live Stem-Cells

Liposomes can interact with cells and tissues by a large variety of mechanisms, sometimes by internalization, sometimes not [10, 27]. These mechanisms are central in the way by which carriers release their material to cells. We choose to deliver QDs to cells using liposomes with fusogenic

properties, composed of DOPE:DOTAP:DPPE-Rh, as recently described [17]. The fusion relies on the combination of properties of cationic lipids, “helper” lipids (ethanolamine) and aromatic molecules. Ideally, these liposomes could encapsulate QDs (or any other material), which would be released into the cytosol after liposome fusion to the plasma cell membrane. Further, although we do not know whether these liposomes are internalized or not, and considering it a real possibility, they would still be able to fuse with endocytic vesicles also releasing encapsulated QDs.

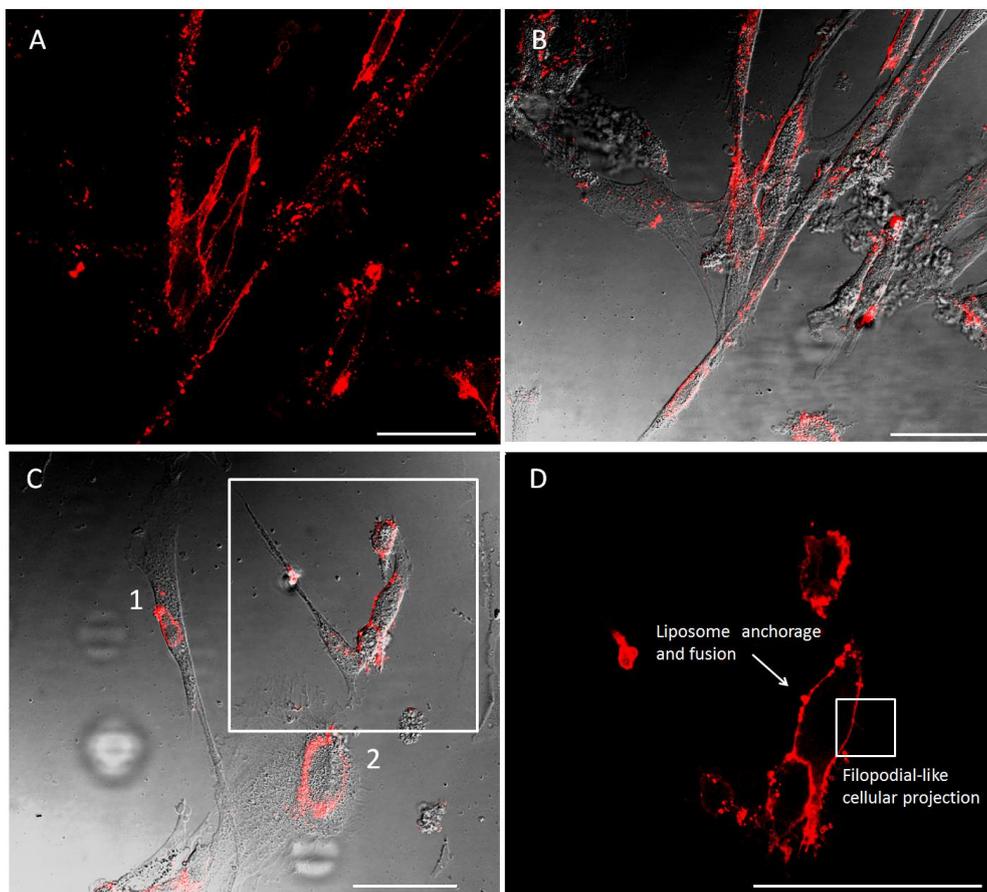
The ability of such preparation in fusing with live cells was tested by incubating these liposomes with human-derived umbilical stem cells, as shown Figure 4. Figure 4A shows, by conventional fluorescence microscopy, that every cell was labeled by the liposomes, indicating the fusion capability of the system. In 4B, a zoom of one single cell displayed detailed membrane morphology (arrows). This profile is a strong indication of membrane fusion, since there is no other cellular structure preferentially labeled and it is common pattern for the cells in the samples. So, the plasma membrane is quite homogeneously labeled as the liposomes are now part of it. Even though the mechanism of fusion seems to predominate in this interaction, the endocytosis of some vesicles can not be excluded.



**Figure 4.** Membrane fusion of liposomes. In figure A, all cells are labeled by the fusogenic liposomes. The red spots in the picture are liposomes. Inset shows merged fluorescence and phase contrast images. In B, a zoom of one cell displaying details of its membrane structure. Bars: In A 100  $\mu\text{m}$ ; in B 25  $\mu\text{m}$ .

Cationic liposomes are commonly used in cell transfection experiments [10, 16, 27]. Such systems release the material after endocytosis. The fusogenic properties of the systems used here also depend on the use of cationic lipids to support interaction with cells, which will eventually promote fusion. In this way, we tested if these liposomes were still able to fuse when endocytosis is inhibited by low temperature incubation (in order to probe fusion versus internalization). Figure 5

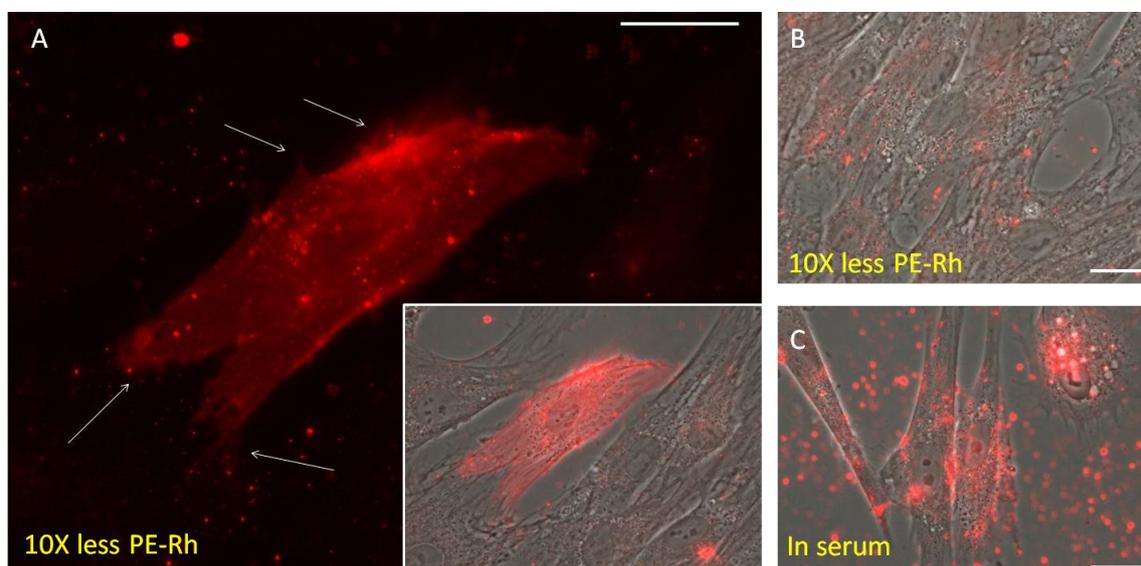
shows a temperature-independent fusion of liposomes with stem cells by confocal microscopy and differential interference contrast microscopy (DIC) when incubating at 4°C. Figures 5A and 5B show that the cellular outline are labeled, corresponding to cellular membranes. Details of cell membranes images after/during fusion with liposomes are presented in Figures 5C and 5D. In figure 5D, the square marks detailed membrane projections better resolved under confocal microscopy corresponding to those projections shown in figure 4B. The arrow points what seems to be a small fluorescent vesicle contacting, anchoring and fusing with the plasma membrane. Although fusion must be the main mechanism of liposome-cell interaction and labeling, which is supported by membrane staining, other profiles could also be observed, such as internal labeling displayed by cells 1 and 2 in figure 4C.



**Figure 5.** Fusogenic liposomes fusing to cell plasma membrane at 4°C. Figure 4A shows the labeling of the cell edges under confocal fluorescence microscopy. In 4B, the same frame under confocal fluorescence microscopy and DIC. Figure 4C displays different labeling pattern - liposome-cell fusion shown in cells inside the square and intracellular labeling for cells 1 and 2. D is the image corresponding to the square in C. It is possible to see details of membrane such as projections (square) or even the approaching vesicles on the cellular membrane (arrow). Bars: 75  $\mu\text{m}$ .

The previous reported description of such liposomes [17] highlights the role of the fluorescent (aromatic) molecules on membrane fusion. We made some modifications on the original

fusogenic liposomal composition or medium conditions to probe its ability to fuse with cells, as shown in figure 6. When 10 times less rhodamine lipids are present in the bilayer, liposomes are still able to fuse to cells but the efficiency is significantly reduced. As shown in figure 6A, one fused cell among non-labeled cells also presented detailed membrane projections similar to those incubated with the “original” liposomal composition containing 10 times more fluorescent lipids (around 10% of cells were labeled). In figure 6B, such fluorescent liposomes contact cells but do not promote fusion. The replacement of PE-Rh lipids for soluble rodamine 101 also is inefficient to promote liposomes fusion to cells (not shown). When “original” liposome preparation is incubated with cells in the presence of serum medium, no fusion occurs (Figure 6C). This result might be related to adsorption of serum proteins onto the cationic vesicles forming a corona [28], which may prevent cell-liposome interaction and fusion.

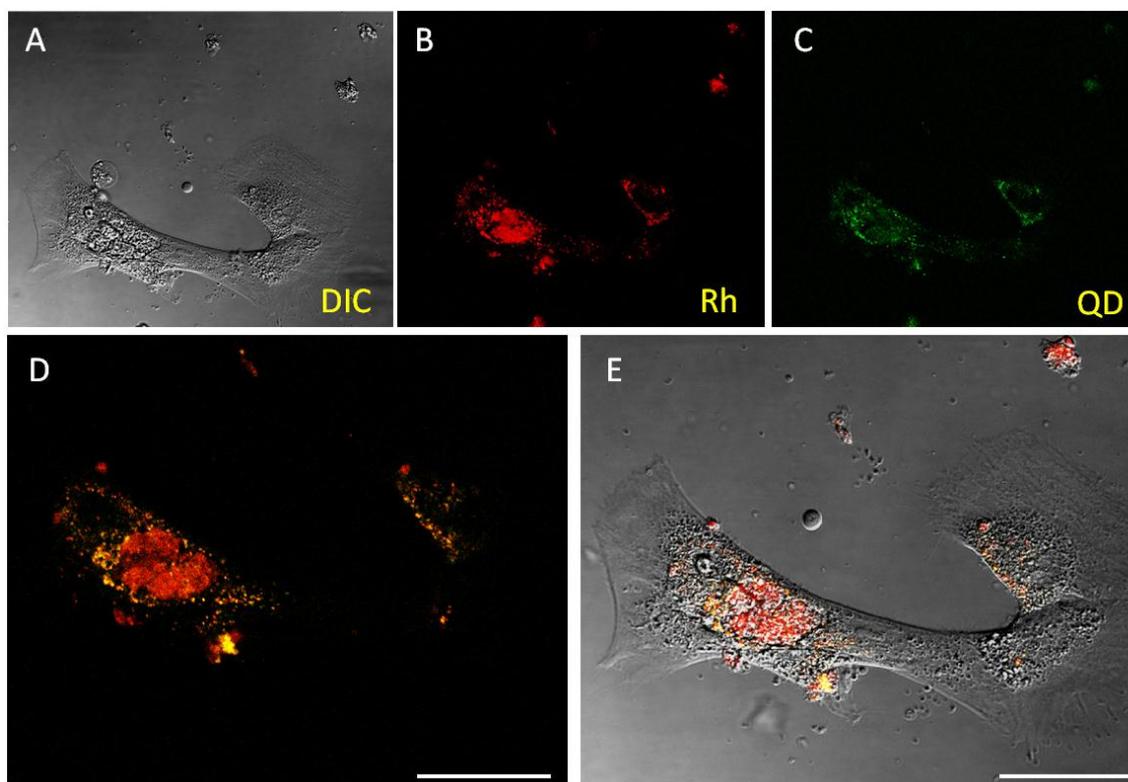


**Figure 6.** Membrane fusion in modified conditions. In A, fusogenic liposomes containing 10X less PE-Rh on the composition fuses less efficiently. Inset shows one fluorescent cell among non-fused cells. In B, such modified liposomes contacting cells do not fuse with the plasma membrane. In C, no fusion occurs in serum-containing medium. Barras: 25  $\mu$ m.

### 3.4 Intracellular Delivery of Quantum Dots by Fusogenic Liposomes

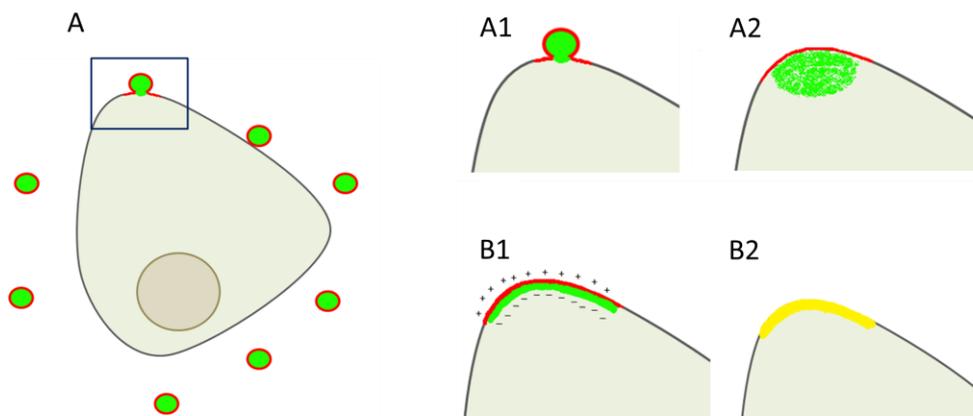
Once demonstrated the efficiency of the freeze-and-thaw method for QD encapsulation in liposomes and established the conditions of liposome-cell fusion, fusogenic liposome-encapsulated QDs were incubated with live stem cells. In ideal conditions, the liposomes containing QDs will fuse with the plasma cell membrane releasing free particles inside the cytosol, which would be seen as a green diffuse pattern in the cell interior. Figure 7 shows typical image of the intracellular delivery of QDs by fusogenic liposomes. After some minutes of incubation, some cells presented red fluorescence (corresponding to the rhodamine-labeled liposomes – 7B) always followed by a green

fluorescence (corresponding to QDs – 7C). The green fluorescence of QDs was always co-localized with the red fluorescence of lipids. We could not observe red and green fluorescence as separated signals, as shown in figures 6D and 6E.



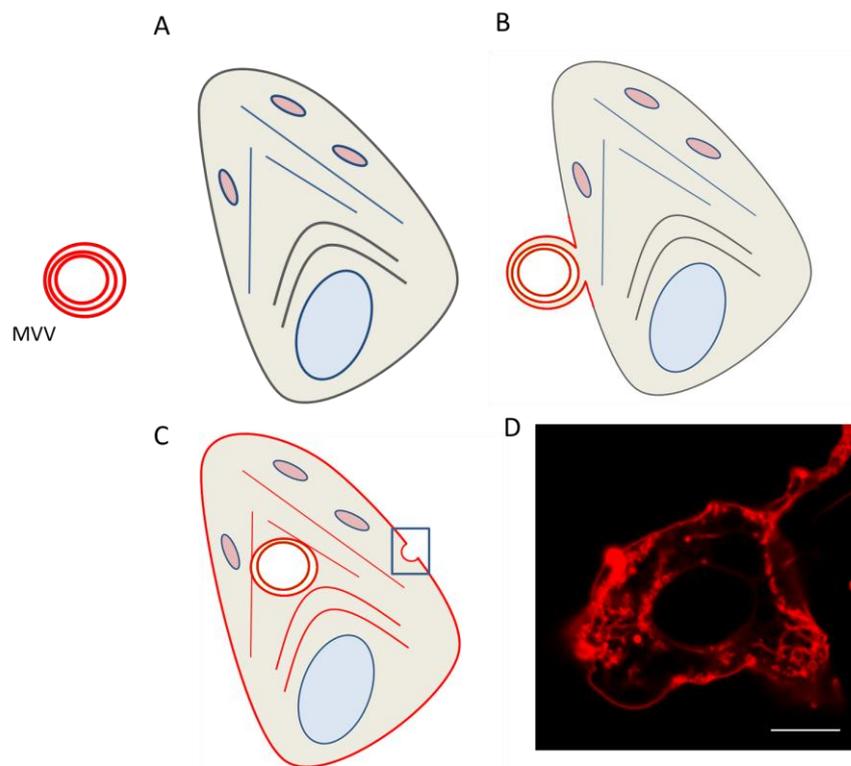
**Figure 7.** Intracellular delivery of fusogenic liposome-encapsulated QDs. Figure A, DIC microscopy of the cells. Figure 6B, red fluorescence image of liposomes. Figure C, green fluorescence image of QDs. In D, co-localization of red and green fluorescence. In E, co-localization under DIC. Bars: 50 μm.

Co-localized signals indicate that QDs and liposomes are spatially close. Once the fusion occurs, the liposomal membrane is now part of the plasma cell membrane; consequently QDs would access the cell interior. However, QDs are not disconnected from the cationic lipids, which now are part of cellular membrane. That probably happens because the QDs coating with carboxyl (CdTe/CdS-MPA) make them negative and possibly able to interact electrostatically with the cationic lipids of the fusogenic liposomes. This proposed mechanism of QDs-mediated liposome delivery to cells, is illustrated in Figure 8. Figure 8A represents the interaction and fusion of fusogenic liposomes with the plasma cell membrane in ideal conditions. Membrane fusion (A1) would lead to cell labeling and release of free QDs inside the biological system (A2). However, the spotted-like pattern observed in Figure 6 points to fusion (Figure 8 B1), but also to charge mediated interactions between QDs and cationic lipids of the fusogenic liposomes, yielding a co-localization of signal (Figure 8 B2).



**Figure 8.** Illustration of the liposome-mediated QDs delivery to cells. In ideal conditions, after incubation (In A), red fluorescent liposomes fuse to the cell membrane (A1), releasing QDs into the cytosol. However, after fusion, charge mediated interactions of QDs and cationic lipids (B1) impair QDs release into the cell, yielding a yellow co-localized signal (B2).

Another interesting finding is that membrane labeling from liposome-cell fusion is not restricted to plasma membrane. As can be seen from the Figure 5C, red staining is also present in intracellular structures. If fusion were the only mechanism of interaction, there was no reason for intracellular labeling, since liposomal bilayer fuses with the membrane bilayer without releasing or leaking any material into cells. However, either by using sonication as described earlier [17] or by freeze-and-thaw followed by extrusion as the method used here, probably not only unilamellar liposomes are produced [21]; some multivesicular structures could be present in the sample. As a consequence, the external bilayer fuses with the plasma membrane releasing intravesicular vesicles. These vesicles are now able to fuse to intracellular membranes. Another possibility is that some liposomes are also endocytosed instead of readily fused, yielding intracellular fluorescence, as the pattern suggested in Figure 5C (cells 1 and 2) or even a combination of both (but endocytosis must not be the case here, since the low temperature would not allow vesicles to be endocytosed), although endocytosis is prohibitive at the temperature in the experiments in figure 5. Figure 9 illustrate such mechanisms. In 9A and 9B, interaction of a multivesicular vesicle (MVV) with the plasma membrane, releasing internal vesicles to the cell interior, which are able to fuse to internal bilayers (Figure 9C). Intracellular fluorescence can also be originated from internalized liposomes (square in figure 9C). In 9D, a real image of a single cell with many intracellular structures labeled while the plasma membrane is homogeneously stained. Mechanisms other than fusion were not reported on the work of Csizár *et. al.* [17] although some internal fluorescence was also present.



**Figure 9.** Mechanisms of intracellular labeling from fusogenic liposomes. Figure A and B illustrate interactions of a multivesicular vesicle (MVV) with the plasma cell membrane, which after fusion of the external bilayer release internal liposomes into the cellular interior. Figure C shows a complete stained plasma membrane after fusion and the fusion of the released vesicles with internal bilayers. Another possibility is the internalization of the liposomes (square in the plasma membrane). Figure D is a real image of the cell whose membrane is homogeneously stained while internal structures are present. Barra: 12  $\mu\text{m}$

## CONCLUDING REMARKS

In this work, we described a new method for efficient encapsulation of QDs in liposomes by using freeze-and-thaw cycles. The QDs encapsulation in liposomes of different compositions shows that this method could become a universal approach and could be used for different liposomes or for encapsulation of other kind of nanoparticles. We also delivered QDs into cells by using liposomes with fusogenic properties. Fusogenic liposomes fuse with the plasma cell membrane in a temperature-independent fashion, suggesting a non endocytic route for material delivery. Water dispersion synthesized QDs were delivered to the cell interior using this preparation. However, QDs remained underneath the plasma membrane indicating interaction with the cationic lipids of fusogenic liposomes. Efficient delivery into cells could be reached by using less charged nanoparticles such as PEG coated, zwitterionic or positive QDs. In contrast to traditional carrier approaches for intracellular delivery, the use of such positively charged and fusogenic liposomes can allow release of particles, drugs and genes directly into cells for many cells at time by mechanisms

which do not depend on internalization, eliminating the limiting steps associated with traditional transfection protocols.

**ACKNOWLEDGEMENTS:** The authors are grateful to CAPES, CNPq, FACEPE, CETENE, L'óreal, Brazilian Academy of Sciences and UNESCO. This work is also linked to CEPOF (Optics and Photonics Research Center, FAPESP), National Institute of Photonics Applied to Cell Biology and National Institute of Photonics. We also are grateful to Regina C. F. Bressan by the microscopy support and Professor Karin Riske.

## REFERENCES

- [1] Genger, U. R., Grabolle, M., Jaricot, S. C., Nitschke, R., Nann, T., "Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels," *Nature Methods* 5, 763-775 (2008).
- [2] Michalet, X., Pinaud, F. F., L. A. Bentolila, L. A., Tsay, J. M., Doose, S., Li, J.J., Sundaresan, G., Wu, A. M., Gambhir, S. S., Weiss, S., "Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics," *Science* 307, 538-544 (2005).
- [3] Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. Paul A. Alivisatos, Marcel Bruchez JR., Mario Morone, Peter Gin, Shimon Weiss. *Science* 281, 2013-2016 (1998).
- [4] Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. Igor L. Medintz, H. Tetsuo Uyeda, Hellen R. Goldman and Hedi Matoussi. *Nature Materials* 4, 435-446 (2005).
- [5] *Molecular Imaging: Physics and Bio-Applications of Quantum Dots in Advances in Medical Physics*. Xavier Michalet, Laurent A. Bentolila e Shimon Weiss. Medical Physics Publishing, Madison, 2008 (edited by Wolbarst, A. B., Hendee, W. R.).
- [6] *Semiconductor Quantum Dots for Biological Applications in Handbook of Self Semiconductor Nanostructures for Novel Devices in Photonics and Electronics*. Beate S. Santos, Patrícia M. A. Farias and Adriana Fontes. Elsevier, Oxford, 2008 (edited by Mohamed H.).
- [7] Ferrara, D. E., Weiss, D., Carnell, P. H., Vito, R. P., Vega, D., Gao, X., Nie, S. e Taylor, W. R. Quantitative 3D fluorescence technique for the analysis of en face preparations of arterial walls using quantum dot nanocrystals and two-photon excitation laser scanning microscopy. *Am J Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290 114–123, 2006.
- [8] Quantum Dots Monitor TrkA Receptor Dynamics in the Interior of Neural PC12 Cells. Sujata S. Rajan and Tania Q. Vu. *Nano Letters* 6, No. 9, 2049-2059 (2006).
- [9] Progress and Problems with the Use of Viral Vectors for Gene Therapy Clare E. Thomas, Anja Ehrhardt e Mark A. Kay. *Nature Reviews Genetics* 4, 3346-358 (2003).
- [10] Recent Approaches to Intracellular Delivery of Drugs and DNA and Organelle Targeting. Vladimir P. Torchilin. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 8, 343–75 (2006).

- [11] Delivering quantum dots into cells: strategies, progress and remaining issues. James B. Delehanty, Hedi Mattoussi e Igor L. Medintz. *Anal. Bioanal. Chem.* 393, 1091–1105 (2009).
- [12] Intracellular Delivery of Quantum Dots for Live Cell Labeling and Organelle Tracking. Austin M. Derfus, Warren C. W. Chan Sangeeta N. Bathia. *Advanced Materials* 16 No. 12, 961-966 (2004).
- [13] In Vivo Imaging of Quantum Dots Encapsulated in Phospholipid Micelles. Benoit Dubertret, Paris Skourides, David J. Norris, Vincent Noireaux, Ali H. Brivanlou, Albert Libchaber. *Science* 298, 1759-1762 (2002).
- [14] Proton-Sponge Coated Quantum Dots for siRNA Delivery and Intracellular Imaging. Maksym V. Yezhelyev, Lifeng Qi, Ruth M. O'Regan, Shuming Nie and Xiaohu Gao. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 9006–9012 (2008).
- [15] Imaging and Tracking of Tat Peptide-Conjugated Quantum Dots in Living Cells: New Insights into Nanoparticle Uptake, Intracellular Transport, and Vesicle Shedding. Gang Ruan, Amit Agrawal, Adam I. Marcus, and Shuming Nie. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 14759-14766 (2007).
- [16] Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. Luc Wasungu and Dick Hoekstra. *Journal of Controlled Release* 116, 255–264 (2006).
- [17] Novel Fusogenic Liposomes for Fluorescent Cell Labeling and Membrane Modification. Agnes Csiszár, Nils Hersch, Sabine Dieluweit, Ralf Biehl, Rudolf Merkel and Bernd Hoffmann. *Bioconjugate Chem.* 21, 537–543 (2010).
- [18] Thiol-Capping of CdTe Nanocrystals: An Alternative to Organometallic Synthetic Routes. Nikolai Gaponik, Dmitri V. Talapin, Andrey L. Rogach, Kathrin Hoppe, Elena V. Shevchenko, Andreas Kornowski, Alexander Eychmüller and Horst J. Weller. *J. Phys. Chem. B.* 106, 7177-7185, 2002.
- [19] Aqueous Synthesis of Thiol-Capped CdTe Nanocrystals: State-of-the-Art. Andrey L. Rogach, Thomas Franzl, Thomas A. Klar, Jochen Feldmann, Nikolai Gaponik, Vladimir Lesnyak, Alexey Shavel, Alexander Eychmüller, Yuri P. Rakovich and John F. Donegan. *J. Phys. Chem. C* 111, 14628-14637 (2007).
- [20] Experimental Determination of the Extinction Coefficient of CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals. W. William Yu, Lianhua Qu, Wenzhuo Guo and Xiaogang Peng. *Chem. Mater.* 15, 2854-2860 (2003).
- [21] Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes). Francis Szoka Jr. and Demetrios Papahadjopoulos. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9 467-508, (1980).
- [22] Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. Peter Walde and Sosaku Ichikawa. *Biomolecular Engineering* 18 , 143–177 (2001).
- [23] Functionalized-Quantum-Dot–Liposome Hybrids as Multimodal Nanoparticles for Cancer. Wafa' T. Al-Jamal, Khuloud T. Al-Jamal, Paul H. Bomans, Peter M. Frederik and Kostas Kostarelos. *Small* 4 No. 9, 1406–1415 (2008).

[24] Liposome-coated quantum dots targeting the sentinel lymph node. Maoquan Chu, Shu Zhuo, Jiang Xu, Qiunan Sheng, Shengke Hou and Ruifei Wang. *J Nanopart Res* 12, 187–197 (2010).

[25] Folate receptor-targeted quantum dot liposomes as fluorescence probes. Chang Yang, Nan Ding, Yibing Xu, Xiaolan Qu, Jing Zhang, Chaoyang Zhao, Liang Hong, Yao Lu and Guangya Xiang. *Journal of Drug Targeting* 17 No.7, 502–511 (2009).

[26] Liposome Delivery of Quantum Dots to the Cytosol of Live Cells. Veronica Dudu, Melissa Ramcharan, M. Lane Gilchrist, Eric C. Holland and Maribel Vazquez. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 8, 2293–2300 (2008).

[27] Recent Advances with Liposomes as Pharmaceutical Carriers. Vladimir P. Torchilin. *Nature Reviews Drug Discovery* 4, 145-160 (2005).

[28] Understanding Biophysicochemical Interactions at the Nano–Bio Interface. Andre E. Nel, Lutz Mädler, Darrell Velegol, Tian Xia, Eric M. V. Hoek, Ponisseril Somasundaran, Fred Klaessig, Vince Castranova And Mike Thompson. *Nature Materials* 8, 543-557 (2009).

## **CAPÍTULO VII**

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Quantum Dots têm sido extensivamente usados em aplicações biológicas e biomédicas desde suas primeiras descrições. Entretanto, algumas questões ainda necessitam ser abordadas para superar determinadas limitações. Esses são os casos das interações inespecíficas dos QDs com sistemas biológicos e do direcionamento de QDs para o interior de células vivas. O primeiro aspecto, o de ligações inespecíficas, foi estudado usando QDs de CdTe/CdS-AMP, cujo recobrimento de superfície resultava em nanopartículas negativamente carregadas nas condições estudadas. A capacidade dessas partículas de ligarem a estruturas biológicas foi estudada por técnicas ópticas complementares, como microscopias de fluorescência e citometria de fluxo. Os resultados apresentados aqui mostraram que esses QDs são capazes de se ligarem tanto à superfície de células sanguíneas mononucleares vivas quanto no interior daquelas que foram artificialmente permeabilizadas. Dessa forma, esse trabalho abordou dois aspectos críticos das aplicações biológicas dos QDs: nanocristais sintetizados em água são capazes de se ligar inespecificamente às células e potencialmente capazes de interferir em análises onde aplicações específicas são requeridas. O efeito da interação com as células vivas resulta na redução do potencial de carga de superfície, o potencial zeta. Esse é um indicativo de possíveis efeitos adversos sobre moléculas presentes nas membranas das células.

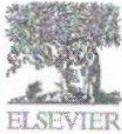
Por serem partículas relativamente grandes e impermeáveis à bicamada das membranas biológicas, QDs são incapazes de atravessá-las diretamente. A internalização dessas nanopartículas pode acontecer por diferentes rotas naturais (endocitose, por exemplo), mas não de maneira espontânea e passando diretamente pela bicamada, o que resultaria em partículas livres no interior das células. Aqui, nós encapsulamos QDs em lipossomas de diferentes composições visando o direcionamento intracelular. A incubação de células-tronco humanas com QDs encapsulados em lipossomas com propriedades fusogênicas permitiu a entrada desses QDs no citosol. Seu perfil de fluorescência co-localizado com a fluorescência das bicamadas catiônicas (agora parte da membrana das células após fusão) entretanto, demonstrou que eles não foram entregues livremente no citosol, mas permaneceram aparentemente ligados às membranas catiônicas. O método descrito é inovador comparado aos tradicionalmente usados em transfecção, que geralmente requerem a capacidade do material ligar eletrostaticamente ao carreador e

internalização do complexo e posterior liberação endo/lisossomal para entrada citoplasmática e pode ser estendido para outros tipos de nanopartículas de cargas negativas e também positivas, ao contrario de sistemas lipoplex.

Com esse trabalho, abriu-se uma nova linha de pesquisa no laboratório relativa ao direcionamento de QDs para o interior das células através de lipossomas. Nós poderemos não só testar a interação de diferentes tipos de lipossomas contendo QDs com variados tipos de células vivas, como poderemos também encapsular outros tipos de nanopartículas (tais como nanopartículas metálicas) e direcioná-las para o citosol. Além disso, com o aprimoramento desta metodologia, seremos capazes de veicular QDs conjugados e investigar a expressão de proteínas localizadas no citoplasma e em organelas de células vivas, bem como visualizar e delinear a ação de uma droga conjugada a QDs cujo alvo se localiza dentro das células. Essa é, portanto, uma via alternativa e aparentemente mais simples dentre os sistemas de transfecção comumente utilizados.

Por último, as observações feitas sobre o potencial zeta das células mononucleares nos chamou atenção sobre alterações de carga de membrana induzidas pela incubação com QDs e nos apresentou uma nova forma de estudar efeitos adversos de toxicidade de nanopartículas que merece ser mais investigada. Efeitos de alteração de carga de membrana celular são particularmente relevantes para aplicações *in vivo* pois, por exemplo, mecanismos de aglutinação e migração celular estão intimamente relacionados a essa distribuição de cargas.

# **ANEXOS**

**TABLE OF CONTENTS**

ISSN: 0968-4328

•	<b>Description</b>	<b>p.1</b>
•	<b>Audience</b>	<b>p.1</b>
•	<b>Impact Factor</b>	<b>p.1</b>
•	<b>Abstracting and Indexing</b>	<b>p.1</b>
•	<b>Editorial Board</b>	<b>p.2</b>
•	<b>Guide for Authors</b>	<b>p.3</b>

**DESCRIPTION**

*Micron* aims to serve as an interdisciplinary forum for all work that involves new applications of microscopy or where microscopy plays a central role. The journal will publish on the design, application, practice or theory of microscopy and microanalysis, including reports on optical, electron-beam, and scanning-probe systems. It also aims at the regular publication of review papers.

The journal embraces original research work in biology, medicine, nanoscience and nanotechnology, materials science and engineering. Over the past several years, it has succeeded in publishing manuscripts within the shortest possible time while maintaining a high standard of refereeing and presentation. Author surveys indicate a high level of satisfaction with the journal.

**AUDIENCE**

Scientists and engineers involved in the design, application, practice or theory of microscopy and microanalysis.

**IMPACT FACTOR**

2010: 1.649 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2011

**ABSTRACTING AND INDEXING**

Aqualine Abstracts  
BIOMED  
BIOSIS  
Current Contents/Life Sciences  
EMBASE  
Elsevier BIOBASE  
INSPEC  
Research Alert  
SCISEARCH  
Science Citation Index  
Scopus

## EDITORIAL BOARD

---

### **Editors:**

**G. Cox**, Electron Microscope Unit, F09, University of Sydney, Sydney, NSW 2006, Australia  
(Biological Sciences)

**R.F. Egerton**, Dept. of Physics, University of Alberta, 11322 - 89 Avenue, Edmonton, T6G 2J1, Canada  
(Physical Sciences)

### **Review Editor**

**J.R. Harris**, Inst. of Zoology, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Müller Weg 6, D-55099 Mainz, Germany

### **Editorial Board:**

**U. Aebi**, Basel, Switzerland

**D. Bhella**, Glasgow, UK

**E.J. Boekema**, Groningen, Netherlands

**G. Botton**, Hamilton, ON, Canada

**F. Braet**, Sydney, NSW, Australia

**N.D. Browning**, Davis, CA, USA

**J.L. Carrascosa**, Madrid, Spain

**P. Gualtieri**, Pisa, Italy

**Sir P. Hirsch**, FRS, Oxford, UK

**F. Hofer**, Graz, Austria

**A. Holzenburg**, College Station, TX, USA

**J.L. Hutchison**, Oxford, UK

**H. Luensdorf**, Braunschweig, Germany

**D.A. Muller**, Ithaca, NY, USA

**L.-M. Peng**, Beijing, China

**M. Sarikaya**, Seattle, WA, USA

**M. Tzaphlidou**, Ioannina, Greece

**Z.L. Wang**, Atlanta, GA, USA

**Y. Zhu**, Upton, NY, USA

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### BEFORE YOU BEGIN

#### *Ethics in Publishing*

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

#### *Conflict of interest*

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

#### *Submission declaration*

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

#### *Changes to authorship*

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

*Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

#### *Copyright*

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

#### *Retained author rights*

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

#### *Role of the funding source*

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

### *Funding body agreements and policies*

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

### *Language and language services*

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

### *Submission*

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

## **PREPARATION**

### *Use of wordprocessing software*

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic illustrations.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

### *LaTeX*

If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class "elsarticle", or alternatively any of the other recognized classes and formats supported in Elsevier's electronic submissions system, for further information see <http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/latex-ees-supported>.

The Elsevier "elsarticle" LaTeX style file package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Quickguide: <http://www.elsevier.com/latex>. It consists of the file: elsarticle.cls, complete user documentation for the class file, bibliographic style files in various styles, and template files for a quick start.

### *Article structure*

#### *Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### *Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

### *Theory/calculation*

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

### *Results*

Results should be clear and concise.

### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### *Appendices*

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

### *Essential title page information*

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### *Abstract*

A concise and factual abstract is required. The abstract should consist of no more than 500 words and should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

### *Highlights*

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 2 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

### *Keywords*

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### *Abbreviations*

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### *Acknowledgements*

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### *Math formulae*

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

### *Footnotes*

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

#### *Table footnotes*

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

### *Artwork*

#### *Electronic artwork*

##### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply "as is".

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

#### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

#### *Tables*

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

#### *References*

##### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

##### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

##### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

##### *Reference management software*

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

##### *Reference style*

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by "et al." and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown ..."

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

##### *Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr, W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

### *Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

### *Video data*

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### *Supplementary data*

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### *Submission checklist*

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

#### **Ensure that the following items are present:**

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

### **AFTER ACCEPTANCE**

### **Use of the Digital Object Identifier**

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

### **Proofs**

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

### **Offprints**

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

### **Offprints**

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. An offprint order form will be supplied by the Publisher for ordering any additional paid offprints.

## **AUTHOR INQUIRIES**

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (<http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2010 Elsevier | <http://www.elsevier.com>