



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

IZABEL GOMES DE SOUZA SOBRINHA

**Síntese e caracterização físico-química de potenciais agentes de
contraste bimodais baseados em Pontos Quânticos e complexos de
Gadolínio**

**Recife
2018**

IZABEL GOMES DE SOUZA SOBRINHA

Síntese e caracterização físico-química de potenciais agentes de contraste bimodais baseados em Pontos Quânticos e complexos de Gadolínio

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFPE como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Inorgânica

Orientadora: Profa. Dra. Giovannia Araújo de Lima Pereira
Coorientadora: Profa. Dra. Maria Goreti Carvalho Pereira

**Recife
2018**

Catálogo na fonte
Bibliotecária Arabelly Ascoli CRB4-2068

S729s Souza Sobrinha, Izabel Gomes de
Síntese e caracterização físico-química de potenciais agentes de contraste bimodais baseados em pontos quânticos e complexos de Gadolínio / Izabel Gomes de Souza Sobrinha. – 2018.
88 f.: il., fig.

Orientadora: Giovannia Araújo de Lima Pereira
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Química. Recife, 2018.
Inclui referências e apêndices.

1. Agentes de contrastes bimodais. 2. Imagem por ressonância magnética. 3. Pontos quânticos. I. Pereira, Giovannia Araújo de Lima (orientadora). II. Título.

546

CDD (22. ed.)

UFPE-FQ 2019-53

IZABEL GOMES DE SOUZA SOBRINHA

Síntese e caracterização físico-química de potenciais agentes de contraste bimodais baseados em Pontos Quânticos e complexos de Gadolínio

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFPE como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovado em: 10/08/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Giovannia Araújo de Lima Pereira (Orientadora)
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Armando Juan Navarro Vázquez
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Doutora Mariana Paola Cabrera
Departamento de Biofísica e Radiobiologia
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Departamento de Química Fundamental: técnicos, professores, servidores -principalmente Patrícia, a quem eu perturbei muitas vezes, e Eliete, que é a companhia mais calorosa no laboratório mais frio de todos. Aos funcionários de manutenção do prédio. Todos estes tornaram possível minha missão ali.

As minhas orientadoras Prof^a Giovannia e Prof^a Goreti, que dividiram toda essa jornada comigo, e eu não poderia estar em melhor companhia. Obrigada por cada ensinamento, pela generosidade e disponibilidade. Sou muito feliz e grata por serem vocês a me orientar.

A todo o grupo de pesquisa, especialmente Gabriela Marques, que me ajudou nos primeiros momentos, Bela, que tem toda minha admiração e gratidão por toda generosidade e dedicação, e a Prof^a Beate pelas contribuições que fez por vezes sem perceber, e pela alegria em todas as horas.

Agradeço a minha família (Mãe, pai, irmãos (e agregados), e sobrinhos), que foi e é o lugar onde recarrego todas as minhas energias, onde esqueço de tudo que é negativo, e onde me sinto em paz. Não conseguiria nada sem vocês.

A todos meus amigos e a minhas amigas, Amanda, Bruna, Jéssica, Jeice, Karen, Kamila, Simone, que me inspiram, e que são pra vida toda meu lugar seguro nas horas de dificuldade, e meu lugar festivo em cada pequena conquista.

A pessoa com quem espero passar todos os meus dias, Renan, muito obrigada por tudo que tu fizeste por mim, eu não imaginaria ser humano melhor pra estar ao meu lado e espero poder retribuir, ou passar o resto da vida tentando.

A todos meu muito obrigada.

RESUMO

Atualmente, uma das ferramentas de diagnóstico clínico mais comumente utilizada é a imagem por ressonância magnética (IRM). Porém, para se obter imagens com maior definição, é necessário o uso de um agente de contraste (AC), que geralmente são quelatos paramagnéticos, constituídos por um ligante orgânico e tendo como íon metálico central o gadolínio. Os ACs clinicamente aplicados fornecem imagens com contraste bem definido suficiente para diagnósticos precisos. No entanto há um potencial para otimização da eficácia observada, a qual é dada em termos da relaxividade. Esta otimização pode ser alcançada através da conjugação de quelatos paramagnéticos a um nanomaterial. Além disso, sendo um sistema nanoparticulado fluorescente, é possível obter sonda capaz de responder a uma segunda técnica de imagem, permitindo dessa forma investigações de eventos bioquímicos a nível celular, os quais são limitados na IRM. Assim, o objetivo desse trabalho foi o desenvolvimento de uma nanossonda bimodal resultante da conjugação de pontos quânticos (PQs) de CdTe estabilizados com cisteamina (CTM) sintetizados em água a complexos paramagnéticos contendo íons gadolínio, Gd(III). PQs estabilizados com cisteamina foram conjugados covalentemente, a partir da amina na CTM, a dois quelatos de Gd(III) contendo como ligantes o DOTA e DTPA, em diferentes proporções PQ:ligante. Entre 47 a 90% dos complexos foram conjugados. Para as proporções adequadas, os PQs mantiveram-se estáveis. Os sistemas apresentaram relaxividades de até $11,36 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 20 MHz por Gd(III), e até de $199,44 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 20 MHz por nanopartícula. Além disso os sistemas com o ligante DTPA apresentaram interação inespecífica com hemácias, evidenciada em microscopia de fluorescência e um percentual de marcação de 74%, equivalente ao observado para o PQ sozinho. Deste modo os sistemas obtidos são potenciais agentes de contrastes bimodais para IRM e imagem óptica.

Palavras-chave: Agentes de contraste bimodais. Imagem por ressonância magnética. Pontos quânticos. Relaxividade. Fluorescência.

ABSTRACT

Currently, one of the most commonly used clinical diagnostic tools is the magnetic resonance imaging (MRI). However, in order to obtain images with greater definition, it is necessary to use a contrast agent (CA), which are generally paramagnetic chelates, constituted by an organic ligand and having as central metallic ion the gadolinium. Clinically applied CAs provide well-defined contrast images sufficient for accurate diagnosis. However there is potential for optimization of observed efficacy, which is given in terms of relaxivity. This optimization can be achieved by conjugating paramagnetic chelates to a nanomaterial. In addition, being a fluorescent nanoparticulate system, it is possible to obtain a probe capable of responding to a second imaging technique, thus allowing investigations of biochemical events at the cellular level, which are limited in MRI. Thus, the objective of this work was the development of a bimodal nanoprobe resulting from the conjugation of CdTe quantum dots (CdTe), stabilized with cysteamine and synthesized in water, to paramagnetic complexes containing gadolinium ions, Gd (III). Cysteamine stabilized QDs were covalently conjugated, from the amine in the CTM, to two chelates of Gd (III) containing as ligands the DOTA and DTPA, in different proportions QD: ligand. Between 47 and 90% of the complexes were conjugated. For the appropriate proportions, the QDs remained stable. The systems exhibited relaxivities of up to $11.36 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ at 20 MHz per Gd (III), and up to $199.44 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ at 20 MHz per nanoparticle. In addition, the systems with DTPA ligand showed non-specific interaction with red blood cells, evidenced by fluorescence microscopy and a percentage of labeling of 74%, equivalent to that observed for QD alone. In this way the obtained systems are potential of bimodal contrast agents for MRI and optical image.

Keywords: Bimodal contrast agents. Magnetic resonance imaging. Quantum dots. Relaxivity. Fluorescence.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 — Esquema de estrutura de bandas em semicondutores macroscópicos..... 16
- Figura 2 — Representação esquemática do processo de emissão de fluorescência em um semicondutor..... 17
- Figura 3 — Representação esquemática dos tipos de confinamento quântico. 18
- Figura 4 — Representação do comportamento das bandas de valência (BV) e condução (BC) com a variação do tamanho do semicondutor. 19
- Figura 5 — Esquema ilustrativo de absorção em sistemas com: distribuição de tamanhos homogênea (linha contínua) e com distribuição de tamanhos pouco homogênea (linha tracejada). 19
- Figura 6 — Esquema ilustrativo de emissão de fluorescência em PQs livre de defeitos superficiais (A) e com defeitos superficiais (B). Em A, observa-se um pico simétrico e estreito muito bem definido. Em B há diminuição deste pico e surgimento de uma nova emissão, menos energética correspondente a transições a partir de “armadilhas” que surgem no intervalo entre BV e BC..... 20
- Figura 7 — Estrutura e pKa para alguns tióis comumente utilizados para estabilizar PQs..... 22
- Figura 8 — Perfis típicos de espectros de emissão e absorção de PQs (esquerda) e corantes orgânicos (direita). Os largos espectros de absorção permitem que fontes com diferentes comprimentos de onda sejam usados para excitar os PQs, enquanto que para o corante orgânico a excitação ocorre para cada comprimento de onda específico. 23
- Figura 9 — (A) Representação esquemática dos prótons em um sistema na ausência de um campo magnético externo (B_0); (B) Alinhamento dos prótons após serem colocados sob B_0 , criando uma pequena magnetização resultante de equilíbrio (M_0); (C) Representação em ampulheta da precessão dos prótons ao redor do eixo z de B_0 28

Figura 10 —	Estruturas de alguns ACs baseados em Gd.	32
Figura 11 —	Representação esquemática dos 'três tipos' de moléculas de água em um complexo paramagnético alguns dos parâmetros relacionados que contribuem para a relaxividade total.	36
Figura 12 —	Mecanismo de formação de ligação amida a partir da reação assistida com EDC e Sulfo-NHS.	42
Figura 13 —	Síntese de PQ de CdTe estabilizado por cisteamina.	49
Figura 14 —	Esquema de conjugação do complexo Gd-DOTA ao PQ de CdTe através da reação assistida por EDC e sulfo-NHS.	52
Figura 15 —	Esquema de purificação dos sistemas bimodais obtidos.	53
Figura 16 —	Esquema de conjugação do ligante DOTA ao PQ de CdTe através da reação assistida por EDC e sulfo-NHS, seguida da complexação de Gd ³⁺	54
Figura 17 —	Esquema de conjugação do ligante DTPA ao PQ de CdTe seguida da complexação de Gd ³⁺	54
Figura 18 —	Esquema de conjugação do ligante DTPA ao PQ de CdTe através da reação assistida por EDC e sulfo-NHS, seguida da complexação de Gd ³⁺	55
Figura 19 —	Suspensão coloidal aquosa contendo PQs de CdTe-CTM (A) sob iluminação comum (luz branca) e (B) sob lâmpada UV ($\lambda = 365$ nm).	60
Figura 20 —	Espectros absorção eletrônica (linha contínua) e de emissão (linha tracejada) de uma suspensão coloidal contendo de CdTe-CTM ($\lambda_{exc} = 365$ nm)	61
Figura 21 —	Acima: sistemas fotografados 6-7 dias após preparo, sem lavar. Abaixo: sistemas lavados logo após obtenção, fotografados 3 meses depois.	62
Figura 22 —	Sistemas 1:10 após 5 meses; Todos os sistemas passaram previamente por etapas de lavagem e transferências de alíquotas para relaxometria. Acima em luz branca e abaixo sob lâmpada $\lambda = 365$ nm.	63
Figura 23 —	Espectros de emissão e absorção (normalizados) dos sistemas S1 comparados ao PQ.	64

Figura 24 —	Espectros de emissão e absorção (normalizados) dos sistemas S3 comparados ao PQ.....	65
Figura 25 —	Varição da taxa de relaxação longitudinal ($R_1=1/T_1$) em função da concentração de íons Gd^{3+} dos complexos paramagnéticos (20MHz, 37°C).	67
Figura 26 —	Comparação entre variação da taxa de relaxação longitudinal dos sistemas bimodais com maior número de complexos por PQ com os complexos correspondentes de acordo com a concentração de Gd^{3+} a 20 MHz e 37 °C.....	68
Figura 27 —	Evolução de $R_1(t)/R_1(0)$ para Gd-DOTA e Gd-DTPA ao longo de aproximadamente 5 dias.....	74
Figura 28 —	Análise por microscopia de fluorescência da marcação de hemácias com o sistema bimodal S3 na proporção (A) 1:20 e (B) 1:30.....	76
Figura 29 —	Citometria de fluxo para os sistemas S1 e S3 nas proporções 1:20 e 1:30.	77

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AC	Agente de contraste
BC	Banda de condução
BV	Banda de valência
CdS	Sulfeto de cádmio
CdTe	Telureto de cádmio
CTM	Cisteamina
DOTA	Ácido 1,4,7,10- tetraaza ciclododecano-1,4,7,10-tetracético
DTPA	Ácido de dietilenotriaminapenta-acético
EDC	N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Eg	Separação energética entre BV e BC, energia da região proibida
FSN	Fibrose sistêmica nefrogênica
FWHM	Largura à meia altura. Do inglês <i>full width at half maximum</i>
Gd ³⁺	Íon gadolínio
ICP-OES	Espectrometria de emissão óptica de plasma acoplado indutivamente
IO	Imagem Óptica
IRM	Imagem por Ressonância Magnética
IS	Esfera interna de coordenação
OMS	Organização Mundial da Saúde
OS	Esfera externa de coordenação
PBS	Solução tampão fosfato. Do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
PQ	Ponto Quântico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
S1	Sistema bimodal obtido pela complexação DOTA-Gd ³⁺ seguida de conjugação ao PQ, assistida por EDC e Sulfo-NHS
S2	Sistema bimodal obtido pela conjugação do ligante DOTA ao PQ, assistida por EDC e Sulfo-NHS, e posterior complexação de Gd ³⁺
S3	Sistema bimodal obtido pela conjugação do ligante DTPA ao PQ e posterior complexação de Gd ³⁺
S4	Sistema bimodal obtido pela conjugação do ligante DTPA ao PQ, assistida por EDC e Sulfo-NHS, e posterior complexação de Gd ³⁺
	Sulfo-NHSN-hidroxissulfo-succinimida

LISTA DE PRINCIPAIS SÍMBOLOS

r	Diâmetro médio das nanopartículas
A	Absorbância
l	Caminho óptico (largura da cubeta)
ϵ	Coeficiente de extinção molar
$T_{i,d \text{ ou } p}$	Tempo de relaxação ($i=1$ longitudinal, $i=2$ transversal) diamagnético ou paramagnético
R_i	Taxa de relaxação ($i=1$ longitudinal, $i=2$ transversal)
r_i	Relaxividade ($i=1$ longitudinal, $i=2$ transversal)
$[C_p]$	Concentração molar da espécie paramagnética
T_{im}	Tempo de relaxação eletrônica longitudinal ($i=1$) e transversal ($i=2$) dos prótons de moléculas de água
$\Delta\omega_m$	Diferença de deslocamento químico entre moléculas de água livres e coordenadas
μ_B	Magneton de Bohr
r_{GdH}	Distância entre o íon Gd^{3+} e o próton da água
μ_0	Permeabilidade magnética no vácuo
A/\hbar	Constante de acoplamento hiperfina entre os elétrons do metal e os prótons da água
τ_R	Tempo de correlação rotacional da molécula/complexo
τ_M	Tempo médio de residência dos prótons da água coordenada
$1/T_{ie}$	Taxa de relaxação eletrônica do íon metálico
T_{je}	Tempo de relaxação eletrônico
$J(\omega_i; T_{je})$	Função de densidade espectral não-Lorentziana
N_A	Constante de Avogadro
a_{GdH}	Menor distância entre os prótons do solvente na esfera externa e o centro paramagnético
D_{GdH}	Soma dos coeficientes de difusão dos prótons da água e do complexo
τ_{GdH}	Tempo de correlação da difusão
τ_C	Tempo de correlação total
q	Número de moléculas de água coordenadas ao centro paramagnético
k_{ex}	Velocidade de troca de água

^1H	Núcleos de hidrogênio
J	Momento angular intrínseco
B_0	Campo magnético externo
S	Spin total
s	Número quântico de spin
μ	Momento magnético intrínseco
q	Carga do próton,
m	Massa do próton
g	Fator de Landé
α	Estado de menor energia do momento angular do próton
β	Estado de maior energia do momento angular do próton
ω	Frequência de Larmor
γ	Constante giromagnética
N	Número de espécies num dado estado de energia
M_0	Magnetização resultante de equilíbrio
M_z	Magnetização resultante no eixo z
T	Temperatura em kelvin
K	Constante de Boltzman
e^-	Elétron
h^+	Vacância de elétron
h	Constante de Planck
\hbar	Constante de Planck reduzida (dividida por 2π)
ν	Frequência da radiação eletromagnética
λ	Comprimento de onda da radiação eletromagnética
ϵ_0	Constante dielétrica para o semicondutor
ϵ	Constante de permissividade do vácuo
m_0	Massa do elétron em repouso,
e	Carga do elétron
m_{e^*}	Massa efetiva do elétron
m_{h^*}	Massa efetiva do buraco
a_B	Raio de Bohr para o éxciton

SUMÁRIO

1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
1.1	PONTOS QUÂNTICOS.....	15
1.2	IMAGEM POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA (IRM).....	24
1.2.1	Relaxação Nuclear	25
1.3	AGENTES DE CONTRASTE PARA IRM.....	29
1.3.1	Quelatos Paramagnéticos Contendo Íons Gadolínio.....	31
1.4	MECANISMOS DE RELAXAÇÃO PARAMAGNÉTICA E RELAXIVIDADE	35
1.5	SISTEMAS BIMODAIS BASEADOS EM PONTOS QUÂNTICOS CONJUGADOS A QUELATOS DE GD ³⁺	40
1.6	ASSOCIAÇÃO DE PQS E QUELATOS DE GADOLÍNIO POR CONJUGAÇÃO COVALENTE	41
2	OBJETIVOS	47
2.1	OBJETIVO GERAL	47
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
3	METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	48
3.1	SÍNTESE DE PONTOS QUÂNTICOS DE TELURETO DE CÁDMIO ESTABILIZADOS COM CISTEAMINA (CDTE- CTM).....	48
3.2	PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS BIMODAIS.....	49
3.2.1	Sistemas com ligante DOTA	51
3.2.1.1	Complexação Gd-DOTA antes da conjugação ao PQ (S1):.....	51
3.2.1.2	Complexação Gd-DOTA após conjugação ao PQ (S2):	53
3.2.2	Sistemas com ligante DTPA.....	54
3.2.2.1	Complexação Gd-DTPA após conjugação ao PQ, sem EDC e sulfonhs (S3):.....	54
3.2.2.2	Complexação Gd-DTPA após conjugação ao PQ, com EDC e sulfonhs (S3):.....	54
3.3	CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA.....	55
3.4	ICP-OES	56
3.5	CARACTERIZAÇÃO RELAXOMÉTRICA	56
3.6	ENSAIO DE TRANSMETALAÇÃO	57

3.7	MARCAÇÃO CELULAR E CITOMETRIA DE FLUXO.....	59
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4.1	PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PQS (CDTE-CTM).....	60
4.2	PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS BIMODAIS.....	62
4.3	CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS BIMODAIS: CDTE-CTM/L-GD..	63
4.3.1	Caracterização óptica.....	63
4.3.2	Caracterização relaxométrica.....	65
4.4	TRANSMETALAÇÃO.....	73
4.5	MARCAÇÃO CELULAR.....	75
4.6	CITOMETRIA DE FLUXO.....	76
5	CONCLUSÃO.....	79
6	PERSPECTIVAS.....	80
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 PONTOS QUÂNTICOS

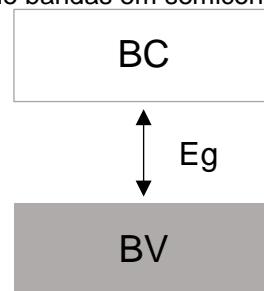
Em nanoescala, diversos materiais têm suas propriedades diferenciadas em relação ao material macroscópico, e esta é uma das razões pelas quais a nanotecnologia é atualmente uma das áreas da ciência e tecnologia que tem despertado amplo interesse de muitos pesquisadores. Uma das classes de materiais que tem suas propriedades alteradas em função do tamanho são os denominados pontos quânticos (PQs) (PEREIRA, *et al.*, 2016).

Nanocristais de semicondutores com tamanhos variando entre 2 – 10 nm são chamados de pontos quânticos (PQs) (em inglês: *Quantum dots*). Os PQs são diferenciados de outros materiais devido ao regime de confinamento quântico no qual se encontram, o que lhes confere propriedades ópticas únicas, que permitem sua ampla aplicabilidade em: dispositivos optoeletrônicos e fotovoltaicos, biomarcação, construção de superestruturas, amplificadores ópticos para redes de telecomunicações (GAPONIK, *et al.*, 2002; GUO, YANG e WANG, 2005; PEREIRA, *et al.*, 2016).

Para compreender as razões que conferem aos PQs as propriedades ópticas únicas, é necessário que se compreenda um pouco mais de sua estrutura eletrônica. Como para todo sólido cristalino, é possível entender a estrutura eletrônica dos PQs na forma de **bandas de energia**. Quando se estabelecem as ligações químicas para formar esses nanocristais, todos os muitos elétrons em um certo nível de energia, de todas as espécies no cristal, ocupam orbitais energeticamente semelhantes. Quanto maior o número de átomos no cristal, mais próximos estão esses níveis de energia, até que não seja mais possível diferenciar cada um desses estados energéticos, que passam a ser compreendidos então como uma região de energia contínua, ou seja uma **banda de energia**. Existem limites importantes nessas estruturas de bandas: os estados eletrônicos ocupados de maior energia e os estados excitados permitidos de menor energia, os quais correspondem aos extremos entre a **banda de valência** (BV) e **banda de condução** (BC), respectivamente (BRUS, 1984; TAKAGAHARA e TAKEDA, 1992; OLIVEIRA, 1995; ALIVISATOS, 1996).

Entre a BV e a BC existem estados energéticos proibidos. Esse intervalo de energia é denominado de **região de energia proibida** (ou *band gap*) e a separação energética entre o estado ocupado mais energético e o estado excitado de mais baixa energia é denominada de E_g , como no esquema na Figura 1. De outro modo, para que o sistema seja excitado é necessário que seja fornecido um mínimo de energia igual a E_g . Os semicondutores são caracterizados por valores de E_g menores ou iguais a 3 eV.

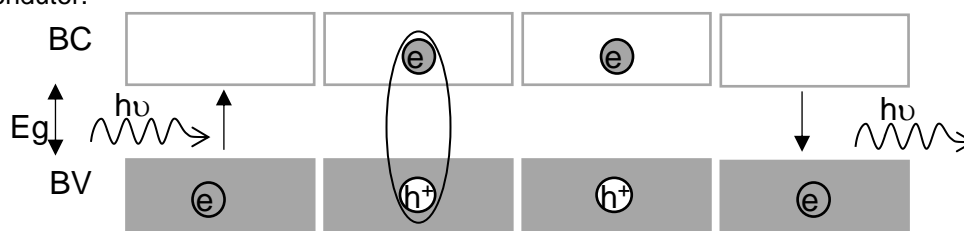
Figura 1 — Esquema de estrutura de bandas em semicondutores macroscópicos.



Fonte: Autoria própria.

Quando um fóton de energia superior a E_g interage com um elétron na BV do semiconductor, este elétron migra para a BC, gerando uma vacância (um buraco virtual na camada de valência). Esse buraco (h^+) possui carga igual à do elétron (e^-), mas de sinal oposto. Esse par é normalmente referido como **par elétron-buraco**, sendo o estado ligado que surge em decorrência desse par é denominado **éxciton**, e a fluorescência observada em semicondutores deve-se a interação da radiação com essa espécie. Uma vez fornecida energia $h\nu$, elétrons (e^-) são excitados e ocupam a banda de condução (BC) deixando um buraco (h^+) na banda de valência (BV), este par comporta-se como uma espécie ligada, o éxciton. Após um curto período de tempo, ocorre o relaxamento com a consecutiva emissão de fluorescência. ($E = h\nu$, onde h é a constante de Planck e ν é a frequência da luz) (Figura 2) (BRUS, 1984), (TAKAGAHARA e TAKEDA, 1992), (OLIVEIRA, 1995).

Figura 2 — Representação esquemática do processo de emissão de fluorescência em um semiconductor.



Fonte: Autoria própria.

De modo análogo à E_g , o raio do excitônio representa a distância entre BV e BC no cristal, é uma propriedade dependente da composição e do tamanho das partículas do semiconductor. Nessa situação, nem o elétron e nem o buraco, constituintes do excitônio, se movem de maneira independente devido a forças coulombianas presentes. Uma vez que o par elétron-buraco é tratado como uma espécie hidrogenóide, é possível utilizar das descrições de Bohr para o átomo de hidrogênio para calcular o raio aproximado do excitônio (a_B -Equação 1), ou raio de Bohr do excitônio, considerando também a aproximação de massa efetiva (ÉFROS e ÉFROS, 1982):

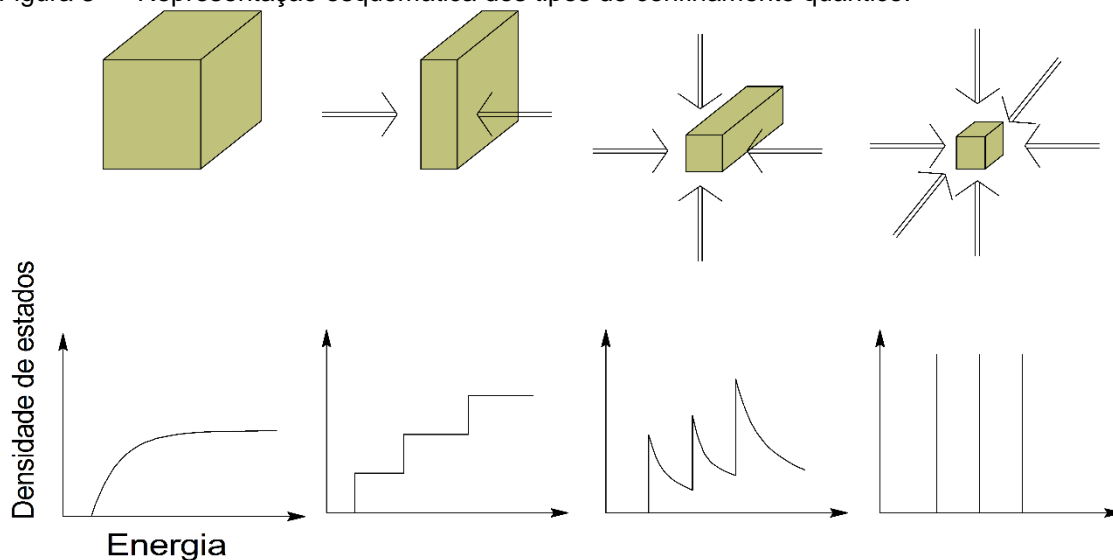
$$a_B = \frac{4\pi\hbar\epsilon_0\epsilon}{m_0e^2} \left[\frac{1}{m_e^*} + \frac{1}{m_h^*} \right] \quad (1)$$

Onde \hbar é a constante de plank reduzida, ϵ_0 é a constante dielétrica para o semiconductor, ϵ é a constante de permissividade do vácuo, m_0 é massa do elétron em repouso, e é a carga do elétron, m_e^* e m_h^* são as massas efetivas do elétron e do buraco, respectivamente. As constantes ϵ , m_e^* e m_h^* são medidas que dependem da composição, sendo assim cada semiconductor apresenta diferentes valores. As massas efetivas são valores relacionados ao comportamento da massa das partículas carregadas em movimento no interior do cristal.

Ao entrar na escala nanométrica, quando as dimensões das partículas passa a ser menor que o raio de Bohr do excitônio, estas se encontram em confinamento quântico, que pode ocorrer em uma, duas ou nas três dimensões (Figura 3), no qual os limites entre as BV e BC passam a ser determinados pelos limites da partícula. Em outros termos, é possível entender o confinamento quântico de modo análogo a ideia da partícula numa caixa de potencial externo

infinito, onde a partícula funciona como uma caixa esférica (BRUS, 1984), (TAKAGAHARA e TAKEDA, 1992), (PEREIRA, *et al.*, 2016).

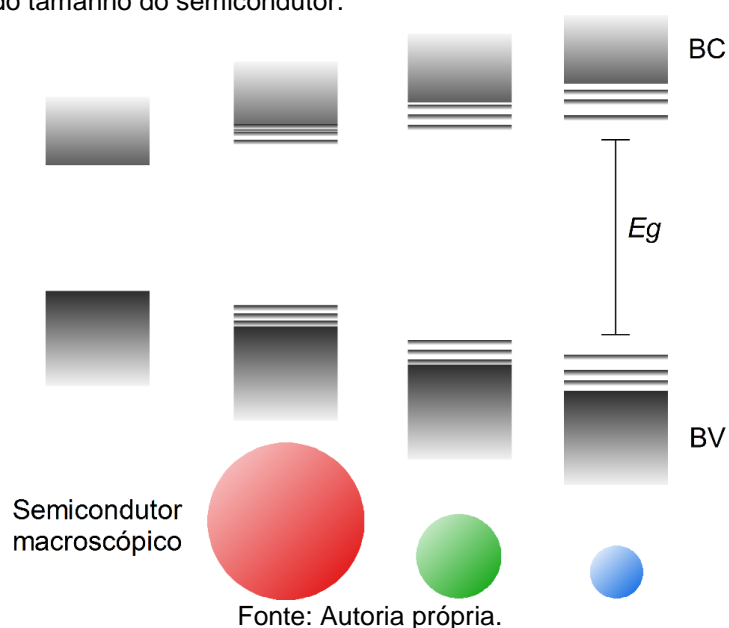
Figura 3 — Representação esquemática dos tipos de confinamento quântico.



Fonte: Autoria própria

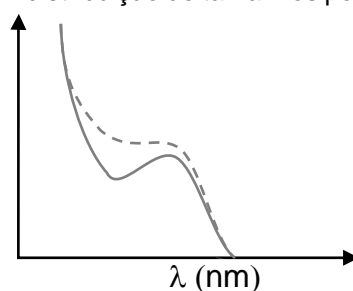
Quando em confinamento quântico, a estrutura de bandas passa então a apresentar níveis discretos e quantizados de energia, semelhante a espécies simples, como átomos, e por isso algumas vezes os PQs são chamados de átomos artificiais. É possível perceber, então, que variando o tamanho da partícula, mesmo sem variar sua composição (Figura 4), obtêm-se nanocristais com estados eletrônicos distintos energeticamente, e, portanto, as propriedades ópticas tais como absorção eletrônica e fotoluminescência, por exemplo, alteram drasticamente com a quantização de semicondutores. Esta é uma das mais importantes características particulares dos PQs (BRUS, 1984; TAKAGAHARA e TAKEDA, 1992; PEREIRA, *et al.*, 2016).

Figura 4 — Representação do comportamento das bandas de valência (BV) e condução (BC) com a variação do tamanho do semiconductor.



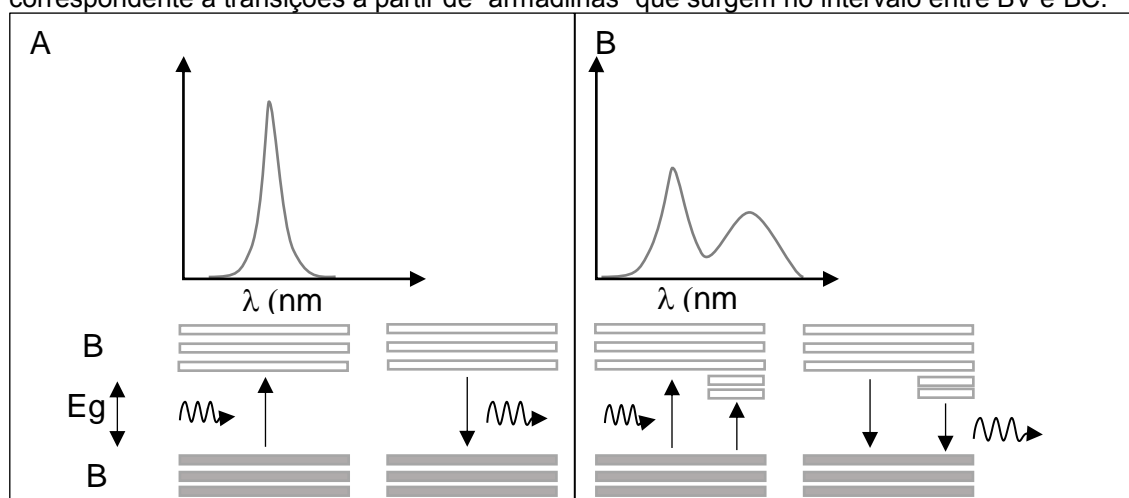
Os espectros eletrônicos dos PQs apresentam algumas diferenças em relação ao material macroscópico de mesma composição. No espectro de absorção dos PQs onde o primeiro máximo está relacionado a primeira transição permitida para o nanocrystal; esta transição é quantizada dado o confinamento, quanto mais homogêneos os tamanhos das partículas, mais estreita é essa banda (Figura 5). Modelos matemáticos permitem o cálculo aproximado do diâmetro das partículas a partir deste primeiro máximo de absorção (ÉFROS e ÉFROS, 1982; OLIVEIRA, 1995). Além disso, o espectro de absorção dos PQs permite estimar também a concentração aproximada, pela lei de Beer-Lambert, uma vez que há uma relação entre o coeficiente de extinção e a concentração (YU, QU e PENG, 2003).

Figura 5 — Esquema ilustrativo de absorção em sistemas com: distribuição de tamanhos homogênea (linha contínua) e com distribuição de tamanhos pouco homogênea (linha tracejada).



Já o espectro de emissão, mais precisamente a largura a meia altura (FWHM- do inglês *full width at half maximum*) da banda, está diretamente relacionada a defeitos na superfície dos PQs. Estes defeitos levam ao surgimento de estados eletrônicos intermediários, entre a BV e a BC, que podem competir com a emissão principal esperada para o sistema, podendo ocorrer alargamento e/ou diminuição de intensidade da banda de emissão (Figura 6). Uma vez que PQs sejam obtidos em suspensão coloidal, devido às dimensões nanométricas, a área superficial é bastante grande, logo o número de espécies na superfície contribui para a diminuição da tensão superficial (PEREIRA, *et al.*, 2016; EYCHMÜLLER, LESNYAK e GAPONIK, 2013).

Figura 6 — Esquema ilustrativo de emissão de fluorescência em PQs livre de defeitos superficiais (A) e com defeitos superficiais (B). Em A, observa-se um pico simétrico e estreito muito bem definido. Em B há diminuição deste pico e surgimento de uma nova emissão, menos energética correspondente a transições a partir de “armadilhas” que surgem no intervalo entre BV e BC.



Fonte: Autoria própria.

A composição dos PQs é geralmente uma combinação de elementos dos grupos II e IV, ou III e V, que pode apresentar montagens de núcleo e casca (*core-shell*), onde no núcleo está o PQ de menor *band gap* e, portanto, responsável pelas propriedades ópticas, sendo este coberto por uma ou mais camadas de um segundo semiconductor de *band gap* maior. Essa estrutura núcleo e casca além de proteger o núcleo da degradação, tem também a função de eliminar os defeitos superficiais do núcleo que ocorrem devido à vacância de átomos, descontinuando a rede cristalina e permitindo o surgimento de armadilhas entre as BV e BC, como demonstrado na Figura 6. Destes grupos citados, alguns dos PQs mais amplamente estudados são os calcogenetos de

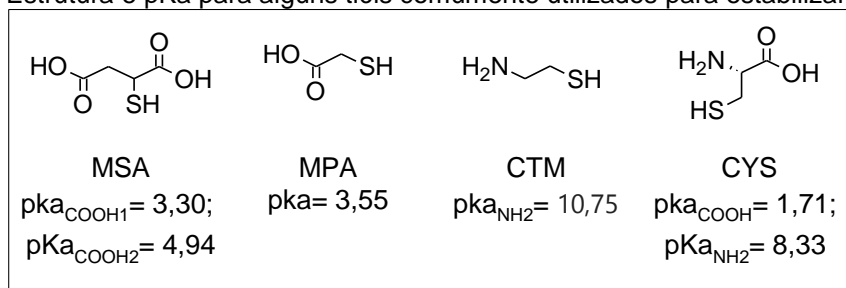
cádmio - os núcleos: CdTe, CdSe, CdS, e em montagens núcleo-casca: CdTe/CdS, CdSe/CdS. Diversos outros ganham espaço a cada dia, como os que contêm zinco, como por exemplo: ZnSe, ZnTe, ZnS, ZnSe/ZnS, CdTe/ZnS. Há ainda relatos de síntese de PQs compostos por metais nobres como Au, Ag, Cu, Pd e Pt. Desde que começaram a ser sintetizados, na década de 80, as rotas sintéticas para obtenção dos PQs evoluíram na direção de tamanhos mais homogêneos, maior estabilidade, superfícies livres de defeitos, rendimentos quânticos mais altos, facilidade e menor custo de obtenção. E, uma vez conhecido seu potencial para aplicações biológicas, obtenção de PQs estabilizados em meio aquoso tem-se destacado (EKIMOV e ONUSHCHENKO, 1982; GAPONIK, *et al.*, 2002; LI, *et al.*, 2005; PEREIRA, *et al.*, 2016).

A síntese de PQs em meio aquoso teve seu início ainda na década de 80, mas foi na década de 90 que foram relatadas as primeiras sínteses de PQs coloidais em meio aquoso (ROGACH, *et al.*, 1996; GAPONIK, *et al.*, 2002; NOZIK, RAJH e MICIC, 1993). Das metodologias de síntese aquosa, cabe destacar a síntese de PQs estabilizados com alquiltióis, primeiramente relatada por Nozik *et al.* (1993). Através dessa metodologia são fornecidas suspensões coloidais de PQs relativamente resistentes à oxidação, conservando suas propriedades ópticas com uma distribuição de tamanho estreita. Tal metodologia consiste essencialmente na injeção do calcogênio reduzido em uma solução aquosa do metal oxidado com o alquiltiól, em pH que promova a desprotonação do grupo SH, a partir de então o aquecimento da mistura permite a precipitação controlada de nanocristais que aumentam de tamanho de acordo com o tempo em aquecimento. É possível obter, por exemplo, PQs de CdTe luminescentes em quase todo espectro visível, variando a razão molar dos reagentes e tempo de aquecimento. Alguns dos aspectos em otimização para esta síntese são principalmente relativas a facilidade de oxidação de alguns dos tióis utilizados para recobrir os PQs, assim como tentativas de aumento do rendimento quântico observado (NOZIK, RAJH e MICIC, 1993; ROGACH, *et al.*, 1996; GAPONIK, *et al.*, 2002; EYCHMÜLLER, LESNYAK e GAPONIK, 2013).

Diversos tióis de cadeia curta são utilizados como estabilizantes para os PQs, o ácido tioglicólico (TGA) e o ácido 3-mercaptopropiônico (MPA) encontram-se entre os mais utilizados, fornecem uma superfície de carga negativa, assim como o ácido mercaptossuccínico (MSA) ao contrário de

cisteína (Cys) e cisteamina (CTM) (Figura 7), sendo esses últimos menos utilizados. A superfície do PQ contendo esses estabilizantes torna-se, além de **estável**, uma vez que recobre o núcleo complementando as ligações anteriormente vacantes, e **carregada**, atribuindo estabilidade coloidal, **funcionalizada** pelos grupos amino e/ou carboxila. Essa funcionalização facilita a **conjugação de biomoléculas** possibilitando aplicações biológicas, uma vez que a ligação covalente, através de grupos funcionais, é a estratégia de bioconjugação mais utilizada, podendo ocorrer também através de adsorção, quelação ou troca de ligantes (GAPONIK e ROGACH, 2010; EYCHMÜLLER, LESNYAK e GAPONIK, 2013; KAIRDOLF, *et al.*, 2013; LI e ZHU, 2013).

Figura 7 — Estrutura e pKa para alguns tióis comumente utilizados para estabilizar PQs.

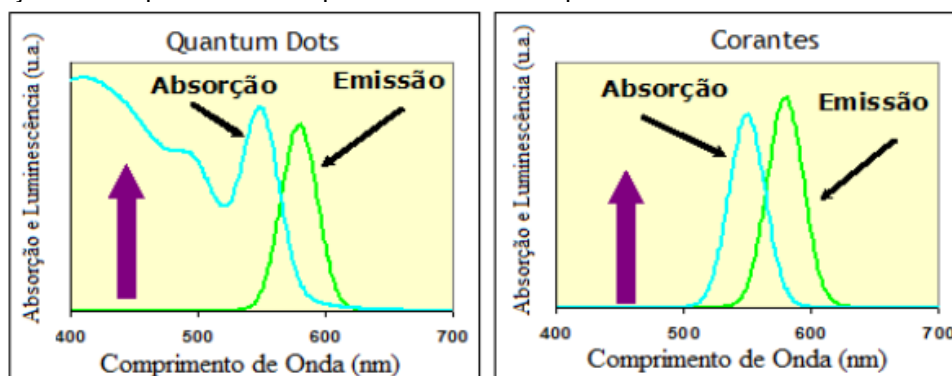


Fonte: Autoria própria a partir de ACD/ChemSketch.

Imageamento e marcação de espécies biológicas são importantes aplicações de PQs, possíveis graças à possibilidade de funcionalização da superfície dos PQs que permite a conjugação destes à sistemas biológicos de interesse. Para que sejam possíveis tais aplicações, os PQs devem apresentar estabilidade no meio biológico (seja *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*) e capacidade de interagir com biomarcadores associados ao alvo a ser analisado (órgão, tumor, bactéria etc.). Algumas estratégias bem-sucedidas consistem no direcionamento do PQ a proteínas e ácidos nucléicos biomarcadores, ou mesmo para a membrana de células metabolicamente alteradas. Tais estratégias geralmente envolvem a funcionalização do PQ à espécies bioativas capazes de direcionar o sistema ao alvo (KAIRDOLF, *et al.*, 2013; LI e ZHU, 2013). Uma vez que o marcador fluorescente encontra o alvo é possível realizar o imageamento através de técnicas de Imagem óptica (IO), onde tipicamente cromóforos orgânicos são utilizados para obtenção de imagem ou marcação. No entanto, PQs são candidatos a substitutos desses compostos uma vez que apresentam

melhor (i) fotoestabilidade, (ii) bandas de emissão estreitas, (iii) elevado rendimento quântico, (iv) espectro de absorção largo que permite excitação com fontes de diferentes comprimentos de onda (Figura 8) (RESCH-GENGER, *et al.*, 2008).

Figura 8 — Perfis típicos de espectros de emissão e absorção de PQs (esquerda) e corantes orgânicos (direita). Os largos espectros de absorção permitem que fontes com diferentes comprimentos de onda sejam usados para excitar os PQs, enquanto que para o corante orgânico a excitação ocorre para cada comprimento de onda específico.



Fonte: (SANTOS, FARIAS e FONTES., 2008).

Em 1998 dois importantes grupos, Bruchez *et. al* e Nie *et. al*, foram os primeiros a relatar o uso de PQs como marcadores de sistemas biológicos. Desde então diferentes estudos vêm explorando aplicações biológicas para os PQs (BRUCHEZ, *et al.*, 1998), (NIE e CHAN, 1998). Mais recentemente, temos o exemplo do estudo de Cabral-Filho *et al.* onde PQs de CdTe foram conjugados covalentemente a transferrina (Tf- proteína de transporte de ferro no sangue), para quantificar e avaliar a distribuição dos receptores desta proteína em três linhas de células distintas, HeLa (células tumorais de câncer cervical), DBTRG-05MG e U87 (células de glioblastoma). A marcação das células ocorreu principalmente nas linhas HeLa e DBTRG-05MG e com alta especificidade (CABRAL-FILHO, *et al.*, 2016). Em 2017 Guo *et. al* descrevem o uso de PQs de CdTe/CdS estabilizados com MPA e covalentemente conjugados a anticorpos para detecção de um microorganismo em leite, utilizando luz UV (Ultravioleta) em um método cromatográfico. Os autores destacam a simplicidade, sensibilidade e rapidez do teste como uma alternativa para os métodos já estabelecidos (GUO, *et al.*, 2017). Estas possibilidades de modificação na estrutura superficial dos PQs são uma grande chave para a diversidade de aplicações destes nanocristais.

1.2 IMAGEM POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA (IRM)

A imagem por ressonância magnética (IRM) é uma das mais importantes técnicas de obtenção de imagem para diagnóstico clínico já desenvolvidas, principalmente pelo fato de ser uma técnica considerada como sendo não-invasiva, não-destrutiva e capaz de fornecer visualização de tecidos moles como cérebro, coração e músculos, assim como de tumores. Baseada no sinal de ressonância magnética nuclear (RMN) dos núcleos de hidrogênio (^1H) da água (comumente chamado de prótons), apresenta importantes diferenciais em relação a outras técnicas, tais como: (i) melhor resolução espacial - podendo atingir milímetros, e em alguns casos a cerca de $10\ \mu\text{m}$; (ii) ausência de radiação ionizante; (iii) pode diferenciar tecido doente do tecido saudável; (iv) obtenção da imagem em qualquer direção do corpo (PEREIRA e GERALDES, 2007; ZHANG, *et al.*, 2016).

Em 1971, Damadian propôs o uso da ressonância magnética para detecção de tumores através de medidas de tempos de relaxação nuclear, onde o autor baseava-se nas recentes descobertas acerca do comportamento dos prótons da água nas células (DAMADIAN, 1971).

Em 1973 Lauterbur publicou o primeiro relato de obtenção de imagem através da técnica de ressonância magnética, obtendo uma imagem bidimensional de dois capilares contendo água foi obtida (LAUTERBUR, 1973).

Em 1974, novamente Damadian, recebeu patente devido ao seu trabalho (entregue em 1972) no desenvolvimento de equipamento e método (o FONAR-*Field focused nuclear magnetic resonance*) para detecção de câncer em tecidos, o equipamento era capaz de escanear todo corpo (DAMADIAN, 1974).

A partir do trabalho de Lauterbur, Hinshaw, Bottomley e Holland em 1977, que demonstrou a obtenção de uma imagem de um punho esquerdo, a qual ocorria a partir do deslocamento simultâneo de dois gradientes de campo ortogonais uniformes com diferentes dependências de tempo. Na presença de um terceiro campo estático, a imagem gerada trata-se de um mapa bidimensional da distribuição da medida de RMN na amostra (HOLLAND, BOTTOMLEY e HINSHAW, 1977).

Ainda em 1977, mais uma vez Damadian, em colaboração com Goldsmith e Minkoff, comunicam o uso do método FONAR na obtenção de uma imagem de uma seção transversal de um tórax em um humano vivo, a obtenção da imagem consistia numa distribuição do sinal relacionado a densidade de spins com diferentes tempos de relaxação spin-rede (T_1), mais um dos conceitos os quais trataremos a seguir (1.4) (DAMADIAN, GOLDSMITH e MINKOFF, 1977).

Como em média 70% da massa corpórea humana é constituída de água, é possível obter imagens de todo o corpo através da RM (HENDERSON, 1983), (CARAVAN, 2006), (PEREIRA, 2008). Existe uma relação entre o sinal e a posição, em três dimensões (3D), visto que os equipamentos de RM apresentam três gradientes de campo, em três direções perpendiculares entre si. É possível selecionar um corte bidimensional (um plano), deste modo é possível obter imagens (em escala de cinza) onde cada unidade de volume da imagem corresponde a uma frequência espacial, as quais são tipicamente geradas por transformada discreta de Fourier (DFT). As diferentes intensidades de sinais que permitem o contraste na imagem, são moduladas pelo tempo relacionado ao desaparecimento do vetor M_z , ou seja, ao tempo para que os prótons de moléculas de água 'percam magnetização'. Esses tempos são denominados tempos de **relaxação**, dos quais trataremos na seção 1.4 (PEREIRA, 2008).

Atualmente IRM é uma das técnicas de imagem para diagnóstico mais amplamente utilizadas. Segundo a OMS, em 2014, em alguns países da Europa, e o Canadá possuíam aproximadamente entre 5,5 e 132,2 equipamentos de IRM por milhão de habitantes, enquanto em países da África os números estavam entre 0 e 0,07 (WHO, 2014) No Brasil, a recomendação vigente é de 0,5 equipamentos por milhão de habitantes (BAHIA, 2002).

1.2.1 Relaxação Nuclear

Para compreender do que se trata o fenômeno de relaxação nuclear podemos partir do fenômeno da ressonância magnética. Propriedades magnéticas existem para quaisquer partículas carregadas, no entanto, em pequena escala tais propriedades não podem ser compreendidas de acordo com a mecânica clássica (EISBERG e RESNICK, 1979; FEYNMAN, LEIGHTON e

SANDS, 2008). Na técnica de IRM o sinal que dá origem às imagens obtidas é proveniente de cada próton no núcleo dos átomos de hidrogênio das moléculas de água do organismo, comumente se refere ao átomo de hidrogênio como próton.

No caso dos prótons (o que aqui podemos estender para os núcleos de hidrogênio, assim como para toda partícula elementar carregada) seu movimento em torno de seu próprio eixo apresenta um momento angular intrínseco (J), na presença de um campo magnético externo (B_0). O número máximo de estados permitidos para J é quantizado por $(2S + 1)$, onde S é o spin total), através do número quântico de spin (s), que assume valores de $+s$ a $-s$, variando de uma unidade.

O spin do próton é de $\frac{1}{2}$, existem, portanto, dois valores para o número quântico de spin (s) do próton: $\frac{1}{2}$ e $-\frac{1}{2}$. Sua direção exata não pode ser definida, mas é possível quantificar J ao longo de um eixo determinado. Por consequência, há também um momento magnético intrínseco (μ) (Equação 2).

$$\mu_z = g\left(\frac{q}{2m}\right)J_z \quad (2)$$

Onde, q é carga do próton, m sua massa, g é o fator de Landé (característico para cada espécie).

Num campo fraco (livre de perturbação dos movimentos internos), pode-se relacionar uma componente do momento magnético (J_z) e angular (μ_z) com a variação de energia por (Equação 3) (EISBERG e RESNICK, 1979), (FEYNMAN, LEIGHTON e SANDS, 2008):

$$\Delta E = -g\left(\frac{q}{2m}\right)J_z \cdot B_0 \quad (3)$$

Os dois valores de s para o próton refletem os dois estados de energia de seu momento angular, os quais são normalmente denominados α (relacionado a $s=\frac{1}{2}$) e β (relacionado a $s=-\frac{1}{2}$) (PEREIRA, 2008).

O movimento dos prótons, assim como um giroscópio, consiste num movimento de precessão, decorrente da interação entre o campo e o momento magnético, conseqüentemente, a componente do momento angular (J_z) “move-

se” também em precessão, entre os estados permitidos (HENDERSON, 1983), (FEYNMAN, LEIGHTON e SANDS, 2008).

A frequência de precessão, novamente considerando um campo fraco é dada por (Equação 4):

$$\omega = g \frac{q\hbar}{2m} B_0 \quad (4)$$

Que é o chamado Teorema de Larmor, quando $g=1$. O conjunto de constantes que multiplicam o valor de B_0 é a constante giromagnética γ multiplicada por \hbar (FEYNMAN, LEIGHTON e SANDS, 2008), (PEREIRA, 2016).

Na ausência de um campo magnético externo, os spins nucleares distribuem-se aleatoriamente sem orientação definida. Porém, na presença de B_0 , sendo este intenso e homogêneo, os spins magnéticos tendem a assumir determinadas orientações. Estas orientações são definidas pelo número de spin S , segundo a mecânica quântica, onde o número de orientações possíveis é igual a $2S+1$. Por exemplo, o próton de um átomo de hidrogênio, que possui número de spin S igual a $\frac{1}{2}$, ao sofrer a ação de um campo magnético externo pode orientar-se de duas formas com relação ao campo externo aplicado B_0 : (i) paralelo com B_0 e (ii) antiparalelamente a B_0 . As duas orientações representam diferentes estados energéticos, sendo o estado de menor energia aquele que se encontra paralelamente alinhado com B_0 e é denominado estado α (ou $+\frac{1}{2}$), e o estado de maior energia, o antiparalelo a B_0 , é denominado estado β (ou $-\frac{1}{2}$). A distribuição dos spins nos dois níveis é regida pela distribuição de Boltzmann (Equação 5 **Error! Reference source not found.**) (FEYNMAN, LEIGHTON e SANDS, 2008):

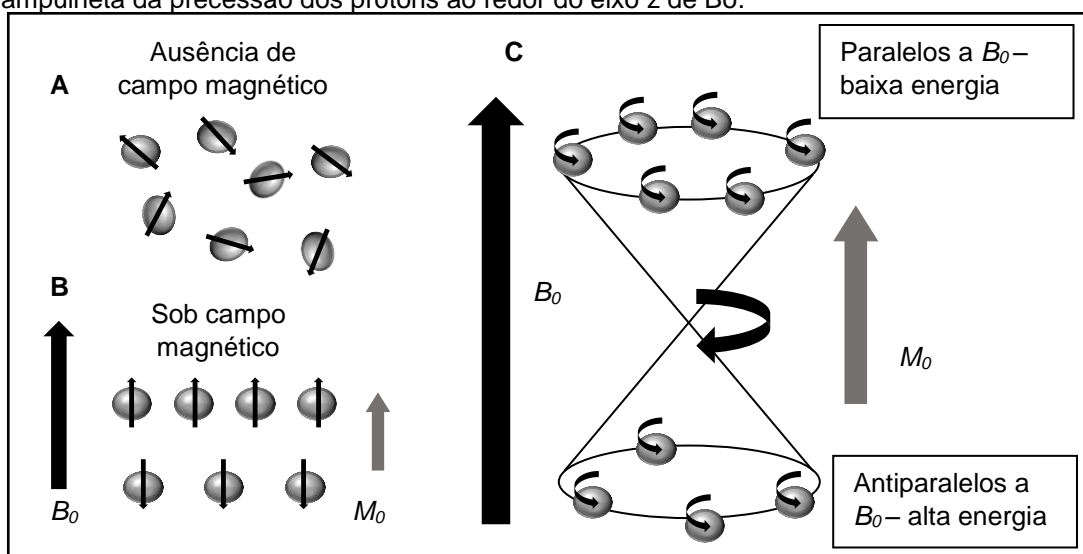
$$N_{\alpha \text{ ou } \beta} = a_{\alpha \text{ ou } \beta} e^{\frac{-\mu B}{kT}} \quad (5)$$

Onde, N é o número de espécies no estado correspondente; k é a constante de Boltzman; T a temperatura em kelvin e a é uma constante que correlaciona N_α e N_β de modo que (Equação 6):

$$N = N\alpha + N\beta \quad (6)$$

No equilíbrio, um número um pouco maior de spins (em torno de $1/10^8$ espécies a mais) se alinha paralelamente a B_0 (em um estado de menor energia) do que em sentido oposto (estado de maior energia). Esse predomínio cria uma pequena magnetização resultante de equilíbrio (M_0). Tomando como base os eixos x, y e z, sendo o eixo z como o eixo paralelo ao campo magnético que será aplicado e o plano xy como o plano transversal, no equilíbrio $M_0 = M_z$. Rigorosamente falando, é importante compreender também que os prótons não se alinham precisamente ao longo do eixo z, mas sim se movimentam em torno deste, de forma análoga a um pião, que gira em torno do seu eixo gravitacional, movimento conhecido como precessão. A frequência de precessão é tanto maior quanto maior for o campo magnético. Logo, maior será a frequência de precessão do spin, que é conhecida como frequência de Larmor. Para que o sinal seja detectado é necessário fazer com que a resultante se alinhe com o plano transversal (xy). Para que isso ocorra é necessário aplicar outro campo magnético B_1 , perpendicular a B_0 de curta duração, ou seja, um pulso na região de rádio frequência ($r\tilde{f}$) (Figura 9).

Figura 9 — (A) Representação esquemática dos prótons em um sistema na ausência de um campo magnético externo (B_0); (B) Alinhamento dos prótons após serem colocados sob B_0 , criando uma pequena magnetização resultante de equilíbrio (M_0); (C) Representação em ampulheta da precessão dos prótons ao redor do eixo z de B_0 .



Fonte: Autoria própria.

Quando o pulso B_0 é acionado, a magnetização resultante M_z se posiciona no plano transversal e logo após o pulso ser cessado a resultante volta a seu estado longitudinal. O tempo que leva este processo se chama **tempos de relaxação**. A magnetização, pode ser estimada matematicamente (Equação 7), considerando que o campo não é alto o suficiente para provocar saturação na magnetização, e a temperatura não perturbe os movimentos das espécies (FEYNMAN, LEIGHTON e SANDS, 2008):

$$M = Ng^2 \frac{s(s+1)}{3} \frac{\mu_B^2}{kT} \quad (7)$$

Um dos processos de relaxação está relacionado a redistribuição dos spins nucleares do sistema ao estado de equilíbrio, o que chamamos de relaxação spin-rede. Esse processo está relacionado a uma constante de tempo exponencial, T_1 , que é o tempo necessário para que o sistema tenha “recuperado” 63% do equilíbrio. T_1 é influenciado por toda a “rede” em torno do núcleo paramagnético e, portanto, diferenças na rede provocam variações em T_1 . T_1 é normalmente referido como tempo de relaxação longitudinal, em analogia com um sistema onde mede-se a magnetização no eixo z (PEREIRA, 2016; PAVIA, *et al.*, 2010).

Um outro processo redistribui sem perdas, qualquer energia possivelmente adquirida, entre os núcleos, alterando os tempos de vida dos núcleos num dado estado sem alterar a população de núcleos. Este processo também ocorre exponencialmente de acordo com a constante de tempo T_2 , tempo de relaxação spin-spin. De modo semelhante a T_1 , T_2 é referido como tempo de relaxação transversal, uma vez que se relaciona com o comportamento da magnetização no plano transversal (xy) (PAVIA, *et al.*, 2010).

1.3 AGENTES DE CONTRASTE PARA IRM

Apesar de naturalmente existir uma diferença nos tempos de relaxação de prótons de tecidos saudáveis e doentes, o uso de agentes de contraste (ACs) permite a obtenção de imagens com mais qualidade, em termos de diferenciação

entre tecidos em condições metabólicas distintas. Tais ACs começaram a ser desenvolvidos desde que os parâmetros que afetam o processo de relaxação paramagnética foram explorados. Os ACs são baseados em espécies paramagnéticas ou superparamagnéticas, que são capazes de modificar os tempos de relaxação dos núcleos de ^1H das moléculas de água presentes nos tecidos, de modo que na presença destes, os prótons têm seus tempos de relaxação (T_1 e T_2) diminuídos. No entanto é possível classificar os ACs em positivos: afetam principalmente T_1 e negativos: afetam principalmente T_2 (CARAVAN, 2006; PEREIRA, 2008).

O grupo de pesquisa de Lauterbur, em 1978 foi o primeiro a descrever o uso de um sal paramagnético para otimização nos tempos de relaxação longitudinal dos prótons em órgãos e tecidos, e consequente obtenção de imagens com melhor qualidade, ou seja, com melhor contraste. Neste trabalho foi utilizado um sal de manganês (sulfato de manganês) para distinguir entre áreas infartadas ou saudáveis de corações (LAUTERBUR, MENDONCA-DIAS e RUDIN, 1978). Realizou-se em 1981 estudo *in vivo* de uso um agente de contraste exógeno para IRM, cloreto férrico em uso oral, que reduzia T_1 , em estômagos, de 730 ms (milissegundos) a 285 ms. E a inalação de oxigênio em 5 voluntários demonstrou reduzir discretamente T_1 no sangue na cavidade ventricular esquerda (YOUNG, *et al.*, 1981). Mais tarde, em 1982 foi realizada IRM de corações caninos com infarto agudo do miocárdio induzido, um grupo utilizando contraste de manganês apresentou diferentes intensidades de sinal entre áreas isquêmicas e normais (BRADY, *et al.*, 1982). No mesmo ano, o mesmo grupo utilizou cloreto de manganês para determinar a extensão da área infartada de 6 corações caninos, havendo boa correlação entre medidas feitas a partir das imagens de IRM e imagens obtidas por fotografias dos órgãos corados (GOLDMAN, *et al.*, 1982).

Em 1981, um importante estudo, que mais tarde tornou-se também uma patente, que utilizava como ACs uma série de substâncias compostas de duas partes específicas: um íon metálico central e um ácido complexante capaz de formar um quelato com o metal. No estudo os autores listam uma série de possíveis metais - cromo, manganês, gadolínio e ferro. Das espécies listadas no estudo um quelato de gadolínio (ácido de dietilenotriaminapenta-acético (DTPA)) apresentou os melhores resultados na diminuição dos tempos de relaxação.

Logo o grupo seguiu a estudar, testar e otimizar este composto, e publicar seu relatório final acerca do mesmo, o qual veio a ser o primeiro AC aprovado pela FDA para uso médico em humanos (Magnevist®), em 1988 (GRIES, ROSENBERG e WEINMANN, 1987), (LANIADO, *et al.*, 1984), (WEINMANN, *et al.*, 1984). A partir de então os compostos, sobretudo quelatos, contendo gadolínio são os candidatos a ACs mais estudados, apresentando os melhores resultados conhecidos até então (LOHRKE, *et al.*, 2016), (PIERRE, ALLEN e CARAVAN, 2014), (CARAVAN, *et al.*, 1999).

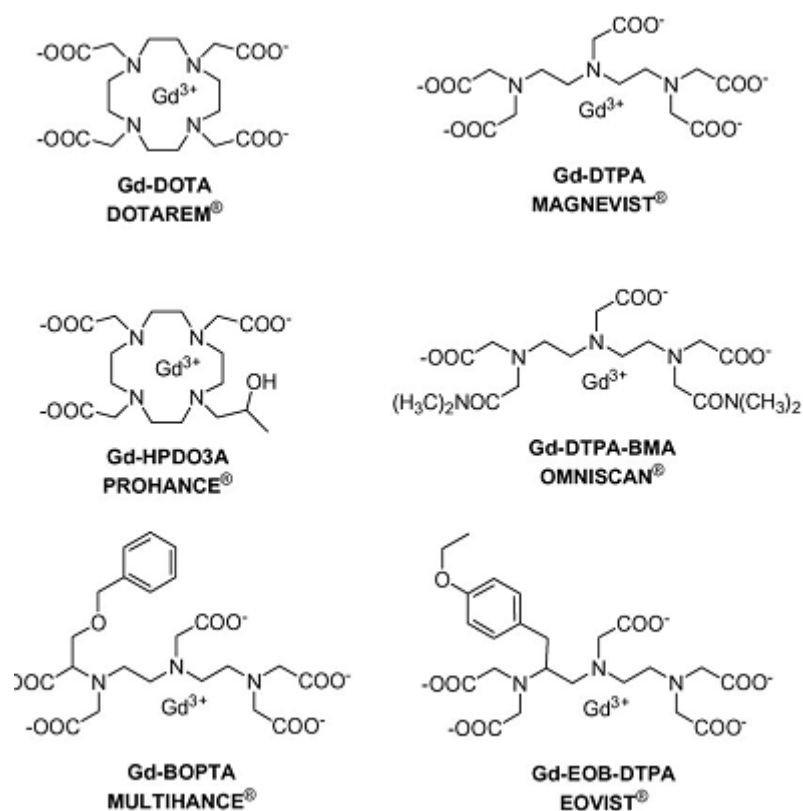
1.3.1 Quelatos Paramagnéticos Contendo Íons Gadolínio

Desde o estudo do grupo de Weinmann e outros importantes grupos, inúmeros trabalhos foram realizados com os ACs conhecidos até então, Carr *et al.* administraram de forma intravenosa Gd-DTPA para obter imagens de RMN de tumores cerebrais, obtendo resultados semelhantes a tomografia computadorizada, e relatando ausência de efeitos colaterais ou anormalidades significativas na ureia, creatinina e eletrólitos, função hepática, coagulação sanguínea ou em teste de urina (CARR, *et al.*, 1984). Em colaboração com o grupo de Weinmann, Runge *et al.* estudaram abscessos cerebrais em cães, utilizando Gd-DTPA como contraste, e obtendo imagens em que apenas no caso do uso do agente, foi possível a visualização das áreas afetadas, com resultados superiores aos observados por tomografia computadorizada. O grupo foi premiado pelo trabalho (RUNGE, *et al.*, 1985).

Atualmente a maior parte dos ACs para IRM autorizados para uso, são quelatos de gadolínio (Figura 10 **Error! Reference source not found.**) havendo muitos mais em fase de investigação. Os ACs baseados em Gd^{3+} apresentam contraste positivo, embora sejam capazes de afetar T_1 e T_2 a diminuição em T_1 ocorre em maior proporção (CARAVAN, *et al.*, 1999; ZHANG, *et al.*, 2016). A eficiência com que o íon Gd^{3+} melhora a relaxividade dos sistemas se deve aos 7 elétrons 4f desemparelhados, que conferem um alto momento magnético, combinados com a simetria do termo espectroscópico (8S) do íon, a qual permite que o movimento dos *spins* dos elétrons possa afetar os prótons das moléculas de água diretamente coordenadas ao íon metálico central, ou seja, moléculas de

água que estão na primeira esfera de coordenação. O Gd^{3+} é tóxico, e não pode ser administrado diretamente em organismos vivos. Desta forma, os ligantes orgânicos capazes de quelar o íon, diminuem os riscos, uma vez que permitem a rápida excreção do organismo sem que haja a possibilidade de interação do íon paramagnético com espécies biológicas (CARAVAN, *et al.*, 1999; ZHANG, *et al.*, 2016; SHERRY, CARAVAN e LENKINSKI, 2009).

Figura 10 — Estruturas de alguns ACs baseados em Gd.



Fonte: (TAN e LU, 2011).

A estabilidade, cinética e termodinâmica, dos quelatos de Gd^{3+} asseguram que o AC será administrado sem que haja liberação do lantanídeo no organismo. Os ligantes utilizados coordenam-se ao Gd^{3+} através dos elétrons livres dos átomos doadores presentes na estrutura molecular. Além disso, tais ligantes podem ser lineares ou cíclicos, resultando em quelatos paramagnéticos com diferentes constantes de estabilidade (LOHRKE, *et al.*, 2016; SHERRY, CARAVAN e LENKINSKI, 2009). A flexibilidade dos ligantes lineares permite uma rápida formação do complexo, uma vez que assim que as forças eletrostáticas permitam a aproximação íon-ligante, a molécula se conforma de

modo a envolver rapidamente o metal. Nos ligantes cíclicos, mais tempo é necessário até que o metal interaja adequadamente com todos os átomos doadores. Termodinamicamente, é sabido que ligantes com átomos doadores mais básicos fornecem quelatos mais estáveis, sendo as aminas cíclicas mais básicas que as lineares. Além disso, o pH e a presença de metais concorrentes também são fatores a considerar. De um modo geral em pH neutro ligantes mais básicos apresentam menor estabilidade, e a pH mais ácido o número de prótons disponível no meio dificulta a ligação entre os átomos doadores e o metal, diminuindo a estabilidade (SHERRY, CARAVAN e LENKINSKI, 2009). Os íons Zn^{2+} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} podem formar complexos com os ligantes tipicamente utilizados nos ACs com Gd^{3+} . Ocorrendo a troca de metais num complexo (processo conhecido como transmetalização), um quelato de gadolínio libera o íon Gd^{3+} para o meio. Processos de transmetalização podem correr facilmente com íons Zn^{2+} , dada a alta concentração deste íon no organismo e estabilidade termodinâmica dos complexos formados. Os ligantes lineares apresentam altos índices de transmetalização quanto mais altas são as concentrações de Zn^{2+} . Para os ligantes cíclicos, menos suscetíveis que os lineares, a dissociação do complexo é decisiva para que ocorra a transmetalização (SHERRY, CARAVAN e LENKINSKI, 2009; LAURENT, *et al.*, 2010).

Um importante problema relacionado com a instabilidade de complexos de gadolínio, e conseqüente liberação deste metal, em meio biológico é a coordenação de íons Gd^{3+} em sítios de determinadas enzimas originalmente ocupados por Ca^{2+} , uma vez que os raios de ambos os íons são próximos, dificultando os processos biológicos associados às mesmas. Além disso, o íon Gd^{3+} está associado a uma condição rara denominada fibrose sistêmica nefrogênica (FSN). A FSN atinge principalmente pele e músculos, o aparecimento de fibroses é característico. A gravidade da doença é variável, e nos casos mais severos ocorre morte devido a mobilidade limitada ou insuficiência respiratória. Em indivíduos saudáveis os rins eliminam por volta do terceiro dia todo AC utilizado para um exame, a FSN tem índices de ocorrência maiores nos pacientes em diálise ou algum grau de insuficiência renal. Nesses indivíduos os ACs permanecem por mais tempo. Apesar de não se conhecer detalhadamente os mecanismos dessa doença, há indicativos de que o tempo de exposição elevado combinado com concentrações mais altas de íons fosfato

(PO_4^{2-}) tornam mais fácil a dissociação dos quelatos, liberando o íon Gd^{3+} . O fosfato de gadolínio é insolúvel e dificilmente excretado e, de alguma forma, se deposita em tecidos e órgãos tomando o lugar de outros metais biologicamente ativos. Para indivíduos com funcionalidade renal limitada os ACs mais estáveis (macrocíclicos) e em doses reduzidas são normalmente a opção mais segura, no entanto também se faz necessário levantar o histórico de uso de ACs assim como o grau de insuficiência. Essas medidas tem contribuído para uma diminuição dos casos de FSN relacionados a administração de ACs com gadolínio (SHERRY, CARAVAN e LENKINSKI, 2009; BIRKA, *et al.*, 2015), (SIEBER, *et al.*, 2009; KAEWLAI e ABUJUDEH, 2012).

Apesar de todos os pontos positivos da técnica de IRM associada com o uso de ACs baseados em Gd^{3+} convencionais, há algumas limitações associadas à técnica que devem ser citadas, tais como a baixa sensibilidade, falta de especificidade e os longos tempos de exame são as principais, os quais são atualmente o ponto de partida de diversos estudos para minimização dessas limitações. A pouca sensibilidade faz necessária a administração de grandes quantidades (cerca de $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) de quelatos de gadolínio durante um exame. Essa limitação encontra possíveis soluções como por exemplo nas tentativas de aumentar a concentração local de AC (através do uso de sistemas nanoparticulados), ou ainda melhorando a eficiência dos ACs através de modificações estruturais dos mesmos, como a formulação de quelatos com mais moléculas de água coordenadas (aumento de q). Ainda pode se considerar aumento da massa molecular dos ligantes, que altera alguns parâmetros associados aos mecanismos de relaxação paramagnética, como o tempo de residência da água coordenada ao centro paramagnético (τ_M), o qual determina a taxa de troca da mesma, o tempo rotacional da molécula (τ_R) e o tempo de difusão de moléculas de água nas proximidades do íon metálico (τ_D), os quais serão melhor compreendidos na seção 1.4 . Outra estratégia para superar as limitações da IRM é a **multimodalidade**, ou seja, o uso de combinação da IRM com pelo menos outra técnica como a tomografia computadorizada de raios X (TC), a tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT), a tomografia por emissão de pósitrons (PET), imagem óptica (OI) e ultra-som. Na

seção 1.5 trataremos de exemplos desta estratégia (ZHANG, *et al.*, 2016; LOHRKE, *et al.*, 2016; RAYMOND e PIERRE, 2004).

1.4 MECANISMOS DE RELAXAÇÃO PARAMAGNÉTICA E RELAXIVIDADE

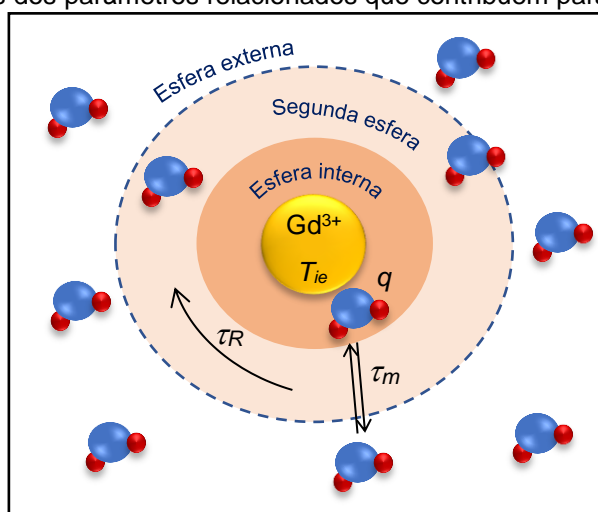
As constantes de tempo T_1 e T_2 , como todo o processo de relaxação, são dependentes de diversos fenômenos que afetam os centros paramagnéticos. Há modelos que descrevem todo o processo de relaxação, baseiam-se em três contribuições: (i) de **esfera interna**; (ii) de **esfera externa** e (iii) segunda esfera. Trataremos a seguir das contribuições i e ii, uma vez que a contribuição de segunda esfera é difícil de estimar, sendo normalmente “inclusa” na contribuição de esfera externa. A partir destas contribuições é possível quantificar a **relaxividade** (r_i – Equações 8 e 9) (PEREIRA, 2008; DEBROYE e PARAC-VOGT, 2014):

$$r_i[C_p] = \frac{1}{T_{io}} - \frac{1}{T_{id}} \quad \text{onde } i = 1 \text{ ou } 2 \quad (8)$$

$$\frac{1}{T_{io}} = \frac{1}{T_i^{Is}} + \frac{1}{T_i^{Os}} + \frac{1}{T_{id}} \quad (9)$$

Onde $[C_p]$ é a concentração da espécie paramagnética em mM, $1/T_{id}$ e $1/T_{io}$ são as taxas de relaxação diamagnética (na ausência de qualquer espécie paramagnética) e a contribuição paramagnética observada, respectivamente. T_i^{Is} e T_i^{Os} são as contribuições paramagnéticas de esfera interna e externa para o tempo de relaxação observado, estes termos estão relacionados com as moléculas de água em torno do centro paramagnético, como esquematizado na Figura 11 (PEREIRA, 2008; DEBROYE e PARAC-VOGT, 2014):

Figura 11 — Representação esquemática dos ‘três tipos’ de moléculas de água em um complexo paramagnético alguns dos parâmetros relacionados que contribuem para a relaxividade total.



Fonte: Autoria própria

i. **Relaxação de esfera interna:** É descrita pelo modelo de Solomon-Bloembergen Morgan (BLOEMBERGEN e MORGAN, 1961; SOLOMON, 1995; BLOEMBERGEN, 1957), está relacionada com as trocas entre moléculas de água ligadas ao centro paramagnético e as moléculas de água no meio (Equações 10 e 11):

$$\frac{1}{T_1^{IS}} = \frac{q[C_p]}{55,5(T_{1m} + \tau_m)} \quad (10)$$

$$\frac{1}{T_2^{IS}} = \frac{q[C_p]}{55,5\tau_m} \left[\frac{T_{2m}^{-1}(\tau_m^{-1} + T_{2m}^{-1}) + \Delta\omega_m^2}{(\tau_m^{-1} + T_{2m}^{-1})^2 + \Delta\omega_m^2} \right] \quad (11)$$

Onde q é o número de moléculas de água diretamente coordenadas ao centro paramagnético. τ_m é o **tempo médio de residência dos prótons da água coordenada**. $[C_p]$ é a concentração molar da espécie paramagnética. T_{1m} e T_{2m} são respectivamente os tempos de relaxação eletrônica longitudinal e transversal dos prótons de moléculas de água. E $\Delta\omega_m$ é a diferença de deslocamento químico entre moléculas de água livres e coordenadas (PEREIRA, 2008), (LAUFFER, 1987). Os mecanismos de esfera interna tornam-se significativos quando há condição de “troca rápida” ($\tau_m \ll T_{1m}$), neste cenário o aumento da taxa de relaxação experimentado pelas moléculas de água no meio dependerá do aumento da taxa de relaxação para a molécula de água coordenada (PEREIRA, 2008; CARAVAN, *et al.*, 1999). Novamente através da

abordagem das equações de Solomon-Bloembergen Morgan é possível calcular as taxas de relaxação T_{1m} e T_{2m} (Equações 12-16), as quais tem contribuições devido interações, através do espaço, entre o dipolo nuclear e o dipolo dos elétrons desemparelhados e contribuições escalares (através das ligações) resultantes deslocalização da densidade de spin desemparelhada no núcleo:

$$\frac{1}{T_{im}} = \frac{1}{T_i^{DD}} + \frac{1}{T_i^{SC}}, \text{ onde } i=1 \text{ ou } 2, \text{ DD=dipolar, SC= escalar} \quad (12)$$

$$\frac{1}{T_1^{DD}} = \frac{2}{15} \frac{\gamma_I^2 g^2 \mu_B^2}{r_{GdH}^6} S(S+1) \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \left[7 \frac{\tau_{c2}}{1+\omega_S^2 \tau_{c2}^2} + 3 \frac{\tau_{c1}}{1+\omega_I^2 \tau_{c1}^2} \right] \quad (13)$$

$$\frac{1}{T_1^{SC}} = \frac{2S(S+1)}{3} \left(\frac{A}{\hbar}\right)^2 \left[\frac{\tau_{e2}}{1+\omega_S^2 \tau_{e2}^2} \right] \quad (14)$$

$$\frac{1}{T_2^{DD}} = \frac{1}{15} \frac{\gamma_I^2 g^2 \mu_B^2}{r_{GdH}^6} S(S+1) \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \left[13 \frac{\tau_{c2}}{1+\omega_S^2 \tau_{c2}^2} + 3 \frac{\tau_{c1}}{1+\omega_I^2 \tau_{c1}^2} + 4\tau_{c1} \right] \quad (15)$$

$$\frac{1}{T_2^{SC}} = \frac{S(S+1)}{3} \left(\frac{A}{\hbar}\right)^2 \left[\frac{\tau_{e2}}{1+\omega_S^2 \tau_{e2}^2} + \tau_{e1} \right] \quad (16)$$

Onde, S é o número quântico de spin eletrônico γ_I é a constante giromagnética nuclear, g é o fator de Landé eletrônico, μ_B é o magneton de Bohr, r_{GdH} é a distância entre o íon Gd^{3+} e o próton da água, μ_0 é a permeabilidade magnética no vácuo, A/\hbar é a constante de acoplamento hiperfina entre os elétrons do metal e os prótons da água, ω_I e ω_S são as frequências de Larmor nuclear e eletrônica respectivamente ($\omega_{I,S} = \gamma_{I,S} B$, onde B é o campo magnético). Por últimos, é possível observar que os tempos de correlação τ_c e τ_e definem a contribuição dipolar e a contribuição escalar, respectivamente, e podem ser definidos por (Equações 17 e 18) (PEREIRA, 2008; CARAVAN, *et al.*, 1999; HELM, MERBACH e TÓTH, 2013):

$$\frac{1}{\tau_{ci}} = \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{T_{ie}} + \frac{1}{\tau_m} \quad \text{e} \quad (17)$$

$$\frac{1}{\tau_{ei}} = \frac{1}{\tau_m} + \frac{1}{T_{ie}}, \text{ onde } i= 1 \text{ ou } 2 \quad (18)$$

Onde τ_R é o tempo de correlação rotacional da molécula/completo, τ_m é o tempo médio de residência dos prótons da água coordenada, e $1/T_{ie}$ é a taxa de relaxação eletrônica do íon metálico. Para complexos paramagnéticos com o íon

Gd^{3+} as contribuições escalares são menores devido as distâncias entre o íon metálico e as moléculas de água coordenadas, portanto os parâmetros na contribuição dipolar são mais importantes.

ii. **Relaxação de esfera externa:** dependente das moléculas de água difundindo nas proximidades do centro paramagnético durante sua translação. Modulada pela relaxação eletrônica e pela difusão de moléculas de água próximo do centro paramagnético, normalmente próximas a átomos eletronegativos do ligante via ligação de hidrogênio, é resultante da interação entre o spin nuclear I do próton da água e o spin de elétron do gadolínio S . É comumente descrita como nas Equações 19-21 (FREED, 1978; KOENIG e BROWN III, 1991; CARAVAN, *et al.*, 1999):

$$\frac{1}{T_1^{OS}} = R_1^{OS} = \left(\frac{32\pi}{405}\right) \cdot \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \cdot \gamma_I^2 \gamma_S^2 \eta^2 S(S+1) \cdot \frac{N_A}{a_{GdH} D_{GdH}} \cdot [3J(\omega_I; T_{1e}) + 7J(\omega_S; T_{2e})] \quad (19)$$

$$J(\omega_i T_{je}) = Re \left[\frac{1 + \frac{1}{4} \left(i\omega_i \tau_{GdH} + \frac{\tau_{GdH}}{T_{je}} \right)^{\frac{1}{2}}}{1 + \left(i\omega_i \tau_{GdH} + \frac{\tau_{GdH}}{T_{je}} \right)^{\frac{1}{2}} + \frac{4}{9} \left(i\omega_i \tau_{GdH} + \frac{\tau_{GdH}}{T_{je}} \right) + \frac{1}{9} \left(i\omega_i \tau_{GdH} + \frac{\tau_{GdH}}{T_{je}} \right)^{\frac{3}{2}}} \right] \quad (20)$$

$$j = 1 \text{ ou } 2, i = I \text{ ou } S$$

$$\tau_{GdH} = \frac{a_{GdH}^2}{D_{GdH}} \quad (21)$$

Onde T_{je} é o tempo de relaxação eletrônico, $J(\omega_i; T_{je})$ é uma função de densidade espectral não-Lorentziana, N_A é a constante de Avogadro, γ_S é a constante giromagnética do elétron, a_{GdH} é a menor distância entre os prótons do solvente na esfera externa e o centro paramagnético, D_{GdH} é a soma dos coeficientes de difusão dos prótons da água e do complexo e τ_{GdH} é o tempo de correlação da difusão. Todos os outros termos se repetem nas equações anteriores. Uma vez que a difusão é a principal variável para esta contribuição, complexos com tamanhos e estruturas semelhantes apresentam também semelhança nos valores da relaxação de esfera externa (CARAVAN, *et al.*, 1999; HELM, MERBACH e TÓTH, 2013; PEREIRA, 2008). Além dos parâmetros citados, há diversos outros que influenciam diretamente no processo de

relaxação, apesar de não se conhecer exatamente a relação entre todos estes e a estrutura da espécie paramagnética, é possível obter melhoras na relaxividade considerando três desses **parâmetros**: q , τ_M e τ_R (PEREIRA, 2008; DEBROYE e PARAC-VOGT, 2014; CARAVAN, 2006).

- **Número de moléculas de água diretamente ligadas ao centro paramagnético (q)**

O número de moléculas coordenadas ao centro paramagnético é um dos fatores mais diretamente relacionados com alterações na relaxividade, de modo que, maior número de moléculas implica numa melhor relaxividade, como fica demonstrado pelas equações 10 e 11. No entanto para muitas espécies paramagnéticas, um aumento desta quantidade pode implicar negativamente em sua estabilidade cinética e termodinâmica. Quando se está no limite de estabilidade para um dado número de moléculas de água coordenadas tanto o número de moléculas de água na segunda esfera, quanto o aumento no tempo de residência na primeira esfera tornam-se importantes (PEREIRA e GERALDES, 2007; PEREIRA, 2008; LAUFFER, 1987; DEBROYE e PARAC-VOGT, 2014).

- **Tempo médio de 'residência' dos prótons coordenados (τ_M)**

É um dos termos que compõem o tempo de correlação total (τ_c , como demonstrado na equação 17), pode ser compreendido em termos do inverso da taxa de troca da água ($1/k_{ex}$), diz respeito a troca química entre moléculas de água ligadas ao centro paramagnético e o meio. Esta troca deve ocorrer num intervalo de tempo apropriado para que haja a transferência e ainda assim não prejudique as interações dipolo-dipolo entre as moléculas. Um valor pequeno de τ_M implica num valor alto para r_i , ajustes nesse parâmetro podem ser feitos de modo a inserir grupos que provoquem impedimento estérico, surgimento de cargas ou permitam ligações de hidrogênio (LAUFFER, 1987; PEREIRA, 2008; DEBROYE e PARAC-VOGT, 2014).

- **Tempo de correlação rotacional da molécula (τ_R)**

Estando ligado ao tempo de reorientação da espécie, varia de acordo com: tamanho e do peso molecular, presença de ligações covalentes com grupos volumosos, assim como da viscosidade do meio (apesar de se conhecer pouco sobre os mecanismos que permeiam este fator), e é nestes fatores que trabalham as estratégias de otimização. Quanto maior o tempo que a espécie paramagnética toma para reorientar-se maior a relaxividade (LAUFFER, 1987; PEREIRA, 2008; DEBROYE e PARAC-VOGT, 2014).

A campo baixo, no caso dos estudos clínicos, τ_R é umas das contribuições mais importantes para a correlação geral, sobretudo quando as espécies paramagnéticas apresentam baixo peso molecular, para espécies maiores a reorientação é mais complexa, e a relação entre o tamanho e o τ_R não é tão direta (LAUFFER, 1987; PEREIRA, 2008; DEBROYE e PARAC-VOGT, 2014).

1.5 SISTEMAS BIMODAIS BASEADOS EM PONTOS QUÂNTICOS CONJUGADOS A QUELATOS DE Gd^{3+}

Uma das alternativas encontradas para superar as limitações da IRM tem sido a possibilidade de uma abordagem bimodal de imagem. Para que isso seja possível é necessário o uso de uma sonda que apresente resposta a pelo menos duas técnicas. Nesse sentido, têm sido desenvolvidos diversos sistemas que respondem a IRM e a alguma outra técnica, sendo uma das mais promissoras as sondas bimodais que integram a IRM e a IO, uma vez que a IO apresenta sensibilidade alta, possibilidade de detecção de uma única molécula e a obtenção de imagens ao nível celular e em tempo real a partir da fluorescência, apesar da baixa capacidade de penetração. Tais características são complementares a IRM, a qual possui excelente definição anatômica (ZHANG, *et al.*, 2016; KIM, *et al.*, 2015; LOUIE, 2010).

No desenvolvimento de sondas bimodais, os quelatos de gadolínio já em uso clínico, ou quelatos derivativos dos ligantes clínicos, são as escolhas mais usuais para conjugação com nanomateriais. Normalmente os parâmetros que permitem a melhoria da resposta paramagnética são τ_M e τ_R , os quais são

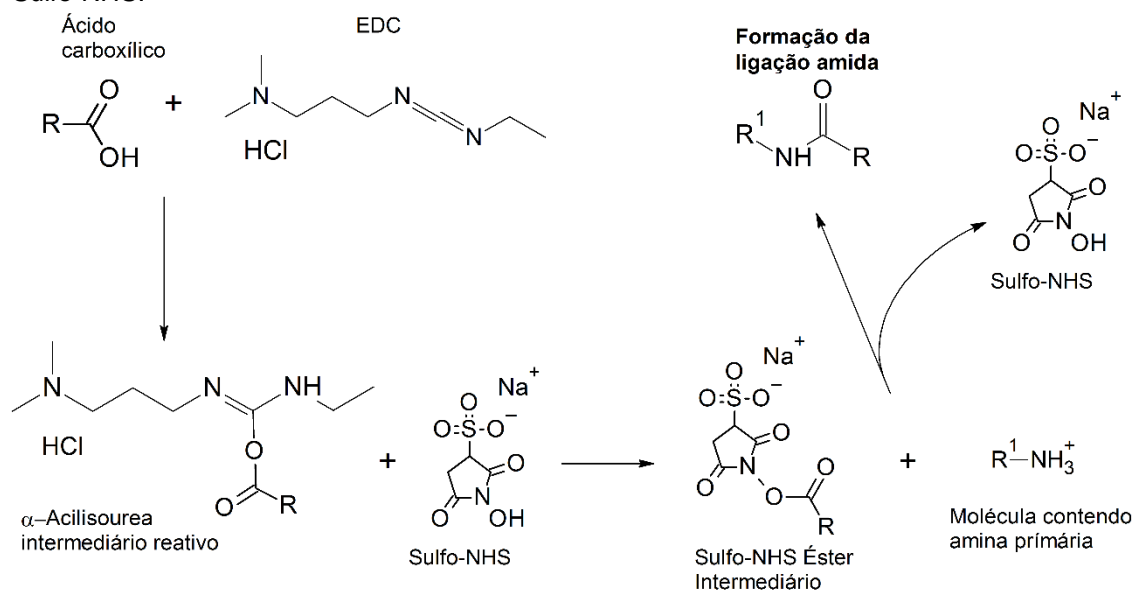
dependentes da estrutura e do movimento da espécie paramagnética. Para uma abordagem em que se tenha uma sonda de imagem bimodal, os PQs são excelentes candidatos para essa finalidade. Os PQs conjugados a um quelato paramagnético permite um aumento do tempo de correlação rotacional (τ_R) do AC, além de poder alterar τ_M , o que tem consequência direta na relaxividade observada desses sistemas (KIM, *et al.*, 2015; VILLARAZA, BUMB e BRECHBIEL, 2010; CAO, *et al.*, 2017).

Diversos são os sistemas já propostos para atuarem como sondas bimodais IRM/IO, e mais variados são os métodos de obtenção dos mesmos. A composição dos PQs assim como da espécie paramagnética de interesse, são determinantes na escolha do método de conjugação a ser utilizado. Dos métodos de associação entre PQs e quelatos de gadolínio destacam-se: a encapsulação em lipossomas e polímeros ((TAN e ZHANG, 2005; LIU, *et al.*, 2011), o recobrimento dos PQs com lipídeos paramagnéticos ((MULDER, *et al.*, 2006; TILBORG, *et al.*, 2006)), e a ligação covalente entre PQs e os quelatos de Gd^{3+} .

1.6 ASSOCIAÇÃO DE PQs E QUELATOS DE GADOLÍNIO POR CONJUGAÇÃO COVALENTE

Existem ainda poucos exemplos, na literatura, da preparação de sondas bimodais contendo PQs por conjugação covalente. A ligação covalente pode ser promovida de diversas formas, tendo sido utilizados no caso destas nanossondas essencialmente duas metodologias: (i) utilização de ligantes tiolados que se ligam diretamente na superfície do PQ, e (ii) conjugação de ligantes com o estabilizante através da utilização de agentes de acoplamento. O protocolo com uso de EDC (N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida), uma carbodiimida, é o mais utilizado para este fim, reage com carboxilas e aminas promovendo uma ligação amida, o protocolo pode ser otimizado com uso de NHS (sulfo-NHS (N-hidroxisulfo-succinimida) ou ésteres de NHS) para aumentar a solubilidade e a reatividade do intermediário ativo, de acordo com o mecanismo na Figura 12.

Figura 12 — Mecanismo de formação de ligação amida a partir da reação assistida com EDC e Sulfo-NHS.



Fonte: Autoria própria a partir de ACD/ChemSketch.

Na preparação de sondas bimodais baseadas em PQs e quelatos de gadolínio, após a conjugação entre as duas espécies, é importante analisar algumas das propriedades da nanossonda final. Numa conjugação eficiente as propriedades ópticas e magnéticas, do sistema bimodal, devem ser mantidas ou melhoradas quando comparadas com os sistemas individuais. Algumas das principais propriedades de sondas deste tipo -PQ conjugado a quelato de Gd^{3+} , obtidos ou transferidos para meio aquoso- já descritas na literatura, estão resumidas na Tabela 1.

Em 2008, Jin *et al.* (JIN, *et al.*, 2008) obtiveram uma sonda composta por PQ de CdSeTe/CdS funcionalizado com GSH (glutathione - um peptídeo que contém cisteína) conjugado a DOTA-Gd (onde DOTA é o ácido 1,4,7,10-tetraazociclododecano-1,4,7,10-tetracético). O PQ utilizado neste trabalho é originalmente disperso em meio orgânico, a funcionalização com GSH garante a dispersão em meio aquoso. O ligante DOTA é ativado com éster-NHS e solubilizado em tampão fosfato (PBS), a esta solução são acrescentados os PQs funcionalizados com GSH sob agitação, deste modo ocorrendo a ligação amida (carboxila do DOTA + amina de GSH), ligantes que não reagiram são removidos por diálise. Uma solução de gadolínio é adicionada sob agitação, e novamente diálise é utilizada para remover excessos que não reagiram. Após a conjugação, os sistemas bimodais apresentaram-se fluorescentes ($\lambda_{\text{máx}}=800 \text{ nm}$) e com uma

relaxividade (r_1) de $365 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ por nanopartícula e, em média, $4,74 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ por íon Gd^{3+} .

Stasiuk *et al.* conjugaram o ácido 6,6'-((7-(13-12-ditiolanil-5-pentaamido-1-carboxipentil)-1,4,7-triazaciclononano-1,4-diil)bis(metileno))dipicolínico (um derivado do ligante bpatchn (1-(carboximetil)-4,7-bis[(6-carboxipiridin-2-il)metil]-1,4,7-triazaciclononano)) a um PQ de InP/ZnS ($\lambda_{\text{máx}}=620 \text{ nm}$). O PQ utilizado foi sintetizado previamente em fase orgânica, e funcionalizado com penicilina (ácido (2S)-2-amino-3-metil-3-sulfanil-butanóico) para ser disperso em água. Para conjugação do quelato ao PQ o agente redutor TCEP (tris(carboxietil)fosfina) foi utilizado em excesso sob agitação, a pH 9 e $20 \text{ }^\circ\text{C}$, para quebrar as ligações dissulfeto do ligante e permitir que os átomos de enxofre se liguem covalentemente a superfície de ZnS . A sonda obtida apresentou r_1 de 13 e $900 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ por Gd^{3+} e por nanopartícula, respectivamente (STASIUK, *et al.*, 2011).

Novamente Stasiuk *et al.*, utilizaram o mesmo PQ, e o mesmo protocolo de conjugação para sondas com três ligantes derivados do DPAA ((S)-2-[bis(6-(carboxilato)piridin-2-il)metil-amino]-4-aminobutanoato), contendo ácido lipóico, mercaptopropiônico ou mercaptobenzóico, substituindo um dos hidrogênios do grupo amino do DPAA. Neste caso os complexos eram coordenados a três moléculas de água, as nanopartículas bimodais apresentaram r_1 por íon Gd^{3+} de: 20,9; 8,9 e 31,5 e por nanopartícula: 240, 585 e $2523 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (STASIUK, *et al.*, 2013).

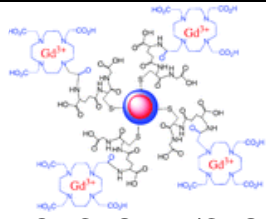
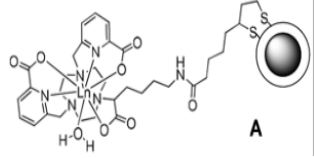
PQs núcleo-casca CdSe/ZnS foram conjugados a Gd-DTPA ($\lambda_{\text{máx}}=680 \text{ nm}$) por Xing *et al.*, a síntese dos PQs ocorreu em meio orgânico. Neste trabalho o ligante foi conjugado inicialmente a BSA (albumina de soro bovino) em meio aquoso e o gadolínio foi posteriormente complexado. Esse conjugado foi submetido a agitador ultra-sônico e os PQs em clorofórmio foram adicionados com uma seringa, uma emulsão foi obtida e a fase orgânica posteriormente rotoevaporada, além disso o excesso de quelatos foi removido por ultracentrifugação. As nanopartículas apresentaram r_1 por íon Gd^{3+} de $16,56 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (XING, *et al.*, 2015).

Em 2017, Yang *et al.* relataram a obtenção de uma sonda contendo um ligante ditiolado derivado de DTPA (DTDTPA) conjugado a PQs $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$

($\lambda_{\text{máx}} = 680 \text{ nm}$), mais uma vez os PQs utilizados são sintetizados em meio orgânico. Para conjugação o PQ disperso em clorofórmio é gotejado em DTDTPA dissolvido em metanol em pH 10 e temperatura ambiente, sob agitação durante 4 h, os átomos de enxofre do DTDTPA ligam-se covalentemente a superfície do PQ. Os solventes orgânicos são retirados por destilação a pressão reduzida e o produto é redisperso em solução tampão fostato (PBS), após lavagem e filtração em centrífuga, uma solução de Gd^{3+} é adicionada sob agitação, o produto final é obtido após uma nova etapa de lavagem e filtração. As nanopartículas apresentaram r_1 por íon Gd^{3+} de $9,91 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (YANG, *et al.*, 2017).

Gadolínio complexado ao ligante produzido pela condensação de 4-aminotiofenol com bis(anidrido) de DTPA foi conjugado a PQs, também hidrofóbicos, de CdSe/CdS/ZnS, como descreveram McAdams *et al.* A conjugação do quelato ao PQ ocorreu através da agitação destes componentes em solução 1:1 metanol/clorofórmio em atmosfera inerte durante 24h, após isso foram feitas lavagens e filtrações em centrífuga e o produto foi ressuspensão em metanol e tampão fosfato. Os valores de r_1 nas sondas resultantes foram: $11 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ por íon Gd^{3+} e $800 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ por nanopartícula (MCADAMS, *et al.*, 2017).

Tabela 1 — Propriedades de sondas bimodais baseadas em pontos quânticos e quelatos de Gd^{3+} descritas na literatura.

Estrutura e Referência	$r_1 \text{ (mM}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$		Quelatos/PQ	Parâmetros
	Por Gd	Por PQ		
 PQ=CdSeTe/CdS $\lambda_{\text{máx}} = 800 \text{ nm}$ (JIN, <i>et al.</i> , 2008)	4,74	365	77 ± 18	500 MHz (11,7 T) 25 °C
 PQ=InP/ZnS $\lambda_{\text{máx}} = 620 \text{ nm}$ (STASIUK, <i>et al.</i> , 2011)	13	900	75-80	35 MHz (0,81 T) 25 °C

Estrutura e Referência	r_1 (mM ⁻¹ s ⁻¹)		Quelatos/PQ	Parâmetros
	Por Gd	Por PQ		
<p>Ln.2.QD Ln.4.QD Ln.3.QD</p> <p>PQ=InP/ZnS $\lambda_{\text{máx}} = 620$ nm (STASIUK, <i>et al.</i>, 2013)</p>	Gd2 20,9 Gd3 8,9 Gd4 31,5	Gd2 2406 Gd3 585 Gd4 2523	115 Gd2 66 Gd.3 80 Gd.4	35 MHz (0,81 T) 25° C
<p>GdDTPA-BSA</p> <p>PQ=CdSe/ZnS $\lambda_{\text{máx}} = 680$ nm (XING, <i>et al.</i>, 2015)</p>	16,56	-	Não informa	60 MHz (1,41 T) 37 °C
<p>NIR rescence</p> <p>PQ=CuInS₂/ZnS $\lambda_{\text{máx}} = 710$ nm (YANG, <i>et al.</i>, 2017)</p>	9,91	-	4,73% em peso	127,5 MHz (3 T) 37 °C
<p>Gd³⁺</p> <p>PQ=CdSe/CdS/ZnS $\lambda_{\text{máx}} = \sim 660$ nm (MCADAMS, <i>et al.</i>, 2017)</p>	11	800 +/- 130	550 +/- 130	42,5 MHz (1 T) 37 °C

PQs com superfície funcionalizada por estabilizantes tiolados terminados em aminas ou ácidos carboxílicos, e agentes de contraste baseados nos ligantes convencionais, geralmente com grupos carboxila disponíveis, são espécies com potencial para conjugação covalente. No entanto, estas sondas vêm sendo

obtidas em sua maioria a partir de síntese de PQs em meio orgânico. Neste sentido há uma lacuna na possibilidade do uso de PQs preparados em meio aquoso. Sendo assim, essa dissertação aborda a possibilidade de se obter sondas bimodais eficientes para aplicação em imagem óptica e por ressonância magnética, através de métodos de síntese relativamente simples. Foram utilizados PQs hidrofílicos, o que pode permitir um caminho mais fácil para o desenvolvimento de agentes de contraste biocompatíveis.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento e caracterização físico-química de diferentes sistemas bimodais constituídos de pontos quânticos de CdTe estabilizados com cisteamina (CTM) conjugados a quelatos de gadolínio.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar PQs de CdTe estabilizados com cisteamina (CTM);
- Conjugar ligantes do tipo DOTA e DTPA com os PQs, testando diferentes rotas sintéticas;
- Complexar os sistemas PQ-ligantes preparados com Gd^{3+} ;
- Otimizar as etapas de conjugação e de complexação de forma a maximizar o número de complexos na superfície dos PQs, e melhorar a estabilidade dos sistemas bimodais;
- Caracterizar opticamente os sistemas;
- Quantificar concentração de Gd^{3+} nos sistemas preparados, através de ICP-OES;
- Estudar o comportamento relaxométrico dos sistemas em dois diferentes campos magnéticos 20 e 60 MHz (0,47 e 1,4 T);
- Avaliar a estabilidade dos complexos preparados a partir de medidas de transmetalção do íon Gd^{3+} ;
- Estudar marcação celular inespecífica em hemácias.

3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

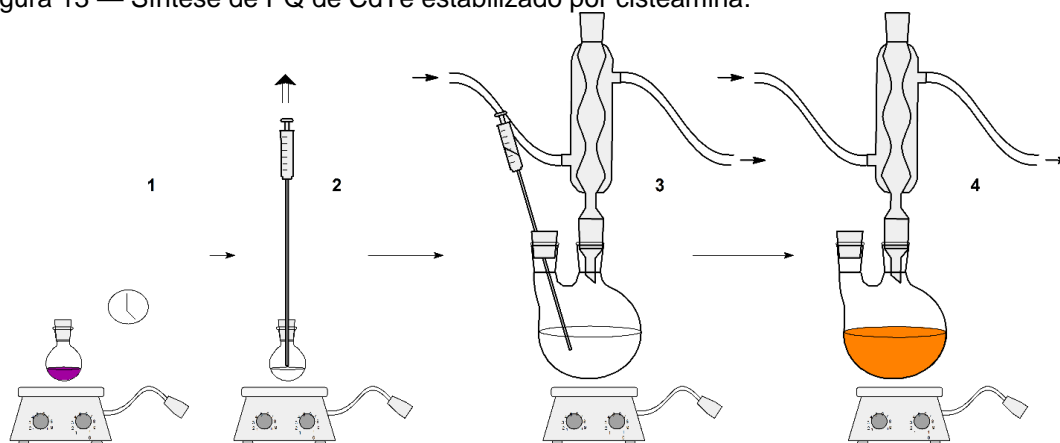
3.1 SÍNTESE DE PONTOS QUÂNTICOS DE TELURETO DE CÁDMIO ESTABILIZADOS COM CISTEAMINA (CdTe- CTM)

O método de síntese consiste na precipitação controlada dos nanocristais seguindo a estratégia de injeção rápida do calcogênio reduzido (telúrio) na solução do metal oxidado contendo o agente estabilizante, de acordo com protocolo, esquematizado em Figura 13, já descrito pelo grupo anteriormente com algumas modificações (SANTOS, *et al.*, 2008).

1. Para redução de telúrio, 0,46 mmol de telúrio metálico em pó (99,997% Sigma-Aldrich) disperso em 5 mL de água ultrapura foi submetido a aquecimento em torno de 90 °C, sob atmosfera inerte (N₂, White Martins) e agitação, na presença de 2,5 mmol de borohidreto de sódio (NaBH₄, 99,99% Sigma-Aldrich). A reação foi catalisada pela adição de 200 µL de uma solução de hidróxido de sódio 2 M (NaOH em pó ≥98% Sigma-Aldrich).
2. Em um segundo balão, uma solução contendo 4,7 mmol de cloreto de cádmio (CdCl₂ 99.99% Sigma-Aldrich) e 5,7 mmol de hidrocloreto de cisteamina (CTM, HSCH₂CH₂NH₂·HCl, ≥98% Sigma-aldrich) foi preparada em 125 mL de água ultrapura, e o pH ajustado para 5,8 com NaOH 1 M. A solução foi aquecida a 90 °C, sob atmosfera inerte e agitação.
3. Após a redução do telúrio (evidenciada pela obtenção de solução transparente e límpida), o mesmo foi adicionado ao balão de duas bocas, que continha a solução de íons cádmio e cisteamina.
4. Imediatamente após a mistura das duas soluções, observa-se uma coloração laranja, característica da formação dos nanocristais de CdTe. A suspensão coloidal foi mantida sob aquecimento e atmosfera inerte por um total de 330 minutos (5h30m).
5. Com os PQs sintetizados, o pH foi reajustado para 5,6-5,8 com hidrocloreto de cisteamina.

6. Posteriormente, alíquotas dos PQs foram lavadas e filtradas em Vivaspin® 10 kDa MWCO (GE Healthcare) em centrífuga, por dois ciclos de 2500 rpm durante 3 minutos a 25 °C, para remoção de espécies que não reagiram ou em excesso e posterior execução dos demais procedimentos experimentais.

Figura 13 — Síntese de PQ de CdTe estabilizado por cisteamina.



Fonte: Autoria própria a partir de ACD/ChemSketch.

3.2 PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS BIMODAIS

Cada metodologia a seguir descrita foi realizada em triplicata para cada um dos sistemas. Para pontuar quais e como os sistemas seriam obtidos, foram feitas as seguintes considerações acerca das reações que envolvem a conjugação ao PQ:

- O anidrido do DTPA reage com aminas terminais em pH próximo da neutralidade formando ligações amida através dos grupos carboxila. A reação entre o anidrido de ácido DTPA e a amina primária da cisteamina seguem um mecanismo de adição-eliminação de poucas etapas, ocorrendo rapidamente mesmo a temperatura ambiente (SOLOMONS e FRYHLE, 2002; HERMANSON, 2008).
- Nas reações com uso de EDC/Sulfo-NHS o ligante é ativado por EDC/Sulfo-NHS para tornar-se reativo, e assim conjugar-se a amina terminal na superfície do PQ (HERMANSON, 2008). A

conjugação envolve etapas de ataque nucleofílico, eliminação e rearranjos (SOLOMONS e FRYHLE, 2002; MA e SU, 2011; WANG, *et al.*, 2010; HERMANSON, 2008).

Deste modo foi definido as quatro possíveis rotas para a obtenção dos sistemas:

S1: Complexação DOTA-Gd³⁺ seguida de conjugação ao PQ, assistida por EDC e Sulfo-NHS

S2: Conjugação do ligante DOTA ao PQ, assistida por EDC e Sulfo-NHS, e posterior complexação de Gd³⁺

S3: Conjugação do ligante DTPA ao PQ e posterior complexação de Gd³⁺

S4: Conjugação do ligante DTPA ao PQ, assistida por EDC e Sulfo-NHS, e posterior complexação de Gd³⁺

Posteriormente, foram definidos os seguintes pontos:

1. O volume total a ser obtido foi fixado em 2 mL, sendo 0,5 mL da suspensão de PQs.
2. A partir da concentração de PQs calculada (a partir de dados espectroscópicos, como descrito em 3.3), foi estimado o número de equivalentes dos PQs em um volume de 0,5 mL.
3. Sabendo o número de equivalentes dos PQs, foram calculados os volumes das soluções dos ligantes ou do complexo (para o sistema em que Gd³⁺ é complexado a DOTA antes da conjugação) que contenham 10, 20, 30, 40, 50 e 60 equivalentes por PQ.
4. Para o número de equivalentes dos ligantes foram calculados os volumes da solução contendo 90% de equivalentes de Gd³⁺ para cada ligante adicionado.

A partir de então, tomando a concentração estimada para os PQs e as diluições a serem realizadas, foi determinada também a **concentração total** (Tabela 2) de complexos paramagnéticos nos sistemas:

Tabela 2 — Concentração de complexo de gadolínio presente em cada sistema.

Nº de ligantes por PQ	[Gd-L] _i (mM)
10	0,04
20	0,08
30	0,12
40	0,16
50	0,20
60	0,24

- Quando necessário, também foram calculados os volumes necessários das soluções dos agentes de conjugação, mantendo pelo menos 1 equivalente de cada agente por ligante.
- Soluções a 10 mM do ligante DOTA ($\geq 97\%$ Sigma-Aldrich), dos agentes de acoplamento EDC ($\geq 98\%$ Sigma-Aldrich), sulfo-NHS ($\geq 98\%$ Sigma-Aldrich) e de cloreto de gadolínio (99.9% Alfa-Aesar) foram preparadas. Isto se faz necessário uma vez que não é possível pesar cada reagente em vidraria volumétrica e completar o volume com água, devido ao fato de que as massas seriam muito pequenas e erro associado a cada pesagem tornariam inviável o processo.

3.2.1 Sistemas com ligante DOTA

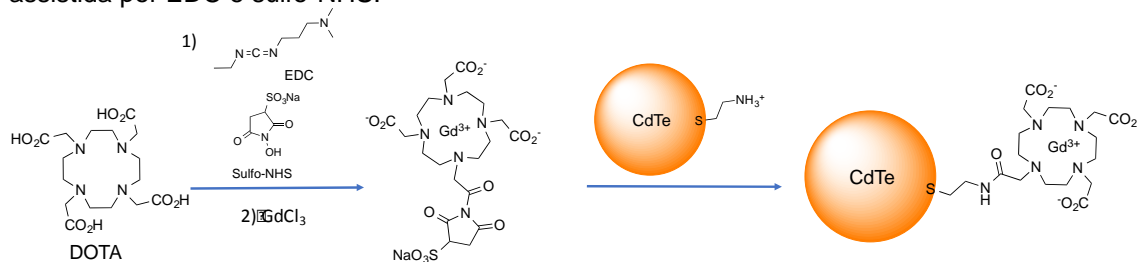
Duas metodologias foram executadas para obtenção dos sistemas com PQ conjugado a Gd-DOTA:

3.2.1.1 Complexação Gd-DOTA **antes** da conjugação ao PQ (**S1**):

- Preparou-se uma solução contendo o ligante DOTA, os reagentes EDC e sulfo-NHS com uma concentração final de 10 mM de todos os reagentes (Etapa 1) na Figura 14). A mistura foi deixada a agitar por 30 min.
- O pH foi ajustado para aproximadamente 8 utilizando solução de NaOH a 0,05 M.

3. Foi adicionado um volume de uma solução 10 mM com gadolínio suficiente para que se tenha 90% de Gd^{3+} para cada ligante disponível (*Etapa 2*) na Figura 14). A solução resultante seguiu para refluxo a 90 °C por 1 h, sob agitação.
4. Teste com Xilenol (BELLEZA e VILLARAZA, 2014) confirmou a estabilidade deste complexo.
5. Em frascos de vidro contendo 0,5 mL dos PQs, adicionou-se água (o suficiente para que o total final fosse 2 mL) e o complexo *Gd-DOTA*, nos volumes previamente calculados de modo a se obter sistemas na proporção molar de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 em relação ao PQ. A mistura foi deixada a agitar à temperatura ambiente durante a noite.

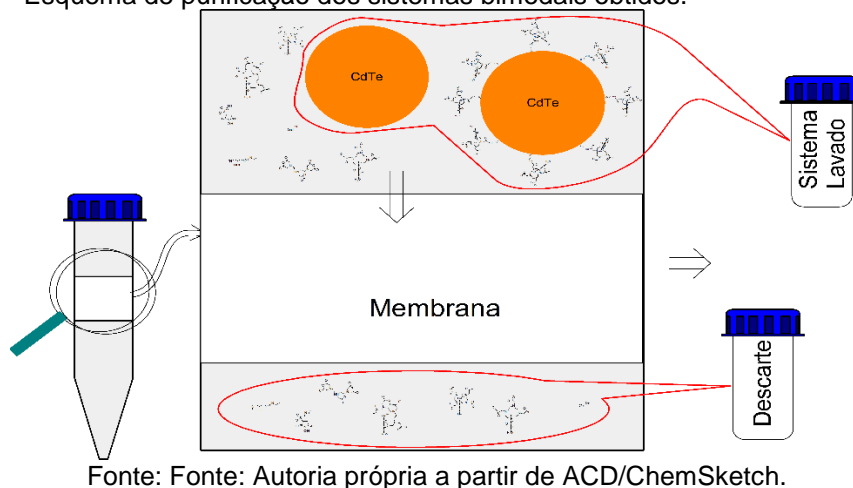
Figura 14 — Esquema de conjugação do complexo *Gd-DOTA* ao PQ de CdTe através da reação assistida por EDC e sulfo-NHS.



Fonte: Autoria própria a partir de ACD/ChemSketch.

Os sistemas foram purificados por ultrafiltração usando os filtros de 10 kDa da Vivaspin[®], como esquematizado na Figura 15. Uma vez que a membrana permite apenas a passagem de espécies de dimensões iônicas e moleculares, todo excesso de ligantes, reagentes para conjugação e gadolínio livre são retirados da amostra, e essa deve ser a composição dos descartes (que foram analisados por ICP-OES e relaxometria (seções 3.4 e 3.5), consequentemente as amostras passam a conter apenas PQs, conjugados ou não aos quelatos.

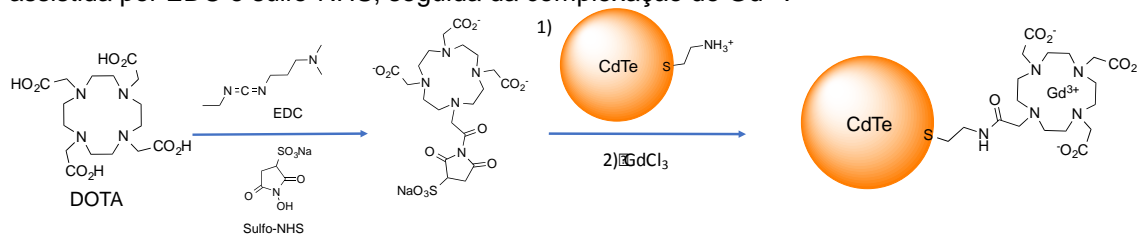
Figura 15 — Esquema de purificação dos sistemas bimodais obtidos.



3.2.1.2 Complexação Gd-DOTA após conjugação ao PQ (S2):

1. Para ativação de uma das carboxilas do ligante DOTA, para posterior conjugação do mesmo na superfície dos PQs via formação de ligação covalente, adicionou-se os volumes previamente calculados das soluções de DOTA, EDC e sulfo-NHS de modo a se obter sistemas na proporção molar de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 em relação ao PQ.
2. Adicionou-se água Mili-Q para completar um volume de 1,5 mL. Essas misturas seguiram para agitação durante 30 min.
3. Foram adicionados 0,5 mL dos PQs sintetizados (Etapa 1) na Figura 16).
4. Os sistemas foram levados a agitação durante a noite.
5. Cada sistema recebeu um volume da solução com íons gadolínio correspondente a 90% de Gd^{3+} em relação aos ligantes (Etapa 2) na Figura 16).
6. Novamente, os sistemas foram agitados durante a noite com temperatura ambiente.

Figura 16 — Esquema de conjugação do ligante DOTA ao PQ de CdTe através da reação assistida por EDC e sulfo-NHS, seguida da complexação de Gd^{3+} .



Fonte: Autoria própria a partir de ACD/ChemSketch.

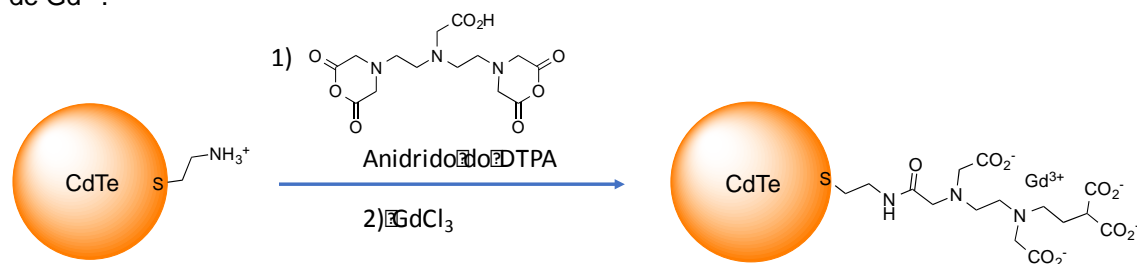
3.2.2 Sistemas com ligante DTPA

Novamente, duas metodologias foram executadas para obtenção dos sistemas com o PQ conjugado a Gd-DTPA, utilizando o dianidrido do DTPA (dianidrido dietilenotriaminapentaacético, $C_{14}H_{19}N_3O_8$, 98% Sigma-aldrich) para formar o ligante em solução após reação com CTM da superfície dos PQs:

3.2.2.1 Complexação Gd-DTPA após conjugação ao PQ, **sem** EDC e sulfo-NHS (**S3**):

A metodologia seguida foi semelhante à descrita na seção 3.2.1.2, excluindo as etapas de adição de EDC e sulfo-NHS (Figura 17), novamente com tempo de agitação de 4 h para a complexação do Gd (etapa 7).

Figura 17 — Esquema de conjugação do ligante DTPA ao PQ de CdTe seguida da complexação de Gd^{3+} .

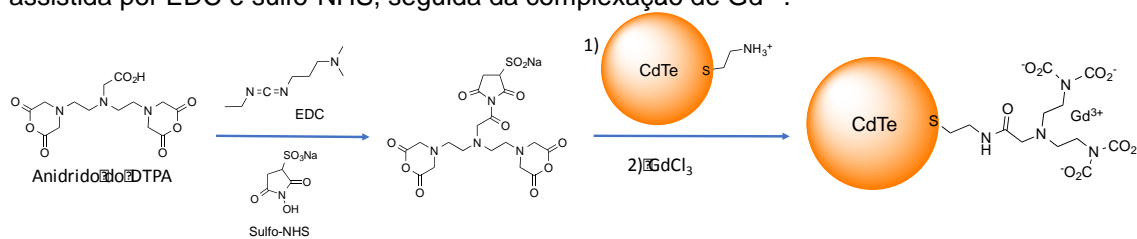


Fonte: Autoria própria a partir de ACD/ChemSketch.

3.2.2.2 Complexação Gd-DTPA após conjugação ao PQ, **com** EDC e sulfo-NHS (**S3**):

A metodologia seguiu de acordo com a descrita na seção 3.2.1.2 para a preparação do PQ-(Gd-DOTA), utilizando-se o anidrido do DTPA (Figura 18) e um tempo de agitação de 4 h para a complexação do Gd (etapa 7).

Figura 18 — Esquema de conjugação do ligante DTPA ao PQ de CdTe através da reação assistida por EDC e sulfo-NHS, seguida da complexação de Gd³⁺.



Fonte: Autoria própria a partir de ACD/ChemSketch.

3.3 CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA

Após lavados e filtrados, alíquotas dos PQs (diluídos) e dos sistemas bimodais foram caracterizados opticamente através de espectroscopia eletrônica de absorção (espectrofotômetro UV-1800 shimadzu), onde o primeiro máximo de absorção está relacionado ao diâmetro médio das partículas, de acordo com a equação abaixo proposta por Dagtepe *et al.* e aproximação sugerida por Rogach *et al.* (Equação 22) (DAGTEPE, *et al.*, 2007; ROGACH, *et al.*, 2007). A diluição da alíquota dos PQs foi feita de modo que a concentração nessa amostra fosse a mesma, ou a mais próxima da concentração nos sistemas bimodais, assim como para que a o sinal a ser observado estivesse dentro do intervalo em que a intensidade de sinal (absorbância) é proporcional a concentração.

$$r = \frac{1.38435 - 0.00066\lambda}{1 - 0.00121\lambda} \quad (22)$$

Onde r é o diâmetro médio das nanopartículas e λ é o comprimento de onda do primeiro máximo de absorção. A concentração de nanopartículas foi estimada pelas equações abaixo, considerando o coeficiente de extinção molar de acordo com Yu *et al.* (23) e através da Lei de Lambert-Beer (

(24) (YU, QU e PENG, 2003).

$$\varepsilon = 10043 \cdot r^{2,12} \quad (23)$$

$$C = \frac{A}{\varepsilon l} \quad (24)$$

Onda A é a absorvância, l , é o caminho óptico (largura da cubeta), r é o diâmetro médio, calculado pela equação 22, e ε é o coeficiente de extinção molar. Das mesmas amostras foram obtidos os espectros de emissão (Espectrofotômetro LS55 Perkin Elmer), usando comprimento de onda de excitação de 365 nm.

3.4 ICP-OES

O íon gadolínio presente nos sistemas foi quantificado a partir de medidas de espectrometria de emissão óptica de plasma acoplado indutivamente ICP-OES (Icap 6300, Thermo Scientific). Alíquotas dos sistemas foram digeridas em solução com ácido nítrico (65%, FMaia), e posteriormente diluídas a fim de obter soluções com concentrações na faixa de ppm (partes por milhão), e de modo a manter todas com aproximadamente o mesmo teor (5%) de HNO_3 .

3.5 CARACTERIZAÇÃO RELAXOMÉTRICA

A caracterização relaxométrica dos complexos paramagnéticos e dos sistemas bimodais obtidos (seção 3.2), foi realizada a partir das medidas dos tempos de relaxação longitudinal e transversal (T_1 e T_2) dos núcleos de ^1H das moléculas de água das soluções e suspensões coloidais aquosas, respectivamente. Valores de T_1 e T_2 foram medidos a 25 e 37 °C em relaxômetros, operando em campos magnéticos de 0,47 e 1,41 T (Bruker, Minispec mq20 e mq60, respectivamente). Os valores de T_1 foram obtidos usando uma sequência de pulso de inversão-recuperação (IR) sendo a média de duas medidas consecutivas, com 20 pontos de dados coletados e 4 varreduras para cada. Enquanto os valores de T_2 foram medidos utilizando a sequência de

pulsos Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) sendo a média de duas medidas consecutivas, com 1500 pontos de dados e separação de pulsos de 1 ms.

Além das medidas das amostras supracitadas, medidas de T_1 (37 °C, 1,41 T, 60 MHz) foram também obtidas em diferentes diluições tanto dos complexos paramagnéticos (0,2 a 0,04 mM) quanto dos sistemas bimodais (0,1 a 0,03 mM), já que é esperada uma dependência linear entre a taxa de relaxação ($1/T_i$, $i = 1, 2$) dos núcleos de ^1H das moléculas de água do meio e a concentração de íons gadolínio, de acordo com a equação 25, abaixo (PEREIRA, 2008; PEREIRA e GERALDES, 2007) :

$$\frac{1}{T_{i,obs}} = \frac{1}{T_{i,0}} + r_i[\text{Gd}] \quad (25)$$

Onde $T_{i,obs}$ ($i = 1, 2$) são os tempos de relaxação medidos experimentalmente na presença dos sistemas paramagnéticos, $T_{i,0}$ são os tempos de relaxação da água ultrapura (contribuição diamagnética), $[\text{Gd}]$ é a concentração do íon gadolínio (em mM) e r_i são as relaxividades longitudinal ($i = 1$) ou transversal ($i = 2$), ou seja é o incremento da taxa de relaxação dos núcleos de ^1H das moléculas de água por mM de Gd^{3+} .

3.6 ENSAIO DE TRANSMETALAÇÃO

De modo a avaliar a estabilidade dos complexos paramagnéticos, foi realizado o experimento de transmetalção do Gd^{3+} com Zn^{2+} em todos os complexos paramagnéticos obtidos. Para tal, é avaliada a evolução da taxa de relaxação longitudinal paramagnética ($R_{1p} = 1/T_{1p}$) dos núcleos ^1H das moléculas de água em condições fisiológicas (pH = 7,4 e 37 °C) de uma solução contendo o complexo paramagnético na presença de íons zinco. Dispondo do dianidrido do DTPA, utilizamos CTM a fim de promover a formação do ligante desejado e mimetizar o sistema com PQs. Para o ligante DOTA isso não se fez necessário uma vez que dispúnhamos do ligante assim como desejado. O procedimento foi realizado seguindo protocolo descrito por Laurent et al. (LAURENT, *et al.*, 2010):

1. Soluções dos complexos contendo Gd^{3+} com concentração final de 2,5 mM em solução tampão fosfato (a partir de Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 , anidros, $\geq 99\%$ Sigma-Aldrich) foram preparadas.
2. Alíquotas de 1 mL foram retiradas.
3. Cada alíquota foi acrescida de 10 μ L de uma solução de cloreto de zinco (a partir de $ZnCl_2$, 99,999% Sigma-Aldrich) 250 mM.
4. A Solução resultante foi agitada.
5. Imediatamente, uma fração de 0,3 mL foi retirada e foram medidos os tempos de relaxação longitudinal dos núcleos 1H das moléculas de água das soluções em estudo em função do tempo.
6. Mediu-se o T_1 a $t=0$ (instante em que se adiciona o Zn^{2+} ao meio), coletando 20 pontos de dados com 4 varreduras para cada um, em um intervalo de pulsos de 50 a 20000 ms.
7. Medidas consecutivas de T_1 foram realizadas (em duplicata) entre 0 e 7200 min, em intervalos de tempo inicialmente curtos, por volta de 20 min, durante a primeira hora, aumentando posteriormente o intervalo de medida para 24 h
8. São determinados então dois índices que avaliam de forma semi-quantitativa a termodinâmica e a cinética da transmetalção: $R_1(t)/R_1(0)$ e o tempo t para $R_1(t)/R_1(0)=0,8$ ou seja, o intervalo em que permanecem 80% dos complexos sem haver transmetalção.

Medidas de T_1 (T_{1obs}) foram realizadas no relaxômetro Minispec mq 60 da Burker (60 MHz, 1.41 T, 37 °C). A taxa de relaxação paramagnética é obtida após subtração da contribuição diamagnética ($R_{1dia} = 1/T_{1dia}$) da taxa de relaxação 1H observada ($R_{1obs} = 1/T_{1obs}$).

3.7 MARCAÇÃO CELULAR E CITOMETRIA DE FLUXO

Os sistemas bimodais S1 e S3 nas proporções 1:20 e 1:30 foram avaliados para marcação celular inespecífica em hemácias, de acordo com as etapas seguintes:

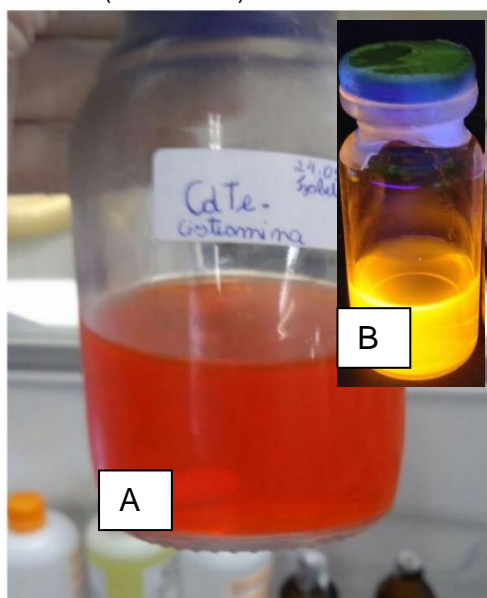
1. Coletou-se sangue em um tubo contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético)
2. 1 mL da amostra de sangue foi transferido para um *eppendorf* e centrifugado durante 5min a 679 xg (mini Spin, Eppendorf AG), para remoção do plasma com a precipitação de eritrócitos. Todos os procedimentos executados neste projeto foram apoiados pelo comitê de ética em pesquisa (CAAE 41109115.6.0000.5208).
3. As hemácias foram então diluídas em solução salina 0,9%, para obter uma suspensão de hemácias a 1%.
4. As hemácias foram incubadas com os sistemas bimodais por 5 minutos, em uma concentração final de 1,5 μ M.
5. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas por 30 s a 679 xg.
6. O sobrenadante foi retirado e adicionou-se 100 μ L de salina a 0,9% antes da leitura.
7. As hemácias incubadas com os sistemas bimodais foram avaliadas por microscopia de fluorescência (Leica DMI 4000B), a emissão dos PQs foi excitada usando o filtro em 560/40 nm e adquirida usando o filtro em 645/75 nm.
8. Para citometria de fluxo (realizada em citômetro BD Accuri™ C6 (Becton Dickinson)) as hemácias foram preparadas usando a mesma metodologia.
9. Foram adquiridos 20000 eventos sob excitação a 488 nm, e a emissão foi detectada usando o filtro FL2 (585/20 nm).
10. Os dados foram tratados usando o software Accuri C6™ (Becton Dickinson).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PQs (CdTe-CTM)

Os PQs de CdTe estabilizados por cisteamina foram obtidos, conforme a metodologia previamente descrita na seção 3.1, resultando em suspensões coloidais, de coloração e aspecto visual característicos, conforme observado abaixo na Figura 19.

Figura 19 — Suspensão coloidal aquosa contendo PQs de CdTe-CTM (A) sob iluminação comum (luz branca) e (B) sob lâmpada UV ($\lambda = 365$ nm).

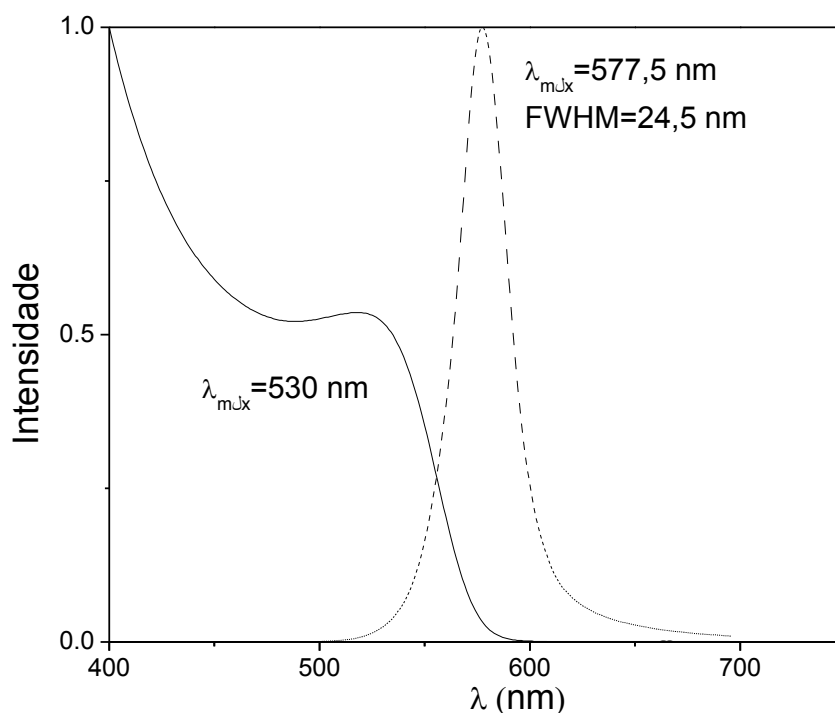


Fonte: Autoria própria.

Os perfis de absorção eletrônica e de emissão das suspensões coloidais de CdTe-CTM são apresentados na Figura 20. A partir do primeiro máximo de absorção localizado em 530 nm, estimou-se o diâmetro médio das nanopartículas como sendo aproximadamente 3,1 nm, a partir da utilização da Equação 22 (seção 3.3). Este tamanho corresponde a nanopartículas com *band gap* (E_g , onde $E_g = hc/\lambda$) em torno de 2,34 eV, evidenciando o confinamento quântico, uma vez que o CdTe macroscópico apresenta E_g de 1,44 eV e raio do éxciton de Bohr de 7,3 nm (EYCHMÜLLER, LESNYAK e GAPONIK, 2013; KAPITONOV, *et al.*, 1999). Também foi possível obter a concentração

aproximada de nanopartículas dispersas ($\sim 0,02$ mM) através das equações 23 e 24.

Figura 20 — Espectros absorção eletrônica (linha contínua) e de emissão (linha tracejada) de uma suspensão coloidal contendo de CdTe-CTM ($\lambda_{exc} = 365$ nm)

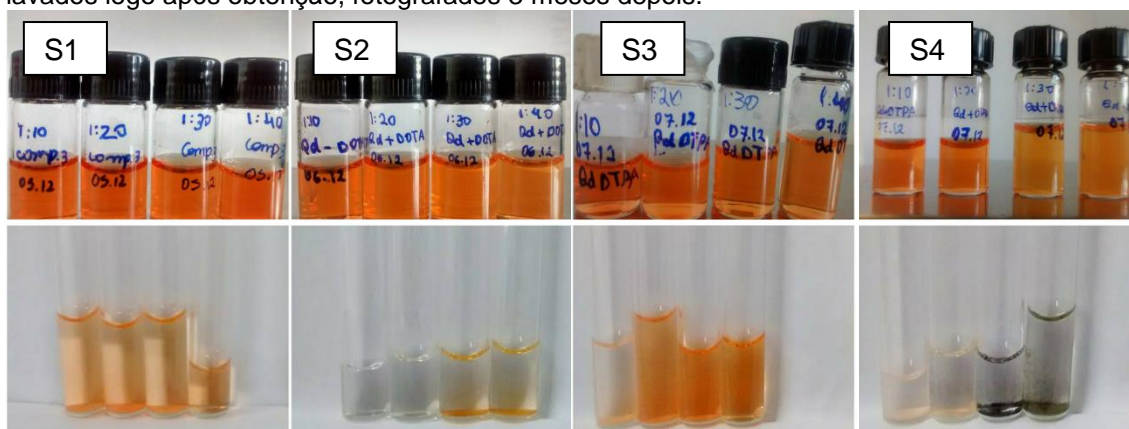


De acordo com o espectro de emissão (Figura 20 linha tracejada), os nanocristais apresentaram um máximo de emissão em torno de 578 nm. A largura à meia altura (FWHM- do inglês *full width at half maximum*) de aproximadamente 25 nm é um indicativo de poucos defeitos em sua superfície. PQs descritos na literatura sintetizados de forma bem semelhante a estes aqui descritos, apresentam valores de FWHM entre 38 e 81 nm (WANG, *et al.*, 2012; YANG, *et al.*, 2008; KUANG, *et al.*, 2010). O máximo de emissão está situado no laranja, a simetria observada no espectro de emissão reflete a ausência de muitos defeitos nos PQs, o que se pode atribuir a uma efetiva passivação da superfície através de interações (formação de ligação) do enxofre da cisteamina (CTM) com íons cádmio (WANG, *et al.*, 2012; GAPONIK, *et al.*, 2002).

4.2 PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS BIMODAIS

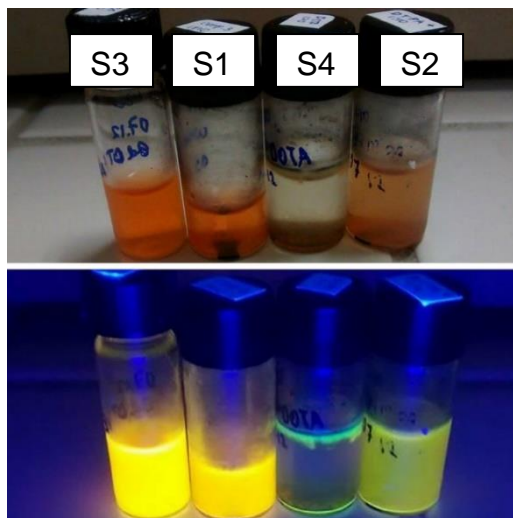
Os PQs de CdTe encontram uma importante limitação em sua estabilidade devido à fácil oxidação dos ânions de telúrio, particularmente os sistemas estabilizados com CTM parecem apresentar um número menor de ligações Cd-S em comparação com outros estabilizantes tióis. Sendo assim estes nanocristais, mesmo demonstrando uma efetiva passivação da superfície logo após a síntese, podem perder a estabilidade a depender da disponibilidade de estabilizantes livres em solução, assim como da quantidade de oxigênio solubilizado (GAPONIK, *et al.*, 2002). A partir da metodologia aplicada para preparação de sistemas com diferentes proporções PQ:Complexo, (descrito em 3.2) observou-se o comportamento em relação à estabilidade das nanopartículas, sendo os sistemas contendo PQs com sinal de precipitação/oxidação eliminados. Nas Figura 21 e Figura 22 são mostradas as imagens de todos os quatro sistemas obtidos, onde é possível perceber visualmente quais os que apresentam melhor estabilidade coloidal.

Figura 21 — Acima: sistemas fotografados 6-7 dias após preparo, sem lavar. Abaixo: sistemas lavados logo após obtenção, fotografados 3 meses depois.



Fonte: Autoria própria.

Figura 22 — Sistemas 1:10 após 5 meses; Todos os sistemas passaram previamente por etapas de lavagem e transferências de alíquotas para relaxometria. Acima em luz branca e abaixo sob lâmpada $\lambda=365$ nm.



Fonte: Autoria própria.

Os sistemas com 50 e 60 ligantes por PQ, para todas as metodologias, oxidaram e/ou precipitaram durante a preparação, ou em menos de 6 dias após a preparação, e por isso não foram replicados ou caracterizados. De acordo com a observação visual da estabilidade, os sistemas selecionados foram: **S1 e S3** os quais demonstraram apresentar uma melhor estabilidade coloidal e ausência de sinais característicos de oxidação, portanto foram replicados e caracterizados.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS BIMODAIS: CdTe-CTM/L-Gd

4.3.1 Caracterização óptica

Os sistemas S1 e S3 foram opticamente caracterizados de forma semelhante e comparativa a caracterização feita na seção 4.1 para o PQ, como se observa nas Figura 23 e

Figura 24. Com a conjugação dos quelatos o perfil de emissão do PQ é praticamente inalterado pela presença dos mesmos sugerindo a possibilidade de que a interação destes se dá exclusivamente pela extremidade $-NH_2$ da cisteamina, preservando o núcleo de CdTe. A variação na FWHM é praticamente inexistente, enquanto que o deslocamento do máximo de emissão é de no máximo 1,5 nm para os sistemas S3 e 3 nm para os sistemas S1.

Os espectros de absorção também não sofreram alteração, uma vez que não houve deslocamento na posição do primeiro máximo de absorção, o que sugere que não houve alteração no tamanho médio das nanopartículas.

Figura 23 — Espectros de emissão e absorção (normalizados) dos sistemas S1 comparados ao PQ.

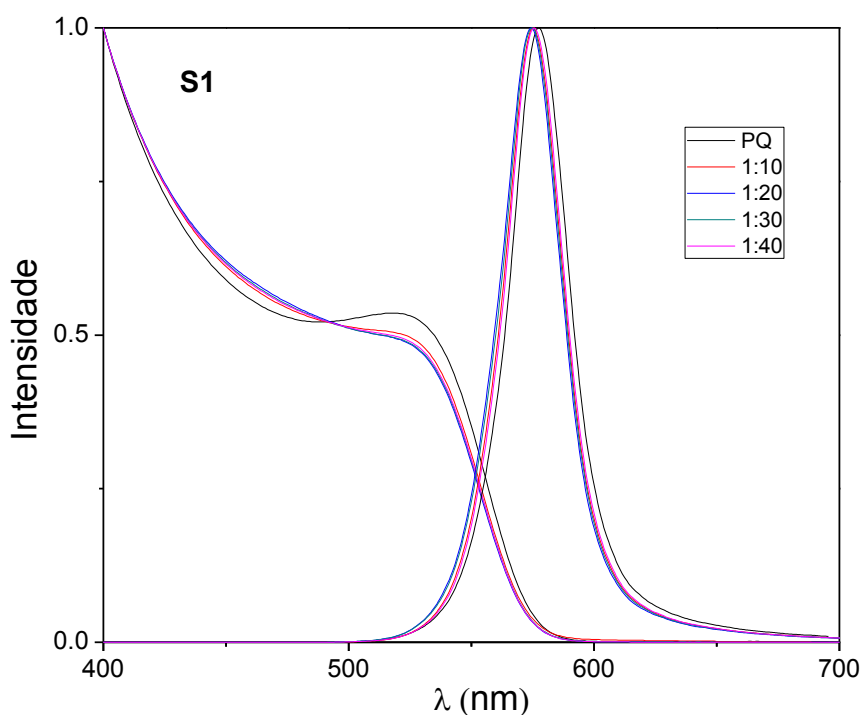
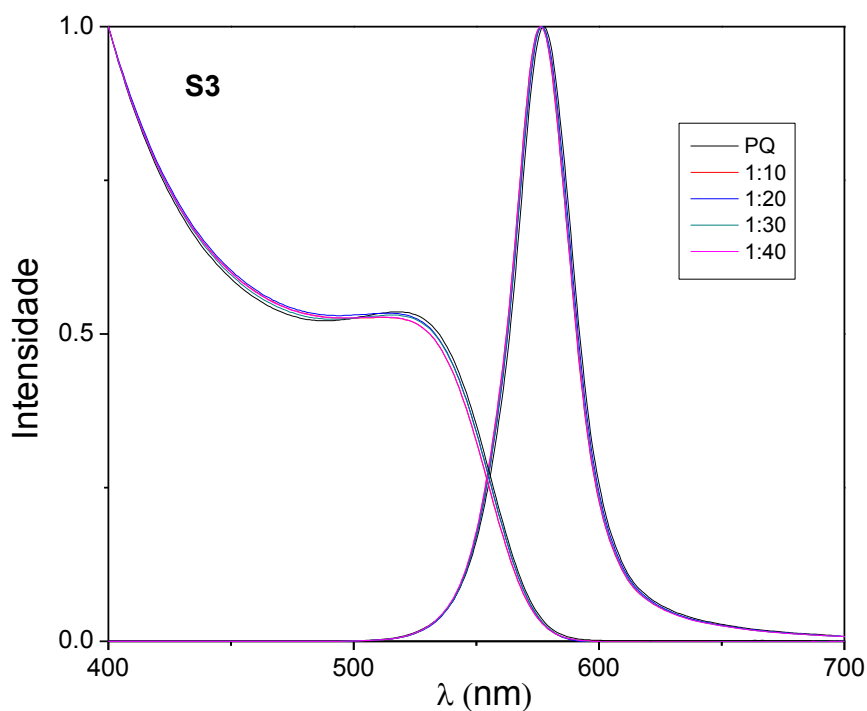


Figura 24 — Espectros de emissão e absorção (normalizados) dos sistemas S3 comparados ao PQ.



4.3.2 Caracterização relaxométrica

A concentração de gadolínio foi estimada por ICP-OES para amostras pré-selecionadas de acordo com o comportamento relaxométrico observado, de modo a excluir amostras de mesma composição com comportamentos muito parecidos, sendo esse o caso das amostras contendo 20 ligantes para cada PQ, tanto nos sistemas com DOTA como naqueles com DTPA. Nestas amostras as medidas relaxométricas se assemelhavam muito com as amostras com 10 ligantes por PQ. Tomando o total de gadolínio adicionado no sistema é possível obter um comparativo, na Tabela 3, com o total encontrado nas amostras após todo processo de conjugação e lavagem.

Tabela 3 — Comparativo entre a concentração de gadolínio e entre as proporções PQ:Ligante adicionados aos sistemas e as concentrações finais, obtidas por ICP-OES nos sistemas bimodais.

Proporção teórica PQ:Ligante	[Gd ³⁺] mM		Proporção real Ligante/PQ	
	S3	S1	S3	S1
1:10	0,04	0,03	9	6
1:30	0,07	0,06	15	14
1:40	0,11	0,11	24	25

Apesar das diferenças estruturais e nas reações (demonstradas na seção 3.2.1 e 3.2.2) que envolvem as conjugações dos dois diferentes complexos, os valores obtidos por ICP-OES demonstram que o rendimento das duas metodologias utilizadas foi semelhante, obtendo-se quantidades bastante parecidas de complexo por PQ, variando de 47% a 90% de ligantes conjugados (Tabela 3).

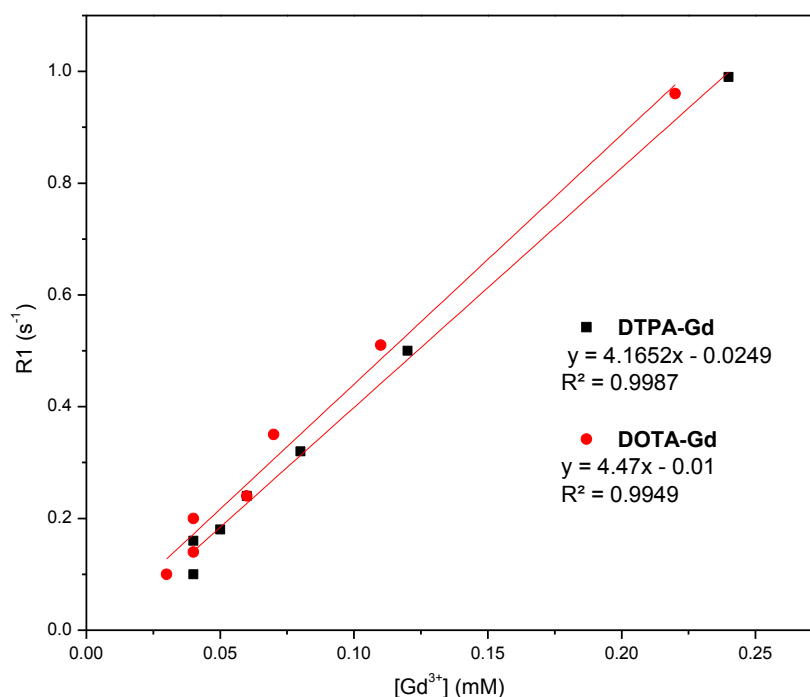
De forma geral, os sistemas nos quais a adição de complexos foi menor (10 ligantes: PQ), houve maior sucesso na conjugação, isto implica que, com o aumento do número de complexos o impedimento estérico, uma vez que os ligantes são volumosos, torna-se limitante para a conjugação. Isto e as observações na instabilidade dos sistemas com 50 e 60 ligantes adicionados, relatadas em 4.3, indicam que provavelmente o limite de complexos conjugados a este PQ deve estar muito próximo dos 24-25 (Tabela 3).

Uma vez que o objetivo principal é o desenvolvimento de potenciais agentes de contraste para IRM, torna-se necessário avaliar a resposta destes sistemas ao campo magnético. Os primeiros dados relaxométricos a serem analisados são as curvas que relacionam a concentração de gadolínio com a taxa de relaxação longitudinal (R_1) dos núcleos de ¹H das moléculas de água do meio. Os ACs à base de gadolínio oferecem contraste positivo devido ao mecanismo de esfera interna ser a contribuição dominante para a relaxividade longitudinal total observada, uma vez que está diretamente relacionado com moléculas de água coordenadas ao centro paramagnético, bem como a respectiva taxa de troca com as moléculas de água do meio (CARAVAN, 2006; CARAVAN, et al., 1999) . Os valores de R_1 foram obtidos para algumas diluições das soluções contendo os complexos e outras contendo os sistemas (Figura 25).

As medidas a 20 MHz demonstram um comportamento próximo da linearidade de R_1 na faixa de concentrações analisada para os complexos e para

os sistemas, permitindo que mesmo as amostras dos sistemas bimodais menos concentradas podem ser submetidas a estas mesmas medidas. Deste modo os coeficientes angulares fornecem os valores para relaxividade

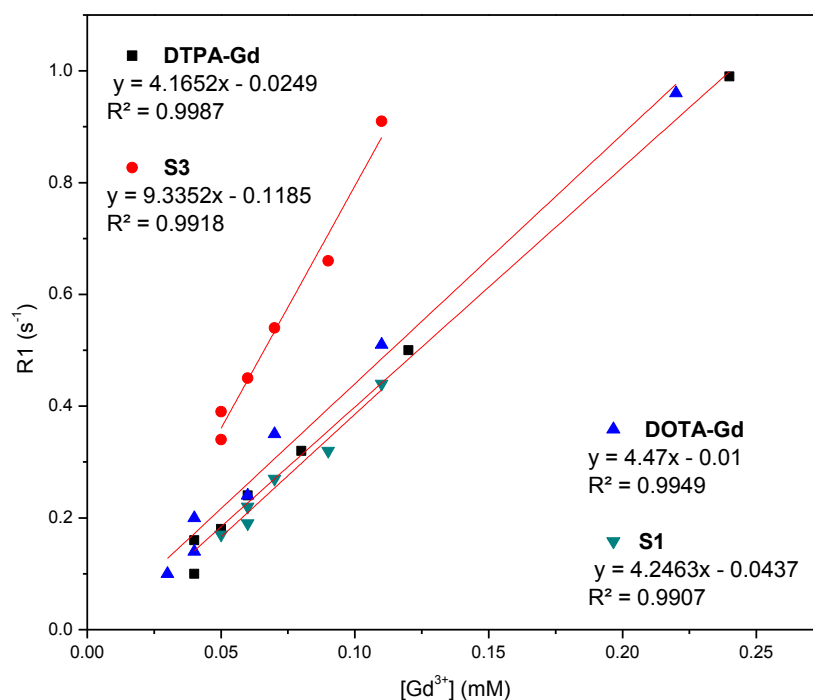
Figura 25 — Variação da taxa de relaxação longitudinal ($R_1=1/T_1$) em função da concentração de íons Gd^{3+} dos complexos paramagnéticos (20MHz, 37°C).



Ambas soluções contendo os complexos sintetizados apresentam uma resposta linear para os valores de R_1 . A partir dos coeficientes angulares nos gráficos, é possível obter os valores de r_1 ($mM^{-1}s^{-1}$) de 4,47 e 4,17 para as soluções contendo o complexo com DOTA e DTPA respectivamente, os quais são bastante próximos dos valores relatados para os complexos comerciais (ROHRER, *et al.*, 2005). Além disso, as medidas realizadas permitem obter um paralelo das taxas de relaxação dos complexos antes e após a conjugação, a partir de diluições dos sistemas mais concentrados: S1 e S3 foram obtidas as curvas da Figura 26. Observa-se certa linearidade entre a concentração de íon gadolínio e o aumento da taxa de relaxação. A partir dos coeficientes angulares dos gráficos, é possível perceber que para o sistema com DTPA a 20 MHz, há um aumento da relaxividade, enquanto que o sistema com DOTA a relaxividade praticamente se mantém como no complexo antes da conjugação. No entanto,

veremos que isso não se estende para sistemas com proporções PQ:complexo diferente.

Figura 26 — Comparação entre variação da taxa de relaxação longitudinal dos sistemas bimodais com maior número de complexos por PQ com os complexos correspondentes de acordo com a concentração de Gd^{3+} a 20 MHz e 37 °C.



Os valores de T_1 (Tabela 4) para os descartes das amostras com 40 ligantes adicionados, são baixos, indicando uma concentração relativamente alta das espécies paramagnéticas (neste caso, complexos de gadolínio ou o íon), comparada com aquela presente nos sistemas. Estes valores evidenciam a efetividade na filtração realizada, assim como a deficiência na conjugação dos complexos aos PQs quantificada nos dados de ICP-OES (Tabela 3).

Tabela 4 — Valores de T_1 , 20 MHz e 37 °C, nas amostras de descarte dos sistemas, proveniente das lavagens realizadas.

Ligante	Amostra	$T_1(s)$
DTPA	40x	0.73
DOTA	40x	1.05

Na Tabela 5 estão resumidos os dados relaxométricos obtidos a 20 e 60 MHz a 37 °C para os sistemas bimodais com as diferentes proporções PQ:ligantes, calculadas através dos dados de ICP-OES. Os dados obtidos para os sistemas bimodais são comparados com os valores da literatura para os complexos em suas formas já em uso clínico, a fim de observar a efetividade nesta tentativa de otimização das relaxividades.

Tabela 5 — Relaxividades obtidas para os sistemas bimodais a 37 °C a 20 MHz (0,47 T) e 60MHz (1,41 T) em comparação com as relaxividades para os complexos de gadolínio correspondentes em sua forma comercial.

37°C (mM ⁻¹ s ⁻¹)		S3				S1			
		Gd-DTPA	1:9	1:15	1:24	Gd-DOTA	1:6	1:14	1:25
60 MHz	r ₁	3,30*	3,46	4,37	6,82	2,90*	6,07	3,61	3,07
	r ₂	3,90*	3,89	6,70	9,51	3,20*	7,63	4,65	4,49
20 MHz	r ₁	4,17	6,71	9,16	8,31	4,47	11,36	4,06	3,61
	r ₂	4,00*	6,66	8,01	7,41	4,10*	6,89	5,70	4,55

*Dados para o complexo em sua forma comercial, fonte: (ROHRER, *et al.*, 2005).

A 60 MHz r_1 e r_2 para os sistemas com o ligante DTPA aumentam de acordo com o número de complexos conjugados, já a 20 MHz os sistemas com 24 complexos apresentam valores menores que aqueles com 15 complexos.

Para os sistemas com o ligante DOTA o aumento do número de complexos diminui as relaxividades r_1 e r_2 em ambos os campos medidos, comportamento que não seria o esperado se houvesse conjugação efetiva dos quelatos paramagnéticos na superfície dos PQs. É nestes sistemas, porém, que se encontra o melhor valor para r_1 a 20 MHz, 11,36 mM⁻¹ s⁻¹ para o sistema com 6 complexos por PQ, o que corresponde a um aumento de 2,5 vezes em relação ao valor do complexo não conjugado ao PQ.

Conforme descrito na fundamentação teórica desse trabalho, o processo de relaxação paramagnética em quelatos de Gd(III) é governado pela contribuição de esfera interna (IS), relacionada com troca entre água coordenada ao centro metálico e as águas do meio e a contribuição de esfera externa (OS) resultante de moléculas de água que difundem próximas ao quelato paramagnético. Considerando o efeito de esfera interna, é possível manipular determinados parâmetros associados ao aumento da relaxividade, que são: o número de moléculas de água coordenadas ao centro metálico (q), seu tempo de troca (τ_M) com águas do *bulk* e o tempo de correlação rotacional do complexo

(τ_R) (CARAVAN, 2006; PEREIRA, 2008; DEBROYE e PARAC-VOGT, 2014). Assim, uma das abordagens usadas para aumentar r_1 na faixa de frequência de 10 - 60 MHz é reduzir a mobilidade (consequentemente aumentando τ_R) de quelatos paramagnéticos, ligando-os, como no nosso caso, à nanopartículas que são pelo menos uma ordem de grandeza maiores que os quelatos. No entanto, a taxa de troca da água coordenada ($k_{ex}=1/\tau_M$) se torna importante e pode limitar do aumento de r_1 quando o movimento rotacional é retardado (CARAVAN, 2006). Com relação ao número de águas coordenadas ao complexo após conjugação desse com os PQs, apesar de um dos grupos carboxilas ter sido usado para formar ligação amida com a cisteamina durante processo de conjugação, já foi demonstrado em outros estudos com derivados monoamida do Gd-DOTA e Gd-DTPA que o átomo de oxigênio da amida ainda coordena com o íon Gd(III), mantendo o valor de $q = 1$ (CARAVAN, *et al.*, 1999), (PETERS, *et al.*, 2013). Além disso, espera-se também que k_{ex} não seja alterado de modo significativo após conjugação dos quelatos à superfície dos PQs, uma vez que a acessibilidade das moléculas de água do meio ao quelato paramagnético mantém-se irrestrita. Valores de k_{ex} previamente reportados para complexos monoamidados conjugados à dendrimeros (TÓTH, *et al.*, 1996) apresentaram-se ainda menores do que os calculados para Gd-DOTA e Gd-DTPA (POWELL, *et al.*, 1996). Logo, sendo os quelatos paramagnéticos conjugado ao PQ monoamidados, é de se esperar que k_{ex} para os nanosistemas estudados sejam semelhantes, o que pode estar limitando o aumento de r_1 esperado para quelatos paramagnéticos com τ_R lento advindos da conjugação destes com os PQs.

Analisando a diminuição de r_1 dos nanosistemas obtidos em função do campo magnético, sabe-se que a 60 MHz (correspondente ao campo clínico) o tempo de correlação dominante para r_1 é a difusão rotacional, que governa a contribuição de IS (CARAVAN, 2006) e, para um τ_R mais lento, observa-se um r_1 maior. No entanto, estudos prévios com diferentes quelatos de Gd (III) mostraram que, se τ_R é retardado significativamente (por exemplo, quando quelatos moleculares estão ligados a proteínas), r_1 diminui em campos magnéticos mais altos com o aumento de τ_R . Assim, pode-se supor que os valores de τ_R dos nossos nanosistemas são lentos o suficiente para diminuir r_1 a 60 MHz quando comparado a 20 MHz. A interação de τ_R (assim como τ_M) com

as diferentes intensidades de campo são bastante distintas, podendo a melhor combinação de valores a 20 MHz resultar na pior relaxividade em 60 MHz (CARAVAN, *et al.*, 2009; DE LEÓN-RODRÍGUEZ, *et al.*, 2015; PEREIRA, 2008).

É possível observar que a mudança do ligante é acompanhada de uma mudança do comportamento da relaxividade, o que pode ser uma evidência que os parâmetros de maior relevância foram alterados de formas distintas nos diferentes sistemas (aqueles com DOTA e aqueles com DTPA). Isto se deve principalmente às diferenças estruturais existentes entre esses ligantes, sobretudo após a conjugação, uma vez que o número de cada um dos ligantes em cada sistema é bastante semelhante. Dessa forma, deve-se ainda considerar a flexibilidade distinta para cada um dos quelatos paramagnéticos na superfície do PQ, que pode limitar a relaxividade, pois no movimento rotacional, tanto o movimento global do quelato imobilizado (τ_R global) como sua capacidade de movimento interno (τ_R local) deve ser levada em conta, de acordo com o tratamento Lipari-Szabo (FERREIRA, *et al.*, 2012; LIPARI e SZABO, 1982).

A partir da razão r_2/r_1 (Tabela 6) é possível observar como ocorreram as alterações nas relaxividade de forma relativa.

Tabela 6 — Valores de r_2/r_1 a 37 °C, para os sistemas bimodais, em campos de 20 MHz (0,47 T) e 60MHz (1,41 T) em comparação com os complexos de gadolínio correspondentes em sua forma comercial.

		S3				S1			
(mM⁻¹s⁻¹)		DTPA-Gd	1:9	1:15	1:24	DOTA-Gd	1:6	1:14	1:25
60MHz	r_2/r_1	1,18	1,12	1,53	1,39	1,10	1,26	1,29	1,46
20MHz	r_2/r_1	1,18	0,99	0,87	0,89	1,21	0,61	1,40	1,26

O mecanismo de esfera externa resulta da difusão das moléculas de água à volta do centro metálico e, portanto, tempo de difusão e distância das mesmas ao íon paramagnético são parâmetros relacionados à taxa de relaxação transversal observada. Os dados apresentados na Tabela 6 mostram que para ambos os sistemas a razão r_2/r_1 aumentou no campo clínico de 60 MHz (com exceção para o sistema S1 1:14), devido ao comportamento esperado de diminuição de r_1 e aumento de r_2 à 60 MHz quando comparados a 20 MHz. Logo os nanosistemas obtidos podem potencialmente ser aplicados como agentes de contrastes ponderados em T_1 (T_1 -weighting CA) desde que as razões r_2/r_1 são

muito baixas (CARAVAN, *et al.*, 1999), (CARAVAN, *et al.*, 2009), (DE LEÓN-RODRÍGUEZ, *et al.*, 2015).

Estes sistemas bimodais aqui descritos apresentam algumas melhorias na relaxividade de forma discreta. No entanto, uma vez que há diversos sistemas como estes já caracterizados, uma análise comparativa, resumida na Tabela 7, se faz necessária a fim de avaliar a viabilidade destes sistemas frente a outros.

Tabela 7 — Comparativo de propriedades relaxométricas de diversos sistemas bimodais.

Referência	r_1 (mM ⁻¹ s ⁻¹)			Parâmetros das medidas
	Por Gd	Por PQ	Quelatos/PQ	
S3 1:15	4,37	65,54	15	60 MHz 37 °C
S3 1:24	6,82	163,61	24	
S1 1:14	3,61	50,48	14	
S1 1:25	3,07	76,82	25	
(JIN, <i>et al.</i> , 2008)	4,74	365	77±18	500 MHz *
(STASIUK, <i>et al.</i> , 2011)	13	900	75-80	35 MHz 25 °C
(STASIUK, <i>et al.</i> , 2013)	Gd.2: 20,9	Gd.2: 2406	115 Gd.2	35 MHz 25 °C
	Gd.3: 8,9	Gd.3: 585	66 Gd.3	
	Gd.4: 31,5	Gd.4: 2523	80 Gd.4	
(XING, <i>et al.</i> , 2015)	16,56	**	**	60 MHz 37 °C
(YANG, <i>et al.</i> , 2017)	9,91	**	**	127,5 MHz 37 °C
(MCADAMS, <i>et al.</i> , 2017)	11	6800 +/-1300	550 +/-130	42,5 MHz 37 °C

*Temperatura ambiente; ** não informa.

Apesar de os parâmetros adotados para as medidas serem bastante diferentes, é possível verificar que a maioria das sondas bimodais apresentadas tem um número bastante elevado de complexos por PQ, em comparação com as sondas relatadas no presente trabalho. Neste sentido consequentemente, há uma limitação nos valores de relaxividade por PQ. As relaxividade por íon gadolínio são, na maioria das demais sondas, pelo menos o dobro, neste sentido cabe destacar que, na maioria dos trabalhos os ligantes são de maior peso

molecular em relação a DOTA e DTPA, este fator já garante melhores relaxividades.

Apesar dos resultados ainda discretos os sistemas obtidos a partir deste trabalho apresentam uma diferença importante em relação a síntese, os PQs aqui utilizados são dispersos em água, o que torna mais viável ecologicamente e de modo a diminuir etapas no processo de preparação dos sistemas para aplicações biomédicas. Além disso, por se tratar de um estudo inicial com PQs em meio aquoso, abre a possibilidade para uso de outras nanopartículas como estas.

Cada sistema paramagnético se comporta de diferentes formas, uma vez que os parâmetros que estão associados aos mecanismos que governam o processo de relaxação paramagnética podem ser alterados de modo distinto em cada um dos sistemas estudados. Portanto faz-se necessário um estudo quantitativo do comportamento de relaxação paramagnética de nossos nanosistemas bimodais, o que exige um estudo relaxométrico completo, incluindo medidas de ^{17}O , medidas da dependência r_1 com o campo magnético em (medidas de NMRD- Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion).

4.4 TRANSMETALAÇÃO

O comportamento observado nas medidas de transmetalção refletem a estabilidade relatada para estes complexos, ou seja, os sistemas lineares apresentam uma menor estabilidade frente àqueles com ligantes cíclicos (LOHRKE, *et al.*, 2016; SHERRY, CARAVAN e LENKINSKI, 2009). As curvas e os valores apresentados na Figura 27 e Tabela 8 são muito semelhantes aos encontrados na literatura para os complexos em suas formas usuais (LAURENT, ELST e MULLER, 2006).

Figura 27 — Evolução de $R_1(t)/R_1(0)$ para Gd-DOTA e Gd-DTPA ao longo de aproximadamente 5 dias.

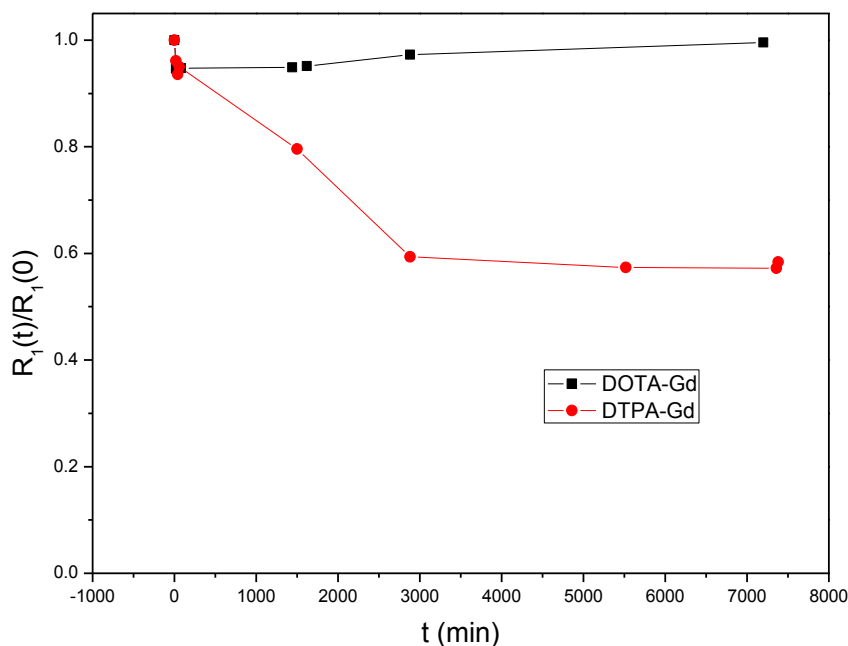


Tabela 8 — Índices em tempo total de análise e cinético para transmetalção do íon Gd^{3+} .

Complexo	$R_1(t)/R_1(0)$	t (min) para $R_1(t)/R_1(0)=0,8$
Gd-DOTA	0,99	>7200
Gd-DTPA	0,58	1500

O índice relacionado ao tempo total de análise $R_1(t)/R_1(0)$ onde $t = 7200$ min informa a extensão em que a transmetalção ocorre, neste caso próximo da metade de todos os complexos com ligante DTPA tem os sítios do metal ocupados por Zn^{2+} , o que se aproxima do índice de 0,49 para o complexo comercial (LAURENT, ELST e MULLER, 2006; LAURENT, *et al.*, 2010). Enquanto que para o ligante DOTA há uma estabilidade muito alta, uma vez que praticamente a totalidade dos complexos permanece com o Gd^{3+} coordenado, novamente semelhante ao índice de 0,99 relatado para o complexo comercial (LAURENT, ELST e MULLER, 2006; LAURENT, *et al.*, 2010).

O índice cinético indica por quantos minutos a maior parte do complexo permanece relativamente estável, ou seja, 80% dos complexos não sofrem transmetalção com o íon Zn^{2+} , ressaltando a instabilidade do complexo com DTPA após 25 h (1500 min), que em sua forma comercial ocorre em aproximadamente 250 min (LAURENT, ELST e MULLER, 2006; LAURENT, *et al.*, 2010). Após 5 dias de análise o complexo com DOTA se manteve estável, semelhante ao que ocorre com o complexo na forma comercial, onde este tempo

é superior a 3 dias (LAURENT, ELST e MULLER, 2006), (LAURENT, *et al.*, 2010).

Estes índices apenas fornecem indícios a respeito da estabilidade dos complexos sintetizados, uma vez que não permitem analisar outros mecanismos que comprometam a estabilidade, ou prever o comportamento dos complexos após a conjugação com o PQ. Portanto, é possível concluir que: (1) a complexação Gd-DOTA ocorre de acordo com as expectativas; (2) para o ligante DTPA, onde a complexação ocorre após a conjugação, a diminuição do número de átomos doadores não altera a estabilidade frente a transmetalção.

4.5 MARCAÇÃO CELULAR

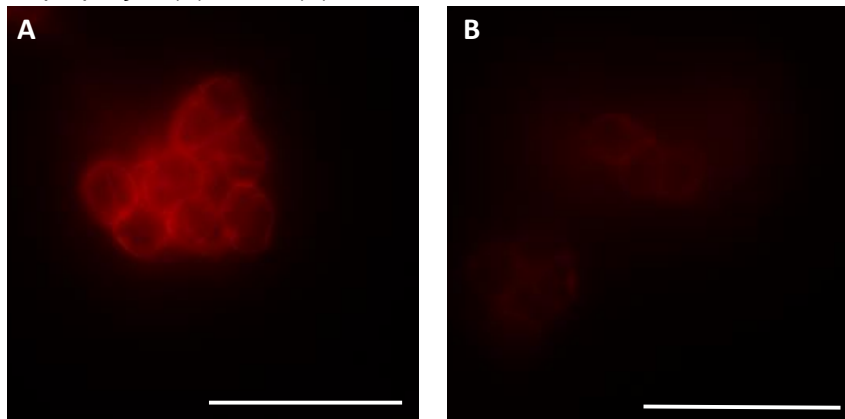
Os sistemas S1 e S3 foram avaliados como marcadores fluorescentes inespecíficos através de incubação com hemácias. A partir de imagens obtidas por microscopia de fluorescência, verificou-se que os sistemas bimodais S3 se mostraram melhores marcadores fluorescentes inespecíficos quando comparados com os sistemas S1 (Figura 28). Esta marcação inespecífica é possibilitada pela interação eletrostática entre os PQs aminados (uma vez que são funcionalizados com cisteamina, de carga positiva) e a carga negativa da membrana celular.

É também possível observar uma diminuição na marcação utilizando o sistema S1 na proporção 1:30 (considerando o total adicionado) quando comparado com o sistema na proporção 1:20. Possivelmente esta diferença obtida na marcação celular com os dois sistemas preparados, poderá estar relacionada com a quantidade de complexos de Gd³⁺ na superfície do PQ. Ainda que os sistemas 1:30 não tenham sido avaliados por ICP-OES (Tabela 3), é possível supor que eles tenham um maior número de complexos na superfície, uma vez que os dados para os demais sistemas permitem inferir que quanto maior a adição de complexos mais conjugação ocorre. Uma vez que um maior número de complexos na superfície do PQ, levará à diminuição da carga superficial do PQ, diminuindo a interação eletrostática com a membrana celular.

Em relação a baixa marcação observada com os sistemas S1, o fato do grupo DOTA ser maior em relação ao DTPA pode ter dificultado a interação

entre os grupos amina do PQ com a membrana celular, já que, como os dados de ICP-OES demonstram, não há diferença significativa entre os sistemas S1 e S3 no número de complexos conjugados a superfície do PQ.

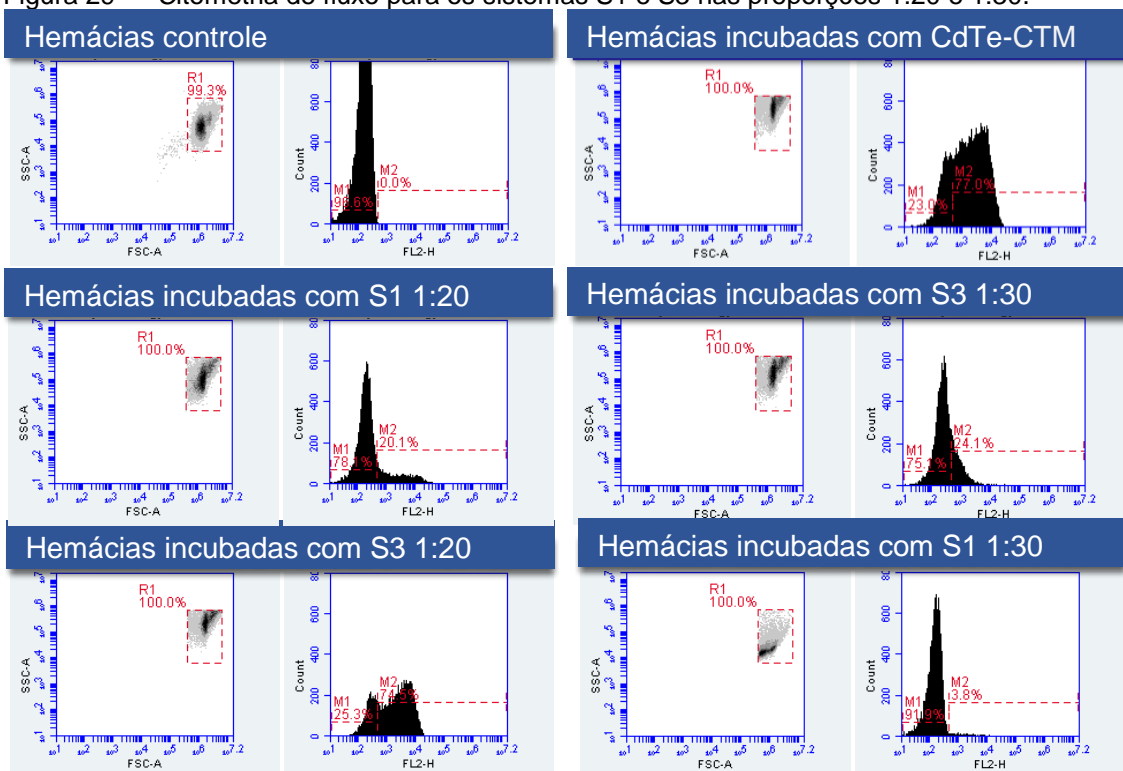
Figura 28 — Análise por microscopia de fluorescência da marcação de hemácias com o sistema bimodal S3 na proporção (A) 1:20 e (B) 1:30.



4.6 CITOMETRIA DE FLUXO

Os resultados observados pela citometria de fluxo (Figura 29) confirmam os resultados da microscopia de fluorescência.

Figura 29 — Citometria de fluxo para os sistemas S1 e S3 nas proporções 1:20 e 1:30.



A Figura da esquerda para cada amostra representa o *dot plot* (SSC vs. FCS), o que informa sobre mudanças na morfologia e complexidade da célula. Dentro da janela R1 é definida a população saudável de células, assim estes resultados mostram que os sistemas bimodais não provocaram considerável lise nas hemácias.

A Figura da direita, para cada amostra, apresenta o histograma. Foram utilizadas hemácias como controle, e a população M1 representa a população não fluorescente, enquanto que M2 representa a população fluorescente, correspondente às hemácias marcadas pelos PQs. Assim, é possível observar que o sistema S3 1:20 apresenta uma percentagem de marcação semelhante ao CdTe-CTM (74 %), com o provável aumento do número de quelatos na superfície do PQ a percentagem de marcação diminui, diminuindo também quando são utilizados os sistemas com DOTA, pelas razões já mencionadas nos resultados de marcação celular.

Apesar de se esperar que os sistemas bimodais interagissem de forma inespecífica com as hemácias, devido a interações eletrostáticas, estes resultados são promissores para o desenvolvimento de sistemas bimodais específicos. Uma vez que, não havendo interação inespecífica entre as

nanossondas e as células, após a conjugação com uma biomolécula, não será necessária uma etapa adicional para bloquear as aminas livres do PQ e eliminar a interação inespecífica.

Estes resultados mostram a potencialidade destes sistemas bimodais serem utilizados como agentes de contraste para imagem óptica e por ressonância magnética, especialmente o sistema S3 1:20 (cuja proporção real é de 1:16), uma vez que este sistema também apresenta um dos melhores valores para relaxividade a 20 MHz r_1 por íon Gd^{3+} . Os PQs além de comportarem um número maior de complexos de gadolínio (Gd^{3+}), apresentam uma superfície ativa para conjugações com biomoléculas, possibilitando, no futuro, o desenvolvimento de agentes de contraste para marcação celular específica.

5 CONCLUSÃO

De modo geral, através deste trabalho, foi possível obter e caracterizar sistemas bimodais baseados em pontos quânticos de CdTe e quelatos de gadolínio. Dos resultados obtidos até então, concluímos inicialmente que a superfície do PQ não sofreu alterações significativas após processo de conjugação destes ao quelatos paramagnéticos, conservando assim suas propriedades ópticas.

Os melhores aumentos na relaxividade longitudinal foram encontrados nos sistemas S3 (constituído por Gd-DTPA conjugado ao PQ) com aproximadamente 15 complexos por PQ e S1 (composto por Gd-DOTA conjugado ao PQ) com estimativa de 6 complexos por PQ (de acordo com os dados de ICP), com aumentos de 2 e 2,5 vezes em relação aos complexos correspondentes, respectivamente.

Dados de transmetalção mostraram comportamento esperado previamente reportado para a estabilidade cinética e termodinâmica dos dois complexos estudados, mostrando que os complexos utilizados tem estabilidades semelhantes aos correspondentes encontrados em uso comercial.

Através dos resultados de ICP-OES, que demonstraram que há um limite de conjugação de quelatos na superfície dos PQs, pois o aumento do número de complexos no meio reacional não otimizou a quantidade de complexos conjugados.

Os sistemas também apresentaram potencial em marcação inespecífica e possibilidade para direcionamento específico, o que fornece perspectivas positivas para a bimodalidade de nanosondas semelhantes a estas.

Como se trata de um dos poucos estudos como este realizados a partir de nanopartículas em meio aquoso, com etapas de conjugação relativamente simples, o principal objetivo aqui foi cumprido, sondas bimodais foram obtidas, e além disso os resultados nos fornecem informações importantes para a continuidade do estudo de sondas bimodais para IRM e OI.

6 PERSPECTIVAS

Com os resultados encontrados neste trabalho, a metodologia de conjugação adotada pode ser estendida a nanopartículas diferentes dos PQs aqui utilizados, como aqueles livres de cádmio e outros metais pesados. Uma vez que a mudança de nanopartícula pode fornecer conjugações quantitativamente melhores, além da possibilidade de melhor interação com células.

Além disso, uma vez que sejam feitos estudos mais detalhados dos mecanismos de relaxação presentes nestas sondas, como NMRD e RMN de ^{17}O , e da estabilidade dos sistemas, otimizações para o uso dos complexos paramagnéticos Gd-DOTA e Gd-DTPA em sistemas semelhantes podem ser encontradas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIVISATOS, A. P. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. **Science**, v. 271, p. 933–937, 1996.
- BAHIA. Secretaria de saúde do Estado da Bahia, 2002. Disponível em: <http://www.saude.ba.gov.br/direg/images/legislacao/portaria_1101_12_06_02.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2017.
- BELLEZA, O. J. V.; VILLARAZA, A. J. L. Ion charge density governs selectivity in the formation of metal–Xylenol Orange (M–XO) complexes. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 47, p. 87-92, 2014.
- BELOGLAZOVA, N. V. et al. Quantum Dot Loaded Liposomes As Fluorescent Labels for Immunoassay. **Analytical Chemistry**, 85, p. 7197-7204, 2013.
- BIRKA, M. et al. Diagnosis of Nephrogenic Systemic Fibrosis by means of Elemental Bioimaging and Speciation Analysis. **American Chemical Society**, v. 87, p. 3321-3328, 2015.
- BLOEMBERGEN, N. J. Proton Relaxation Times in Paramagnetic Solutions. **The Journal of Chemical Physics**, v. 27, p. 572-573, 1957.
- BLOEMBERGEN, N.; MORGAN, L. O. Proton Relaxation Times in Paramagnetic Solutions. Effects of Electron Spin Relaxation. **The Journal of Chemical Physics**, v. 34, p. 842 – 842, 1961.
- BRADY, T. J. et al. Proton nuclear magnetic resonance imaging of regionally ischemic canine hearts: effect of paramagnetic proton signal enhancement. **Radiology**, v. 144, p. 343-347, 1982.
- BRASCH, R. C. et al. Brain nuclear magnetic resonance imaging enhanced by a paramagnetic nitroxide contrast agent: preliminary report. **American Journal of Roentgenology**, p. 1019-1023, v. 141, 1983.
- BRUCHEZ, M. et al. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. **Science**, v. 281, p. 2013–2016, 1998.
- BRUS, L. E. Electron–electron and electronhole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state. **The Journal of Chemical Physics**, v. 80, p. 4403-3309, 1984.
- CABRAL-FILHO, P. E. et al. CdTe quantum dots as fluorescent probes to study transferrin receptors in glioblastoma cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1860, p. 28-35, 2016.
- CAO, Y. et al. Gadolinium-based nanoscale MRI contrast agents for tumor imaging. **Journal of materials chemistry. B, Materials for biology and medicine**, v. 5, p. 3431-3461, 2017.
- CARAVAN, P. Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium based MRI contrast. **Chemical Society Reviews**, v. 35, p. 512–523, 2006.

CARAVAN, P. et al. Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. **Chemical reviews**, v. 99, p. 2293-2352, 1999.

CARAVAN, P. et al. Influence of molecular parameters and increasing magnetic field strength on relaxivity of gadolinium- and manganese-based T1 contrast agents. **Contrast Media Mol Imaging**, v. 2, p. 89-100, 2009.

CARR, D. H. et al. Intravenous chelated gadolinium as a contrast agent in NMR imaging of cerebral tumours. **Lancet**, v. 1, p. 484-486, 1984.

CHENG, C.-Y. et al. Gadolinium-Based CuInS₂/ZnS Nanoprobe for Dual-Modality Magnetic Resonance/Optical Imaging. **ACS applied materials & interfaces**, v. 5, p. 4389-4400, 2013.

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

DAMADIAN, R. V. Tumor Detection by Nuclear Magnetic Resonance. **Science**, v. 171, p. 1151-1153, 1971.

DAMADIAN, R. V. **Apparatus and method for detecting cancer in tissue.** 3789832, 05 Fevereiro 1974.

DAMADIAN, R.; GOLDSMITH, M.; MINKOFF, L. NMR in cancer: XVI. FONAR image of the live human body. **Physiological Chemistry and Physics**, v. 9, p. 97-100, 1977.

DE LEÓN-RODRÍGUEZ, L. M. et al. Basic MR Relaxation Mechanisms & Contrast Agent Design. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 42, p. 545–565, 2015.

DEBROYE, E.; PARAC-VOGT, T. N. Towards polymetallic lanthanide complexes as dual contrast agents for magnetic resonance and optical imaging. **Chemical Society Reviews**, v. 43, p. 8178-8192, 2014.

ÉFROS, L. . A.; ÉFROS, A. L. Interband absorption of light in a semiconductor sphere. **Soviet Physics Semiconductors-Ussrp**, v. 16, p. 772-775, 1982.

EISBERG, R. M.; RESNICK, R. **Física Quântica: Átomos, Moléculas, Sólidos e Partículas.** [S.I.]: Campus, 1979.

EKIMOV, A. I.; ONUSHCHENKO, A. A. Quantum size effect in the optical-spectra of semiconductor micro-crystals. **Soviet Physics Semiconductors-Ussrp**, v. 16, p. 775-778., 1982.

EROGBOGBO, F. et al. Bioconjugation of luminescent silicon quantum dots to gadolinium ions for bioimaging applications. **Nanoscale**, v. 4, p. 5483-5489, 2012.

EYCHMÜLLER, A.; LESNYAK, V.; GAPONIK, N. Colloidal semiconductor nanocrystals: the aqueous approach. **Chemical Society Reviews**, 42, p. 2905-2929, 2013.

EYCHMÜLLER, A.; LESNYAK, V.; GAPONIK, N. Colloidal semiconductor nanocrystals: the aqueous approach. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 2905-2929, 2013.

FEYNMAN, R. P.; LEIGHTON, R. B.; SANDS, M. **Feynman: Lições de Física**. Vol. II. Porto Alegre: Bookman, 2008.

FREED, J. H. Dynamic effects of pair correlation functions on spin relaxation by translational diffusion in liquids. II. Finite jumps and independent T1 processes. **The Journal of Chemical Physics**, v. 48, p. 4034-4037, 1978.

GAPONIK, N. et al. Thiol-Capping of CdTe Nanocrystals: An Alternative to Organometallic Synthetic Routes. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 29, p. 7177-7185, 2002.

GAPONIK, N.; ROGACH, A. L. Thiol-capped CdTe nanocrystals: progress and perspectives of the related research fields. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, p. 8685-8693, 2010.

GOLDMAN, M. R. et al. Quantification of experimental myocardial infarction using nuclear magnetic resonance imaging and paramagnetic ion contrast enhancement in excised canine hearts. **Circulation**, v. 66, p. 1012-1016, 1982.

GRIES, H.; ROSENBERG, D.; WEINMANN, H.-J. **Diagnostic media**. US4647447 A, 1987.

GUO, A. et al. CdTe/CdS quantum dot-labeled fluorescent immunochromatography test strips for rapid detection of Escherichia coli O157:H7. **The Royal Society of Chemistry**, v. 7, p. 17819 - 17823, 2017.

GUO, J.; YANG, W.; WANG, C. Systematic Study of the Photoluminescence Dependence of Thiol-Capped CdTe Nanocrystals on the Reaction Conditions. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, p. 17467–17473, 2005.

HELM, L.; MERBACH, A.; TÓTH, E. **The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging**. 2^a. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, Ltd., 2013.

HENDERSON, G. R. Nuclear magnetic resonance imaging: a review. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 76, p. 206–212, 1983.

HERMANSON, G. T. **Bioconjugate techniques**. 2^a. ed. Rockford, Illinois, USA: [s.n.], 2008.

HOLLAND, G. N.; BOTTOMLEY, P. A.; HINSHAW, W. S. Radiographic thin-section image of the human wrist by nuclear magnetic resonance. **Nature**, v. 270, p. 722-723, 1977.

- JIN, T. et al. Gd³⁺-functionalized near-infrared quantum dots for in vivo dual modal (fluorescence/magnetic resonance) imaging. **Chemical communications**, v. 281, p. 5764-5766, 2008.
- KAEWLAI, R.; ABUJUDEH, H. Nephrogenic systemic fibrosis. **American journal of roentgenology**, v. 199, p. 17-23, 2012.
- KAIRDOLF, B. A. et al. Semiconductor Quantum Dots for Bioimaging and Biodiagnostic Applications. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 6, p. 143-162, 2013.
- KAPITONOV, A. M. et al. Luminescence Properties of Thiol-Stabilized CdTe Nanocrystals. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 46, p. 10109-10113, 1999.
- KIM, J. S. et al. Recent advances in Gd-chelate based bimodal optical/MRI contrast agents. **Chemical Society Reviews**, v. 44, p. 1791-1806, 2015.
- KOENIG, S. H.; BROWN III, R. D. Field-cycling relaxometry of protein solutions and tissue: implications for MRI. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 22, p. 487-567, 1991.
- KUANG, R. et al. Synthesis of cysteamine-coated CdTe quantum dots for the detection of bisphenol A. **Microchimica Acta**, v. 169, p. 109–115, 2010.
- LANIADO, M. et al. First use of GdDTPA/dimeglumine in man. **Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR**, v. 16, p. 157-165, 1984.
- LAUFFER, R. B. Paramagnetic Metal Complexes as Water Proton Relaxation Agents for NMR. **Chemical Reviews**, v. 87, p. 901-927, 1987.
- LAURENT, S. et al. How to measure the transmetallation of a gadolinium complex. **Contrast Media & Molecular Imaging**, v. 5, p. 305-308, 2010.
- LAURENT, S.; ELST, L. V.; MULLER, R. N. Comparative study of the physicochemical properties of six clinical low molecular weight gadolinium contrast agents. **CONTRAST MEDIA & MOLECULAR IMAGING**, v. 1, p. 128–137, 2006.
- LAUTERBUR, P. C. Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance. **Nature**, v. 242, p. 190-191, 1973.
- LAUTERBUR, P. C.; MENDONCA-DIAS, M.; RUDIN, A. Augmentation of tissue water proton spin-lattice relaxation rates by in vivo addition of paramagnetic ions. **In Frontiers of Biological Energetics**, v. 1, p. 752-759, 1978.
- LI, J.; ZHU, J. Quantum dots for fluorescent biosensing and bio-imaging applications. **Analyst**, v. 138, p. 2506-2515, 2013.
- LI, Y. et al. A general strategy for nanocrystal synthesis. **Nature**, v. 437, p. 121-124, 2005.
- LIU, L. et al. Multimodal imaging probes based on Gd-DOTA conjugated quantum dot nanomicelles. **Analyst**, v. 136, p. 1881-1886, 2011.

LOHRKE, J. et al. 25 Years of Contrast-Enhanced MRI: Developments, Current Challenges and Future Perspectives. **Advances in therapy**, v. 33, p. 1-28, 2016.

LOUIE, A. Multimodality imaging probes: design and challenges. **Chemical reviews**, v. 110, p. 3146-3195, 2010.

MA, Q.; SU, X. Recent advances and applications in QDs-based sensors. **Analyst**, v. 136, p. 4883–4893, 2011.

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

MULDER, W. J. M. et al. Quantum Dots with a Paramagnetic Coating as a Bimodal Molecular Imaging Probe. **Nano Letters**, v. 6, p. 1-6, 2006.

NIE, S. M.; CHAN, W. C. W. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. **Science**, v. 281, p. 2016–2018, 1998.

NOZIK, A. J.; RAJH, T.; MICIC, O. I. Synthesis and characterization of surface-modified colloidal cadmium telluride quantum dots. **J Phys Chem**, v. 97, p. 11999–12003, 1993.

OLIVEIRA, C. R. M. **Estudo de confinamento quântico em semicondutores II-VI: poços quânticos e pontos quânticos** (Tese de Doutorado). Campinas, SP: UNICAMP, 141 p., 1995.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à Espectroscopia: Tradução da 4a edição norte-americana**. Bellingham, Washington: Cengage Learning, 2010.

PEREIRA, G. A. L. **Paramagnetic Systems as Potencial MRI Contrast Agents: Evaluation of Physical-Chemical Properties** (Tese Doutorado). Coimbra: Universidade de Coimbra, 2008.

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

PEREIRA, M. G. C. et al. Quantum Dots. In: Margarita Sanchez-Dominguez, Carlos Rodriguez-Abreu. (Org.). *Nanocolloids - A Meeting Point for Scientists and Technologists*. **Elsevier**, v. 1, p. 131-158, 2016.

PEREIRA, M. I. A. **Agentes de contraste bimodais baseados em quantum dots e quelatos de gadolínio** (Dissertação de Mestrado). Recife- PE: Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

PIERRE, V. C.; ALLEN, M. J.; CARAVAN, P. Contrast agents for MRI: 30+ years and where are we going? **Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry**, v. 19, p. 127-131, 2014.

RAYMOND, K. N.; PIERRE, V. C. Next Generation, High Relaxivity Gadolinium MRI Agents. **American Chemical Society**, v.16, p. 3-8, 2004.

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

ROGACH, A. L. et al. Synthesis and Characterization of Thiol-Stabilized CdTe Nanocrystals. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 100, p. 1772-1778, 1996.

ROGACH, A. L. et al. Aqueous Synthesis of Thiol-Capped CdTe Nanocrystals: State-of-the-Art. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, p. 14628–14637, 2007.

ROHRER, M. et al. Comparison of Magnetic Properties of MRI Contrast Media Solutions at Different Magnetic Field Strengths. **Investigative Radiology**, 2005. v. 40, p. 715-724.

RUNGE, V. M. et al. Dyke Award. Evaluation of contrast-enhanced MR imaging in a brain-abscess model. **American Journal of Neuroradiology**, v. 6, p. 139-147, 1985.

SANTOS, B. S. et al. Semiconductor Quantum Dots for Biological Applications. In: HENINE, M. **Handbook of Self Assembled Semiconductor Nanostructures Novel**. Amsterdam: Elsevier, 2008. Cap. 26, p. 773 – 798.

SANTOS, B. S.; FARIAS, P. M. A.; FONTES., A. Semiconductor Quantum Dots for Biological Applications. In: HENINI, M. **Handbook of Self Assembled Semiconductor Nanostructures for Novel Devices in Photonics and Electronics**. [S.I.]: Elsevier Science, 2008. Cap. 26, p. 773–798.

SHERRY, A. D.; CARAVAN, P.; LENKINSKI, R. E. Primer on gadolinium chemistry. **Journal of magnetic resonance imaging: JMRI**, v. 30, p. 1240-1248, 2009.

SIEBER, M. A. et al. Gadolinium-based contrast agents and NSF: evidence from animal experience. **Journal of magnetic resonance imaging: JMRI**, v. 30, p. 1268-1276, 2009.

SOLOMON, I. Relaxation processes in a system of two spins. **Physical Review**, v. 99, p. 559-565, 1995.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica 2**. Tradução da 7ª ed. Rio de Janeiro, RJ: LTC, v. 2, 2002.

STASIUK, G. J. et al. Cell-Permeable Ln(III) Chelate-Functionalized InP Quantum Dots As Multimodal Imaging Agents. **ACS Nano**, v. 5, p. 8193-8201, 2011.

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

- TAKAGAHARA, T.; TAKEDA, K. Theory of the quantum confinement effect on excitons in quantum dots of indirect-gap materials. **Physical Review B**, v. 46 , p. 15578-15581, 1992.
- TAN, M.; LU, Z. R. Integrin Targeted MR Imaging. **Theranostics**, v. 1, p. 83-101, 2011.
- TAN, W. .; ZHANG, Y. Multifunctional Quantum-Dot-Based Magnetic Chitosan Nanobeads. **Advanced Materials**, v. 17, p. 2375-2380, 2005.
- TILBORG, G. A. F. V. et al. Annexin A5-Conjugated Quantum Dots with a Paramagnetic Lipidic Coating for the Multimodal Detection of Apoptotic Cells. **Bioconjugate Chemistry**, v. 17, p. 865-868, 2006.
- VILLARAZA, A. J. L.; BUMB, A.; BRECHBIEL, M. W. Macromolecules, dendrimers, and nanomaterials in magnetic resonance imaging: the interplay between size, function, and pharmacokinetics. **Chemical reviews**, v. 110, p. 2921-2959, 2010.
- WANG, C. et al. Semiquantitative Study of the EDC/NHS Activation of Acid Terminal Groups at Modified Porous Silicon Surfaces. **Langmuir**, v. 26, p. 809–814, 2010.
- WANG, R. et al. Synthesis and characterization of cysteamine-CdTe quantum dots via one-step aqueous method. **Materials Letters**, v. 66, p. 261-263, 2012.
- WEINMANN, H. J. et al. Characteristics of gadolinium-DTPA complex: a potential NMR contrast agent. **American Journal of Roentgenology**, v. 142, p. 619-624, 1984.
- WHO, W. H. O. WHO|Magnetic resonance imaging. **WHO**, 2014. Disponível em:
<http://www.who.int/diagnostic_imaging/imaging_modalities/dim_magresimaging/en/>. Acesso em: 08 dez. 2017.
- XING, X. et al. An “imaging-biopsy” strategy for colorectal tumor reconfirmation by multipurpose paramagnetic quantum dots. **Biomaterials**, v. 48, p. 16-25, 2015.
- YANG, W.-H. et al. Hydrothermal synthesis for high-quality CdTe quantum dots capped by cysteamine. **Materials Letters**, v.62, p. 2564-2566, 2008.
- YANG, Y. et al. CuInS₂/ZnS Quantum Dots Conjugating Gd(III) Chelates for Near-Infrared Fluorescence and Magnetic Resonance Bimodal Imaging. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 9, p. 23450-23457, 2017.
- YOUNG, I. R. et al. Enhancement of relaxation rate with paramagnetic contrast agents in NMR imaging. **The Journal of Computed Tomography**, v. 5, p. 543-547, 1981.
- YU, W. W.; QU, L.; PENG, W. G. A. X. Y. Experimental Determination of the Extinction Coefficient of CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals. **Chemical Materials**, v. 15, p. 2854–2860, 2003.

ZHANG, L. et al. The evolution of gadolinium based contrast agents: from single-modality to multi-modality. **Nanoscale**, v. 8, p. 10491–10510, 2016.