



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

CAMILA APARECIDA PEREIRA MONTEIRO

QUANTUM DOTS COMO NANOPLATAFORMAS FUNCIONAIS
PARA ESTUDO DA DINÂMICA DE RECEPTORES DE ÁCIDO FÓLICO
E DO PERFIL DE ÁCIDO SIÁLICO EM MEMBRANAS CELULARES

Recife
2019

CAMILA APARECIDA PEREIRA MONTEIRO

**QUANTUM DOTS COMO NANOPLATAFORMAS FUNCIONAIS
PARA ESTUDO DA DINÂMICA DE RECEPTORES DE ÁCIDO FÓLICO
E DO PERFIL DE ÁCIDO SIÁLICO EM MEMBRANAS CELULARES**

Dissertação de Mestrado apresentada à coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas,

Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Adriana Fontes

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Euzébio Cabral Filho

Recife
2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Monteiro, Camila Aparecida Pereira

Quantum Dots como nanoplateformas funcionais para estudo da dinâmica de receptores de ácido fólico e do perfil de ácido siálico em membranas celulares / Camila Aparecida Pereira Monteiro - 2019.

60 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Adriana Fontes

Coorientador: Paulo Euzébio Cabral Filho

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas. Recife, 2019.

Inclui referências e apêndices.

1. Nanocristais 2. Fluorescência 3. Câncer

I. Fontes, Adriana (Orient.) II. Cabral Filho, Paulo Euzébio (Coorient.)

III. Título

620.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-366

CAMILA APARECIDA PEREIRA MONTEIRO

**QUANTUM DOTS COMO NANOPLATAFORMAS FUNCIONAIS
PARA ESTUDO DA DINÂMICA DE RECEPTORES DE ÁCIDO FÓLICO
E DO PERFIL DE ÁCIDO SIÁLICO EM MEMBRANAS CELULARES**

Dissertação de Mestrado apresentada à coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 30 de Julho de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Adriana Fontes
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – UFPE (Presidente)

Dr^a Mariana Paola Cabrera
Departamento de Biofísica e Radiobiologia – UFPE (Titular – Membro Externo)

Dr^a Cássia Regina Albuquerque de Cunha
Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (Titular – Membro Externo)

AGRADECIMENTOS

A todos que passaram pela minha vida e contribuíram para a conclusão desse mestrado, vocês são muito especiais.

Aos meus orientadores, Adriana Fontes e Paulo Euzébio, por terem aceitado me conduzir, por compartilhar seus conhecimentos, dado oportunidade de evoluir meu pensamento científico e ter me ensinado a desenvolver uma intuição no campo, além de me proporcionar um desenvolvimento em outros aspectos. Por terem me dado suporte, confiança, palavras de apoio em momentos difíceis e por estar sempre presente para conversas e afins. Agradeço de todo o coração por terem me ajudado a percorrer esse caminho difícil com tanto suporte. Palavras ainda não seriam suficientes para agradecer-los.

Agradeço em especial a Isabela, por todo conhecimento compartilhado, pelos ensinamentos e paciência. Por ter me feito crescer em pensamentos, tanto profissional quanto pessoal. Pela amizade, respeito e apreço. Agradeço em especial também ao Ryan, um amigo e parceiro de trabalho na qual tenho muita confiança, respeito e carinho. Por estar sempre presente na minha vida em todos os aspectos. Aos amigos do LBQ, por tornarem o trabalho diário mais prazeroso. Obrigada pela força, ajuda, amizade e pelos momentos de descontração.

A Universidade Federal de Pernambuco, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas e ao CNPq pela base, pelos auxílios, pelos aprendizados que levarei por toda vida, por me proporcionar experiências, mostrando novos horizontes. Não poderia deixar de agradecer ao INFABIC, em especial a Mariana por me receber tão bem e ter compartilhado diversos conhecimentos para uma melhor evolução científica.

Agradeço aos meus pais, Arlene e Cleodon, por toda confiança, sacrifícios e principalmente pela educação. Por me proporcionarem tudo que estava em seus alcances, fortalecendo minha base e preocupando-se sempre com meu futuro. Por todo amor e carinho que me proporcionaram nesta jornada pelo apoio nas horas difíceis e principalmente por me permitir realizar esse sonho.

As minhas irmãs mais velhas, Carole e Carla, por sempre estarem presentes mesmo à distância. Pelas constantes palavras de apoio e incentivo. Pela paciência, atenção

e companheirismo. Não poderia deixar de agradecer as minhas irmãs mais novas, Clara e Cecília, por todo amor proporcionado.

A minha noiva, Bruna, por ser meu porto seguro nas horas mais difíceis. Por todas as conversas que me ajudaram a relaxar durante todo esse trabalho. Agradeço pelos conselhos, abraços e a presença em momentos de cansaço.

A minha psicóloga, Thaís, por me proporcionar um caminho para o autoconhecimento. Agradeço pelas diversas terapias que me conduziram e me proporcionaram ser quem sou atualmente. Palavras são poucas para descrever a ajuda e suporte proporcionado.

Aos meus amigos da vida pela amizade, palavras de apoio e distrações nos momentos difíceis, por estarem presente desde o começo desta jornada, pelo amor, carinho e terem me dado conforto em todos os momentos necessários.

E, sobretudo, agradeço a Deus, meus anjos e guias espirituais por estarem comigo em todos os momentos, me orientando e me deixando tranquila nas incertezas.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar, mas o mar seria menos se lhe faltasse uma gota.”

(CALCUTÁ, 2002)

RESUMO

As membranas celulares possuem estruturas que desempenham complexas atividades, dentre elas estão os receptores de folato (RFs) e os ácidos siálicos (ASs). Os RFs são responsáveis por internalizar uma vitamina essencial para o organismo, o ácido fólico (AF). Já os ASs conferem carga eletronegativa à superfície celular, a qual intermedia processos como migração e adesão celular. Assim, o uso de ferramentas versáteis e sensíveis, como os *quantum dots* (QDs), capazes de monitorar alterações nesse receptor e nesse carboidrato pode fornecer dados para a compreensão de vários processos biológicos, como os associados ao câncer. QDs são nanocristais fluorescentes de semicondutores que apresentam propriedades singulares, tais como uma superfície ativa para conjugação a moléculas e alta fotoestabilidade. Sendo assim, esse trabalho teve como objetivo estudar a dinâmica dos RFs e o perfil de ASs nas membranas celulares através do uso de QDs. Em um primeiro trabalho, os QDs foram conjugados ao AF (QDs-AF) para estudar a expressão/internalização e reciclagem dos RFs nas células T47D, MDA-MB231 e MCF7, utilizando a HeLa como controle. A técnica de espectroscopia de correlação por fluorescência (FCS) comprovou a efetividade dessa conjugação. Também foi realizado um ensaio de saturação dos RFs, pelo qual se comprovou a especificidade do conjugado e assim também foi possível inferir sobre a taxa de reciclagem desses receptores nessas células. Os ensaios de microscopia de fluorescência e citometria de fluxo indicaram que as células HeLa e T47D expressaram/internalizaram níveis mais altos de RFs (95% e 90% de marcação) do que a MDA-MB231 (68%). Já a MCF7 apresentou um baixo número de RFs funcionais (3%). Nos ensaios de saturação foi observado que a taxa de reciclagem do RF é baixa (6%, 4%, 2% de marcação para HeLa, MDA-MB231 e MCF7), exceto para T47D (26%). Em um segundo estudo, os QDs foram conjugados ao ácido 3-mercaptopenilborônico (QDs-AMFB) e eritrócitos foram utilizados como modelo para avaliar essas nanossondas. Os ácidos fenilborônicos vêm sendo chamados de lectinas miméticas, por também se ligarem reversivelmente a vários tipos de carboidratos. O FCS também comprovou a conjugação. A especificidade do conjugado pelo AS foi provada ao observarmos uma redução da marcação por citometria de fluxo quando os eritrócitos foram tratados previamente com sialidase, uma enzima que retira o AS, bem como por ensaios de inibição com outros carboidratos. As análises de citometria de fluxo e microscopia de

fluorescência indicaram que praticamente todos os eritrócitos foram marcadas de forma específica pelo conjugado QDs-AMFB. Após essa etapa foram realizados ensaios fluorescentes com linhagens de leucemia mielóide aguda e crônica KG-1 e K562 e os resultados citométricos obtidos até então indicam que as membranas das células KG-1 possuem maior quantidade de AS, 99% de marcação e uma mediana de intensidade de fluorescência cerca de 2x maior quando comparada a K562 (marcação de 84%). Dessa forma podemos concluir que nesse estudo foram desenvolvidos conjugados de QDs-AF e QDs-AMFB eficientes, os quais auxiliaram a agregar informações para a compreensão da biologia celular do câncer e seus processos, possibilitando assim abrir novas frentes no diagnóstico/terapia desta doença.

Palavras-chaves: Nanocristais. Fluorescência. Câncer. Células.

ABSTRACT

Cell membranes have structures that perform complex activities. Among them, there are the folate receptors (FRs) and sialic acids (SAs). FRs are responsible for internalizing an essential vitamin for the human body, folic acid (FA). SAs confer electronegative charges to cell membranes, which mediate processes such as migration and cell adhesion. Thus, the use of versatile and sensitive tools, such as quantum dots (QDs), capable of monitoring changes in FRs and SAs can provide valuable data for understanding several biological processes, such as those associated with cancer. QDs are fluorescent nanocrystals made of semiconductor materials that exhibit unique properties, such as an active surface for conjugation with molecules and high photostability. Therefore, this work had as objective to study both the dynamics of FRs and the profile of SA in cell membranes applying QDs. In the first work, QDs were conjugated to FA (QDs-FA) to study the expression/internalization and recycling of FRs in T47D, MDA-MB231 and MCF7 cells, using HeLa as a control. The fluorescence correlation spectroscopy (FCS) technique confirmed the effectiveness of this conjugation. An FR saturation assay was also performed, which not only proved the specificity of the conjugate but also allowed us to analyze the recycling rate of those receptors in these cells. Fluorescence and flow cytometry microscopy assays indicated that HeLa and T47D cells expressed/internalized higher levels of FRs (95% and 90% of labeling were found) than MDA-MB231 (68%). MCF7 seems to have a low number of functional FRs (3%). In the saturation tests, it was observed that the recycling rate of FRs is low (6%, 4%, 2% of labeling for HeLa, MDA-MB231, and MCF7), except for T47D (26%). In a second study, QDs were conjugated to 3-mercaptophenylboronic acid (QDs-AMPB), and erythrocytes were used as models to develop those nanoprobe. Phenylboronic acids have been called mimetic lectins because they are also able to bind reversibly to various types of carbohydrates. The FCS also confirmed the conjugation. The specificity of the SA conjugate was proved by observing a reduction in the flow cytometric labeling when erythrocytes were pretreated with sialidase, a SA-removing enzyme, as well as by inhibition assays with other carbohydrates. Flow cytometry and fluorescence microscopy analyses indicated that practically all erythrocytes were specifically labeled by QDs-AMPB. After this step, fluorescence assays were performed with acute and chronic myelogenous leukemia cell lines (KG-1 and K562), and flow cytometry results obtained until the moment

indicated that KG-1 membranes presented greater amount of SA, 99% of labeling with a median of fluorescence intensity *ca.* 2x higher, when compared to K562 (84% of labeling). In this way, we can conclude that in this study, efficient QDs-FA and QDs-AMPB conjugates were developed, providing information for understanding the cell biology of cancer and its processes, thus opening new perspectives to the diagnosis/therapy of this disease.

Keywords: Nanocrystals. Fluorescence. Cancer. Cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DO REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 –	<i>Quantum dots</i> de um mesmo material emitindo fluorescência em várias regiões do espectro de luz visível, variando-se apenas o tamanho destes nanocristais.....	23
Figura 2 –	Diferença no <i>bandgap</i> (E_g) para diferentes classes de materiais sólidos.....	23
Figura 3 –	Esquema de fotoluminescência de semicondutores. A partir da excitação do elétron (e^-) para a banda de condução (BC), há formação de um éxciton, que após relaxação e recombinação excitônica, finalmente gera a emissão de fluorescência. Onde: h^+ representa o buraco gerado na banda de valência (BV) pela excitação do e^- , $E = h\nu$ é a energia de um fóton necessária para excitar a amostra (sendo h é a constante de Planck e ν é a frequência da luz)....	24
Figura 4 –	O efeito de confinamento quântico, ocasiona o aparecimento de níveis discretos de energia e também um aumento da E_g como consequência da redução do tamanho de partículas constituídas por materiais semicondutores.....	26
Figura 5 –	Espectros de absorção e emissão dos QDs e dos corantes orgânicos. Os QDs podem ser excitados em vários comprimentos de onda, já os corantes convencionais necessitam de excitações em comprimentos de onda específicos para cada tipo de corante utilizado.....	27
Figura 6 –	Resistência à fotodegradação dos QDs ao longo do tempo. Em vermelho, antígenos nucleares marcados por QDs (630 nm), os quais permaneceram fluorescentes ao longo do estudo. Enquanto que os microtúbulos marcados pelo corante orgânico AlexaFluor 488 nm, em verde, tornaram-se indetectáveis a partir de 120 segundos, devido à fotodegradação do corante.....	27

Figura 7 –	(A) Presença da camada de passivação nos QDs de estrutura <i>core/shell</i> promove aprimoramento da emissão de fluorescência, por intensidade e estreitamento da largura do espectro (FWHM, do inglês, <i>full width at half maximum</i> e se refere à largura do espectro de emissão à meia altura da intensidade máxima). (B) Na ausência do <i>shell</i> , os elétrons interagem com “armadilhas” geradas pelos defeitos de superfície, comprometendo a qualidade da fluorescência. À direita temos o comportamento espectral para ambas as condições A e B descritas, sendo os espectros de absorção em linha cinza e emissão em linha preta.....	28
Figura 8 –	Esquema de um <i>quantum dot</i> funcionalizado quimicamente para sua utilização como marcador fluorescente.....	30
Figura 9 –	Esquema de conjugações covalente (para ligação amida) e não covalente.....	32
Figura 10 –	Esquema de conjugação covalente entre componentes carboxilados e aminados. O componente carboxilado é ativado por EDC/Sulfo-NHS para formar uma ligação amida com componente aminado.....	33
Figura 11 –	Alteração do tempo de difusão do QD sozinho (difusão rápida) e conjugado (difusão lenta).....	35
Figura 12 –	Marcação de células HeLa pelo nanossistema multimodal baseado em QDs, nanopartículas magnéticas e transferrina. Em vermelho vesículas de endocitose da nanossonda via receptor de transferrina e em azul o corante de núcleo pelo Hoechst. Escala = 10 μm	38
Figura 13 –	Imagem <i>in vivo</i> de camundongo com QDs injetados. QD525-carboxilado (primeira coluna), QD525-aminado (segunda coluna), QD800-carboxilado (terceira coluna) e QD800-aminado (quarta coluna). Cortes coronais (linha superior), sagitais (linha média) e transversais (linha inferior).....	39
Figura 14 –	Estrutura molecular do ácido fólico.....	41
Figura 15 –	Representação da endocitose mediada por RF.....	41

Figura 16 –	Estrutura molecular do ácido <i>N</i> -acetilneuramínico.....	44
Figura 17 –	Esquema da cinética de reação do AFB em diferentes pH.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3T3	Células fibroblasto de rato
A549	Carcinoma de pulmão humano
AAFB	Ácido 3-aminofenilborônico
AF	Ácido fólico
AFB	Ácido fenilborônico
AMA	Ácido mercaptoacético
AMFB	Ácido 3-mercaptofenilborônico
AMP	Ácido 3-mercaptopropiônico
AMS	Ácido mercaptosuccínico
anti-A	Anticorpo monoclonal A
anti-B	Anticorpo monoclonal B
anti-H	Lectina <i>Ulex europaeus</i>
AS	Ácido siálico
AZT	Azidotimidina
BC	Banda de condução
BGC-823	Carcinoma gástrico humano
BV	Banda de valência
CdS	Sulfeto de Cádmio
CdSe	Telureto de Cádmio
CdSeTe	Telureto de Cádmio e Selênio
CdTe	Telureto de Cádmio
CIS	L-cisteína
CISTM	Cisteamina
D	Coeficiente de difusão
DLS	Espalhamento dinâmico da luz (<i>Dynamic light scattering</i>)
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EMF	Ensaio de microplaca fluorescente
FCS	Espectroscopia por correlação de fluorescência
FRET	Transferência de energia de ressonância por fluorescência (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

FT-IR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
FWHM	Largura a meia altura (<i>full width at half maximum</i>)
Gd ³⁺	Íon gadolínio (III)
HER2	Fator de crescimento epidérmico humano receptor-tipo 2
HT-29	Adenocarcinoma colorretal humano
InP	Fosfeto de Índio
K562	Leucemia mielogênica crônica humana
KB	Linhagem derivada de carcinoma epitelial cervical humano
Mn	Manganês
NHS	N-hidroxisuccinimida
OH-	Radical hidroxila
PC-12	Feocromocitoma de rato
PQs	Pontos quânticos
QDs	<i>Quantum Dots</i>
RF	Receptor de folato
-SH	Grupamento tiol
STM	Microscópio de varredura por tunelamento (<i>Scanning Tunnelling Microscope</i>)
Sulfo-NHS	N-hidroxisulfosuccinimida
sulfo-SMCC	(sulfossuccinimidil 4-(N-maleimidomethyl)ciclohexano-1-carboxilato)
<i>T</i>	Temperatura
WGA	<i>Wheat germ agglutinin</i>
ZnS	Sulfeto de Zinco

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

a_0	Raio de Bohr
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
d	Diâmetro
D_H	Diâmetro hidrodinâmico
e^-	Elétron
E_g	<i>band gap</i> de energia
eV	Elétron-volt
h	Constante de Planck
h^+	Buraco
k_B	Constante de Boltzmann
kDa	Kilodaltons
λ	Comprimento de onda
η	Viscosidade do meio
nM	Nanomolar
nm	Nanômetro
s	Segundo
τ_D	Tempo de difusão
u.a.	Unidades arbitrárias
μs	Microsegundo
ν	Frequência da luz
ω_x	Volume focal do laser

SÚMARIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	OBJETIVOS.....	21
1.1.1	Objetivo Geral.....	21
1.1.2	Objetivos Específicos.....	21
2	REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	22
2.1	PONTOS QUÂNTICOS (PQs) OU <i>QUANTUM DOTS</i> (QDs).....	22
2.2	CONJUGAÇÃO DE <i>QUANTUM DOTS</i>	30
2.2.1	Estratégia de Conjugação.....	31
2.2.1.1	Conjugação Covalente.....	32
2.2.1.2	Conjugação Não Covalente.....	33
2.2.2	Técnica de Confirmação de Conjugação.....	34
2.2.2.1	Espectroscopia por Correlação de Fluorescência.....	34
2.3	APLICAÇÕES DOS <i>QUANTUM DOTS</i>	37
2.4	MEMBRANA CELULAR.....	40
2.4.1	Receptor de Folato.....	40
2.4.2	Ácido Siálico.....	43
2.4.2.1	Ácido Borônico.....	45
3	CONCLUSÕES GERAIS.....	48
	REFERÊNCIAS.....	49
	APÊNDICE A – ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA “JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY & PHOTOBIOLOGY, B: BIOLOGY”.....	58
	APÊNDICE B – MANUSCRITO A SER SUBMETIDO À REVISTA “TALANTA”.....	59
	APÊNDICE C – ARTIGO PUBLICADO NA “JOURNAL OF BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY”.....	60

1 INTRODUÇÃO

As células estão envolvidas por uma membrana plasmática composta por carboidratos, proteínas e lipídios. Essa membrana delimita a célula como também exibe estruturas que desempenham atividades complexas, podendo ser destacadas, por exemplo: moléculas de reconhecimento celular e receptores que interagem especificamente com moléculas provenientes do exterior (POTAPENKO et al., 2010). Dentre essas estruturas podem ser referenciados os receptores de folato (RFs) e os ácidos siálicos (ASs) (LI et al., 2016; QIAO et al., 2016; SCHAUER; KAMERLING, 2018).

Os RFs têm afinidade por uma vitamina essencial para o organismo, o ácido fólico - AF (CHEN et al., 2013). Baixas concentrações de AF vêm sendo associadas a diversas patologias como distúrbios hematopoiéticos, doenças cardiovasculares, defeitos do tubo neural e aumento do risco de câncer (CZEIZEL; DUDAS., 1992; SNEDDON et al., 1991; VERGOTE; MARTH; COLEMAN, 2015). Adicionalmente, mudanças na expressão desse receptor podem se correlacionar a doenças, como a superexpressão que vem sendo observada em câncer de ovário, rim e pulmão, por exemplo (DRIVER et al., 2016; VERGOTE; MARTH; COLEMAN, 2015; YU; YAN; WU, 2017). Quimioterápicos sítio-específicos para o RF vêm sendo desenvolvidos, porém ainda se sabe pouco sobre a internalização desse receptor pelas células (BWATANGLANG et al., 2016a; NGUYEN et al., 2019; SOE et al., 2018; XU et al., 2017).

Por outro lado, os ASs também exercem um papel determinante em vários mecanismos biológicos essenciais, além de conferir carga eletronegativa à superfície celular, a qual intermedia processos como migração e adesão celular (CUI et al., 2011; HUANG et al., 2011). A perda de AS, leva, por exemplo, à redução da carga eletronegativa, favorecendo a aglutinação dos eritrócitos na microcirculação e à oclusão vascular (BASU et al., 2008; COOK, 2016). Alguns estudos indicam que as alterações na expressão do AS estão também relacionadas com várias doenças, tais como o câncer, as doenças cardiovasculares, hemoglobinopatias e algumas de origem neurológicas (AGRAWAL et al., 2016; NAITO-MATSUI et al., 2017; VARKI, 2008).

A plena compreensão dos papéis biológicos desse receptor e desse carboidrato requer ferramentas eficazes e capazes de identificar e quantificar a dinâmica e perfis desses biomarcadores nas células. Dentre as ferramentas potenciais estão às técnicas baseadas em fluorescência, as quais apresentam como vantagem a alta sensibilidade, permitindo a investigação de eventos celulares ao nível molecular em sistemas biológicos vivos (ETRYCH et al., 2016). A sensibilidade, bem como a especificidade química, da fluorescência advêm do uso de marcadores fluorescentes combinados com moléculas, portanto, o uso de sondas fluorescentes é imprescindível para evidenciar as estruturas e eventos desejados. Na maioria dos casos, essas sondas fluorescentes são corantes orgânicos, os quais em geral apresentam a desvantagem de sofrer rápida fotodegradação. Dentre as sondas fluorescentes, os pontos quânticos (PQs), ou *quantum dots* (QDs), vêm se destacando (PEREIRA et al., 2019).

Os QDs são nanocristais de semicondutores fluorescentes com tamanhos típicos de 2 a 10 nm que apresentam propriedades singulares para investigação de processos biológicos por fluorescência, principalmente excelente fotoestabilidade e uma superfície ativa para conjugação com moléculas e até mesmo outras nanoestruturas (MALIK; GULIA; KAKKAR, 2013; FONTES et al., 2012; PEREIRA et al., 2019).

Dessa forma, nessa dissertação primeiramente QDs de Telureto de Cádmio (CdTe) foram conjugados ao AF e aplicados para investigar a expressão/internalização e reciclagem de RFs em linhagens epiteliais de câncer humano de diferentes perfis (MDA-MB231, MCF7 e T47D), utilizando a linhagem de adenocarcinoma cervical como controle. Numa segunda etapa, foram desenvolvidos novos conjugados constituídos por QDs de CdTe e ácido 3-mercaptopenilborônico (AMFB). Os ácidos fenil-borônicos (AFBs) vêm chamando a atenção pela sua capacidade de se ligar reversivelmente a carboidratos, e por isso vêm sendo chamados de lectinas miméticas (MATSUMOTO; MIYAHARA, 2018). Estudos demonstraram que o AFB tem uma alta afinidade por resíduos de AS quando se encontram em pH fisiológico (MATSUMOTO et al., 2009). A efetividade e especificado desse conjugado foi avaliada utilizando eritrócitos como modelo, por terem uma membrana rica em AS. Posteriormente, esse conjugados foram aplicados para

estudar o perfil de distribuição do AS em linhagens de células provenientes de leucemia mielóide crônica e aguda, KG562 e KG-1, respectivamente.

Acreditamos que os conjugados desenvolvidos podem não só agregar informações para a compreensão da biologia celular do câncer, como também apresentar potencial para serem aplicados para elucidação de vários outros processos biológicos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver e aplicar conjugados de *quantum dots* para estudar a dinâmica de receptores de folato e o perfil de ácido siálico em membranas celulares.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar QDs de CdTe (Telureto de Cádmio) carboxilados e caracterizá-los opticamente;
- Conjugar os QDs ao ácido fólico (QDs-AF) ou ao ácido 3-mercaptopenilborônico (QDs-AMFB);
- Caracterizar os conjugados quanto a parâmetros ópticos, físico-químicos e biológicos;
- Avaliar a efetividade e especificidade das conjugações;
- Avaliar e comparar a expressão/internalização dos receptores de folato e sua reciclagem em linhagens de câncer de mama;
- Estudar o potencial do conjugado QDs-AMFB na determinação do perfil de ácido siálico em membranas celulares.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PONTOS QUÂNTICOS (PQs) OU *QUANTUM DOTS* (QDs)

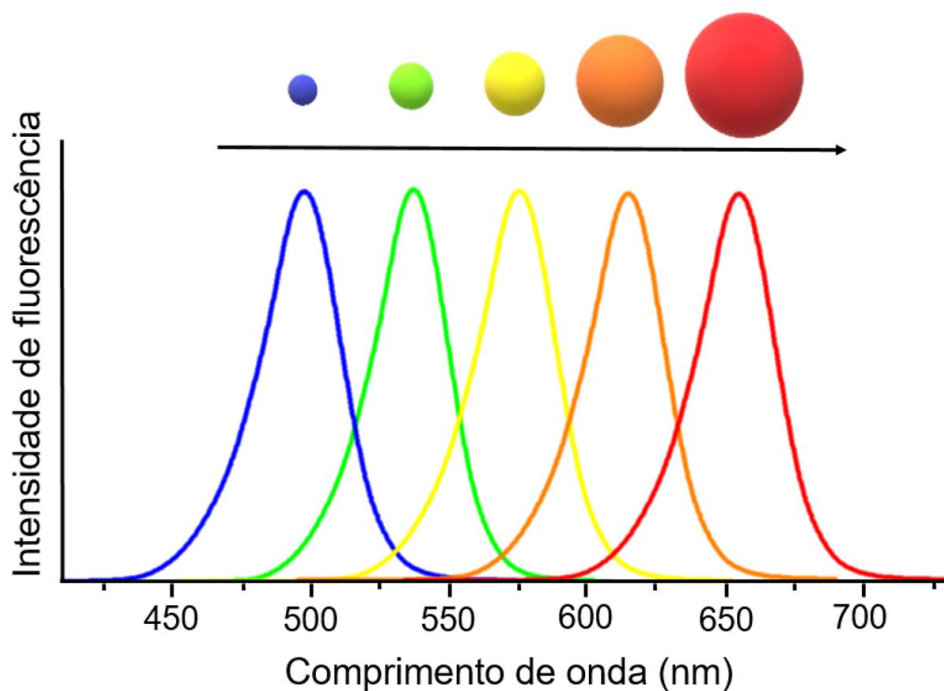
Ao longo dos anos as áreas da Nanotecnologia e Nanociência vêm evoluindo e atraindo o interesse de vários grupos de pesquisa. Em 1959, o físico norte-americano Richard Feynman participou da reunião anual da Sociedade Americana de Física apresentando a palestra “*There’s Plenty of Room at the Bottom*”, fazendo referência a possibilidade de se manipular a matéria na escala atômica e molecular, instigando o desenvolvimento de microscópios com poder de resolução ao nível atômico. Assim, surgiu o microscópio de varredura por tunelamento (*Scanning Tunnelling Microscope* - STM) que ajudou a abrir caminhos para uma nova revolução tecnológica do século XXI, a Nanotecnologia (MARTINS; TRINDADE, 2012). Dentro desse universo, uma nova classe de nanomateriais constituída pelos nanocristais fluorescentes de semicondutores, também chamados de pontos quânticos (PQs) ou *quantum dots* (QDs), pode ser destacada. Isso se deve a suas propriedades singulares que levaram a uma vasta aplicação desses nanomateriais, tendo estes atraído o interesse não só de diversos pesquisadores, bem como de empresas para sua comercialização (RESHMA; MOHANAN, 2019; SMITH; GAO; NIE, 2004).

Estudos desenvolvidos por Ekimov e Efros foram passos iniciais para a compreensão das propriedades ópticas desses materiais semicondutores e sua dependência com relação ao tamanho, quando os mesmos se apresentam em escala nanométrica (EKIMOV; EFROS; ONUSHCHENKO, 1985). Esses achados, proporcionaram a Louis Brus, em 1984, o desenvolvimento dos primeiros QDs preparados por síntese coloidal. Porém o termo ponto quântico ou *quantum dot* foi proposto apenas em 1988, o qual refere-se a nanopartículas de semicondutores que em geral apresentam de 1,5 a 10 nm. (BRUS, 1984; MARTINS; TRINDADE, 2012; REED et al., 1988; SMITH; GAO; NIE, 2004).

A fluorescência dos QDs é dependente não só do tamanho, como também da composição desses nanocristais. Além disso, suas propriedades ópticas estão relacionadas ao fenômeno de confinamento quântico (MICHALET; BENTOLILA; WEISS, 2008). Logo, pode-se sintonizar a fluorescência dos QDs em vários comprimentos de ondas, por exemplo, desde o ultravioleta até regiões próximas ao

infravermelho, percorrendo assim todo o espectro de luz visível (400 - 700 nm). Dessa forma, QDs de tamanhos menores vão emitir fluorescência em regiões mais próximas ao azul, já os maiores, vão emitir em regiões mais próximas ao vermelho, como ilustra a Figura 1 (SMITH; GAO; NIE, 2004).

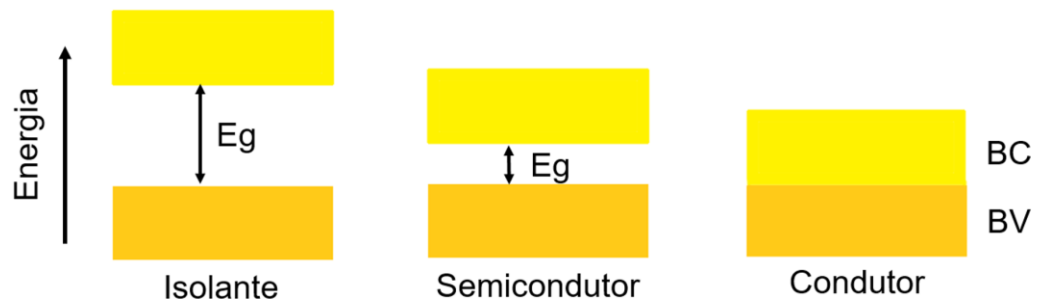
Figura 1 – *Quantum dots* de um mesmo material emitindo fluorescência em várias regiões do espectro de luz visível, variando-se apenas o tamanho destes nanocristais.



Fonte: A autora (2019).

Os materiais semicondutores apresentam uma banda de valência (BV) totalmente ocupada por elétrons, a qual está separada por um *bandgap* de energia (E_g) da banda de condução (BC). Para que os elétrons passem da BV para a BC, é necessário o fornecimento de energia com valor igual ou maior que E_g (Figura 2). A E_g pode ser expressa em eV (elétron-volt). Os materiais sólidos podem ser classificados de acordo com a sua condutividade elétrica em termos do E_g e podem ser categorizados em: isolantes, semicondutores e condutores (SMITH; GAO; NIE, 2004).

Figura 2 – Diferença no *bandgap* (E_g) para diferentes classes de materiais sólidos.

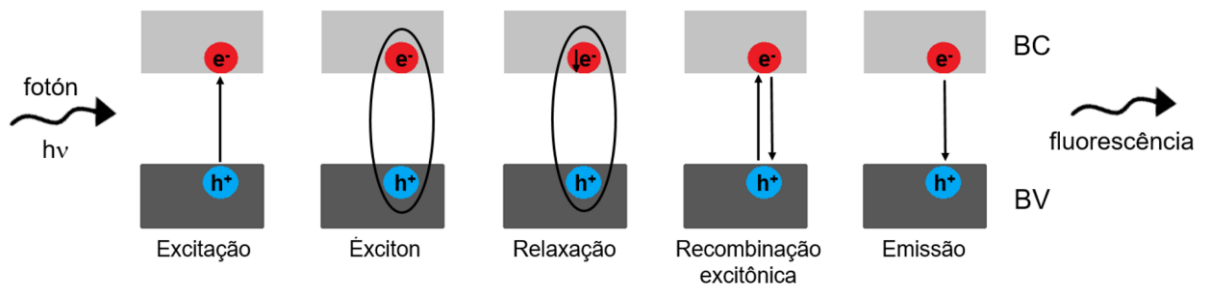


Fonte: Adaptado de SMITH; GAO; NIE (2014).

Um material isolante possui uma $E_g > 3,0$ eV, a qual dificulta os elétrons atingirem a BC, porque necessitam de elevadas energias de excitação, em temperatura ambiente. Diferente dos condutores, que apresentam uma banda contínua devido à sobreposição da BV e da BC, fazendo com que haja pouca ou nenhuma resistência à passagem dos elétrons entre as bandas e, assim, os elétrons facilmente se difundem entre as mesmas. Com relação aos semicondutores, eles apresentam uma E_g intermediária, $< 3,0$ eV, permitindo, por exemplo, que a luz no ultravioleta ou até visível possa ser utilizada para promover os elétrons da BV para a BC também a temperatura ambiente (SMITH; GAO; NIE, 2004).

Quando os semicondutores recebem energia maior que E_g , por exemplo na forma de fótons, os elétrons da BV, de menor energia, podem ser excitados e passar para a BC, de maior energia, deixando um “buraco” na BV, gerando um par elétron-buraco ou éxciton, assim como mostra a Figura 3 (BRUS, 1984; MICHALET; BENTOLILA; WEISS, 2008).

Figura 3 – Esquema de fotoluminescência de semicondutores. A partir da excitação do elétron (e^-) da BV para a BC, há formação de um éxciton, que após relaxação e recombinação excitônica, finalmente gera a emissão de fluorescência. Onde: h^+ representa o buraco gerado na banda de valência (BV) pela excitação do e^- , $E = h\nu$ é a energia de um fóton necessária para excitar a amostra (sendo h a constante de Planck e ν a frequência da luz).



Fonte: A autora (2019).

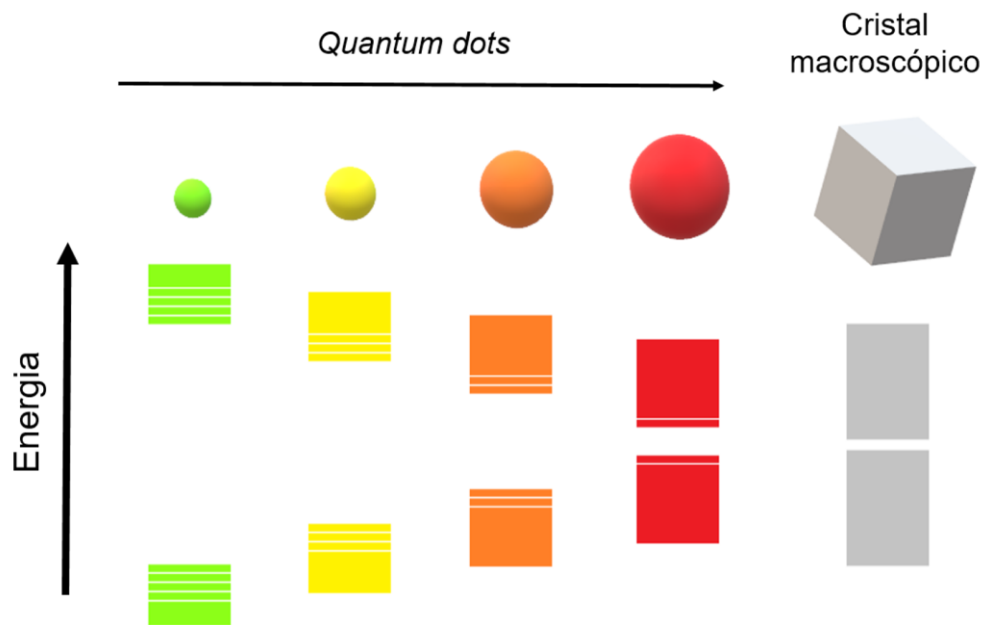
A recombinação excitônica é o processo de decaimento energético dos elétrons da BC para BV a fim de retornar ao estado fundamental, dando origem à emissão característica, ou fluorescência, destes materiais tanto em regime macroscópico quanto nanométrico. Porém, quando em nanoescala, os elétrons e buracos sofrem um forte confinamento quântico, responsável pelas modificações das propriedades ópticas desses materiais.

O confinamento quântico é um fenômeno crítico para materiais semicondutores. No cristal macroscópico ou *bulk*, o elétron pode ocupar uma variedade de estados energéticos, distribuídos de forma contínua pelas bandas. Porém, quando os cristais estão em confinamento quântico tridimensional, ou seja, todas as dimensões do material são fisicamente menores que o raio de Bohr¹, característico para determinado semicondutor, é que se tem os QDs. Essa redução dimensional limita o movimento dos elétrons nas três direções (x, y e z), levando a uma mudança na distribuição dos estados energéticos, com o surgimento de níveis discretos de energia, como mostra a Figura 4, semelhante ao que acontece nos átomos (BRUS, 1984). Por essa razão, os QDs também são chamados de “átomos artificiais”. Cada semicondutor tem um valor de raio de Bohr característico, por exemplo, o do CdSe (Seleneto de Cádmio) é 6,0 nm e o de CdTe (Telureto de Cádmio) é 7,3 nm. Assim, para que nanopartículas sintetizadas a partir desses materiais sejam denominados QDs, elas precisam estar em regime de confinamento quântico e

¹ Em alusão aos átomos de hidrogênio (que possui apenas um elétron e um próton), o raio de Bohr é definido como a distância média entre o elétron e o buraco do *éxciton*, já que uma força atrativa mantém o par elétron-buraco movendo-se juntos, sendo típico de cada semicondutor.

possuir diâmetros menores que 6,0 nm e 7,3 nm, respectivamente, por exemplo (ESCH et al., 1990; MICHALET; BENTOLILA; WEISS, 2008).

Figura 4 – O efeito de confinamento quântico, ocasiona o aparecimento de níveis discretos de energia e também um aumento da E_g como consequência da redução do tamanho de partículas constituídas por materiais semicondutores.



Fonte: A autora (2019).

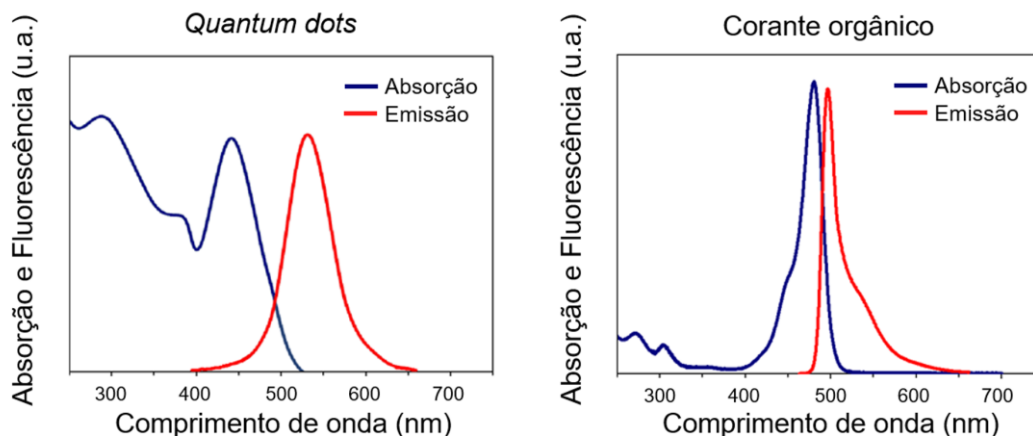
O confinamento quântico também faz com que seja possível controlar em qual região do espectro eletromagnético um QD irá emitir modificando-se o seu tamanho, ou seja, este nanocristal possui sintonização do comprimento de onda de emissão com relação ao tamanho. Isto ocorre por que, em confinamento quântico, a E_g diminui ou aumenta de acordo com o tamanho da nanopartícula, desde que esta seja constituída pelos mesmos materiais.

Quanto menor a partícula de um semicondutor, maior é a E_g e mais para o azul é sua emissão. Já partículas maiores, possuem menor E_g e emitem fluorescência mais próxima do infravermelho. Isso ocorre porque o diâmetro (d) e o comprimento de onda (λ) são inversamente proporcionais a E_g , como visto nas seguintes relações: E_g é proporcional a $1/d^2$ e E_g é proporcional a $1/\lambda$ (SANTOS; FARIAS; FONTES, 2008).

Portanto, são essas novas características que esses materiais adquirem quando escalonados nanometricamente, que fazem dos QDs nanossondas fluorescentes bastante versáteis em Ciências da Vida (SANTOS; FARIAS; FONTES,

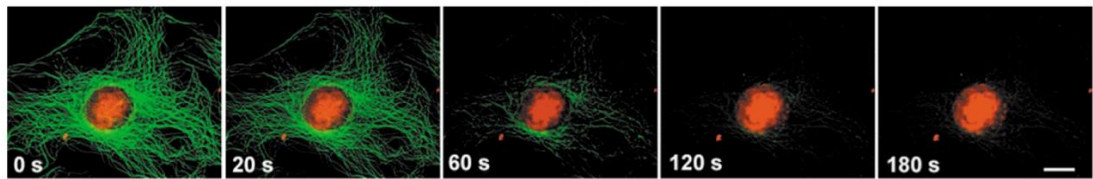
2008). Suas principais vantagens quando comparados a outros marcadores fluorescentes, como o caso dos corantes orgânicos, são: (1) largo espectro de absorção (Figura 5), possibilitando que uma única fonte de luz possa excitar a fluorescência de nanopartículas com diferentes comprimentos de onda de emissão; (2) espectro de emissão estreito e simétrico em diferentes regiões do espectro, variando-se apenas o tamanho da partícula (Figuras 1 e 5); (3) elevada resistência à fotodegradação, uma taxa 100 vezes menor daquelas apresentadas pelos os corantes orgânicos convencionais (isso permite que QDs sejam utilizados para monitorar estudos biológicos em tempo real e por tempos maiores – Figura 6); (4) são eletrodensos, permitindo a visualização destas nanopartículas por microscopia eletrônica de transmissão e (5) possuem superfície ativa, que possibilita a sua conjugação a moléculas ou até mesmo a outras nanopartículas (ESTEVE-TURRILLAS; ABAD-FUENTES, 2013; KAIRDOLF et al., 2013; WU et al., 2003).

Figura 5 – Espectros de absorção e emissão dos QDs e dos corantes orgânicos. Os QDs podem ser excitados em vários comprimentos de onda, já os corantes convencionais necessitam de excitações em comprimentos de onda específicos para cada tipo de corante utilizado.



Fonte: Adaptada de SOUZA (2018).

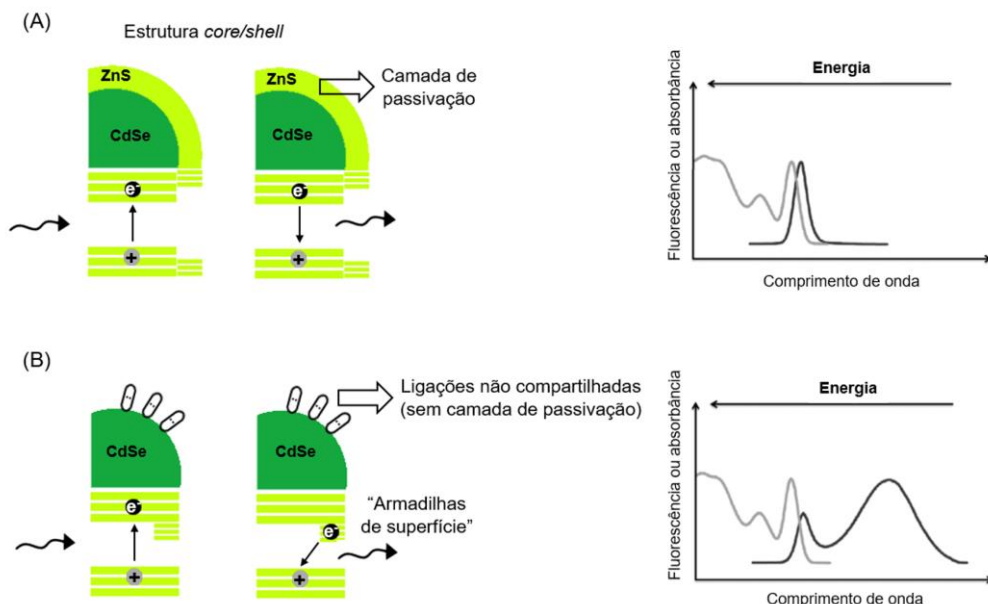
Figura 6 – Resistência à fotodegradação dos QDs ao longo do tempo. Em vermelho, antígenos nucleares marcados por QDs (630 nm), os quais permaneceram fluorescentes ao longo do estudo. Enquanto que os microtúbulos marcados pelo corante orgânico AlexaFluor 488 nm, em verde, tornaram-se indetectáveis a partir de 120 segundos, devido à fotodegradação do corante.



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

A redução do tamanho dos materiais (de macro para nano) resulta em um aumento relativo da área superficial. Este aumento significativo contribui para que o número de átomos na superfície com ligações não compartilhadas tenha um papel mais significativo, que no caso dos QDs está associado aos defeitos de superfícies do material, como mostra a Figura 7, resultando na diminuição da eficiência de luz emitida por esses nanossistemas (MARTINS; TRINDADE, 2012).

Figura 7 – (A) Presença da camada de passivação nos QDs de estrutura *core/shell* promove aprimoramento da emissão de fluorescência, por intensidade e estreitamento da largura do espectro (FWHM, do inglês, *full width at half maximum* e se refere à largura do espectro de emissão à meia altura da intensidade máxima). (B) Na ausência do *shell*, os elétrons interagem com “armadilhas” geradas pelos defeitos de superfície, comprometendo a qualidade da fluorescência. À direita temos o comportamento espectral para ambas as condições A e B descritas, sendo os espectros de absorção em linha cinza e emissão em linha preta.



Fonte: Adaptada de MARTINS; TRINDADE (2012).

Os defeitos levam à formação de níveis intermediários entre a BV e a BC ocasionando uma diminuição da intensidade de luminescência dos nanocristais.

Esses níveis favorecem a perda de energia do elétron, já que ao invés do elétron decair diretamente da BC para a BV, ele passará por esses níveis intermediários até chegar à BV (Figura 7B). Por isso, essas ligações são chamadas de “armadilhas”. Assim, na presença de defeitos, há diminuição da intensidade e da qualidade da emissão de fluorescência pelos nanocristais.

Uma alternativa para solucionar este problema, ou minimizá-lo, é o crescimento de uma monocamada (“casca” – processo chamado de passivação) constituída por outro material semicondutor, geralmente de maior E_g que o do semicondutor que forma o núcleo da nanopartícula. Ao final do processo de síntese, tem-se uma estrutura do tipo núcleo/casca ou *core/shell*. Este processo diminui os defeitos de superfície, responsáveis pelo comprometimento da qualidade da emissão desses nanocristais, aperfeiçoando suas propriedades fluorescentes, assim como mostra a Figura 7A (MARTINS; TRINDADE, 2012; SILVA et al., 2010).

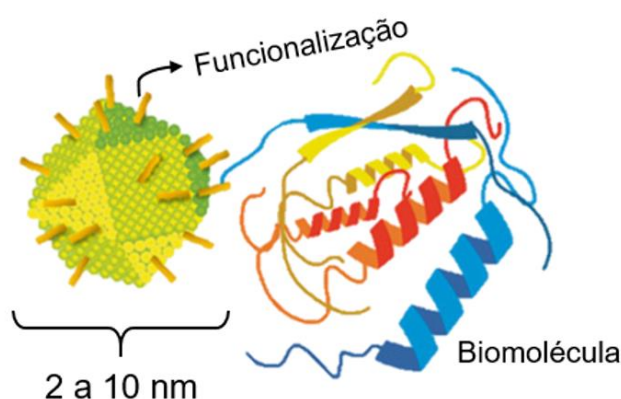
Na síntese aquosa coloidal muitos QDs são binários e preparados a partir de precursores da família IIB e VIA da antiga tabela periódica. Essa síntese é em geral realizada em pH básico e em temperaturas por volta de 90 a 100 °C, ademais utiliza um agente estabilizante que tem a função de controlar o crescimento do núcleo e evitar a aglomeração das nanopartículas (SILVA et al., 2010; SUKHANOVA; NABIEV, 2008).

Os principais agentes estabilizantes utilizados no preparo de QDs em meio aquoso apresentam o grupamento tiol ($-SH$) em sua estrutura, e devido à presença do enxofre, estes compostos também atuam na construção da camada de passivação. Além disso, os agentes estabilizantes podem conferir cargas aos QDs, mantendo não só as partículas afastadas em suspensão como também conferindo grau de funcionalidades às mesmas. Por atuarem como ponte química nas interações dos QDs com moléculas orgânicas, os estabilizantes muitas vezes são também chamados de agentes funcionalizantes. Dentre os estabilizantes mais utilizados, destacam-se o ácido mercaptoacético (AMA), ácido 3-mercaptopropiônico (AMP), ácido mercaptossuccínico (AMS), L-cisteína (CIS) e cisteamina (CISTM), que apresentam ácidos carboxílicos e/ou aminas em sua estrutura (PASSOS et al., 2016; ROGACH et al., 2007; FONTES et al., 2012).

Ao final da síntese temos, portanto, uma nanoestrutura complexa que é composta por camadas, sendo que: (1) o núcleo da nanopartícula determina sua

emissão, (2) a camada de passivação determina a intensidade e qualidade da emissão e a fotoestabilidade e, por fim, (3) a camada orgânica e mais externa, de agente estabilizante/funcionalizante, determina a sua estabilidade química e o grau de funcionalidade em relação à marcação do sistema biológico de interesse (Figura 8).

Figura 8 – Esquema de um *quantum dot* funcionalizado quimicamente para sua utilização como marcador fluorescente.



Fonte: Adaptada de CESAR (2014).

Essa superfície ativa dos QDs permite a interação dessas nanopartículas com biomoléculas, tais como aminoácidos, proteínas e carboidratos que vão dar um direcionamento biológico mais específico a esses QDs. Por isso, os QDs têm atraído o interesse de diversos pesquisadores na área das Ciências da Vida, sendo úteis em ensaios bioanalíticos, na aquisição de imagens *in vitro* de células e tecidos, bem como de imagens *in vivo* de pequenos animais e também no diagnóstico e compreensão da biologia celular do câncer e de outras doenças (CABRAL FILHO et al., 2016; ESTEVE-TURRILLAS; ABAD-FUENTES, 2013; KAIRDOLF et al., 2013). Além disso, é possível conjugar os QDs a outros compostos que possuam grupos funcionais ou a outras nanopartículas, desenvolvendo sistemas inovadores aplicáveis em mais de uma modalidade de imagem (CABRAL FILHO et al., 2018; KOKTYSH; BRIGHT; PHAM, 2011; PEREIRA et al., 2019).

2.2 CONJUGAÇÃO DE QUANTUM DOTS

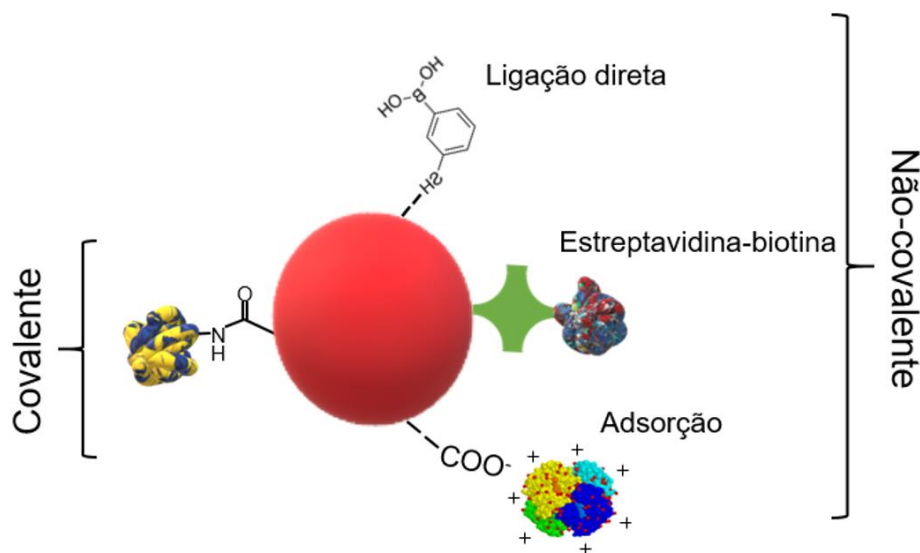
Nas últimas décadas um dos maiores desafios desde o desenvolvimento dos QDs têm sido sua conjugação efetiva com moléculas para aplicação biológica sítio-específica (PEREIRA et al., 2019). Em 1998, Bruchez e co-autores empregaram QDs de CdSe sintetizados por uma rota hidrofóbica revestidos com sílica e conjugados com biotina, usando uma estratégia de biotina-estreptavidina para marcação específica dos filamentos de actina nas células 3T3 (fibroblasto de rato). Ao mesmo tempo e independentemente, Chan e Nie (1998) descreveram conjugados de QDs de CdSe com duas proteínas, IgG e transferrina, utilizando como agente de acoplamento carbodiimidas que propiciam conjugação covalente entre as carboxilas dos QDs com as aminas das proteínas. Desde essa época, diferentes estratégias de conjugação para QDs vêm sendo utilizadas, e com elas surgem novas possibilidades de aplicações para essa classe de sonda fluorescente (CHAN; NIE, 1998; FOUBERT et al., 2016; PEREIRA et al., 2019).

Os procedimentos de conjugação, entre os QDs e moléculas, apresentam diferentes mecanismos de reação, sendo importante levar em consideração alguns parâmetros/fatores, como: (i) a atividade natural da biomolécula não pode ser afetada; (ii) as propriedades ópticas dos QDs não podem ser alteradas; (iii) é necessário o controle no número de biomolécula na superfície do QD e dos agentes de acoplamento; (iv) deve-se obter bioconjugados estáveis em condições fisiológicas; (v) o bioconjugado deve ter as ligações inespecíficas com os sistemas biológicos minimizadas; (vi) os conjugados necessitam ter reprodutibilidade. Devido a essa conjuntura de fatores, a conjugação entre QDs a diferentes biomoléculas ainda é um desafio para pesquisadores que trabalham nessa área, pois cada biomolécula tem comportamento e estruturas diferentes (CABRAL FILHO et al., 2015, 2016; JIN; HILDEBRANDT, 2012). A seguir serão relatadas as estratégias mais utilizadas, bem como as técnicas de avaliação de conjugação mais empregadas. Outras técnicas e mais detalhes relacionados à conjugação podem ser encontrados no nosso artigo de revisão publicado no *Journal of Brazilian Chemical Society*, disponível como apêndice a essa dissertação (PEREIRA et al., 2019).

2.2.1 Estratégia de Conjugação

Existem diferentes tipos de conjugações químicas entre os QDs e outros compostos como nanopartículas e/ou biomoléculas. Sendo utilizadas estratégias do tipo covalente e não covalente. Na conjugação covalente, faz-se necessário o uso de agentes de acoplamentos para favorecer a ligação entre a superfície dos QDs funcionalizada e grupos funcionais presentes na biomolécula, como radicais carboxílicos e aminas (Figura 9). Já as conjugações não covalentes são baseadas em interações, tais como: adsorção, ligação direta à superfície dos QDs ou afinidade da estreptavidina-biotina, assim como também esquematizado na Figura 9 (FOUBERT et al., 2016; HERMANSON, 2013).

Figura 9 – Esquema de conjugações covalente (para ligação amida) e não covalente.



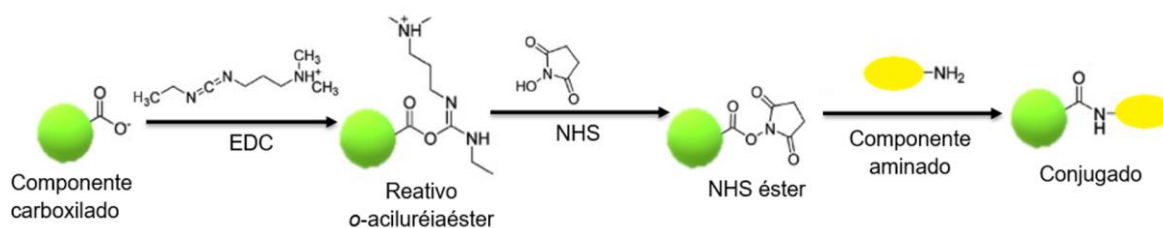
FONTE: A autora (2019).

2.2.1.1 Conjugação Covalente

A escolha de mediadores para a conjugação covalente depende dos grupos funcionais dos QDs e das biomoléculas envolvidas. Os principais agentes de acoplamento empregados quando à promoção de ligação amida são o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e *N*-hidroxisuccinimida (NHS ou também o Sulfo-NHS), já a ligação amina-tiol pode ser favorecida pelo sulfo-SMCC (sulfossuccinimidil 4-(*N*-maleimidomethyl)ciclohexano-1-carboxilato) e, entre aminas, o glutaraldeído pode ser utilizado (HERMANSON, 2013).

Em particular, o EDC ou EDAC são agentes altamente reativos com ácidos carboxílicos para promover ligação amida com componentes aminados. O EDC interage com a carboxila disponível, por meio da carbodiimida ($-N=C=N-$), formando a *o*-acilisouréia, que é um intermediário altamente reativo, com tempo de vida curto. Além disso, para obter um aumento do rendimento e um aprimoramento na cinética do processo, pode-se adicionar o NHS (ou Sulfo-NHS). A hidroxila do NHS interage com o complexo reativo *o*-acilisouréia formando o intermediário NHS éster, o qual apresenta maior estabilidade e interage com as amins primárias, promovendo a formação da ligação amida e a consequente conjugação, esquematizado na Figura 10 (BENOITON, 2006; HERMANSON, 2013; PEREIRA et al., 2019).

Figura 10 – Esquema de conjugação covalente entre componentes carboxilados e aminados. O componente carboxilado é ativado por EDC/NHS para formar uma ligação amida com componente aminado.



Fonte: Adaptada de WANG et al. (2012).

2.2.1.2 Conjugação Não Covalente

A conjugação por adsorção é baseada em interações eletrostáticas e/ou hidrofóbicas (Van der Waals). Por não usufruir de mediadores, essa metodologia torna-se mais simples e economicamente satisfatória, entretanto esse tipo de interação pode ser suscetível às condições do meio, como pH, força iônica e temperatura, sendo às vezes menos estáveis que as estratégias por conjugação covalente (FOUBERT et al., 2016; HERMANSON, 2013). Já a conjugação de alta afinidade entre a avidina ou estreptavidina e a biotina apresentam-se como uma das interações não covalentes mais fortes, apresentando resistência a alteração no pH, sais de tampão, temperatura e manipulação de procedimentos. Contudo, devido ao tamanho potencialmente grande da composição final e o custo dos reagentes, torna-

se uma das estratégias menos popular (DIAMANDIS; CHRISTOPOULOS, 1991; HERMANSON, 2013).

Outra estratégia de ligação não covalente é a ligação direta, na qual as biomoléculas se ligam diretamente a superfície dos QDs, sendo favorecida por interações dativas – aquela formada pela doação de dois elétrons por um único átomo de biomolécula. Esse tipo de conjugação necessita de menor energia que as ligações covalentes, assim podem ser sensíveis ao pH, à oxidação e às trocas de moléculas semelhantes (ALIVISATOS; GU; LARABELL, 2005; FOUBERT et al., 2016; HERMANSON, 2013). Exemplos dessa estratégia são conjugações com biomoléculas com resíduos tiol disponível, para as quais o grupo sulfidril das moléculas tioladas podem estabelecer ligações dativas com o metal presente nos QDs. O principal desafio dessa interação é a necessidade do resíduo tiol na molécula (FOUBERT et al., 2016; HERMANSON, 2013; SAPSFORD et al., 2006).

Os processos de conjugação ainda são desafiadores, pois podem comprometer a qualidade da fluorescência dos QDs, bem como a atividade dos componentes que se deseja associar a eles. Assim, é crucial eleger a estratégia de conjugação mais apropriada e investir em estudos de avaliação da conjugação a fim de monitorar e aperfeiçoar esse processo (CABRAL FILHO et al., 2015; CARVALHO et al., 2014).

2.2.2 Técnicas de Confirmação de Conjugação

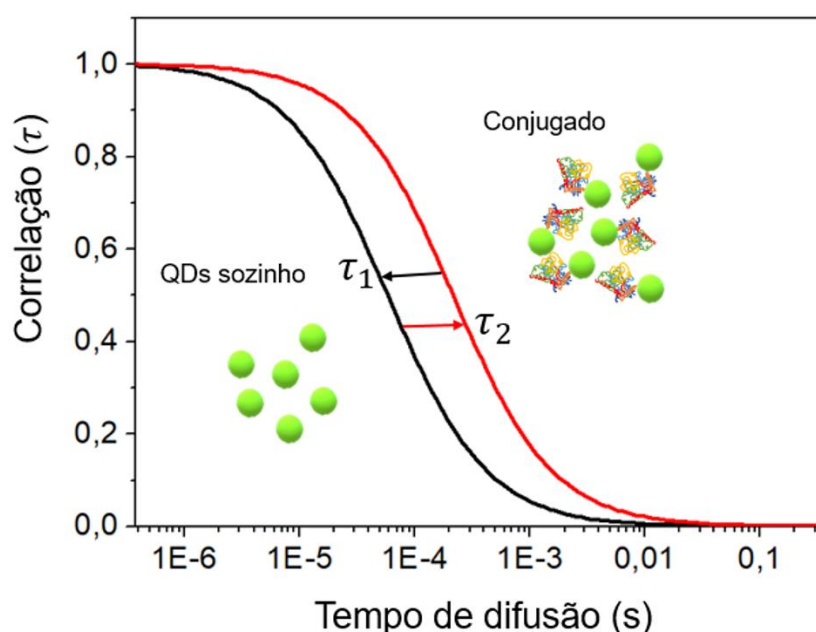
Técnicas de caracterizações são fundamentais para avaliar o método de conjugação, vários pesquisadores as utilizam rotineiramente. As técnicas mais citadas são a espectroscopia por correlação de fluorescência (FCS), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), eletroforese, ensaio de microplaca fluorescente (EMF), potencial zeta e espalhamento dinâmico da luz (DLS). Dentre todas, a técnica de FCS é a mais recente e chama atenção por sua alta sensibilidade, uma vez que permite avaliar conjugados com grande e pequenas moléculas (PEREIRA et al., 2019).

2.2.2.1 Espectroscopia por Correlação de Fluorescência

A técnica de FCS utiliza um microscópio confocal para detectar a difusão de moléculas ou partículas em um volume focal definido por um laser, gerando flutuações de fluorescência devido ao movimento browniano (SHAO et al., 2009). Essas flutuações são detectadas obtendo-se uma curva de autocorrelação que interliga os eventos em função do tempo, como esquematizado na Figura 11 para QDs e seus respectivos conjugados. O FCS fornece informações relacionadas ao tamanho, número de moléculas fluorescentes ou partículas, velocidade de difusão, bem como interações entre moléculas (HAN; DING; JU, 2011).

Na Figura 11 nota-se que quando os QDs passam no foco do laser apresentam um tempo de difusão menor, portanto a curva será deslocada para esquerda. Já quando os QDs estão conjugados a moléculas o tempo de difusão é maior e a curva se desloca para direita (THOMAZ et al., 2015).

Figura 11 — Alteração do tempo de difusão do QD sozinho (difusão rápida) e conjugado (difusão lenta).



Fonte: Adaptada de PEREIRA et al. (2019).

O FCS é uma técnica altamente sensível, visto que sua faixa de detecção é na concentração de nanomolar (nM), por essa razão esse método vem sendo cada vez mais explorado para estudos de bioconjugação, utilizando não só diferenças no tempo de difusão como também as medidas do raio hidrodinâmico, no caso de nanopartículas como os QDs (THOMAZ et al., 2014). Assim, se as partículas da

amostra, entrando e saindo do volume focal, forem esféricas, pode-se relacionar a elas um raio hidrodinâmico, o qual é calculado a partir da Eq. 1:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \Rightarrow R = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad \text{Eq. 1}$$

onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, η é a viscosidade do meio e D é o coeficiente de difusão. No entanto, pode-se usar a definição do tempo médio de difusão (Eq. 2) e calcular o raio hidrodinâmico obtendo τ_D da curva de autocorrelação:

$$\tau_D = \frac{\omega_x^2}{4D} \quad \text{Eq. 2}$$

Contudo para obter o raio lateral do volume focal do laser (ω_x) é necessário uma calibração usando uma substância com coeficiente de difusão conhecido, como o corante rodamina, uma vez que é o único parâmetro difícil de medir (SHAO et al., 2009). Dessa forma, o raio hidrodinâmico pode ser dado, segundo a Eq. 3:

$$R = \frac{4k_B T \tau_D}{6\pi\eta \omega_x^2} \quad \text{Eq. 3}$$

Por exemplo, Cabral Filho et al. (2015) utilizaram a técnica de FCS para confirmar a conjugação entre QDs de CdTe e anticorpos anti-A e anti-B contra antígenos do grupo sanguíneo ABO através dos tempos de difusão e diâmetros hidrodinâmicos (D_H). Os autores observaram que o QD sozinho apresentou $D_H = 3,8$ nm e seus conjugados associados ao anti-A e anti-B exibiram $D_H = 20,4$ nm e $18,5$ nm, respectivamente. Pereira et al. (2019) também utilizaram a técnica de FCS para confirmar e diferenciar a conjugação de QDs de CdTe a quelatos de gadolínio (Gd^{3+}) em duas proporções diferentes, 1/20 e 1/30 (QD/quelato). Através do FCS, os autores obtiveram tempos médio de difusão de aproximadamente $127 \mu s$ para QDs sozinho, $646 \mu s$ e $1.141 \mu s$ para nanossistemas bimodais de 20 e 30 quelatos, respectivamente, além disso foram obtidos raios hidrodinâmicos para o QD sozinho (ca. $3,1$ nm), e conjugados 1/20 e 1/30, sendo ca. $15,9$ e $28,2$ nm, respectivamente. Nesse contexto, pode-se concluir que o FCS é uma valiosa técnica de caracterização dos conjugados baseados em QDs.

2.3 APLICAÇÕES DOS QUANTUM DOTS

Um grande número de ensaios baseados em fluorescência utilizam corantes orgânicos associados a moléculas, contudo esses marcadores apresentam limitações. Com o passar dos anos outros tipos de sondas vêm chamando a atenção, por atender melhor as demandas das análises. Deste modo, os QDs vêm se destacando como candidatos versáteis para ensaios *in vitro* e *in vivo*, já que apresentam propriedades ópticas únicas e preenchem, em vários aspectos, as desvantagens associadas aos corantes tradicionais, assim como previamente mencionado na seção 3.1 dessa dissertação (RESHMA; MOHANAN, 2019).

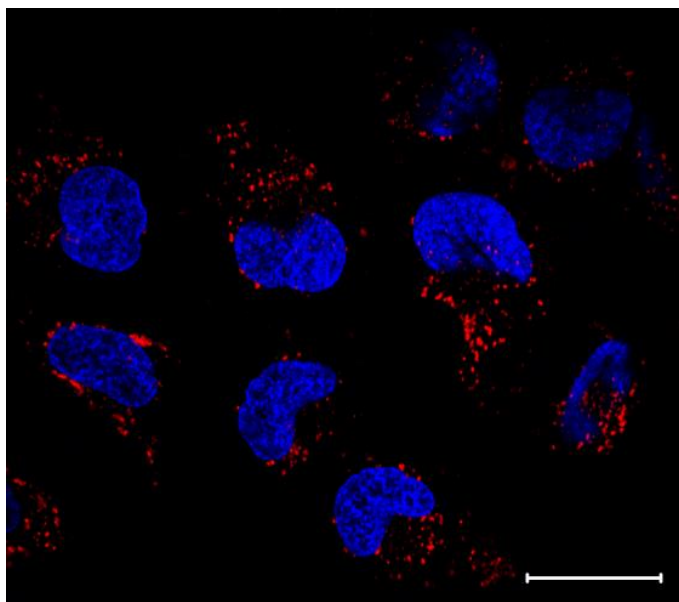
Os primeiros estudos realizados utilizaram os QDs como sondas inespecíficas (LIRA et al., 2012; SMITH; GIORGIO, 2009) para compreender os mecanismos de interação destes nanocristais com os sistemas biológicos e assim avaliar o seu potencial para aplicações biológicas específicas (CLIFT; STONE, 2012). Desde então, diversos trabalhos envolvendo diferentes tipos de aplicações já foram reportados, tais como: marcações *in vitro* e *in vivo*, análises bioanalíticas, como detecção de proteínas, DNA e outras biomoléculas, utilizando como por exemplo até mesmo o fenômeno de transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET) (GOLDMAN et al., 2002; RESHMA; MOHANAN, 2019; PEREIRA et al., 2019). Além da aplicabilidade em diagnóstico por imagens ópticas, o potencial fotossensibilizador desses nanocristais foi também investigado para a terapia fotodinâmica (MALIK; WANI; HASHIM, 2012; QI et al., 2011; SAMIA; DAYAL; BURDA, 2006; VIANA et al., 2015).

Diferentes pesquisadores aplicaram conjugados de QDs de alta especificidade para a detecção de antígenos, receptores ou outras moléculas em superfície de eritrócitos, células e tecidos cancerosos e assim possibilitar a identificação e a caracterização de processos envolvidos ou não com patologias (CUNHA et al., 2018). Cabral Filho et al. (2015), por exemplo, demonstram a aplicação dos QDs para fenotipar antígenos eritrocitários. Para isso os autores conjugaram os QDs aos anticorpos anti-A, anti-B e anti-H, e avaliaram a capacidade dos conjugados de distinguir grupos ABO e subtipos do grupo sanguíneo A através da marcação fluorescente por citometria de fluxo, seus resultados foram bem-sucedidos e se apresentaram como alternativa complementar aos métodos tradicionais.

Mangeolle et al. (2019) prepararam conjugados de QDs de CdSe/CdS/ZnS associados ao ácido fólico para estudar esferoides de células KB (linhagem derivada de carcinoma epitelial cervical humano) e observaram a marcação dos receptores de folato por microscopia de fluorescência.

Atualmente, o interesse em conjugações com aplicabilidade múltipla vem também aumentando, como no caso de preparações de conjugados multimodais com propriedades fluorescentes, magnéticas e com especificidade para um determinado alvo celular. Cabral Filho et al. (2018) desenvolveram uma nova nanossonda multimodal baseada em QDs, nanopartículas magnéticas e holo-transferrina humana, que propiciou análises por diferentes técnicas como microscopia de fluorescência, ressonância magnética e citometria de fluxo, com especificidade bioquímica para receptores de transferrina. Eles comprovaram a especificidade do nanossistema através do padrão de marcação (Figura 12) e ensaios de saturação utilizando células HeLa (carcinoma epitelial cervical humano), além de demonstrar que as propriedades ópticas e magnéticas se mantiveram, após a conjugação à transferrina.

Figura 12 – Marcação de células HeLa pelo nanossistema multimodal baseado em QDs, nanopartículas magnéticas e transferrina. Em vermelho vesículas de endocitose da nanossonda via receptor de transferrina e em azul o corante de núcleo pelo Hoechst. Escala = 10 μm .



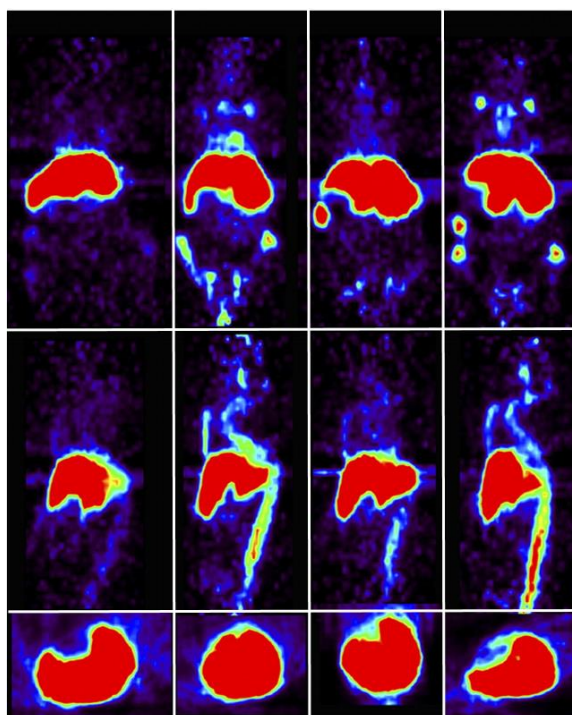
Fonte: Adaptada de CABRAL FILHO et al. (2018).

Com o sucesso das aplicações *in vitro* os pesquisadores começaram também a testar os marcadores baseados em QDs para imagens *in vivo*. Os primeiros

pesquisadores a demonstrar uma biodistribuição dos QDs foram Schipper et al. (2007), eles utilizaram QDs de CdSe comercialmente disponíveis em ratos vivos para os quais foi observada uma rápida captação das nanopartículas pelo fígado e baço, com maior acúmulo no fígado, após alguns minutos (Figura 13). Desde então muitos pesquisadores começaram a aplicar sistemas baseados em QDs para imagem *in vivo*, Xiao et al. (2019), por exemplo, usaram QDs de sílica associados ao gadolínio para demonstrar a aplicação desse sistema no rastreamento fluorescente e sua atuação como agente de contraste por ressonância magnética. Neste estudo os autores utilizaram ratos e peixe-zebra como modelos animais. Os resultados comprovaram a baixa toxicidade do nanossistema, indicando o nanossistema como potencial agente em estudos de processos *in vivo*.

Atualmente, há vários estudos com aplicação *in vivo* usufruindo de diferentes sistemas baseados em QDs, como também distintos sistemas biológicos como modelo experimental. Entretanto, estudos sobre a eliminação e toxicidade dos QDs ainda são necessários (HARDMAN, 2006; KUMAR, 2017; NEL et al., 2006; WAGNER et al., 2019).

Figura 13 – Imagem *in vivo* de camundongo com QDs injetados. QD525-carboxilado (primeira coluna), QD525-aminado (segunda coluna), QD800-carboxilado (terceira coluna) e QD800-aminado (quarta coluna). Cortes coronais (linha superior), sagitais (linha média) e transversais (linha inferior).



Fonte: Adaptado de SCHIPPER et al. (2007).

Assim vemos que os QDs são versáteis e promissoras ferramentas para auxiliar na compreensão de processos biológicos. Uma vez que, conjugados eficientes permitem a obtenção de informações biológicas acerca da localização espacial e temporal, detalhes morfológicos e resolução ao nível celular e molecular (WEGNER; HILDEBRANDT, 2015).

2.4 MEMBRANA CELULAR

As células são envolvidas por uma membrana plasmática de 6 a 10 nm de espessura composta por carboidratos, proteínas e lipídios. Essa membrana delimita a célula como também exibe estruturas que desempenham atividades complexas, como: (i) deslocamento de substâncias pelo citoplasma; (ii) constituem barreiras permeáveis e seletivas; (iii) fornecem barreira física; (iv) participam dos processos de exocitose e endocitose; (v) apresentam moléculas de reconhecimento celular; (vi) possuem receptores que interagem especificamente com moléculas provenientes do exterior (DE ROBERTIS; HIB, 2004).

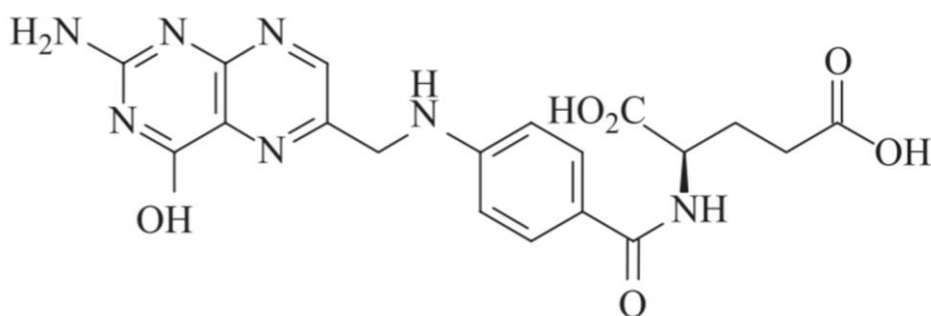
Além disso, um estudo sobre a migração celular, realizado em 1960, propiciou a descoberta da carga eletronegativa da membrana através de um ensaio de eletroforese, o qual contribuiu para a descoberta do glicocálix (SCHAUER; KAMERLING, 2018). O glicocálix está relacionado a funções na membrana celular, tais quais: (i) adesão celular; (ii) reconhecimento célula-célula; (iii) sinalização celular. Assim, alterações no glicocálix, como a diminuição ou aumento da carga eletronegativa, podem resultar em mudanças na adesão, modificações na conformação celular e morfologia da membrana (LAHIR, 2017).

2.4.1 Receptor de Folato

O receptor de folato (RF) é uma glicoproteína de membrana ligadora de folato com peso molecular de 38 – 40 kDa, com localização geralmente apical, e tem afinidade pelo ácido fólico (AF), Figura 14 (WALTERS et al., 2013; WANG; LOW, 1998). A dinâmica do RF ocorre quando o AF se liga e o complexo RF-AF é endocitado para o citoplasma da célula. Após a captação, o AF é convertido a poliglutamato de folato para que possa ser armazenado. Logo após, os RFs são reciclados, ou seja,

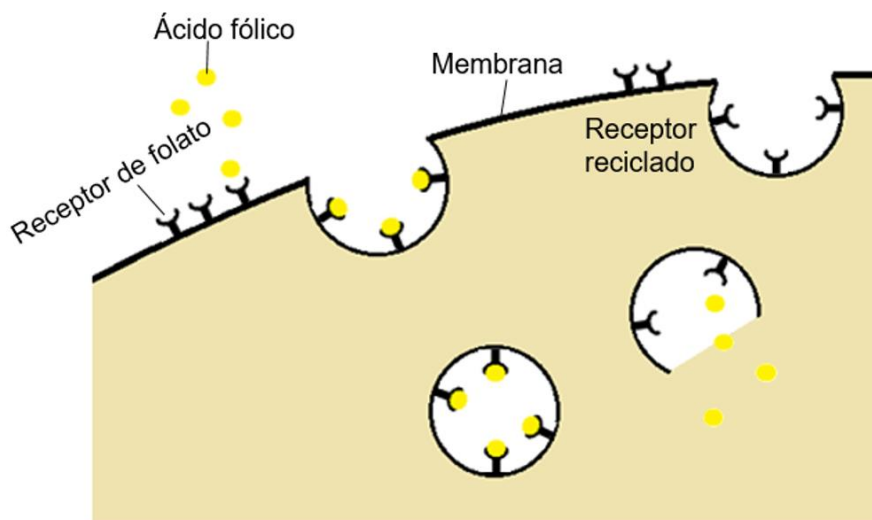
retornam à membrana plasmática – o transporte de AF pelo receptor é unidirecional para o citoplasma como esquematizado na Figura 15. A regulação de AF nessa dinâmica é limitada pela quantidade de RF presente na membrana celular, bem como pela quantidade de AF armazenada no interior da célula (WALTERS et al., 2013; WANG; LOW, 1998).

Figura 14 – Estrutura molecular do ácido fólico.



Fonte: Adaptado de LEAMON; REDDY (2004).

Figura 15 – Representação da endocitose mediada por RF.



Fonte: A autora (2019).

Alguns trabalhos vêm estudando a expressão aumentada dos RFs em células e tecidos cancerosos de ovário, mama, reto, pulmão, bexiga, rim e de nasofaringe, quando comparadas aos tecidos normais. Em alguns cânceres nos estágios iniciais ou até mesmo em estados indiferenciados, os RFs podem estar superexpressos. Esse microambiente pode acabar dando suporte para um crescimento tumoral rápido e

descontrolado, o qual é observado nos tumores mais agressivos. Alguns trabalhos também sugeriram que o aumento na expressão dos RFs pode estar associado com a progressão do tumor (KELEMEN, 2006; LEAMON; LOW, 1991; MIOTTI et al., 1997; ROSS; CHAUDHURI; RATNAM, 1994; WALTERS et al., 2013; YU; YAN; WU, 2017). Outros trabalhos têm relacionado o aumento de RFs não só à progressão como também ao risco de recorrência, estando presente em tumores que são triplo negativos – receptores estrógeno, progesterona e HER2 (Fator de crescimento epidérmico humano receptor-tipo 2) (GINTER et al., 2017a; KUMAR et al., 2017; YU; YAN; WU, 2017). Os RFs apresentam um baixo peso molecular e alto grau de especificidade, por esses fatores os pesquisadores vêm estudando a utilização desse receptor como alvo tanto para auxiliar no diagnóstico, quanto para guiar terapias mais eficientes para o câncer, bem como para compreender melhor a biologia celular dessa doença multifatorial (BWATANGLANG et al., 2016b; SONG et al., 2009; VERGOTE; MARTH; COLEMAN, 2015; VIMALA et al., 2017).

A associação da endocitose mediada pelos RFs com AFs marcados por compostos fluorescentes pode ser uma ferramenta interessante para se obter informações sobre a quantidade de receptores funcionais e sua internalização pela célula em estudo (DU et al., 2011; GESZKE et al., 2011; MOROSINI et al., 2011; SINGH et al., 2015). Bwatanglang et al. (2016), por exemplo, usaram QDs de Mn-ZnS ligados ao fármaco 5-fluorouracil (anticancerígeno) para estudar a efetividade do direcionamento desse composto aos RFs. Os autores utilizaram células de câncer de mama bem como analisaram camundongos portadores de tumor para monitorar a ação dos QDs-5-fluorouracil conjugados ao AF e sem conjugá-los. De acordo com os resultados foi demonstrado que a presença do AF no conjugado apresentou efeito antitumoral seletivo e foi mais efetivo do que aquele sem a presença do AF.

Suriamoorthy et al. (2010) elaboraram conjugados constituídos por QDs de CdTe ligados covalentemente ao AF, através do agente de acoplamento EDC. Os autores incubaram os QDs sozinhos e os conjugados QDs-AF com duas linhagens de células tumorais: KB – expressa RFs – e A549 (carcinoma de pulmão humano) – sem expressão de RFs. Foi observado que as células KB apresentaram alta marcação quando incubadas com o conjugado QDs-AF e baixa marcação com QDs sozinhos, já as células A549 demonstraram baixa marcação ao ser incubada com QDs-AFs, demonstrando o potencial do conjugado para estudo de RFs, mediado pelo AF, em

células tumorais. Bharali et al. (2005) também utilizaram as mesmas linhagens celulares citadas anteriormente, no entanto os autores desenvolveram conjugados de AF com QDs de InP-ZnS estabilizados com ácido mercaptoacético. A análise foi feita através de microscopia confocal com excitação por dois fótons, sendo demonstrado que essa associação apresenta potencial para se adquirir imagens de tecidos mais profundos, e que este resultado corrobora com o do autor anteriormente citado.

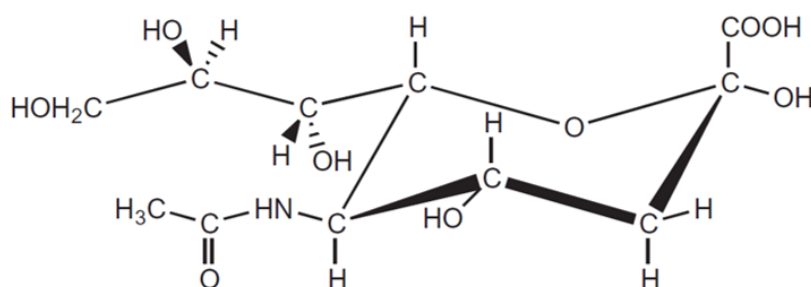
Morosini et al. (2011) usaram bioconjugados de QDs de CdTe com AF para um estudo de terapia fotodinâmica em células KB (RF+) e HT-29 (adenocarcinoma colorretal humano – RF-). Os autores observaram uma diferença estatisticamente significativa na eficiência fotodinâmica entre as células ao utilizarem o conjugado, tendo assim um melhor direcionamento a uma resposta do tratamento. Desse modo o estudo permitiu validar a capacidade dos QDs como um potencial fotossensibilizador para terapia dinâmica.

Portanto, QDs conjugados ao AF apresentam grande potencial para estudos biológicos, uma vez que também há ainda poucos trabalhos que exploraram esse tipo de conjugado para o estudo da dinâmica do RFs. Essa ferramenta, portanto, se mostra promissora para ajudar a um melhor entendimento da biologia celular do câncer.

2.4.2 Ácido Siálico

Dentre as distintas estruturas dos glicoconjugados na membrana, o ácido siálico (AS) destaca-se como uma família de carboidratos complexos de nove carbonos, normalmente ligados a outros carboidratos por meio de ligações α -acetosídicas. O AS ocorre na natureza em 50 tipos diferentes, sendo o ácido *N*-acetilneuramínico (Figura 16) o mais abundante em organismos eucariotos. Localizados habitualmente nas posições terminais das cadeias de açúcar na superfície celular, os ASs estão intimamente associados a processos biológicos essenciais à manutenção da vida, tais como; mediadores na adesão célula-célula, mediadores na comunicação intercelular, renovadores celulares, e como receptores para bactérias e vírus (BLAUM; STEHLE, 2019; KIEFEL; ITZSTEIN, 1999; KIEFEL; VON ITZSTEIN, 2002; SCHAUER; KAMERLING, 2018; SEARS; WONG, 1999; WILSON; ITZSTEIN, 2003).

Figura 16 – Estrutura molecular do ácido *N*-acetilneuramínico.



Fonte: Adaptado de SCHAUER; KAMERLING (2018).

Devido a sua carga negativa o AS contribui para várias funções biofísicas em vários sistemas biológicos. Por exemplo, a carga negativa atribuída pelo AS aos eritrócitos humanos corresponde a mais de 70%, e atua impedindo a agregação dos eritrócitos na circulação sanguínea (HUANG et al., 2016; STRATTON et al., 1973). Supõe-se que alterações celulares, como as associadas com as hemoglobinopatias, também contribuam para a perda de AS, e como consequência, para a redução da carga elétrica negativa das membranas desses eritrócitos, favorecendo a aglutinação eritrocitária na microvasculação e a oclusão vascular em portadores dessas doenças hematológicas (BASU et al., 2008; YEDGAR; KOSHKARYEV; BARSHEIN, 2002). Ademais, o AS também atua regulando a renovação celular dos eritrócitos que têm uma vida média de aproximadamente 120 dias. Essa renovação é mediada pela perda de resíduos de ASs presente em nos glicoconjugados da membrana eritrocitária e estas células são então reconhecidas e fagocitadas pelo sistema reticuloendotelial (HUANG et al., 2016; MAMMEN; CHOI; WHITESIDES, 1998).

Além disso, a carga da membrana celular, conferida pelo AS, pode ter um papel importante na migração, no potencial de malignidade e no grau invasivo das neoplasias, contribuindo na infiltração preferencial de determinados tipos de tecidos (BULL et al., 2014; CUI et al., 2011; HUANG et al., 2016; INAGAKI et al., 2007 WANG et al., 2009). Modificações na quantidade de ASs podem estar também associadas a várias doenças, como câncer, doenças cardiovasculares e neurológicas (ANGATA; VARKI, 2002; DWEK, 1996; LIU et al., 2011; MARU et al., 1996; VARKI, 1991). Essa sialilação alterada pode ocorrer em células malignas levando a uma progressão acelerada do câncer, incluindo repulsão célula-célula, alteração da ligação de células

cancerosas à matriz extracelular, migração aumentada, atracação ao endotélio vascular e invasão, que facilita a formação de metástases, levando a doença a ter um mau prognóstico. Além disso, o aumento da sialilação pode elevar a possibilidade de resistência das células tumorais à apoptose (SCHAUER; KAMERLING, 2018). Esforços crescentes vêm sendo feitos para ampliar abordagens eficientes no monitoramento do AS. Estudos vêm buscando entender a complexa maquinaria de glicosilação para o desenvolvimento de terapias mais efetivas para as várias doenças humanas (CHENG et al., 2013; JACOBS et al., 2001; KEPPLER et al., 2001; KOELLER; WONG, 2000; LIU et al., 2011; PANAGIOTOPOULOU et al., 2017; XU et al., 2019).

Atualmente, avanços na glicobiologia impulsionaram a progressão de novas estratégias para compreensão da sialilação, tal como no câncer. Tais estratégias podem envolver o uso de moléculas que reconhecem o AS, como o ácido fenilborônico (AFB) e a lectina WGA (*Wheat germ agglutinin*), associadas a sondas fluorescente (CHENG et al., 2013; LIU et al., 2011; MATSUNO; SUZUKI, 2008; PANAGIOTOPOULOU et al., 2017). Liu et al. (2011), por exemplo, demonstraram em seu trabalho que sondas baseadas em QDs ligadas ao ácido aminofenilborônico (AAFB) permitiram a marcação e identificação das porções de AS em células PC-12 (feocromocitoma de rato), possibilitando a análise da dinâmica de difusão do AS. Dessa maneira, esses autores descobriram que o AS sofre internalização após a ligação com a sonda fluorescente específica via endocitose e posteriormente distribuem-se na região perinuclear.

Assim sendo, estudos sobre os ASs podem também ajudar na compreensão da biologia do câncer, visto que essa estrutura abrange muitos processos metabólicos cruciais para a manutenção da doença, como também desempenha papéis significativos no reconhecimento celular e modulação da permeabilidade da membrana.

2.4.2.1 Ácido Borônico

Pesquisas anteriores constataram que o borato produz complexos estáveis com compostos que contêm grupos hidroxila em uma posição favorável para a complexação de borato (OTSUKA et al., 2003). Essa interação vem atraindo o

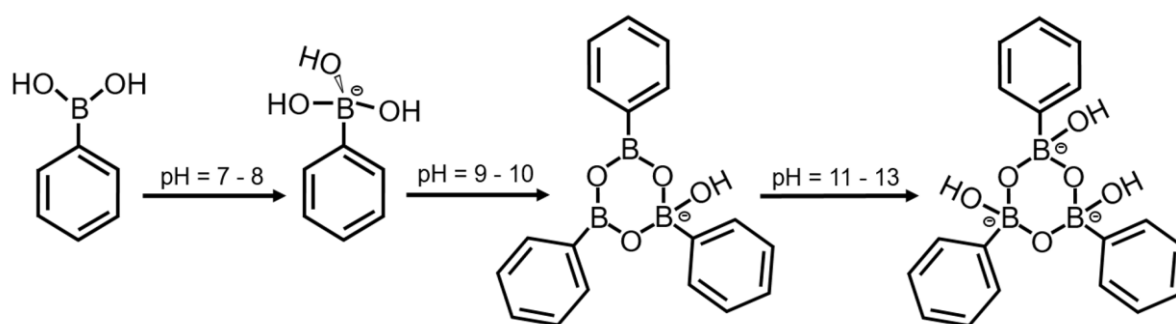
interesse dos pesquisadores, uma vez que o borato interage com os carboidratos presente nas membranas de vírus, bactérias, fungos e células (SCHAUER; KAMERLING, 2018).

O ácido fenilborônico (AFB) é uma molécula sintética e estável em meio aquoso, também conhecida como lectina mimética visto que apresentam funções semelhantes as lectinas naturais, por exemplo, a WGA. O AFB vem demonstrando ser mais favorável quando comparado as lectinas naturais por apresentar uma maior estabilidade e menor toxicidade, além de versatilidade no desenho/modulação molecular, bem como a não indução da adesão celular aos substratos (OTSUKA et al., 2003; UCHIMURA et al., 2001).

Essas lectinas miméticas apresentam afinidade e seletividade por compostos de açúcares presentes na membrana celular (HAN; DING; JU, 2011; UCHIMURA et al., 2001). É observado na literatura que o AFB apresenta complexos estáveis na sua forma dissociada com açúcares contendo estruturas 1,2- ou 1,3-diol – manose, galactose e glicose – a pHs mais altos do que seu valor de pKa 8,63. Contudo, pesquisas recentes constaram que o AS, excepcionalmente, pode formar uma ligação estável com o AFB não dissociado em pH mais baixo, idealmente próximo ao pH fisiológico (DOWLUT; HALL, 2006; HAN; DING; JU, 2011; MATSUMOTO et al., 2009; OTSUKA et al., 2003).

Além da seletividade no reconhecimento celular ser dependente do pH, Su et al. (2017) observaram que a estruturação do AFB é bastante relacionada as variações do pH do meio. A molécula de ácido borônico é hidrolisada gradualmente com a alteração do pH 7 para o valor do pKa. Ao aumentar o pH ambiente do AFB as hidroxilas (OH) começam a se alterar para um estágio trímero – três estruturas adjacentes – como observado na Figura 17. Logo, o aumento do pH ambiente (pH > 10) impossibilita a ligação do AFB aos açúcares por interações entre as moléculas, como também diminui o direcionamento nos estudos relacionados ao AS.

Figura 17 – Esquema da cinética de reação do AFB em diferentes pH.



Fonte: A autora (2019).

Por apresentar uma aplicação promissora na detecção nas glicoproteínas, vários estudos vêm usufruindo do AFB como molécula para terapia, diagnóstico, biossensor e/ou marcação celular (CAO et al., 2015; CHANG et al., 2017; CHENG et al., 2013; EGAWA et al., 2011; HAN; DING; JU, 2011; LEE et al., 2015; MATSUMOTO et al., 2009; SANKOH et al., 2016). Cao et al. (2015), por exemplo, desenvolveram uma plataforma microfluídica, baseada em QDs de CdSeTe conjugados ao ácido 3-aminofenilborônico (AAFB), para mensurar ASs ao nível de uma única célula. A plataforma foi avaliada através do reconhecimento do AS em células K562 (leucemia mielogênica crônica humana) antes e após tratamento com o fármaco AZT (azidotimidina). Os autores indicaram que a quantidade de ASs aumentou com o tratamento.

Han et al. (2011) conjugaram QDs de CdS ao AAFB para reconhecer os grupos de AS presentes na célula BGC-823 (carcinoma gástrico humano). Porém, os autores não só usaram o sinal dos QDs ligados as células, como também usaram nanopartículas de ouro estabilizadas com ácido polisiálico que se ligam aos QDs já conectados as células propiciando que mais conjugados de QDs-AAFB se ligassem ao sistema, amplificando assim o sinal. Para confirmação da marcação celular foram realizadas análises de citometria de fluxo e microscopia confocal, demonstrando ser uma estratégia interessante para estudos citobiológicos.

Assim, a versatilidade da associação dos borônicos aos QDs podem levar ao desenvolvimento de nanoplataformas funcionais, simples e versáteis capazes de abrir novos caminhos para a elucidação da complexa maquinaria de glicosilação e das funções celulares associadas aos glicanos.

3 CONCLUSÕES GERAIS

- QDs de CdTe estabilizados com AMS foram sintetizados com boa estabilidade coloidal e intensa fluorescência na regiões espectral do verde e laranja;
- Os QDs foram conjugados eficientemente ao AF na proporção 1:25. Esses conjugados apresentaram intensa fluorescência e demonstraram ser uma promissora sonda sítio-específica para o estudo da dinâmica dos RFs nas células.
- As células HeLa e T47D apresentaram maior expressão/internalização de RFs quando comparada a MDA-MB231. Enquanto, a MCF7 apresentou poucos RFs funcionais.
- A taxa de reciclagem de RFs foi baixa para a maioria das células estudadas, exceto para T47D.
- Os QDs conjugados ao AF se mostraram como potenciais ferramentas para a compreensão da biologia celular do câncer, e assim auxiliar na elucidação de mecanismos biológicos que possam também ajudar ao aprimoramento de terapias e diagnósticos via RFs.
- A estratégia de conjugação utilizada para ligar os QDs ao AMFB foi efetiva, pouco laboriosa e rápida.
- Os conjugados de QDs-(AMFB) apresentaram intensa fluorescência e demonstraram ser eficientes e específicos no reconhecimento do AS, quando eritrócitos foram utilizados como modelo, antes e após tratamento com neuraminidase e ensaios de inibição com outros carboidratos.
- Os conjugados de QDs-(AMFB) marcaram eficientemente as células KG-1 e K562, demonstrando ser também uma sonda específica eficiente para estudar o perfil de AS em células leucêmicas, principalmente considerando que há poucos estudos na literatura.
- Os resultados obtidos até o momento indicam que as células KG-1 apresentam um maior conteúdo de AS distribuídos de forma mais homogênea na membrana que as K562.
- Os conjugados de QDs-(AMFB) demonstraram então ser promissoras ferramentas para o estudo do perfil de AS em membranas celulares.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, R. et al. Assessment of red blood cell deformability in type 2 diabetes mellitus and diabetic retinopathy by dual optical tweezers stretching technique. **Scientific Reports**, v. 6, n. September 2015, p. 1–12, 2016.
- ALIVISATOS, A. P.; GU, W.; LARABELL, C. Quantum Dots as Cellular Probes. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 7, n. 1, p. 55–76, 2005.
- ANGATA, T.; VARKI, A. Chemical Diversity in the Sialic Acids and Related α -Keto Acids: An Evolutionary Perspective. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 2, p. 439–470, 2002.
- BASU, S. et al. Loss of phospholipid membrane asymmetry and sialylated glycoconjugates from erythrocyte surface in haemoglobin E β -thalassaemia. **British Journal of Haematology**, v. 141, n. 1, p. 92–99, 2008.
- BENOITON, N. L. **Chemistry of Peptide Synthesis**. 1^a Edição. Canada: CRC Press, 2006, p. 290.
- BHARALI, D. J. Folate-Receptor-Mediated Delivery of InP Quantum Dots for Bioimaging Using Confocal and Two-Photon Microscopy. **J. American Chemical Society**, v. 127, n. 32, p. 11364 - 11371, 2005.
- BLAUM, B. S.; STEHLE, T. Sialic Acids in Nonenveloped Virus Infections. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 76, p. 65–111, 2019.
- BRUCHEZ, M. et al. Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels. **Science**, v. 281, n. 5385, p. 2013–2016, 1998.
- BRUS, L. E. Electron-electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state. **The Journal of Chemical Physics**, v. 80, n. 9, p. 4403–4409, 1984.
- BULL, C. et al. Sialic Acids Sweeten a Tumor's Life. **Cancer Research**, v. 74, n. 12, p. 3199–3205, 2014.
- BWATANGLANG, I. B. et al. In vivo tumor targeting and anti-tumor effects of 5-fluororacil loaded, folic acid targeted quantum dot system. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 480, p. 146–158, 2016a.
- BWATANGLANG, I. B. et al. In vivo tumor targeting and anti-tumor effects of 5-fluororacil loaded, folic acid targeted quantum dot system. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 480, p. 146–158, 2016b.
- CABRAL FILHO, P. E. et al. Blood group antigen studies using CdTe quantum dots and flow cytometry. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 4393–4404, 2015.
- CABRAL FILHO, P. E. et al. CdTe quantum dots as fluorescent probes to study transferrin receptors in glioblastoma cells. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1860, n. 1, p. 28–35, 2016.
- CABRAL FILHO, P. E. et al. Multimodal highly fluorescent-magnetic nanoplatform to target transferrin receptors in cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1862, n. 12, p. 2788–2796, 2018.

CAO, J. T. et al. Versatile microfluidic platform for the assessment of sialic acid expression on cancer cells using quantum dots with phenylboronic acid tags. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 7, n. 27, p. 14878–14884, 2015.

CARVALHO, K. H. G. et al. Fluorescence Plate Reader for Quantum Dot-Protein Bioconjugation Analysis. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 5, p. 3320–3327, 2014.

CESAR, C. **Quantum Dots - Applications in Biology**: Introduction to Quantum Dots. 2^a Edição. Recife: Humana Press, 2014. p. 3 - 9.

CHAN, W. C. W.; NIE, S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. **Science**, v. 281, n. 5385, p. 2016–2018, 1998.

CHANG, L. et al. A highly sensitive fluorescent turn-on biosensor for glycoproteins based on boronic acid functional polymer capped Mn-doped ZnS quantum dots. **Analytica Chimica Acta**, v. 995, p. 91–98, 2017.

CHEN, C. et al. Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors. **Nature**, v. 500, n. 7463, p. 486–489, 2013.

CHENG, L. et al. Multifunctional phenylboronic acid-tagged fluorescent silica nanoparticles via thiol-ene click reaction for imaging sialic acid expressed on living cells. **Talanta**, v. 115, p. 823–829, 2013.

CLIFT, M. J. D.; STONE, V. Quantum dots: An insight and perspective of their biological interaction and how this relates to their relevance for clinical use. **Theranostics**, v. 2, n. 7, p. 668–680, 2012.

COOK, G. M. W. Glycobiology of the cell surface: Its debt to cell electrophoresis 1940-65. **Electrophoresis**, v. 37, n. 11, p. 1399–1406, 2016.

CUI, H. et al. Differential expression of the α 2,3-sialic acid residues in breast cancer is associated with metastatic potential. **Oncology Reports**, v. 25, n. 5, p. 1365–1371, 2011.

CUNHA, C. R. A. et al. Biomedical applications of glyconanoparticles based on quantum dots. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1862, n. 3, p. 427–439, 2018.

CZEIZEL, A. E.; DUDAS., I. Prevention of the First Occurrence of Neural-tube Defects by Periconceptional Vitamin Supplementation. **The New England Journal of Medicine**, v. 327, n. 9, p. 1832–1835, 1992.

DE ROBERTIS, E.; HIB, J. **Bases da biologia celular e molecular**. 4^a Edição. Buenos Aires: Guanabara Koogan, 2004, p. 394.

DIAMANDIS, E. P.; CHRISTOPOULOS, T. . The Biotin-(Strept)Avidin System: Principles and Applications in Biotechnology. **Clin. Chem.**, v. 37, n. 5, p. 625–636, 1991.

DOWLUT, M.; HALL, D. G. An Improved Class of Sugar-Binding Boronic Acids, Soluble and Capable of Complexing Glycosides in Neutral Water. **J. Am. Chem Soc.**, v. 128, p. 4226–4227, 2006.

DRIVER, B. R. et al. Folate receptor α expression level correlates with histologic grade in lung adenocarcinoma. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 140, n. 7, p. 682–685, 2016.

DU, J. et al. Study on the interaction between CdTe quantum dots and folic acid by two-photon excited fluorescence spectroscopic techniques. **Journal of Molecular Structure**, v. 1006, n. 1–3, p. 650–654, 2011.

DWEK, R. A. Glycobiology: “Towards Understanding the Function of Sugars”. **Biochemical Society Transactions**, v. 96, p. 683–720, 1996.

EGAWA, Y. et al. Electrochemical and optical sugar sensors based on phenylboronic acid and its derivatives. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, n. 7, p. 1257–1264, 2011.

EKIMOV, A. I.; EFROS, A. L.; ONUSHCHENKO, A. A. Quantum size effect in semiconductor microcrystals. **Solid state communications**, v. 56, n. 11, p. 921–924, 1985.

ESCH, V. et al. State filling, coulomb, and trapping effects in the optical nonlinearity of CdTe quantum dots in glass. **Physical Review B**, v. 42, n. 12, p. 7450–7453, 1990.

ESTEVE-TURRILLAS, F. A.; ABAD-FUENTES, A. Applications of quantum dots as probes in immunosensing of small-sized analytes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 41, n. 1, p. 12–29, 2013.

ETRYCH, T. et al. Fluorescence optical imaging in anticancer drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 226, p. 168–181, 2016.

FONTES, A. et al. **Biomedical Engineering - Technical Applications in Medicine: Quantum Dots in Biomedical Research**. 1ª Edição. Slovakia: InTechOpen, 2012. p. 269 - 290.

FOUBERT, A. et al. Bioconjugation of quantum dots: Review & impact on future application. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 83, p. 31–48, 2016.

GESZKE, M. et al. Folic acid-conjugated core/shell ZnS:Mn/ZnS quantum dots as targeted probes for two photon fluorescence imaging of cancer cells. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 3, p. 1327–1338, 2011.

GINTER, P. S. et al. Folate Receptor Alpha Expression Is Associated With Increased Risk of Recurrence in Triple-negative Breast Cancer. **Clinical Breast Cancer**, v. 17, n. 7, p. 544–549, 2017.

GOLDMAN, E. R. et al. Conjugation of luminescent quantum dots with antibodies using an engineered adaptor protein to provide new reagents for fluoroimmunoassays. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 4, p. 841–847, 2002.

HAN, E.; DING, L.; JU, H. Highly sensitive fluorescent analysis of dynamic glycan expression on living cells using glyconanoparticles and functionalized quantum dots. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 18, p. 7006–7012, 2011.

HARDMAN, R. A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. **Environmental health perspectives**, v. 114, n. 2, p. 165–72, 2006.

HERMANSON, G. T. **Bioconjugate techniques**. 3ª Edição. Estados Unidos: Academic press, 2013. p. 1200.

HUANG, Y. X. et al. Human red blood cell aging: Correlative changes in surface charge and cell properties. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 15, n. 12, p. 2634–2642, 2011.

HUANG, Y. X. et al. Restoring the youth of aged red blood cells and extending their lifespan in circulation by remodelling membrane sialic acid. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 20, n. 2, p. 294–301, 2016.

INAGAKI, Y. et al. Sialoglycoconjugate expression in primary colorectal cancer and metastatic lymph node tissues. **Hepatogastroenterology**, v. 54, n. 73, p. 53-57, 2007.

JACOBS, C. L. et al. Substrate specificity of the sialic acid biosynthetic pathway. **Biochemistry**, v. 40, n. 43, p. 12864–12874, 2001.

JIN, Z.; HILDEBRANDT, N. Semiconductor quantum dots for in vitro diagnostics and cellular imaging. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 7, p. 394–403, 2012.

KAIRDOLF, B. A. et al. Semiconductor Quantum Dots for Bioimaging and Biodiagnostic Applications. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 143–162, 2013.

KELEMEN, L. E. The role of folate receptor α in cancer development, progression and treatment: Cause, consequence or innocent bystander? **International Journal of Cancer**, v. 119, n. 2, p. 243–250, 2006.

KEPPLER, O. T. et al. Biochemical engineering of the N-acyl side chain of sialic acid: Biological implications. **Glycobiology**, v. 11, n. 2, p. 11–18, 2001.

KIEFEL, M. J.; ITZSTEIN, M. VON. Influenza Virus Sialidase - A Drug Discovery Target. **Progress in Medicinal Chemistry**, v. 36, p. 67–75, 1999.

KIEFEL, M. J.; VON ITZSTEIN, M. Recent Advances in the Synthesis of Sialic Acid Derivatives and Sialylmimetics as Biological Probes. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 2, p. 471–490, 2002.

KOELLER, K. M.; WONG, C. H. Synthesis of complex carbohydrates and glycoconjugates: enzyme-based and programmable one-pot strategies. **Chemical Reviews**, v. 100, n. 12, p. 4465–4493, 2000.

KOKTYSH, D.; BRIGHT, V.; PHAM, W. Fluorescent magnetic hybrid nanoprobe for multimodal bioimaging. **Nanotechnology**, v. 22, n. 27, 2011.

KUMAR, P. et al. Folate/N-acetyl glucosamine conjugated mesoporous silica nanoparticles for targeting breast cancer cells: A comparative study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 156, p. 203–212, 2017.

LAHIR, Y. Understanding the basic role of glycocalyx during cancer. **Journal of Radiation and Cancer Research**, v. 7, n. 3, p. 79, 2017.

LEAMON, C. P.; LOW, P. S. Delivery of macromolecules into living cells: a method that exploits folate receptor endocytosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 13, p. 5572–6, 1991.

LEAMON, C. P.; REDDY, J. A. Folate-targeted chemotherapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 8, p. 1127 - 1141, 2004.

LEE, J. Y. et al. Phenylboronic acid-decorated chondroitin sulfate A-based theranostic nanoparticles for enhanced tumor targeting and penetration. **Advanced Functional Materials**, v. 25, n. 24, p. 3705–3717, 2015.

LI, H. et al. Fabrication of folic acid-sensitive gold nanoclusters for turn-on fluorescent imaging

of overexpression of folate receptor in tumor cells. **Talanta**, v. 158, p. 118–124, 2016.

LIRA, R. B. et al. Non-specific interactions of CdTe/Cds Quantum Dots with human blood mononuclear cells. **Micron**, v. 43, n. 5, p. 621–626, 2012.

LIU, A. et al. Quantum dots with Phenylboronic acid tags for specific labeling of sialic acids on living cells. **Analytical Chemistry**, v. 83, p. 1124–1130, 2011.

MALIK, P.; GULIA, S.; KAKKAR, R. Quantum dots for diagnosis of cancers. **Advanced Materials Letters**, v. 4, n. 11, p. 811–822, 2013.

MAMMEN, M.; CHOI, S.-K.; WHITESIDES, G. M. Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors. **Angew. Chem. Int.**, v. 37, p. 2754–2794, 1998.

MANGEOLLE, T. et al. The targeting ability of fluorescent quantum dots to the folate receptor rich tumors. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 26, p. 150 - 156, 2019.

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

MARU, I. et al. Molecular cloning and identification of N-acyl-D-glucosamine 2-epimerase from porcine kidney as a renin-binding protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 27, p. 16294–16299, 1996.

MATSUMOTO, A. et al. Noninvasive sialic acid detection at cell membrane by using phenylboronic acid modified self-assembled monolayer gold electrode. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 34, p. 12022–12023, 2009.

MATSUMOTO, A.; MIYAHARA, Y. 'Borono-lectin' based engineering as a versatile platform for biomedical applications. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 19, n. 1, p. 18–30, 2018.

MATSUNO, K.; SUZUKI, S. Simple fluorimetric method for quantification of sialic acids in glycoproteins. **Analytical Biochemistry**, v. 375, n. 1, p. 53–59, 2008.

MICHALET, X.; BENTOLILA, L. A.; WEISS, S. Molecular Imaging: Physics and Bioapplications of Quantum Dots. **Advances in Medical Physics**, p. 111–127, 2008.

MIOTTI, S. et al. Simultaneous activity of two different mechanisms of folate transport in ovarian carcinoma cell lines. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 65, n. 4, p. 479–491, 1997.

MOROSINI, V. et al. Quantum dot-folic acid conjugates as potential photosensitizers in photodynamic therapy of cancer. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 10, n. 5, p. 842–851, 2011.

NAITO-MATSUI, Y. et al. Physiological exploration of the long term evolutionary selection against expression of N-Glycolylneuraminic Acid in the Brain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 7, p. 2557–2570, 2017.

NEL, A. et al. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. **Science**, v. 311, n. 5761, p. 622–627, 2006.

NGUYEN, V. DU et al. Folate receptor-targeted liposomal nanocomplex for effective synergistic photothermal-chemotherapy of breast cancer in vivo. **Colloids and Surfaces B:**

Biointerfaces, v. 173, n. September 2018, p. 539–548, 2019.

OTSUKA, H. et al. Anomalous Binding Profile of Phenylboronic Acid with N -Acetylneuraminic Acid (Neu5Ac) in Aqueous Solution with Varying pH. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 12, p. 3493–3502, 2003.

PANAGIOTOPOULOU, M. et al. Fluorescent molecularly imprinted polymers as plastic antibodies for selective labeling and imaging of hyaluronan and sialic acid on fixed and living cells. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 88, p. 85–93, 2017.

PASSOS, S. G. B. et al. One-pot electrochemical synthesis of CdTe quantum dots in cavity cell. **Electrochimica Acta**, v. 190, p. 689–694, 2016.

PEREIRA, G. et al. (Bio)conjugation Strategies Applied to Fluorescent Semiconductor Quantum Dots, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2019.

PEREIRA, M. I. A. et al. Hydrophilic Quantum Dots Functionalized with Gd(III)-DO3A Monoamide Chelates as Bright and Effective T₁-weighted Bimodal Nanoprobes. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.

POTAPENKO, I. O. et al. Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. **Molecular Oncology**, v. 4, n. 2, p. 98–118, 2010.

QI, Z. DE et al. Biocompatible CdSe quantum dot-based photosensitizer under two-photon excitation for photodynamic therapy. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 8, p. 2455–2458, 2011.

QIAO, J. et al. Folic acid-conjugated fluorescent polymer for up-regulation folate receptor expression study via targeted imaging of tumor cells. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 78, p. 147–153, 2016.

REED, M. A. et al. Observation of Discrete Electronic States in a Zero-Dimensional Semiconductor Nanostructure. **Physical Review Letters**, v. 60, n. 6, p. 535–537, 1988.

RESHMA, V. G.; MOHANAN, P. V. Quantum dots: Applications and safety consequences. **Journal of Luminescence**, v. 205, n. September 2018, p. 287–298, 2019.

ROGACH, A. L. et al. Aqueous synthesis of thiol-capped CdTe nanocrystals: State-of-the-art. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 40, p. 14628–14637, 2007.

ROSS, J. F.; CHAUDHURI, P. K.; RATNAM, M. Differential Regulation of Folate Receptor Isoforms in Normal and Malignant Tissues In Vivo and in Established. **Cancer**, v. 73, n. 9, p. 2432–2443, 1994.

SAMIA, A. C. S.; DAYAL, S.; BURDA, C. Quantum Dot-based Energy Transfer: Perspectives and Potential for Applications in Photodynamic Therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, n. 3, p. 617, 2006.

SANKOH, S. et al. 4-Mercaptophenylboronic Acid Functionalized Gold Nanoparticles for Colorimetric Sialic Acid Detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 85, p. 743–750, 2016.

SANTOS, B. S.; FARIAS, P. M. A; FONTES, A. **Handbook of Self Assembled Semiconductor Nanostructures Novel Devices in Photonics and Electronic: Semiconductor quantum dots for biological applications**. 1^a Edição. United Kingdom: Elsevier,

2008. p. 796-798.

SAPSFORD, K. E. et al. Biosensing with luminescent semiconductor quantum dots. **Sensors**, v. 6, n. 8, p. 925–953, 2006.

SCHAUER, R.; KAMERLING, J. P. **Exploration of the Sialic Acid World**. 1ª Edição. Germany: Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, 2018. p. 213.

SCHIPPER, M. L. et al. microPET-based biodistribution of quantum dots in living mice. **J. Nucl. Med.**, v. 48, n. 9, p. 1511 - 1518, 2007.

SEARS, P.; WONG, C.-H. Carbohydrate Mimetics: A New Strategy for Tackling the Problem of Carbohydrate-Mediated Biological Recognition. **ChemInform**, v. 38, p. 2300–2324, 1999.

SHAO, L. et al. Studies on interaction of CdTe quantum dots with bovine serum albumin using fluorescence correlation spectroscopy. **Journal of Fluorescence**, v. 19, n. 1, p. 151–157, 2009.

SILVA, F. O. et al. O estado da arte da síntese de semicondutores nanocristalinos coloidais. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1933–1939, 2010.

SINGH, G. et al. Cancer Cell Targeting Using Folic Acid/Anti-HER2 Antibody Conjugated Fluorescent CdSe/CdS/ZnS-MPA and CdTe-MSA Quantum Dots. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 12, p. 9382–9395, 2015.

SMITH, A. M.; GAO, X.; NIE, S. Quantum Dot Nanocrystals for In Vivo Molecular and Cellular Imaging. **Photochemistry and Photobiology**, v. 80, n. 3, p. 377, 2004.

SMITH, R. A.; GIORGIO, T. D. Quantitative measurement of multifunctional quantum dot binding to cellular targets using flow cytometry. **Cytometry Part A**, v. 75, n. 5, p. 465–474, 2009.

SNEDDON, J. et al. Prevention of neural tube defects: Results of the Medical Research Council Vitamin Study. **The Lancet**, v. 338, n. 8760, p. 131–137, jul. 1991.

SOE, Z. C. et al. Folate receptor-mediated celastrol and irinotecan combination delivery using liposomes for effective chemotherapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 170, n. April, p. 718–728, 2018.

SONG, E. Q. et al. Tumor cell targeting using folate-conjugated fluorescent quantum dots and receptor-mediated endocytosis. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 5, p. 955–963, 2009.

SOUZA, S. O. Lipossomas fusogênicos para entrega intracelular de pontos quânticos catiônicos hidrofílicos. Trabalho de conclusão de curso - Universidade Federal de Pernambuco. CB. Bacharelado em Biomedicina, Recife, 2018.

STRATTON, F. et al. The Role of Zeta Potential in Rh Agglutination. **Vox Sanguinis**, v. 24, n. 3, p. 273–279, 1973.

SU, H. et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy study on the structure changes of 4-Mercaptophenylboronic Acid under different pH conditions. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 185, p. 336 - 342, 2017.

SUKHANOVA, A.; NABIEV, I. Fluorescent nanocrystal quantum. **Expert Opin. Med. Diagn**, v. 2, n. 4, p. 429–448, 2008.

SURIAMOORTHY, P. Folic acid-CdTe quantum dot conjugates and their applications for cancer cell targeting. **Cancer Nanotechnology**, v. 1, n. 1-6, p. 19 - 28, 2010.

THOMAZ, A. A. **Quantum Dots - Applications in Biology**: Measuring the Hydrodynamic Radius of Quantum Dots by Fluorescence Correlation Spectroscopy. 2ª Edição. Recife: Humana Press, 2014. p. 85 - 91.

THOMAZ, A. A. et al. Measurement of the hydrodynamic radius of quantum dots by fluorescence correlation spectroscopy excluding blinking. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 119, n. 11, p. 4294–4299, 2015.

UCHIMURA, E. et al. Totally synthetic polymer with lectin-like function: Induction of killer cells by the copolymer of 3-acrylamidophenylboronic acid with N,N-dimethylacrylamide. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, n. 3, p. 307–314, 2001.

VARKE, A. Radioactive tracer techniques in the sequencing of glycoprotein oligosaccharides. **FASEB J**, v. 5, n. 2, p. 226–235, 1991.

VARKE, A. Sialic acids in human health and disease. **Trends Mol Med.**, v. 14, n. 8, p. 351–360, 2008.

VERGOTE, I. B.; MARTH, C.; COLEMAN, R. L. Role of the folate receptor in ovarian cancer treatment: evidence, mechanism, and clinical implications. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 34, n. 1, p. 41–52, 2015.

VIANA, O. S. et al. Comparative study on the efficiency of the photodynamic inactivation of candida albicans Using CdTe Quantum Dots, Zn(II) Porphyrin and Their Conjugates as Photosensitizers. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8893–8912, 2015.

VIMALA, K. et al. Synergistic effect of chemo-photothermal for breast cancer therapy using folic acid (FA) modified zinc oxide nanosheet. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 488, p. 92–108, 2017.

WAGNER, A. M. et al. Quantum Dots in Biomedical Applications. **Acta Biomaterialia**, n. May, 2019.

WALTERS, C. L. et al. Folate and folate receptor alpha antagonists mechanism of action in ovarian cancer. **Gynecologic oncology**, v. 131, n. 2, p. 493–8, 2013.

WANG, F. L. et al. High expression of α 2, 3-linked sialic acid residues is associated with the metastatic potential of human gastric cancer. **Cancer Epidemiology**, v. 32, n. 5–6, p. 437–443, 2009.

WANG, J. et al. Studies on bioconjugation of quantum dots using capillary electrophoresis and fluorescence correlation spectroscopy. **Electrophoresis**, v. 33, n. 13, p. 1987-1995, 2012.

WANG, S.; LOW, P. S. Folate-mediated targeting of antineoplastic drugs, imaging agents, and nucleic acids to cancer cells. **Journal of controlled release**, v. 53, p. 39–48, 1998.

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

WILSON, J.; ITZSTEIN, M. Recent Strategies in the Search for New Anti-Influenza Therapies. **Current Drug Targets**, v. 4, n. 5, p. 389–408, 2003.

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

XIAO, F. et al. Facile synthesis of Silicon quantum dot-Gadolinium: A potential fluorescent/T1-T2 multimodal imaging agent. **Talanta**, v. 199, p. 336 - 346, 2019.

XU, L. et al. Folate-mediated chemotherapy and diagnostics: An updated review and outlook. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 73–82, 2017.

XU, S. et al. One-step fabrication of boronic-acid-functionalized carbon dots for the detection of sialic acid. **Talanta**, v. 197, p. 548–552, 2019.

YEDGAR, S.; KOSHKARYEV, A.; BARSHTAIN, G. The red blood cell in vascular occlusion. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, v. 32, n. 5–6, p. 263–268, 2002.

YU, D. S.; YAN, H. Y.; WU, C. L. Folate receptor expression in bladder cancer and its correlation with tumor behaviors and clinical outcome. **Journal of Cancer Research and Practice**, v. 4, n. 4, p. 130–133, 2017.

**APÊNDICE A – ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA “JOURNAL OF
PHOTOCHEMISTRY & PHOTOBIOLOGY, B: BIOLOGY”**

**Evaluating Internalization and Recycling of Folate Receptors in Breast Cancer
Cells Using Quantum Dots**

Camila A. P. Monteiro¹, Aline D. P. R. Oliveira¹, Ryan C. Silva¹, Rennan. R. M. Lima¹,
Fabricio O. Souto², Mariana O. Baratti³, Hernandes F. Carvalho³, Beate S. Santos⁴,
Paulo E. Cabral Filho^{1,*}, Adriana Fontes^{1,*}

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

²Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco,
Recife – PE, Brazil.

³Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular,
Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, Brazil.

⁴Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco,
Recife – PE, Brazil.

*Corresponding authors: Adriana Fontes and Paulo E. Cabral Filho, Av. Prof. Moraes
Rego, S/N. Departamento de Biofísica e Radiobiologia, CB, UFPE, 50670-901, Recife,
PE, Brazil - Phone: +55 81 21267818, e-mails: adriana.fontes.biofisica@gmail.com and
pauloeuzebio03@hotmail.com.

APÊNDICE B – MANUSCRITO A SER SUBMETIDO À REVISTA “TALANTA”

Quantum Dots Functionalized with 3-Mercaptophenylboronic Acids as Novel Nanoplatfoms to Evaluate Sialic Acid Content on Cell Membranes

Camila A. P. Monteiro¹, Ryan C. Silva¹, Lara G. Assis¹, Goreti Pereira², Giovannia A. L. Pereira², Beate S. Santos³, Paulo E. Cabral Filho^{1,*,#}, Adriana Fontes^{1,*,#}

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

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

⁴Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, Brasil.

[#] Adriana Fontes and Paulo E. Cabral Filho jointly supervised this work.

*Corresponding authors: Adriana Fontes and Paulo E. Cabral Filho, Av. Prof. Moraes Rego, S/N. Departamento de Biofísica e Radiobiologia, CB, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil – Phone: +55 81 21267818, e-mails: adriana.fontes.biofisica@gmail.com and pauloeuzebio03@hotmail.com.

APÊNDICE C – ARTIGO PUBLICADO NA “JOURNAL OF BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY”



<http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20190163>

J. Braz. Chem. Soc., Vol. 00, No. 00, 1-25, 2019

Printed in Brazil - ©2019 Sociedade Brasileira de Química

Review

(Bio)conjugation Strategies Applied to Fluorescent Semiconductor Quantum Dots

Goreti Pereira,^{a,b} Camila A. P. Monteiro,^{a,c} Gabriela M. Albuquerque,^{a,b}
Maria I. A. Pereira,^{a,c} Mariana P. Cabrera,^{a,b} Paulo E. Cabral Filho,^{a,c}
Giovannia A. L. Pereira,^{a,b} Adriana Fontes^{a,c} and Beate S. Santos^{a,d}

^aGrupo de Pesquisa em Nanotecnologia Biomédica (NanoBio),
Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brazil

^bDepartamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco,
50740-540 Recife-PE, Brazil

^cDepartamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco,
50670-901 Recife-PE, Brazil

^dDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco,
50740-560 Recife-PE, Brazil

Quantum dots (QDs) are semiconductor nanocrystals, which present unique photophysical properties, enabling their application as new fluorescent platforms for biomedical sciences. Colloidal QDs are end-capped with organic or inorganic compounds, not only to prevent their agglomeration but also to provide reaction sites for the attachment of targeting (bio)molecules, nanoparticles or other interfaces, for specific biological purposes. The (bio)conjugation can involve non-covalent or covalent interactions, which can be accomplished through different strategies. The final assembly needs to maintain its chemical and optical stability and biochemical functionality. Although a relative good comprehension of the experimental procedures has been established, the bioconjugation process is still a challenge. The present manuscript aims to review the main (bio)conjugation strategies successfully applied to QDs, describing the steps necessary to prepare stable targeting fluorescent nanoplateforms, as well as some usual methods used to evaluate and optimize this process.

Keywords: nanocrystals, fluorescence, cross-linkers, conjugation strategies

1. Introduction

Nanotechnology is a field that has been attracting the interest of many research groups and, nanomaterials have become key elements for science and technology, especially due to their physicochemical properties that can be controlled according to their size and/or shape. A class of emerging nanomaterials is the quantum dots (QDs), fluorescent semiconductor nanocrystals with diameters from about 2 to 10 nm. These nanostructures have proved to be a powerful tool to develop electroluminescent devices, optical switching systems, photovoltaic cells, and more recently biomedical nanoprobe.^{1,2} The “discovery” of QDs was ascribed to Alexei Ekimov, a Russian physicist that synthesized, for the first time (in 1981),

CuCl₂ semiconductor microcrystals in a glass matrix.³ Another important Russian researcher was Alexander Efros, who established the first theoretical principles for QDs, i.e., he explained the optical behavior of this special class of semiconductors by electron confinement. These findings lead Ekimov and Efros,⁴ in 1985, to study quantum size effects in semiconductors. The authors observed an appreciable variation in the QDs wavelength emission to low values when their size was decreased. Concurrently and motivated by these discoveries, the American chemist Louis Brus synthesized the first colloidal suspensions of CdS QDs.⁵ Nevertheless, when QDs were first studied, researchers did not expect that this class of nanomaterials would be one day useful for biological applications. However, in 1998, two independent studies presenting the use of QDs for biological purposes were published.^{6,7}

*e-mail: beate.saegesser@gmail.com