



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



RENNAN RIBEIRO MANO DE LIMA

**NANOPLATAFORMAS ÓPTICO-MAGNÉTICAS MULTIMODAIS
PARA INTERAÇÃO COM RECEPTORES DE TRANSFERRINA**

Recife
2022

RENNAN RIBEIRO MANO DE LIMA

**NANOPLATAFORMAS ÓPTICO-MAGNÉTICAS MULTIMODAIS
PARA INTERAÇÃO COM RECEPTORES DE TRANSFERRINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia e Bioinformática.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Fontes

Co-orientadoras: Profa. Dra. Giovannia A. L. Pereira e Dra. Maria I. A. Pereira.

Recife

2022

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

Lima, Rennan Ribeiro Mano de
Nanoplatasformas óptico-magnéticas multimodais para interação com receptores de transferrina / Rennan Ribeiro Mano de Lima. - 2022.

71 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Fontes.

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

Coorientadora: Profa. Dra. Maria I. A. Pereira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2022.

Inclui referências e anexos.

1. Câncer. 2. Biotecnologia. 3. Nanotecnologia. I. Fontes, Adriana (orientadora). II. Pereira, Giovannia A. L. (coorientadora). III. Pereira, Maria I. A. (coorientadora). IV. Título.

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2022-073

RENNAN RIBEIRO MANO DE LIMA

**NANOPLATAFORMAS ÓPTICO-MAGNÉTICAS MULTIMODAIS
PARA INTERAÇÃO COM RECEPTORES DE TRANSFERRINA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Pernambuco, como
requisito parcial para obtenção do
título de mestre em Ciências
Biológicas.

Aprovada em: 27/01/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Adriana Fontes (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Wesley Felix de Oliveira (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Carinna Nunes de Lima (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Walther e Otácia, por todo amor, paciência, incentivo e, principalmente, pela educação, os quais me fortaleceram não apenas como profissional, mas como ser humano. Vocês são minha inspiração!

À minha família, em especial aos meus irmãos (Zé, Larinha e Victor) e aos meus padrinhos (Glória e Paulo), por estarem presentes e me apoiarem em cada etapa. Sem dúvidas, vocês foram muito importantes para que eu seguisse firme.

À Ky, minha namorada, pelo companheirismo, amor e atenção incondicionais desde o início dessa jornada.

À Universidade Federal de Pernambuco, minha segunda casa, pelos auxílios e aprendizados únicos adquiridos ao longo da graduação e do mestrado. Em especial, sou grato aos professores, não só pelo conteúdo transmitido, mas também pela humanização.

Aos amigos do NanoBio e do LBQ, pela ajuda rotineira no trabalho experimental, compartilhando conhecimentos e fazendo companhia ao longo de toda a caminhada. Não apenas isso, mas também por tornar o trabalho na pesquisa mais divertido e prazeroso.

À minha orientadora, Adriana Fontes, e às coorientadoras, Isabela Andrade e Giovannia Pereira, por terem aceitado o desafio de auxiliar a realização desse projeto tão complexo. Também sou grato à Paulo Euzébio, por ser fundamental na condução do projeto. A todos eles, agradeço bastante a disponibilidade, a dedicação em ajudar a qualquer momento e a paciência.

Enfim, sou grato a Deus por todos os objetivos alcançados e também a todas as pessoas que ajudaram direta ou indiretamente, tornando possível concluir esta etapa importante.

RESUMO

Os pontos quânticos (PQs) são nanocristais fluorescentes de semicondutores com propriedades ópticas singulares. Os quelatos de gadolínio [Gd(III)] são utilizados como agentes de contraste (ACs) na técnica de imagem por ressonância nuclear magnética (IRM). Combinando-se PQs a quelatos de Gd(III) é possível aliar a especificidade e a sensibilidade dos métodos baseados em fluorescência e proporcionar um sinal paramagnético otimizado para IRM. Assim, o objetivo dessa dissertação foi desenvolver uma nanoplataforma multimodal formada por PQs de CdTe carboxilados, quelatos do tipo DOTA-Gd(III) e a transferrina (Tf), uma vez que receptores de transferrina (RTfs) podem estar superexpressos em células de câncer, sendo alvos interessantes para diferentes estudos sobre a biologia do câncer. Para tanto, os grupos carboxílicos dos PQs foram ativados por agentes de acoplamento para favorecer a conjugação com os ACs de forma covalente, via etilenodiamina. Então, conjugou-se covalentemente o nanossistema obtido com a Tf, utilizando também agentes de acoplamento para propiciar a interação dos grupos carboxílicos dos PQs com aminas da proteína. As nanossondas foram caracterizadas por relaxometria e espectroscopias de absorção e de emissão. A conjugação com a Tf foi analisada por ensaio fluorescente em microplaca (EFM). Para avaliar a efetividade do nanossistema multimodal e sua especificidade por RTfs, ensaios de marcação fluorescente com células HeLa foram também realizados. A nanossonda multimodal exibiu um tempo de relaxação longitudinal (T_1) ca. $4,5\times$ menor que o da água e uma relaxividade longitudinal (r_1) maior que a do quelato molecular: ca. $2\times$ [por Gd(III)] e $50\times$ [por PQ] (a 37 °C e 60 MHz) e manteve a fluorescência. Observou-se uma efetiva conjugação com a Tf, obtendo-se um sinal de fluorescência relativa de ca. 1.130% pelo EFM. Na citometria de fluxo observou-se uma marcação de ca. 88% das células HeLa, reduzida para ca. 39% após saturação prévia dos RTfs com Tf, sugerindo especificidade para o nanossistema. Uma captação celular eficiente com padrão vesicular foi observada pela microscopia de fluorescência. Portanto, a nanoplataforma multimodal óptica-magnética desenvolvida apresentou potencial para ser aplicada em estudos biológicos associados ao câncer tendo como alvos os RTfs.

Palavras-chaves: Células de Câncer; Fluorescência; Quelatos de Gd(III); Pontos Quânticos.

ABSTRACT

Quantum dots (QDs) are fluorescent semiconductor nanocrystals with unique optical properties. Gadolinium [Gd(III)] chelates have been used as contrast agents (CAs) in the technique of nuclear magnetic resonance imaging (MRI). Combining QDs with Gd(III) chelates, it is possible to join the specificity and sensitivity of fluorescence-based methods and provide a more effective paramagnetic signal for MRI. Thus, the objective of this dissertation was to develop a multimodal nanoplatform formed by carboxyl-coated CdTe QDs, DOTA-Gd(III) chelates, and transferrin (Tf), since transferrin receptors (TfRs) can be overexpressed in cancer cells, becoming then interesting targets for studies on the cancer biology. For this purpose, the carboxylic groups of QDs were activated by coupling agents to favor a covalent conjugation with CAs, via ethylenediamine. Thus, the nanosystem obtained was covalently conjugated to Tf, also applying coupling agents to provide the interaction of the carboxyl groups of QDs with amines of Tf. The nanoprobees were characterized by relaxometry and absorption and emission spectroscopies. The conjugation to Tf was analyzed by fluorescent microplate assay (FMA). To assess the effectiveness of the multimodal nanosystem and its specificity for TfRs, fluorescent labeling assays with HeLa cells were also performed. The multimodal nanoprobe exhibited a longitudinal relaxation time (T_1) ca. $4.5\times$ smaller than that of water and a longitudinal relaxivity (r_1) greater than that of the molecular chelate: ca. $2\times$ [per Gd(III)] and $50\times$ [per QD] (at 37 °C and 60 MHz) and maintained the fluorescence. An effective conjugation with Tf was observed, obtaining a relative fluorescence signal of ca. 1130% by FMA. The flow cytometry assay showed a labeling of ca. 88% of HeLa cells, reduced to ca. 39% after previous saturation of TfRs with Tf, suggesting specificity for the nanosystem. An efficient cell uptake, with a vesicular pattern, was observed by fluorescence microscopy. Therefore, the developed optical-magnetic multimodal nanoplatform showed potential to be applied in biological studies associated with cancer *via* TfRs.

Keywords: Cancer Cells; Fluorescence; Gd(III) Chelates; Quantum Dots.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DO REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 –	Pontos quânticos com a mesma composição química emitindo fluorescência em diferentes comprimentos de onda, sintonizável com o tamanho.	17
Figura 2 –	Esquema representativo do processo de fotoluminescência de semicondutores. À medida que o elétron (e^-) é excitado, ele migra para a banda de condução (BC), dando origem a um <i>éxciton</i> . Quando ocorre relaxação e consequentemente a recombinação excitônica, a emissão de fluorescência é gerada. Onde: h^+ representa o buraco formado na banda de valência (BV), pela excitação do elétron.	17
Figura 3 –	Ao ser adotado um regime de confinamento quântico tridimensional, a redução do tamanho das partículas de semicondutores resulta no surgimento de níveis discretos de energia e aumento da E_g com a redução do tamanho das nanopartículas, e é nessa configuração que temos os pontos quânticos.	18
Figura 4 –	Resistência à fotodegradação dos pontos quânticos (PQs) ao longo do tempo. Em vermelho, citoesqueleto marcados por PQs (630 nm) permaneceram fluorescentes ao longo da análise. Já em verde, o núcleo marcado pelo corante orgânico (Alexa Fluor, 488 nm) tornou-se indetectável a partir de 120 s, devido à fotodegradação do corante. Barra de escala 10 μ m.	19
Figura 5 –	A camada de passivação nos pontos quânticos (PQs) compostos por núcleo/casca, ou <i>core/shell</i> , otimiza a emissão de fluorescência, com um estreitamento da largura do espectro (FWHM). Quando a camada está ausente, os elétrons podem ocupar tais “armadilhas”, favorecendo outros decaimentos radioativos não excitônicos, interferindo, assim, na qualidade da fluorescência (intensidade e largura espectral). Na parte inferior de imagem encontram-se os espectros de emissão (linha preta contínua) e absorção (linha cinza pontilhada) típicos de cada situação.	20
Figura 6 –	Esquema nanoestrutural de um ponto quântico, ilustrando núcleo, camada de passivação e de agentes estabilizantes/funcionalizantes.	21
Figura 7 –	Esquema representativo de PQs carboxilados ativados por EDC e Sulfo-NHS para interação com componentes aminados.	23
Figura 8 –	Esquema representativo do ensaio fluorescente em microplaca (EFM). Os controles, só pontos quânticos (PQs) e só biomoléculas, vão apresentar baixa fluorescência, enquanto que os conjugados, quando preparados de forma efetiva, vão apresentar sinal fluorescente significativo, confirmando a bioconjugação.	24
Figura 9 –	Representação esquemática da orientação energética dos spins nucleares. Na esquerda, os <i>spins</i> estão orientados de forma aleatória na ausência de um campo magnético externo ($B_0 = 0$). Já na direita, os <i>spins</i> estão orientados de forma paralela e antiparalela na presença do campo ($B_0 > 0$).	27

Figura 10 –	Exemplos de imagens ponderadas nos tempos de relaxação longitudinal (T_1 – mais claras) e transversal (T_2 – mais escuras).	28
Figura 11 –	Esquema representativo do perfil observado da solução de xilenol. Em A: variação da cor em decorrência da adição de íons Gd(III). Em B: Espectros característicos da solução de xilenol (em vermelho) e o perfil espectral da solução de xilenol na presença de íons Gd(III) (em preto).	29
Figura 12 –	Representação de moléculas de água realizando uma interação com a esfera interna (centro do íon paramagnético) de quelato de Gd(III) em solução e os tempos de residência da água coordenada ao íon metálico central (τ_M), o tempo de rotação do complexo (τ_R) e o tempo de difusão da água nas regiões circundantes ao íon (τ_D).	30
Figura 13 –	Ilustração esquemática da superfície ativa de PQs carboxilados passíveis para interagir, após ativação com agentes de acoplamento, e concentrar vários quelatos de DOTA-Gd(III) modificados para conter grupos amina, através da conjugação direta. O resultado é a formação de nanossistemas óptico-magnéticos de PQs-DOTA-Gd(III).	31
Figura 14 –	Esquema representativo do nanossistema óptico-magnético desenvolvido pelos autores. Em A: espectro de emissão dos PQs, linha contínua em vermelho, e PQs-quelatos de Gd(III), linha contínua em roxo ($\lambda_{exc} = 400 \text{ nm}$). Em B: Imagens do nanossistema ponderadas em T_1 (3 T), trazendo o aumento do contraste brilhante, de cinza a branco, à medida que a concentração do nanossistema aumenta. Em C: esquema da preparação, na qual foi utilizado o ligante linear DTPA complexado com Gd(III) para conjugar na superfície do PQ.	33
Figura 15 –	Em A: Imagem de microscopia de fluorescência confocal de células HeLa marcadas pelos nanossistemas PQs-DO3A-Gd(III) (em vermelho). Os núcleos estão marcados pelo Hoechst (em azul). Barra de escala: 20 μm . Em B: IRM do controle (em preto) e do nanossistema 1/30 PQs:quelatos de Gd(III) (em cinza). Em C: Espectros de emissão dos PQs (em preto) e dos sistemas preparados com as proporções 1/20 e 1/30 PQs:quelatos de Gd(III) (em vermelho e em azul, respectivamente).	35
Figura 16 –	Captação do ferro pelas células de organismos vertebrados. Em detalhe, observa-se a ligação da holo-transferrina (Holo-Tf) ao receptor de transferrina (RTf), sendo esse endocitado na forma de endossomo. Em seguida, o Fe(III) sofre redução a Fe(II) e é enviado do endossomo ao citoplasma por meio do transportador de metais bivalentes (DMT1). Finalmente, a apo-transferrina (Apo-Tf) retorna à membrana celular e, ao se ligarem novamente aos íons Fe(III), reiniciam um novo ciclo.	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PQs	Pontos quânticos
ACs	Agentes de contraste
IRM	Imagem por ressonância magnética
T_1	Tempo de relaxação longitudinal
T_2	Tempo de relaxação transversal
Gd(III)	Íons gadolínio
Tf	Transferrina
RTfs	Receptores de transferrina
Fe(III)	Íons ferro III
Fe(II)	Íons ferro II
CdTe	Telureto de cádmio
DOTA	<i>tetraazacyclododecanetetraacetic acid</i>
BV	Banda de valência
BC	Banda de condução
e^-	Elétrons
E_g	<i>Bandgap</i>
h^+	<i>Buraco/hole</i>
FWHM	Largura à meia altura
a_{exc}	Raio de Bohr do éxciton
CdSe	Seleneto de cádmio
CISTM	Cisteamina
AMS	Ácido mercaptossuccínico
EDC	1-etil-3-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide)
Sulfo-NHS	N-hydroxysulfosuccinimide
NHS	N-hydroxysuccinimide
Sulfo-SMCC	Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate
FTIR	<i>Fourier-Transform Infrared Spectroscopy</i>
FCS	<i>Fluorescence Correlation Spectroscopy</i>
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
EFM	Ensaio fluorescente em microplaca

k_B	Constante de Boltzmann
τ_{DIF}	Tempo de difusão
η	Viscosidade
ω_x	Raio lateral do volume focal
RMN	Ressonância magnética nuclear
B_0	Campo magnético
M_0	Magnetização
B_1	Campo oscilante
xy	Plano transversal
DTPA	<i>diethylenetriamine pentaacetic acid</i>
r_1	Relaxividade longitudinal
r_2	Relaxividade transversal
$R_{1,2}^{obs}$	Taxa de relaxação longitudinal e transversal observada na presença de íons (para)magnéticos
$R_{1,2}^{diam}$	Taxa de relaxação longitudinal e transversal diamagnética
$1/\tau_M$	Taxa de troca das moléculas de água coordenadas ao íon central com aquelas presentes no meio
τ_D	Tempo de difusão das moléculas de águas nas proximidades do complexo que contém o íon (para)magnético
τ_R	Tempo de rotação do complexo (para)magnético
DPAA	<i>1,4,7-triazacyclononane-1,4-dibis(methylene)dipicolinic acid</i>
Ag ₂ Se	Seleneto de prata
MDA-MB-231	Adenocarcinoma mamário humano
PBS	Tampão fosfato-salino
Holo-Tf	Holo-transferrina
Apo-Tf	Apo-transferrina
DMT1	Transportador de metais bivalentes
U87	Glioblastoma humano recorrente
DBTRG-05MG	<i>Denver Brain Research Group 05</i>
InP/ZnS	Fosfeto de índio passivado com sulfeto de zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1 PONTOS QUÂNTICOS	16
3.1.1 <i>Fundamentação teórica</i>	16
3.1.2 <i>Conjugação</i>	21
3.2 AGENTES DE CONTRASTE EM IRM	26
3.3 NANOSSISTEMA ÓPTICO-MAGNÉTICO BASEADO EM PONTOS QUÂNTICOS E QUELATOS DE Gd(III)	30
3.4 TRANSFERRINA	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 MANUSCRITO	39
5 CONCLUSÕES	63
6 SÚMULA CURRICULAR	64
REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

As técnicas baseadas em fluorescência têm desempenhado um papel primordial na compreensão dos mais diversos mecanismos biológicos, devido a sua sensibilidade e também especificidade bioquímica. Para tanto, faz-se necessário o uso de marcadores fluorescentes, preferencialmente associados a moléculas que possuem afinidades por um alvo biológico, pois assim se pode usufruir de todo potencial das técnicas fluorescentes (MARTYNENKO et al., 2017; SAHL; HELL; JAKOBS, 2017).

Nesse contexto, os pontos quânticos (PQs), que são nanocristais de semicondutores, têm apresentado um grande destaque como marcadores fluorescentes por possuírem propriedades ópticas singulares, tais como: (i) excelente resistência à fotodegradação, o que permite análises por tempos prolongados; (ii) espectro de emissão estreito, o que possibilita múltiplas marcações simultâneas em diferentes comprimentos de onda; (iii) fluorescência sintonizável com o tamanho, ou seja, PQs de mesma composição química podem emitir fluorescência em diferentes regiões do espectro eletromagnético e (iv) superfície quimicamente ativa para conjugações com moléculas, outras nanopartículas ou até mesmo superfícies de eletrodos (PEREIRA et al., 2019a; RESHMA; MOHANAN, 2019).

Os PQs têm sido cada vez mais aplicados em estudos biológicos, envolvendo desde aquisição de imagens *in vitro* de células e tecidos para estudo do câncer, bem como estudos *in vivo* e em biossensoriamento de diferentes doenças (MARTYNENKO et al., 2017; MATEA et al., 2017). Mais recentemente, têm também surgido o interesse de associar os PQs com compostos que possuem propriedades magnéticas, gerando assim nanossistemas bimodais óptico-magnéticos (CABRERA et al., 2017; PEREIRA et al., 2019). Dentre os compostos magnéticos que vêm sendo mais explorados nessa perspectiva, destacam-se os quelatos contendo o íon paramagnético Gd(III), os quais já são agentes de contraste (ACs) aplicados clinicamente na técnica de imagem por ressonância magnética (IRM) (VERWILST et al., 2015; YAN; SUN; SHEN, 2017).

A IRM se baseia nos princípios da ressonância magnética nuclear (RMN) e a obtenção das imagens é baseada na resolução espacial de sinais adquiridos a partir do monitoramento dos tempos de relaxação longitudinal (T_1) e transversal (T_2) dos spins nucleares dos núcleos de ^1H das moléculas de água presentes nos tecidos biológicos. Através de variações encontradas nesses tempos de relaxação nos

diferentes tecidos é possível observar e diferenciar estruturas biológicas. A função primordial dos ACs na IRM é otimizar as diferenças observadas entre estruturas saudáveis e patológicas, o que é proporcionado a partir da sua atuação na diminuição de T_1 ou T_2 . Os quelatos de gadolínio [Gd(III)], por exemplo, atuam como ACs na aquisição de imagens de IRM ponderadas em T_1 , fornecendo um contraste brilhante. Já ACs ponderados em T_2 , como é o caso de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro, apresentam um papel no contraste escuro nas imagens (BOEHM-STURM et al., 2018; YAN; SUN; SHEN, 2017; ZHOU; LU, 2013).

Assim, o desenvolvimento de nanossistemas bimodais óptico-magnéticos baseados em PQs surge, então, na perspectiva de se unir e usufruir, utilizando apenas uma única nanossonda, a sensibilidade e especificidade bioquímica das técnicas baseadas em fluorescência para estudos em nível celular com a diferenciação anatômica propiciada pela IRM. Além disso, PQs são capazes de concentrar vários quelatos de Gd(III) em sua superfície podendo aumentar a concentração local de íons paramagnéticos de maneira mais eficiente, levando a tempos de relaxação ainda menores e favorecendo contrastes ainda mais efetivos. Mesmo já existindo alguns trabalhos que envolvam nanossondas baseadas em PQs e quelatos de Gd(III), ainda há uma busca por nanossistemas que possuam uma melhor manutenção da fluorescência e/ou aprimoramento das propriedades relaxométricas (MCADAMS et al., 2017; STASIUK et al., 2013; YANG et al., 2017). No entanto, poucos são ainda os estudos que trazem aplicações biomédicas com nanossondas bimodais sítio-específicas para alvos celulares, o que os configuram como nanoplataformas multimodais (CABRAL FILHO et al., 2018).

Dessa forma, os nanossistemas bimodais óptico-magnéticos apresentam um perfil vantajoso para contribuir para a compreensão biológica de diferentes doenças, sob mais de um aspecto, sobretudo quando combinados com biomoléculas, e em especial para o câncer, uma doença multifatorial que ainda nos desafia. Um entendimento mais completo dos eventos biológicos relacionados ao câncer é relevante para o desenvolvimento de métodos de diagnósticos mais rápidos e eficientes e tratamentos mais eficazes (FARZIN et al., 2020; HE et al., 2020). Dentre as biomoléculas de interesse nesse contexto, está a transferrina (Tf). Essa proteína é responsável pelo transporte do Fe(III) para o interior das células, por meio de receptores específicos, os RTfs, que se encontram na membrana citoplasmática. As células de câncer, devido a sua alta taxa metabólica, podem apresentar uma alta

expressão, captação e reciclagem de RTfs. Dessa forma, os RTfs se tornam um alvo celular interessante para investigar determinados eventos biológicos relativos ao câncer (CANDELARIA et al., 2021; SHEN et al., 2018).

Portanto, nessa dissertação apresentaremos o desenvolvimento e caracterização físico-química e biológica de uma nanoplataforma multimodal constituída por PQs de telureto de cádmio (CdTe) conjugados de forma covalente a quelatos do tipo DOTA-Gd(III) e à Tf para propiciar a interação com RTfs presentes nas membranas de células de câncer.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma nanoplataforma óptico-magnética baseada em PQs e quelatos do tipo DOTA-Gd(III) tendo como alvos os receptores de transferrina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar e caracterizar opticamente os PQs;
- Preparar quelatos paramagnéticos de DOTA-Gd(III) e caracterizá-los por relaxometria, bem como estimar a eficiência de complexação dos íons Gd(III) ao ligante DOTA;
- Conjuguar os PQs aos quelatos de Gd(III) covalentemente para desenvolver um nanossistema bimodal;
- Conjuguar o nanossistema bimodal covalentemente à Tf, para obter um nanossistema multimodal;
- Caracterizar óptica e relaxometricamente os nanossistemas bimodal e multimodal;
- Confirmar a conjugação do nanossistema bimodal com a Tf;
- Avaliar a efetividade e a especificidade do nanossistema multimodal em ensaios com células de câncer por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PONTOS QUÂNTICOS

3.1.1 *Fundamentação teórica*

Estamos vivenciando a era nanotecnológica, em que novos avanços na síntese e na pesquisa de nanomateriais têm trazido grandes impactos nos campos das ciências médicas, da saúde e do meio ambiente. Nessas áreas, os nanomateriais podem ser utilizados, dentre várias possibilidades, como marcadores biológicos, células fotovoltaicas e diodos emissores de luz. Vale salientar que as propriedades físicas desses nanomateriais (eletrônica, óptica e magnética) e químicas (catalíticas) são diferenciadas quando o seu tamanho está reduzido à escala nanométrica (KUMAR; SINHA RAY, 2018; RESHMA; MOHANAN, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2021).

Dentro desse universo de possibilidades na área da nanotecnologia, destacam-se materiais funcionais como os nanocristais de semicondutores. Estes chamam a atenção devido ao seu leque de aplicações nos mais variados campos, como da física, química e ciências da vida (RESHMA; MOHANAN, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2021). Quando se encontram em dimensões nanométricas, os materiais semicondutores podem apresentar propriedades ópticas não antes observadas em sua forma macroscópica (ROCO, 2003). Dessa maneira, os pontos quânticos (PQs), os quais possuem uma dimensão típica entre 2 e 10 nm, emitem luz (fluorescência) sintonizável com o tamanho, mesmo quando possuem a mesma composição química de elementos (RESHMA; MOHANAN, 2019; WAGNER *et al.*, 2019). Assim, é possível sintonizar a fluorescência dos PQs em diferentes comprimentos de onda, percorrendo boa parte do espectro eletromagnético da luz visível (entre 400 e 700 nm), apenas alterando o tamanho da nanopartícula (NP), conforme ilustra a Figura 1.

Os materiais semicondutores são compostos por uma banda de valência (BV) e uma banda de condução (BC). Por sua vez, os elétrons (e^-), ao absorverem energia suficiente para ultrapassar o intervalo entre as bandas (conhecido por *bandgap* – E_g), podem migrar da BV à BC. Quando esse fenômeno ocorre, o elétron deixa um buraco/*hole* (h^+) na BV, assim, há formação de um par elétron-buraco denominado de *éxciton* (MICHALET; BENTOLILA; WEISS, 2008; SMITH; GAO; NIE, 2004). A distância típica entre um elétron e um buraco é chamada de raio de Bohr do éxciton

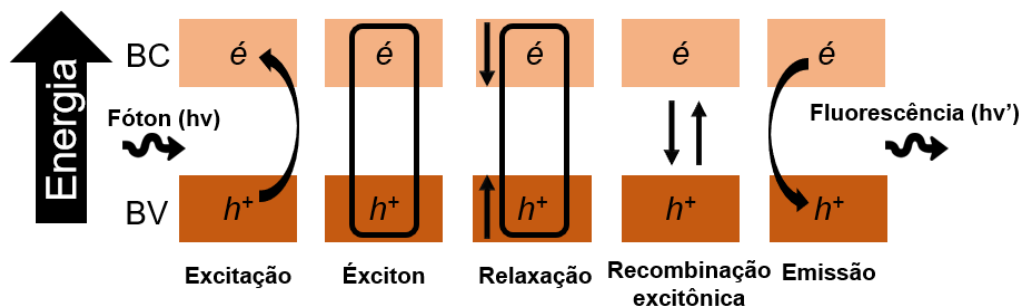
(a_{exc}), sendo específico de cada material semiconductor (MICHALET; BENTOLILA; WEISS, 2008). Na medida em que o e^- relaxa ao seu estado energético fundamental, retornando à BV, os e^- e h^+ sofrem recombinação excitônica, originando a emissão de fótons, assim como ilustra a Figura 2.

Figura 1 – Pontos quânticos com a mesma composição química emitindo fluorescência em diferentes comprimentos de onda, sintonizável com o tamanho.



Fonte: O autor (2022).

Figura 2 – Esquema representativo do processo de fotoluminescência de semicondutores. À medida que o elétron (e^-) é excitado, ele migra para a banda de condução (BC), dando origem a um *éxciton*. Quando ocorre relaxação e consequentemente a recombinação excitônica, a emissão de fluorescência é gerada. Onde: h^+ representa o buraco formado na banda de valência (BV), pela excitação do elétron.



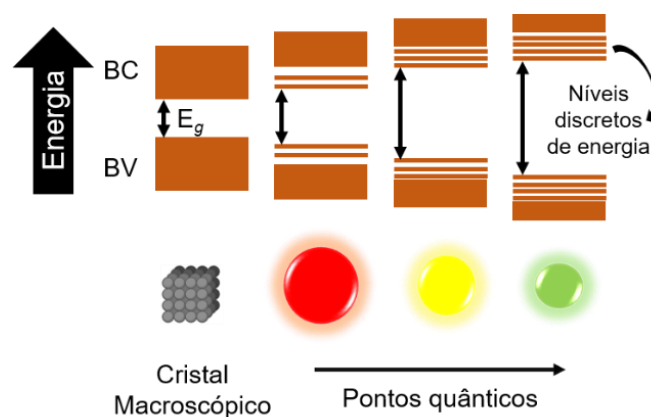
Fonte: O autor (2022).

Quando um semiconductor se apresenta na forma de cristais macroscópicos, há uma ampla variação de possíveis estados energéticos, os quais estão distribuídos praticamente de modo contínuo (Figura 3). Porém, quando as três dimensões do material se tornam fisicamente menores que a_{exc} , há confinamento quântico, sendo a NP de semiconductor chamada de PQ. Nessa configuração, os materiais semicondutores apresentam distintas propriedades fotoluminescentes (BENTOLILA; MICHALET; WEISS, 2008).

Sendo o a_{exc} característico de cada semicondutor, podemos exemplificar o que ocorre quando o material semicondutor se transforma em um PQ utilizando o seleneto de cádmio (CdSe), como exemplo. O a_{exc} do CdSe é 5 nm; logo, somente podemos considerar que um nanomaterial é um PQ de CdSe se o diâmetro dessa NP for inferior a aproximadamente 10 nm (BENTOLILA; MICHALET; WEISS, 2008). Além disso, quando o material está em um regime de confinamento quântico tridimensional (x, y e z), consequentemente os seus estados energéticos tornam-se discretos à medida em que possuem menor tamanho, como mostra a Figura 3, assemelhando-se aos átomos artificiais e, por isso, os PQs também são assim chamados (BENTOLILA; MICHALET; WEISS, 2008; SANTOS; FARIAS; FONTES, 2008).

Dessa forma, o regime de confinamento quântico, além de levar a uma discretização dos estados energéticos, desempenha um papel crucial na relação do tamanho dos PQs com as suas propriedades ópticas. Isso se dá porque outra consequência do fenômeno de confinamento é o aumento do E_g do nanocristal em função da diminuição do tamanho dos PQs (Figura 3) (YU *et al.*, 2003). Visto que: $E_g \propto 1/d^2$ (sendo, d o diâmetro da nanopartícula) e $E_g \propto 1/\lambda$ (sendo, λ o comprimento de onda de emissão de fluorescência), então “d” e “ λ ” são inversamente proporcionais ao E_g (SANTOS; FARIAS; FONTES, 2008). Assim, PQs menores, vão emitir em direção à região espectral do UV (ultravioleta), devido ao maior E_g . Em contrapartida, PQs maiores emitem fluorescência em regiões mais próximas do NIR (infravermelho próximo), por causa do menor E_g .

Figura 3 – Ao ser adotado um regime de confinamento quântico tridimensional, a redução do tamanho das partículas de semicondutores resulta no surgimento de níveis discretos de energia e aumento da E_g com a redução do tamanho das nanopartículas, e é nessa configuração que temos os pontos quânticos.

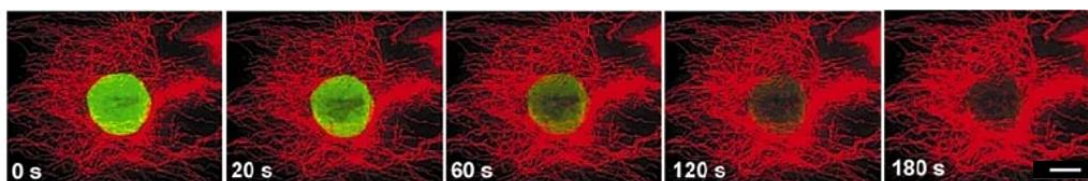


Fonte: O autor (2022).

A redução à nanoescala facilita a interação desses materiais com sistemas biológicos, os quais apresentam estruturas e processos nessa mesma faixa de tamanho (WAGNER *et al.*, 2019). Ademais, a partir da observação dessas novas características, os PQs tornaram-se novas sondas fluorescentes bastante versáteis para aplicações nos mais variados campos da ciência da vida, apresentando interessantes propriedades, como: (1) amplo espectro de absorção, sendo possível excitar a fluorescência das NPs com uma única fonte de luz; (2) emissão estreita e simétrica em diferentes regiões do espectro eletromagnético, variando-se apenas o tamanho da partícula; (3) alta resistência à fotodegradação, numa taxa 100 vezes menor em relação à que é apresentada pelos corantes orgânicos convencionais, permitindo a exposição da amostra à luz por longos períodos, tornando possível um monitoramento de eventos biológicos em tempo real – Figura 4; e (4) possuem superfície ativa, que permite a sua conjugação a biomoléculas, conferindo diferentes especificidades, como interação com proteínas, anticorpos e fármacos (KAIRDOLF *et al.*, 2013).

Essa funcionalização da superfície ainda pode possibilitar a associação dos PQs com pequenas moléculas, tais como agentes de contraste (ACs), como os quelatos paramagnéticos de Gd(III), e até mesmo a outras NPs, sendo possível unir, em uma única nanossonda, sinais óptico, dos PQs, e magnético, dos quelatos de Gd(III) ou NPs de óxido de ferro, por exemplo (ALBUQUERQUE *et al.*, 2021; CABRAL FILHO *et al.*, 2016a; CARVALHO *et al.*, 2019; KHALEDIAN *et al.*, 2021).

Figura 4 – Resistência à fotodegradação dos pontos quânticos (PQs) ao longo do tempo. Em vermelho, citoesqueleto marcado por PQs (630 nm) permaneceram fluorescentes ao longo da análise. Já em verde, o núcleo marcado pelo corante orgânico (Alexa Fluor, 488 nm) tornou-se indetectável a partir de 120 s, devido à fotodegradação do corante. Barra de escala: 10 μ m.



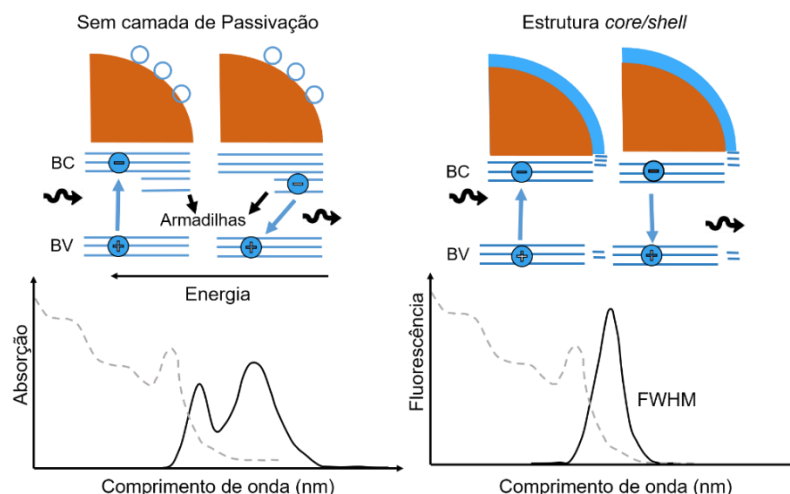
Fonte: Adaptada de WU *et al.*, (2002).

A diminuição do tamanho dos materiais da escala macrométrica para a nanométrica também causa um aumento relativo da área superficial. Este fenômeno, por sua vez, influencia significativamente os átomos da superfície, uma vez que

apresentam ligações não compartilhadas. Estas ligações levam ao surgimento de níveis intermediários de energia entre a BV e a BC, também chamados de “armadilhas”, causando uma diminuição da eficiência de luz emitida por esses nanocristais, conforme ilustra a Figura 5 (MARTINS; TRINDADE, 2012).

Uma alternativa para minimizar esta perda da intensidade de fluorescência é o crescimento de uma “casca” (passivação), normalmente constituída por outro material semiconductor, geralmente de maior E_g que o do semiconductor constituinte do núcleo da NP. Assim, o PQ apresenta uma estrutura do tipo núcleo/casca. Este processo diminui os defeitos de superfície (os quais prejudicariam a qualidade da emissão desses nanocristais, por exemplo a intensidade de fluorescência e largura espectral), otimizando suas propriedades fluorescentes (SHI *et al.*, 2021; SOUSA *et al.*, 2018).

Figura 5 – A camada de passivação nos pontos quânticos (PQs) compostos por núcleo/casca, ou *core/shell*, otimiza a emissão de fluorescência, com um estreitamento da largura à meia altura do espectro (FWHM). Quando a camada está ausente, os elétrons podem ocupar tais “armadilhas”, favorecendo outros decaimentos radioativos não excitônicos, interferindo, assim, na qualidade da fluorescência (intensidade e largura espectral). Na parte inferior da imagem encontram-se os espectros de emissão (linha preta contínua) e absorção (linha cinza pontilhada) típicos de cada situação.



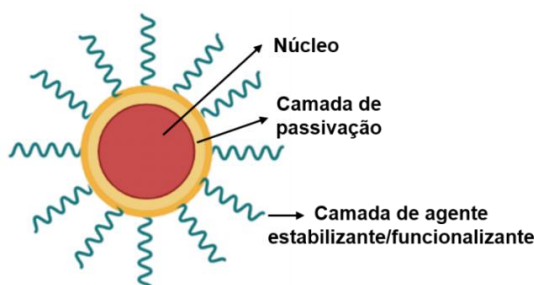
Fonte: O autor (2022).

Os PQs vêm sendo sintetizados pelo método *bottom up* (no qual se parte de átomos provenientes de compostos químicos, por exemplo, para gerar sistemas maiores, como as NPs), sendo utilizados agentes estabilizantes, os quais auxiliam na regulação do crescimento, bem como impedem a aglomeração dos PQs. Os agentes estabilizantes mais utilizados nas suspensões coloidais de PQs hidrofílicos, em geral apresentam um grupamento tiol ($-SH$), visto que o enxofre pode atuar como precursor

da camada de passivação, ligando-se ao cádmio, por exemplo. Além do tiol, esses agentes, em geral, podem apresentar outros grupos funcionais, tais como carboxílicos e aminas, que além de conferir cargas aos PQs, podem atuar como ponte química para a interação dos nanocristais com moléculas. O tipo de interação dependerá dos grupos funcionais dos agentes estabilizantes/funcionalizantes. Como exemplos: a cisteamina (CISTM) disponibiliza grupos aminas e carga positiva aos PQs (em pH próximo ao fisiológico); enquanto o AMS (ácido mercaptossuccínico) expõe grupos carboxílicos e carga negativa na superfície dos PQs (PEREIRA et al., 2019b).

Assim, ao final da síntese, o PQ apresenta uma estrutura complexa formada por três camadas: o núcleo da NP, responsável por determinar a emissão; a camada de passivação, que determina a qualidade da emissão e a fotoestabilidade; a camada orgânica (mais externa), de agente estabilizante/funcionalizante, cuja importância é conferir estabilidade química e o grau de funcionalidade em relação à marcação do sistema biológico em estudo, favorecendo a conjugação dos PQs com biomoléculas e até com outras NPs, conforme observado na Figura 6.

Figura 6 – Esquema nanoestrutural de um ponto quântico, ilustrando núcleo, camada de passivação e de agentes estabilizantes/funcionalizantes.



Fonte: O autor (2022).

3.1.2 Conjugação

A aplicação dos PQs nos mais diversos ramos das ciências da vida deve-se principalmente as suas propriedades ópticas. No entanto, outro ponto importante que aumenta a versatilidade e garante especificidade para os PQs é o processo de conjugação. Este se dá quando o nanocristal de semicondutor é associado a: (1) biomoléculas (como proteínas, aminoácidos e anticorpos); (2) ACs (radioativos ou com sinal magnético); ou (3) a outras NPs, a exemplo as magnéticas ou metálicas (CABRAL FILHO et al., 2018; CARVALHO et al., 2019; PEREIRA et al., 2019b).

Por ser um procedimento desafiador, é interessante que a conjugação seja baseada em metodologias reprodutíveis e padronizadas, as quais possam preservar as propriedades ópticas dos PQs e as potenciais funcionalidades dos outros componentes associados aos PQs, gerando um conjugado estável, livre de aglomerações e precipitações (DÍAZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*, 2019b). Ademais, a versatilidade na associação dos PQs a biomoléculas ou compostos com outros sinais pode torná-los nanossondas multifuncionais, sendo possível a atuação em mais de uma modalidade de análise (ALBUQUERQUE *et al.*, 2021; CARVALHO *et al.*, 2019; WAGNER *et al.*, 2019).

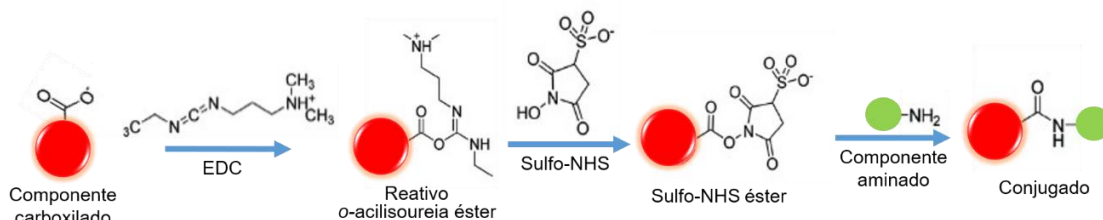
A superfície dos PQs, com seus grupos funcionais, permite uma interação química entre o nanocristal e demais componentes que possuam grupos funcionais (Figura 6). Dentre os tipos de conjugação, destacam-se: (1) ligação covalente, a qual se relaciona a diferentes agentes de acoplamento, como 1-etil-3-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimide) (EDC), *N*-hydroxysulfosuccinimide (Sulfo-NHS) [ou NHS (*N*-Hydroxysuccinimide)]; (2) ligação covalente utilizando o glutaraldeído; (3) adsorção simples, baseada em interações eletrostáticas e/ou hidrofóbicas (Van der Waals), também chamada de ligação não covalente e (4) a forte interação de PQs funcionalizados com moléculas de avidina, ou estreptavidina, com biotina (HERMANSON, 2013).

Para escolher os agentes de acoplamentos, os quais são mediadores da ligação covalente entre PQs e os outros componentes, é necessário definir os grupos funcionais dos dois constituintes envolvidos no processo de conjugação. Para promover ligação carboxil-amina (amida) pode-se utilizar o EDC e/ou Sulfo-NHS (ou NHS), enquanto que a ligação amina-tiol pode ser favorecida pelo Sulfo-SMCC (sulfosuccinimidyl 4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate) e, entre aminas, o glutaraldeído pode ser aplicado (HERMANSON, 2013).

Em particular, o EDC e o Sulfo-NHS (ou NHS) são agentes altamente reativos com ácidos carboxílicos, promovendo 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 e instável, com tempo de vida curto. Dessa forma, para obter um aumento do rendimento e um aprimoramento na cinética do processo, é adicionado o Sulfo-NHS (ou NHS). A hidroxila do Sulfo-NHS interage com o complexo reativo *o*-acilisouréia formando o intermediário Sulfo-NHS éster, o qual apresenta maior estabilidade e interage com as

aminas primárias, promovendo a formação da ligação amida e a consequente conjugação (Figura 7) (HERMANSON, 2013).

Figura 7 – Esquema representativo de PQs carboxilados ativados por EDC e Sulfo-NHS para interação com componentes aaminados.



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

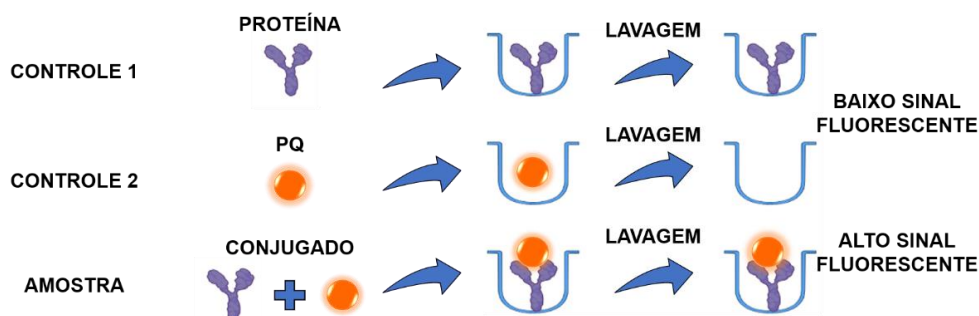
Além de definir a estratégia mais adequada e eficiente de conjugação, a fim de preservar a qualidade óptica dos PQs e as características funcionais dos demais componentes, é indispensável utilizar metodologias e técnicas de avaliação da conjugação, para monitorar esse processo. Existem algumas técnicas e ferramentas com esse propósito, como: espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR – *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*), espectroscopia por correlação de fluorescência (FCS – *Fluorescence Correlation Spectroscopy*), dispersão/espalhamento dinâmico da luz (DLS – *Dynamic Light Scattering*) e ensaio fluorescente em microplaca (EFM) (CRACIUN *et al.*, 2021; DA SILVA *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

O EFM se baseia no princípio da afinidade de biomoléculas com uma microplaca de poliestireno. Proteínas possuem afinidade pela placa de poliestireno, porém as mesmas apresentam baixo sinal fluorescente. Por outro lado, os PQs não possuem afinidade pela microplaca e, por isso, não ficam aderidos, não sendo observado sinal fluorescente significativo na análise. Dessa maneira, apenas amostras com os PQs conjugados a biomoléculas interagem com a microplaca, apresentando alto sinal fluorescente, assim como ilustra a Figura 8. Para indicar a ocorrência de conjugação, o sinal da fluorescência relativa (*FR*) gerado para o bioconjugado (*FL Bioconjugado*) terá que ser superior a 100%, em relação aos valores médios dos controles (*FL Controles*) – a biomolécula sozinha e o PQ sozinha, conforme observado na Equação 1. Quanto maior o sinal de *FL Relativa*, melhor é a conjugação (CARVALHO *et al.*, 2014):

$$FR (\%) = \frac{(FL \text{ Bioconjugado} - FL \text{ Controles})}{FL \text{ Controles}} \times 100\% \quad \text{Eq. 1}$$

Este valor foi adotado pois, quando os conjugados apresentavam *FR* igual ou maior que 100% de intensidade relativa de fluorescência, verificou-se marcação específica de células (CABRAL FILHO *et al.*, 2018). Então, o EFM apresenta várias vantagens, como ser mais prático e semiquantitativo, além de possibilitar a análise de várias amostras ao mesmo tempo (CARVALHO *et al.*, 2014). No entanto, para confirmar, de fato, a conjugação entre os PQs e a biomolécula, é necessário que esta tenha afinidade pela microplaca de poliestireno.

Figura 8 – Esquema representativo do ensaio fluorescente em microplaca (EFM). Os controles, só o ponto quântico (PQ) e só a biomolécula, vão apresentar baixa fluorescência, enquanto que os conjugados, quando preparados de forma efetiva, vão apresentar sinal fluorescente significativo, confirmando a bioconjugação.



Fonte: O autor (2022).

Com a FCS, podemos avaliar a presença ou ausência da conjugação através da determinação do raio hidrodinâmico dos sistemas envolvidos. Além da sua sensibilidade, a análise por FCS é bastante precisa, pois se utiliza da focalização do feixe de laser por uma objetiva de alta abertura numérica em um microscópio confocal, que limita o volume focal de detecção e de observação, sendo capaz de diferenciar a difusão de espécimes, como NPs, ainda que tenham tamanhos semelhantes (CRACIUN *et al.*, 2021; DAWES; SOELLER; SCHOLPP, 2020). Nessa técnica, NPs ou moléculas fluorescentes atravessam aleatoriamente o volume focal de detecção e são discriminadas precisamente através das flutuações da intensidade de fluorescência geradas em decorrência de seu movimento browniano, ao entrar e sair desse volume focal. As flutuações detectadas geram uma curva de correlação em função do tempo e, a partir desta, se obtém o tempo de difusão e o raio hidrodinâmico

para NPs (BRIDDON; KILPATRICK; HILL, 2018; DAWES; SOELLER; SCHOLPP, 2020; DE THOMAZ *et al.*, 2015).

Para identificar a presença da conjugação por meio desta técnica, é possível definir o raio hidrodinâmico por meio da Equação 2:

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

onde k_B é a constante de Boltzmann; T é a temperatura da amostra; τ_{DIF} é o tempo de difusão; η é a viscosidade média e ω_x é o raio lateral do volume focal.

Além das técnicas que avaliam diretamente a conjugação, vale salientar a importância de análises que avaliem a interação com as células a fim de evitar falsos negativos e falsos positivos das marcações fluorescentes. Essas análises incluem, por exemplo, ensaios de saturação envolvendo o sistema biológico e inibição do conjugado que podem ser monitorados por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo, sendo também adequadas para avaliar a eficiência dos conjugados através da fluorescência (CARVALHO *et al.*, 2019; CUNHA *et al.*, 2018). No caso de ensaios de saturação de sistemas biológicos, pode-se citar, por exemplo, a saturação de RTfs das células com excesso de Tf antes da incubação com conjugados PQs-Tf, resultando em menor interação dos mesmos, visto que os RTfs se encontram ocupados diante do excesso de biomoléculas no meio. Diante disso, a saturação dos RTfs pode ser utilizada como teste de especificidade (CABRAL FILHO *et al.*, 2016a).

Em geral, é interessante a combinação de mais de uma técnica de avaliação da conjugação para que seja possível analisar o nanossistema como um todo. Além disso, se o componente associado for um quelato de Gd(III) ou NPs magnéticas, por exemplo, é importante avaliar o sinal magnético através de técnicas específicas, como a relaxometria. Essa avaliação nos dá informações sobre os tempos de relaxação nucleares dos componentes associados sendo possível, posteriormente, calcular a relaxividade do sistema. Portanto, são metodologias relevantes para comprovar o sucesso na aplicação com PQs (CABRAL FILHO *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*, 2019).

Nesse contexto de conjugações, o desenvolvimento das nossas nanossondas óptico-magnéticas, além de aliar sinal fluorescente à nanossonda que traz especificidade e possibilidade de monitoramento à nível celular, possui a interessante característica de poder concentrar vários quelatos de Gd(III) por NP, podendo intensificar ainda mais o sinal para a técnica de imagem por ressonância magnética

(IRM) que pode trazer também informações de caráter anatômico. Para melhor entender os fundamentos, características e vantagens desta proposta, a próxima seção irá abordar princípios da imagem por ressonância magnética (IRM) e dos ACs moleculares.

3.2 AGENTES DE CONTRASTE EM IRM

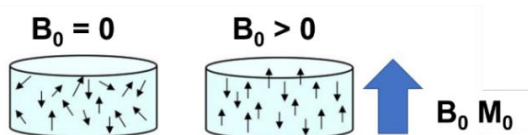
A IRM, sendo uma das mais poderosas e importantes técnicas de diagnóstico desenvolvidas, é baseada nos fundamentos da ressonância magnética nuclear (RMN), produzindo imagens com altos detalhes anatômicos de diferentes tecidos, tendo a capacidade de diferenciar tecidos saudáveis de patológicos. A IRM elenca várias vantagens quando comparada a outras técnicas diagnósticas (como é o caso das que utilizam raios X, raios gama e ultrassom), dentre elas, fornece imagens com alta resolução comparada às demais (ca. 0,5 mm) (BROWN, 2014; PEREIRA; GERALDES, 2007).

A imagem obtida através da RMN é baseada na diferença dos tempos de relaxação longitudinal e transversal (T_1 e T_2 , respectivamente) dos spins nucleares dos prótons de ^1H das moléculas de água presentes em tecidos normais e alterados. O sinal pode ser obtido a partir dos ^1H , por serem (i) abundantemente presentes no corpo humano (mais de 70% composto por água) e (ii) sensíveis ao fenômeno de RMN, ocorrendo alinhamento dos spins nucleares quando exposto a um campo magnético (ALBUQUERQUE *et al.*, 2021).

Sobre os spins nucleares dos núcleos de ^1H (número quântico de spin nuclear, S , como sendo $\frac{1}{2}$), há dois tipos de alinhamentos na presença de um campo magnético $\mathbf{B}_0$: paralelo (estado de menor energia, spin $+\frac{1}{2}$) ou antiparalelo (estado de maior energia, spin $-\frac{1}{2}$). Além disso, existe ainda a condição quântica $2S+1$, onde os estados energéticos encontram-se em condição de ressonância. Sob temperatura ambiente, o número de spins nucleares alinhados paralelamente a $\mathbf{B}_0$ é ligeiramente maior, resultando em uma magnetização $\mathbf{M}_0$ paralela ao campo magnético ($\mathbf{B}_0$), conforme ilustrado na Figura 9. Sabendo-se que em equilíbrio $\mathbf{M}_0 = \mathbf{M}_z$ (sendo z o eixo longitudinal), para medir-se os tempos de relaxação, aplica-se um campo oscilante ($\mathbf{B}_1$) perpendicular, ressonante à frequência de precessão (*Larmor*) dos prótons de ^1H , com o intuito de deslocar o vetor magnetização resultante para o plano transversal (xy), por exemplo. Quando $\mathbf{B}_1$ é

interrompido, a magnetização resultante retorna ao estado de equilíbrio, ocorrendo a liberação da energia absorvida (na região de radiofrequência), sendo esse processo denominado de relaxação (PEREIRA; GERALDES, 2007). O processo de relaxação (ou seja, quando os prótons de ^1H retornam ao equilíbrio) é modulado pelas constantes exponenciais de tempo (T_1 e T_2). A primeira (T_1) reflete o retorno/recuperação da magnetização M_0 no eixo longitudinal z , enquanto a segunda (T_2) reflete o desaparecimento/perda do sinal no eixo transversal xy . Na prática, a IRM é influenciada pelas propriedades físico-química (como a temperatura e o campo magnético que está sendo aplicado) e morfológicas das estruturas biológicas e do microambiente, resultando em imagem com diferentes contrastes (PEREIRA; GERALDES, 2007).

Figura 9 – Representação esquemática da orientação energética dos spins nucleares. Na esquerda, os *spins* estão orientados de forma aleatória na ausência de um campo magnético externo ($B_0 = 0$). Já na direita, os *spins* estão orientados de forma paralela e antiparalela na presença do campo ($B_0 > 0$).



Fonte: Adaptada de Pereira (2021).

Para aprimorar a qualidade de formação de imagens, ACs podem ser aplicados em procedimentos clínicos. Os ACs atuantes em T_1 mais utilizados na rotina clínica são compostos de quelatos paramagnéticos contendo o íon gadolínio Gd(III) . Dentre os ACs de baixo peso molecular (abaixo de 10 kDa), destacam-se alguns lineares, como o Magnevist [(Gd-DTPA (*diethylenetriamine pentaacetic acid*))] e Omniscan (Gd-DTPA-BMA); e também cíclicos, como o Dotarem [(Gd-DOTA (*tetraazacyclododecane tetraacetic acid*))] e ProHance [Gd(HP-DO3A)]. No caso dos tumores, por exemplo, por serem metabolicamente ativos, naturalmente tendem a apresentar uma maior captação dos ACs resultando, por conseguinte, em um aumento de contraste na imagem (YAN; SUN; SHEN, 2017).

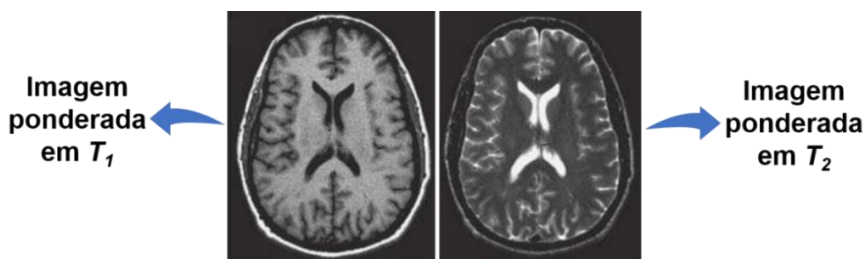
Nesse contexto, o grau de eficiência dos ACs é medido pela relaxividade (r_i , dada em $\text{s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$, $i = 1,2$), a qual indica a capacidade do AC em reduzir os tempos de relaxação dos ^1H por unidade de concentração (mM) do íon paramagnético. De forma geral, vale ressaltar que a concentração real de íons Gd(III) é usualmente

quantificada através da espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS – *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*). Além disso, quando um sistema é nanoparticulado, essa relaxação também é determinada em função da concentração de NP. Essa grandeza pode ser obtida a partir da Equação 3:

$$r_{1,2} = \frac{R_{1,2}^{obs} - R_{1,2}^{dia}}{C} \quad \text{Eq. 3}$$

na qual, C é a concentração de íons magnéticos (ou NPs) e $R_{1,2}^{obs}$ é a taxa de relaxação longitudinal e transversal ($1/T_{1,2}$) dos prótons de ^1H da água medida na presença de íons (para)magnéticos. Por outro lado, $R_{1,2}^{dia}$ é a contribuição diamagnética, sem a presença do íon (para)magnético. Dessa forma, podemos inferir a partir da Eq. 3: altos valores de r_1 e r_2 correspondem a menores valores de T_1 e T_2 , respectivamente. A grandeza relaxividade depende ainda do campo e da temperatura sob a qual a análise está sendo realizada. A classificação de um AC que atua em T_1 ou T_2 (fornecendo contrastes claro ou escuro às imagens, respectivamente, conforme ilustrado na Figura 10) também pode ser dada pela razão $a=r_2/r_1$. Alguns exemplos de AC que atuam em T_2 são as NPs de óxido de ferro e os que atuam em T_1 são os quelatos de Gd(III) (ALBUQUERQUE *et al.*, 2021; CABRAL FILHO *et al.*, 2018).

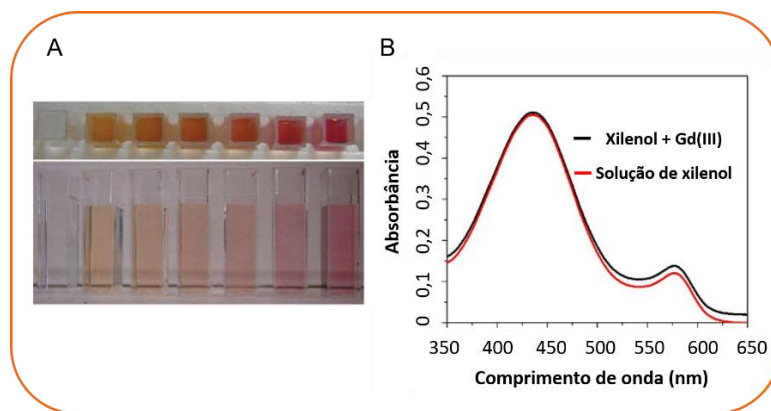
Figura 10 – Exemplos de imagens ponderadas nos tempos de relaxação longitudinal (T_1 – mais claras) e transversal (T_2 – mais escuras).



Fonte: Adaptada de Buxton (2002).

Em geral, para que se possa analisar o grau de eficiência da complexação de íons Gd(III) aos ligantes, pode ser aplicado o teste do alaranjado de xilenol. Este teste consiste na utilização de um indicador (corante orgânico) de íons da família dos lantanídeos (III). A cor da solução de xilenol varia dependendo do pH, sendo amarela em pH neutro/ácido e modificando para roxa em pH básico ou na presença de metais livres (a exemplo dos íons Gd(III)). Além da variação visual observada, o xilenol exibe dois picos de absorção em comprimentos de ondas característicos (576 e 437 nm), conforme ilustra a Figura 11.

Figura 11 – Esquema representativo do perfil observado da solução de xilenol. Em A: variação da cor em decorrência da adição de íons Gd(III). Em B: Espectros característicos da solução de xilenol (em vermelho) e o perfil espectral da solução de xilenol na presença de íons Gd(III) (em preto).

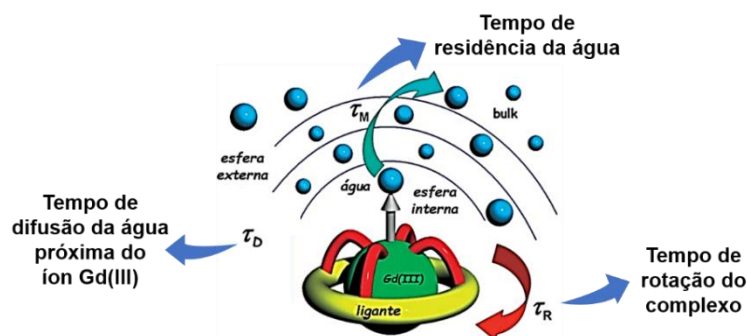


Fonte: Adaptada de Barge *et al.* (2006).

Partindo da avaliação desses picos, pode-se estimar a porcentagem de incorporação de Gd(III) no quelato. Dessa forma, calcula-se a razão entre as absorbâncias A_{576} e A_{437} referentes aos picos máximos e, utilizando uma curva de calibração construída a partir de uma solução de Gd(III) livre, pode-se determinar o percentual complexado no ligante (BARGE *et al.*, 2006; BELLEZA; NARAGA; VILLARAZA, 2018).

Dessa forma, o processo de relaxação paramagnética dos ACs consiste nas seguintes contribuições: (i) da esfera externa, que são as moléculas de água que se difundem nas proximidades do íon central; (ii) da esfera interna – associada à quantidade (q) de moléculas de água coordenadas ao íon central, bem como (iii) da taxa de troca ($1/\tau_M$) dessas moléculas com aquelas presentes no meio (*bulk*). Assim, conforme pode ser observado na Figura 12, existem alguns fatores que podem influenciar na relaxividade dos sistemas, como: (i) o número de moléculas de água (q) na esfera interna de coordenação; (ii) o tempo de difusão das moléculas de água nas proximidades do complexo que contém o íon paramagnético (τ_D) e (iii) o tempo de rotação do complexo paramagnético (τ_R), diretamente ligado ao tamanho e à mobilidade do mesmo.

Figura 12 – Representação de moléculas de água realizando uma interação com a esfera interna (centro do íon paramagnético) de quelato de Gd(III) em solução e os tempos de residência da água coordenada ao íon metálico central (τ_M), o tempo de rotação do complexo (τ_R) e o tempo de difusão da água nas regiões circundantes ao íon (τ_D).



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

Os ACs ainda podem sofrer alterações quando estão associados a macromoléculas (como proteínas) ou NPs (como os PQs). Quando acontecem algumas dessas associações, podem ocorrer modificações nos tempos de difusão (τ_D) de moléculas de água próximas ao centro paramagnético e, conseqüentemente, nos valores de relaxividade transversal (r_2), pois resultam em um sistema com uma ordem de grandeza maior em tamanho que os ACs moleculares. Além disso, quando o tipo de interação com essas estruturas ocorre por meio de ligantes ou intermediários, a mobilidade do complexo pode ser alterada, refletindo-se, por sua vez, na variação do tempo de rotação (τ_R), influenciando conseqüentemente a r_1 (FERREIRA *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2019).

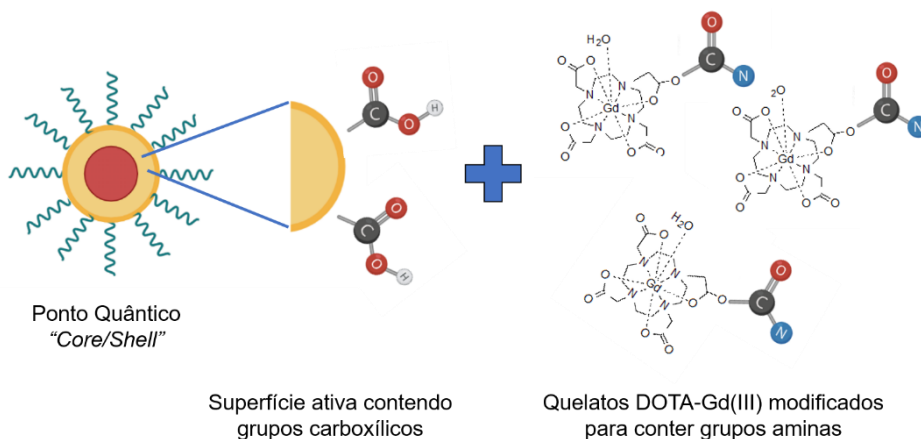
Para aprimorar a compreensão sobre os fundamentos da IRM e as vantagens de se associar NPs a ACs, a próxima seção apresentará alguns trabalhos que têm buscado explorar a conjugação de PQs com compostos magnéticos ponderados em T_1 a base de quelatos de Gd(III), para intensificar o sinal para a IRM e adquirir multifuncionalidade em um único nanossistema.

3.3 NANOSSISTEMA ÓPTICO-MAGNÉTICO BASEADO EM PQs E QUELATOS DE Gd(III)

No cenário do desenvolvimento de nanossondas óptico-magnéticas, existem várias formas de se realizar essa associação, como o revestimento de PQs com lipídios contendo quelatos-Gd(III); o encapsulamento de PQs de quelatos-Gd(III) em

nanoestruturas (micelas e lipossomas); e, também, a conjugação direta de quelatos-Gd(III) na superfície de PQs. Dentre elas, as baseadas na conjugação direta podem ser vantajosas, devido ao favorecimento da dinâmica de troca de água (pelo fato de não existirem obstáculos que limitem a troca de moléculas de água), além da manutenção de um menor diâmetro hidrodinâmico dos nanossistemas, sendo de uma ordem de grandeza mais compatível com os sistemas biológicos e as respectivas estruturas a serem avaliadas. É importante frisar que a estratégia de conjugação deve ser baseada em fundamentos apresentados brevemente na seção 3.1.2, uma vez que ao dominar esses fundamentos, pode-se escolher adequadamente os métodos a serem utilizados para a interação dos PQs com outros componentes. Como exemplo de um nanossistema preparado por conjugação direta, podemos visualizar, na Figura 13, um PQ com a superfície funcionalizada com grupos carboxílicos, aptos para interagir com aminas de quelatos paramagnéticos, por meio da conjugação direta de vários desses ACs presentes na superfície da NP. A abordagem da conjugação direta também é vantajosa, pois possibilita a concentração de vários ACs por unidade de PQ. Além disso, conforme mencionado no parágrafo anterior, a localização dos ACs na superfície favorece o aumento da relaxividade, por causa de melhorias nos efeitos relacionados à dinâmica de troca de água (ALBUQUERQUE et al., 2021; PEREIRA et al., 2019). Em seguida, traremos alguns estudos que utilizaram essa abordagem de ligação direta.

Figura 13 – Ilustração esquemática da superfície ativa de PQs carboxilados passíveis para interagir, após ativação com agentes de acoplamento, e concentrar vários quelatos de DOTA-Gd(III) modificados para conter grupos amina, através da conjugação direta. O resultado é a formação de nanossistemas óptico-magnéticos de PQs-DOTA-Gd(III).



Fonte: Adaptada de PEREIRA (2021).

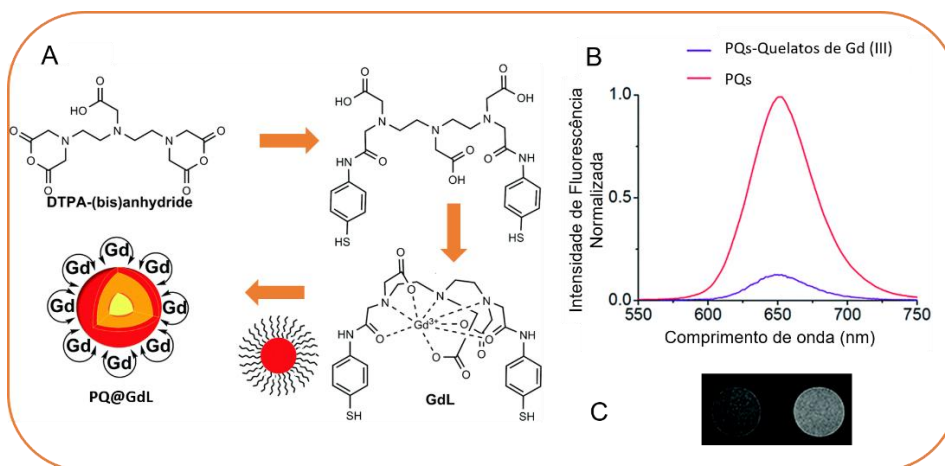
Stasiuk *et al.* (2011) conjugaram quelatos de Gd(III) a PQs hidrofóbicos de InP/ZnS, sendo necessária uma etapa secundária para torná-los hidrofílicos, usando a penicilamina para garantir a troca de ligante. Primariamente, os autores prepararam os quelatos de Gd(III), a partir da reação do DPAA (*1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-tris(methylene)dipicolinic acid*) e ácido lipóico. Nesse contexto, a ligação dos quelatos de Gd(III) à superfície dos PQs foi confirmada por análises de DLS, cujos diâmetros aumentaram de 6,9 nm (apenas PQs) para 8,6 nm [PQs-quelatos de Gd(III)]. Em termos de fluorescência, o comprimento máximo do espectro de emissão manteve-se em torno de 620 nm. No entanto, após a etapa de troca de ligante, os PQs exibiram redução do rendimento quântico, bem como diminuição da intensidade de fluorescência. Stasiuk e colaboradores também avaliaram o sistema pela relaxometria, obtendo r_1 de 900 mM⁻¹.s⁻¹ por PQ e de 13 mM⁻¹.s⁻¹ por Gd(III) (ambos a 0,81 T e 25 °C). Vale salientar que a última relaxividade alcançada foi cerca de 3 × superior ao AC comercial na forma molecular, quando associados 80 quelatos de Gd(III) por PQ. Os autores ainda promoveram a conjugação de PQs-quelatos de Gd(III) ao peptídeo de penetração celular (MCA – maurocalcine), a fim de estudar a internalização deste nanossistema em sistemas biológicos. Dessa forma, na IRM, após 15 min da injeção dos PQs-quelatos de Gd(III)-MCA em cérebro de rato, foi obtido um sinal distinto comparado ao observado pelo Dotarem comercial. Além disso, o nanossistema apresentou um elevado tempo de retenção e manteve um intenso sinal mesmo após 4 h (STASIUK *et al.*, 2011). Stasiuk *et al.* (2013) promoveram uma otimização do sistema, agora utilizando o mercaptobenzoico, um “ligante adaptador” de melhor eficiência dentre os demais testados. A partir disso, os autores constataram uma melhora significativa do sinal paramagnético, com a relaxividade r_1 de 2520 mM⁻¹.s⁻¹ por PQ e de 31 mM⁻¹.s⁻¹ por Gd(III) (ambos a 0,81 T e 25 °C), sendo que a última relaxividade exibiu um sinal cerca de 8 × maior que o quelato molecular comercial (STASIUK *et al.*, 2013).

Yang *et al.* (2017) desenvolveram nanossistemas óptico-magnéticas baseados em PQs ternários de CuInS/ZnS e quelatos de Gd(III). Para tanto, utilizaram o ligante linear DTDTPA (*2-[bis[2-[carboxymethyl-[2-oxo-2-(2-sulfanylethyl-amino) ethyl]amino] ethyl] amino] acetic acid*). Os nanossistemas óptico-magnéticos exibiram um diâmetro de 24,7 ± 2,7 nm (analisados por DLS), pequena redução da intensidade de fluorescência e um sutil *red shift* (detectados pelo espectro de emissão), após a

conjugação com os quelatos de Gd(III), além de apresentarem uma redução do rendimento quântico (de 29 para 19%). Além disso, evidenciaram uma marcação fluorescente de células HeLa pela microscopia de fluorescência, após 24 h de incubação com os nanossistemas desenvolvidos. Nas avaliações relaxométricas do nanossistema, foi constatado uma r_1 de $11 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ por Gd(III) (a 3 T e 37°C), sendo mais eficiente do que o quelato molecular em cerca de $2,5 \times$. Por fim, os autores também visualizaram uma marcação eficiente e prolongada de tumor *in vivo*, em ratos, analisada por IRM e microscopia de fluorescência (YANG *et al.*, 2017).

McAdams *et al.*, (2017) sintetizaram quelatos de Gd(III) formados a partir do ligante linear DTPA e, em seguida, associaram cerca de 620 desses quelatos à superfície dos PQs de CdSe/CdS/ZnS (Figura 14A), sendo esse valor estimado através da ICP-MS. As nanossondas apresentaram diâmetro de $8,4 \pm 0,9 \text{ nm}$ e redução da intensidade de fluorescência após a adição dos DTPA-Gd(III), Figura 14B. Além disso, os autores identificaram potencial para obtenção de IRM ponderadas em T_1 , como observado na Figura 14C. Já as medidas de r_1 foram de $6800 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e $11 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ por PQs e por Gd(III), respectivamente (ambos a $1,06 \text{ T}$, 37°C), respectivamente, sendo o r_1 desse último superior ao DTPA-Gd(III) na forma molecular ($r_1 = 3,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (MCADAMS *et al.*, 2017).

Figura 14 – Esquema representativo do nanossistema óptico-magnético desenvolvido por McAdams *et al.* Em A: esquema da preparação, na qual foi utilizado o ligante linear DTPA complexado com Gd(III) para conjugar na superfície do PQ. Em B: espectro de emissão dos PQs, linha contínua em vermelho, e PQs-quelatos de Gd(III), linha contínua em roxo ($\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$). Em C: IRM do nanossistema ponderadas em T_1 (3 T), trazendo o aumento do contraste brilhante, de cinza a branco, à medida que a concentração do nanossistema aumenta.

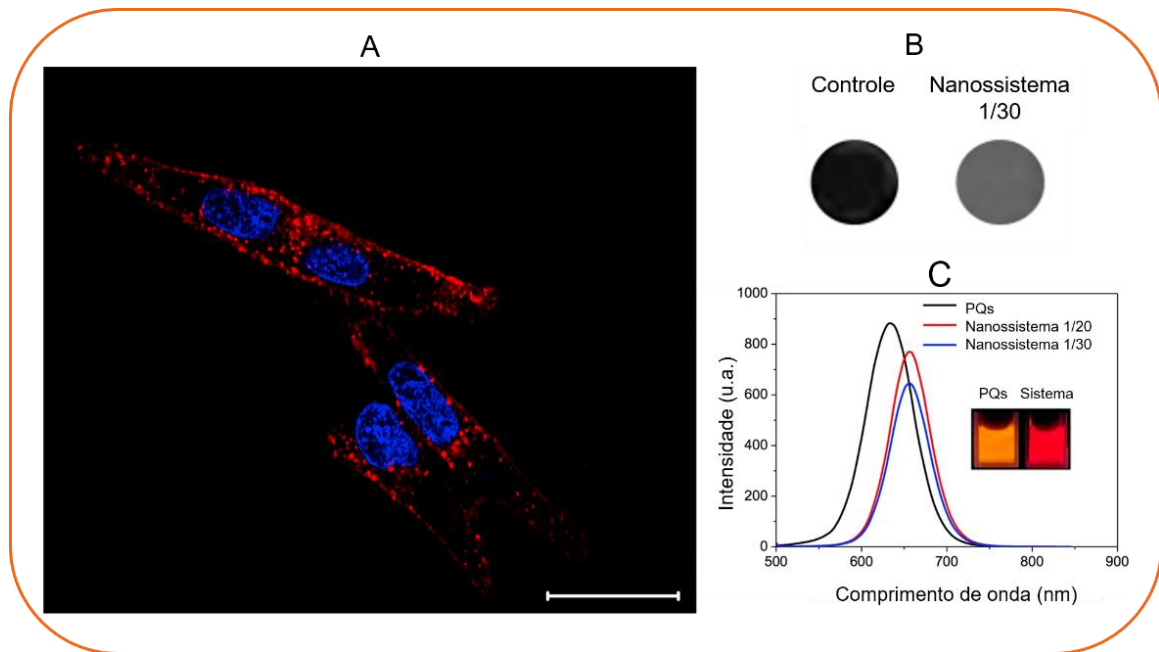


Fonte: Adaptado de MCADAMS *et al.*, (2017).

Ma *et al.* (2018) também avaliaram o potencial de nanossistemas bimodais por meio da análise de IRM. Para tanto, associaram PQs de Ag₂Se a quelatos de DTPA-Gd(III), observando que os nanossistemas apresentaram um diâmetro hidrodinâmico de 13,5 nm (por DLS). Através da caracterização relaxométrica, os PQs-DTPA-Gd(III) exibiram uma r_1 de aproximadamente 3 mM⁻¹.s⁻¹ (a 3 T), próximo ao valor encontrado no DTPA-Gd na forma molecular. De acordo com os ensaios *in vitro*, com células MDA-MB-231, os nanossistemas exibiram baixa toxicidade, com uma taxa de sobrevivência superior a 80% daquela linhagem. Já no estudo *in vivo*, eles puderam proporcionar um contraste brilhante bem definido, principalmente nas regiões renal e da veia cava inferior de ratos. Portanto, mostraram-se interessantes sistemas nanoparticulados para a atuação em IRM e até mesmo em técnicas fluorescentes (MA *et al.*, 2018).

Pereira *et al.* (2019) prepararam nanossistemas óptico-magnéticos que consistiam em PQs hidrofílicos de CdTe, conjugados de forma direta a quelatos monoaminados de DOTA-Gd(III), nas proporções de 1/20 e 1/30 PQs:quelatos de Gd(III). Os autores observaram que após a conjugação aos quelatos de Gd(III), a intensidade de fluorescência não sofreu alteração significativa (Figura 15C). O diâmetro hidrodinâmico dos PQs, bem como dos nanossistemas com 20 e 30 quelatos foi de 3; 16; e 28 nm, respectivamente (obtidos a partir do FCS), indicando que houve conjugação e que houve diferença entre os sistemas com número de quelatos variáveis. A partir da relaxometria, os nanossistemas com 20 e 30 quelatos apresentaram r_1 de 24 mM⁻¹.s⁻¹ e 20 mM⁻¹.s⁻¹, ou seja, pelo menos 5 × maiores que o DOTA-Gd(III), quando avaliados a 1,4 T e 37 °C. Os autores constataram uma marcação eficiente por microscopia de fluorescência (Figura 15A). Através da IRM, foram avaliadas as imagens dos nanossistemas e do controle (usando apenas PBS), sendo possível observar imagens com contraste claro (cinza) dos nanossistemas (Figura 15B). Além disso, os nanossistemas desenvolvidos mantiveram-se estáveis e fluorescentes por pelo menos 3 meses (PEREIRA *et al.*, 2019).

Figura 15 – Em A: Imagem de microscopia de fluorescência confocal de células HeLa marcadas pelos nanossistemas PQs-DOTA-Gd(III) (em vermelho). Os núcleos estão marcados pelo Hoechst (em azul). Barra de escala: 20 μm . Em B: IRM do controle (em preto) e do nanossistema 1/30 PQs:quelatos de Gd(III) (em cinza). Em C: Espectros de emissão dos PQs (em preto) e dos sistemas preparados com as proporções 1/20 e 1/30 PQs:quelatos de Gd(III) (em vermelho e em azul, respectivamente).



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

3.4 TRANSFERRINA

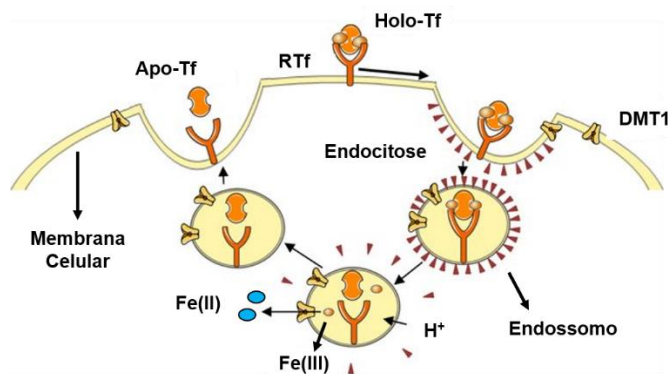
Há cerca de 50 anos, quando a Tf foi descoberta, diversos estudos têm focado em compreender a mediação da entrada de ferro nas células de organismos através dessa proteína transportadora, principalmente dos vertebrados. A Tf pertence à família das proteínas ligantes de ferro, sendo considerada uma glicoproteína do tipo β -globina (com cerca de 600-700 aminoácidos em sua composição) e apresentando um peso molecular de cerca de 80 kDa (KAWABATA, 2019). Quando se encontra no plasma sanguíneo, atua regulando os níveis de ferro, ligando-se de forma reversível e com alta afinidade aos íons Fe(III). Dessa maneira, quando ela está ligada aos íons Fe(III) recebe o nome de holo-transferrina (Holo-Tf), possuindo alta afinidade (a nível nanomolar) pelo seu receptor; por outro lado, quando não está ligada ao ferro, é chamada de apo-transferrina (Apo-Tf) e não apresenta afinidade pelo seu receptor (SHEN *et al.*, 2018).

O CD71, mais conhecido como RTf, pode ser encontrado em diversos tipos celulares, a exemplo de: hemácias, hepatócitos, monócitos e bactérias. O primeiro receptor a ser identificado (RTf1) está vinculado à captação intracelular de ferro, e à regulação do crescimento celular, exibindo uma alta expressão em células com alta taxa de proliferação. Já o segundo receptor identificado (RTf2) é intrinsecamente expresso em tecidos responsáveis pelo metabolismo do ferro, tal como no fígado e intestino (JOHNSEN *et al.*, 2019; SHEN *et al.*, 2018).

Como o RTf possui expressão acentuada em células com alta taxa proliferativa, células de câncer podem ter uma maior expressão desse receptor, devido ao elevado nível metabólico e de crescimento celular (JUNG *et al.*, 2021; YU *et al.*, 2019). Este ponto já foi constatado em vários tipos de câncer, como no de mama, ovário, cérebro, estômago, dentre outros (DENG; DUTTA; LIU, 2018; HE; LIN, 2021; LODHI *et al.*, 2021; SHEN *et al.*, 2018). Além disso, parece existir uma correlação entre a expressão de RTf1 e o nível de malignidade tumoral. Devido ao exposto, uma variedade de estratégias com aplicações em terapias antitumorais tem sido estudada para a marcação de ferro intracelular, incluindo a utilização de quelantes de ferro, bem como conjugados citotóxicos mediados pelo RTf (SHEN *et al.*, 2018).

Em termos de mecanismos, a captação de ferro é mediada via clatrina (proteína de membrana encarregada de formar vesículas). Quando a Holo-Tf se liga ao RTf, este é endocitado em vesículas denominadas endossomos. Após este processo, o Fe(III) é reduzido a Fe(II) (em pH ácido), sendo, portanto, liberado pela Holo-Tf e externalizado do endossomo pelo transportador de metais bivalentes (DMT1). Por fim, a Apo-Tf volta à membrana celular e, ao encontrar íons Fe(III), em pH próximo do neutro, ligam-se a estes e reestabelecem um novo ciclo, como pode ser observado na Figura 16 (JOHNSEN *et al.*, 2019; KAWABATA, 2019).

Figura 16 – Captação do ferro pelas células de organismos vertebrados. Em detalhe, observa-se a ligação da holo-transferrina (Holo-Tf) ao receptor de transferrina (RTf), sendo esse complexo endocitado na forma de endossomo. Em seguida, o Fe(III) sofre redução a Fe(II) e é enviado do endossomo ao citoplasma por meio do transportador de metais bivalentes (DMT1). Finalmente, a apo-transferrina (Apo-Tf) retorna à membrana celular e, ao se ligarem novamente aos íons Fe(III), reiniciam um novo ciclo.



Fonte: Adaptada de Christofides *et al.* (2018).

Pelo fato dos RTf se encontrarem superexpressos em algumas linhagens de células de câncer, é relevante a compreensão dos mecanismos envolvidos na captação de ferro pelos RTf. Ainda mais, através de técnicas baseadas em fluorescência, é possível avaliar a dinâmica de internalização e o tráfego desse receptor nas células, bem como quantificá-lo na membrana, fornecendo alta sensibilidade e especificidade (CABRAL FILHO *et al.*, 2018). Nessa perspectiva, Cabral Filho *et al.* (2016), sintetizaram PQs de CdTe e os conjugaram à Tf, para estudar a expressão e a reciclagem de RTfs em células HeLa, bem como em duas linhagens de câncer cerebral - U87 (glioblastoma humano) e DBTRG-05MG (*Denver Brain Tumor Research Group 05* – glioblastoma humano recorrente). Através da microscopia de fluorescência, foi possível observar um padrão de marcação em vesículas e próximo ao núcleo, relativo à interação Tf-RTfs. Pela citometria de fluxo, constatou-se uma superexpressão de RTfs nas células HeLa e DBTRG-05MG (94% e 93%, respectivamente); por outro lado, a U87 que exibiu uma porcentagem de marcação inferior (57%). Segundo os resultados obtidos pelos autores, a linhagem DBTRG-05MG apresentou alta expressão e capacidade de reciclar RTfs, sendo associada a uma elevada atividade metabólica e, por consequência, alto grau de malignidade.

Nesse contexto, Selesi e colaboradores (2021) também sintetizaram nanossistemas baseados em PQs de InP/ZnS, NPs magnéticas de óxido de ferro e Tf

para investigar o perfil de captação e internalização em células U87. Através da microscopia de fluorescência, os autores observaram que as células foram marcadas pelos nanossistemas, exibindo um perfil de internalização completa quando comparadas ao controle (apenas as células marcadas com PQs-NPs magnéticas, sem a Tf). Além disso, ao serem submetidos a um campo magnético externo, a intensidade da marcação aumentou cerca de 3 ×, devido ao efeito cumulativo garantido pelo componente magnético e com alta especificidade aos RTfs presentes em um único sistema (AG SELECI *et al.*, 2021).

Portanto, uma abordagem interessante para quantificar, avaliar e monitorar o tráfego de RTf em diversos tipos de linhagens de células de câncer seria conjugando a Tf aos PQs. Além disso, a Tf pode ser aplicada no direcionamento de ACs multimodais, contribuindo com a existência de mais de um sinal em um mesmo nanossistema. Dessa maneira, esses estudos podem auxiliar a otimização de diagnósticos e terapias que utilizem o RTf como via de entrega intracelular de compostos para realce do contraste para imagens ou até mesmo de fármacos (CHUNG *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2019).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dessa dissertação serão apresentados na forma de um artigo experimental a ser submetido e publicado.

4.1 ARTIGO EM PREPARAÇÃO

Nanossondas Óptico-Magnéticas Baseadas em Pontos Quânticos e Quelatos de DOTA-Gd(III) para Interação Biológica via Receptores de Transferrina

Resumo: A associação de agentes de contraste (ACs) do tipo quelatos de Gd(III) com pontos quânticos (PQs) e biomoléculas sítio-específicas apresenta grande potencial para o estudo da biologia do câncer, unindo a especificidade/sensibilidade das técnicas por fluorescência para investigação celular com a possibilidade de aquisição de imagens por RMN ponderadas em T_1 , com sinal paramagnético aprimorado em relação aos ACs moleculares. O objetivo desse estudo foi desenvolver um nanossistema multimodal, baseado em PQs, quelatos de Gd(III) derivados do DOTA e a transferrina (Tf), a qual foi escolhida por ser uma molécula alvo para receptores de transferrina (RTfs), uma vez que células de câncer podem apresentar alta expressão, captação e reciclagem de RTfs. A ligação covalente entre os PQs e os ACs foi intermediada pela etilenodiamina, gerando nanossondas bimodais que foram conjugadas covalentemente com a Tf. Os nanossistemas foram caracterizados de forma óptica e relaxométrica e a conjugação com a Tf foi avaliada por ensaio fluorescente em microplaca (EFM). A efetividade e a especificidade dos nanossistemas também foram estudadas por meio da marcação fluorescente de células HeLa. A nanossonda multimodal manteve a fluorescência e exibiu um T_1 *ca.* $4,5\times$ menor que o da água e uma relaxividade r_1 maior que a do AC molecular: *ca.* $2\times$ [por Gd(III)] e $50\times$ [por PQ] (a 60 MHz e 37 °C). O EFM indicou uma conjugação efetiva com a Tf, apresentando fluorescência relativa (FR) de *ca.* 1.130%. A marcação citométrica das células HeLa foi de *ca.*

88%, caindo para *ca.* 39% após saturação prévia dos receptores com Tf, indicando especificidade dos multimodais. A microscopia de fluorescência também exibiu uma marcação efetiva das células HeLa pelos multimodais, apresentando um padrão vesicular. Portanto, os nanossistemas multimodais desenvolvidos nesse estudo apresentam potencial para atuar como ACs óptico-magnéticos na investigação de mecanismos biológicos do câncer via RTfs.

Palavras-chave: agentes de contraste; células; fluorescência; nanossistema multimodal

1 - Introdução

A técnica de imagem por ressonância magnética (IRM) vem sendo bastante estudada e aplicada na aquisição de imagens a partir da resolução espacial dos tempos de relaxação T_1 (longitudinal) ou T_2 (transversal) associados aos spins dos prótons de ^1H presentes nos tecidos, exibindo imagens com elevado detalhe anatômico. Na IRM podem ser utilizados agentes de contraste (ACs) para intensificar o sinal a partir da diminuição de T_1 ou T_2 dos ^1H , auxiliando assim em uma diferenciação mais aprimorada entre tecidos normais e patológicos (CABRERA et al., 2017; STASIUK et al., 2013; YANG et al., 2017).

Por outro lado, também merecem destaque as técnicas baseadas em fluorescência, as quais têm possibilitado não somente múltiplas análises por microscopias, como também por fluoroimunoensaios e citometria de fluxo. Elas vêm auxiliando não apenas no entendimento das interações intermoleculares à nível celular e molecular, em tempo real, como também na visualização e na quantificação de biomarcadores biológicos, estejam esses na superfície ou no interior celular. As técnicas fluorescentes também vêm ajudando a monitorar diferentes processos biológicos devido a sua alta sensibilidade [5–6]. No contexto das técnicas baseadas em fluorescência, os pontos quânticos (PQs) – nanocristais de semicondutores – vêm despertando grande interesse, por possuírem propriedades físico-químicas singulares, tais como: (i) excepcional resistência à fotodegradação e (ii) superfície ativa com grupos químicos

aptos para interação com biomoléculas, outras nanopartículas e até mesmo ACs, tais como os quelatos de Gd(III) que são utilizados na aquisição de imagens de IRM ponderadas em T_1 (ALBUQUERQUE et al., 2021; CABRAL FILHO et al., 2018; CUNHA et al., 2018; PEREIRA et al., 2019b).

Assim, nos últimos anos, diferentes grupos vêm buscando desenvolver nanossistemas óptico-magnéticos baseados na conjugação direta de PQs a quelatos de Gd(III) (MA et al., 2018; MCADAMS et al., 2017; PEREIRA et al., 2019), uma vez que essa combinação oferece não somente (i) a perspectiva de unir as vantagens das técnicas baseadas em fluorescência para estudos em nível celular – especialmente quando são utilizados PQs – com a diferenciação anatômica propiciada pela IRM; como também (ii) a possibilidade de concentrar vários quelatos de Gd(III) na superfície dos PQs, favorecendo a preparação de ACs nanoparticulados ainda mais eficientes para IRM.

O desenvolvimento de nanossondas bimodais vem especialmente beneficiando estudos envolvendo a biologia do câncer (STASIUK et al., 2013; YANG et al., 2017), visto que esta é uma doença multifatorial, de grande complexidade e que requer uma melhor compreensão biológica na busca por métodos diagnósticos e terapêuticos ainda mais efetivos e personalizados (DI GREGORIO et al., 2019). Nesse âmbito, sabe-se que as células de câncer, devido a sua alta taxa metabólica, podem apresentar maior expressão, captação e reciclagem de diferentes tipos de receptores na sua membrana extracelular para aumentar o suprimento de nutrientes essenciais para sua proliferação, incluindo os receptores de transferrina (RTfs) (CANDELARIA et al., 2021; SHEN et al., 2018). A Tf é uma proteína ligada ao metabolismo do Fe(III) e os RTfs são responsáveis por captar o complexo de Tf e Fe(III) para o meio intracelular (KAWABATA, 2019). Dessa forma, os RTfs são alvos interessantes para direcionar nanossondas óptico-magnéticas na investigação de eventos biológicos associados ao câncer.

Diferentes trabalhos envolvendo nanossondas baseadas em PQs e quelatos de Gd(III) vêm sendo reportados na literatura (MCADAMS et al., 2017; PEREIRA et al., 2019b; STASIUK et al., 2013; YANG et al., 2017). Há ainda, no entanto, uma busca por nanossistemas que possuam não somente uma melhor manutenção da fluorescência e propriedades magnéticas mais efetivas, mas também tenham afinidade direcionada a alvos celulares chave para a compreensão de processos biológicos. Assim, o objetivo deste estudo foi preparar nanossondas multimodais constituídas por PQs de CdTe, quelatos do tipo DOTA-Gd(III) e Tf. Para tanto, os quelatos DOTA-Gd(III), e em seguida a Tf, foram conjugados na superfície dos PQs por ligação covalente. Os quelatos DOTA-Gd(III) também foram escolhidos por sua estabilidade quanto à transmetalção com íons de importância biológica como Zn(II), que poderia ocorrer *in vivo* (PEREIRA et al., 2019). As propriedades ópticas e relaxométricas da nanossonda multimodal foram então avaliadas, bem como sua capacidade de interagir com células de câncer via RTfs. Para isso, foram utilizadas células de carcinoma cervical humano (HeLa) como modelo, uma vez que os RTfs têm sido amplamente estudados com essa linhagem. Espera-se que os nanossistemas multimodais óptico-magnéticos desenvolvidos possam ser úteis para aplicação em estudos relacionados à biologia do câncer, propiciando avaliações por técnicas baseadas em fluorescência e sinal efetivo para IRM.

2 - Procedimentos Experimentais

2.1 - Síntese e Caracterização Óptica dos PQs

Os PQs de CdTe foram sintetizados segundo procedimentos estabelecidos por nós (TENÓRIO et al., 2015) em duas etapas simultâneas, com pequenas modificações. Na primeira foi preparada uma solução de Cd^{2+} /AMS a partir do precursor CdCl_2 (0,2 mmol) e do estabilizante/funcionalizante ácido mercaptosuccínico (AMS, 0,6 mmol), em pH $\sim 10,5$ ajustado com NaOH (2 M). Já na segunda etapa, foi promovida a redução do telúrio metálico (0,1 mmol), para Te^{2-} , utilizando NaBH_4 , em pH básico e atmosfera inerte de N_2 . Por fim, a solução

contendo Te^{2-} foi adicionada na solução Cd^{2+} /AMS, permanecendo sob agitação e aquecimento (90 – 100 °C) por 5 horas, obtendo-se, dessa maneira, PQs de Cd:Te:AMS na proporção 2:1:6.

Os PQs foram caracterizados de forma óptica por meio de espectroscopias de absorção e emissão utilizando o espectrofotômetro UV-Vis 1800 (*Shimadzu*) e o espectrofluorímetro LS55 (*PerkinElmer*). A partir dos espectros de absorção foi possível estimar o tamanho e a concentração dos PQs (DAGTEPE et al., 2007; YU et al., 2003).

2.2 - Preparação dos Quelatos de DOTA-Gd(III)

Os quelatos de DOTA-Gd(III) foram preparados a partir de uma solução do ligante DOTA [(1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrayl)tetraacetic acid] e de uma solução de GdCl_3 , ambas a 10 mM, conservando a proporção de 10% a mais de ligante em relação a Gd(III). Para tanto, ajustou-se o pH da solução de DOTA (1 mL) para ~5,5 com NaOH (2 M), com posterior ativação dos seus grupos carboxílicos com o uso de agentes de acoplamento em pó *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC – 1,9 mg) e *N*-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS – 2,1 mg) (HERMANSON, 2013). Logo após, a solução de Gd(III) (0,9 mL) foi inserida na solução do ligante ativado DOTA-NHS, sendo mantida sob agitação constante por 24 h, para a coordenação dos Gd(III) ao ligante, obtendo-se o complexo DOTA-NHS-Gd(III) (~ 4,7 mM). Além disso, o pH do complexo foi ajustado com NaOH (2 M) após a preparação, visto que é importante mantê-lo na faixa de ~5,5 pois à medida que há a complexação, há a formação de HCl, reduzindo o pH.

Além disso, para mensurar a eficiência da formação dos quelatos de DOTA-Gd(III) foi aplicado o teste do alaranjado de xilenol (BARGE et al., 2006). Para tanto, primeiramente foi preparada uma solução de tampão acetato, partindo de 717 μL de ácido acético (17,4 M), completando o volume final da solução para 250 mL de água (em balão volumétrico) e ajustando o pH para ~5,8 com NaOH (2 M). Em seguida, pesou-se 0,6 mg do alaranjado de xilenol, que foi diluído em uma alíquota da solução de tampão acetato (50 mL). A solução final

foi então utilizada nas análises, através do espectrofotômetro UV-Vis 1800 (*Shimadzu*). Para as avaliações, utilizou-se o próprio tampão como referência. Já as amostras foram dispostas da seguinte forma: controle (5 µL de água ultrapura e 1 mL da solução de xilenol) e teste (5 µL do quelato e 1 mL da solução de xilenol). Para estimar a porcentagem de incorporação do Gd(III) no ligante, partiu-se da análise das absorbâncias nos comprimentos de onda 576 e 437 nm presentes em cada espectro. Os picos observados foram característicos da solução e em comprimentos de onda semelhantes aos de Barge *et al.* (2006) (BARGE *et al.*, 2006). Foi então calculada a razão entre as absorbâncias A₅₇₆/A₄₃₇ e, a partir de uma curva de calibração, foi determinado o percentual de Gd(III) complexado.

2.3 - Preparação dos Nanossistemas

Os sistemas bimodais foram preparados segundo Pereira *et al.* (PEREIRA *et al.*, 2019b), sendo ofertado o quelato DOTA-NHS-Gd(III) na proporção *ca.* 1:30 (PQs:quelatos). Na preparação do nanossistema bimodal, primeiramente ajustou-se o pH dos PQs para ~5,5 com AMS (4,9%, m/v), sendo logo após ultrafiltrados a 1.119 ×g (*Eppendorf - MiniSpin*), com filtros de 10 kDa por 3 min, a fim de remover os agentes estabilizantes e precursores da síntese excedentes. Em seguida, promoveu-se a ativação dos grupos carboxílicos de 1 mL dos PQs pelos agentes de acoplamento EDC (10 mM) e sulfo-NHS (10 mM). Os volumes das alíquotas dos agentes de acoplamento a serem adicionados foram definidos a partir do número de mols dos PQs multiplicado por 30. Nesse caso, levou-se em consideração o volume necessário de cada componente para ativar 30 grupos carboxílicos, de acordo com a Equação 1:

$$V = \frac{n_{PQ} \times 30}{M} \quad \text{Eq. 1}$$

onde n_{PQ} é o número de mol dos PQs e M é a concentração molar da solução-mãe de cada componente.

Para promover a conjugação covalente entre os PQs e os quelatos de Gd(III), foi utilizada a etilenodiamina (100 mM, ofertada com um excesso de 10× em relação aos outros

componentes mencionados acima) para intermediar a interação, já que ambos componentes, PQs e DOTA-NHS-Gd(III), possuem grupos carboxilados (FUTAMI et al., 2001; HERMANSON, 2008; VUKOVIĆ et al., 2010). Os volumes de etilenodiamina bem como da solução de DOTA-NHS-Gd(III) também foram adicionados de acordo com a Eq. 1. Dessa forma, após a incorporação da etilenodiamina, a suspensão foi novamente ultrafiltrada (1.119 ×g por 3 min) para retirar o excesso dessa molécula. Então, a alíquota de quelato foi adicionada e o nanossistema bimodal foi ultrafiltrado por mais um ciclo, nas mesmas condições das fases anteriores, para retirar os ACs não ligados aos PQs, após incubar a 4 °C por pelo menos 7 dias.

Após caracterizar físico-quimicamente, este sistema bimodal foi conjugado à Tf (holotransferrina – Sigma-Aldrich), formando o sistema multimodal PQs-DOTA-Gd(III)-Tf. Para tanto, foram testadas duas abordagens: sem e com a adição complementar de agentes de acoplamento. Para essa última, foram adicionados EDC (0,4 mg em pó) e sulfo-NHS (0,6 mg em pó) aos bimodais PQs-DOTA-Gd(III) (1 mL) para ativar os grupos carboxílicos remanescentes na superfície dos PQs, e em seguida, adicionou-se 48 µL de Tf (1 mg/mL).

2.4 - Caracterização Óptica e Relaxométrica dos Nanossistemas

Para avaliar como potencial das nanossondas como ACs para IRM, realizou-se caracterizações no relaxômetro *Bruker Minispec mq60* (60 MHz, 1,4 T a 37 °C), usando sequências de pulso de inversão e recuperação (*inversion-recovery*), após 7 dias da preparação. Os volumes finais dos nanossistemas bimodal e multimodal foram conservados aproximadamente iguais para permitir a comparação. Como sabe-se que esses ACs bimodais nanoparticulados são atuantes em T_1 (PEREIRA et al., 2019b), esse tempo de relaxação foi determinado para os nanossistemas e a relaxividade longitudinal (r_1), por PQ e por íon Gd(III) foi calculada, segundo a Equação 2:

$$r_1 = \frac{R_1^{obs} - R_1^{dia}}{c} \quad \text{Eq. 2}$$

onde, C é a concentração por PQ ou por íon Gd(III), R_1^{obs} representa a taxa de relaxação longitudinal ($1/T_1$) dos prótons de ^1H da água observada na presença de íons Gd(III). Já R_1^{dia} (ca. $0,28\text{ s}^{-1}$) é a contribuição diamagnética, sem a presença do íon magnético (PEREIRA et al., 2019b). O tempo de relaxação T_1 dos quelatos de Gd(III) na forma molecular também foi avaliado, estando r_1 (ca. $4\text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) de acordo com a literatura para o campo e temperatura aplicados [7, 25–27]. Além da avaliação das propriedades relaxométricas, caracterizou-se os nanossistemas de forma óptica de acordo com os procedimentos descritos na seção 2.1. A concentração de íons Gd(III) foi também determinada por meio da espectroscopia de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES – *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*). Para a determinação de r_1 foram utilizadas análises de pelo menos uma duplicata.

2.5 - Avaliação da Conjugação

Após a preparação, os multimodais permaneceram a $4\text{ }^\circ\text{C}$ por no mínimo 7 dias, antes de darmos prosseguimento com as análises de ensaio fluorescente em microplaca (EFM) (CARVALHO et al., 2014a). Este método consiste na afinidade de biomoléculas com a microplaca de poliestireno. Nesse caso, as proteínas apresentam afinidade pela placa de poliestireno, mas exibem baixo sinal fluorescente nas condições utilizadas. Os PQs, ao contrário, não possuem afinidade pela microplaca e, por isso, não ficam aderidos, não sendo observado sinal fluorescente significativo na análise. Portanto, só quando há conjugação dos PQs conjugados a biomoléculas é que estes ficam ligados à microplaca e haverá sinal fluorescente significativo, sendo proporcional à eficiência de conjugação. Para haver uma conjugação efetiva, de acordo com Carvalho *et al.*, o sinal da fluorescência relativa (FR), calculado pela Equação 3, observado para o conjugado terá que ser maior que 100% em relação à média dos controles (só proteínas e só PQs). Quanto maior o FR, melhor é a conjugação.

$$FR (\%) = \frac{(FL \text{ Bioconjugado} - FL \text{ Controles})}{FL \text{ Controles}} \times 100\% \quad \text{Eq. 3}$$

Para as análises, foram utilizados como controles apenas PQs e apenas Tf (ambos diluídos na mesma condição do nanossistema multimodal. Todas as amostras (50 µL) foram inseridas em uma microplaca de poliestireno de 96 poços (*Optiplate F HB – PerkinElmer*) e incubadas por 2 h a 37 °C. Logo após, lavou-se os poços 3 vezes com o tampão fosfato salino (PBS 1×) e, finalmente, avaliou-se a FR das amostras por meio do leitor de microplaca *WALLAC 1420 PerkinElmer*, utilizando os filtros BP 405/5 nm para a excitação e BP 595/15 nm para a captação da emissão. Foram realizados pelo menos 3 ensaios em triplicata. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

2.6 - Interação do Nanossistema Multimodal com Células de Câncer

2.6.1 - Cultura Celular

Utilizou-se as células HeLa (*American Type Culture Collection – ATCC*) como modelo mais estudado de célula de câncer, cultivando-as em DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium – Sigma-Aldrich*) suplementado com 100 mg/mL de estreptomicina e 100 unidades/mL de penicilina, além de 10% de soro fetal bovino (FBS – Gibco). As células foram cultivadas em uma incubadora sob atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37 °C. Logo após atingirem uma confluência ideal (80 – 90%), as células passaram por um processo de tripsinização (tripsina 0,25% – Gibco), sendo posteriormente contadas em uma câmara de Neubauer e plaqueadas em placas de cultura de 6 poços (Corning Inc.), com 200.000 células/poço para a citometria de fluxo ou 50.000 células/poço para a análise por microscopia de fluorescência – em placa de cultura de 6 poços (Greiner Bio-One – REF. 657160) ou 4 poços (Greiner Bio-One – REF. 3516), respectivamente. Após a etapa de plaqueamento, as células foram mantidas na incubadora por 24 h, nas mesmas condições acima citadas, para aderirem à placa e seguiram para as análises.

2.6.2 - Análise por Técnicas Fluorescentes

Após a etapa de adesão, as células foram lavadas com PBS, avaliando-as nas seguintes condições: (i) células controle e (ii) células incubadas com o nanossistema multimodal (PBS:sistema, 1:1 v/v), por 60 min. Antes de ser incubado com as células, o nanossistema multimodal teve seus grupos carboxílicos bloqueados com TRIS base (0,1 mM), na proporção 1:20 (TRIS:multimodal, v:v), a fim de bloquear grupos carboxílicos ativados e livres e evitar uma interação inespecífica com as células. Além disso, para confirmar a especificidade do multimodal, realizou-se também ensaios de saturação. Para tanto, foi previamente ofertado excesso de Tf a 5 mg/mL (Tf:PBS, 1:1 v/v) às células, por 60 min.

Nas análises por microscopia, as células também foram incubadas com o marcador fluorescente Hoechst (0,6 µg/mL – Sigma-Aldrich) por 5 min, que foram lavadas por mais duas vezes com PBS antes de serem analisadas pelo microscópio confocal multiespectral (*Fluoview* – *Olympus*). Para observar a fluorescência do multimodal, a emissão foi coletada de 550 a 650 nm, com excitação em 473 nm. Já para o marcador Hoechst, a emissão foi coletada de 490 a 510 nm, com excitação em 473 nm.

A interação também foi analisada por citometria de fluxo (BD Accuri™ C6 – Becton Dickinson). Dessa maneira, as células foram desprendidas da placa de 6 poços com a adição de tripsina-EDTA, seguida de inativação com meio de cultura apropriado (DMEM). Então, as suspensões celulares foram lavadas 3 vezes, por centrifugação em PBS a $400 \times g$ por 2 min (MiniSpin – Eppendorf). Na análise foram adquiridos 20.000 eventos, sob excitação de 488 nm. Foi utilizado o filtro FL4 (675/25 nm) para detectar a emissão. Os dados foram analisados no software BD Accuri. Foram realizados pelo menos três ensaios independentes. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

3 - Resultados e Discussão

3.1 - Caracterizações Ópticas

Os PQs exibiram um espectro de absorção característico, com um primeiro máximo no comprimento de onda de 580 nm, como pode ser constatado na Figura 1A. Da mesma forma, os espectros de absorção de ambos os nanossistemas (bimodal e multimodal) não apresentaram mudanças significativas (dados não apresentados). De acordo com o espectro de absorção, o diâmetro dos PQs foi estimado em aproximadamente 3,4 nm, com uma concentração de *ca.* 6,4 μ M (YU et al., 2003).

A partir dos espectros de emissão, os PQs apresentaram um máximo de emissão em torno de 620 nm, na região espectral do laranja, além de uma largura à meia altura (FWHM) de aproximadamente 57 nm, como apresentado na Figura 1B. Em relação aos nanossistemas, eles permaneceram fluorescentes, sendo observado um deslocamento para a esquerda no bimodal; por outro lado, foi observado um deslocamento sutil para a direita no multimodal, indicando que ocorreu modificações na superfície dos PQs em ambas as situações, assim como já observado por nós com outros nanossistemas (CABRAL FILHO et al., 2016a; MONTEIRO et al., 2020; PEREIRA et al., 2019b). Quanto ao FWHM, os dois nanossistemas apresentaram valores da mesma ordem que o dos PQs.

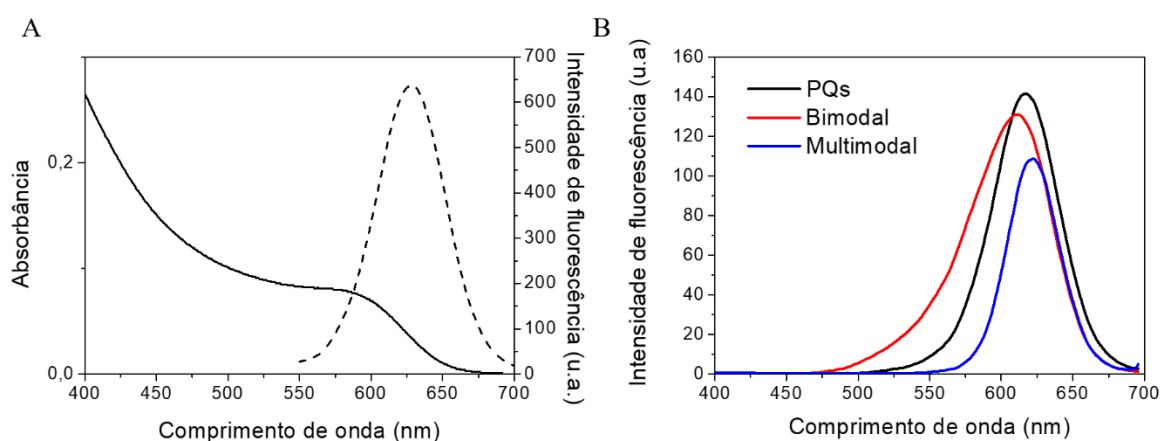


Figura 1 – Caracterização óptica dos PQs e dos nanossistemas bimodal e multimodal. Em A: espectros de emissão (linha tracejada) e absorção (linha contínua) dos PQs. Já em B: espectros de emissão dos PQs (linha preta), do nanossistema bimodal (linha vermelha) e do multimodal (linha azul).

3.2 – Avaliação da Conjugação por EFM

Partindo da Eq. 3, foi obtido um FR de $1.130 \pm 54\%$, conforme apresentado na Tabela 1, quando excesso de EDC e sulfo-NHS foi adicionado. Dessa forma, como já definido por Carvalho *et al.* (2014), pode-se confirmar que ocorreu uma eficiente conjugação entre o nanossistema bimodal e a Tf, pois foi detectado um valor de FR consideravelmente maior que 100% (CARVALHO et al., 2014a). Sem adição de agentes de acoplamento não foi observada uma conjugação satisfatória. Por esse motivo, as análises subsequentes prosseguiram com o sistema elaborado com excesso dos agentes de acoplamento. Utilizando uma concentração final de Tf (88 $\mu\text{g/mL}$) maior do que o presente trabalho, Cabral Filho *et al.* (2018) obtiveram um FR de *ca.* 1.200% ao conjugar um nanossistema bimodal constituído por PQs e nanopartículas magnéticas à Tf, sendo observado, portanto FRs semelhantes.

Tabela 1 – Média da fluorescência relativa (FR), desvio padrão e sinais fluorescentes dos controles e do multimodal.

Amostras	Controles (PQs + Tf)	Multimodal
Sinal Fluorescente médio (u.a.)	$225,8 \pm 8$	2.551 ± 122
Fluorescência Relativa média (FR, %)	-	1.130 ± 54

3.3 - Análises de Eficiência de Complexação e Relaxometria

A partir da avaliação das razões entre os picos A576/A437 do alaranjado de xilenol a quantidade de Gd(III) não complexado ao ligante foi de 0,48 μM , cuja fração é equivalente a ~5% do total esperado na alíquota da solução analisada pelo espectrofotômetro (9,4 μM). Portanto, houve ~95% de complexação dos íons Gd(III) pelo ligante DOTA-NHS, sendo um percentual semelhante ao obtido por Pereira *et al.* (2019) (PEREIRA et al., 2019b).

Foram obtidos T_1 médios (considerando 10% de erro) de 777 e 800 ms, respectivamente na presença dos nanossistemas bimodal e multimodal (a 60 MHz e 37 °C), indicando que ambos

os sistemas levaram à redução do T_1 da água (~ 3600 ms, a 60 MHz e 37 °C). A partir dos tempos de relaxação e concentrações de Gd(III) (obtida por ICP – *ca.* 140 e 120 μM para os sistemas bimodal e multimodal, respectivamente) e de PQs (obtida por meio da espectroscopia de absorção após as lavagens – *ca.* 5 μM), foram calculadas as relaxividades r_1 de ambos os sistemas utilizando a Eq. 2, sendo de *ca.* 7,2 $\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$ e 8 $\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$ por Gd(III) para os nanossistemas bimodal e multimodal, respectivamente, e *ca.* 200 $\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$ por PQ para ambos nanossistemas. Quando comparadas à r_1 do quelato na forma molecular (4 $\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$) (HERMANSON, 2008; PEREIRA et al., 2019b; POWELL et al., 1996), pode-se constatar um aumento de *ca.* 2× [por Gd(III)] e 50× por PQ na relaxividade para o nanossistema multimodal aqui desenvolvido.

Os resultados aqui obtidos para os tempos de relaxação T_1 são da mesma ordem de grandeza dos reportados por Pereira *et al.* (2019), cujo valor encontrado para a nanossonda bimodal, preparada por uma metodologia semelhante, foi de *ca.* 720 ms (a 60 MHz e 37 °C). A relaxividade do nanossistema bimodal aqui obtida, embora ainda maior que a do quelato molecular, foi, no entanto, aproximadamente metade da reportada por Pereira *et al.* (2019). O rendimento de conjugação dos quelatos paramagnéticos aos PQs foi semelhante em ambos os estudos ($\sim 75\%$). A diferença é que no presente estudo foi utilizada uma suspensão mais concentrada de PQs, e consequentemente de Gd(III) também, mas não houve alteração proporcional para T_1 . Assim, acredita-se que mais estudos são necessários para verificar a influência da concentração de PQs na relaxividade.

O processo de relaxação paramagnética dos ACs é baseado nas contribuições da esfera externa, associada à difusão das moléculas de água nas proximidades do íon paramagnético central e da esfera interna, relacionada ao número de moléculas de água coordenadas ao íon central. A maior relaxividade que vêm sendo reportada para ACs nanoparticulados baseados em quelatos de Gd(III) vem sendo associada ao aumento do tempo de rotação dos complexos

paramagnéticos, que ocorre devido à redução da mobilidade desses quelatos paramagnéticos quando ligados a nanopartículas que são pelo menos uma ordem de magnitude maior (FERREIRA et al., 2012; PEREIRA et al., 2019b). Assim, vale ressaltar que os tempos de relaxação T_1 e relaxividades r_1 semelhantes obtidos para os nanossistemas bimodal e multimodal indicam que a conjugação com a Tf não impactou nem na difusão das moléculas ao redor do centro paramagnético e nem no tempo de rotação do sistema, favorecendo uma manutenção de uma relaxividade maior que a do quelato molecular para a nanossonda multimodal.

Há ainda poucos trabalhos envolvendo PQs, quelatos de Gd(III) e moléculas sítio-específicas na literatura (ZHAO et al., 2017), e até onde sabemos não há nanossistemas desse tipo com Tf. Cai *et al.* (2016), no entanto, sintetizaram um sistema multimodal óptico-magnético utilizando o fluoróforo orgânico Cy5,5, quelatos de DTPA-Gd(III) (diethylenetriaminepentaacetic acid-gadolinium) e Tf. Ao serem avaliados pela relaxometria, o sistema exibiu um r_1 de *ca.* $4,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, sendo da mesma ordem do observado para o quelato comercial, avaliado no entanto a 298 MHz (CAI et al., 2016). Zhao *et al.* (2017) produziram um sistema baseado em nanopartículas de Tf contendo Gd(III), sintetizadas pelos processos de biomineralização e precipitação, obtendo uma r_1 de $17 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (também em um maior campo de 128 MHz) *ca.* $4\times$ superior à observada para o Magnevist® ($\sim 4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, agente baseado no ligante). No entanto, esse nanossistema não foi preparado para exibir fluorescência (ZHAO et al., 2017). Assim, o nanossistema obtido no presente trabalho além de exibir sinal óptico, apresentou propriedades relaxométricas interessantes em campo clínico e potencial para ser utilizado em estudos biológicos via interação com RTfs envolvendo IRM.

3.4 - Marcações das Células de Câncer pelo Nanossistema Multimodal

Após os nanossistemas multimodais terem sido incubados com as células HeLa por 60 min, a marcação foi analisada quantitativamente através da citometria de fluxo, sendo

constatada uma marcação média de *ca.* $88\% \pm 4\%$ (Figura 2B). Vale ressaltar que as concentrações utilizadas foram semelhantes às aplicadas em um estudo anterior realizado com nanossistemas bimodais preparados pela mesma metodologia, para as quais não foi constatada citotoxicidade considerável, também utilizando células HeLa (PEREIRA et al., 2019).

A porcentagem de marcação do presente estudo foi comparável com a obtida por Cabral Filho *et al.* (2016), cuja marcação foi de *ca.* 94% utilizando a mesma linhagem celular, mas com conjugados de PQs-Tf sem quelatos de DOTA-Gd(III) (CABRAL FILHO et al., 2016). Após saturação prévia com excesso de Tf, a marcação média pelos multimodais decaiu para *ca.* $39\% \pm 5\%$ (Figura 2C), sugerindo especificidade para internalização dos nanossistemas multimodais via RTfs. Esse é um resultado promissor, considerando também que as células de câncer são capazes de internalizar uma parcela de nanopartículas de forma inespecífica devido ao seu metabolismo acelerado (CABRAL FILHO et al., 2016). Vale, no entanto, realizar mais estudos aumentando a concentração de TRIS para aumentar o bloqueio de grupos carboxílicos ativados na superfície dos PQs e/ou aumentar o tempo de incubação com a Tf no ensaio de saturação.

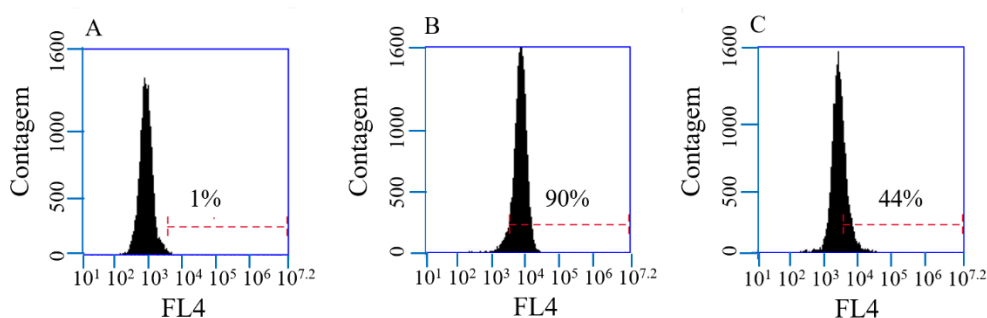


Figura 2 – Histogramas representativos da análise por citometria de fluxo das células HeLa. Em A: controle, apenas as células; em B: células incubadas com nanossistemas multimodais; em C: células incubadas com nanossistemas multimodais após o ensaio de saturação dos RTfs com excesso de Tf.

Através da microscopia de fluorescência, pôde-se observar uma marcação intracelular em vesículas nas células HeLa pelos nanossistemas multimodais (Figura 3). O mesmo padrão

foi observado por Cabral Filho *et al.* (2016), quando incubaram conjugados de PQs-Tf com células da mesma linhagem (CABRAL FILHO *et al.*, 2016).

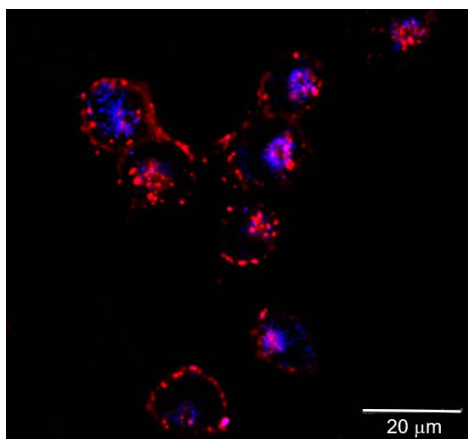


Figura 3 – Imagem de microscopia de fluorescência confocal das células HeLa após serem incubadas com os nanossistemas multimodais (fluorescendo em vermelho). Os núcleos das células foram marcados em azul pelo corante Hoechst. Barra de escala: 20 μm.

4 – Conclusão

Foram desenvolvidos nanossistemas multimodais baseados em PQs de CdTe, quelatos DOTA-Gd(III) e Tf que exibiram estabilidade coloidal e intensa fluorescência. Ademais, os nanossistemas multimodais apresentaram valores de r_1 promissores e superiores ao observado para o quelato molecular. O EFM mostrou que o processo de conjugação com a Tf foi eficiente. O nanossistema multimodal marcou efetivamente as células HeLa, indicando especificidade pelos RTfs. Além disso, foi constatada uma marcação com um padrão vesicular intracelular pelos nanossistemas multimodais. Portanto, os ACs multimodais nanoparticulados desenvolvidos no presente estudo mostraram-se potenciais ferramentas para interação biológica com os RTfs, a fim de elucidar processos biológicos associados ao câncer por técnicas baseadas em fluorescência e IRM.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências de fomento brasileiras: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Fundação de Amparo à Ciência e

Tecnologia (FACEPE); Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Este trabalho também está vinculado ao Instituto Nacional de Fotônica (INCT-INFo).

Referências

AG SELECI, D. et al. Transferrin-Decorated Niosomes with Integrated InP/ZnS Quantum Dots and Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Dual Targeting and Imaging of Glioma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4556, 27 abr. 2021.

ALBUQUERQUE, G. M. et al. Quantum Dots and Gd³⁺ Chelates: Advances and Challenges Towards Bimodal Nanoprobes for Magnetic Resonance and Optical Imaging. **Topics in Current Chemistry**, v. 379, n. 2, p. 12, 7 abr. 2021.

BARGE, A. et al. How to determine free Gd and free ligand in solution of Gd chelates. A technical note. **Contrast Media & Molecular Imaging**, v. 1, n. 5, p. 184–188, set. 2006.

BELLEZA, O. J. V.; NARAGA, A. M. B.; VILLARAZA, A. J. L. Relative Ligand Exchange Rates in Gd-based MRI Contrast Agent Formation as Probed by Gd-XO Complex. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 65, n. 5, p. 561–566, maio 2018.

BENTOLILA, L. A.; MICHALET, X.; WEISS, S. Quantum Optics: Colloidal Fluorescent Semiconductor Nanocrystals (Quantum Dots) in Single-Molecule Detection and Imaging. In: [s.l: s.n.]. p. 53–81.

BOEHM-STURM, P. et al. Low-molecular-weight iron chelates may be an alternative to gadolinium-based contrast agents for T1-weighted contrast-enhanced MR imaging. **Radiology**, v. 286, n. 2, p. 537–546, 2018.

BRIDDON, S. J.; KILPATRICK, L. E.; HILL, S. J. Studying GPCR Pharmacology in Membrane Microdomains: Fluorescence Correlation Spectroscopy Comes of Age. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 39, n. 2, p. 158–174, fev. 2018.

BROWN, R. W. ET AL. Magnetic Resonance Imaging. Physical Principles and Sequence Design. In: **Wiley Blackwell**. 2. ed. [s.l: s.n.]. p. 978.

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, 2016a.

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

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

CABRERA, M. P. et al. Highly fluorescent and superparamagnetic nanosystem for biomedical applications. **Nanotechnology**, v. 28, n. 28, p. 285704, 14 jul. 2017.

CAI, J. et al. A transferrin-target magnetic/fluorescent dual-mode probe significantly enhances the diagnosis of non-small cell lung cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 26, p. 40047–40059, 28 jun. 2016.

CANDELARIA, P. V. et al. Antibodies Targeting the Transferrin Receptor 1 (TfR1) as Direct Anti-cancer Agents. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. March, p. 1–21, 2021.

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, 2014a.

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, 1 maio 2014b.

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

CHUNG, H.-J. et al. Transferrin as a thermosensitizer in radiofrequency hyperthermia for

cancer treatment. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 13505, 10 dez. 2018.

CRACIUN, A.-M. et al. One-photon excited photoluminescence of gold nanospheres and its application in prostate specific antigen detection via fluorescence correlation spectroscopy (FCS). **Talanta**, v. 228, p. 122242, jun. 2021.

CUNHA, C. R. A. et al. Quantum dot–Cramoll lectin as novel conjugates to glycobiology. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 178, p. 85–91, jan. 2018.

DA SILVA, A. R. et al. Quantum dots conjugated to lectins from *Schinus terebinthifolia* leaves (SteLL) and *Punica granatum* sarcotesta (PgTeL) as potential fluorescent nanotools for investigating *Cryptococcus neoformans*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 192, p. 232–240, dez. 2021.

DAGTEPE, P. et al. Quantized growth of CdTe quantum dots; observation of magic-sized CdTe quantum dots. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 41, p. 14977–14983, 2007.

DAWES, M. L.; SOELLER, C.; SCHOLPP, S. Studying molecular interactions in the intact organism: fluorescence correlation spectroscopy in the living zebrafish embryo. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 154, n. 5, p. 507–519, 16 nov. 2020.

DE THOMAZ, A. A. et al. Measurement of the Hydrodynamic Radius of Quantum Dots by Fluorescence Correlation Spectroscopy Excluding Blinking. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 119, n. 11, p. 4294–4299, 19 mar. 2015.

DENG, H.; DUTTA, P.; LIU, J. Stochastic simulations of nanoparticle internalization through transferrin receptor dependent clathrin-mediated endocytosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1862, n. 9, p. 2104–2111, set. 2018.

DI GREGORIO, E. et al. Use of FCC-NMRD relaxometry for early detection and characterization of ex-vivo murine breast cancer. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 4624, 15 dez. 2019.

DÍAZ-GONZÁLEZ, M. et al. Quantum Dot bioconjugates for diagnostic applications. **Topics**

in **Current Chemistry**, v. 378, n. 2, 2020.

FARZIN, A. et al. Magnetic Nanoparticles in Cancer Therapy and Diagnosis. **Advanced Healthcare Materials**, v. 9, n. 9, p. 1–29, 2020.

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

FUTAMI, J. et al. Preparation of Potent Cytotoxic Ribonucleases by Cationization: Enhanced Cellular Uptake and Decreased Interaction with Ribonuclease Inhibitor by Chemical Modification of Carboxyl Groups. **Biochemistry**, v. 40, n. 25, p. 7518–7524, 1 jun. 2001.

HE, G. Z.; LIN, W. J. Peptide-Functionalized Nanoparticles-Encapsulated Cyclin-Dependent Kinases Inhibitor Seliciclib in Transferrin Receptor Overexpressed Cancer Cells. **Nanomaterials**, v. 11, n. 3, p. 772, 18 mar. 2021.

HE, Z. et al. A review on methods for diagnosis of breast cancer cells and tissues. **Cell Proliferation**, v. 53, n. 7, p. 1–16, 2020.

HERMANSON, G. T. **Bioconjugate Techniques**. [s.l: s.n.]. v. 53

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

JOHNSEN, K. B. et al. Targeting the transferrin receptor for brain drug delivery. **Progress in Neurobiology**, v. 181, p. 101665, out. 2019.

JUNG, S.-Y. et al. Depletion of ST6GALNACIII retards A549 non-small cell lung cancer cell proliferation by downregulating transferrin receptor protein 1 expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 575, p. 78–84, out. 2021.

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, 12 jun. 2013.

KAWABATA, H. Transferrin and transferrin receptors update. **Free Radical Biology and**

Medicine, v. 133, p. 46–54, mar. 2019.

KHALEDIAN, S. et al. Applications of novel quantum dots derived from layered materials in cancer cell imaging. **FlatChem**, v. 27, n. March, p. 100246, 2021.

KUMAR, N.; SINHA RAY, S. **Synthesis and functionalization of nanomaterials**. [s.l.] Springer International Publishing, 2018. v. 277

LI, Y. et al. Transferrin receptor-targeted redox/pH-sensitive podophyllotoxin prodrug micelles for multidrug-resistant breast cancer therapy. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 7, n. 38, p. 5814–5824, 2019.

LODHI, M. S. et al. Probing Transferrin Receptor Overexpression in Gastric Cancer Mice Models. **ACS Omega**, v. 6, n. 44, p. 29893–29904, 9 nov. 2021.

MA, J. J. et al. Gd-DTPA-coupled Ag₂Se quantum dots for dual-modality magnetic resonance imaging and fluorescence imaging in the second near-infrared window. **Nanoscale**, v. 10, n. 22, p. 10699–10704, 2018.

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.

MARTYNENKO, I. V. et al. Application of semiconductor quantum dots in bioimaging and biosensing. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, n. 33, p. 6701–6727, 2017.

MATEA, C. T. et al. Quantum dots in imaging, drug delivery and sensor applications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 5421–5431, 2017.

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

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

MONTEIRO, C. A. P. et al. Evaluating internalization and recycling of folate receptors in breast

cancer cells using quantum dots. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 209, p. 111918, ago. 2020.

OLIVEIRA, W. F. et al. Bauhinia monandra leaf lectin (BmoLL) conjugated with quantum dots as fluorescent nanoprobes for biological studies: application to red blood cells. **Methods and Applications in Fluorescence**, v. 8, n. 3, p. 035009, 7 jul. 2020.

PEREIRA, G. et al. (Bio)conjugation Strategies Applied to Fluorescent Semiconductor Quantum Dots. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 12, p. 2536–2560, 2019a.

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

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

POWELL, D. H. et al. Structural and Dynamic Parameters Obtained from ¹⁷O NMR, EPR, and NMRD Studies of Monomeric and Dimeric Gd³⁺ Complexes of Interest in Magnetic Resonance Imaging: An Integrated and Theoretically Self-Consistent Approach 1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 39, p. 9333–9346, 1 jan. 1996.

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

RIBEIRO, J. F. F. et al. Quantum dot-based fluoroassays for Zika. In: **Zika Virus Impact, Diagnosis, Control, and Models**. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 283–292.

ROCO, M. C. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 337–346, jun. 2003.

SAHL, S. J.; HELL, S. W.; JAKOBS, S. Fluorescence nanoscopy in cell biology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 18, n. 11, p. 685–701, 2017.

- SANTOS, B. S.; FARIAS, P. M. A.; FONTES, A. Semiconductor Quantum Dots for Biological Applications. **Handbook of Self Assembled Semiconductor Nanostructures for Novel Devices in Photonics and Electronics**, p. 773–798, 2008.
- SHEN, Y. et al. Transferrin receptor 1 in cancer: a new sight for cancer therapy. **American journal of cancer research**, v. 8, n. 6, p. 916–931, 2018.
- SHI, X.-D. et al. Synthesis, characterization, and biological activity of selenium nanoparticles conjugated with polysaccharides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 13, p. 2225–2236, 20 jul. 2021.
- 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. 377–85, 2004.
- SOUSA, J. C. L. et al. Effect of Mercaptosuccinic Acid Stabilizer Agent on the Optical Properties of Colloidal CdTe Quantum Dots. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 18, n. 1, p. 651–658, 1 jan. 2018.
- STASIUK, G. J. et al. Cell-Permeable Ln(III) Chelate-Functionalized InP Quantum Dots As Multimodal Imaging Agents. **ACS Nano**, v. 5, n. 10, p. 8193–8201, 25 out. 2011.
- STASIUK, G. J. et al. Optimizing the relaxivity of Gd(III) complexes appended to InP/ZnS quantum dots by linker tuning. **Dalton Transactions**, v. 42, n. 23, p. 8197, 2013.
- TENÓRIO, D. P. L. A. et al. CdTe quantum dots conjugated to concanavalin A as potential fluorescent molecular probes for saccharides detection in *Candida albicans*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 142, p. 237–243, jan. 2015.
- VERWILST, P. et al. Recent advances in Gd-chelate based bimodal optical/MRI contrast agents. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 7, p. 1791–1806, 2015.
- VUKOVIĆ, G. D. et al. Removal of cadmium from aqueous solutions by oxidized and ethylenediamine-functionalized multi-walled carbon nanotubes. **Chemical Engineering Journal**, v. 157, n. 1, p. 238–248, 15 fev. 2010.

- WAGNER, A. M. et al. Quantum dots in biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, v. 94, p. 44–63, 2019.
- YAN, Y.; SUN, X.; SHEN, B. Contrast agents in dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging. **Oncotarget**, v. 8, n. 26, p. 43491–43505, 27 jun. 2017.
- YANG, Y. et al. CuInS₂/ZnS Quantum Dots Conjugating Gd(III) Chelates for Near-Infrared Fluorescence and Magnetic Resonance Bimodal Imaging. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 9, n. 28, p. 23450–23457, 2017.
- YU, H. et al. Sulfasalazine-induced ferroptosis in breast cancer cells is reduced by the inhibitory effect of estrogen receptor on the transferrin receptor. **Oncology Reports**, 6 jun. 2019.
- YU, W. W. et al. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. **Chemistry of Materials**, v. 15, n. 14, p. 2854–2860, 2003.
- ZHAO, Y. et al. Tumor-Targeted and Clearable Human Protein-Based MRI Nanoprobes. **Nano Letters**, v. 17, n. 7, p. 4096–4100, 12 jul. 2017.
- ZHOU, Z.; LU, Z.-R. Gadolinium-based contrast agents for magnetic resonance cancer imaging. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 5, n. 1, p. 1–18, jan. 2013.

5 CONCLUSÕES

- Foram preparados quelatos de DOTA-Gd(III) com alto rendimento de complexação do íon paramagnético pelo ligante (ca. 95%).
- As caracterizações relaxométricas indicaram que os quelatos DOTA-Gd(III) foram satisfatoriamente conjugados na superfície dos PQs.
- O EFM indicou que houve uma conjugação efetiva do nanossistema bimodal com a Tf.
- O nanossistema multimodal exibiu um T_1 cerca de 4,5× menor que o da água e r_1 cerca de 2× e 50× maior que a do quelato molecular por Gd(III) e PQ, respectivamente (a 37 °C e 60 MHz), apresentando, portanto, um sinal magnético interessante para aplicações.
- O nanossistema multimodal também apresentou intensa fluorescência, exibindo propriedades ópticas promissoras para aplicações.
- As células HeLa captaram os nanossistemas multimodais baseados em Tf de forma significativa, indicando especificidade pelos RTfs.
- Dessa maneira, o nanossistema multimodal óptico-magnético desenvolvido nesse trabalho, baseado em PQs, quelatos de DOTA-Gd(III) e Tf, possui um potencial interessante para aplicações associadas à biologia do câncer, envolvendo imagens ponderadas em T_1 por IRM e ensaios fluorescentes. É relevante, no entanto, realizar reproduções de preparação, caracterização e aplicações dos nanossistemas, envolvendo também outras linhagens celulares, bem como avaliar as características relaxométricas da nanossonda após interação com células.

6 SÚMULA CURRICULAR

Principais atividades científicas e acadêmicas:

1. Artigo Científico:

- MONTEIRO, C. A. P., OLIVEIRA, A. D. P. R., SILVA, R. C., LIMA, R. R. M. *et al.* Evaluating internalization and recycling of folate receptors in breast cancer cells using quantum dots. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 209, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111918>.

2. Participação em Eventos:

- LIMA, R. R. M. *et al.* **Sistemas multimodais óptico-paramagnéticos para o estudo de receptores de transferrina.** V Congresso Regional da Sociedade Brasileira de Biofísica, Apresentação de trabalho, 2019.
- LIMA, R. R. M. **VI Congresso Internacional das Licenciaturas**, Ouvinte, 2019.
- LIMA, R. R. M. **Seminário de Física, Engenharia e Neurociências em Pernambuco – Neurophys**, Ouvinte, 2019.
- LIMA, R. R. M. *et al.* **Estudo da Captação da Glicose pelas Células Cancerígenas Utilizando Pontos Quânticos**, II Workshop Entre Luzes e Cristais, Apresentação de trabalho, 2019.
- LIMA, R. R. M. **III Workshop Entre Luzes e Cristais**, Ouvinte, 2020.
- LIMA, R. R. M. **I Fórum Online de Tecnologias da Luz na Saúde**, Ouvinte, 2020.

3. Projetos de Pesquisa:

- Nanoplateformas Multifuncionais Baseadas em Pontos Quânticos Para Estudo da Captação de Glicose em Células de Câncer. Situação: em andamento (FACEPE).

- Plataformas Ópticas Multifuncionais para Aplicações em Ciências da Vida.
Situação: em andamento (CNPq), 2019-2021.

REFERÊNCIAS

- AG SELECI, D. et al. Transferrin-Decorated Niosomes with Integrated InP/ZnS Quantum Dots and Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Dual Targeting and Imaging of Glioma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4556, 27 abr. 2021.
- ALBUQUERQUE, G. M. et al. Quantum Dots and Gd³⁺ Chelates: Advances and Challenges Towards Bimodal Nanoprobes for Magnetic Resonance and Optical Imaging. **Topics in Current Chemistry**, v. 379, n. 2, p. 12, 7 abr. 2021.
- BARGE, A. et al. How to determine free Gd and free ligand in solution of Gd chelates. A technical note. **Contrast Media & Molecular Imaging**, v. 1, n. 5, p. 184–188, set. 2006.
- BELLEZA, O. J. V.; NARAGA, A. M. B.; VILLARAZA, A. J. L. Relative Ligand Exchange Rates in Gd-based MRI Contrast Agent Formation as Probed by Gd-XO Complex. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 65, n. 5, p. 561–566, maio 2018.
- BENTOLILA, L. A.; MICHALET, X.; WEISS, S. Quantum Optics: Colloidal Fluorescent Semiconductor Nanocrystals (Quantum Dots) in Single-Molecule Detection and Imaging. In: [s.l: s.n.]. p. 53–81.
- BOEHM-STURM, P. et al. Low-molecular-weight iron chelates may be an alternative to gadolinium-based contrast agents for T1-weighted contrast-enhanced MR imaging. **Radiology**, v. 286, n. 2, p. 537–546, 2018.
- BRIDDON, S. J.; KILPATRICK, L. E.; HILL, S. J. Studying GPCR Pharmacology in Membrane Microdomains: Fluorescence Correlation Spectroscopy Comes of Age. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 39, n. 2, p. 158–174, fev. 2018.
- BROWN, R. W. ET AL. Magnetic Resonance Imaging. Physical Principles and Sequence Design. In: **Wiley Blackwell**. 2. ed. [s.l: s.n.]. p. 978.
- 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, 2016a.
- CABRAL FILHO, P. E. et al. CdTe quantum dots as fluorescent probes to study transferrin receptors in glioblastoma cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1860, n. 1, p. 28–35, jan. 2016b.
- CABRAL FILHO, P. E. et al. Multimodal highly fluorescent-magnetic nanoplatform to target transferrin receptors in cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1862, n. 12, p. 2788–2796, dez. 2018.
- CABRERA, M. P. et al. Highly fluorescent and superparamagnetic nanosystem for biomedical applications. **Nanotechnology**, v. 28, n. 28, p. 285704, 14 jul. 2017.
- CAI, J. et al. A transferrin-target magnetic/fluorescent dual-mode probe significantly

enhances the diagnosis of non-small cell lung cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 26, p. 40047–40059, 28 jun. 2016.

CANDELARIA, P. V. et al. Antibodies Targeting the Transferrin Receptor 1 (TfR1) as Direct Anti-cancer Agents. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. March, p. 1–21, 2021.
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, 2014a.

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, 1 maio 2014b.

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

CHUNG, H.-J. et al. Transferrin as a thermosensitizer in radiofrequency hyperthermia for cancer treatment. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 13505, 10 dez. 2018.

CRACIUN, A.-M. et al. One-photon excited photoluminescence of gold nanospheres and its application in prostate specific antigen detection via fluorescence correlation spectroscopy (FCS). **Talanta**, v. 228, p. 122242, jun. 2021.

CUNHA, C. R. A. et al. Quantum dot–Cramoll lectin as novel conjugates to glycobiology. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 178, p. 85–91, jan. 2018.

DA SILVA, A. R. et al. Quantum dots conjugated to lectins from *Schinus terebinthifolia* leaves (SteLL) and *Punica granatum* sarcotesta (PgTeL) as potential fluorescent nanotools for investigating *Cryptococcus neoformans*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 192, p. 232–240, dez. 2021.

DAGTEPE, P. et al. Quantized growth of CdTe quantum dots; observation of magic-sized CdTe quantum dots. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 41, p. 14977–14983, 2007.

DAWES, M. L.; SOELLER, C.; SCHOLPP, S. Studying molecular interactions in the intact organism: fluorescence correlation spectroscopy in the living zebrafish embryo. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 154, n. 5, p. 507–519, 16 nov. 2020.

DE THOMAZ, A. A. et al. Measurement of the Hydrodynamic Radius of Quantum Dots by Fluorescence Correlation Spectroscopy Excluding Blinking. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 119, n. 11, p. 4294–4299, 19 mar. 2015.

DENG, H.; DUTTA, P.; LIU, J. Stochastic simulations of nanoparticle internalization through transferrin receptor dependent clathrin-mediated endocytosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1862, n. 9, p. 2104–2111, set. 2018.

DI GREGORIO, E. et al. Use of FCC-NMRD relaxometry for early detection and

characterization of ex-vivo murine breast cancer. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 4624, 15 dez. 2019.

DÍAZ-GONZÁLEZ, M. et al. Quantum Dot bioconjugates for diagnostic applications. **Topics in Current Chemistry**, v. 378, n. 2, 2020.

FARZIN, A. et al. Magnetic Nanoparticles in Cancer Therapy and Diagnosis. **Advanced Healthcare Materials**, v. 9, n. 9, p. 1–29, 2020.

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

FUTAMI, J. et al. Preparation of Potent Cytotoxic Ribonucleases by Cationization: Enhanced Cellular Uptake and Decreased Interaction with Ribonuclease Inhibitor by Chemical Modification of Carboxyl Groups. **Biochemistry**, v. 40, n. 25, p. 7518–7524, 1 jun. 2001.

HE, G. Z.; LIN, W. J. Peptide-Functionalized Nanoparticles-Encapsulated Cyclin-Dependent Kinases Inhibitor Seliciclib in Transferrin Receptor Overexpressed Cancer Cells. **Nanomaterials**, v. 11, n. 3, p. 772, 18 mar. 2021.

HE, Z. et al. A review on methods for diagnosis of breast cancer cells and tissues. **Cell Proliferation**, v. 53, n. 7, p. 1–16, 2020.

HERMANSON, G. T. **Bioconjugate Techniques**. [s.l.: s.n.]. v. 53
HERMANSON, G. T. The Reactions of Bioconjugation. **Bioconjugate Techniques**, p. 229–258, 2013.

JOHNSEN, K. B. et al. Targeting the transferrin receptor for brain drug delivery. **Progress in Neurobiology**, v. 181, p. 101665, out. 2019.

JUNG, S.-Y. et al. Depletion of ST6GALNACIII retards A549 non-small cell lung cancer cell proliferation by downregulating transferrin receptor protein 1 expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 575, p. 78–84, out. 2021.

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, 12 jun. 2013.

KAWABATA, H. Transferrin and transferrin receptors update. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 133, p. 46–54, mar. 2019.

KHALEDIAN, S. et al. Applications of novel quantum dots derived from layered materials in cancer cell imaging. **FlatChem**, v. 27, n. March, p. 100246, 2021.

KUMAR, N.; SINHA RAY, S. **Synthesis and functionalization of nanomaterials**. [s.l.] Springer International Publishing, 2018. v. 277

- LI, Y. et al. Transferrin receptor-targeted redox/pH-sensitive podophyllotoxin prodrug micelles for multidrug-resistant breast cancer therapy. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 7, n. 38, p. 5814–5824, 2019.
- LODHI, M. S. et al. Probing Transferrin Receptor Overexpression in Gastric Cancer Mice Models. **ACS Omega**, v. 6, n. 44, p. 29893–29904, 9 nov. 2021.
- MA, J. J. et al. Gd-DTPA-coupled Ag₂Se quantum dots for dual-modality magnetic resonance imaging and fluorescence imaging in the second near-infrared window. **Nanoscale**, v. 10, n. 22, p. 10699–10704, 2018.
- 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.
- MARTYNENKO, I. V. et al. Application of semiconductor quantum dots in bioimaging and biosensing. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, n. 33, p. 6701–6727, 2017.
- MATEA, C. T. et al. Quantum dots in imaging, drug delivery and sensor applications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 5421–5431, 2017.
- MCADAMS, S. G. et al. High magnetic relaxivity in a fluorescent CdSe/CdS/ZnS quantum dot functionalized with MRI contrast molecules. **Chemical Communications**, v. 53, n. 76, p. 10500–10503, 2017.
- MICHALET, X.; BENTOLILA, L. A.; WEISS, S. Molecular Imaging: Physics and Bioapplications of Quantum Dots. **Advances in Medical Physics**, p. 111–127, 2008.
- MONTEIRO, C. A. P. et al. Evaluating internalization and recycling of folate receptors in breast cancer cells using quantum dots. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 209, p. 111918, ago. 2020.
- OLIVEIRA, W. F. et al. Bauhinia monandra leaf lectin (BmoLL) conjugated with quantum dots as fluorescent nanoprobe for biological studies: application to red blood cells. **Methods and Applications in Fluorescence**, v. 8, n. 3, p. 035009, 7 jul. 2020.
- PEREIRA, G. et al. (Bio)conjugation Strategies Applied to Fluorescent Semiconductor Quantum Dots. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 12, p. 2536–2560, 2019a.
- PEREIRA, G. A.; GERALDES, C. F. G. C. Design and Optimization of Gadolinium Based Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. **Ann. Magn. Reson.**, v. 6, n. 1/2, p. 1–33, 2007.
- PEREIRA, M. I. A. et al. Hydrophilic Quantum Dots Functionalized with Gd(III)-DO3A Monoamide Chelates as Bright and Effective T₁-weighted Bimodal Nanoprobes. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019b.
- POWELL, D. H. et al. Structural and Dynamic Parameters Obtained from ¹⁷O NMR, EPR, and NMRD Studies of Monomeric and Dimeric Gd³⁺ Complexes of Interest in Magnetic Resonance Imaging: An Integrated and Theoretically Self-Consistent

Approach 1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 39, p. 9333–9346, 1 jan. 1996.

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

RIBEIRO, J. F. F. et al. Quantum dot-based fluoroassays for Zika. In: **Zika Virus Impact, Diagnosis, Control, and Models**. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 283–292.

ROCO, M. C. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 337–346, jun. 2003.

SAHL, S. J.; HELL, S. W.; JAKOBS, S. Fluorescence nanoscopy in cell biology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 18, n. 11, p. 685–701, 2017.

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

SHEN, Y. et al. Transferrin receptor 1 in cancer: a new sight for cancer therapy. **American journal of cancer research**, v. 8, n. 6, p. 916–931, 2018.

SHI, X.-D. et al. Synthesis, characterization, and biological activity of selenium nanoparticles conjugated with polysaccharides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 13, p. 2225–2236, 20 jul. 2021.

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. 377–85, 2004.

SOUSA, J. C. L. et al. Effect of Mercaptosuccinic Acid Stabilizer Agent on the Optical Properties of Colloidal CdTe Quantum Dots. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 18, n. 1, p. 651–658, 1 jan. 2018.

STASIUK, G. J. et al. Cell-Permeable Ln(III) Chelate-Functionalized InP Quantum Dots As Multimodal Imaging Agents. **ACS Nano**, v. 5, n. 10, p. 8193–8201, 25 out. 2011.

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

TENÓRIO, D. P. L. A. et al. CdTe quantum dots conjugated to concanavalin A as potential fluorescent molecular probes for saccharides detection in *Candida albicans*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 142, p. 237–243, jan. 2015.

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

VUKOVIĆ, G. D. et al. Removal of cadmium from aqueous solutions by oxidized and

ethylenediamine-functionalized multi-walled carbon nanotubes. **Chemical Engineering Journal**, v. 157, n. 1, p. 238–248, 15 fev. 2010.

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

YAN, Y.; SUN, X.; SHEN, B. Contrast agents in dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging. **Oncotarget**, v. 8, n. 26, p. 43491–43505, 27 jun. 2017.

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

YU, H. et al. Sulfasalazine-induced ferroptosis in breast cancer cells is reduced by the inhibitory effect of estrogen receptor on the transferrin receptor. **Oncology Reports**, 6 jun. 2019.

YU, W. W. et al. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. **Chemistry of Materials**, v. 15, n. 14, p. 2854–2860, 2003.

ZHAO, Y. et al. Tumor-Targeted and Clearable Human Protein-Based MRI Nanoprobes. **Nano Letters**, v. 17, n. 7, p. 4096–4100, 12 jul. 2017.

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