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

GABRIELA MARQUES DE ALBUQUERQUE

Desenvolvimento de agentes de contraste bimodais para imagem óptica e por ressonância magnética baseados em pontos quânticos de CdTe e quelatos de Gd (III)

Recife
2020

GABRIELA MARQUES DE ALBUQUERQUE

Desenvolvimento de agentes de contraste bimodais para imagem óptica e por ressonância magnética baseados em pontos quânticos de CdTe e quelatos de Gd (III)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Química. Área de concentração: química inorgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Giovannia Araújo de Lima Pereira

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Goreti Carvalho Pereira

Recife
2020

Catalogação na fonte
Bibliotecária Monick Raquel Silvestre da S. Portes, CRB4-1217

A345d Albuquerque, Gabriela Marques de
Desenvolvimento de agentes de contraste bimodais para imagem óptica e por ressonância magnética baseados em pontos quânticos de CdTe e quelatos de Gd (III) / Gabriela Marques de Albuquerque. – 2020.
127 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Giovannia Araújo de Lima Pereira.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN, Química, Recife, 2020.
Inclui referências e apêndice.

1. Química inorgânica. 2. Ressonância magnética. I. Pereira, Giovannia Araújo de Lima (orientadora). II. Título.

546 CDD (23. ed.) UFPE- CCEN 2021 - 112

GABRIELA MARQUES DE ALBUQUERQUE

DESENVOLVIMENTO DE AGENTES DE CONTRASTE BIMODAIS PARA IMAGEM ÓPTICA E POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA BASEADOS EM PONTOS QUÂNTICOS DE CDTE E QUELATOS DEGD (III).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da UniversidadeFederal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada em: 30/10/2020

BANCA EXAMINADORA

_____

Profª. Giovannia Araújo de Lima Pereira (Orientadora)
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Prof. Dr. Ricardo Oliveira da Silva
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Prof.ª Dra. Andreia Gerniski Macedo
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Departamento de Química Fundamental: técnicos, professores, servidores; especialmente Patrícia Rosa que sempre foi muito atenciosa e prestativa, me salvando por diversas vezes.

Às minhas orientadoras, Profª Giovannia Pereira e Profª Goreti Pereira, por aguentarem a minha cabeça dura, me socorrerem nas crises de choro e nunca medirem esforços para me ajudar.

Aos integrantes do LINCC: Samantha Coiado, Izabel Souza Sobrinha, Mércia Freire, Jailson José, Joalen Pereira, Ingrid Valeriano, Wedja Maciel e Larissa Dias. Especialmente Izabel por contribuir nos experimentos e tentar me transformar em uma pessoa melhor nas horas vagas. Samantha, por ter a coragem de dividir a bancada comigo, aguentando meu jeito metódico e desvendando o significado dos meus sonhos aleatórios.

À minha família, especialmente Natália Albuquerque, Tarcísio Lima e Geise Nascimento, que são meu porto seguro e vibram com minhas conquistas como se eu tivesse ganho o Nobel.

Aos meus amigos que nunca entendem com que eu realmente trabalho, mas sempre acham que é algo fantástico e que um dia dominarei o mundo. Especialmente Letícia Santos por dividir as aflições acadêmicas desde a graduação.

RESUMO

A imagem por ressonância magnética (IRM) é uma técnica de diagnóstico que apresenta vantagens frente a outras técnicas. Apesar de possuir boa resolução espacial, por vezes se faz necessário o uso de agentes de contraste (ACs). Os ACs atuam diminuindo os tempos de relaxação dos núcleos de hidrogênio das moléculas de água presentes no meio, melhorando o realce das imagens. Os complexos de gadolínio estão entre os ACs mais utilizados clinicamente. A baixa sensibilidade da IRM apresenta limitações na detecção de eventos à nível celular e molecular. Dessa forma, a nanotecnologia vem contribuindo com novas estratégias para suprimir tais limitações, desenvolvendo sistemas bimodais nanoparticulados. Entre eles, os sistemas compostos por *Quantum Dots* (QDs) e quelatos de gadolínio, originam sistemas com propriedades fluorescentes e paramagnéticas. Os QDs são nanocristais de semicondutores que se destacam pelas suas propriedades ópticas únicas e por possuírem superfície ativa para conjugação com (bio)moléculas, aumentando a sua aplicação nas Ciências Biomédicas. Assim, o presente trabalho visa desenvolver nanossondas bimodais baseadas em QDs de telureto de cádmio conjugados com complexos de Gd (III), através de uma metodologia prática e simples usando ligações dativas. Os QDs de CdTe foram funcionalizados com três agentes estabilizantes diferentes, utilizando o método de preparação *one-pot* em meio aquoso. Foram preparados cinco complexos de Gd (III) tiolados, a fim de avaliar a influência de cada modificação nas propriedades ópticas e nas relaxométricas dos sistemas bimodais preparados. Os complexos de Gd (III) foram associados com os QDs através da ligação tiol-metal. Foram ainda preparados dois sistemas bimodais através de ligação covalente entre os QDs e os complexos para fins de comparação do método. A eficiência da complexação foi avaliada pelo teste do alaranjado de xilenol. Verificou-se que os sistemas preparados com o CdTe estabilizado com cisteamina e ácido mercaptossuccínico mantiveram as propriedades ópticas dos QDs e apresentaram propriedades relaxométricas interessantes. Estes resultados indicam que os sistemas bimodais desenvolvidos nesta dissertação são potenciais agentes de contraste para imagem óptica e por ressonância magnética.

Palavras-chave: *Quantum dots*. Complexos de gadolínio. Fluorescência. Ressonância magnética.

ABSTRACT

Magnetic resonance imaging (MRI) is a diagnostic technique that has advantages over other techniques. Despite having good spatial resolution, it is sometimes necessary to improve the enhancement in the images, using contrast agents (CAs). These act by decreasing the relaxation time of the hydrogen nuclei of the water molecules present in the medium. Gadolinium complexes have been widely used clinically as CAs. The MRI low sensitivity has limitations to study events at the cellular and molecular level. Thus, nanotechnology has been contributing with new strategies to suppress such limitations, developing nanoparticulate bimodal systems. Among them, the systems composed of quantum dots (QDs) and gadolinium chelates, obtaining systems with fluorescent and paramagnetic properties. QDs are semiconductor nanocrystals that stand out for their unique optical properties and have an active surface for conjugation with (bio)molecules, increasing their application in Biomedical Sciences. The present work aims to develop bimodal nanoprobes based on QDs of cadmium telluride conjugated to Gd (III) complexes, through a practical and simple methodology using dative bonds. For this study, the CdTe QDs were functionalized with three different stabilizing agents, using one-pot preparation method. Five thiolated Gd (III) complexes were prepared to assess the influence of each modification on the optical and relaxometric properties of the prepared bimodal systems. The Gd (III) complexes were associated with the QDs through thiol-metal bonding, and two bimodal systems were also prepared through covalent bonding between the QDs and the complexes to compare the conjugation method. Complexation efficiency was evaluated by the xylene orange test. It was found that the systems prepared with CdTe stabilized with cysteamine and mercaptosuccinic acid maintained the optical properties of the QDs and presented interesting relaxometric properties. Thus, these results indicate that the bimodal systems developed in this dissertation has potential as contrast agents for optical and magnetic resonance imaging.

Keywords: Quantum dots. Gadolinium complexes. Fluorescence. Magnetic resonance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Movimento de rotação e precessão do próton ^{1}H na presença de um campo magnético externo..... 18

Figura 2 – Perfil dos spins nucleares: A) Após indução de um campo magnético; B) Após transmissão de um pulso de 90° na frequência de Larmor; C) Retornando à posição de equilíbrio; D) Comportamento dos prótons ao se alinharem novamente na direção do campo magnético..... 20

Figura 3 – Exemplificação gráfica da medida de T_1..... 21

Figura 4 – Ilustração de uma curva de medida de T_2..... 22

Figura 5 – Representação do mecanismo de relaxação nas esferas de coordenação..... 23

Figura 6 – ACs mais utilizados clinicamente. a) DTPA-Gd; b) (DTPA-BMA)-Gd; c) BOPTA-Gd; d) DOTA-Gd; e) (DO3A-butrol)-Gd 27

Figura 7 – Estrutura do alaranjado de xilenol..... 28

Figura 8 – Alteração na coloração da solução do alaranjado de xilenol: A) sem a presença de metais livres; B) após adicionar solução de Gd (III)..... 29

Figura 9 – Espectro de absorção do alaranjado de xilenol..... 29

Figura 10 – Representação da estrutura do complexo [GdDO3MA] utilizado no estudo de Messeri *et al*..... 31

Figura 11 – Representação esquemática do processo de emissão de luz: a) Gd antes de ser excitado; b) após absorver energia; c) emissão de energia na forma de luz..... 33

Figura 12 – Diagrama de La Mer..... 35

Figura 13 – Representação esquemática do procedimento de preparação dos QDs de CdTe. a) ajuste do pH da solução contendo o precursor do cádmio e o estabilizante; b) injeção da solução do precursor de telúrio, seguido de injeção do agente redutor; c) agitação e aquecimento do sistema em atmosfera inerte..... 41

Figura 14 – Representação dos sistemas bimodais pretendidos, tomando como base o QD CdTe-CIS..... 46
Figura 15 – QDs preparados de CdTe, funcionalizados com: a) CIS; b) MSA; c) GSH..... 50
Figura 16 – Espectros de absorção (linhas tracejadas) e de emissão (linhas contínuas), dos QDs de CdTe sintetizados com diferentes estabilizantes: a) CdTe-CIS; b) CdTe-MSA; c) CdTe-GSH..... 51
Figura 17 – Curva para calibração do teste de XO para quantificação das concentrações de Gd (III) nos complexos preparados.... 54
Figura 18 – Regressão linear com base nos pontos obtidos na curva de calibração..... 54
Figura 19 – Teste do XO para o complexo DOTA-CIS..... 55
Figura 20 – Teste do XO dos complexos preparados: a) DTPA-CIS; b) DOTA-CYS; c) DOTA-GSH; d) DOTA-ATF..... 57
Figura 21 – Caracterização óptica dos sistemas bimodais preparados por conjugação covalente dos QDs de CdTe-CIS e os complexos de DTPA (A1) e DOTA (A2) 60
Figura 22 – Espectros de absorção (linhas tracejadas) e emissão (linhas contínuas, λ_{exc} = 408 nm) dos sistemas bimodais obtidos a partir da conjugação do CdTe-CIS com complexos paramagnéticos tiolados com diferentes linkers. C1 = QD-DTPA-CIS, C2 = QD-DOTA-CIS, C3 = QD-DOTA-CYS, C4 = QD-DOTA-GSH, C5 = QD-DOTA-ATF..... 61
Figura 23 – Espectros de absorção (linhas tracejadas) e emissão (linhas contínuas) dos sistemas preparados a partir dos QDs: a) CdTe-MSA (M1 = QD-DTPA-CIS, M2 = QD-DOTA-CIS, M5 = QD-DOTA-ATF; b) CdTe-GSH (G1 = QD-DTPA-CIS, G3 = QD-DOTA-CYS, G4 = QD-DOTA-GSH, G5 = QD-DOTA-ATF) 63
Figura 24 – Nova curva para efetuar os cálculos de regressão linear..... 68
Figura 25 – Regressão linear do teste do XO para estimar concentração de Gd (III) livre em solução..... 69

Figura 26 – Ensaios de XO para os complexos (a) DOTA-CYS e (b) DOTA-GSH após otimização por aquecimento..... 70
Figura 27 – Espectros de emissão dos sistemas bimodais repetidos, formados a partir do CdTe-CIS. C1R = QD-DTPA-CIS, C2R = QD-DOTA-CIS, C3O = QD-DOTA-CYS, C4O = QD-DOTA-GSH..... 72
Figura 28 – Espectros de emissão dos sistemas bimodais repetidos, formados a partir do: (A) CdTe-MSA. M1R = QD-DTPA-CIS, M2R = QD-DOTA-CIS, M3O = QD-DOTA-CYS, C4O = QD-DOTA-GSH; (B) CdTe-GSH. G1R = QD-DTPA-CIS, G2R = QD-DOTA-CIS, G3O = QD-DOTA-CYS, G4O = QD-DOTA-GSH..... 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação de reagentes e suas proporções para preparação de cada complexo..... 43

Tabela 2 – Dados do ensaio de calibração para o teste do XO..... 44

Tabela 3 – Descrição da nomenclatura utilizada para os sistemas bimodais preparados..... 47

Tabela 4 – Especificações de cada sistema preparado..... 47

Tabela 5 – Dados espectrais obtidos a partir da caracterização óptica dos QDs preparados com diferentes estabilizantes..... 52

Tabela 6 – Resumo dos dados estimados a partir dos ensaios de XO.... 57

Tabela 7 – Dados das propriedades ópticas dos sistemas bimodais..... 65

Tabela 8 – Tempos de relaxação longitudinal e respectivos valores de relaxividade dos sistemas bimodais, obtidos à 60 MHz (1,41 T), 37 °C..... 66

Tabela 9 – Valores obtidos para relaxação transversal dos sistemas preparados..... 67

Tabela 10 – Comparativo da eficácia de complexação antes e após aquecimento dos complexos DOTA-CYS e DOTA-GSH..... 71

Tabela 11 – Resumo dos resultados da caracterização óptica dos sistemas bimodais preparados..... 75

Tabela 12 – Valores de T_1 e da relaxividade dos complexos preparados.. 76

Tabela 13 – Valores de concentração de Gd (III) presentes nos sistemas bimodais, medidos por ICP-OES..... 77

Tabela 14 – Tempos de relaxação longitudinal medidos para os sistemas bimodais repetidos, à 60 MHz e 37 °C e os respectivos valores de relaxividade..... 78

Tabela 15 – Dados de tempo de relaxação transversal dos sistemas e suas respectivas relaxividades, r_2..... 79

Tabela 16 – Comparativo de medidas relaxométricas de sistemas bimodais semelhantes já relatados na literatura..... 80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Agente de contraste
Anx A5	Annexin A5
ATF	4-aminotiofenol
BC	Banda de condução
BSA	*Bovine serum albumin*
BV	Banda de valência
CdSe	Seleneto de cádmio
CdTe	Telureto de cádmio
CIS	Cisteamina
CYS	L-Cisteína
DOTA	Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético
DTPA	Ácido dietilenotriaminapentaacético
DTPAa	Dianidrido dietilenotriaminapentaacético
EDC	*N*-etil-*N*'-(3-dimetilaminopropril) carbodiimida
EMA	*European Medicines Agency*
FDA	*Food and Drug Administration*
FWHM	Largura máxima a meia altura (do inglês, *full width at half maximum*)
GSH	Glutationa
ICP-OES	Espectrometria de emissão óptica de plasma acoplado indutivamente
MPA	Ácido 3-mercaptopropiônico
MRI	Imagem por ressonância magnética (do inglês, *Magnetic resonance imaging*)
MSA	Ácido 3-mercaptossuccínico
NHS	*N*-hidroxissuccinimida
NIR	Infravermelho próximo (do inglês, *Near-infrared*)
NP	Nanopartícula
PBS	Solução salina tamponada de fosfato
PS	Fosfatidilserina
QD	Ponto quântico (do inglês, *Quantum Dot*)

SBM	Teoria de Solomon, Bloembergen e Morgan
XO	Alaranjado de xilenol (do inglês, *Xylenol orange*)
ZnS	Sulfeto de zinco

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Absorbância
ϵ	Coeficiente de extinção das partículas
λ	Comprimento de onda
c	Concentração
C	Diluição da amostra
[M]	Concentração do íon metálico
$\log K$	Constante de estabilidade
γ	Razão giromagnética
r	Diâmetro médio das nanopartículas
h^+	*Éxciton*
e^-	Elétron
ω_0	Frequência de Larmor
L	Largura da cubeta
I	Momento magnético de *spin*
q	Número de águas coordenadas
$\vec{M}_0$	Vetor magnetização longitudinal no equilíbrio
$\vec{M}_z$	Vetor momento magnético
$\vec{M}_{xy}$	Vetor momento magnético transversal
K_{ps}	Constante de solubilidade
$r_{1,2}$	Relaxividade
$(1/T_i)_d$	Taxa de relaxação diamagnética
$(1/T_i)_p$	Taxa de relaxação paramagnética
τ_R	Tempo de difusão rotacional
$t_{1/2}$	Tempo de meia vida
T_{im}	Tempo de relaxação dos prótons ^1H
T_1	Tempo de relaxação longitudinal
$(1/T_i)_{obs}$	Tempo de relaxação observado
T_2	Tempo de relaxação transversal

τ_m	Tempo de residência da água coordenada
$\overrightarrow{B_0}$	Vetor campo magnético

SUMÁRIO

1	**FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....**	**17**
1.1	IMAGEM POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA.....	17
1.1.1	**Tempo de relaxação longitudinal.....**	**19**
1.1.2	**Tempo de relaxação transversal.....**	21
1.1.3	**Relaxividade.....**	**22**
1.2	AGENTES DE CONTRASTE.....	25
1.2.1	**Teste do alaranjado de xilenol.....**	**28**
1.2.2	**Design de novos ACs com sistemas nanoparticulados.....**	30
1.3	*QUANTUM DOTS*.....	32
1.4	SISTEMAS BIMODAIS.....	36
2	**OBJETIVOS.....**	**39**
2.1	OBJETIVO GERAL.....	39
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
3	**METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....**	**40**
3.1	MATERIAIS.....	40
3.2	SÍNTESE DE QDs DE TELURETO DE CÁDMIO (CdTe).....	40
3.2.1	**CdTe estabilizados com cisteamina (CIS).....**	**41**
3.2.2	**CdTe estabilizados com ácido 3-mercaptossuccínico (MSA).....**	**41**
3.2.3	**CdTe estabilizados com glutationa (GSH).....**	**42**
3.3	PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE Gd (III)	42
3.3.1	**Teste do alaranjado de xilenol.....**	**43**
3.3.2	**Caracterização relaxométrica dos complexos.....**	**44**
3.4	PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS BIMODAIS.....	45
3.4.1	**Conjugação covalente.....**	**45**
3.4.2	**Conjugação não-covalente.....**	**46**
3.5	ICP-OES.....	47
3.6	CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA.....	48
3.7	CARACTERIZAÇÃO RELAXOMÉTRICA.....	48
4	**RESULTADOS E DISCUSSÃO.....**	**50**
4.1	CARACTERIIZAÇÃO DOS QDs PREPARADOS.....	50

4.2 PREPARAÇÃO DOS COMPLEXOS TIOLADOS..... 52
4.2.1 Avaliação da eficiência da complexação..... 53
4.3 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS BIMODAIS..... 59
4.3.1 Caracterização óptica..... 59
4.3.2 Caracterização relaxométrica..... 65
4.4 PREPARAÇÃO DE NOVOS SISTEMAS BIMODAIS..... 67
4.4.1 Otimização dos sistemas bimodais com DOTA-CYS e DOTA-GSH..... 67
4.4.2 Estudo das relaxividades dos complexos preparados..... 76
4.4.3 Estudo das propriedades relaxométricas dos sistemas bimodais otimizados..... 76
5 CONCLUSÃO..... 82
6 PERSPECTIVAS..... 83
REFERÊNCIAS..... 84
APÊNDICE A – ARTIGO DE REVISÃO..... 90

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 IMAGEM POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

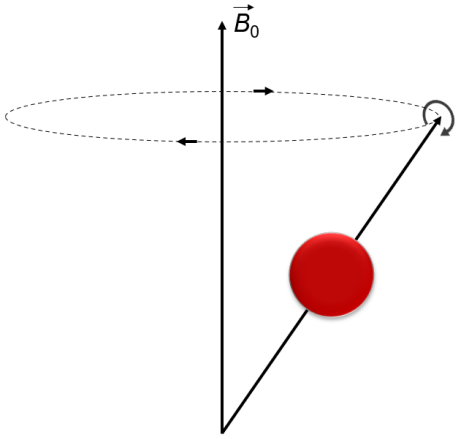
Em 1946, Felix Bloch e Edward Purcell através de estudos independentes, descreveram pela primeira vez o fenômeno de imagem por ressonância magnética (do inglês, *magnetic resonance imaging*, MRI), o que lhes rendeu o Prêmio Nobel de Física em 1952 (Bushong *et al.,* 2014, Constantinides, 2014).

A técnica de MRI é uma ferramenta poderosa de diagnóstico médico por imagem que permite o mapeamento do corpo humano, além da diferenciação entre tecidos saudáveis e patológicos. Apesar da baixa sensibilidade, apresenta vantagens frente outras técnicas por ser não-invasiva, versátil em relação a outras que se restringem a um único tipo de contraste, e ainda permitir visualização em diversas direções. Além disso, não faz uso de radiação ionizante, tendo seu sinal obtido através da aplicação de um campo magnético (Brown *et al*., 2014, Constantinides, 2014, Pereira *et al*., 2007).

Assim como a ressonância magnética nuclear, a MRI baseia-se na interação entre *spin* nucleares e um campo magnético externo ($\overrightarrow{B_0}$). Os núcleos de hidrogênio (^{1}H), que para efeito de simplificação serão tratados no presente trabalho como prótons, estão entre os que sofrem efeito de ressonância (I = ½) e, devido à elevada concentração de moléculas de água no corpo, são os mais utilizados para gerar um sinal de radiofrequência detectável. A imagem é obtida por meio da correlação entre diversos sinais medidos e suas localizações espaciais, não havendo relação entre sua resolução e o comprimento de onda de radiofrequência utilizado (Brown *et al*., 2014, Weishaupt *et al*., 2008).

As medidas dos tempos de relaxação partem da detecção do movimento de precessão dos ^{1}H (da água, gordura ou outras moléculas orgânicas) quando submetidos a um campo magnético. O vetor momento magnético dos prótons tende a se alinhar na direção do campo magnético (paralelo ou antiparalelo) apresentando além de seu movimento de rotação, também um movimento de precessão (FIGURA 1) (Brown *et al*., 2014).

Figura 1 – Movimento de rotação e precessão do próton ^{1}H na presença de um campo magnético externo.



Fonte: Autoria própria (2020).

A frequência angular de precessão é proporcional ao campo magnético aplicado, sendo chamada de frequência de Larmor. Estas duas grandezas estão associadas através da equação de Larmor (Equação 1) (Weishaupt *et al*., 2008).

$$\omega_0 = \gamma \times B_0 \quad (1)$$

Onde ω_0 é a frequência de Larmor, em MHz, e B_0 é a força do campo magnético, em T. γ é a uma constante específica de cada núcleo, denominada razão giromagnética. Para os prótons ^{1}H esta constante vale γ = 42,58 MHz.T^{-1} (Weishaupt *et al*., 2008).

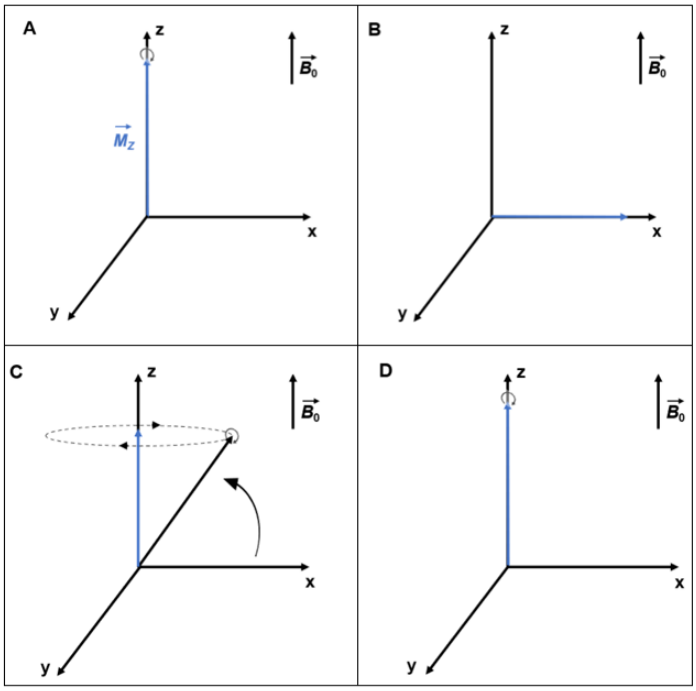
Como mencionado anteriormente, os *spins* dos prótons ^{1}H ao se alinharem na direção do campo magnético externo podem apresentar além do sentido paralelo, o sentido antiparalelo ao campo devido a energia térmica associada com a temperatura absoluta. Em 37 ºC, temperatura do corpo humano, a energia térmica será cerca de milhões de vezes maior que a diferença de energia quântica dos alinhamentos paralelo (níveis de menor energia) e antiparalelo (níveis de maior energia). Como se trata do próton ^{1}H que apresenta apenas esses dois estados quânticos de *spin*, só existem esses dois alinhamentos possíveis e sendo o estado de baixa energia (alinhamento paralelo) o que compreende uma população em excesso de *spins* alinhados paralelamente ao campo magnético externo (Brown *et al*., 2014).

1.1.1 Tempo de relaxação longitudinal

Os *spins* dos prótons ^{1}H atuam como barras magnéticas e costumam encontrar-se distribuídos pelo corpo de forma randômica, comportamento este que poderia ser comparado ao Movimento Browniano. Quando submetidos à ação de um campo magnético, estão propensos a alterar suas direções de modo a ficarem paralelos ou antiparalelos à direção do campo aplicado (estado estável) e, como consequência do pequeno excesso de *spins* alinhados paralelamente ao campo magnético externo, surge uma magnetização resultante alinhada a B_0. Aplica-se um pulso de radiofrequência forte o suficiente e pelo tempo necessário para alterar a direção do vetor magnetização em 180° (pulso π). Esta partícula absorverá energia, invertendo o seu vetor. Posteriormente, após um novo pulso de radiofrequência de 90°, é medido o tempo levado pelo ^{1}H para alinhar-se novamente à direção do campo magnético B_0. Ao cessar o pulso de radiofrequência, a excitação é perdida e a magnetização longitudinal (alinhada a B_0) é gradualmente recuperada, sendo esse evento conhecido como tempo de relaxação longitudinal (T_1) ou *spin*-rede, e está associado às interações dos *spins* dos prótons com o seu entorno. Por definição, T_1 é o tempo requerido para o núcleo recuperar 63,2% do valor original de (M_z), sendo o mesmo dependente da força do campo magnético induzido e da frequência de Larmor (Constantinides, 2014, Shaw, 1992, Weishaupt *et al*., 2008).

Em termos de vetores, pode-se entender as medidas de T_1 como sendo a medida da projeção do vetor momento magnético do próton sob o eixo z (M_z – coincidente com a direção do vetor $\overrightarrow{B_0}$) (FIGURA 2A). Nesta condição, a componente transversal de magnetização (M_{xy}) é nula (FIGURA 2B). À medida que o próton se alinha, o módulo de sua projeção aumenta (FIGURA 2C) (Brown *et al*., 2014, Bushong *et al.,* 2014, Weishaupt *et al*., 2008).

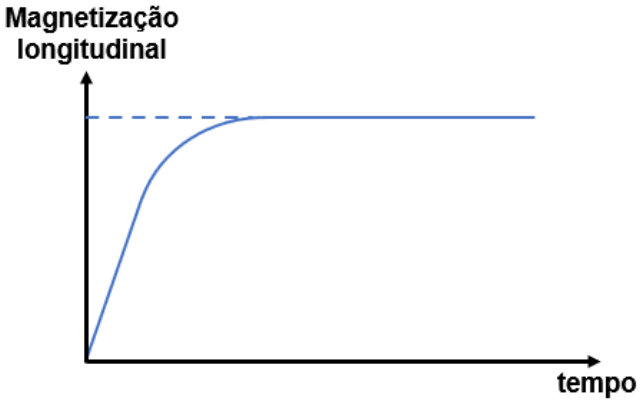
Figura 2 – Perfil dos *spins* nucleares: A) Após indução de um campo magnético; B) Após transmissão de um pulso de 90° na frequência de Larmor; C) Retornando à posição de equilíbrio; D) Comportamento dos prótons ao se alinharem novamente na direção do campo magnético.



Fonte: Autoria própria (2020).

De forma intuitiva, tem-se um gráfico crescente para a medida do tempo de relaxação longitudinal (FIGURA 3). Gráfico este que deve atingir uma constância num determinado tempo, visto que haverá um momento em que todos os *spins* estarão coincidindo com o eixo z. Quanto mais inclinada a curva de crescimento, menor o tempo para que os prótons se alinhem ao campo magnético, maior a eficiência do complexo (Brown *et al*., 2014).

Figura 3 – Exemplificação gráfica da medida de T_1.



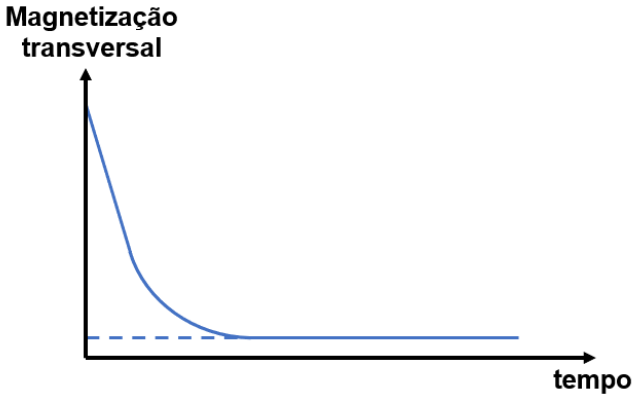
Fonte: Autoria própria (2020).

1.1.2 Tempo de relaxação transversal

O tempo de relaxação transversal (ou *spin-spin*), T_2, é dependente da força do campo magnético aplicado e ocorre de forma independente a T_1. Imediatamente após a amostra ser excitada por um pulso de radiofrequência, os vetores momento magnético dos *spins* encontram-se sincronizados com relação aos seus movimentos de precessão, portanto apresentam angulação de 0º. Nesse momento, diz-se que os *spins* estão em fase. Essa sincronia é perdida gradativamente com o passar do tempo e os *spins* passam a estar defasados em relação a um outro. À medida que os vetores momento magnético retornam para a posição de equilíbrio, as suas projeções sob o plano xy tendem a se anular e a projeção do vetor resultante diminui cada vez mais até desaparecer. Por definição, T_2 é o período de tempo durante o qual 63,2% do sinal no plano transversal é perdido (Brown *et al*., 2014, Bushong *et al.,* 2014, Weishaupt *et al*., 2008).

Considerando mais uma vez um gráfico tridimensional, como as medidas de T_2 referem-se à perda de coerência de fase entre cada um dos vetores momento magnético durante suas precessões e estão associadas ao módulo da projeção do vetor momento magnético do próton sob o plano transversal xy, chamado de vetor momento magnético transversal, $\vec{M}_{xy}$, tem-se uma curva decrescente tendendo a zero (FIGURA 4) (Brown *et al*., 2014).

Figura 4 – Ilustração de uma curva de medida de T_2.



Fonte: Autoria própria.

1.1.3 Relaxividade

Algumas características dos tecidos biológicos influenciam no contraste observado na imagem, podendo-se destacar como principais: densidade de prótons, T_1 e T_2. A densidade de prótons indica o sinal máximo que pode ser obtido por um determinado tecido através da medida do número de *spins* excitados por unidade de volume. O vetor $\vec{M}_0$, denominado de vetor magnetização longitudinal no equilíbrio, expressa a magnitude máxima da densidade de prótons presente na amostra. Nas medidas de T_1, $\vec{M}_z$ é igual a $\vec{M}_0$ quando em equilíbrio. Compostos com altas relaxividades são desejáveis para obter imagens com bom contraste sem a necessidade de um aumento na dosagem (Bushong *et al.,* 2014, Weishaupt *et al*., 2008).

A taxa de relaxação observada, $(1/T_i)_{obs}$, que advém de um processo de transferência de energia através da interação núcleo (H)-elétrons (Gd), é composto pelas contribuições da taxa de relaxação diamagnética, $(1/T_i)_d$, e paramagnética, $(1/T_i)_p$ (Equação 2), em que a contribuição paramagnética está relacionada com a concentração da espécie paramagnética (Caravan *et al*., 1999, Caravan, 2006).

$$\left(\frac{1}{T_i}\right)_{obs} = \left(\frac{1}{T_i}\right)_d + \left(\frac{1}{T_i}\right)_p \qquad i = 1{,}2 \qquad (2)$$

As determinações de relaxividade são realizadas a partir das medidas dos tempos de relaxação dos prótons das moléculas de água do *bulk*, que por sua vez estão em processo dinâmico de troca com a molécula de água coordenada ao íon Gd (III). A relaxividade, r_i, pode ser calculada através de uma relação entre

$(1/T_i)_p$ e a concentração do Gd (III), através da Equação 3 (Caravan *et al*., 1999, Caravan, 2006).

$$r_i = \frac{\left(\frac{1}{T_i}\right)_{obs} - \left(\frac{1}{T_i}\right)_d}{[Gd\ (III)]} = \frac{\left(\frac{1}{T_i}\right)_p}{[Gd\ (III)]} \qquad i = 1{,}2 \qquad (3)$$

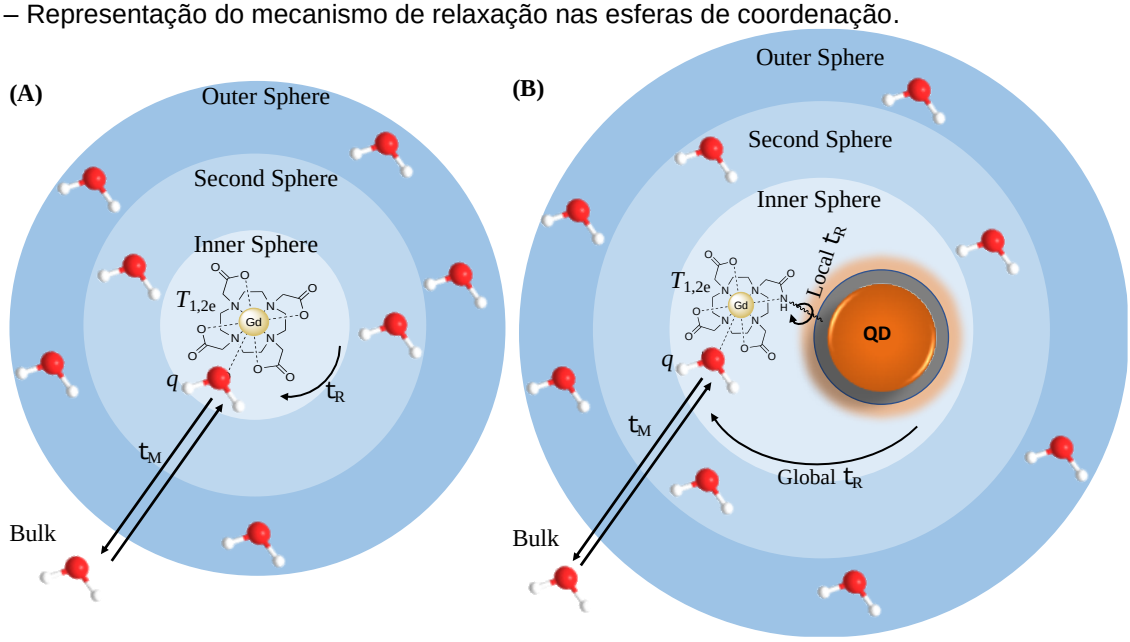
O processo de relaxação paramagnética possui componentes escalar (contato) e dipolar (pseudo-contato), que se referem ao efeito sentido nas esferas de coordenação interna e externa (FIGURA 5), respectivamente (Equação 4) (Caravan, 2006).

$$\left(\frac{1}{T_i}\right)_p = \left(\frac{1}{T_i}\right)^{IS} + \left(\frac{1}{T_i}\right)^{OS} \qquad i = 1{,}2 \qquad (4)$$

Estando $(1/T_i)^{IS}$ associada ao mecanismo de esfera interna e $(1/T_i)^{OS}$ à contribuição do mecanismo de esfera externa.

Na esfera interna, tem-se a contribuição da molécula de água diretamente coordenada ao íon paramagnético para a relaxividade (FIGURA 5). Neste caso, o efeito da relaxação depende da formação da ligação entre o íon Gd (III) e o próton ^1H por coordenação. Se possível fosse diminuir o tamanho dessa ligação, isto resultaria em um aumento da relaxividade (Caravan *et al*., 1999, Pereira *et al*., 2007).

Figura 5 – Representação do mecanismo de relaxação nas esferas de coordenação.



Fonte: Albuquerque *et al*. (em preparação).

A contribuição da esfera interna para a relaxividade do complexo pode ser calculada através da Equação 5 (Caravan *et al*., 1999, Caravan, 2006).

$$r_i^{IS} = \frac{cq}{55.6}\left(\frac{1}{(T_{im}+\tau_m)}\right) \quad i = 1{,}2 \qquad (5)$$

Sendo *c* a concentração de espécies paramagnéticas, *q* o número de moléculas de água na esfera interna, diretamente coordenadas ao íon Gd (III), T_{im} o tempo de relaxação dos prótons ^{1}H dessas moléculas de água, e τ_m o seu tempo de residência na esfera interna (Caravan, 2006, Pereira *et al*., 2007).

Apesar de parecer matematicamente favorável para o aumento da relaxividade, um aumento no número de moléculas de água coordenadas, *q*, pode acarretar em uma diminuição da estabilidade termodinâmica do complexo, tornando o mesmo mais instável. Ainda sobre a equação 5, é possível inferir que melhor será a capacidade de relaxação do complexo quanto menor for o T_{im}. Além disso, também é desejável um tempo de residência relativamente curto da molécula de água coordenada ao complexo, de modo que se τ_m <<< T_{im}, então r_i^{IS} dependerá do T_{im} (Caravan *et al*., 1999, Caravan, 2006, Clough *et al*., 2019, Pereira *et al*., 2007).

A molécula de água citada anteriormente descreve um processo dinâmico em que entra no complexo se coordenando ao Gd (III), permanece por um dado intervalo de tempo (τ_m) e, em seguida, retorna ao *bulk*, dando lugar para outra água se coordenar. Essa troca de águas deve ser rápida o suficiente para conseguir transmitir o efeito da relaxividade para o solvente. Caso a troca de água seja muito rápida, de maneira que o τ_m seja muito pequeno, o parâmetro temporal a governar a equação 3 será o T_{1m}. No entanto, uma troca de água muito lenta resulta em uma fraca transmissão do efeito paramagnético para o *bulk* (Caravan, 2006).

Alguns parâmetros interferem na relaxividade observada, tais como: propriedades eletrônicas do íon paramagnético, campo magnético aplicado, taxa de troca de água coordenada na esfera interna, tempo de difusão das moléculas de água nas proximidades do íon metálico (τ_D), ou seja, na esfera externa. Outros parâmetros que se referem às características da molécula interferem na relaxividade de forma particular. Para cada molécula, a influência deve ser analisada de acordo com seu peso molecular, rigidez, presença de outras moléculas conjugadas na sua superfície, como proteínas. Essa característica

estrutural do quelato paramagnético altera, portanto, o seu respectivo tempo rotacional (τ_R). Ao fixar o complexo na superfície do QD, o nanocristal passa a interferir no tempo de rotação global do complexo (Caravan, 2006).

O fenômeno de relaxação eletrônica é o parâmetro de correlação temporal dominante em campos menores que 4.3 MHz. Esse fenômeno diminui à medida que se aumenta a força do campo, de modo a ficar mais devagar que o movimento rotacional. Em campos altos, a teoria de Solomon, Bloembergen e Morgan (SBM) pode ser utilizada para descrever a relaxação do próton (Caravan *et al*., 1999, Caravan, 2006).

Aquelas moléculas de água disponíveis para entrar no complexo e que têm seu tempo de residência maior que seu tempo de translação difusional, estão inseridas na segunda esfera. Já a esfera externa compreende as águas mais afastadas do complexo, que percebem o efeito dos elétrons desemparelhados do Gd (III) nos *spins* nucleares do ^{1}H por difusão. Este efeito pode ser calculado (Equação 6) considerando a distância da ligação Gd-H (a) e o somatório dos coeficientes de difusão da água e do complexo (D) (Caravan, 2006).

$$\tau_D = \frac{a^2}{D} \qquad (6)$$

1.2 AGENTES DE CONTRASTE

Algumas vezes o sinal emitido pelos tecidos não confere um contraste significativo na imagem, necessitando assim aumentar o sinal. Esse aumento pode ser feito através do uso de agentes de contraste (ACs), que atuam alterando os tempos de relaxação, T_1 e T_2, dos tecidos, aumentando o contraste observável nas imagens. São compostos por quelatos coordenados a íons paramagnéticos. Estes íons apresentam momento magnético que fornece o sinal para MRI, devido seus pares de elétrons desemparelhados. Alguns exemplos são Co (II), Fe (III), Gd (III) e Mn (II) (Aime *et al*., 2003, Caravan *et al*., 1999, Clough *et al*., 2019, Weishaupt *et al*., 2008).

Todos os ACs atuam diminuindo ambos os tempos de relaxação. No entanto, quando tem-se um AC causando maior diminuição em T_1, diz-se que o contraste é positivo, como por exemplo os complexos de gadolínio. Já quando

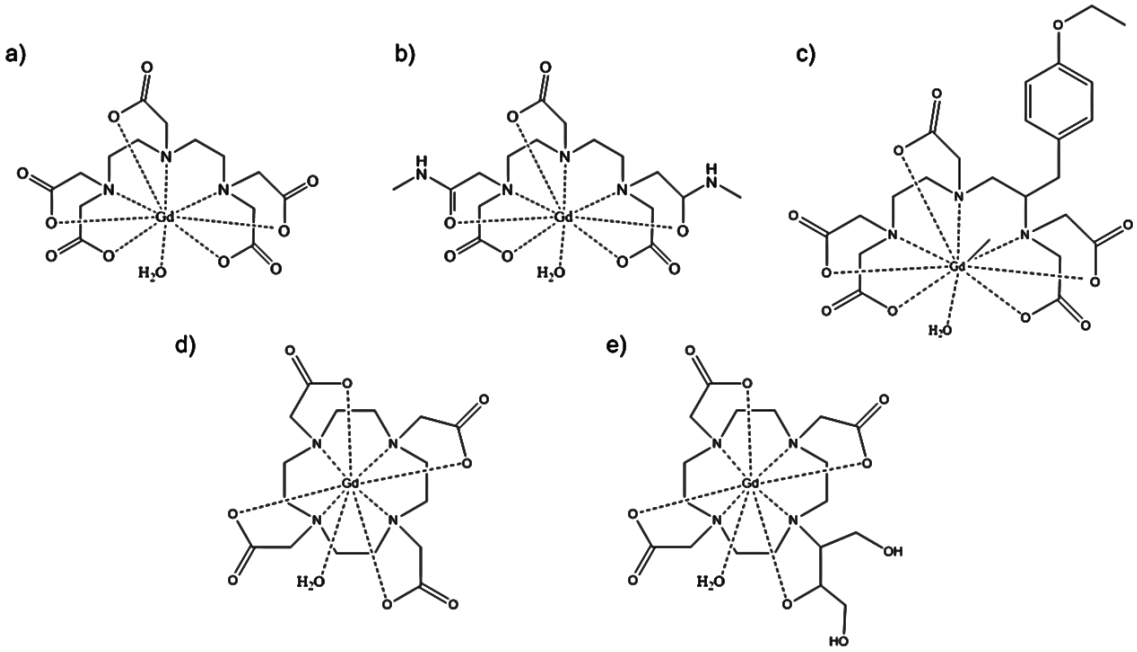
este resultado é mais expressivo em T_2, o contraste é dito como negativo, como no caso dos óxidos de ferro. Essa classificação é obtida levando em consideração a relação r_2/r_1. A eficiência dos contrastes é avaliada de acordo com a relaxividade do complexo (Aime *et al*., 2003, Caravan, 2006).

Os complexos de Gd (III) são moléculas paramagnéticas largamente aplicadas como ACs para MRI. O gadolínio, que pertence à série de lantanídios terras-raras, apresenta sete elétrons desemparelhados e é considerado um dos elementos paramagnéticos mais poderosos. Sua toxicidade provém do fato de ter diâmetro similar ao do íon cálcio, Ca (II), podendo tomar seu lugar no corpo, trazendo prejuízos à respiração, coagulação do sangue, absorção celular, entre outros. Também pode competir com íons endógenos, como Zn (II) e Cu (II) (Aghebati-Maleki *et al*., 2019, Barge *et al*., 2006, Belezza *et al*., 2018, Bushong *et al.,* 2014, Cabella *et al*., 2006, Caravan *et al*., 1999, Ramalho *et al*., 2016).

O primeiro AC, Gd-DTPA (Magnevist®), foi sintetizado em 1981 e aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para ser utilizado clinicamente pela primeira vez em 1988. Os Gd-DTPA tem baixo custo de produção, dispõem de alta estabilidade termodinâmica, porém exibem baixa inércia cinética, o que confere certas restrições à sua aplicação *in vivo* de acordo com a FDA e a *European Medicines Agency* (EMA) (Caravan *et al*., 1999, Clough *et al*., 2019).

Por outro lado, complexos com o ligante macrocíclico DOTA demonstram alta estabilidade cinética e termodinâmica, exibindo a maior constante de estabilidade conhecida até o momento quando complexados com lantanídios trivalentes (Caravan *et al*., 1999, Clough *et al*., 2019, Tóth *et al*., 1994). Atualmente há 11 complexos de Gd (III) aprovados para uso clínico como AC, todos baseados em ligantes poliaminocarboxilatos octadentados, estando os 5 mais utilizados representados na FIGURA 6 (Bushong *et al.,* 2014, Caravan, 2006, Niendorf, 1988, Yang *et al*., 2006).

Figura 6 – ACs mais utilizados clinicamente. a) DTPA-Gd; b) (DTPA-BMA)-Gd; c) BOPTA-Gd; d) DOTA-Gd; e) (DO3A-butrol)-Gd.



Fonte: Autoria própria (2020).

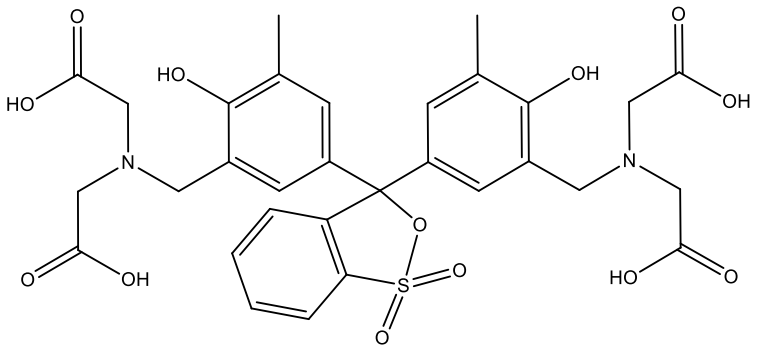
Devido a toxicidade dos íons Gd (III), os complexos utilizados como ACs devem ser estáveis a ponto de não aparentarem efeitos adversos nos pacientes. É interessante que sejam solúveis em água, tenham baixo peso molecular, alta estabilidade termodinâmica e sejam cineticamente inertes com relação à descomplexação (Barge *et al*., 2006, Caravan *et al*., 1999, Clough *et al*., 2019, Weishaupt *et al*., 2008).

A estabilidade termodinâmica indica a quantidade de Gd (III) que é liberada quando o sistema encontra-se em equilíbrio. Esta é medida pela constante de estabilidade, *log K*, por estar relacionada com a energia livre de Gibbs envolvida na reação de complexação. Este parâmetro isolado não é suficiente para considerar um complexo estável. A inércia cinética, por outro lado, é referente à taxa de liberação de Gd (III), sendo influenciada por características do ligante, como os grupos funcionais presentes e a densidade eletrônica. É medida através do tempo de meia vida ($t_{1/2}$) do complexo que consiste no tempo requerido para que metade dos complexos em solução se dissociem. Ligantes lineares apresentam $t_{1/2}$ em torno de segundos, enquanto os macrocíclicos chegam a horas (Caravan *et al*., 1999, Caravan, 2006, Clough *et al*., 2019).

1.2.1 Teste do alaranjado de xilenol

Se faz extremamente necessária a comprovação de que o complexo é seguro, ou seja, suficientemente estável para análises *in vivo* de modo que o complexo seja excretado intacto. Essa verificação pode ser feita por meio da medida da quantidade de Gd (III) livre. O alaranjado de xilenol (XO, do inglês *xylenol orange*) (FIGURA 7) é um corante largamente utilizado como indicador de presença de íons lantanídio (III) na amostra, sendo capaz de detectar Gd (III) livre em concentrações na faixa de micromolar (Barge *et al*., 2006, Belleza *et al*., 2018, Caravan *et al*., 1999, Caravan, 2006).

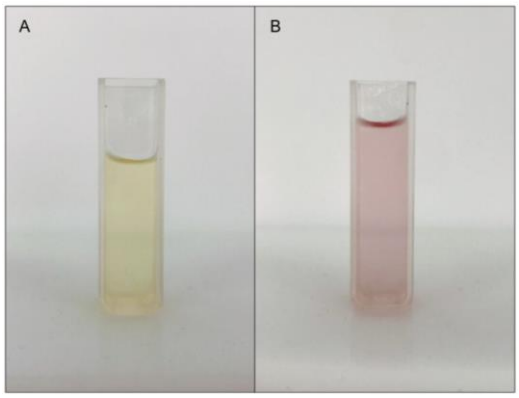
Figura 7 – Estrutura do alaranjado de xilenol.



Fonte: Autoria própria (2020).

A coloração da solução de XO varia de acordo com o pH, devido a desprotonação da hidroxila o que causa um deslocamento da nuvem eletrônica. A solução se mostra amarela quando ácida ou neutra, mudando para roxa quando em pH básico ou ainda na presença de metais livres (FIGURA 8) (Barge *et al*., 2006).

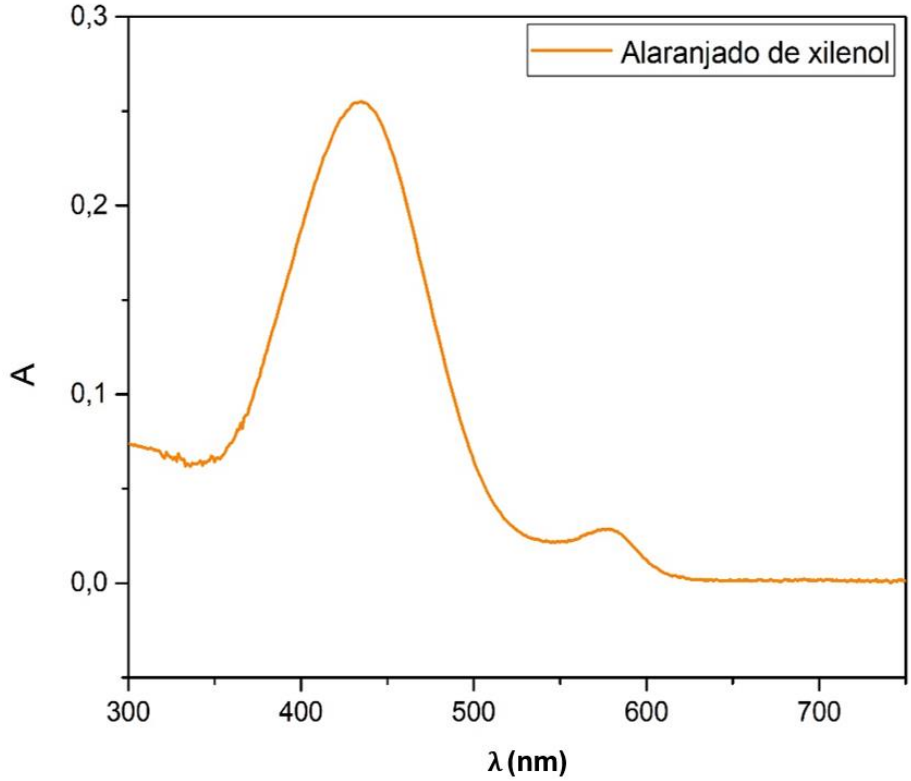
Figura 8 – Alteração na coloração da solução do alaranjado de xilenol: A) sem a presença de metais livres; B) após adicionar solução de Gd (iii).



Fonte: Autoria própria (2020).

Além da mudança visual, o composto ainda apresenta absorção em dois comprimentos de onda específicos, 433 e 573 nm (FIGURA 9). Em pH ácido, a primeira banda se mostra mais intensa que a segunda. Ao adicionar íons Gd (III), a coloração altera e a intensidade das bandas se inverte (Barge *et al*., 2006, Suazo *et al*., 2015).

Figura 9 – Espectro de absorção do alaranjado de xilenol.



Fonte: Autoria própria (2020).

A concentração de Gd (III) livre está diretamente relacionada com a absorbância das bandas características do corante e pode ser estimada pela Equação 7 (Barge *et al*., 2006, Suazo *et al*., 2015).

$$[Gd^{3+}] = A + B\frac{Abs^{573}}{Abs^{433}} \qquad (7)$$

Em que Abs^{573} e Abs^{433} correspondem às absorbâncias nos comprimentos de onda de 573 e 433, respectivamente. Os coeficientes A e B são obtidos por regressão linear.

1.2.2 *Design* de novos ACs com sistemas nanoparticulados

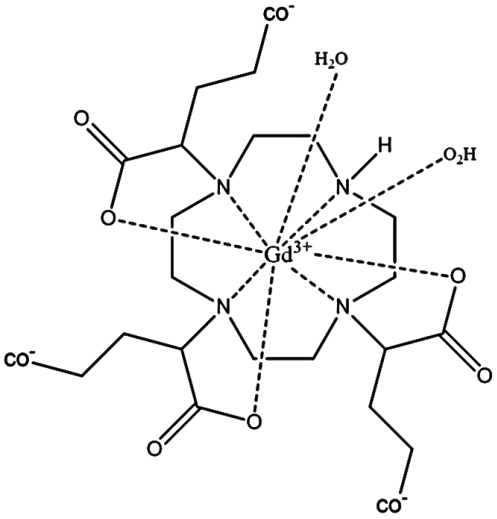
Com o intuito de suprimir a limitação da técnica de MRI decorrente de sua baixa sensibilidade, grandes quantidades de contraste são requeridas para aumentar o sinal medido e obter imagens mais claras. Essa quantidade é limitada, devido o volume que as células comportam. Por tais motivos, além das questões já comentadas de toxicidade, é de grande interessante desenvolver estratégias para aumentar a relaxividade (Clough *et al*., 2019, Tóth *et al*., 2002).

Para *designs* novos de ACs mais eficientes, costuma-se partir da estrutura do DOTA devido suas excelentes habilidades quelantes. A otimização é feita por substituição dos grupos funcionais presentes no ligante, ou adição de novos grupos funcionais, a fim de aumentar a relaxividade sem trazer grandes prejuízos à estabilidade do complexo. O principal objetivo dessas alterações é melhorar os valores de *q* e τ_m. O propósito em se aumentar o número de hidratação é aumentar a velocidade da troca da água na esfera interna em comparação com a taxa de troca de água (Aime *et al*., 2003, Caravan *et al*., 2006, Clough *et al*., 2019).

Uma estratégia de modificação é a introdução de quiralidade, seja no anel ou nos braços do ligante. Messeri *et al*. removeram um dos braços na estrutura do DOTA e aos remanescentes, adicionou uma cadeira lateral de ácido butanoico (FIGURA 10). Tais mudanças resultaram em uma diminuição do número de sítios de coordenação, aumentando em uma unidade o número de águas coordenadas e ocasionando em um relaxividade três vezes maior do complexo quando comparado ao Gd-DOTA. No entanto, não efetuaram estudos

de forma a verificar se a estabilidade termodinâmica e a inércia cinética foram alteradas (Messeri *et al*., 2001).

Figura 10 – Representação da estrutura do complexo [GdDO3MA] utilizado no estudo de Messeri *et al*.



Fonte: Autoria própria (2020).

Alterações na rigidez podem ocasionar em um aumento da constante de estabilidade e, consequentemente, da estabilidade termodinâmica. Como no complexo apresentado por Aime e colaboradores (2003), em que um dos braços ligados ao anel foi substituído por uma piridina, exibindo rápida troca de água e aumentando o $\log K$ em mais de duas vezes com relação aos ACs comerciais (Aime *et al*., 2003).

Outros estudos demonstraram haver uma relação linear entre a constante de basicidade de quelatos de Gd e suas estabilidades termodinâmicas. Como por exemplo Kumar *et al*. que realizaram alterações na estrutura do DOTA, removendo um oxigênio de uma das carboxilas e adicionando um grupo metil em diferentes posições. As mudanças implicaram em diferentes constantes de basicidade e os autores observaram que o aumento na basicidade acarretava também em um aumento na constante de estabilidade do ligante. Essas observações condizem com a teoria, uma vez que uma maior basicidade do ligante promove interações mais fortes com o Gd (III), que é um ácido de Lewis (Bianchi *et al*., 2000, Kumar *et al*., 1994).

No entanto, a maioria dos trabalhos não avalia as mudanças na inércia cinética consequentes das modificações feitas na estrutura, focando na

estabilidade termodinâmica de modo a também melhorar os valores de relaxividade.

Jin e colaboradores buscaram uma melhoria na relaxividade através da conjugação de complexos de DOTA à QDs de CdSeTe/CdS, sem realizar modificações na estrutura do ligante. Os complexos foram ativados com éster-NHS e conjugados aos funcionalizantes dos QDs por ligação covalente. Os sistemas apresentaram valores de r_1 iguais a 365 $mM^{-1}s^{-1}$ por QD, à 500 MHz e temperatura ambiente (Jin *et al*., 2008).

1.3 *QUANTUM DOTS*

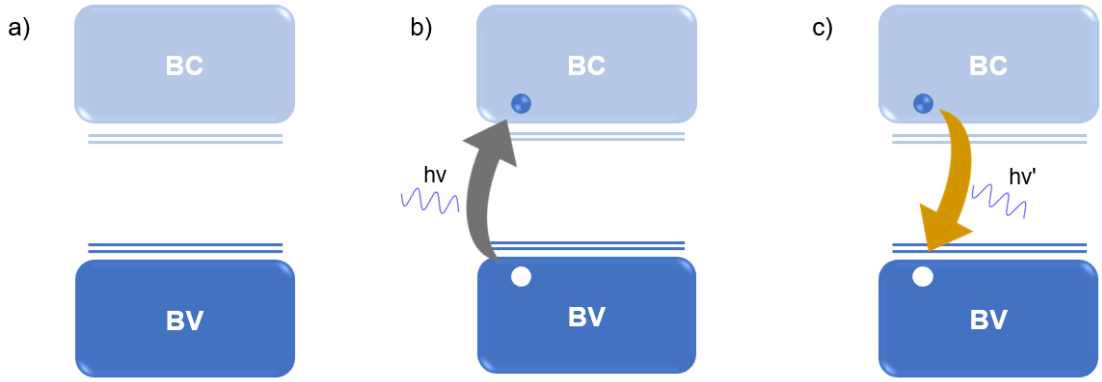
Nanotecnologia corresponde a uma área da ciência apresentada pela primeira vez em 1959 pelo físico Richard Feynman, que demonstrou a produção de novos produtos a partir da manipulação de átomos. Consiste de um conjunto de estudos e aplicações de nanoestruturas com dimensões variando da ordem de 1 a 100 nm (Bario *et al*., 2012, Zanetti-Ramos, *et al*., 2008).

Há alguns anos os nanomateriais vêm se mostrando estruturas promissoras por conferir diferentes propriedades ao ter sua escala reduzida. Por ser uma ciência multidisciplinar, encontra aplicação nas mais diversas áreas, como: células solares (Selopal *et al*., 2020, Wu *et al*., 2012), agricultura (Ung *et al*., 2012), biomedicina (Aghebati-Maleki *et al*., 2019, Pereira *et al*., 2019), odontologia (Garcia *et al*., 2016), terapia fotodinâmica (Hsu *et al*., 2013, Song *et al*., 2019), entre outras. Nanoestruturas empregadas como biossensores celulares têm se revelado de grande interesse por permitirem uma maior especificidade nas marcações, além de multifuncionalidade (Aghebati-Maleki *et al*., 2019).

Uma nanopartícula (NP) é dita em confinamento quântico quando apresenta suas três dimensões menores que o respectivo raio de Bohr, sendo denominadas *Quantum Dots* (QDs). QDs correspondem aos nanocristais constituídos de material semicondutor com diâmetros variando entre 1 e 10 nm e propriedades ópticas únicas provindas da sua condição de regime de confinamento quântico (Aghebati-Maleki *et al*., 2019, Fontes *et al*., 2012, Santos *et al*., 2008).

Por se tratar de um material semicondutor, suas bandas de valência (BV) e de condução (BC) encontram-se afastadas, sendo o espaço entre elas chamado de *band gap*. Quanto maior o diâmetro do QD, menor o número de níveis discretos e menor o *band gap*. Suas propriedades ópticas de emissão ocorrem quando o nanocristal é excitado em um determinado comprimento de onda que permita que um elétron (e^-) pertencente à BV absorva energia suficiente para ser promovido para a BC, deixando assim um espaço vazio (h^+) na BV, onde esse par elétron/buraco recebe o nome de *éxciton* (e^-/h^+). Quando o e^- retorna à sua posição energética de origem, libera a energia recebida na forma de luz (FIGURA 11). Como consequência do efeito de confinamento quântico, tem-se uma relação inversa entre o tamanho do QD e a energia do *band gap*, que por sua vez está relacionada com o comprimento de onda (λ, em nm) (Fontes *et al*., 2012, Santos *et al*., 2008).

Figura 11 – Representação esquemática do processo de emissão de luz: a) Gd antes de ser excitado; b) após absorver energia; c) emissão de energia na forma de luz.



Fonte: Autoria própria (2020).

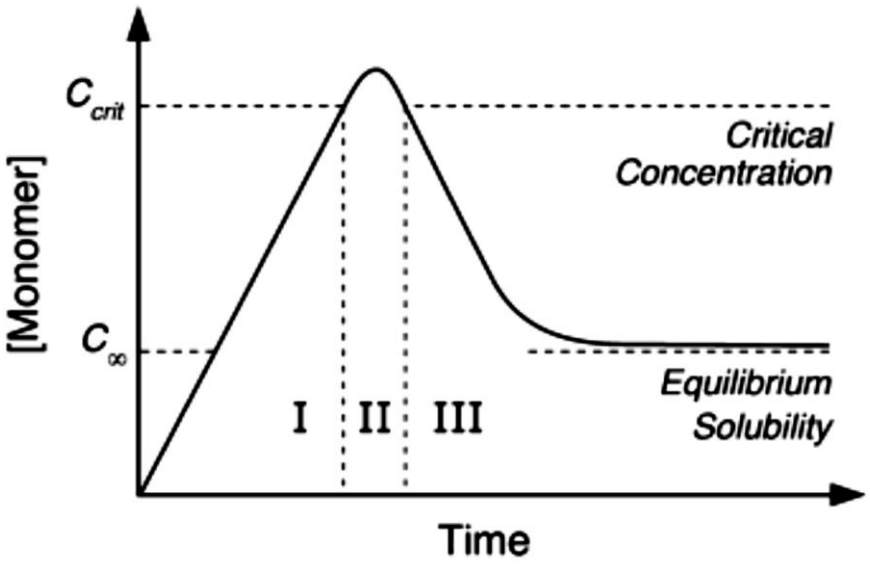
As primeiras investigações acerca do estudo dos QDs datam do início dos anos 1980, tendo suas primeiras sínteses de CdE (E = S, Se, Te) publicadas por Murray e colaboradores, as quais baseavam-se na pirólise de reagentes organometálicos (Murray *et al*., 1993). QDs preparados em meio orgânico exibem estreita distribuição de tamanho, além de estrutura cristalina com menos defeitos e alto rendimento quântico. Contudo, visando aplicações biológicas e biomédicas, se faz necessária a mudança de solvente para um meio aquoso. Rogach *et al*. foram os primeiros a publicar estratégias para sintetizar QDs de CdTe hidrofílicos, o que depois passou a chamar a atenção de outros pesquisadores com o intuito de baratear os custos de produção e tornar o

processo de síntese mais simples (Callan *et al*., 2013, Rogach *et al*., 1996, Yong *et al*., 2011).

Tendo em vista uma otimização do processo de aplicação dos nanocristais, sua preparação em água se faz mais atrativa, apresentando um ambiente mais amigável por meio do uso de um solvente biocompatível. Além disso, os QDs hidrofílicos são preparados com o auxílio de moléculas contendo um grupo tiol e outro grupo funcional (como amina ou ácido carboxílico), usadas como agentes estabilizantes, que podem se ligar à outras moléculas através de ligação eletrostática ou covalente, conferindo especificidade (Callan *et al*., 2013, Gaponik *et al*., 2010, Pereira *et al*., 2019, Pu *et al*., 2018).

A preparação dos QDs é feita de forma controlada, pois os mesmos possuem um baixo produto de solubilidade (K_{ps}). A formação dos nanocristais ocorre em três etapas e pode ser descrita pelo diagrama de La Mer , apresentado na FIGURA 12 (La Mer *et al*., 1950, Santos *et al*., 2008). Na etapa (I), a concentração do soluto aumenta a partir da decomposição lenta dos compostos até atingir a concentração crítica, dando início à nucleação (etapa II). A concentração do soluto continua aumentando por um pequeno espaço de tempo e, em seguida, passa a diminuir, bem como a variação da energia livre de Gibbs por unidade de volume. Quanto torna a atingir a concentração crítica, começa a etapa III correspondente ao crescimento pelo processo de amadurecimento de Ostwald, em que as espécies presentes em solução são consumidas. A concentração do soluto continua em queda até se igualar à concentração de saturação (Cossairt *et al*., 2016, García-Rodríguez *et al*., 2013, Santos *et al*., 2008).

Figura 12 – Diagrama de La Mer.



Fonte: García-Rodríguez (2013).

As suspensões coloidais, como mencionado, podem ser preparadas em meio orgânico ou aquosa, sendo caracterizadas pela reação entre metal, calcogeneto e agentes estabilizantes dispersos em solução, sob aquecimento e atmosfera inerte. A maior parte dos QDs estudados são compostos por dois elementos, principalmente aqueles dos grupos II-VI e III-VI da tabela periódica, tais como CdTe, ZnSe e InP. Para aplicações biológicas, devido as fontes de irradiação e os detectores presentes nos microscópios, são preferíveis aqueles QDs que apresentem emissão na região do visível (Viegas *et al*., 2019, Yarema *et al*., 2018). No entanto vem sendo crescente o interesse por QDs baseados em calcogenetos de prata e cobre, principalmente para aplicações biológicas, em decorrência da sua baixa citotoxicidade e por apresentarem emissão no infravermelho próximo (do inglês, *near infrared*, NIR) que permite obter imagens mais profundas e com melhor resolução espacial (Cai *et al*., 2019, Zebibula *et al*., 2017).

O uso de QDs como marcadores de células cancerígenas vem atraindo cada vez mais interesse, se mostrando eficaz na investigação da interação entre biomoléculas e células (Yong *et al*., 2011). Recentemente, a associação de QDs e compostos paramagnéticos tem chamado a atenção de pesquisadores como Weng *et al*., que conjugaram QDs de CdTe funcionalizados com MPA à lectina vegetal e um anticorpo, como marcadores específicos de células tumorais (Weng

et al., 2006). Cabral Filho e colaboradores, associaram covalentemente a transferrina à QDs de CdTe-MSA, para observar os receptores de transferrina em células de glioblastoma humano (Cabral Filho *et al*., 2016).

1.4 SISTEMAS BIMODAIS

A fim de unir as vantagens de mais de uma técnica, além de suprimir suas limitações, foram desenvolvidos os chamados sistemas bimodais. Neste caso, o sistema explora as propriedades ópticas dos QDs e as paramagnéticas dos complexos de gadolínio. Uma das vantagens no desenvolvimento destes sistemas é a possibilidade de conjugar vários complexos na superfície da nanopartícula, provendo um melhoramento no sinal uma vez que se faz necessária a internalização de um número significativo de complexos de Gd (III) para uma análise de MRI, na ordem de 10^7-10^8 Gd (III) por célula (Cabella *et al*., 2006, Caravan, 2006, Clough *et al*., 2019).

Estudos relataram a associação não covalente de QDs de CdSe à complexos de Gd (III) (Gd-DTPA), através de ligação *streptavidin*. Os nanocristais foram funcionalizados com Annexin A5 (AnxA5), sonda largamente utilizada para visualizar a exposição da superfície celular de fosfatidilserina (PS) que ocorre frequentemente em mortes celulares. As caracterizações relaxométricas desses sistemas revelaram altos valores de relaxividade, da ordem de 17,5 $mM^{-1}s^{-1}$ por Gd (III) e até 630 $mM^{-1}s^{-1}$ por QD. Durante os ensaios *in vitro*, as sondas ainda demonstraram um aumento na intensidade de emissão, quando comparadas ao controle (Prinzen *et al*., 2007).

Outros grupos avaliaram as consequências nos tempos de relaxação de incorporar complexos de Gd (III) do tipo DOTA em uma camada de sílica usada para recobrir QDs de CdSe (sonda A) e conjugá-los à sílica presente na superfície dos nanocristais (sonda B). A maior proximidade dos íons Gd ao QD no caso da sonda A, resulta em uma diminuição nos tempos de relaxação em comparação com a sonda B. Por outro lado, as diferentes estratégias não demonstraram significativa influência nas propriedades ópticas e nos ensaios *in vitro* com células HeLa (Bakalova *et al*., 2006, Bakalova *et al*., 2008).

Liu *et al*. desenvolveram sistemas bimodais encapsulando QDs de CdTe/ZnS em micelas com superfície anfifílica, ligadas à complexos do tipo

DOTA através de ligações amida. Os resultados expostos pelo grupo demonstraram que os QDs sofreram alteração nas suas propriedades ópticas devido ao encapsulamento. Em termos de relaxividade, os sistemas se mostraram promissores, exibindo aumento na relaxividade (4380 $mM^{-1}s^{-1}$, por nanopartícula, a 4,7 T) quando comparados à contrastes comerciais. Os ensaios biológicos utilizando macrófagos indicaram baixa citotoxicidade das sondas, mesmo em altas dosagens (Liu *et al*., 2011).

A fim de obter sondas com emissão no NIR, Gao *et al*. utilizaram QDs de CdHgTe/ZnS revestidos com ácido dihidrolipoico (DHLA), ao qual foram complexados íons Gd (III) para produzir nanossondas bimodais. Os autores conseguiram conjugar na superfície dos nanocristais em média 80 complexos por QD, o que resultou em um aumento significativo do contraste na imagem. A caracterização relaxométrica dos sistemas apontou r_1 igual a 2,01 $mM^{-1}s^{-1}$ por íon paramagnético (à 20 MHz e 32 ºC). Além disso, os testes *in vivo* exibiram uma boa penetrabilidade dos sistemas, demonstrando seu potencial na aplicação como ACs (Gao *et al*., 2013).

Objetivando o uso de ACs contendo QDs livres de cádmio, Cheng *et al*. associaram por ligação dativa $CuInS_2$/ZnS QDs funcionalizados com ácido fólico, à complexos de DTPA. Realizando as medidas de relaxividade em campo clínico e temperatura ambiente, as nanossondas desenvolvidas pelo grupo exibiram valores de 3,72 $mM^{-1}s^{-1}$ por Gd (III). As conjugações na superfície não causaram alterações nas propriedades ópticas, exibindo apenas um deslocamento para a direita (inferior à 5 nm), além de um aumento na largura à meia altura (FWHM, do inglês, *full width at half maximum*). Ainda, os sistemas não apresentaram toxicidade significativa quando incubados com células HeLa (Cheng *et al*., 2013).

Xing *et al*. recobriram QDs de CdSe/ZnS com complexos de DTPA modificados com albumina de soro bovino (do inglês *bovine sérum albumin*, BSA). Os complexos foram preparados através da reação do anidrido do DTPA com a BSA, seguido da complexação com $GdCl_3$. Esses sistemas bimodais foram conjugados com anticorpo antitumoral policlonal (PcAb), utilizando os agentes de acoplamento *N*-etil-*N*'-(3-dimetilaminopropril) carbodiimida (EDC) e *N*-hidroxissuccinimida (NHS). O biomarcador antitumoral utilizado não alterou as propriedades ópticas do QD. Por outro lado, forneceu um aumento na relaxividade da nanossonda devido à redução na mobilidade do complexo

imposta pela BSA, passando de 15,4 $mM^{-1}s^{-1}$ por Gd (III) para o complexo com a BSA, para 16,6 $mM^{-1}s^{-1}$ para o sistema bimodal (Xing *et al*., 2015).

O nosso grupo de pesquisa recentemente publicou um trabalho demonstrando o potencial do uso de sistemas bimodais contendo QDs de CdTe ligados covalentemente à complexos derivados do DOTA, como ACs para MRI e imagem óptica. A conjugação entre os QDs de CdTe carboxilados e os complexos do DOTA, foi conseguida usando EDC e sulfo-NHS como agentes de acoplamento, e etilenodiamina como ligante. As propriedades relaxométricas foram comparadas ao contraste comercial (Dotarem®), exibindo aumento na relaxividade pelo menos 5 vezes por Gd (III) (r_1 = 24 $mM^{-1}s^{-1}$) e 100 vezes maior por QD (r_1 = 422 $mM^{-1}s^{-1}$) à 60 MHz e 37 ºC. A associação dos complexos à superfície dos nanocristais alterou as propriedades ópticas do QD, diminuindo sua intensidade de emissão e causando um deslocamento para a direita da mesma. Além disso, os sistemas bimodais apresentaram bom desempenho na marcação de células HeLa (Pereira *et al*., 2019).

Uma revisão completa da literatura referente ao desenvolvimento de agentes de contraste bimodais, para imagem óptica e por ressonância magnética, pode ser encontrada no manuscrito presente no Anexo I.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento e caracterização de nanossondas bimodais constituídas por *Quantum Dots* de CdTe com diferentes funcionalizantes associados à complexos paramagnéticos contendo íons Gd (III) para avaliar suas potencialidades como agentes de contraste para imagem por ressonância magnética e imagem óptica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparação de QDs de CdTe funcionalizados com cisteamina (CIS), ácido 3-mercaptossuccínico (MSA) e glutationa (GSH);
- Preparação de complexos de gadolínio (III) derivados do DOTA, modificados com diferentes *linkers* (CIS, CYS, GSH e ATF);
- Conjugação covalente de QDs de CdTe-CIS com complexos de Gd (III), usando o DTPA e o DOTA como ligantes;
- Associação dos QDs de CdTe funcionalizados com diferentes estabilizantes, com os complexos paramagnéticos através de ligações dativas (tiol-metal);
- Caracterização relaxométrica dos complexos preparados e estimativa da quantidade de Gd (III) livre em solução a partir do Teste do *Xylenol Orange*.
- Caracterização óptica dos sistemas bimodais preparados por espectroscopia de absorção UV-Vis e espectroscopia de emissão;
- Caracterização relaxométrica das nanossondas bimodais;
- Comparação das propriedades ópticas e relaxométricas dos sistemas bimodais preparados usando estratégias de conjugação diferentes.

3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

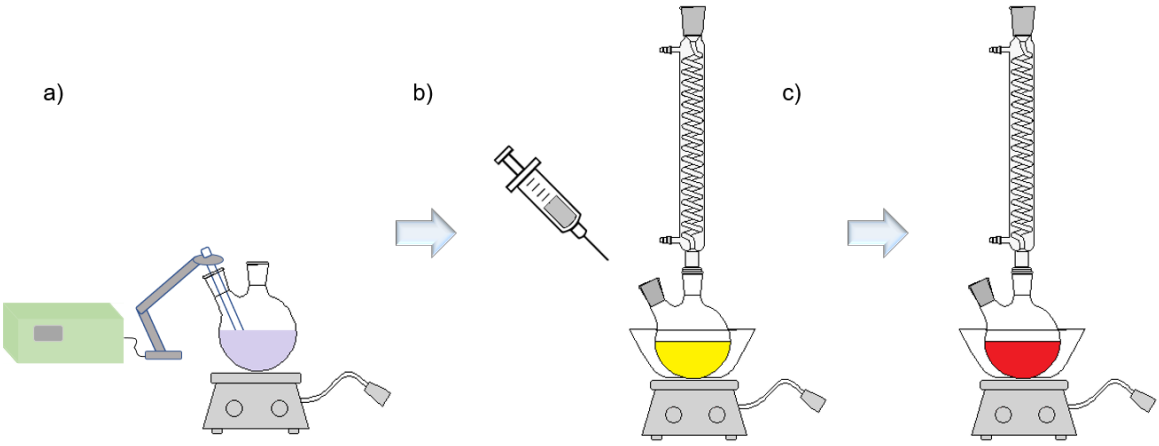
3.1 MATERIAIS

Todos os materiais foram empregados sem qualquer purificação adicional. Todas as soluções foram preparadas utilizando água ultrapura. Neste trabalho foram utilizados cloreto de cádmio (99,99%, Sigma-Aldrich), telurito de sódio (99%, Sigma-Aldrich), borohidreto de sódio (99,99% Sigma-Aldrich), hidróxido de sódio (98%, Sigma-Aldrich), hidrocloreto de cisteamina (CIS, 98%, Sigma-Aldrich), ácido mercaptosuccínico (MSA, 97%, Sigma-Aldrich), L-glutationa reduzida (GSH, 98%, Sigma-Aldrich), dianidrido dietilenotriaminopentaacético (DTPAa, 98%, Sigma-Aldrich), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (97%, Sigma-Aldrich), *N*-hidroxissuccinimida (NHS, 98%, Sigma-Aldrich), *N*-etil-*N*'-(3-dimetilaminopropril) carbodiimida (EDC, 98%, Sigma-Aldrich), cloreto de gadolínio (99,99%, Sigma-Aldrich), L-cisteína (CYS, 97%, Sigma-Aldrich), 4-aminotiofenol (ATF, 97%, Sigma-Aldrich).

3.2 SÍNTESE DE QDs DE TELURETO DE CÁDMIO (CdTe)

No presente trabalho foram preparados QDs de CdTe utilizando três funcionalizantes diferentes, sendo eles: cisteamina (CIS), ácido 3-mercaptossuccínico (MSA) e glutationa (GSH). A FIGURA 13 ilustra o método de preparação *one-pot* para os três tipos de QD, baseado no protocolo adaptado de Viegas *et al*. (2020). Primeiramente dissolveu-se o cloreto de cádmio ($CdCl_2$) em um balão de fundo redondo de duas bocas juntamente com o estabilizante. Após ajuste do pH, o sistema foi fechado, mantendo a atmosfera inerte com nitrogênio, e aquecido à 90 ºC sob agitação. Após 30 minutos, as soluções do agente redutor e o telurito de sódio (Na_2TeO_3) foram injetadas, respectivamente. O sistema então permaneceu fechado, sob aquecimento e agitação por 5 horas.

Figura 13 – Representação esquemática do procedimento de preparação dos QDs de CdTe. a) ajuste do pH da solução contendo o precursor do cádmio e o estabilizante; b) injeção da solução do precursor de telúrio, seguido de injeção do agente redutor; c) agitação e aquecimento do sistema em atmosfera inerte.



Fonte: Autoria própria (2020).

3.2.1 CdTe estabilizados com cisteamina (CIS)

Os CdTe funcionalizados com CIS foram preparados na proporção molar de Cd:Te:CIS 10:1:12. Pesou-se 0,862 g de $CdCl_2$ e dissolveu-se em 125 mL de água ultrapura. Adicionou-se 0,648 g da CIS sob agitação. O pH foi ajustado com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,02 M para 5,8. O sistema foi fechado e aquecido sob refluxo. Purgou-se com N_2 e deixou-se agitar por 30 minutos. Dissolveu-se 0,0946 g de borohidreto de sódio ($NaBH_4$) em 1 mL de água que foi posteriormente injetada no balão, seguida da injeção de 25 mL de uma solução de Na_2O_3Te 0,02 M. O sistema permaneceu sob agitação por 5 horas. Ao final da síntese, o pH foi ajustado novamente para 5,8 para evitar precipitação.

3.2.2 CdTe estabilizados com ácido 3-mercaptossuccínico (MSA)

Os CdTe-MSA foram preparados seguindo proporção molar de Cd:Te:MSA 2:1:2,4. Pesou-se 0,0366 g de $CdCl_2$ e dissolveu-se em 80 mL de água ultrapura. Adicionou-se 0,036 g da MSA sob agitação. O pH foi ajustado

para 10,5. O sistema foi fechado e aquecido sob refluxo. Purgou-se N_2 e deixou-se agitar por 30 minutos. Dissolveu-se 0,114 g de $NaBH_4$ em 5 mL de água que foi posteriormente injetada no balão, seguida da injeção de 5 mL de uma solução de Na_2O_3Te 0,02 M. O sistema permaneceu sob agitação por 5 horas.

3.2.3 CdTe estabilizados com glutationa (GSH)

A síntese do CdTe-GSH seguiu protocolo similar ao do CdTe-MSA. De acordo com a proporção molar, foram pesados 0,0737 g de GSH e o pH do sistema foi ajustado para um intervalo entre 7-8. Todas as outras condições foram comuns aos utilizados na preparação do CdTe-MSA.

3.3 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE Gd (III)

A TABELA 1 apresenta um resumo das quantidades utilizadas, bem como os ligantes e *linkers*. Neste trabalho foram usados dois ligantes, o dianidrido dietilenotriaminopentaacético (DTPAa) e o ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10- tetraacético (DOTA).

Para preparação de uma solução de complexo a 0,01 M, primeiro dissolveu-se o ligante em 5 mL de água ultra pura. Ajustou-se o pH para 5,6-5,8 e na sequência adicionou-se os agentes de acoplamento EDC e NHS, respectivamente. Após 1 hora sob agitação, houve a adição do *linker*, seguido de um reajuste novamente para o pH de 5,6-5,8. O sistema permaneceu sob agitação por 24 horas para posterior adição do $GdCl_3$ na razão molar de ligante:Gd 1:0,9, com excesso de 10% do ligante, finalizando com 48 horas de agitação à temperatura ambiente. Durante todo o processo de complexação o pH foi monitorado e mantido entre 6-7.

Tabela 1 – Relação de reagentes e suas proporções para preparação de cada complexo.

Ligante (mg)		**EDC (mg)**	**NHS (mg)**	***Linker* (mg)**		**Gd (III) (mg)**	**Código**
DOTA	18	9,5	11	---		18,5	DOTA-NHS*
DTPAa	18	9,5	11	CIS	5,5	18,5	DTPA-CIS
DOTA	20	9,5	11	CIS	5,5	18,5	DOTA-CIS
DOTA	20	9,5	11	CYS	6,1	18,5	DOTA-CYS
DOTA	20	9,5	11	GSH	15,3	18,5	DOTA-GSH
DOTA	20	9,5	11	ATF	6,2	18,5	DOTA-ATF

*Complexo DOTA ativado para conjugação covalente.

De forma a otimizar a complexação do DOTA-CYS e DOTA-GSH, as soluções destes complexos foram colocadas em um micro-ondas (Picolo, Panasonic) e aquecidas em intervalos de 5 segundos, com ajuste do pH entre cada aquecimento, perfazendo um aquecimento total de 15 ou 30 segundos, respectivamente.

3.3.1 Teste do alaranjado de xilenol

De forma a determinar a presença de Gd (III) livre em solução, foi feito o teste do alaranjado de xilenol (XO, do inglês *xylenol orange*). Preparou-se a solução de XO com base na metodologia proposta por Barge *et al*. Diluiu-se 720 µL de ácido acético em 200 mL de água ultra pura. Ajustou-se o pH da solução com NaOH 0,02 M para 5,8 e completou o volume com água até atingir 250 mL. Por fim, acrescentou-se 3 mg de XO à solução, a qual foi dividida em alíquotas de 20 mL e armazenadas em baixa temperatura (aproximadamente -6 ºC), por o XO perder em questão de minutos sua eficiência após atingir a temperatua ambiente, não podendo ser acondicionado novamente.

Para cada ensaio realizado com a solução de XO preparada, tomou-se o cuidado de não usar a mesma solução por mais de 45 minutos após ser descongelada, como sugerido por Barge *et al*., utilizando uma nova fração da solução a medida que notou-se grande variação nos resultados. Para cada nova medida realizada, uma nova curva de calibração do XO foi traçada.

O teste foi realizado com o auxílio de um espectrofotômetro de absorção UV-Vis (espectrofotômetro Evolution 600, Thermo Scientific). Primeiramente foram adicionados volumes conhecidos de uma solução de Gd (III) 0.001 M (TABELA 2), de forma a obter a curva de calibração em função da variação da intensidade das bandas nos comprimentos de onda específicos do XO (433 nm e 573 nm). A partir de regressão linear foi possível estimar a quantidade de Gd (III) livre.

Tabela 2 – Dados do ensaio de calibração para o teste do XO.

$V_{Gd\ (III)}$ adicionado (µL)	[Gd (III)] (µM)	Abs^{573}/Abs^{433}
0	0	0,093
1	0,5	0,206
2	1	0,339
4	2	0,554
6	3	0,776
8	4	1,158
10	5	1,564

Para os ensaios de cada complexo, fez-se uma medida da solução de XO seguida da adição de volumes regulares da solução dos complexos de acordo com as variações de intensidade das bandas nos comprimentos de onda específicos do XO (433 nm e 573 nm).

3.3.2 Caracterização relaxométrica dos complexos

A caracterização relaxométrica dos complexos foi realizada em frequência de campo clínico e temperatura corpórea, com o auxílio de um relaxômetro (Minispec mq60, Bruker, 60 MHz, 37 °C). A avaliação das propriedades relaxométricas foi realizada a partir das medidas dos tempos de relaxação longitudinal (T_1) dos prótons ^1H das moléculas de água na ausência (contribuição diamagnética) e na presença dos complexos paramagnéticos. A relaxividade foi calculada por meio da Equação 3, mencionada anteriormente.

$$r_i = \frac{\left(\frac{1}{T_i}\right)_{obs} - \left(\frac{1}{T_i}\right)_d}{[Gd\ (III)]} = \frac{\left(\frac{1}{T_i}\right)_p}{[Gd\ (III)]} \qquad i = 1{,}2 \qquad (3)$$

Realizou-se a caracterização relaxométrica dos complexos preparados, com exceção do complexo DOTA-ATF que apresentou precipitação após o aquecimento e, devido à interrupção dos experimentos em consequência da pandemia do COVID-19, optou-se por priorizar aqueles complexos que já se mostraram mais promissores. Os valores de r_1 calculados a partir das medidas do tempo de relaxação longitudinal (T_1) dos complexos foram comparados aos valores de r_1 para os complexos DTPA-Gd e DOTA-Gd comerciais, à 60 MHz e 37 °C.

3.4 PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS BIMODAIS

3.4.1 Conjugação covalente

Reproduziu-se a metodologia utilizada por Souza Sobrinha (2018) para preparação dos sistemas bimodais, adaptando para os QDs de CdTe-CIS preparados pelo método *one-pot* e conjugando-os à complexos de DTPA e DOTA equivalentes ao empregado em seu estudo.

O sistema CdTe-CIS-DTPA-Gd (A1) foi preparado reagindo uma solução do DTPAa (0,01 M) com os agentes de acoplamento EDC (0,01 M) e NHS (0,01 M), em meio aquoso durante 1 hora. A seguir, o CdTe-CIS foi adicionado e a mistura ficou sob agitação durante a noite à temperatura ambiente. Finalmente, foi adicionada uma solução de $GdCl_3$ (0,01 M) e deixada em agitação por 4 h.

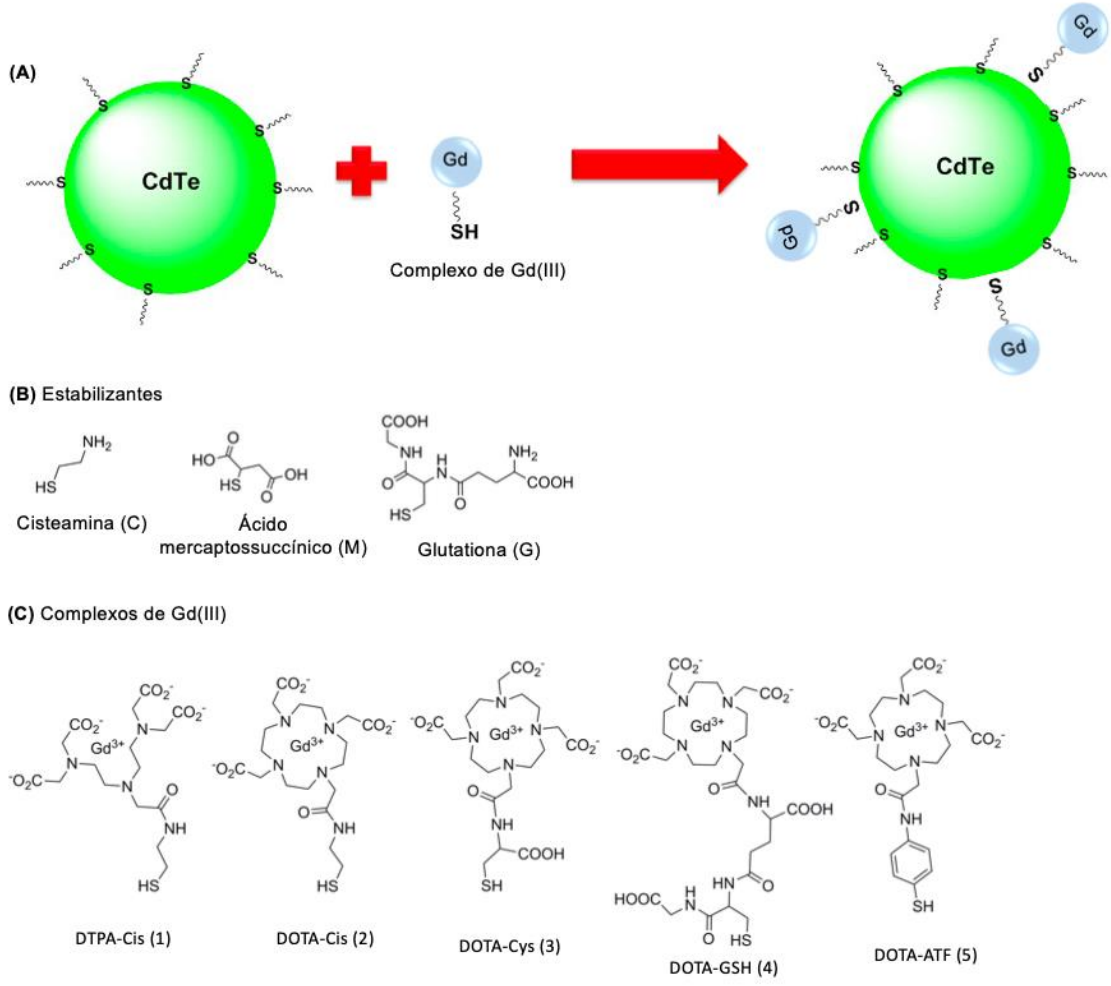
O sistema CdTe-CIS-DOTA-Gd (A2) foi preparado usando o complexo DOTA ativado. Para isso, o DOTA foi reagido com EDC (0,01 M) e NHS (0,01 M), por 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionada uma solução de $GdCl_3$ (0,01 M) e a mistura foi deixada sob agitação durante a noite à temperatura ambiente. Por fim o CdTe-CIS foi adicionado e deixado sob agitação durante a noite.

No final, os sistemas bimodais foram centrifugados à 3000 rpm por 3 minutos usando um tubo de ultracentrifugação com membrana de 10 kDa MWCO (Vivaspin®, GE Healthecare), para retirar impurezas da síntese.

3.4.2 Conjugação não-covalente

Os sistemas bimodais foram preparados a partir dos QDs de CdTe sintetizados com os 3 estabilizantes diferentes (CIS, MSA e GSH) e conjugados aos 5 complexos descritos anteriormente (FIGURA 14, TABELA 3). Cada sistema foi preparado na proporção de QD:complexo 1:30. Esta alternativa de preparação foi proposta objetivando reduzir interferências na suspensão coloidal, como por exemplo a necessidade de ajuste de pH para conjugação, além de simplificar o protocolo de conjugação.

Figura 14 – Representação dos sistemas bimodais pretendidos, tomando como base o QD CdTe-CIS.



Fonte: Autoria própria (2020).

Tabela 3 – Descrição da nomenclatura utilizada para os sistemas bimodais preparados.

QD*linker*	**DTPA-CIS**	**DOTA-CIS**	**DOTA-CYS**	**DOTA-GSH**	**DOTA-ATF**
CdTe-CIS	C1	C2	C3	C4	C5
CdTe-MSA	M1	M2	M3	M4	M5
CdTe-GSH	G1	G2	G3	G4	G5

Os QDs foram centrifugados à 3000 rpm por 3 minutos usando um tubo de ultracentrifugação com membrana de 10 kDa MWCO (Vivaspin®, GE Healthcare), para retirar impurezas da síntese, como possíveis íons Cd (II) livres e moléculas de estabilizante. Diluiu-se 0,5 mL da suspensão em 1,5 mL de água ultra pura e em seguida adicionou-se o complexo (0,01 M). O volume utilizado de cada complexo está descrito na TABELA 4. O volume adicionado é o mesmo para todos os complexos, pois todos foram preparados na mesma concentração de 0,01 M. Portanto, o volume adicionado varia apenas de acordo com a concentração de cada QD.

Tabela 4 – Especificações de cada sistema preparado.

QD	**Complexo (µL)**	
	1:20	**1:30**
CdTe-CIS	10,4	15,6
CdTe-MSA	6,5	9,8
CdTe-GSH	17,4	26,1

3.5 ICP-OES

A quantidade real de Gd (III) presente nos sistemas bimodais foi medida por espectrometria de emissão óptica de plasma acoplado indutivamente, ICP-OES (Icap 6300, Thermo Scientific). Para isso, digeriu-se alíquotas dos sistemas em ácido nítrico (65%, FMaia), de modo que a solução final apresentasse uma concentração inferior a 5% do ácido. O volume restante foi completado com água ultrapura, totalizando 5 mL.

3.6 CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA

As propriedades ópticas dos QDs e dos sistemas bimodais preparados foram avaliadas por espectroscopia de absorção UV-Vis (espectrofotômetro Evolution 600, Thermo Scientific) e por espectroscopia de emissão (espectrômetro LS 55, PerkinElmer) com excitação do material em 408 nm. O tamanho médio das nanopartículas e sua distribuição de tamanho foram determinados com base no crescimento e na cinética de dissolução (Dagtepe *et al*., 2007). O diâmetro médio dos QDs (Equação 8) foi calculado de acordo com a equação proposta por Dagtepe *et al*.

$$r = \frac{1.38435 - 0.00066\lambda}{1 - 0{,}00121\lambda} \quad (8)$$

Onde *r* corresponde ao diâmetro médio dos nanocristais e λ ao comprimento de onda relativo ao primeiro máximo de absorção.

A concentração das nanopartículas (Equação 9) pôde ser estimada pelas aproximações de Yu *et al*. através do coeficiente de extinção das NPs, ϵ, referente aos QDs de CdTe (Equação 10).

$$A = \epsilon C L \quad (9)$$

$$\epsilon = 10043(r)^{2.12} \quad (10)$$

Sendo *A* a absorbância correspondente ao primeiro máximo de absorção, C concentração da amostra e L o caminho óptico (largura da cubeta).

A amostra de QD foi diluída três vezes para ficar com uma concentração semelhante à dos sistemas. Estes foram diluídos igualmente em água ultra pura, na proporção de 200 µL de sistema para 1,8 mL de água. Medidas de absorção e emissão foram feitas em sequência com as mesmas amostras, utilizando cubeta de 1 cm de largura.

Os sistemas bimodais com os complexos otimizados foram caracterizados utilizando um espectrômetro de absorção e fluorescência (Duetta, Horiba Scientific), com excitação do material em 408 nm.

3.7 CARACTERIZAÇÃO RELAXOMÉTRICA

As medidas das propriedades relaxométricas dos sistemas bimodais foram realizadas à 60 MHz a 37 ºC (Minispec mq60, Bruker). A avaliação das

propriedades relaxométricas foi realizada a partir das medidas dos tempos de relaxação longitudinal e transversal (T_1 e T_2, respectivamente) dos prótons ^1H das moléculas de água da amostra de QD na ausência (contribuição diamagnética) e na presença dos complexos paramagnéticos conjugados aos QDs. A relaxividade foi calculada por meio da Equação 3.

Para as medidas, os sistemas foram previamente purificados após conjugação, através da centrifugação a 3000 rpm por 3 minutos, para retirada de possíveis Gd (III) livres na solução ou complexos de Gd (III) não conjugados, que poderiam influenciar nos resultados. Primeiramente, foram realizadas as medidas de T_1 e T_2 de amostras das suspensões aquosas de cada QD a fim de se obter a contribuição diamagnética ($T_{i,d}$). Em seguida, o $T_{i,obs}$ foi medido para cada sistema.

Para alguns sistemas bimodais, a quantidade de Gd (III) foi determinada por ICP-OES (Icap 6300, ThermoScientific). Para tal, a uma alíquota dos sistemas bimodais foi adicionado ácido nítrico (250 µL) e peróxido de hidrogênio (500 µL), e água até perfazer o volume de 5 mL, e preparar soluções com concentrações na faixa de 1-5 ppm.

Por limitações de tempo, devido à suspensão das atividades presenciais na UFPE como consequência da pandemia do COVID-19, para os QDs de CdTe-MSA e CdTe-GSH, foram caracterizados relaxometricamente apenas os sistemas M1, M2, G1, G2, correspondentes aos sistemas bimodais formados pelos complexos DTPA-CIS e DOTA-CIS. Enquanto todos os sistemas bimodais contendo CdTe-CIS tiveram seu tempo de relaxação longitudinal, T_1, medido. As medidas de T_2 foram realizadas apenas com os sistemas contendo os complexos DTPA-CIS e DOTA-CIS. Também como consequência da suspensão das atividades presenciais, não foi possível realizar medidas de relaxação em um campo mais baixo (20 MHz com variação da temperatura (25 e 37 °C), nem a quantificação de Gd (III) em todos os sistemas preparados através de ICP-OES. Pelo mesmo motivo, não foi possível realizar as medidas de transmetalação, que forneceriam informações sobre a estabilidade dos complexos na presença de zinco, um íon endógeno.

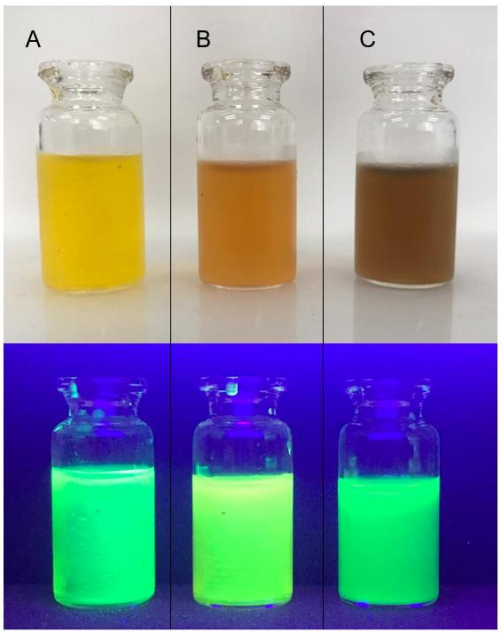
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS QDs PREPARADOS

Preparou-se QDs de CdTe pelo método *one-pot*, metodologia de síntese desenvolvida recentemente pelo nosso grupo de pesquisa. Eles foram funcionalizados com três estabilizantes, sendo eles: CIS, MSA e GSH (FIGURA 15). Estes três funcionalizantes foram selecionados de acordo com suas estruturas, visando variar tanto a carga líquida superficial da NP, quanto o volume dessas moléculas, de modo a poder avaliar o efeito do impedimento estérico no processo de conjugação dos complexos paramagnéticos na superfície das NPs.

A presença de grupos funcionais nos QDs, como amina e ácido carboxílico, tem sido bastante explorada para conjugação com biomoléculas, outras nanopartículas e deposição em superfícies, aumentando exponencialmente as possibilidades de aplicação destes nanocistais (Maiti *et al*., 2013, Pereira *et al*., 2019). Além disso, os sistemas bimodais obtidos com os QDs de CIS e MSA serão importantes para comparação com outras metodologias de síntese (Souza Sobrinha (2018), Pereira *et al*., 2019).

Figura 15 – QDs preparados de CdTe, funcionalizados com: a) CIS; b) MSA; c) GSH.

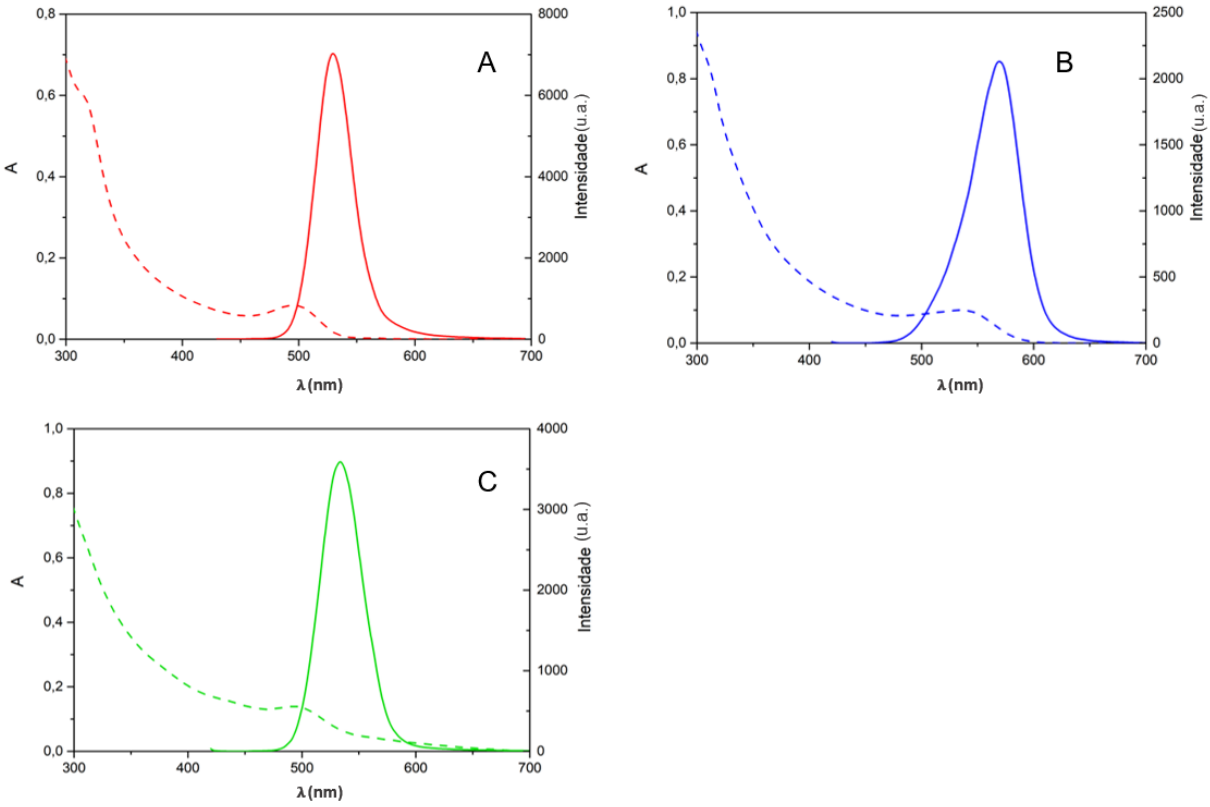


Fonte: Autoria própria (2020).

Nesta dissertação, todos os QDs foram preparados adaptando-se a estratégia *one-pot*, no lugar da metodologia em duas etapas comumente utilizada no grupo de pesquisa (Pereira *et al*., 2019). Após sintetizadas, as suspensões coloidais foram armazenadas sob refrigeração. O CdTe-CIS ao final da síntese apresentou opacidade devido um aumento de pH decorrente da adição do $NaBH_4$. O reajuste foi feito adicionando o próprio estabilizante até atingir novamente um pH em torno de 5,8, obtendo por fim uma solução transparente.

Foram realizadas medidas de espectroscopia de absorção e emissão dos três QDs de CdTe funcionalizados com CIS, MSA e GSH, obtendo os seguintes espectros normalizados, apresentados abaixo (FIGURA 16 A, B e C, respectivamente).

Figura 16 – Espectros de absorção (linhas tracejadas) e de emissão (linhas contínuas), dos QDs de CdTe sintetizados com diferentes estabilizantes: a) CdTe-CIS; b) CdTe-MSA; c) CdTe-GSH.



Fonte: Autoria própria (2020).

Todas as amostras apresentaram o perfil de absorção característico dos QDs, confirmando a formação dos nanocristais. O diâmetro médio das nanopartículas e a concentração destas em suspensão foram estimados

utilizando as Equações 8, 9 e 10 da seção 3.5, com base no primeiro máximo de absorção observado para cada suspensão coloidal de QD. Os resultados referentes às características espectrais de cada suspensão coloidal encontram-se descritos na TABELA 5 abaixo. Os espectros de emissão dos QDs apresentaram uma largura à meia altura (FWHM) menor que 60 nm, indicando uma boa homogeneidade das amostras com poucos defeitos de superfície.

Tabela 5 – Dados espectrais obtidos a partir da caracterização óptica dos qds preparados com diferentes estabilizantes.

QD	λ_{abs} (nm)	λ_{emi} (nm)	FWHM (nm)	d (nm)	[QD] (μM)
CdTe-CIS	497	531	37,5	2,65	10,42
CdTe-MSA	532	565	55,9	2,90	6,56
CdTe-GSH	497	535	43,8	2,65	17,41

4.2 PREPARAÇÃO DOS COMPLEXOS TIOLADOS

Prepararam-se cinco complexos partindo da funcionalização dos ligantes DTPA e DOTA, os quais são empregados como AC para MRI. A escolha do DOTA como estrutura de partida se deve à eficácia relaxométrica e segurança clínica deste ligante, fazendo com que diversas abordagens descritas na literatura para obtenção de ACs ainda mais eficientes partam da sua estrutura Tais modificações estruturais não afetam significativamente a estabilidade termodinâmica e cinética dos mesmos, seja pela adição de grupos funcionais ou pela sua associação à espécies que limitem sua mobilidade, causando alterações nos parâmetros que governam a relaxação paramagnética. Sendo considerado atrativo para aplicação como AC devido sua alta estabilidade termodinâmica e alta inércia cinética (Caravan *et al*., 2006, Tóth *et al*., 1994), de modo que diversos trabalhos optam por estratégia similar como adição de piridina (Aime *et al*., 2003), aminoácidos (Ferreira *et al*., 2009), entre outros. Um aumento da rigidez pode otimizar o τ_R, e uma alteração nas interações intermoleculares entre o complexo e a molécula de água coordenada, pode otimizar o tempo de residência da água próximo ao íon paramagnético, τ_m

(Caravan *et al*., 1999). Um derivado do DTPA também foi testado a fim de comparação com o trabalho de Souza Sobrinha (2018), dado que é conhecido que esse ligante linear é pouco inerte, tendo sua aplicação controlada. (Clough *et al*., 2019).

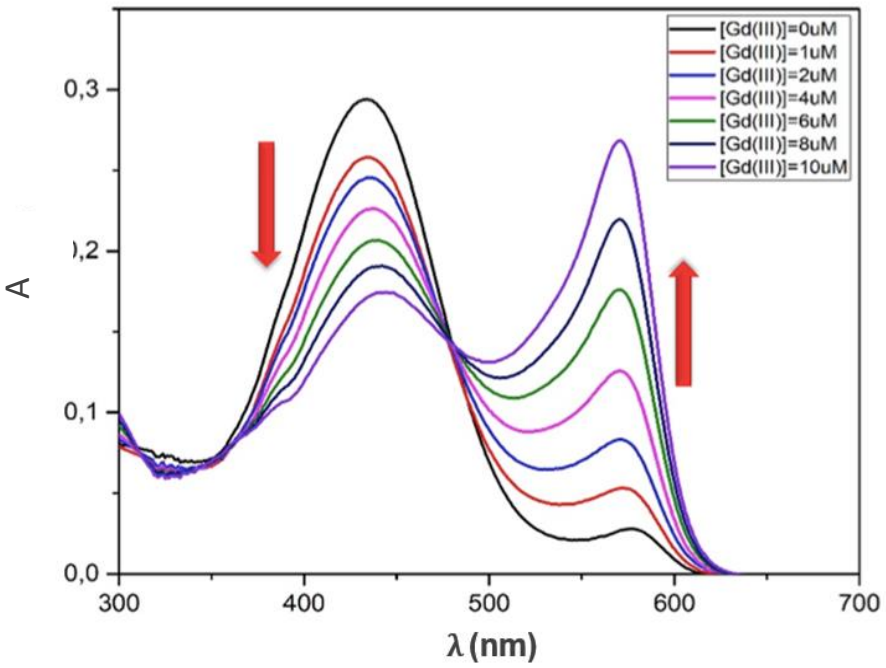
Todo o processo de modificação da estrutura do ligante e posterior complexação com o íon Gd (III) foi realizado a temperatura ambiente. Belleza e colaboradores já haviam demonstrado experimentalmente a complexação do DTPA e do DOTA ocorrendo em poucos segundos ao entrar em contato com o íon paramagnético a temperatura ambiente (Belleza *et al*., 2018).

Foram preparadas 5 soluções a 0,01 M de complexos derivados do DTPA e do DOTA, como descrito na metodologia. O ligante linear foi modificado com CIS, enquanto que o DOTA teve sua estrutura alterada por CIS, CYS, GSH e ATF. A escolha dos *linkers* foi pensada de acordo com o tamanho das cadeias e os grupos funcionais disponíveis, além da necessidade de possuir um grupo tiol que viria a ser explorado para a conjugação com o QD. A adição de um grupo amida em uma das ramificações do DOTA contribui para a estabilidade por aumentar a seletividade do ligante por íons Gd (III) em vez de Ca (II). Em contrapartida, pode reduzir a velocidade da taxa de troca de água (Caravan *et al*., 1999).

4.2.1 Avaliação da eficiência da complexação

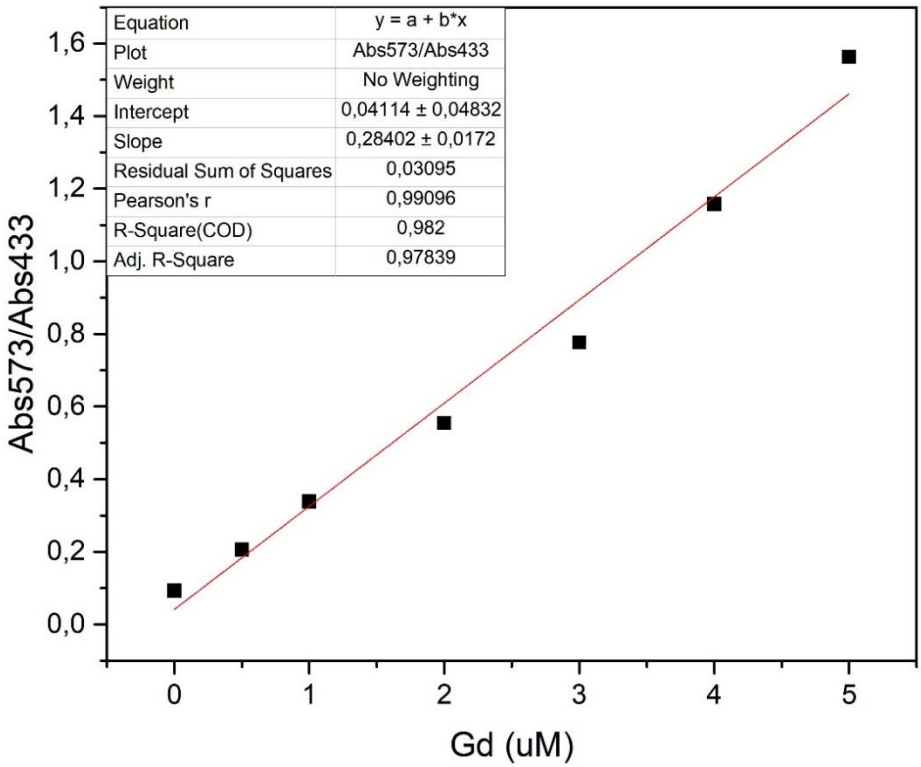
Para avaliar a eficiência da complexação, foi utilizado o teste do alaranjado de xilenol (XO), que permite estimar a concentração de Gd (III) livre em solução. Para tal, inicialmente foi traçada uma curva de calibração adicionando quantidades conhecidas de uma solução de Gd (III) a 0,001 M preparada previamente (FIGURA 17). Para cada curva obtiva, efetuou-se o cálculo da razão das intensidades das bandas de absorção do xilenol nos comprimentos de onda de 573 nm e 433 nm. Realizou-se a regressão linear com base nas concentrações de Gd (III) de cada curva, em acordo com a Equação 6 (FIGURA 18).

Figura 17 – Curva para calibração do teste de XO para quantificação das concentrações de Gd (III) nos complexos preparados.



Fonte: Autoria própria (2020).

Figura 18 -Regressão linear com base nos pontos obtidos na curva de calibração.



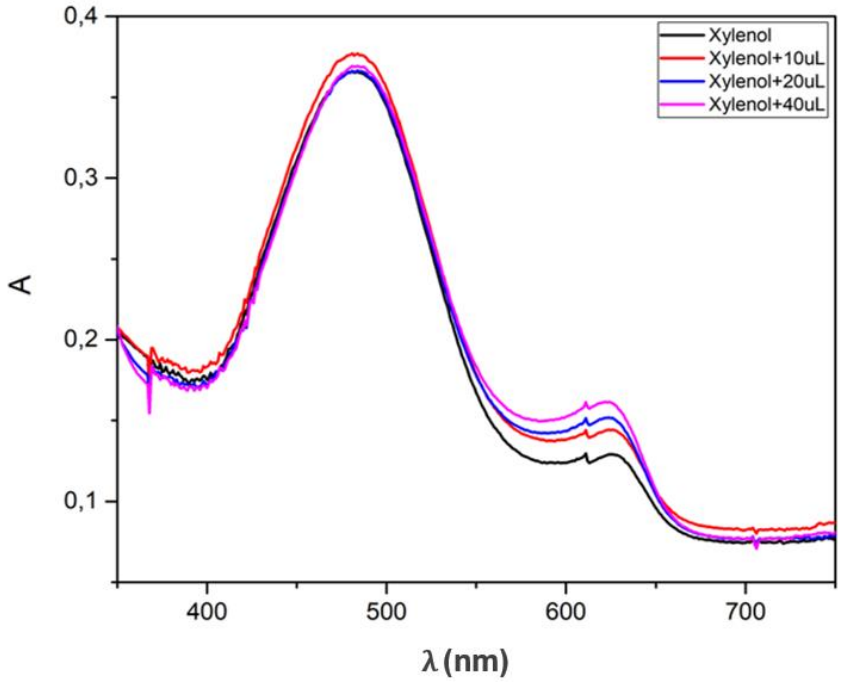
Fonte: Autoria própria (2020).

A partir da curva obtida na Figura 18, pôde-se encontrar os fatores remanescentes para obter a Equação 11 desejada para estimar as concentrações de Gd (III) livre em cada solução de complexo preparada.

$$[Gd(III)] = 3{,}521127\frac{Abs^{573}}{Abs^{433}} - 0{,}144718 \qquad (11)$$

De posse da equação acima, os testes de XO foram realizados. O complexo DOTA-CIS (FIGURA 19) visualmente não demonstrou alteração significativa no perfil da curva do XO após adição de grandes quantidades da solução do complexo (entre 50 e 200 μM), o que poderia sugerir um elevado rendimento de complexação, devido indicação de ausência de Gd (III) livre.

Figura 19 – Teste do XO para o complexo DOTA-CIS.



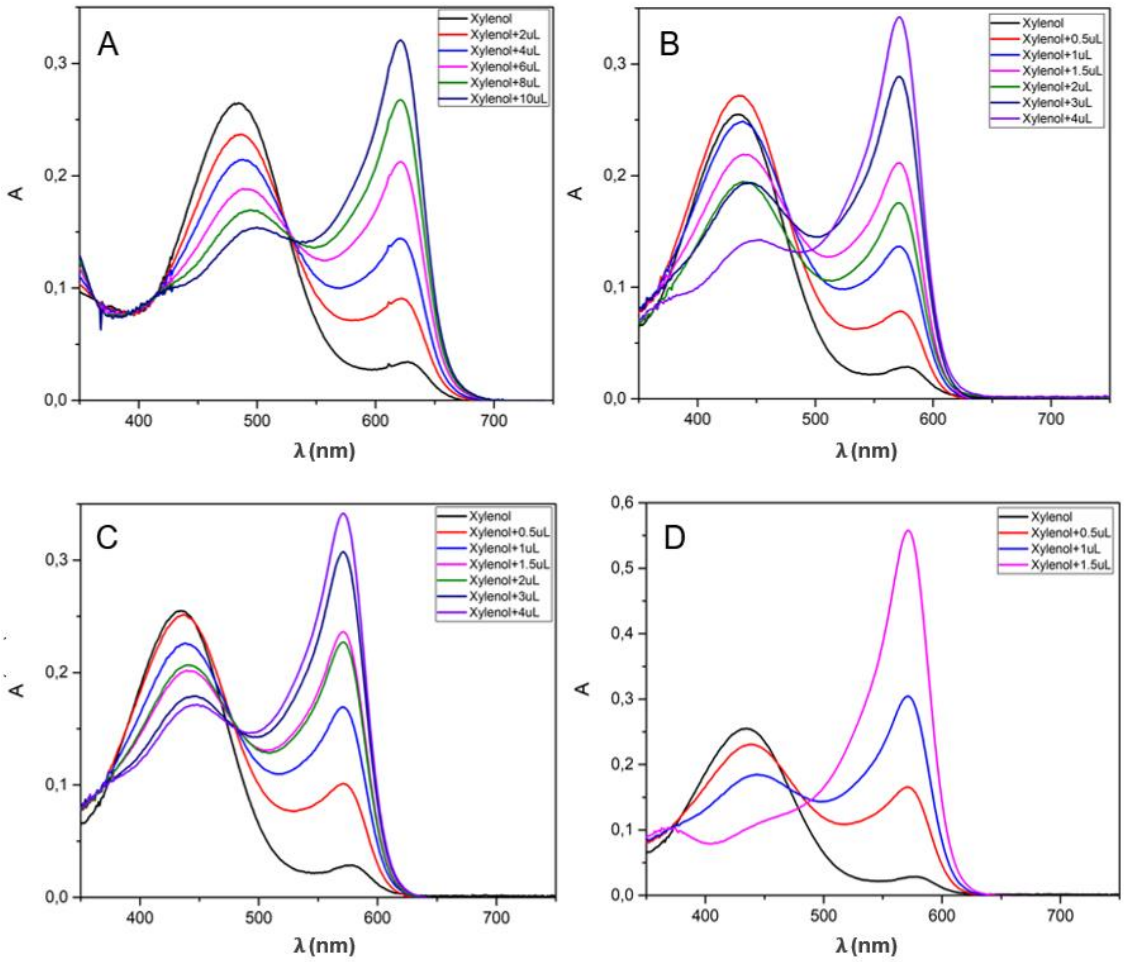
Fonte: Autoria própria (2020).

Com o auxílio da equação 11 e dos valores extraídos da curva Xylenol+20 μL (FIGURA 19), tem-se a estimativa de uma concentração de Gd (III) livre no complexo DOTA-CIS equivalente a 1,86 μM. Este resultado confirma a suposição com base no aspecto visual feita anteriormente, uma vez que foi estimado um percentual inferior a 5% do íon livre, indicando um rendimento superior a 95% na complexação.

As mesmas medidas foram realizadas para os demais complexos preparados (FIGURA 20). Com base nas curvas obtidas para os testes de cada

complexo, efetuou-se o cálculo das concentrações de Gd (III) livre estimadas. Considerando a curva Xylenol+4 µL na FIGURA 20A, o complexo DTPA-CIS obteve 2,78 µM de íons paramagnéticos livres em solução, correspondendo a um rendimento de complexação de 86%. Todas as soluções demonstraram a presença de grandes quantidades de Gd (III) livre em solução, indicando que a complexação não foi eficiente. Sendo necessário efetuar posteriormente a otimização desta complexação, usando uma temperatura mais elevada (50-70 ºC). Os cálculos para o DOTA-CYS (FIGURA 20B) e DOTA-GSH (FIGURA 20C) tiveram como base a mesma curva (Xylenol+1,5 µL), equivalente a uma concentração de 7,5 µM de cada complexo. Os valores obtidos para concentração do íon livre foram 3,28 µM (43,7%) e 3,79 µM (50,5%), respectivamente. O alto percentual de Gd (III) livre confirma o esperado pela análise visual dos gráficos referentes aos ensaios desses complexos.

Figura 20 – Teste do XO dos complexos preparados: a) DTPA-CIS; b) DOTA-CYS; c) DOTA-GSH; d) DOTA-ATF.



Fonte: Autoria própria (2020).

A TABELA 6 resume os dados estimados de Gd (III) livre a partir dos testes de XO.

Tabela 6 – Resumo dos dados estimados a partir dos ensaios de XO.

Complexo	**[Gd (III)] livre (μM)**	**Rendimento da complexação (%)**
DOTA-CIS	1,86	> 95
DTPA-CIS	2,78	86
DOTA-CYS	3,28	43,7
DOTA-GSH	3,79	50,5

A maior concentração de Gd (III) livre no DTPA-CIS, quando comparada com o DOTA-CIS, pode estar associada à menor estabilidade do ligante linear (DTPA: log *K* = 10,2, $t_{1/2}$= 4,5 h) quando comparada aos complexos macrocíclicos. (Cacheris *et al*., 1990, Frenzel *et al*., 2008, Messeri *et al*., 2001). No entanto, os complexos DOTA-CYS e DOTA-GSH também exibem estabilidade menor que o DOTA sem modificações (DOTA: log *K* = 25,6, $t_{1/2}$ superior a 83 h) (Clough *et al*., 2019, Laurent *et al*., 2001).

Esta diminuição pode estar associada à menor constante de estabilidade dos mesmos devido a uma diminuição na basicidade desses ligantes. Kumar *et al*. já haviam demonstrado haver uma relação linear entre a estabilidade termodinâmica e a basicidade do ligante, dada pelo somatório das constantes de protonação de cada átomo doador (Kumar *et al*., 1994). Além do mais, a CYS e a GSH podem coordenar fracamente com íons paramagnéticos através dos carboxilados presentes nas respectivas estruturas, provocando uma competição durante a etapa de complexação com o DOTA. Este fato diminui o rendimento de formação do complexo DOTA-Gd, formando um complexo fraco *linker*-Gd, sensível às condições do meio, podendo ter liberado Gd (III) nos ensaios realizados. Sendo assim, nesses casos pode ocorrer competição entre o *xylenol* e os *linkers*, aumentando o indicativo de Gd (III) livre.

A FIGURA 20D evidencia a ineficiência no preparo do complexo DOTA-ATF, o que pode ser atribuído à dificuldade de solubilização do ATF mesmo com o auxílio de ultrassom, comprometendo a preparação do complexo. A comprovação pôde ser feita considerando a curva Xylenol+1 µL (5 µM) e que todo Gd (III) empregado na preparação do complexo DOTA-ATF encontrava-se livre em solução.

As diferentes concentrações utilizadas para o teste do XO para cada complexo decorreram da propensão que cada um apresentou para mudança nas intensidades das bandas de absorção. Para aqueles complexos que demonstraram mais Gd (III) livre, foram utilizadas menores concentrações de complexo nos ensaios. Por isso que o complexo DOTA-CIS foi analisado com concentrações maiores que o complexo DTPA-CIS, sugerindo que a solução do complexo DOTA-CIS tem menos íons paramagnéticos livres e, portanto, a complexação foi mais efetiva.

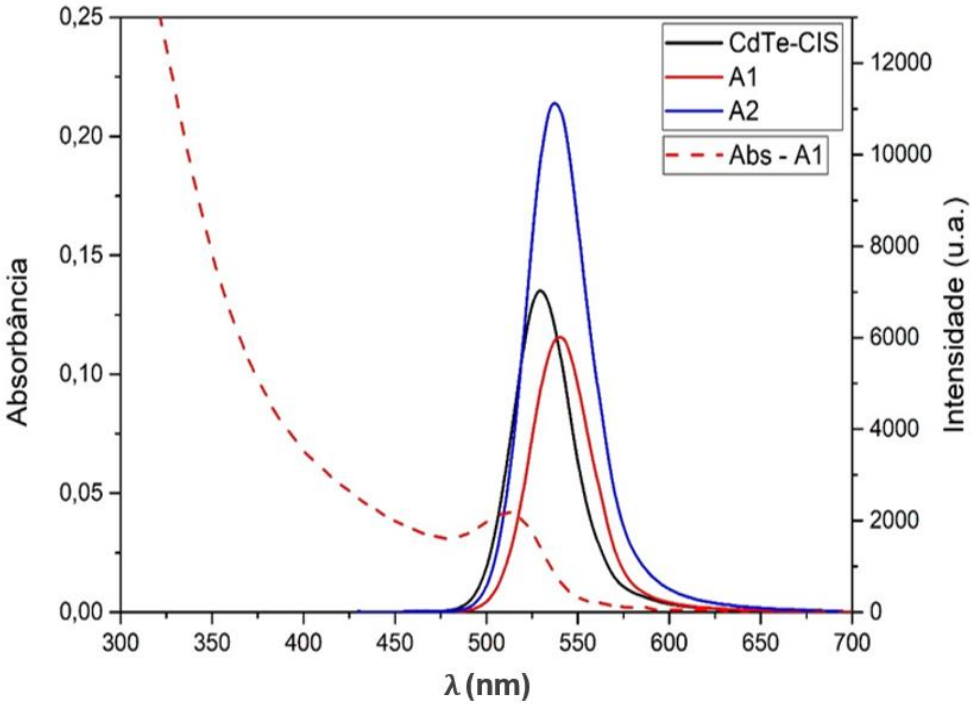
4.3 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS BIMODAIS

4.3.1 Caracterização óptica

Com o intuito de desenvolver uma nova metodologia de conjugação para os sistemas bimodais e poder fazer uma comparação com as estratégias utilizadas por Souza Sobrinha (2018), inicialmente, foi reproduzida a estratégia utilizada anteriormente, que se baseava na conjugação covalente entre o CdTe-CIS e os complexos de Gd (III), usando como agentes de acoplamento EDC e NHS. Para tal, o ligante DOTA foi ativado usando EDC e NHS, seguindo de complexação com $GdCl_3$, e posterior adição ao QD aminado, sistema A1. O ligante DTPA foi também ativado com EDC e NHS, e adicionando ao QD aminado, seguindo da complexação com $GdCl_3$. sistema A2.

A caracterização óptica destes sistemas encontra-se na FIGURA 21. Os espectros de absorção dos sistemas bimodais coincidiram e, por isso, foram exemplificados pela curva de absorção do sistema A1. Com relação à emissão, ambos sistemas bimodais apresentaram um deslocamento para a direita. O sistema A1 contendo os complexos de DTPA exibiu diminuição na intensidade de emissão quando comparado ao QD, enquanto que o sistema A2 (com o complexo do DOTA) aumentou a intensidade de emissão.

Figura 21 – Caracterização óptica dos sistemas bimodais preparados por conjugação covalente dos QDs de CdTe-CIS e os complexos de DTPA (A1) e DOTA (A2).



Fonte: Autoria própria.

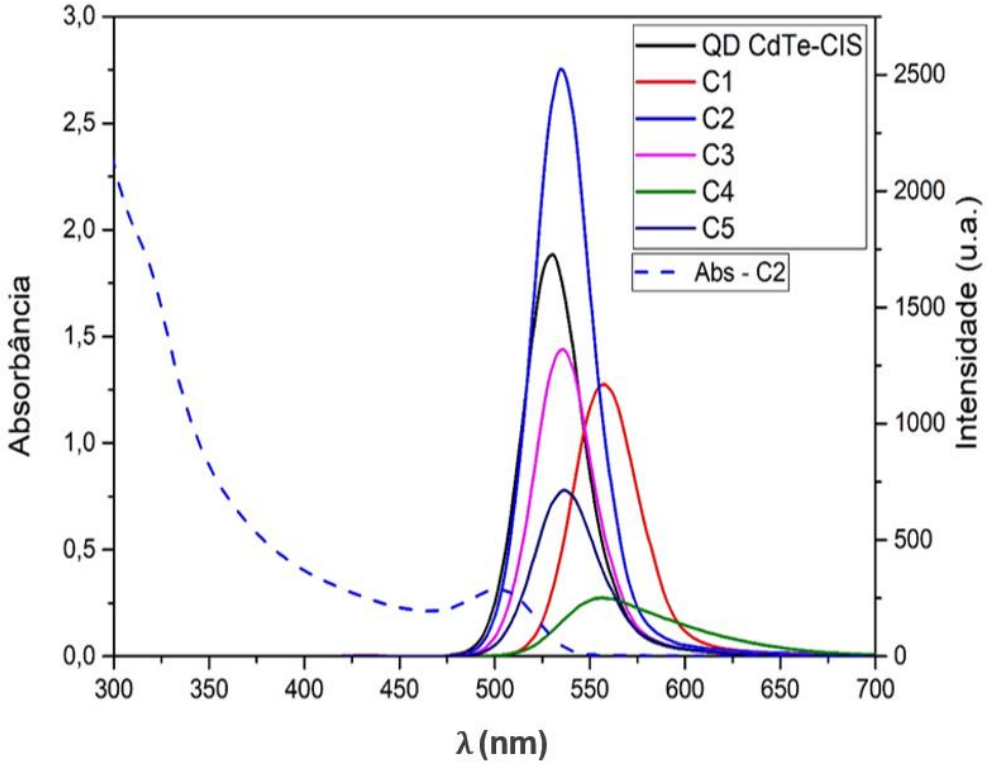
De forma a se desenvolver uma metodologia prática e que não dependesse dos tipos de grupos funcionais presentes na superfície do QD, optou-se por utilizar uma associação não-covalente e ligar os complexos diretamente na superfície dos nanocristais, através de ligações dativas. Tal estratégia fez-se possível uma vez que os ligantes foram modificados com moléculas tioladas, permitindo que os complexos paramagnéticos interajam diretamente na superfície dos QDs.

A princípio foram testados complexos similares (DTPA-CIS e DOTA-CIS) com o mesmo QD (CdTe-CIS), originando os sistemas C1 (CdTe-CIS com DTPA-CIS) e C2 (CdTe-CIS com DOTA-CIS). Posteriormente esses complexos foram conjugados à QDs com diferentes estabilizantes (CdTe-MSA e CdTe-GSH) para avaliar a relação da nova estratégia de conjugação com diferentes estabilizantes. Por fim, outros três *linkers* (CYS, GSH, ATF) foram utilizados para modificar a estrutura do DOTA com o intuito de estudar as mudanças na relaxividade provenientes dessas alterações. Para permitir a comparação, os três complexos (DOTA-CYS, DOTA-GSH e DOTA-ATF) foram conjugados a um

mesmo QD (CdTe-CIS), originando os sistemas C3 (CdTe-CIS com DOTA-CYS, C4 (CdTe-CIS com DOTA-GSH) e C5 (CdTe-CIS com DOTA-ATF).

A Figura 22 ilustra os espectros de emissão medidos dos sistemas preparados a partir do CdTe-CIS. Os espectros de absorção dos sistemas não divergiram entre si, estando exemplificado pela absorção do sistema C2.

Figura 22 – Espectros de absorção (linhas tracejadas) e emissão (linhas contínuas, λ_{exc} = 408 nm) dos sistemas bimodais obtidos a partir da conjugação do CdTe-CIS com complexos paramagnéticos tiolados com diferentes *linkers*. C1 = QD-DTPA-CIS, C2 = QD-DOTA-CIS, C3 = QD-DOTA-CYS, C4 = QD-DOTA-GSH, C5 = QD-DOTA-ATF.



Fonte: Autoria própria (2020).

Os sistemas C1, C3, C4 e C5 ilustrados acima apresentaram uma diminuição na intensidade de emissão. Estas mudanças no espectro de emissão podem estar relacionadas com diferentes fatores, como à presença de algum Gd (III) livre em solução, agredindo a superfície da NP e, consequentemente, reduzindo sua emissão. Ou ainda com a associação dos complexos na superfície dos QDs que pode estar influenciando na passivação do QD, conferindo mais defeitos à superfície dos nanocristais. Ademais, os sistemas C1 e C4 exibiram um desvio do máximo de emissão para a direita (do inglês, *red shift*), efeito já observado em sistemas bimodais similares desenvolvidos em trabalhos

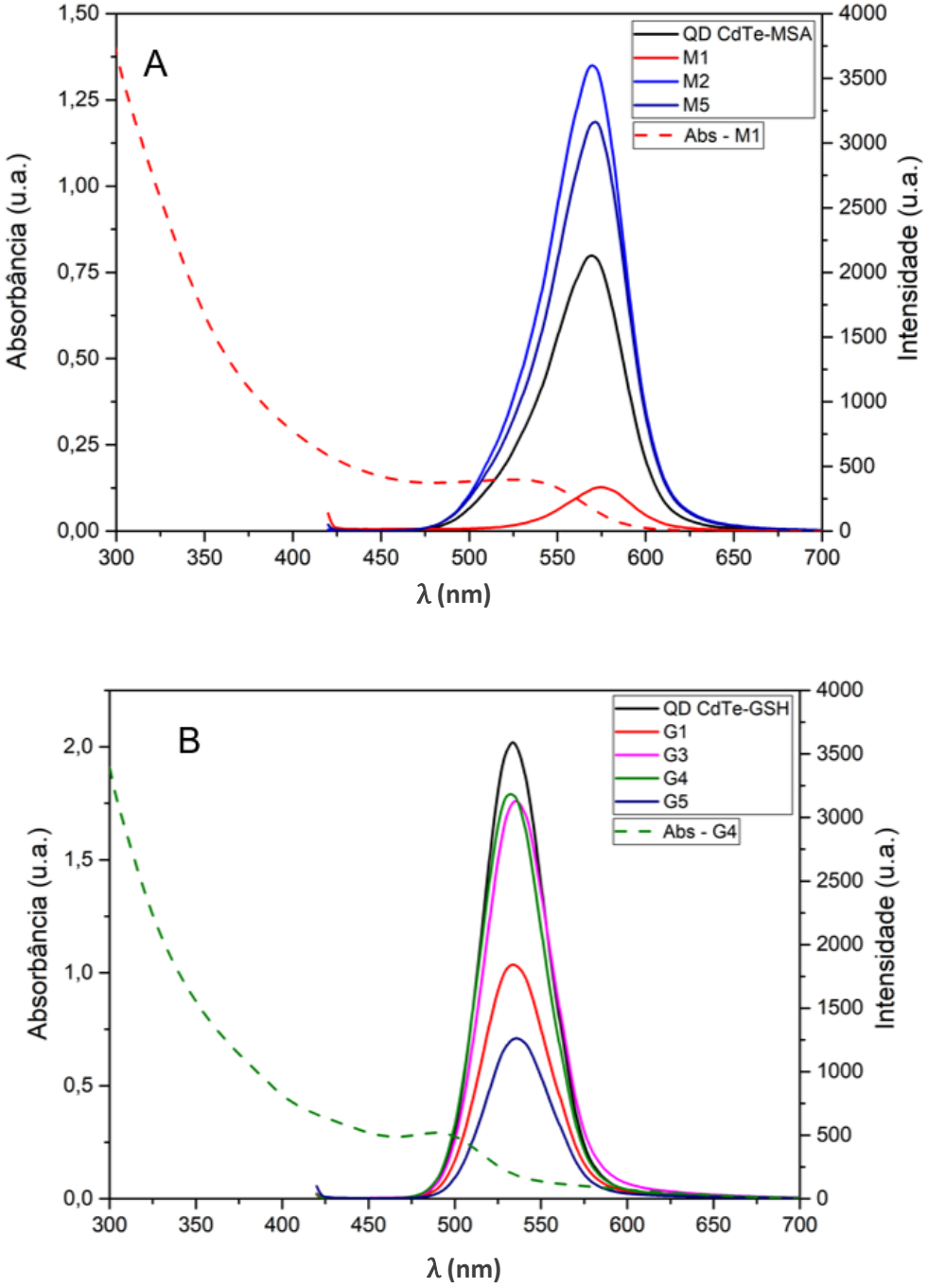
anteriores do nosso grupo de pesquisa (Pereira *et al*., 2019), possivelmente relacionado às alterações feitas na superfície dos QDs. No geral esses sistemas demonstraram um alargamento da banda, confirmado a partir dos valores obtidos de FWHM, revelando um possível aumento de defeitos na superfície do QD (TABELA 8).

O sistema C2 demonstrou aumento na intensidade de emissão, que pode estar relacionado com uma interação positiva dos complexos com a superfície dos QDs, minimizando os defeitos de superfície por reacomodação dos estabilizantes.

A associação de QDs de CdTe-MSA com complexos de DOTA por conjugação covalente já havia sido feita no nosso grupo de pesquisa (Pereira *et al*., 2019). No entanto, ela requeria o uso de uma diamina de forma a possibilitar a conjugação covalente entre os ácidos carboxílicos do CdTe e o grupo carboxílico do DOTA, implicando no aumento de etapas no procedimento de conjugação. Assim, a metodologia desenvolvida neste trabalho foi também utilizada com QDs de CdTe-MSA para comparação. E foram ainda utilizados QDs de CdTe-GSH. Estes QDs (CdTe-MSA e CdTe-GSH) foram conjugados com os 5 complexos, obtendo-se os sistemas M1 (CdTe-MSA com DTPA-CIS), M2 (CdTe-MSA com DOTA-CIS), M3 (CdTe-MSA com DOTA-CYS), M4 (CdTe-MSA com DOTA-GSH), M5 (CdTe-MSA com DOTA-ATF), G1 (CdTe-GSH com DTPA-CIS), G2 (CdTe-GSH com DOTA-CIS), G3 (CdTe-GSH com DOTA-CYS), G4 (CdTe-GSH com DOTA-GSH) e G5 (CdTe-GSH com DOTA-ATF).

Abaixo na FIGURA 23 estão apresentados os espectros para os demais sistemas preparados a partir dos QDs CdTe-GSH e CdTe-MSA, respectivamente, que também tiveram seus espectros de emissão analisados para cada complexo utilizado na conjugação. Novamente, os espectros de absorção coincidiram entre os sistemas, de forma que foram exemplificados pelas absorções dos sistemas M1 e G4.

Figura 23 – Espectros de absorção (linhas tracejadas) e emissão (linhas contínuas) dos sistemas preparados a partir dos QDs: a) CdTe-MSA (M1 = QD-DTPA-CIS, M2 = QD-DOTA-CIS, M5 = QD-DOTA-ATF); b) CdTe-GSH (G1 = QD-DTPA-CIS, G3 = QD-DOTA-CYS, G4 = QD-DOTA-



Fonte: Autoria própria (2020).

No caso dos sistemas formados a partir do QDs CdTe-MSA e CdTe-GSH, a maioria dos sistemas não demonstrou um deslocamento significativo. O complexo DTPA-CIS, em ambos os casos (sistemas M1 e G1), ocasionou uma

diminuição na intensidade de emissão, comportamento similar que já havia sido reportado anteriormente na literatura pelo complexo DTPA-Gd (Cheng *et al*., 2013, Liu *et al*., 2011). O sistema M2 exibiu um aumento da emissão, o que pode estar atrelado mais uma vez à diminuição dos defeitos superficiais do nanocristal decorrentes da sua associação com o complexo.

No caso dos complexos DOTA-CYS e DOTA-GSH (sistemas G3 e G4, respectivamente), a diminuição na intensidade de emissão pode ser devido à conjugação com os complexos modificados, gerando defeitos na superfície do QD. As concentrações razoáveis de Gd (III) livre observadas em ambos os complexos (~50%) podem não estar interferindo negativamente pela possibilidade de os íons paramagnéticos complexarem com os estabilizantes MSA e GSH.

Os sistemas contendo DOTA-ATF (sistemas C5, M5, G5) não exibiram resultados coerentes, o que pode estar relacionado com complicações na preparação do complexo devido à dificuldade de solubilizar o *linker*. Além disso, a elevada quantidade de Gd (III) livre em solução podem ter complexado com os estabilizantes MSA e GSH, e as moléculas de ATF em solução podem ter competido com os estabilizantes, gerando defeitos na superfície dos QDs. Os sistemas M3, M4 e G2 precipitaram antes da realização da caracterização óptica.

No geral, para os sistemas exibidos na FIGURA 23, não houve variação significativa no FWHM comparado aos QDs. Os valores referentes a cada um dos parâmetros citados anteriormente estão expostos na TABELA 7 abaixo.

Tabela 7 – Dados das propriedades ópticas dos sistemas bimodais.

Sistema	λ_{emi} (nm)	% variação na emissão*	FWHM (nm)
CdTe-CIS	530,7	---	37,5
C1	558,4	-32,37	40,8
C2	535,8	46,11	37,2
C3	536,4	-23,65	37,5
C4	568,0	-86,64	74,9
C5	538,0	-92,72	40,9
CdTe-MSA	565,0	---	55,9
M1	573,3	-83,75	46,8
M2	565,3	68,95	55,7
M5	566,5	47,93	55,6
CdTe-GSH	534,9	---	43,8
G1	535,5	-48,67	45,7
G3	535,7	-12,53	46,1
G4	536,9	-13,03	46,1
G5	533,9	-64,87	44,0

*Comparado aos QDs.

4.3.2 Caracterização relaxométrica

A relaxividade dos sistemas preparados foi calculada a partir das medidas de $T_{1,d}$ dos QDs e $T_{1,obs}$ dos sistemas, e calculadas através da equação 3, considerando duas estimativas da concentração de Gd (III). Uma usando a concentração nominal de Gd (III), considerando que tanto a complexação como a conjugação tiveram um rendimento de 100%. E outra, estimando a concentração de Gd (III) a partir dos resultados do teste do XO. Os resultados dos sistemas na proporção de 1:30 encontram-se expostos na TABELA 8 abaixo.

Tabela 8 – Tempos de relaxação longitudinal e respectivos valores de relaxividade dos sistemas bimodais, obtidos à 60 MHz (1,41 T), 37 °C.

Sistema	T_1 (ms)	r_1 ($mM^{-1}s^{-1}$) por Gd (III)		por QD
		Nominal	A partir do XO	Real
CdTe-CIS	3460	-	-	-
C1	2460	1,7	1,9	11,2
C2	2850	0,9	0,9	5,9
C3	1163	8,2	14,6	54,5
C4	1730	4,1	8,3	27,6
C5	824	13,2	-	88,3
CdTe-MSA	3130	-	-	-
M1	1154	3,6	4,2	22,1
M2	2590	1,7	1,8	10,2
CdTe-GSH	3350	-	-	-
G1	2230	1,2	1,4	8,6
G2	2860	0,4	0,4	2,9

Considerando a relaxividade por íon Gd (III), de modo geral, os valores obtidos foram menores que os dos complexos comerciais (DTPA-Gd = 4,3 $mM^{-1}s^{-1}$, DOTA-Gd = 3,6 $mM^{-1}s^{-1}$, à 60 MHz e 37 ºC) (Rohrer *et al*., 2005). Para os sistemas preparados a partir do CdTe-CIS, as nanossondas C3, C4 e C5, exibiram resultados mais promissores. No entanto, os baixos valores de r_1 podem estar relacionados com uma baixa eficiência na conjugação com o QD.

Em contrapartida, os sistemas bimodais preparados, com exceção do sistema G2, apresentaram bons resultados estimados por QD quando comparados com os complexos comerciais, com valores de relaxividade pelo menos 3 vezes superiores, quando comparados com os complexos moleculares. Além disso, verificou-se também valores até 50 vezes maiores para as nanossondas preparadas com o complexo DOTA-CIS. Dessa forma, os resultados preliminares sugerem que a metodologia proposta para preparação dos sistemas se apresenta como promissora no desenvolvimento de ACs.

Foram realizadas medidas de T_2 dos sistemas formados pelos três QDs com os complexos DTPA-CIS e DOTA-CIS. A relaxividade r_2 foi calculada por

meio da Equação 3. Os resultados obtidos, tal qual a razão entre as relaxividades calculadas, encontram-se exibidos na TABELA 9. Os valores de r_2 são referentes aos valores nominais por Gd (III) apresentados na TABELA 8. Através dos dados obtidos, pode-se observar que a razão r_2/r_1 é baixa, o que significa que estes sistemas bimodais são preferencialmente agentes de contraste para T_1. Sendo que os sistemas de CdTe-MSA destacam-se nos valores de r_2, principalmente por nanopartícula.

Tabela 9 – Valores obtidos para relaxação transversal dos sistemas preparados.

Sistema	T_2 (ms)	r_2 ($mM^{-1}s^{-1}$) por Gd (III)		r_2 ($mM^{-1}s^{-1}$) por QD	r_2/r_1
		Nominal	A partir do XO	Real	
CdTe-CIS	1439	-	-	-	-
C1	1222	1,8	2,1	11,8	1,1
C2	1329	0,8	0,9	5,5	0,9
CdTe-MSA	1719	-	-	-	-
M1	589,8	27,8	32,4	169,8	7,7
M2	1288	4,9	5,1	153,7	2,9
CdTe-GSH	1810	-	-	-	-
G1	1188	2,4	2,8	16,6	2,0
G2	1328	1,7	1,8	11,5	4,2

4.4 PREPARAÇÃO DE NOVOS SISTEMAS BIMODAIS

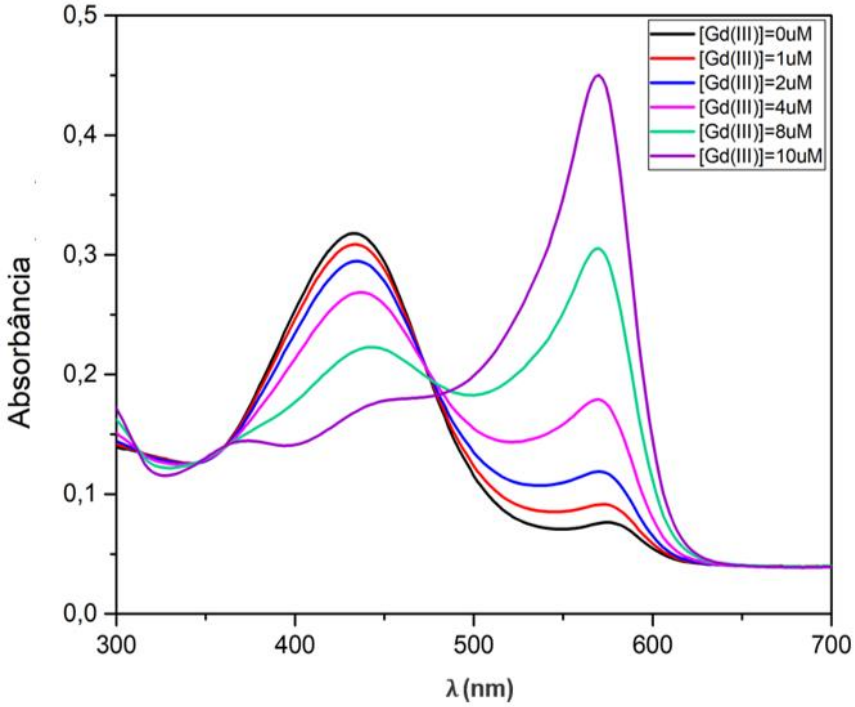
4.4.1 Otimização dos sistemas bimodais com DOTA-CYS e DOTA-GSH

Os complexos DOTA-CYS, DOTA-GSH e DOTA-ATF utilizados anteriormente que haviam indicado uma concentração de Gd (III) livre em solução maior que 50%, foram aquecidos em um forno micro-ondas na tentativa de melhorar suas complexações. O complexo DOTA-CYS foi aquecido durante 15 segundos, em intervalos regulares de 5 segundos. O DOTA-GSH e o DOTA-ATF foram aquecidos em intervalos similares, por um tempo total de 30

segundos. O pH foi reajustado entre cada intervalo de aquecimento para todos os complexos. No entanto, o DOTA-ATF precipitou após o aquecimento. Devido as dificuldades de solubilização do ATF e o tempo reduzido para repetir os sistemas decorrente das restrições impostas pela COVID-19, optou-se por não investir nos complexos DOTA-ATF neste momento.

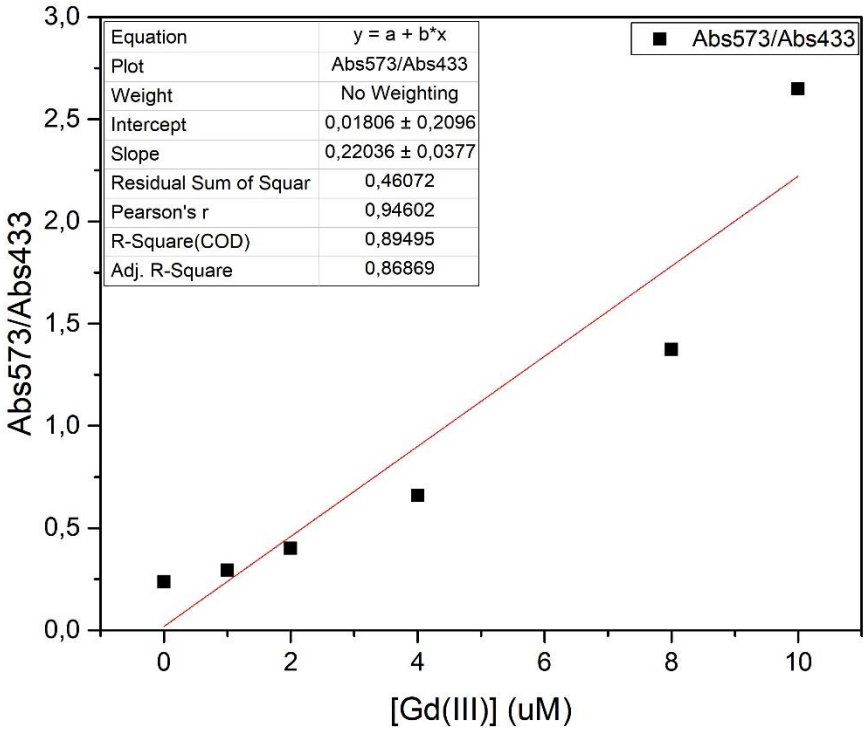
Os ensaios de XO e a caracterização óptica dos sistemas bimodais preparados com os complexos aquecidos, foram repetidos. Uma nova curva de calibração foi feita para estimar a concentração de Gd (III) livre dos complexos que passaram por aquecimento. O procedimento foi semelhante ao primeiro e os resultados podem ser observados nas FIGURAS 24 e 25.

Figura 24 - Nova curva para efetuar os cálculos de regressão linear.



Fonte: Autoria própria (2020).

Figura 25 – Regressão linear do teste do XO para estimar concentração de Gd (III) livre em solução.



Fonte: Autoria própria (2020).

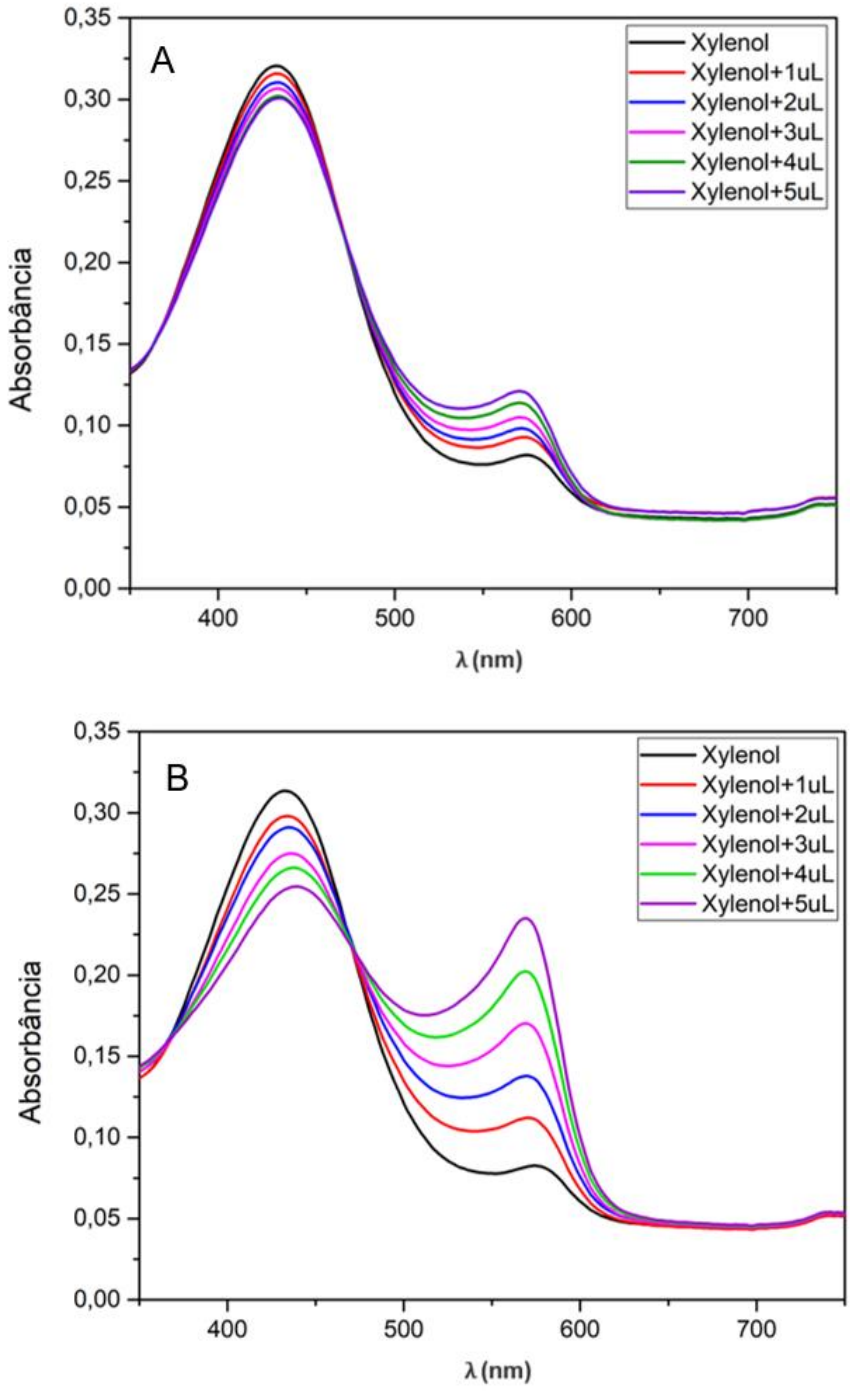
A partir da curva ilustrada na FIGURA 25, encontrou-se a equação da reta (Equação 12) com base na Equação 7.

$$[Gd^{3+}] = A + B\frac{Abs^{573}}{Abs^{433}} \quad (7)$$

$$[Gd^{3+}] = 4{,}537205\frac{Abs^{573}}{Abs^{433}} - 0{,}082123 \quad (12)$$

A FIGURA 26 ilustra o comportamento dos complexos DOTA-CYS e DOTA-GSH no teste do XO, respectivamente, após terem sido submetidos ao aquecimento.

Figura 26 – Ensaios de XO para os complexos (a) DOTA-CYS e (b) DOTA-GSH após otimização por aquecimento.



Fonte: Autoria própria (2020).

Retirando os valores de absorbância nos comprimentos de onda de 433 e 573 nm da curva correspondente à adição de 3 μM de complexo para os dois casos, e aplicando os dados na Equação 12, observou-se uma redução na quantidade de Gd (III) livre em solução comparado aos mesmos complexos

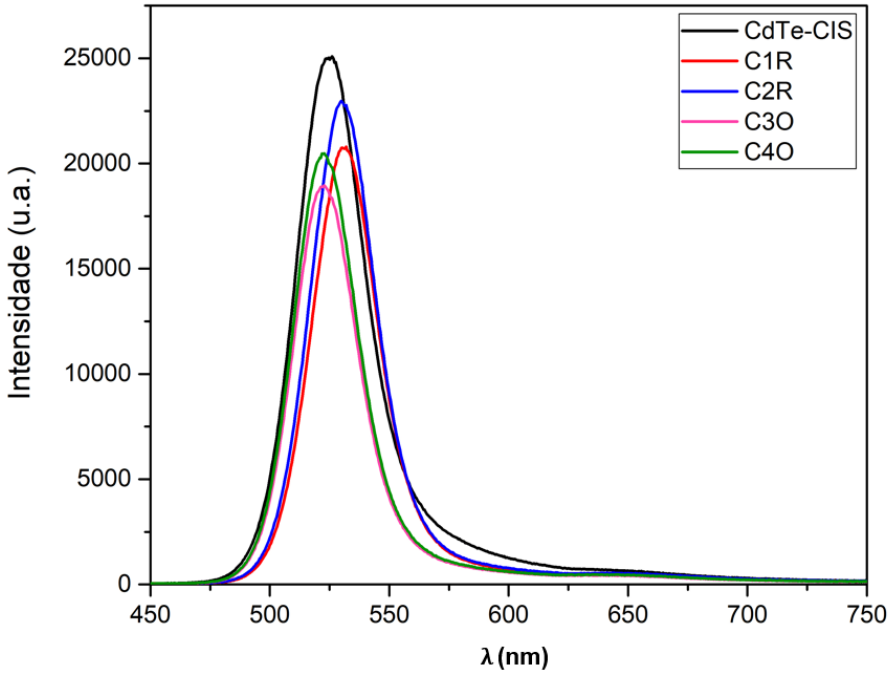
antes de serem aquecidos. O complexo DOTA-CYS estimou uma concentração de 1,4 μM de íons paramagnéticos livres, correspondente à 9,3% da quantidade adicionada. Já o DOTA-GSH apresentou um percentual um pouco maior (18%) de Gd (III) livre em solução, equivalente à 2,7 μM. Mostrando que é possível observar uma melhora na complexação após submeter os complexos à aquecimento. A TABELA 10 apresenta um comparativo entre os resultados obtidos para os complexos DOTA-CYS e DOTA-GSH antes e após o aquecimento.

Tabela 10 – Comparativo da eficácia de complexação antes e após aquecimento dos complexos DOTA-CYS e DOTA-GSH.

Complexo	**Rendimento da complexação (%)**	
	Antes do aquecimento	**Após aquecimento**
DOTA-CYS	43,7	90,7
DOTA-GSH	50,5	82

Repetiu-se os sistemas bimodais utilizando os mesmos 3 QDs de CdTe funcionalizados com CIS, MSA e GSH, e utilizando os quatro complexos cujo rendimento da complexação foi superior a 80%. Os sistemas contendo os complexos DTPA-CIS e DOTA-CIS foram preparados novamente sem fazer alterações nos complexos. A emissão dos sistemas formados a partir do CdTe-CIS encontra-se ilustrada na FIGURA 27.

Figura 27 – Espectros de emissão dos sistemas bimodais repetidos, formados a partir do CdTe-CIS. C1R = QD-DTPA-CIS, C2R = QD-DOTA-CIS, C3O = QD-DOTA-CYS, C4O = QD-DOTA-GSH.

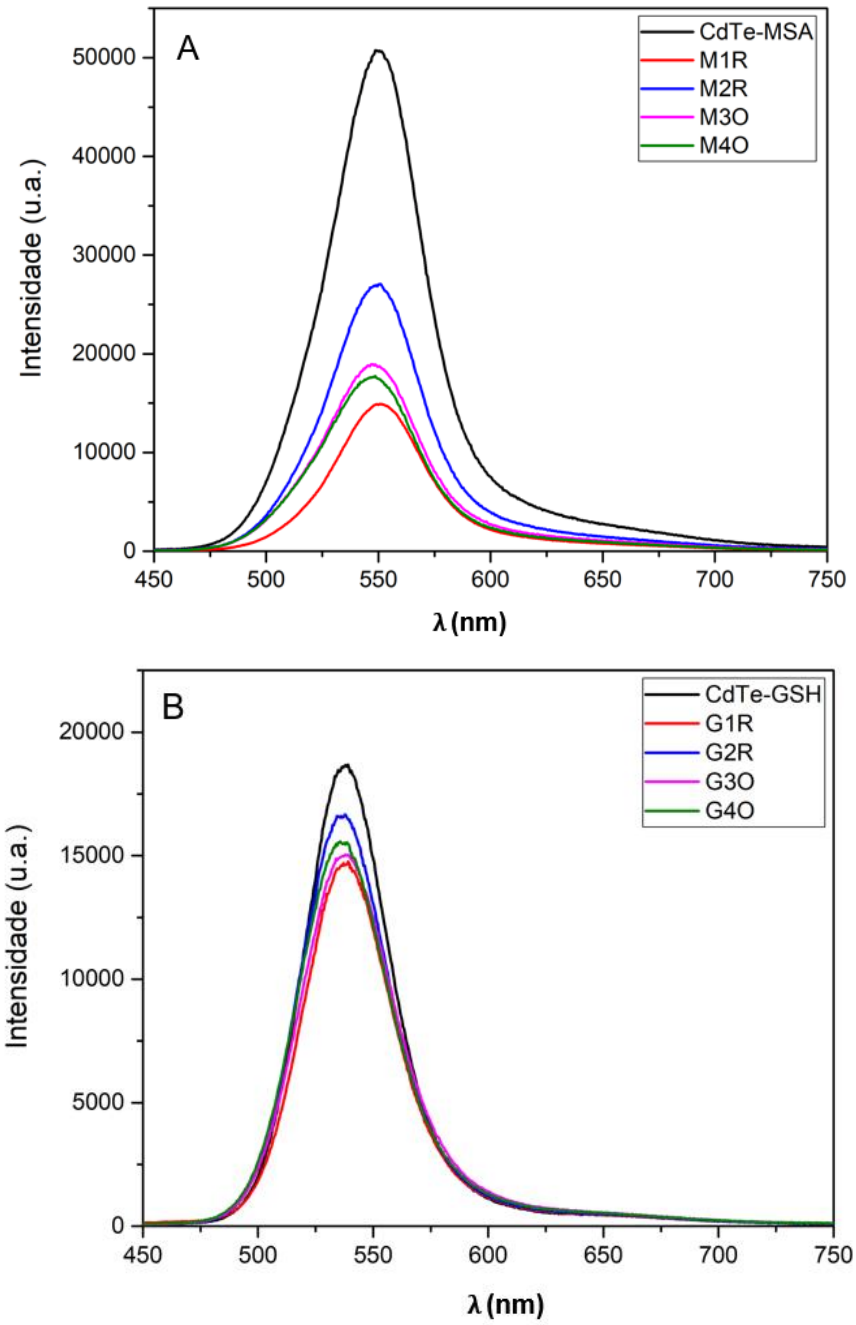


Fonte: Autoria própria (2020).

Todos os sistemas demonstraram diminuição na intensidade de emissão quando comparados ao QD. Os sistemas C1R e C2R apresentaram um ligeiro desvio para a direita (>10 nm) e diminuição na intensidade de emissão, comportamento diferente do sistema C2. O sistema C4O, que nos ensaios anteriores à otimização do complexo exibiu intensidade semelhante aos outros sistemas, agora apresentou seu máximo de emissão próximo ao do C1R. Comparando aos ensaios anteriores, antes de submeter o complexo à aquecimento, o sistema C3O teve um leve aumento na sua intensidade de emissão.

Da mesma forma, os experimentos também foram repetidos para os demais QDs. Os espectros obtidos na caracterização óptica desses sistemas encontram-se na FIGURA 28 abaixo.

Figura 28 – Espectros de emissão dos sistemas bimodais repetidos, formados a partir do: (A) CdTe-MSA. M1R = QD-DTPA-CIS, M2R = QD-DOTA-CIS, M3O = QD-DOTA-CYS, M4O = QD-DOTA-GSH. (B) CdTe-GSH. G1R = QD-DTPA-CIS, G2R = QD-DOTA-CIS, G3O = QD-DOTA-CYS, G4O = QD-DOTA-GSH.



Fonte: Autoria própria (2020).

Observando primeiro os sistemas com o CdTe-MSA (FIGURA 28.A), nenhum dos sistemas apresentou deslocamento do máximo de emissão. O sistema M1R apresentou comportamento similar ao sistema M1. O sistema M2R teve uma diminuição na intensidade de fluorescência, contrariamente ao que tinha sido verificado para o sistema M2. Os sistemas M3 e M4 que haviam

precipitado antes das medidas de emissão, puderam ser medidos nessa repetição (sistema M3O e M4O). Todos os sistemas diminuíram a intensidade de emissão, em comparação com o QD, tendo os sistemas M1R, M3O e M4O reduzido suas emissões em mais da metade da intensidade de emissão exibida pelo nanocristal.

Para os sistemas preparados a partir do CdTe-GSH (FIGURA 28.B), mais uma vez não houve desvio do máximo de emissão com relação ao QD e todos os sistemas diminuíram a intensidade de emissão. Os sistemas G1R e G4O apresentaram melhora na intensidade de emissão comparado aos seus equivalentes G1 e G4, respectivamente. O sistema G2, que havia precipitado antes da caracterização óptica, nesta repetição apresentou estabilidade e permitiu a sua caracterização. O sistema G3O mostrou perfil similar aos experimentos anteriores (sistema G3).

A TABELA 11 traz um resumo dos dados obtidos nas caracterizações ópticas realizadas para os sistemas bimodais repetidos.

Tabela 11 – Resumo dos resultados da caracterização óptica dos sistemas bimodais preparados.

Sistema	λ_{emi} (nm)	% variação na emissão*	FWHM (nm)
CdTe-CIS	525	---	31,8
C1R	532	-16,19	32,8
C2R	530	-7,19	34,2
C3O	523	-23,49	33,4
C4O	523	-17,37	33,3
CdTe-MSA	549	---	44,0
M1R	550	-70,75	53,4
M2R	548	-46,93	54,8
M3O	547	-62,67	57,0
M4O	546	-65,39	47,3
CdTe-GSH	538	---	43,5
G1R	539	-20,92	44,1
G2R	534	-11,00	44,3
G3O	539	-20,74	50,6
G4O	537	-17,08	45,8

*Comparado aos QDs.

Os dados obtidos pela caracterização óptica destes sistemas bimodais indicam que a diminuição da intensidade de fluorescência parece estar relacionada com alterações na superfície do nanocristal devido à conjugação, já que a quantidade de Gd (III) livre é baixa. Os sistemas com CdTe-MSA tiveram uma maior diminuição na emissão, quando comparados com o QD, podendo indicar uma maior repulsão entre os estabilizantes aniônicos e os complexos de Gd (III), que possuem carga líquida -1, dificultando a devida passivação da superfície do nanocristal pelo MSA, diminuindo consequentemente a passivação da superfície do nanocristal, resultando, por sua vez, na diminuição da fluorescência. Assim, fica evidente que mais estudos precisam ser efetuados de forma a otimizar esta estratégia de síntese. No entanto, vale salientar que mesmo verificando uma diminuição na emissão, foi possível visualizar a fluorescência destes sistemas quando irradiados com uma lâmpada de UV (365 nm), indicando o potencial destes sistemas como marcadores fluorescentes.

4.4.2 Estudo das relaxividades dos complexos preparados

Realizou-se a caracterização relaxométrica dos complexos preparados a partir da funcionalização dos ligantes DTPA e DOTA (TABELA 12). As relaxividades dos complexos DOTA-CYS e DOTA-GSH foram obtidas a partir das medidas de T_1 para os complexos após aquecimento.

Tabela 12 – Valores de T_1 e da relaxividade dos complexos preparados.

Amostra	**T_1 (ms)**	**r_1 ($mM^{-1}s^{-1}$)**
Água	3760	---
DTPA-CIS	23,0	4,3
DOTA-CIS	43,4	2,3
DOTA-CYS	24,6	4,0
DOTA-GSH	23,3	4,2

A funcionalização dos ligantes para preparação dos complexos não ocasionou em grande variação dos valores de r_1 com exceção do complexo DOTA-CIS, quando comparados aos seus respectivos comerciais (DTPA-Gd = 4,1 $mM^{-1}s^{-1}$, DOTA-Gd = 3,6 $mM^{-1}s^{-1}$, à 60 MHz e 37 ºC) (Rohrer *et al*., 2005). O resultado do DOTA-CIS pode ser consequência de algum erro experimental e precisa ser repetido.

4.4.3 Estudo das propriedades relaxométricas dos sistemas bimodais otimizados

A concentração real de Gd (III) presente nos sistemas bimodais preparados foi medida por ICP-OES e comparada aos valores teóricos com base na quantidade de Gd (III) empregada na preparação dos complexos. Os dados equivalentes às medidas de T_1 para os sistemas bimodais repetidos, encontram-se na TABELA 13 abaixo.

Tabela 13 – Valores de concentração de Gd (III) presentes nos sistemas bimodais, medidos por ICP-OES.

Sistema	[Gd (III)] teórico	[Gd (III)] real	Rendimento de conjugação (%)
A1	4,9156	2,7005	54,9
A2	4,9156	1,2005	24,4
C1R	2,4578	1,494	60,8
C2R	2,4578	1,1525	46,9
M1R	1,5473	1,042	67,3
M2R	1,5473	0,6555	42,4

Através dos dados de ICP, é possível verificar que o rendimento de conjugação variou entre 24 e 67%. A conjugação parece ter sido mais eficiente com o complexo de DTPA, quando comparado com os complexos de DOTA, para todos os QDs. Uma vez que o sistema preparado por conjugação covalente (A2) teve um rendimento de conjugação baixo, pode-se indagar se todo o ligante DOTA foi ativado anteriormente à complexação. Ou se por outro lado os menores rendimentos para estes complexos estão relacionados com um maior efeito estérico. Para elucidar e conseguir otimizar esta conjugação, torna-se necessário outras caracterizações dos complexos DOTA modificados, como por exemplo espectroscopia de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa.

Para a preparação dos complexos de DTPA modificados, é usado como precursor o dianidrido do DTPA, logo esta reação não está tão dependente da ativação da carboxila pelos agentes de acoplamento, já que a conjugação com as moléculas tioladas pode ocorrer diretamente entre o anidrido e a função amina. Assim, para estes complexos, o rendimento da conjugação na superfície do QD deverá estar relacionado com impedimento estérico e espaço disponível na superfície da nanopartícula, para adição de mais moléculas passivantes.

A comparação destes dados com outras metodologias descritas na literatura é difícil, uma vez que geralmente o rendimento da etapa de conjugação não é apresentado. No trabalho de Souza Sobrinha (2018), os sistemas CdTe-CIS-DTPA-Gd e CdTe-CIS-DOTA-Gd, preparados por conjugação covalente, foram obtidos com um rendimento de cerca de 50%. Assim, com exceção do sistema A2, os rendimentos aqui obtidos são comparáveis. Quando comparamos

com o sistema CdTe-MSA-DOTA-Gd obtido por Pereira *et al*. (2019), com rendimento de 75%, esta estratégia de conjugação não-covalente parece ser menos eficiente para os complexos derivados do DOTA.

As medidas de relaxividade foram feitas para os sistemas repetidos (C1R, C2R, M1R e M2R), bem como para os sistemas bimodais preparados por conjugação covalente (A1 e A2) (TABELA 14). A relaxividade foi calculada considerando a concentração teórica de gadolínio (r_1 nominal) e a concentração real obtida dos resultados de ICP-OES (r_1 real).

Tabela 14 – Tempos de relaxação longitudinal medidos para os sistemas bimodais repetidos, à 60 MHz e 37 °C e os respectivos valores de relaxividade.

Sistema	T_1 **(ms)**	r_1 **(mM^{-1}s^{-1})**		
		por Gd (III)		**por QD**
		Nominal	**Real**	**Real**
CdTe-CIS	3630	---	---	---
A1	1710	4,4	7,3	29,5
A2	1376	6,4	13,7	43,1
CdTe-CIS	3240	---	---	---
C1R	1750	3,7	6,2	25,1
C2R	2400	1,5	3,3	10,3
CdTe-MSA	3370	---	---	---
M1R	1368	10,8	16,4	66,2
M2R	2740	1,7	16,4	10,4

Com exceção do sistema C2R (CdTe-CIS associado ao complexo DOTA-CIS por ligação dativa) que apresenta um valor de relaxividade semelhante ao AC comercial, todos os sistemas apresentaram valores reais de relaxividade superiores aos contrastes comerciais (DTPA-Gd = 4,3 mM^{-1}s^{-1}, DOTA-Gd = 3,6 mM^{-1}s^{-1}, à 60 MHz e 37 ºC) (Rohrer *et al*., 2005). Este aumento de r_1 prevê-se que esteja associado à ligação da nanopartícula que altera o valor de τ_r. O estudo da influência dos mecanismos que governam os processos de relaxação paramagnética poderia ser analisado fazendo medidas de r_1 em diferentes campos e temperaturas, e fazendo medidas de RMN de ^{17}O.

Avaliando por QD, tem-se um acréscimo na relaxividade no mínimo maior que o triplo quando se compara à cada complexo. Sendo este aumento mais evidente nos QDs de CdTe estabilizado com MSA, o que sugere que o estabilizante pode estar influenciando de forma mais significativa alguns parâmetros que governam a relaxação paramagnética, dentre eles a variação de τ_M ou ainda a mobilidade local do complexo, o qual influencia também em τ_R. A influência do estabilizante e do *linker* nesses parâmetros e, consequentemente, na relaxividade, poderão ser elucidadas com a caracterização completa de todos os sistemas preparados a partir de dados de NMRD e ^{17}O.

A TABELA 15 apresenta os dados de relaxividade transversal dos sistemas bimodais calculados a partir das medidas de T_2 e dados de concentração de íons Gd (III) obtidos por ICP-OES. Como era de se esperar, os sistemas bimodais preparados são preferencialmente agentes de contraste positivos, como pode ser verificado pelos baixos valores de r_2/r_1.

Tabela 15 – Dados de tempo de relaxação transversal dos sistemas e suas respectivas relaxividades, r_2.

Sistema	T_2 (ms)	r_2 ($mM^{-1}s^{-1}$) por Gd (III)		por QD	r_2/r_1
		Nominal	Real	Real	
CdTe-CIS	1550	---	---	---	---
A1	907	6,5	10,7	43,7	1,5
A2	763	9,5	20,3	63,6	1,5
CdTe-CIS	871	---	---	---	---
C1R	719	3,5	5,7	23,2	0,9
C2R	828	0,8	1,8	5,7	0,5
CdTe-MSA	1144	---	---	---	---
M1R	566	22,3	33,7	136,1	2,1
M2R	899	5,9	57,3	36,3	3,5

De forma a comparar os nossos resultados com sistemas bimodais reportados na literatura, selecionamos trabalhos que usam campo magnético com a mesma frequência (60 MHz), ou com frequências menores (TABELA 16).

Pois sabe-se que a frequência do campo magnético externo afeta os valores de r_i, sendo que a relaxividade longitudinal diminui com o aumento do campo magnético. Outros valores de relaxividade podem ser encontrados nas TABELAS 1 e 2 do Anexo.

Tabela 16 – Comparativo de medidas relaxométricas de sistemas bimodais semelhantes já relatados na literatura.

Sistema	Referência	r_1 ($mM^{-1}s^{-1}$)	Condições	Método de conjugação
A1	Presente trabalho	7,3	60, 37	EDC e NHS
A2	Presente trabalho	13,7	60, 37	EDC e NHS
CdTe-CIS-DTPA-Gd (C1R)	Presente trabalho	6,2	60, 37	Tiol-metal
CdTe-CIS-DOTA-Gd (C2R)	Presente trabalho	3,3	60, 37	Tiol-metal
CdTe-MSA-DTPA-Gd (M1)	Presente trabalho	16,4	60, 37	Tiol-metal
CdTe-MSA-DOTA-Gd (M2)	Presente trabalho	16,4	60, 37	Tiol-metal
CdTe-CIS-DTPA- Gd	Souza Sobrinha, 2018	6,82	60, 37	EDC e NHS
CdTe-CIS-DOTA-Gd	Souza Sobrinha, 2018	3,07	60, 37	EDC e NHS
CdTe-MSA-DOTA-Gd	Pereira *et al*., 2019	20	60, 37	EDC e sulfo-NHS
CdSe/ZnS-DTPA-Gd	Park *et al*., 2012	11,7	60, 36	Tiol-metal
CdSe/ZnS-DTPA-Gd	Mulder *et al*., 2006	12	60, 37	Interação física
CdSe/ZnS-DOTA-Gd	Gerion *et al*., 2007	23	60, 25	Covalente
CdSe/CdS/ZnS-DTPA-ATF	McAdams *et al*., 2017	11	42,9, 27	Tiol-metal
CdHgTe/ZnS-DHLA-Gd	Gao *et al*., 2013	2,01	20, 32	Tiol-metal

Como pode ser verificado na TABELA 16, existe uma variedade de valores de r_1 para os sistemas reportados na literatura, não havendo uma relação direta entre o método de conjugação e a eficiência do AC. Os sistemas bimodais preparados neste trabalho apresentaram relaxividades semelhantes a outros da literatura, tendo, no entanto, a vantagem de serem preparados a partir de QDs hidrofílicos, não precisando assim de nenhuma etapa de biocompatibilização para serem aplicados em sistemas biológicos.

Quando comparamos os sistemas bimodais preparados nesta dissertação com outros resultados do nosso grupo de pesquisa, é possível verificar que a metodologia utilizada por Souza Sobrinha (2018) foi otimizada, obtendo-se valores de r_1 para os sistemas preparados pela mesma metodologia. No entanto, os sistemas preparados por uma estratégia não-covalente apresentaram valores de r_1 menores, a serem otimizados.

O sistema M2 utilizando o CdTe-MSA, pode ser comparado com o trabalho de Pereira *et al*. (2019), verificando-se que houve uma pequena redução no valor de r_1 (< 5 $mM^{-1}s^{-1}$). Contudo, a estratégia de síntese proposta na literatura requer várias etapas de conjugação covalente. Assim, o método aqui desenvolvido mostra-se interessante para a preparação destes sistemas, uma vez que os sistemas apresentaram propriedades ópticas e relaxométricas promissoras.

Apesar dos resultados obtidos nesta dissertação para os valore de r_1 serem semelhantes aos resultados reportados na literatura, faz-se necessário salientar que devido às limitações impostas pela pandemia, não foi possível reproduzir todos os sistemas, refazer as caracterizações e estimar a real quantidade de Gd (III) de todos os sistemas (por ICP-OES), inviabilizando uma melhor comparação com os valores presentes na literatura. Além de que esses dados nos poderiam dar informações importantes de como os grupos estabilizantes e os *linkers* utilizados interferem nos valores de relaxividade, de forma a encontrar um AC otimizado.

A nova metodologia proposta para a preparação dos sistemas bimodais, quando comparadas com outras da literatura, mostra-se bastante versátil e prática. A alternativa de conjugação direta na superfície minimiza eventuais empecilhos na preparação da suspensão coloidal, como por exemplo a necessidade de ajuste do pH, que pode comprometer a estabilidade do sistema. Além disso, os QDs hidrofílicos utilizados possuem ainda uma superfície ativa para conjugação com biomoléculas, de forma a preparar sondas bimodais específicas.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram desenvolvidos sistemas bimodais compostos por QDs de CdTe com três funcionalizantes diferentes (CIS, MSA e GSH), preparados pelo método *one-pot*, e complexos de gadolínio dos tipos DTPA e DOTA funcionalizados com quatro *linkers* diferentes (CIS, CYS, GSH e ATF). Ainda foram preparados sistemas bimodais por conjugação covalente dos QDs de CdTe-CIS obtidos pelo método *one-pot*, à complexos de DTPA e DOTA, para comparação com metodologias anteriores utilizadas pelo grupo.

Os resultados da caracterização óptica dos sistemas bimodais estudados apontam, no geral, uma diminuição da intensidade de fluorescência quando comparado aos QDs. Tal variação foi associada às alterações realizadas na superfície dos nanocristais decorrentes da conjugação. O estudo evidenciou a necessidade de otimizar estratégias de preparação dos complexos a fim de aumentar os percentuais de complexação, bem como de otimizar a metodologia de conjugação dos complexos aos nanocristais, com o intuito de aumentar o rendimento da conjugação, o que tende a gerar melhorias nos valores de relaxividade por QD.

Através da caracterização relaxométrica realizada pôde-se observar que os sistemas bimodais preparados por conjugação covalente (A1 e A2) mostraram uma otimização da metodologia empregada por Souza Sobrinha (2018). Com relação aos sistemas bimodais preparados por conjugação tiol-metal, os valores de r_1 foram menores, indicando a necessidade de otimização tanto da preparação dos complexos, quanto da sua conjugação com o QD.

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram o potencial dos sistemas bimodais preparados para serem empregados como agentes de contraste. Através dos resultados obtidos pôde-se concluir que a metodologia de preparação dos sistemas bimodais, associando os complexos paramagnéticos por ligação dativa na superfície dos QDs, é promissora, além de ser um método versátil e de fácil execução. Os estudos ópticos e relaxométricos realizados mostraram que os sistemas bimodais preparados se apresentam como promissores agentes bimodais para estudos biológicos por fluorescência e MRI.

6 PERSPECTIVAS

Far-se-á a otimização da preparação dos complexos com o intuito de aumentar a eficiência de complexação e, consequentemente, diminuir a quantidade de Gd (III) livre em solução. Serão testadas metodologias de complexação por refluxo, com aquecimento durante todo o processo, e aquecendo ao final do procedimento, tendo em vista a melhora na complexação por aquecimento para o DOTA-CYS e DOTA-GSH.

Serão desenvolvidas novas estratégias para preparação do complexo DOTA-ATF, tentando superar as dificuldades de solubilização. Além de otimização do preparo dos complexos propostos, ainda é preciso caracterizar os complexos quanto à suscetibilidade de transmetalação, para verificar a estabilidade desses complexos.

Conseguindo otimizar a preparação dos complexos, serão repetidos os demais sistemas bimodais que não puderam ser analisados por todas as técnicas de caracterização, como aqueles contendo o complexo DOTA-ATF, e os sistemas preparados a partir do CdTe-CIS e CdTe-MSA com DOTA-CYS e DOTA-GSH. Como também todos os sistemas preparados a partir do CdTe-GSH com os complexos desenvolvidos neste trabalho.

Por fim, é interessante a modificação da nanopartícula para um QD livre de cádmio com o objetivo de reduzir a toxicidade do sistema, explorando QDs com emissão no NIR.

REFERÊNCIAS

AGHEBATI-MALEKI, A. *et al*. **Nanoparticles and cancer therapy: Perspectives for application of nanoparticles in the treatment of cancers.** Journal of Cellular Physiology. v. 235, n. 3, p. 1962-1972, 2019.

AIME, S., GIANOLIO, E., CORPILLO, D. **Designing Novel Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. Synthesis and Relaxometric Characterization of three Gadolinium (III) Complexes Based on Functionalized Pyridine-Containing Macrocyclic Ligands.** Helvetica Chimica Acta. v. 86, p. 615-632, 2003.

BAKALOVA, R. *et al*. **Silica-Shelled Single Quantum Dot Micelles as Imaging Probes with Dual or Multimodality.** Anal. Chem. v. 78, n. 16, p. 5925-5932, 2006.

BAKALOVA, R. *et al*. **Multimodal Silica-Shelled Quantum Dots: Direct Intracellular Delivery, Photosensitization, Toxic, and Microcirculation Effects.** Bioconjugate Chem. v. 19, n. 6, p. 1135-1142, 2008.

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

BARIL, M. B. *et al*. **Nanotecnologia aplicada aos cosméticos.** Visão Acadêmica. Curitiba. v. 13, n. 1, p. 45-54, 2012.

BELEZZZA, O. J. V. *et al*. **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, 2018.

BIANCHI, A. *et al*. **Thermodynamic and structural properties of Gd^{3+} complexes with functionalized macrocyclic ligands based upon 1,4,7,10-tetraazacyclododecane.** J. Chem. Dalton Trans. v. 5, p. 697-705, 2000.

BROWN, R. W. *et al*. **Magnetic Resonance Imaging. Physical Principles and Sequence Design.** Wiley Blackwell. 2 ed. p. 978, 2014.

BUSHONG, S. C. CLARKE, G. **Magnetic Resonance Imaging: Physical and Biological Principles.** Elsevier. 4 ed. p. 529, 2015.

CABELLA, C. *et al*. **Cellular labeling vith Gd (III) chelates: only high thermodynamic stabilities prevent the cells acting as 'sponges' of Gd^{3+} ions.** Contrast Media and Molecular Imaging. v. 1, p. 23-29, 2006.

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

CACHERIS, W. P., QUAY, S. C., ROCKLAGE, S. M. **The relationship between thermodynamics and the toxicity of gadolinium complexes.** Magnetic Resonance Imaging. v. 8, p. 467-481, 1990.

CAI, Y. *et al.* **Optical nano-agents in the second near-infrared window for biomedical applications.** Chem. Soc. Rev. v. 48, p. 22-37, 2019.

CALLAN, J. F., RAYMO, F. M. **Quantum Dot Sensors. Technology and Commercial Applications.** Pan Stanford Publishing. 1 ed. P. 224, 2013.

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

CARAVAN, P. **Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium-based MRI contrast agents.** Chem. Rev. v. 35, p. 512-523, 2006.

CHENG, C. *et al*. **Gadolinium-based $CuInS_2$/ZnS Nanoprobe for Dual-Modality Magnetic Resonance/Optical Imaging.** ACS Applied Materials and Interfaces. v. 5, p. 4389-4400, 2013.

CLOUGH, T. J. *et al*. **Ligand design strategies to increase stability of gadolinium-based magnetic resonance imaging contrast agents.** Nature Communications. V. 10, p. 1420, 2019.

CONSTANTINIDES, C. **Magnetic Resonance Imaging – The Basics.** Taylor and Francis Group. p. 1-234, 2014.

COSSAIRT, B. M. **Shining Light on Indium Phosphide Quantum Dots: Understanding the Interplay among Precursor Conversion, Nucleation, and Growth.** Chem. Mater. v. 28, n. 20, p. 7181-7189, 2016.

DAGTEPE, P. *et al*. **Quantized Growth of CdTe Quantum Dots; Observation of Magic-Sized CdTe Quantum Dots.** J. Phys. Chem. v. 111, p. 14977-14983, 2007.

FERREIRA, M. F. *et al.* **Gd (DO3A-*N*-α-aminopropionate): a versatile and easily available synthon with optimized water exchange for the synthesis of high relaxivity, targeted MRI contrast agents.** Chem. Commun. p. 6475-6477, 2009.

FONTES, A. *et al*. **Quantum Dots in Biomedical Research.** Biomedical Engineering – Technical Applications in Medicine. c. 12, p. 269-290, 2012.

FRENZEL, T. *et al*. **Stability of Gadolinium-Based Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents in Human Serum at 37 ºC.** Invertigative Radiology. v. 43, n. 12, p. 817-828, 2008.

GALE, E. M. *et al*. **Gadolinium-based contrast agents in pediatric magnetic resonance imaging.** Pediatr. Radiol. v. 47, p. 507-521, 2017.

GAO, D. *et al*. **Ultrasmall paramagnetic near infrared quantum dots as dual modal nanoprobes.** RSC Adv. v. 3, p. 21247-21250, 2013.

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

GARCIA, I. M. *et al*. **Quantum Dots as Nonagglomerated Nanofillers for Adhesive Resins.** Biomaterials and Bioengineeting. v. 12, n. 95, p. 1401-1407, 2016.

GARCÍA-RODRÍGUEZ, R. *et al*. **Conversion Reactions of Cadmium Chalcogenide Nanocrystal Precursors.** Chem. Mater. v. 25, n. 8, p. 1233-1249, 2013.

GERION, D. *et al.* **Paramagnetic Silica-Coated Nanocrystals as an Advanced MRI Contrast Agent.** J. Phys. Chem. v. 111, p. 12542-12551, 2007.

HSU, C. *et al*. **Bioluminescence resonance energy transfer using luciferase-immobilized quantum dots for self-illuminated photodynamic therapy.** Biomaterials. v. 34, n. 4, p. 1204-1212, 2013.

JIN, T. *et al*. **Gd^{3+}-functionalized near-infrared quantum dots for *in vivo* dual modal (fluorescence/magnetic resonance) imaging.** Chem. Commun. p. 5764-5766, 2008.

KLEIN, H. **Clinical Low Field Strength Magnetic Resonance Imaging. A Pratical Guide to Accessible MRI.** Springer. 1 ed. p. 166, 2016.

KUMAR, K. *et al*. **Effect of Ligand Basicity on the Formation and Dissociation Equilibria and Kinetics og Gd^{3+} Complexes of Macrocyclic Polyamino Carboxylates.** Inorg. Chem. v. 33, p. 3823-3829, 1994.

LA MER, V. K., DINEGAR, R. H. **Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols.** Journal of the American Chemical Society. v. 72, n. 11, p. 4847-4854, 1950.

LAURENT, S. *et al*. **Stability of MRI Paramagnetic Contrast Media: A Proton Relaxometric Protocol for Transmetallation Assessment.** Investigative Radiology. v. 36, n. 2, p. 115-122, 2001.

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

LIU, Y. *et al*. **Fluorescence-enhanced gadolinium-doped zinc oxide quantum dots for magnetic resonance and fluorescence imaging.** Biomaterials. v. 32, p. 1185-1192, 2011.

MAITI, A., BHATTACHARYYA, S. **Review: Quantum Dots and Application in Medical Science.** International Journal of Chemistry and Chemical Engineering. v. 3, n. 2, p. 37-42, 2013.

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

MESSERI, D. *et al*. **A stable, high relaxivity, diaqua gadolinium complex that suppresses anion and protein binging.** Chem. Commun. v. 24, p. 2742-2743, 2001.

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

MURRAY, C. B., NORRIS, D. J., BAWENDI, M. G. **Synthesis and Characterization of Nearly Monodisperse CdE (E = S, Se, Te) Semiconduvtor Nanocrystallites.** J. Am. Chem. Soc. v. 115, p. 8706-8715, 1993.

NIENDORF, H. P. **Gadolinium-DTPA: A New Contrast Agent.** Bristol Medico-Chirurgical Journal. v. 103, n. 2, p. 34, 1988.

OOSTENDORP, M. *et al*. **Quantitative Molecular Magnetic Resonance Imaging of Tumor Angiogenesis Using cNGR-Labeled Paramagnetic Quantum Dots.** Cancer Res. v. 68, n. 18, p. 7676-7683, 2008.

OOSTENDORP, M. *et al*. **Gadolinium-Labeled Quantum Dots for Molecular Magnetic Resonance Imaging: R_1 Versus R_2 Mapping.** Magnetic Resonance in Medicine. v. 64, p. 291-298, 2010.

PARK, J. *et al.* **A DTTA-ligated utidine-quantum dot conjugate as a bimodal contrast agente for cellular imaging.** Chem. Commun. v. 48, p. 3218-3220, 2012.

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, issues 1/2, p. 1-33, 2007.

PEREIRA, G. *et al*. **(Bio)conjugation Strategies Applied to Fluorescent Semiconductor Quantum Dots.** J. Braz. Chem. Soc. v. 0, n. 0, p. 1-25, 2019.

PEREIRA, M. I. A. *et al*. **Hydrophilic Quantum Dots Functionalized with Gd (III)-DO3A Monoamide Chelates as Bright and Effective T_1-weighted Bimodal Nanoprobes.** Scientific Reports. v. 9, p. 2341, 2019.

PRINZEN, L. *et al*. **Optical and Magnetic Resonance Imaging of Cell Death and Platelet Activation Using Annexin A5-Functionalized Quantum Dots.** Nano Letters. v. 7, n. 1, p. 93-100, 2007.

PU, Y. *et al*. **Colloidal Synthesis of Semiconductor Quantum Dots Toward Large-Scale Production: A Review.** Ind. Eng. Chem. Res. v. 57, n. 6, p. 1790-1802, 2018.

RAMALHO, J. *et al*. **Gadolinium-Based Contrast Agent Accumulation and Toxicity: An Update.** American Journal of Neuroradiology. v. 37, n. 7, p. 1192-1198, 2016.

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

ROHRER, M. *et al*. **Comparison of Magnetic Properties of MRI Contrast Media Solutions at Different Magnetic Field Strenghts.** Investigative Radiology. v. 4, n. 11, p. 715-724, 2005.

SANTOS, B. S. *et al*. **Semiconductor Quantum Dots for Biological Applications.** Handbook of Self Assembled Semiconductor Nanostructures Novel. c. 26, p. 773-798, 2008.

SELOPAL, G. S. *et al*. **Core /Shell Quantum Dots Solar Cells.** Advanced Functional Materials. v. 62, p. 1-21, 2020.

SHAW, D. J. **Introduction to Colloid and Surface Chemistry.** Butterworth-Heinemann. 4 ed. p. 315, 1992.

SONG, D. *et al*. **Upconversion System with Quantum Dots as Sensitizer: Improved Photoluminescence and PDT Efficiency.** ACS Appl. Mater. Interfaces. v. 11, n. 41, p. 100-108, 2019.

SOUZA SOBRINHA, I. G. **Síntese e caracterização físico-química de potenciais agentes de contraste bimodais baseados em Pontos Quânticos e complexos de Gadolínio.** Dissertação de Mestrado. UFPE. p. 90, 2018.

SUAZO, K. F. G. VILARAZA, J. L. **Gd-XO: a colorimetric probe for the complexation of Gd^{3+} with DO3A-type ligands.** Anal. Methods. n. 20, p. 1-3, 2015.

TÓTH, E. *et al*. **Kinetics of Formation and Dissociation of Lanthanide (III)-DOTA Complexes.** Inorg. Chem. v. 33, p. 4070-7076, 1994.

TÓTH, E. *et al*. **Relaxivity of MRI Contrast Agents.** Topics in Current Chemisty. ed. Krause, W. p. 61-101, 2002.

UNG, T. D. T. *et al*. **CdTe and CdSe quantum dots: synthesis, characterizations and applications in agriculture.** Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology. v. 3, n. 4, p. 1-12, 2012.

VEIGAS, I. M. A. *et al.* **Multivariate optimization of optical properties of CdSe quantum dots obtained by a facile one-pot aqueous synthesis.** Inorganic Chemistry Frontiers. v. 6, p. 1350-1360, 2019.

WEISHAUPT, D., KÖCHLI, V. D., MARINCEK, B. **How Does MRI Work? An Introduction to the Physics and Function of Magnetic Resonance Imaging.** Springer. 2 ed. p. 172, 2008.

WENG, J. *et al.* **Highly luminescent CdTe quantum dots prepared in aqueous phase as an alternative fluorescent probe for cell imaging.** Talanta. v. 70, p. 397-402, 2006.

WU, J. *et al.* **Surface plasmon enhanced intermediate band-based quantum dots solar cell.** Solar Energy Materials and Solar Cells. v. 102, p. 44-49, 2012.

XING, X. *et al*. **An "imaging-biopsy" strategy for colorectal tumor reconfirmation by multipurpose paramagnetic quantum dots.** Biomaterials. v. 48, p. 16-25, 2015.

YANG H. *et al*. **Gd^{III}-Functionalized Fluorescent Quantum Dots as Multimodal Imaging Probes.** Adv. Mater. v. 18, p. 2890-2894, 2006.

YAREMA, O., YAREMA, M., WOOD, V. **Tuning the Composition of Multicomponent Semiconductor Nanocrystals: The Case of I-III-VI Materials.** Chem. Mater. v. 30, p. 1446-1461, 2018.

YONG, K. *et al.* **Aqueous phase synthesis of CdTe quantum dots for biophotonics.** Journal of Biophotonics. v. 4, n. 1-2, p. 9-20, 2011.

YU, W. W. *et al*. **Experimental Determination of the Extinction Coefficient of CdTe, CdSe and CdS Nanocrystals.** Chem. Mater. v. 15, p. 2854-2860, 2003.

ZANETTI-RAMOS, B. G., CRECZYNSKI-PASA, T. B. **O desenvolvimento da nanotecnologia: cenário mundial e nacional de investimentos.** Ver. Bras. Farm. v. 2, n. 89, p. 95-101, 2008.

ZEBIBULA, A. *et al.* **Ultrastable and Biocompatible NIR-II Quantum Dots for Functional Bioimaging.** Adv. Funct. Mater. v. 28, p. 1-13, 2018.

APÊNDICE A – ARTIGO DE REVISÃO

Quantum Dots and Gd^{3+} Chelates: Advances and Challenges Towards Bimodal Nanoprobes for Magnetic Resonance and Optical Imaging

Gabriela M. Albuquerque,[1] Izabel Souza Sobrinha,[1] Samantha D. Coiado,[1] Beate S. Santos,[2] Adriana Fontes, [3] Giovannia A. L. Pereira,[1,*] Goreti Pereira [1,*]

[1] Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

[2] Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

[3] Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

*Corresponding authors: Goreti Pereira (e-mail: goreti.pereira@ufpe.br, Orcid: 0000-0003-2604-6704) and Giovannia A. L. Pereira (e-mail: giovannia.pereira@ufpe.br, Orcid: 0000-0003-2906-238X), Av. Jornalista Anibal Fernandes, S/N, Departamento de Química Fundamental, CCEN, UFPE, 50740-560, Recife, Brazil.

Abstract

The development of multimodal nanoprobes has been increasing in recent years. Between these novel nanostructures are the bimodal systems based on quantum dots (QDs) and low molecular weight Gd^{3+} chelates, magnetic resonance imaging (MRI) and optical analyses. MRI is a technique used worldwide, which has anatomic resolution and allows to distinguish physiological differences, at tissues and organs level. On the other hand, optical techniques are very sensitive and allow following events at cellular or molecular level. Thus, the association of these two techniques has the potential to achieve a more complete comphreension of biological processes. In this review, we present the state-of-the-art research concerning the development of potential multimodal optical/paramagnetic nanoprobes based on Gd^{3+} chelates and QDs, highlighting their preparation strategies and overall properties.

Keywords

Semiconductor nanocrystals, Gd^{3+} complexes, optical techniques, magnetic resonance imaging.

Table of contents

1. INTRODUCTION 92

2. QUANTUM DOTS 93

3. MAGNETIC RESONANCE IMAGING 97

4. STRATEGIES FOR THE ASSOCIATION OF QDS AND GD CHELATES 103

4.1. NON-COVALENT ASSOCIATION 103
4.2. CONJUGATION BY COVALENT BOND 115

CONCLUSION 122

Introduction

The search for versatile probes with different responses has been growing rapidly since the last decade. An interesting multimodal probe requires complementary responses to (i) compensate the limitations of distinct techniques, giving more accurate and complete results with higher sensitivity, specificity, and anatomical resolution, for example, and/or (ii) confer new functions to the hybrid system, such for theragnostic applications. Magnetic resonance imaging (MRI) is one of the most applied imaging techniques in the clinical diagnostic field [1, 2]. The main advantages of MRI technique are its high spatial resolution when compared with other clinical techniques, such as x-ray or gamma rays tomografies, as well as its ability to distinguish soft tissues with different compositions or even those metabolically altered by some abnormality. However, the low sensitivity and insufficient contrast are significant drawbacks of this technique, which avoid, for example, investigations of biological events at cellular level. For this reason, a huge number of such approaches have been recently developed by researchers, to find more selective and sensitive contrast media that would allow a better delineation of diseases, giving a more precise clinical diagnosis. To improve the contrast in anatomical images, MRI contrast agents (CAs) are commonly applied and the most clinically used are those constituted of low molecular weight Gd^{3+} chelates [1, 2]. To increase the local concentration and the efficiency of these CAs, various approaches have been reported, and among them, the use of nanoparticulate systems allows the effective delivery of reporters consisting of a high payload of paramagnetic ions to each target site [3-5].

Moreover, by associating MRI CAs with fluorescent nanoparticles, it is possible to obtain versatile dual nanoprobes. In this way, fluorescence optical imaging (FOI) is especially sensitive, despite the low penetration of light beams, which avoids the visualization of organs localized in deep regions of biological systems for *in vivo* studies [1]. Concerning FOI advances, quantum dots (QDs) have been extensively studied, showing to be robust and promising fluorescent nanostructured probes for several biological applications. QDs are semiconductor nanocrystals with a typical mean size of 2-10 nm that possess unique photophysical properties. They have a size-dependent tunable emission, from visible to the near-infrared region (NIR), and higher photostability when compared to the standard organic dyes. Besides, these nanocrystals have an active surface which allows an effective conjugation with several (bio)molecules of interest, or even other nanoparticles [6, 7]. Thus, the combination of low molecular weight paramagnetic chelates with QDs creates powerful MR/optical nanoplatforms, capable of optimizing the accuracy on the evaluating of the molecular abnormalities associated to diseases, rather than only imaging of morphological effects. Also, this association may overcome the intrinsic limitations of both techniques [1].

In this context, this review describes state-of-the-art research concerning the development of potential multimodal MR/optical nanoprobes based on low molecular weight Gd^{3+} chelates associated with QDs with perspectives to be applied for MRI-FOI techniques. We start by giving a brief explanation of QDs and MRI basic concepts, followed by the discussion of the main papers published in this field. The presentation of the magnetic-optical nanoplatforms was organized by the conjugation strategy applied, namely non-covalent and covalent approaches.

Quantum Dots

Nanotechnology has been benefiting of the multidisciplinary use of colloidal systems. Some materials show a variation on their physico-chemical properties when they change from the macroscopic size to nano-scale. Besides, nanoparticles (NPs) present a greater surface/volume ratio, when compared to bulk materials, which can be useful for several applications [8-10].

Quantum Dots (QDs) consist of a group of semiconductor nanocrystals in quantum confinement regime, that possess unique optical properties and sizes typically varying from 2 to 10 nm. These NPs are quantum confined in their three dimensions, having sizes lower than the exciton Bohr radius. Semiconductors are characterized by a valence band (VB) and a conduction band (CB) separated by an energy gap (bandgap, Eg) (Figure 1A). When the nanoparticle absorbs energy, sufficient to overcome the bandgap, an electron (e^-) is promoted from VB to CB, leaving a vacancy in the VB (h^+). This par e^-h^+, that interacts electrostatically, is called exciton and their distance is called the exciton Bohr radius. As the electron returns to VB, promoting a electron-hole recombination, a photon of energy is emitted. The emitted energy is proportional to the Eg, so QDs can emit at different wavelengths, just altering their size or composition. Semiconductors composed by different elements present distinctive Egs (Figure 1B), being this energy in the ultraviolet (UV), visible, or near-infrared (NIR) spectral region. Furthermore, decreasing the QDs size, a discretization of the energy states also occurs (Figure 1A). Together with these energy levels discretization, an increase in the Eg is observed, which explains the QDs property of emission tuned with their size. These characteristics are widely used for several applications, such as biomedical studies and optoelectronic devices [7, 11].

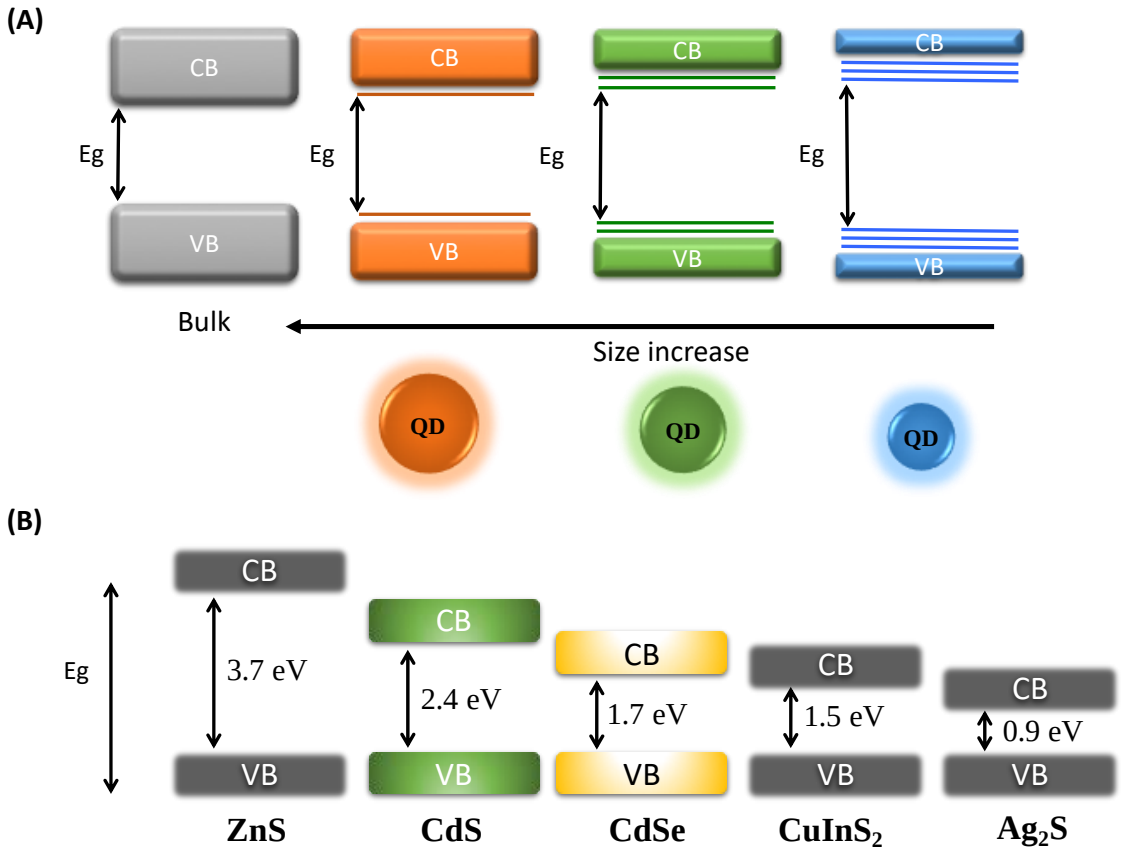


Figure 1 – (A) Schematic representation of the quantum confinement effects, according to the size decrease in semiconductors nanocrystals. (B) Bandgap (Eg) values for some quantum dots (QDs).

For biological proposes, QDs show advantages compared with standard fluorophores, such as organic dyes. Their large absorption broad makes it possible to excite several QDs with different sizes, using the same wavelength, together with a narrow emission band, which allows multicolor labeling. A superior photostability allows long term observation, unlike organic dyes. Furthermore, they presented an active surface enabling conjugation with biomolecules, such as proteins and antibodies, providing specific labeling, or even with other nanoparticles [6, 7, 12].

Nanostructures can be prepared by top-down and bottom-up approaches, and QDs are not an exception. However, for QDs preparation from bottom-up strategies are more widely used, mainly applying colloidal synthesis methodologies. Colloidal suspensions of QDs can be prepared in an organic or aqueous medium, and are characterized by reacting the metal, chalcogenide, and stabilizing agent precursors dispersed in the solvent, under heating and inert atmosphere. The temperature used is directedly related to the solvent utilized. The QDs size is controlled, manipulating the reaction parameters, such as precursors molar ratio and time (Figure 2) [11, 13-15].

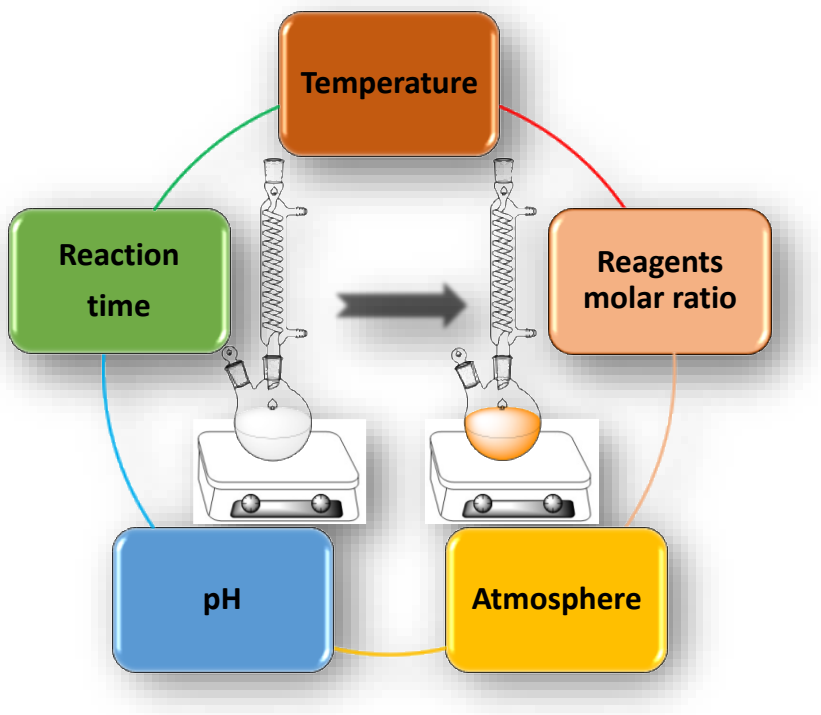


Figure 2 – Parameters that affect the colloidal synthesis of quantum dots.

The most used QDs have a binary composition, meaning that they are composed of two elements, a chalcogenide and a metal. The main studied nanocrystals are composed of elements from II-VI and III-V groups of the periodic table, such as CdTe, ZnSe, GaAs, and InP. The development of ternary and quaternary QDs have also grown, allowing the production of QDs with emission in the visible region, without the use of heavy metals in their composition, like CuInS, AgInS, and ZnAgInSe [7, 16, 17].

For biological applications, the QDs more interested are that with emission in the visible region, due to the irradiation sources and detectors presented in the devices used. The QDs that have been mainly used for these applications are the Zn, Cd, and In-based QDs. Recently, QDs based on silver and copper chalcogenides have attracted great attention due to their lower cytotoxicity and NIR emission. These kind of QDs can be interesting for biological applications, since, in addition to having a surface capable of conjugations and good photostability, they present lower toxicity and can allow analysis in deeper tissues [12, 18].

The stabilizing agents have the function of passivating the QDs surface, completing the dangling bonds, provide their colloidal stability in the selected medium. In aqueous synthetic route, passivating agents need to have, in one end an atom that will interact with the metal atoms (such as a thiol group), and in the other end a residue that will interact with the solvent. For the organic medium, should be used stabilizing agents with long hydrocarbon chains. And for compatibility with aqueous medium, these ligands should have functional groups that could be protonated or deprotonated, such as amines and

carboxylic acids [19]. QDs prepared in an organic medium can also render water-compatible nanocrystals, by a ligand exchange post-synthesis treatment. This procedure allows the exchange of the hydrophobic stabilizing agent for a hydrophilic one, simply by adding the new ligand to the QDs suspension. Although, this strategy adds an extra step in the QDs preparation, and can decrease the emission intensity of those nanoparticles [6, 13, 20].

The optical properties of QDs are related to the core composition (bandgap), and its emission efficiency is dependent on the passivation/stabilization. Thus, good passivation is essential to render QDs with high brightness. To improve the emission efficiency of QDs, a passivation layer can be grown in the core, forming a core-shell structure. The shell is responsible for reducing the non-radiative pathways and the influence of the surrounding medium in the optical properties. The most explored passivation strategies are the deposition of a few layers of a second semiconductor, usually with a higher bandgap, in the core surface [10, 21].

Another great advantage of QDs is their chemically active surface, which allows their attachment to molecules, other nanoparticles, or surfaces. The conjugation of QDs with other substances can be done using non-covalent, streptavidin-biotin, or covalent approaches (Figure 3). Non-covalent associations can be achieved by direct attachment on the QDs surface using dative bonds, using a thiol residue, or by adsorption (mediated by hydrophobic-hydrophilic or electrostatic interactions, for example). Streptavidin-biotin is a strong non-covalent bond, like receptor-ligand type, which requires that the QD is functionalized with streptavidin (a protein) and the other substance needs to be biotinylated, or vice-versa. Covalent bonding can only be achieved using functionalized QDs with reactive functional groups, like the ones obtained by aqueous procedures (amines and carboxylic acids). The substance to be linked to the QD also need to have a reactive functional group, and in many cases, coupling agents are required. A more detailed revision of conjugation strategies for QDs can be found in the literature [19, 22, 23].

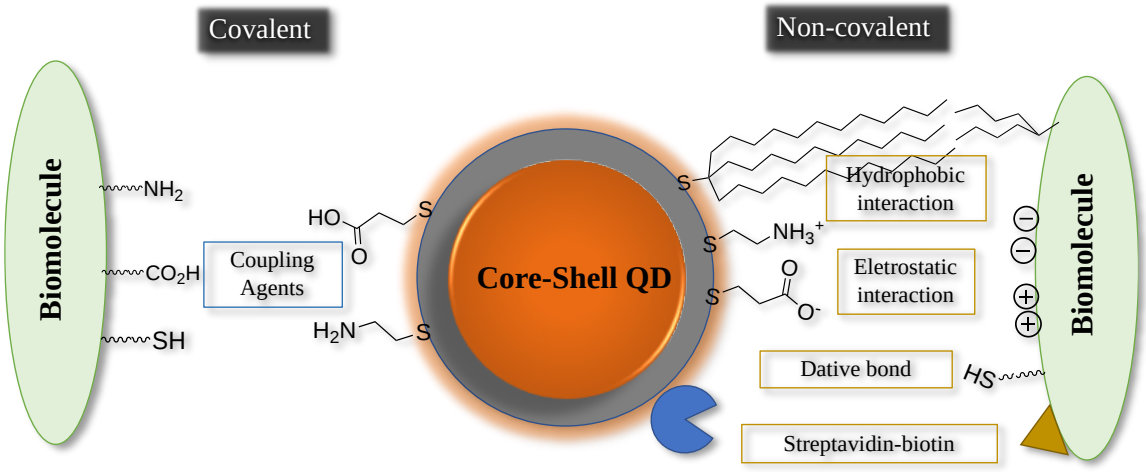


Figure 3 – Representation of the main strategies used for QDs bioconjugation.

For the reasons discussed here, QDs are promising to be used in medical diagnosis, phototherapy, comphreesion of biological processes, lasers, and LEDs [24-28]. Among these possibilities are the bimodal systems containing QDs and paramagnetic chelates, to be used as CAs for MRI and optical imaging. The development of that type of CAs can improve the detection sensitivity and consequently, the results obtained with MRI [7, 29].

Magnetic resonance imaging

MRI is based on nuclear magnetic resonance (NMR), which was first described experimentally by Felix Bloch and Edward Purcell, in 1946. After observation, in 1971, by Raymond Damadian [30] that the nuclear magnetic relaxation times of tissues and tumors are different, the researchers were stimulated to consider magnetic resonance for the detection of diseases, and in 1973 Paul Lauterbur demonstrated the first magnetic resonance imaging [31]. Since then, technological advances have converted MRI in one of the most powerful tools for medical diagnosis. Different from other imaging techniques, MRI uses radiofrequency (RF) radiation, being able to distinguish between healthy and pathological tissues without the effects of ionizing radiation. Additionally, MRI has deep tissue penetration and provides images with high spatial and temporal resolution, compared with ionizing radiation clinical techniques [32-34].

MRI scanner consists of an external magnetic field (B_0), usually 1.4 T (60 MHz) for clinical imaging. Briefly, the NMR signal of body water protons is used to generate the MR images. In the presence of B_0, the hydrogen nuclei, which behave like tiny bar magnets, are parallel and anti-parallel to the applied field. At thermal equilibrium, the number of spins in the lower energy level (parallel to B_0), slightly exceeds the number of spins in the upper level, resulting in a net magnetization, aligned with B_0. This magnetization

will respond to RF pulse at resonance condition and then flips from z-direction to the transverse plane. For the nuclear perturbation, the applied RF must be an oscillating magnetic field whose frequency closely matches the Larmor precession frequency of the nuclear magnetization. The emitted signals are received by a detector and the data is converted by inverse Fourier Transformation (FT), being converted in spatial dimension (two- and three-dimensions) images, when magnetic gradients are applied [35]. NMR signal of body water protons (^{1}H) is often used to generates MR images due to their natural abundance in the human body (up 70 %) and the high gyromagnetic ratio [36]. The image elements intensity ("pixels") depends, among other parameters, on the local proton density, and mainly on the nuclear longitudinal and transverse relaxation times (T_1 and T_2 respectively), which also reflect the local mobility of the water molecules present in the tissues [32, 36]. Taking into account that T_1 and T_2 of the protons of the water molecules present in healthy and pathological tissues are different, the intensity of the signals is different in these respective regions, creating the contrast in the MRI [30].

Longitudinal (T_1) and transverse (T_2) relaxation times are defined as the time constants, which represent the return of net magnetization (M_0) to equilibrium when the applied RF, at Larmor frequency, is off. During relaxation, electromagnetic energy is retransmitted, and this RF emission is called the NMR signal. Also known as the spin-lattice relaxation time, T_1 is a measure of how quickly the net magnetization vector recovers to its ground state in the direction of B_0, in other words, the return of excited nuclei from the high energy state to the low energy or ground state, which is associated with loss of energy to the surrounding nuclei. On the other hand, T_2, also known as spin-spin relaxation time, corresponds to transverse magnetization decay and results from spins getting out of phase over time, because of the magnetic field interaction of individual spins, which move together, slightly modifying their precession rate. Thus, spin-spin relaxation causes a cumulative loss in phase resulting in xy-magnetization decay [37].

It is worth noting that a detailed treatment of NMR principles is out the scope of this work and a specific bibliography is suggested and must be consulted for deeper understanding. The same observation is valid for the following explanation about the mechanisms involved in the paramagnetic relaxation effect of MRI contrast agents based on gadolinium chelates [32-34, 38].

Even with evident contrast between tissues in different physiological conditions, MRI CAs usually are applied to improve the contrast in anatomical images, and this could be achieved particularly with low molecular weight Gd^{3+} chelates such as $[Gd(DTPA)(H_2O)]^{2-}$ and $[Gd(DOTA)(H_2O)]^{-}$ (Figure 4), the first approved contrast agents for clinical administrations. The ability of a CA to improve the observed anatomical contrast is a consequence of increasing the longitudinal and transverse relaxation rates ($1/T_i$, i = 1,2 respectively) of the surrounding water proton spins where the CA better diffuses [39, 40].

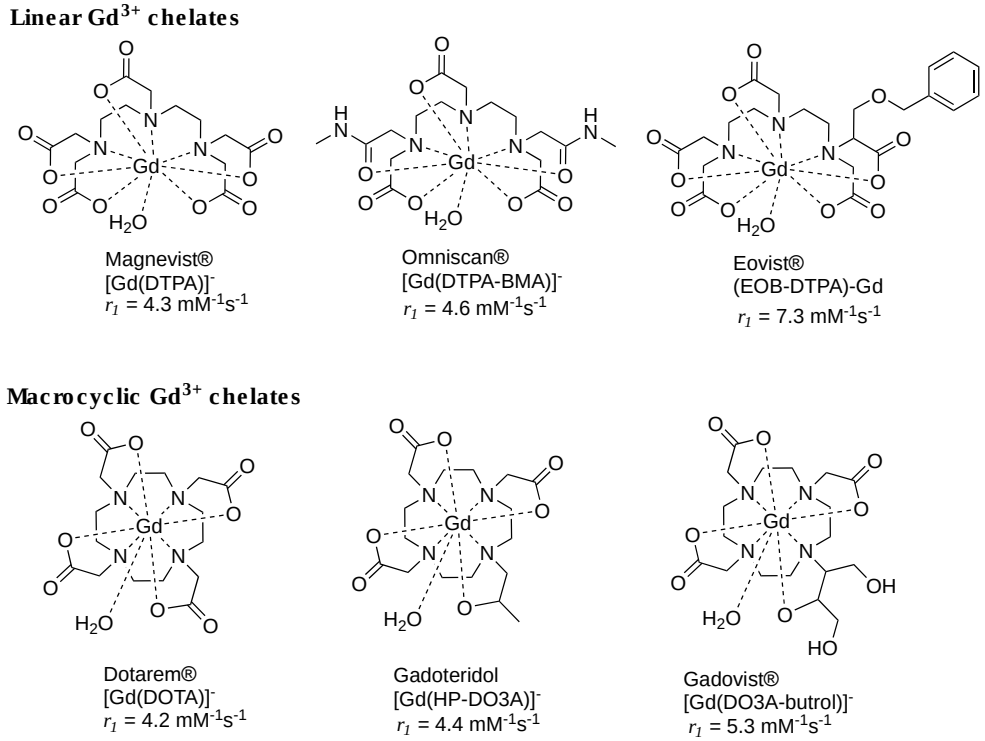


Figure 4 – Molecular structures of clinically approved MRI contrast agents based on Gd^{3+} chelates.

MRI CAs are classified according to their ability to increase both longitudinal and transverse relaxation rates. When a CA increases both $1/T_1$ and $1/T_2$ by approximately the same amount it is classified as a T_1-weighted agent (positive contrast agent, which gives brighter images). Because of the intrinsic transverse relaxation rate in tissues, these T_1-weighted agents, in percentage, alter $1/T_1$ of tissue more than $1/T_2$. Paramagnetic chelates are in this category of CAs. On the other hand, those CAs that alter $1/T_2$ to a much greater extent are classified as T_2-weighted agents, and because they cause a drastic reduction in signal intensity, they are known as negative contrast agents (giving darker images). Iron oxide nanoparticles are examples of T_2-weighted agents [41-43]. Usually, the relaxivity r_2/r_1 ratio is used to evaluate the efficiency of T_2-weighted CAs, which increases with the value of this ratio by limiting T_1-weighting effects. Thus, the higher the r_2/r_1 ratio more efficient they are. Generally, the efficiency of such potential MRI CAs is compared with Resovist® and Endorem® (r_2/r_1 ratios of 7 and 6.6 respectively, 60 MHz, 37ºC) [44, 45].

The efficiency of MRI CAs is measured by the relaxivity parameter (r_i), which is expressed in s^{-1} per millimolar (mM) of Gd^{3+} and it depends on the molecular structure and dynamics of the complex [46, 47]. Although the ideal physical properties of Gd^{3+} ion for reducing the water proton relaxation times, a high thermodynamic and kinetic stability of the complexes used as MRI CAs are required. This is necessary to avoid the exchange of toxic gadolinium ions with endogenous metal ions, which can accumulate in the organs, such as liver and kidney (or even bones), as insoluble $Gd(OH)_3$. Also, it has been suggested that free Gd^{3+} could be involved in the mechanism of nephrogenic systemic fibrosis (NSF) [48, 49].

The physical models that describe the relaxation enhancing effects are a combination of inner-sphere and outer-sphere contributions (Figure 5A). The inner-sphere contribution is related to the exchange between the water molecules directly coordinated with the metal ion and bulk water molecules. The outer-sphere contribution results from water molecules diffusing near the paramagnetic ion during their translational diffusion. Depending on the ligand structure, the second-sphere contribution must be taken into account. This is due to the presence of mobile protons or water molecules in the second coordination sphere that hydrate the complex and have a finite residency time, which is longer than the translational diffusion time of outer-sphere water. In the second-sphere, the water molecules can interact with functional groups through hydrogen bonds (Figure 5A). For low molecular weight complexes, the relaxation enhancements have major contributions from the inner-sphere and usually negligibly small outer-sphere contribution [47]. The relaxivity enhancement (r_i) of water protons in aqueous solutions containing Gd^{3+} chelates arises from time fluctuation of the dipolar coupling between the electron magnetic moment of the metal ion and the nuclear magnetic moment of the solvent nuclei, since fluctuating magnetic dipoles can induce spin transitions and cause spin relaxation [50-52].

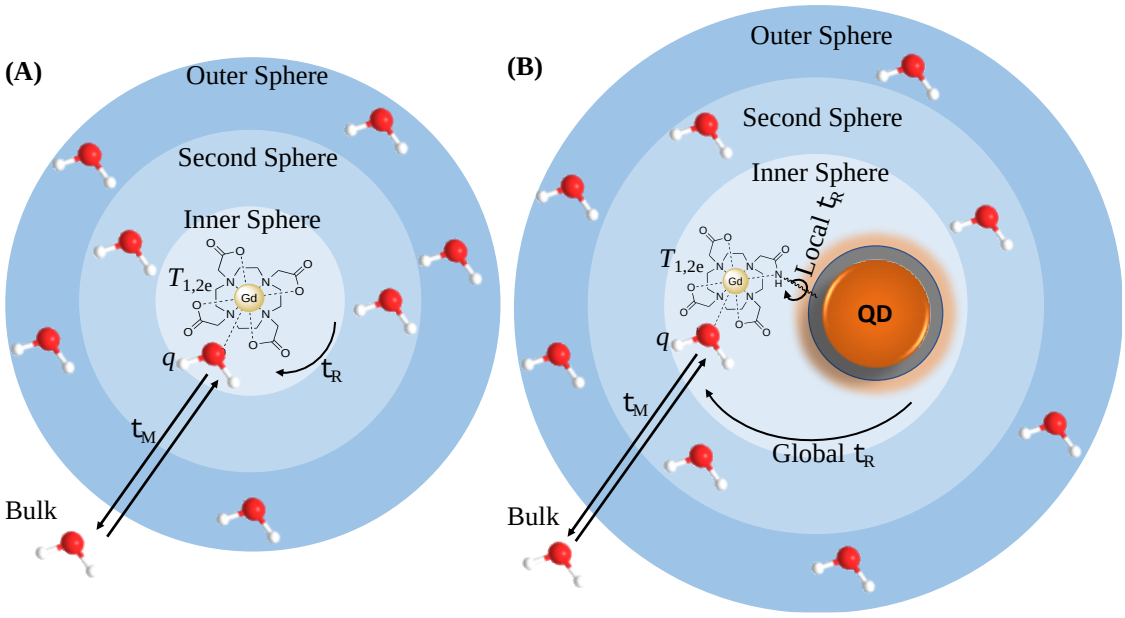


Figure 5 – Schematic representation of the three types of water molecules surrounding Gd^{3+} chelate and the main molecular parameters that influence its relaxivty at free rotational condition (A) and attached at the quantum dot surface (B).

The relaxivity enhancement can be defined as in Equation 1, where $1/T_{i,obs}$ is the measured longitudinal or transverse NMR relaxation rate. $T_{i,d}$, $T_{i,p}^{is}$ and $T_{i,p}^{os}$ are, respectively, the diamagnetic, the inner- and outer-sphere paramagnetic contributions to the observed relaxation rate, and [Gd^{3+}] is the millimolar concentration of the Gd^{3+} (or paramagnetic complex). The diamagnetic contribution is obtained by measuring the relaxation times of the solution in the absence of the paramagnetic chelate [53].

$$\frac{1}{T_{i,obs}} = \frac{1}{T_{i,p}^{is}} + \frac{1}{T_{i,p}^{os}} + \frac{1}{T_{i,d}} = r_i[Gd^{3+}] + \frac{1}{T_{i,d}} \quad (1)$$

The inner-sphere relaxation represents the most important contribution to r_1, so the approaches to improve the efficacy of T_1-weighted CAs have been directed mainly towards its optimization. The relaxation theory developed by Solomon-Bloembergen-Morgan, in which it is assumed that the reorientation of the complex is magnetically and geometrically isotropic [54-56], has provided an understanding of the role played by the relaxation parameters, of their mutual relationship, and how they can be altered according to structural features of the complexes [57-59]. The inner-sphere contribution is given by:

$$\frac{1}{T_{1p}^{is}} = R_{1p}^{is} = \frac{q[C]}{55.5(T_{1M}+\tau_M)} \quad (2)$$

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

where [C] is the concentration of the paramagnetic ion, q is the number of water molecules directly coordinated to the paramagnetic ion, T_{1M} is the longitudinal relaxation time of the bound water protons, τ_M is the mean residence lifetime of the coordinated water protons, S is the electron spin quantum number (7/2 for Gd^{3+}), γ_I is the nuclear gyromagnetic ratio, μ_B is the Bohr magneton, g is the Landé factor for the free electron, r_{GdH} is the distance between the metal ion and the bound water protons, τ_{Ci} (i=1,2) are the correlation times of the modulation of the dipolar electron-proton coupling, ω_I and ω_S are the proton and electron Larmor frequencies, respectively. The inner-sphere contribution becomes important and is transferred to the bulk water when $T_{1M} >> \tau_M$, where the system is in the 'fast exchange' regime. On the other hand, when the coordinated water molecule is in the 'slow exchange' regime ($T_{1M} << \tau_M$), the water exchange rate becomes the limiting factor of the relaxivity [50].

The dipolar mechanism resulting from the through-space interaction of the nuclear dipole with the unpaired electron dipole contributes to the paramagnetic relaxation effect. Thus, fluctuating magnetic dipoles can induce spin transitions and cause spin relaxation, and τ_{Ci} describes the time evolution of the various phenomena influencing the nuclei of interest. Besides τ_M, the rotational correlation time (τ_R), related to the molecular tumbling motions of the paramagnetic chelate, lead to fluctuating magnetic dipoles. Electron spin relaxation (T_{ie}) of the Gd^{3+} ion, also modulate this electron-nuclear interaction. Thus, the overall correlation time τ_{Ci} (i=1,2) is given by Equation 4:

$$\frac{1}{\tau_{ci}} = \frac{1}{\tau_M} + \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{T_{ie}} \quad (4)$$

Besides the dipolar contribution mechanism arising from the random fluctuations of the electronic field, the paramagnetic relaxation rates have also contributions from the contact or hyperfine ($1/T_{i,c}$) mechanism, resulting from a through-bond delocalization of the unpaired spin density on the nucleus. In the case of Gd^{3+} chelates, this is negligible in the longitudinal relaxation, while it plays important role in the transverse relaxation, mainly for nuclei near the metal ion [60]. The Curie ($1/T_{i,\chi}$) mechanism is another dipolar mechanism that must be considered in a certain condition, such as at high magnetic fields, especially if τ_R is much larger than T_{ie}, and it is due to an interaction between the nuclear spin and the thermal average of the electronic spin [61].

The outer-sphere contribution to the relaxation is attributed to the modulation of the dipolar interaction by the diffusion of water molecules from the bulk solution close to the paramagnetic ion. The outer-sphere contribution to the relaxivity is related to the sizes and shapes of the complexes because the diffusion coefficients in these cases are also similar. This contribution is usually described using the Freed equations, which take into account the electronic relaxation and diffusion [62, 63].

As mentioned before, depending on the complex structure, the 'second-sphere' water molecules contribution to the relaxation enhancement is valid. As this contribution is difficult to evaluate, because the number of second-sphere water molecules and their exchange rates are unknown, usually the second sphere effect is included in the outer-sphere contribution [64].

As briefly explained above, the efficiency of MRI contrast agents based on Gd^{3+} chelates has a multifactorial dependence with parameters and mechanisms that govern the paramagnetic relaxation rates. So, the challenge of researchers for improvement of the relaxivity as well as for increasing the sensitivity of these T_1-weighted agents is not easy and neither a linear task. In the last two decades, many approaches were reported, in order to alter mainly the molecular motion, reflecting in the τ_R because the mobility of the paramagnetic complex is dependent on molecular size and rigidity, and the attachment of low molecular weight paramagnetic complex to nanoparticles, such as gold nanoparticles, quantum dots, fullerenes, carbon nanotube, has seemed to be a very promising strategy [5, 65-68]. Moreover, nanoparticles can increase the local concentration of CA to the site of interest, overcoming the low sensitivity of the MRI technique, allowing, in turn, accurate molecular imaging. However, concerning manipulation of the molecular motion of the Gd^{3+} complexes by attaching them at the nanoparticle surface, it is important to consider the flexibility of the linker used for the conjugation, because, in the rotational motion, both the global tumbling of the immobilized chelate (global τ_R) and its internal motion ability (local τ_R) must be taken into account (Figure 5b), according to the Lipari-Szabo treatment [5, 69], and higher linker flexibility can compromise the optimization of τ_R, limiting the relaxivity enhancement. Also, it must be taken into account that the conjugation process does not affect negatively the inner-

sphere water exchange process. Therefore, the choice of the linker must ensure unrestricted water access to the immobilized Gd^{3+} chelates at the nanoparticle surface [70-72].

Strategies for the association of QDs and Gd^{3+} chelates

4.1. Non-covalent association

The first bimodal nanosystems reported in the literature were achieved by the non-covalent association between QDs and Gd^{3+} chelates. And, until now, several approaches have been explored to afford these bimodal nanoprobes by non-covalent interaction, such as encapsulation, physical associations (hydrophobic-hydrophobic, hydrophilic-hydrophilic, and electrostatic interactions), dative bonding and streptavidin-biotin linking. A brief presentation of the works regarding the development of bimodal nanoprobes based on non-covalent interactions is presented in Table 1.

There are only two reports of the preparation of bimodal nanoprobes using the encapsulation strategy, which was reported by Tan and Zhang (2005 and 2007)[73, 74]. In their work, CdSe/ZnS QDs and $[Gd(DTPA)]^{2-}$ were encapsulated in chitosan, originating multifunctional nanoparticles. Hydrophobic CdSe/ZnS QDs were synthesized and modified with 3-mercaptopropionic acid (MPA), to afford aqueous dispersed QDs. Then, CdSe/ZnS-MPA and $[Gd(DTPA)]^{2-}$ chelates were mixed with chitosan. The multifunctional nanoparticles were obtained by electrostatic interactions, which occur between the polycationic chitosan, the anionic CdSe/ZnS-MPA, and the negatively-charged Gd^{3+} complex. The systems obtained presented a diameter of 50 nm (using dynamic light scattering – DLS). After encapsulation, the QDs emission profile was not altered, however, it was observed a quantum yield enhancement. The relaxivity studies of the multimodal nanocrystals showed a decrease in T_1 and T_2, obtaining r_1 = 4.5 $mM^{-1}s^{-1}$ and r_2 = 14.1 $mM^{-1}s^{-1}$ per Gd^{3+} ion (at 1.5 T). The release of QDs and $[Gd(DTPA)]^{2-}$ from the chitosan nanoparticles was also evaluated. It was observed that the QDs release was insignificant, while the $[Gd(DTPA)]^{2-}$ quantity dropped 21% after five days. The toxicity assays were carried out with myoblast cells utilizing the (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay (MTT). These systems proved to be more biocompatible and less toxic than the bare CdSe/ZnS-MPA QDs, being suitable for biological applications.[73, 74]

The streptavidin-biotin binding strategy was also applied only a few times for the development of these bimodal CAs. In 2007, Prinzen *et al*.[75] produced bimodal nanoparticles composed by Annexin A5 (AnxA5)-functionalized CdSe QDs and $[Gd(DTPA)]^{2-}$ complexes. AnxA5 is a molecular imaging probe widely used to visualize cell surface exposure of phosphatidylserine (PS), that frequently occurs during cell death, being a biochemical marker of apoptosis. To increase the load of $[Gd(DTPA)]^{2-}$ complexes per nanoparticle, the Gd^{3+} complexes were attached to biotinylated polylysine (pLys). Streptavidin-functionalized CdSe QDs were conjugated with biotinylated-AnxA5, followed by the addition of biotinylated pLys-$[Gd(DTPA)]^{2-}$. The QD-AnxA5-pLys[Gd(DTPA)] systems were obtained with a size of around 6.7 nm (by transmission electron microscopy – TEM). Relaxometry characterization presented a r_1 value higher than the clinically used

$[Gd(DTPA)]^{2-}$, around 15.6 $mM^{-1}s^{-1}$ *per* Gd^{3+} ion and 3000–4500 $mM^{-1}s^{-1}$ *per* QD (at 1.5 T and room temperature). The systems were tested *in vitro*, with Jurkat cells, to differentiate living and dying cells using two-photon laser scanning microscopy (TPLSM). Cells incubated with the probe exhibited an emission five times more intense than the control (cells unlabeled).

Oostendorp *et al*. (2008)[76] analyzed the performance of the system prepared by the conjugation of the cyclic tripeptide Asn-Gly-Arg (cNGR) to CdSe/ZnS QDs. The $[Gd(DTPA)]^{2-}$ complexes were attached to a biotinylated poly(lysine) dendrimer and then linked to the streptavidin-functionalized CdSe/ZnS QDs. Followed by the addition of biotinylated cNGR peptides, obtaining the final probe QDs-Gd-cNGR. *In vivo* MRI assays (at 7 T) showed differentiation on the mouse tissues, allowing the observation of the tumor sites. The experiments suggested that the probes can differentiate angiogenesis levels in tissues, and presented an increase in r_1 after conjugation with the biomolecule when compared to $[Gd(DTPA)]^{2-}$ chelates. In a second study, these authors [77] analyzed the relaxation rates of the QDs-Gd-cNGP probes in tissues and tumors. In water, the CAs presented a longitudinal relaxation (r_1) of 7.0 $mM^{-1}s^{-1}$ per Gd^{3+} ion and a transverse relaxation of 166 $mM^{-1}s^{-1}$ *per* Gd^{3+} ion (at 7 T and 20 ºC). The relaxation analysis of mice healthy and tumor tissues (of liver, spleen, skeletal muscle, brain, and blood) showed a significant difference in the tissue relaxation rates. Tumor tissues were better differentiated from their surroundings using T_2-weighed images. While T_1-weighed images were more appropriated to distinguish angiogenesis levels in the tissues.

In the work of Biju *et al*. (2015)[78], streptavidin-functionalized CdSe/ZnS QDs were conjugated with biotinylated $[Gd(DOTA)]^{-}$ chelates. Firstly, one of the carboxylic acids of DOTA was functionalized with biotin, followed by complexation of Gd^{3+} ions, to obtain the biotinylated-$[Gd(DOTA)]^{-}$. The conjugation between the CAs and QDs was performed by the biotin-streptavidin approach. The bimodal systems were then associated with the epidermal growth factor (EGF), for specific recognition of EGF receptors. From the optical characterization, it was observed that the conjugation did not affect significantly the optical properties of the QDs. This fact was attributed to the distance between the QD core and the Gd^{3+} chelates, given by the streptavidin coating. For the in vitro assays, the authors used human lung epithelial adenocarcinoma (H1650) cell line. And, although the authors did not estimate the r_1 values, it was possible to observe a greater contrast weighted in T_1 MR images in cells labeled with the QD-Gd-EGF systems, when compared with cells unlabeled. These nanoprobes were also used for in vivo optical and MR imaging (Figure 6).

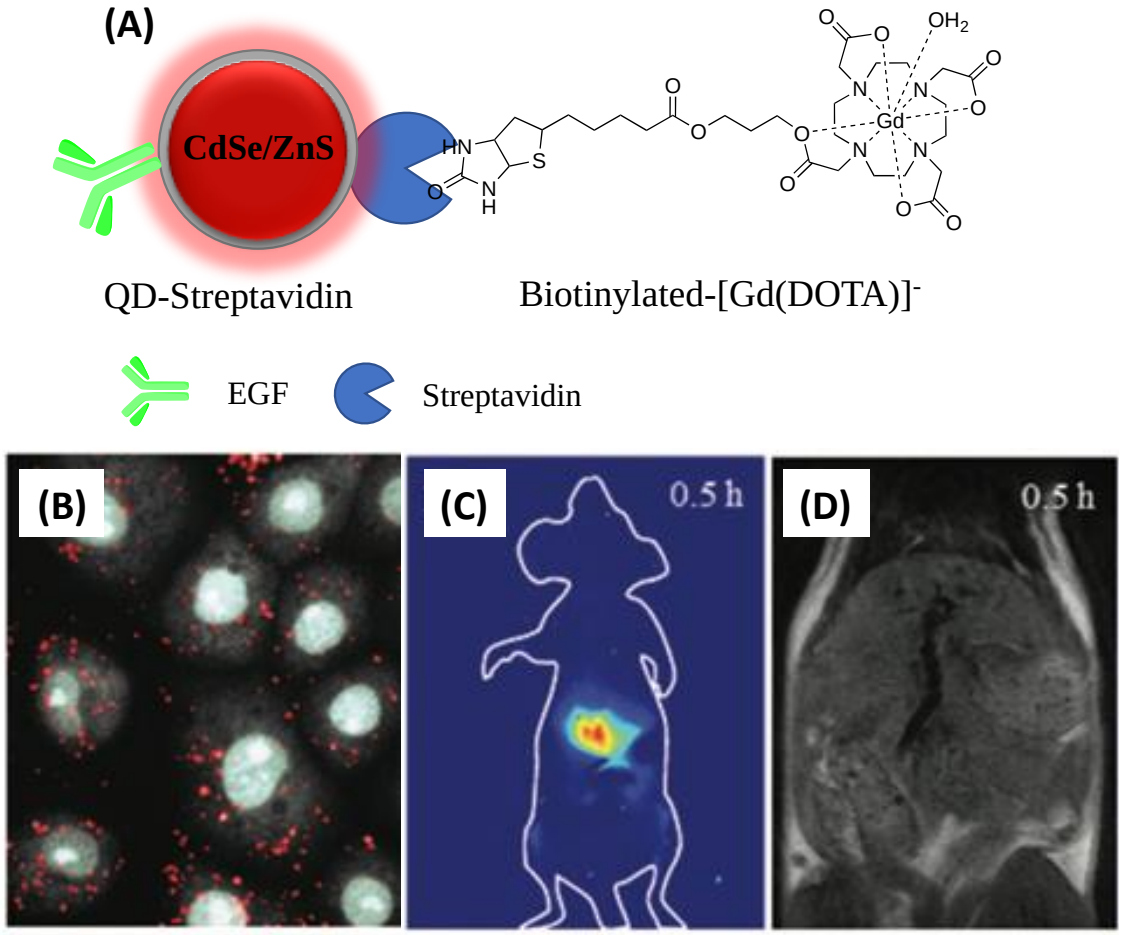


Figure 6 – (A) Schematic representation of a bimodal nanoprobe prepared by a streptavidin-biotin approach, and conjugated with a EGF protein. (B) In vitro fluorescence images of lung epithelial adenocarcinoma cells labeled with the system QD-Gd-EGF (red) and nuclei stained with Syto 13 dye. (C) In vivo fluorescent image and (D) MRI of mice, 30 min after injection with the QD-Gd-EGF probes. Adapted with permission from Biju et al. [78], Nanoscale (2015). Copyright © 2015, The Royal Society of Chemistry.

The most used approaches to prepare bimodal nanoprobes for MRI and optical analysis are based on physical association, such as hydrophobic-hydrophobic, hydrophilic-hydrophilic or electrostatic interactions. Yang *et al*. (2006)[79] produced an optical-paramagnetic system constituted by silica-coated CdS:Mn/ZnS QDs, later functionalized with Gd^{3+} chelates. The CdS:Mn/ZnS QDs were prepared in an organic medium, followed by the formation of a silica coating, using tetraethylorthosilicate (TEOS), 3-(aminopropyl) triethoxysilane (APTS), and 3-(trihydroxysilyl)-propylmethylphosphonate (THPMP), obtaining a hydrophilic QDs-silica. For the paramagnetic residue, it was used a silane chelate derived from the ethyldiamine triacetic acid (TSPETE, L1 Figure 7), which has five reactive coordination sites. The QDs-silica were functionalized with TSPETE followed by complexation with Gd^{3+} ions. The bimodal systems presented a diameter around 11-17 nm (by TEM), and the same emission region (yellow) of the QDs. The measured relaxivities, r_1 and r_2, were compared to the commercial complex Gadoteridol (5.8 and 7.4 $mM^{-1}s^{-1}$ per Gd^{3+} ion, respectively, at 4.7 T), and it was observed that these systems presented higher relaxivity

values (20.5 and 151 $mM^{-1}s^{-1}$ per Gd^{3+} ion, respectively, at 4.7 T). According to the r_2/r_1 ratio, these systems should be more efficient as T_2 CAs.

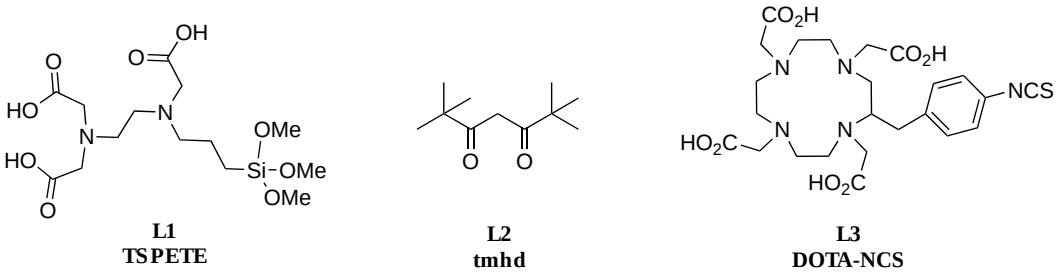


Figure 7 – Chemical structures of the ligands L1, L2, and L3.

Bakalova *et al*. (2006)[80] coated hydrophobic CdSe/ZnSe QDs with a silica shell, using silane derivatives containing hydrophobic chains. Due to the low cytotoxicity of these QDs-silica nanoparticles, the authors added a hydrophobic Gd^{3+} chelate into the silica layer. For this, the ligand 2,2,6,6-tetramethyl-3,5-heptanedionate (tmhd, L2, Figure 7) was used to prepare the $[Gd(tmhd)_3]^-$ complex. The bimodal systems were obtained with a diameter around 17 nm, and the NMR results showed a T_1-weighted contrast enhancement when using this probe, however, it was observed a contrast decreased after the dialysis of the bimodal system. In follow-up work, Bakalova *et al*. (2008)[81] prepared a second probe, mixing the QDs-silica with the gadolinium *S*-2-(4-isothiocyanatobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane tetraacetic acid (DOTA-NCS, L3, Figure 7) complex ($[Gd(DOTA\text{-}NCS)]^-$), a hydrophilic chelate. In this second study, the authors compared the optical and paramagnetic properties of the two probes (15–20 nm in diameter), the system with $[Gd(tmhd)_3]^-$ complexes, where the chelates were located inside the shell (probe A), and the system with $[Gd(DOTA\text{-}NCS)]^-$, where the chelate was placed in the nanoparticle surface (probe B). The optical properties of the two systems were similar and presented the same fluorescence quantum yield than the QDs-silica (without Gd^{3+} chelates). The probe A had Gd^{3+} complex closest to QD than the probe B, which could affect their relaxometry properties, wherein probe A presented shorter T_1 and T_2 than probe B (at 7 T and room temperature). Considering the dialysis results, both probes had approximately the same Gd^{3+} chelates quantity (around 18 Gd^{3+} chelates per QD), which means that probe A seems to be a better contrast agent for MRI. The use of probe A *in vitro* with cancer cells (human cervical, HeLa, and lung cancer cells), and *in vivo* injecting it in rats brain, showed that it could be appropriate to use as a bimodal system for MRI and fluorescent analysis.

Mulder *et al*. (2006) [82] prepared bimodal nanosystems using QDs of CdSe/ZnS and $[Gd(DTPA)]^{2-}$ chelates. The QDs were synthesized in an organic medium, ending coated with an apolar ligand (trioctylphosphineoxide, TOPO). Then, the QDs were coated with a pegylated phospholipid mixture. In this lipid mixture was incorporated a paramagnetic lipid, containing the $[Gd(DTPA)]^{2-}$, and one lipid functionalized with a maleimide. In the end, it was obtained a suspension of lipid micelles-coated QDs (pQDs). The maximum absorption and emission wavelengths were obtained approximately at 540 and

550 nm, respectively. The longitudinal relaxivity (r_1) of the pQDs was determined as 12 $mM^{-1}s^{-1}$ per Gd^{3+} and 2000 $mM^{-1}s^{-1}$ per pQDs (1.4 T). For *in vitro* studies the pQDs were covalently functionalized with the thiolated tripeptide arginine-glycine-aspartic acid (RGD), by reacting with the maleimide-lipids. The RGD peptide can be used to target $\alpha_\upsilon\beta_3$-integrin membrane, a receptor commonly used as a marker for molecular imaging of angiogenesis. These pQDs-RGD probes were incubated with human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). Fluorescence microscopy images demonstrated that the cells incubated with pQDs-RGD presented more intense fluorescence when compared with the ones incubated with bare pQDs, which was attributed to the nanoprobes cellular internalization promoted by the RGD. The T_1-weighted images of the pQDs-RGD showed much more brightness compared to systems without the paramagnetic moiety.

In a succeeding study, the same research group [83] functionalized the pQDs with the protein Annexin A5, using the same thiol-maleimide approach. The relaxivities measurements for this pQDs-AnxA5 gave values of r_1 = 12.4 $mM^{-1}s^{-1}$ per Gd^{3+} ion and r_2 = 18.0 $mM^{-1}s^{-1}$ per Gd^{3+} ion (at 37 °C and 1.4 T). The relaxivities per nanoparticle were 150 times higher than the ionic relaxivities. *In vitro* studies were done inducing apoptosis in T-lymphoma cell line Jurkat. The fluorescence microscopy and MRI presented brighter images of the systems incubated with pQDs-AnxA5 when compared with bare pQDs, showing the specificity of this nanoprobe.

Later on, the same research group [84] described the development of a new bimodal probe using hydrophobic CdSe/ZnS QDs. The QDs were coated with a silica layer, utilizing TEOS. Silica-coated-QDs were capped with a hydrophobic ligand (octadecanol), followed by the coating with the same phospholipid mixture (containing the paramagnetic residue and the maleimide-functionalized lipid). The system was further conjugated with the thiolated cyclic-RGD peptide, obtaining the multimodal QDs-Si-P-RGD systems. The QDs-silica nanoparticles presented a size of 31 nm by TEM, and the QDs-silica-lipids systems showed a hydrodynamic diameter of 58 nm by DLS. The coating procedures did not change the QDs absorption and emission spectra profiles, however, a decrease in the emission quantum yield was observed. Longitudinal relaxivity per Gd^{3+} for the QDs-Si-P-RGD was determined as r_1 = 14.4 $mM^{-1}s^{-1}$ (at 1.4 T), an increment of 3-4 times compared with the commercial $[Gd(DTPA)]^{2-}$. The r_1 value per particle was calculated as 36,000 $mM^{-1}s^{-1}$. *In vitro* tests were realized using serum-activated HUVEC cells. Fluorescence microscopy and MRI assays showed higher contrast when the multimodal QDs-Si-P-RGD systems were used.

Starmans *et al*. (2011)[85] monitored the variations in the relaxometric and optical properties of bimodal nanoprobes after cellular internalization. For this, hydrophobic CdSe/CdS/ZnS QDs were coated with a mixture of pegylated lipids and, $[Gd(DTPA)]^{2-}$ complexes linked to bovine serum albumin (BSA), obtaining the paramagnetic nanoprobes QDs-Gd. They also attached a cyclic RGD-peptide to their systems (QD-Gd-RGD). Both systems presented a hydrodynamic diameter around 25 nm (by DLS), broad absorption, and narrow emission spectra. The relaxivity measurements, in aqueous solution at pH=7.4, showed r_1 = 5.7 and 5.2 $mM^{-1}s^{-1}$ per Gd^{3+} and r_2 = 32.4 and 26.1 $mM^{-1}s^{-1}$ per Gd^{3+} (6.3 T at room

temperature), for QDs-Gd and QDs-Gd-RGD respectively. Both systems were incubated with HUVEC cells for 24 h. The relaxivities evaluation showed that, after incubation, these systems presented a r_1 = 0.97 and r_2 = 34.7 $mM^{-1}s^{-1}$ per Gd^{3+}, for QDs-Gd, and to r_1 = 1.02 and r_2 = 35.4 $mM^{-1}s^{-1}$ per Gd^{3+} (6.3 T at room temperature), for QDs-Gd-RGD. From these results, the authors concluded that the incubation of the cells affects the relaxivity values, but the incorporation of the RGD peptide did not affect the properties of the bimodal nanosystem.

Xing *et al*. (2015)[86] coated hydrophobic CdSe/ZnS QDs with [Gd(DTPA)]-BSA complexes. The [Gd(DTPA)]-BSA was prepared by the reaction between DTPA anhydride and BSA, followed by the addition of $GdCl_3$. Then, they were used to coat the CdSe/ZnS QDs and conjugated with anti-tumor polyclonal antibodies (PcAb), using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) as coupling agents. The QDs-Gd-BSA probe maintained the spectroscopic properties of the QD and presented a hydrodynamic diameter of 35 nm. Relaxometry characterization (at 1.4 T and 37 ºC) showed an improvement in relaxivity, presenting a r_1 of 15.4 and 16.6 $mM^{-1}s^{-1}$ per Gd^{3+}, and a r_2 of 24.1 and 27.7 $mM^{-1}s^{-1}$ per Gd^{3+}, for [Gd(DTPA)]-BSA and QDs-Gd-BSA respectively. The QDs-Gd-BSA-PcAb properties were only studied after incubation in Human Colonic cancer cells (HCT116), by confocal fluorescent microscopy and MRI. The microscopy images showed cells with intense red fluorescence, and the MR scanning showed brighter T_1 images when compared to QDs-Gd-BSA. Furthermore, *in vivo* studies, with mice injected with colorectal cancer cells, showed that QDs-Gd-BSA-PcAb were not toxic and were gradually cleared of the body.

Another commonly used approach, to associate QDs and Gd^{3+} chelates, is the direct attachment on the QDs surface by thiol-metal dative bonds. Stasiuk *et al*. (2011)[87] developed a dual-probe composed of InP/ZnS QDs and Gd^{3+} chelates. The InP/ZnS QDs were prepared in an organic medium and, made water-compatible by a ligand exchange procedure using penicillamine. The Gd^{3+} chelate was obtained functionalizing a derivative of 1,4,7-triazacyclononane-1,4-dibis(methylene)dipicolinic acid (DPAA, L4, Figure 8) with lipoic acid (L5, Figure 8), affording a dithiolated chelate that was attached to the QDs surface by a metal-coordination bond. The obtained probe (with a diameter around 9 nm) showed a relaxivity of r_1 = 13 $mM^{-1}s^{-1}$ per Gd^{3+}, and r_1 = 900 $mM^{-1}s^{-1}$per QD (at 0.8 T, 25°C). The system was functionalized further with a cell-penetrating peptide (CPP), and incubated with Chinese hamster ovary (CHO) cells. The fluorescence microscopy images showed QDs emission in the cells cytosol, proving the endocytosis promoted by the CPPs. T_1-weighted MRI images of brain issues showed a brighter contrast for the prepared nanoprobe when compared with the clinically used Dotarem, $[Gd(DOTA)]^-$.

In a following study, Stasiuk *et al*. (2013)[88] reported the optimization of the relaxometric properties of bimodal nanoprobes, changing the chelates structures. In this work, they compared three different complexes (Figure 8, L5-7), which were obtained by the functionalization of $[Gd(DPAA)]^-$ with lipoic (L5, Figure 8), mercaptopropionic (L6, Figure 8) and mercaptobenzoic (L7, Figure 8) acids. Longitudinal relaxivities of these complexes were determined as 11.8, 9.4, 12.2 $mM^{-1}s^{-1}$ per Gd^{3+} (at 0.8 T, 25 °C), for $[Gd(L5)]^-$, $[Gd(L6)]^-$, and $[Gd(L7)]^-$, respectively. The bimodal systems were obtained using the

same protocol as before, by metal-coordination between the thiol from the chelate and the QDs core. The NMRD profiles of the three bimodal systems demonstrated a significant increase in r_1, in comparison with free complex, 20.9, 8.9, and 31.5 $mM^{-1}s^{-1}$ per Gd^{3+} (at 0.8 T and 25 °C), for QD-[Gd(L5)], QD-[Gd(L6)], and QD-[Gd(L7)], respectively. The differences in the relaxivities values were explained based on the linker structure, ligands with more flexibility (L5 and L6) presented lower r_1, while the rigid benzoyl linker (L7) showed optimized r_1 values.

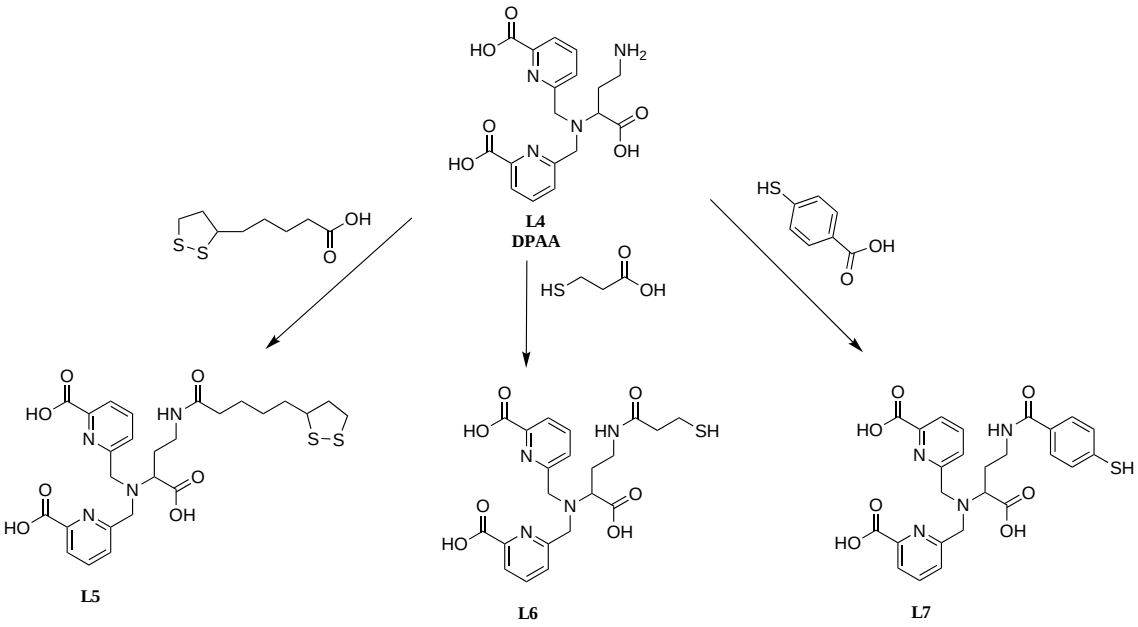


Figure 8 – Chemical structure ligands L4-L7.

Park and collaborators (2012)[89] reported a bimodal CA based on a core-shell CdSe/ZnS QD and a gadolinium complex derived from DTPA. In addition to residual uridine groups, the complex structure presents four thiol groups derived from lipoic acid (L8, Figure 9). The QDs were synthesized in an organic solvent, followed by a ligand exchange protocol, using the thiolated [Gd(L8)] complex as the coating agent. The photophysical properties of QDs remained unchanged after the ligand exchange step, presenting an absorbance and emission maximum wavelengths at 650 and 655 nm, respectively. The QD-[Gd(L8)] systems presented size of 160 nm (by DLS), the longitudinal relaxivity value was estimated per Gd^{3+} as r_1 = 11.7 (at 1.4 T and 36°C) and 10.2 $mM^{-1}s^{-1}$ (at 4.7 T and 36°C), which is 2.5 higher than value for the free complex, per QD r_1 was 655 (at 1.4 T, 36 °C) and 571.2 $mM^{-1}s^{-1}$ (at 4.7 T, 36 °C). The biocompatibility of the probe was tested using a murine macrophage cell line (RAW 264.7), and no significant cytotoxicity was found. Microscopic images showed cells labeled by the bimodal probes, and T_1-weighted MR images (at 4.7 T, 36 °C) presented higher contrast when the prepared probes were used.

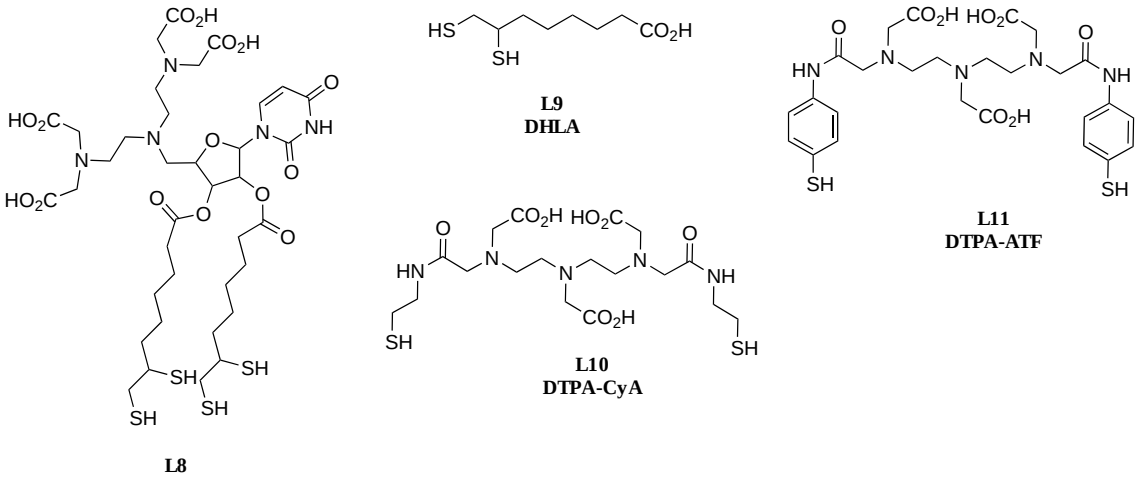


Figure 9 – Chemical structures of the ligands L8-L11.

Gao *et al.* (2013)[24] develop a bimodal system with optical properties in the NIR region using CdHgTe/ZnS QDs. Hydrophobic CdHgTe/ZnS QDs were prepared and then coated with dihydrolipoic acid (DHLA, L9, Figure 9). The QDs-DHLA were then complexed with Gd^{3+}, affording the bimodal probes. The systems prepared presented an average size of 10 nm and a number of Gd^{3+} ions around 80 per nanoparticle. Relaxivity studies showed a dependence between T_1 and the Gd^{3+} concentration, and a r_1 value of 2.01 $mM^{-1}s^{-1}$ *per* Gd^{3+} ion (at 0.55 T and 32 ºC). The *in vivo* assays (in mice) suggested that the probes had good penetrability, indicating that they can be used for *in vivo* imaging.

In 2016, Zhang *et al.* [90] developed a nanostructure with emission in the infrared region, to obtain *in vivo* images of tumors by MRI and fluorescence (Figure 10). For this, BSA was conjugated with DTPA anhydride, followed by complexation with Gd^{3+}, obtaining the BSA-[Gd(DTPA)] chelate. The Ag_2S-BSA-[Gd(DTPA)] was prepared using the BSA-[Gd(DTPA)] chelates as the stabilizing agent, during the QDs colloidal synthesis in an aqueous medium. The nanostructures prepared presented an average size of 6 nm (by DLS), and emission around 790 nm, however, a decrease of 30% was observed in their emission intensity when compared with Ag_2S-BSA QDs. This fluorescence quenching was attributed to the presence of Gd^{3+} ions. Through the relaxation time measurements, the relaxivities values were obtained, r_1 = 12.6 $mM^{-1}s^{-1}$ and r_2 = 16.9 $mM^{-1}s^{-1}$ *per* Gd^{3+} ion (at 1.41 T and 32 ºC). The authors associated this improvement in r_1 with the higher rigidity of the chelate molecules. Other tests showed the stability, low cytotoxicity, and good biocompatibility of Ag_2S-BSA-[Gd(DTPA)] nanoprobes.

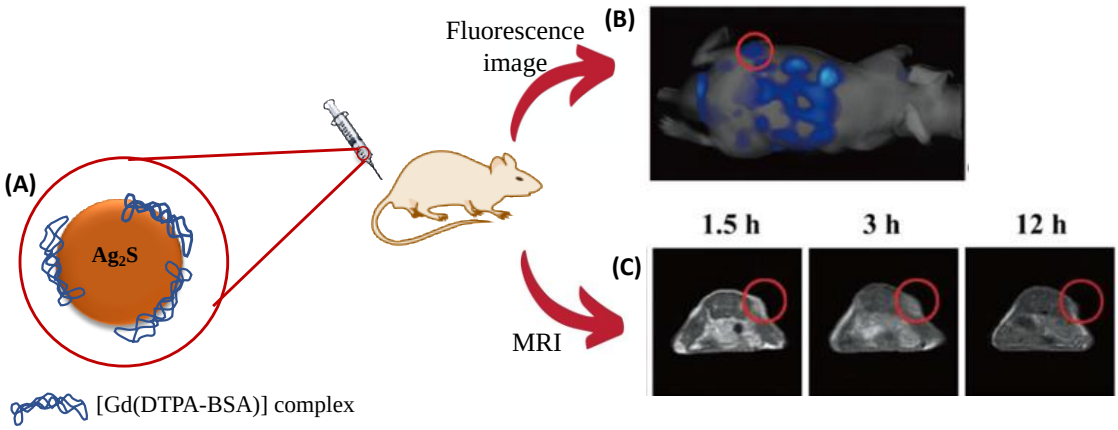


Figure 10 – Schematic representation of the Ag_2S-BSA-[Gd(DTPA)] bimodal nanosystems (A), and the in vivo fluorescence (B) and MR images (C) of mice after injection with the nanoprobes. The red circles indicate the tumor areas confirmed by histological analysis. Adapted with permission from Zhang et al. [90], ACS Appl. Mater. Interfaces (2016). Copyright © 2016, American Chemical Society.

Yang *et al*. (2017)[91] created a nanostructure containing QDs of $CuInS_2$/ZnS conjugated to a $[Gd(DTPA)]^-$ derivative. These NIR-emitting QDs were chosen due to its high fluorescence efficiency, deep tissue penetration, and low toxicity. The DTPA anhydride was linked to cysteamine (CyA), originating a DTPA-SH derivative (DTPA-CyA, L10, Figure 9. Then, the DTPA-CyA was deposited directly on the surface of the hydrophobic $CuInS_2$/ZnS QDs, followed by the chelation with Gd^{3+}. The nanosystems prepared had a size of around 24.7 nm (by DLS). Through the absorption spectra, it was possible to observe that there were no significant changes in comparison with the QDs. The emission spectrum, on the other hand, showed a small decrease in intensity, decreasing their quantum yield from 29 to 19%, when compared to bare QDs. Besides, the maximum emission peak presented a red-shift of 55 nm, which was attributed to the formation of defects during the conjugation process. Longitudinal relaxivity, r_1, was estimated as 9.91 $mM^{-1}s^{-1}$ *per* Gd^{3+} ion (3.0 T), which was 2.5 times higher than the clinically used DTPA. Results from *in vitro* (with HeLa cells) and *in vivo* (with HeLa-bearing mice) and applications revealed that the nanostructures presented good stability and low cytotoxicity (Figure 11).

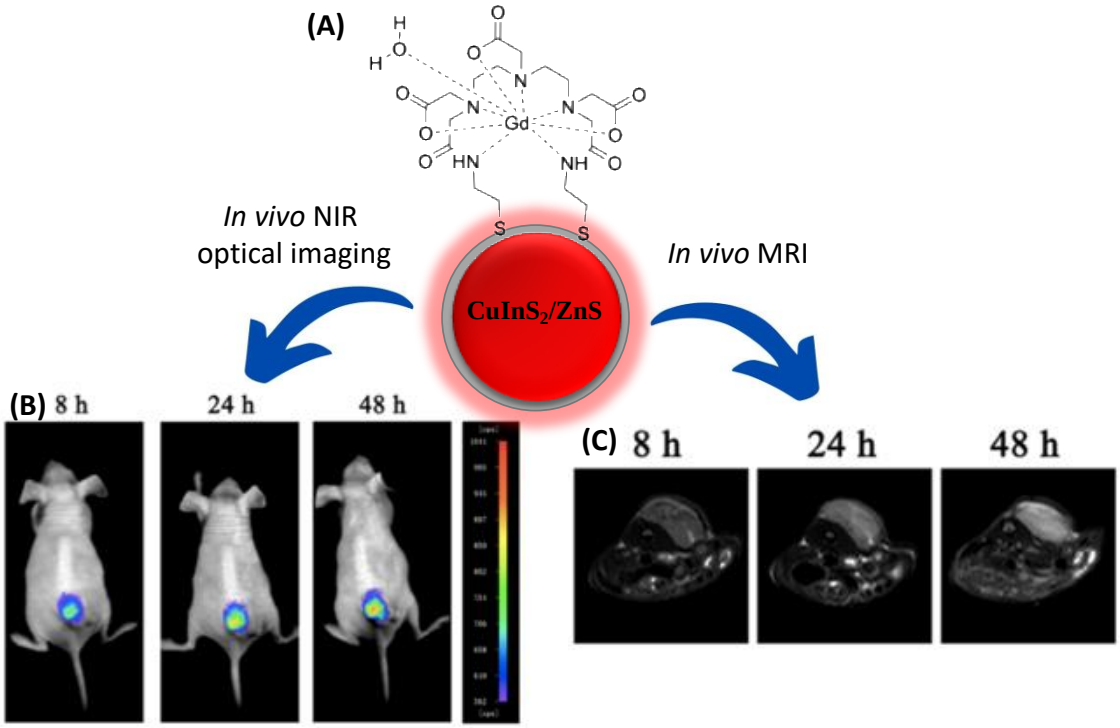


Figure 11 –Schematic representation of the bimodal system (A), used for in vivo NIR optical images (B) and T_1-weighted MR images (C) of HeLa-bearing mice, after incubation with the bimodal nanoprobe. Adapted with permission from Yang et al. [91], ACS Appl. Mater. Interfaces (2017). Copyright © 2017, American Chemical Society.

McAdams *et al*. (2017)[92] prepared bimodal nanoprobes based on CdSe/CdS/ZnS QDs and DTPA-Gd complexes. The DTPA anhydride was conjugated with 4-aminothiophenol (ATF) (DTPA-ATF, L11, Figure 9), and then complexed with Gd^{3+} ions. The $[Gd(DTPA\text{-}ATF)]^{2-}$ was then directly attached to the QDs surface. The prepared nanoprobe QD-[Gd(DTPA-ATF)] presented a size of 8.4 nm, and a decrease in its emission intensity when compared to CdSe/CdS/ZnS QDs. The QD-[Gd(DTPA-ATF)] probes presented r_1 value of 11 $mM^{-1}s^{-1}$ per Gd^{3+} (at 1 T and 27 ºC), and an average of 620 complexes per QD, which means a r_1 of 6800 $mM^{-1}s^{-1}$ per QD.

Table 1 – Summary of the works regarding the development of bimodal nanoprobes based on non-covalent interactions.

QD	Chelate	Strategy	Size (nm)	r_1 ($mM^{-1}s^{-1}$ *per* Gd)	r_1 ($mM^{-1}s^{-1}$ *per* QD)	r_2 ($mM^{-1}s^{-1}$ *per* Gd)	r_2 ($mM^{-1}s^{-1}$ *per* QD)	Ref.
CdSe/ZnS	DTPA	Encapsulation	50[1]	4.5[3]	---	14.1[3]	---	[73, 74]
CdSe	DTPA	Streptavidin-biotin	6.7[2]	15.6[3]	3000-4500[3]	---	5600-8400[3]	[75]
CdSe/ZnS	DTPA	Streptavidin-biotin	28.9[1]	7.0[4]	---	166[4]	---	[76, 77]
CdSe/ZnS	DOTA	Streptavidin-biotin	---	---	---	---	---	[78]
CdS:Mn/ZnS	TSPETE	Physical interactions	11-17[2]	20.5[5]	---	151[5]	---	[79]
CdSe/ZnSe	tmhd	Physical interactions	15-20[2]	---	---	---	---	[80]
CdSe/ZnSe	DOTA-NCS	Physical interactions	15-20[2]	---	---	---	---	[81]
CdSe/ZnS	DTPA	Physical interactions	---	12[6]	2000[6]	18[6]	---	[82]
CdSe/ZnS	DTPA	Physical interactions	---	12.4[6]	---	18[6]	---	[83]
CdSe/ZnS	DTPA	Physical interactions	58[1]	14.4[6]	36,000[6]	23[6]	---	[84]
CdSe/CdS/ZnS	DTPA	Physical interactions	25[1]	5.7[7]	---	32.4[7]	---	[85]
CdSe/ZnS	DTPA	Physical interactions	35[1]	16.6[6]	---	27.7[6]	---	[86]
InP/ZnS	L5, Fig.8	Dative bonds	8.6-9.2[1]	20.9[8]	2406[8]			
	L6, Fig.8		---	8.9[8]	585[8]	---	---	[87, 88]
	L7, Fig.8		---	31.5[8]	2523[8]			
CdSe/ZnS	L8, Fig.9	Dative bonds	160[1]	11.7[6]	655[6]	---	---	[89]
CdHgTe/ZnS	DHLA	Dative bonds	10[1]	2.01[9]	---	---	---	[24]
Ag_2S	DTPA	Dative bonds	6[1]	12.6[6]	---	16.9[6]	---	[90]
$CuInS_2$/ZnS	DTPA-CyA	Dative bonds	24.7[1]	9.91[10]	---	---	---	[91]

QD	Chelate	Strategy	Size (nm)	r_1 ($mM^{-1}s^{-1}$ *per* Gd)	r_1 ($mM^{-1}s^{-1}$ *per* QD)	r_2 ($mM^{-1}s^{-1}$ *per* Gd)	r_2 ($mM^{-1}s^{-1}$ *per* QD)	Ref.
CdSe/CdS/ZnS	DTPA-ATF	Dative bonds	8.4[2]	11[11]	6800[11]	---	---	[92]

(1) DLS; (2) TEM; (3) 1.5 T; (4) 7 T; (5) 4.7 T; (6) 1.4 T; (7) 6.3 T; (8) 0.8 T; (9) 0.55 T, (10) 3 T; (11) 1 T.

4.2. Conjugation by covalent bond

Due to its chemically active surface, QDs can be functionalized with several functional groups and be dispersed in water. These functional groups have specific reactivity that can be manipulated to establish covalent bonds with other functionalities. For the majority of the conjugation strategies, it is required the use of coupling agents, which need to be carefully selected for each reaction, taking into account the reacting functional groups [19]. The most common covalent conjugation approach is based on the reaction of a carboxylic acid with an amine, forming an amide bond, using EDC (or other carbodiimide) and NHS as coupling agents. In Table 2, we presented the reports regarding the development of bimodal nanoprobes based on covalent associations.

As our knowledge goes, the first report of a bimodal nanoprobe, prepared by a covalent strategy, was reported by Gerion *et al*. (2007)[93]. This authors coated CdSe/ZnS QDs with a thiolated silica layer (CdSe/ZnS/Si-SH), and conjugated them covalently to a $[Gd(DOTA)]^-$ chelate derivative. The (2-(4-aminobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid) chelate (NH_2-Bn-DOTA, L12, Figure 12) was complexed with Gd^{3+} ions, and conjugated with CdSe/ZnS/Si-SH, using sulfosuccinimidyl 4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (sulfo-SMCC) as the coupling agent. The nanoparticles size was estimated by atomic force microscopy (AFM), obtain a value of 15−18 nm. The results suggested that the QD-silica contributed to increasing the relaxivity value (r_1 = 23 $mM^{-1}s^{-1}$ per Gd^{3+} ion and r_1 = 1019 $mM^{-1}s^{-1}$ per QD, at 1.4 T and room temperature), and these systems were successfully used in MRI mouse experiments. However, during this study, the optical properties of the QDs and the bimodal nanoprobes were not disclosed.

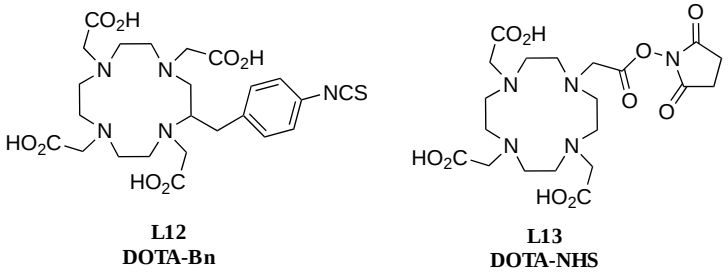


Figure 12 – Chemical structures of ligands L12 and L13.

Jin *et al*. (2008)[94] prepared systems based on NIR-emitting QDs. The hydrophobic CdSeTe/CdS QDs were submitted to a ligand exchange procedure to make them water-compatible, changing the TOPO for glutathione (GSH). Then, the QDs were conjugated with $[Gd(DOTA)]^-$ chelates, activating the DOTA ligand with an NHS-ester (L13, Figure 12). The bimodal nanoprobes QDs-[Gd(DOTA)] presented a broad absorption spectrum and a photoluminescence maximum wavelength around 800 nm. The QDs-[Gd(DOTA)] presented an hydrodynamic radius of 10 nm (determined by fluorescence correlaton spectroscopy) and showed brighter T_1-weighted images than bare QDs. Relaxivities per QD were estimated as r_1 = 365 $mM^{-1}s^{-1}$ and r_2 = 6779 $mM^{-1}s^{-1}$ (at 11.7 T and room temperature). *In vivo*, MRI and

NIR-fluorescence images were obtained injecting QDs-[Gd(DOTA)] in the mouse abdomen, and it was possible to observe a strong fluorescence emission and a MRI brighter contrast in the injection site.

Liu *et al*. (2011)[95] tested two types of probes based on polymer-coated CdTe/ZnS QDs attached to $[Gd(DOTA)]^-$. CdTe/ZnS hydrophobic QDs were coated with PEG-NH_2, obtaining QDs-PEG. Then, QDs-PEG were further encapsulated in an amine-terminated copolymer (QDs-CoP). These amino-functionalized nanostructures (QDs-PEG and QDs-CoP) were conjugated covalently with DOTA-NHS ester, forming the bimodal probes (QD-PEG-Gd and QD-CoP-Gd), with a diameter of 21 nm (by TEM). The optical characterization of the nanoparticles prepared showed retention of the optical properties and a redshift of the emission spectra after the encapsulation. The relaxometric characterization was made at 4.7 T, and exhibited an increase in relaxivity (4.4 and 8.2 $mM^{-1}s^{-1}$ per Gd^{3+} ion for QDs-PEG-Gd and QDs-CoP-Gd, respectively) compared to the commercial CA. The cell viability assays with macrophage cell lines and demonstrated low cytotoxicity of the systems, independently of the dosage.

Cheng *et al*. (2013) [96] investigated the use of cadmium free $CuInS_2$/ZnS QDs covalently bound to $[Gd(DTPA)]^{2-}$ complexes and functionalized with folic acid (FA) to make a specific probe for tumor cells (HeLa, human liver carcinoma - HepG2, and human breast - MCF-7) (Figure 13). The $CuInS_2$/ZnS QDs were prepared in an organic medium and coated with a carboxylated polymer. Then, these QDs were functionalized with ethylenediamine, using EDC and NHS as the coupling reagents, and then conjugated with $[Gd(DTPA)]^{2-}$ chelates, using the same carbodiimide procedure. Finally, FA molecules were attached to the bimodal systems, using also EDC and NHS. The optical properties of QDs were maintained after conjugation, only observing a redshift (under 5 nm), and an enlargement of the full width at half maximum (FWHM). Through a clinical MR scanner (7 T), longitudinal relaxivity was measured at room temperature, exhibiting the value of 3.72 $mM^{-1}s^{-1}$ per Gd^{3+} ion. Tumor cells were incubated with the QDs-[Gd(DTPA)]-FA systems for 24 h and remained alive, indicating no significant toxicity.

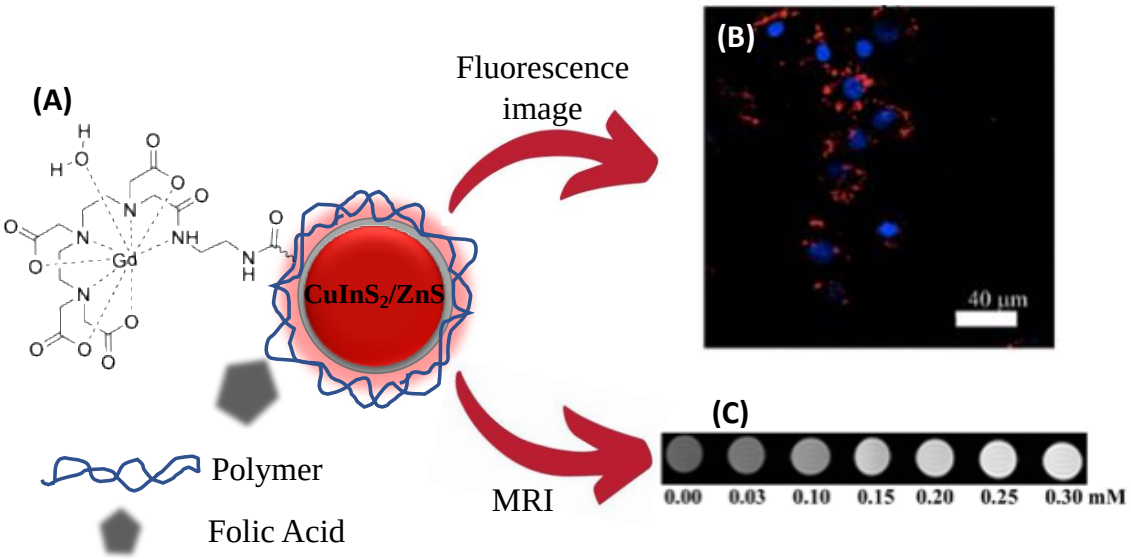


Figure 13 – Schematic representation of the bimodal nanosystems QD-[Gd(DTPA)]-FA (A). Confocal fluorescence microscopy images of HepG2 cells (B) incubated with QD-[Gd(DTPA)]-FA, and MRI of QD-[Gd(DTPA)]-FA in water (C). Adapted with permission from Cheng et al. [96], Applied Materials (2013). Copyright © 2013, American Chemical Society.

In the study reported by Lin and collaborators (2014)[97], the silica-coated $CuInS_2/ZnS$ QDs were attachment covalently to $[Gd(DTPA)]^{2-}$. The core-shell QDs were obtained in organic solvents, and a silica layer was growth also in organic solvents, using TEOS. Then the QDs-silica were functionalized with amino groups (using APTS) and reacted with the diethylenetriaminepentaacetic dianhydride (DTPAa). After the solvent removal, the nanoparticles were dispersed in Tris–HCl buffer solution and complexed with Gd^{3+}. The QDs-Si-NH_2 presented an emission in the red region and sizes around 34 nm (by TEM). The relaxometric measurements of the QDs-Si-NH_2-[Gd(DTPA)] showed an r_1 = 8.45 $mM^{-1}s^{-1}$ per Gd^{3+} (at 3.0 T and room temperature). The nanoparticles were incubated with human pancreatic cancer cell lines (BXPC-3) and presented low cytotoxicity. Fluorescence images obtained demonstrated a clear red emission from the QDs and T_1-weighted images showed better contrast when the QDs-Si-NH_2-[Gd(DTPA)] systems were present.

Li *et al*. (2015)[98] developed a bimodal system with emission in the infrared region, to obtain a preoperative diagnosis and assist in image-guided brain tumor surgery. The Ag_2S QDs used were synthesized in organic medium and then coated with polyethylene glycol conjugated with dihydrolipoic acid (DHLA-PEG-NH_2), after an exchange ligand procedure to obtain Ag_2S-NH_2 hydrophilic QDs. The DOTA was activated with NHS and *O*-(benbenzotriazoleyl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU), forming the DOTA-NHS ester (L13, Figure 12). After that, DOTA-NHS was conjugated to the amino-functionalized QDs through covalent bonding, followed by the Gd^{3+} complexation. The nanoprobes characterization analyses showed the formation of dispersed nanoparticles with a larger size when compared to bare Ag_2S (by TEM), and with an average of 12 Gd^{3+} ions per QD (by inductively coupled plasmon-mass spectroscopy - ICP-MS). The Ag_2S-[Gd(DOTA)] nanoprobes exhibited a broad absorption

band and emission at 1200 nm, with a quantum yield about15%. Through relaxometry measurements, it was possible to calculate the relaxivity, obtaining r_1 = 4.9 $mM^{-1}s^{-1}$ *per* Gd^{3+} ion (at 11.7 T and 25 °C). It was observed that the system was stable, with a negligible release of the metal, which points to its potential for *in vivo* applications. *In vivo* studies showed good fluorescence signal, and 3 hours after injection of the bimodal system Ag_2S-[Gd(DOTA)], an enhancement on the brain tumor (U87MG cells) contrast was observed by MRI (Figure 14). This system could allow the surgeon to be more precise in removing the tumor, as it will be able to see the unhealthy tissue before and after surgery.

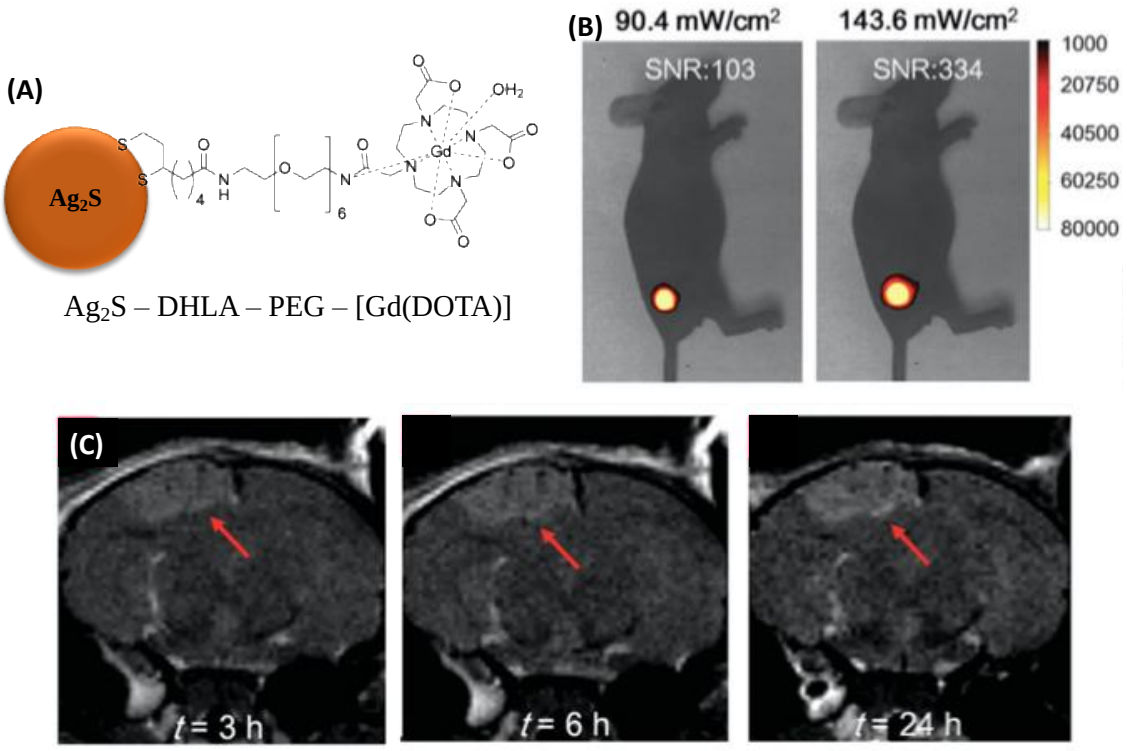


Figure 14 – (A) Schematic representtion of the bimodal system, Ag_2S-DHLA-PEG-[Gd(DOTA)]. In vivo, (B) NIR fluorescence images (12h of incubation), and (C) MRI (3, 6 and 24 h post-injection) of a tumor-bearing mouse injected with Ag_2S-DHLA-PEG-[Gd(DOTA)]. Adapted with permission from Li et al.[98], Small (2015). Copyright © 2015 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

In 2015, Shen *et al.*[99] developed a stable and biocompatible water-dispersible trimodal system containing $CuInS_2$ (CIS) QDs, Fe_3O_4 NPs, and $[Gd(DTPA)]^{2-}$ chelates. The CIS QDs and the magnetic NPs (MNPs) were encapsulated in silica, using TEOS and APTS, obtaining the CIS-MNPs-NH_2 system with an estimated size of 45 nm (by TEM). This bimodal system was then conjugated with $[Gd(DTPA)]^{2-}$ chelates and RGD peptides, using the EDC and NHS as coupling agents, obtaining a dual MRI contrast agent (for T_1 and T_2) and a fluorescence imaging probe for pancreatic cancer. No significant changes were noted in the optical properties of the final system when compared to bare QDs. The relaxivity studies (at 3.0 T, at room temperature) showed that r_1 = 1.56 $mM^{-1}s^{-1}$ *per* Gd^{3+} ion, which was lower than the clinical contrast agent, but presented a good result for r_2 = 23.22 $mM^{-1}s^{-1}$ *per* Gd^{3+}. The *in vitro* (with Human pancreatic cancer cell line BXPC-3 cells) and *in vivo* (in mice injected with BXPC-3 cells) tests confirmed that the trimodal

system showed low toxicity, and allowed to obtain T_1- and T_2-weighted MR and fluorescence images of cancer cells.

Ma *et al*. (2018)[100] conjugated a QD of Ag_2Se with a $[Gd(DTPA)]^{2-}$ chelate to obtain the bimodal nanosystems. The Ag_2Se QDs were prepared in an organic medium and then modified with octylamine-polyacrylic acid (OPA). The Ag_2Se-OPA were activated with EDC, and reacted with NH_2-PEG-NH_2, obtaining the Ag_2Se-PEG-NH_2 QDs. To form the bimodal system, $[Gd(DTPA)]^{2-}$ was conjugated to the Ag_2Se-PEG-NH_2 QDs, using EDC as the coupling agent. The hydrodynamic diameter increased from 5.6 to 13.5nm (by DLS), comparing Ag_2Se and Ag_2Se-[Gd(DTPA)] respectively. Optical studies of the system were carried out, showing no changes for the absorption profile, and a narrowing of the emission spectra. Data regarding the changes in QDs intensity, after the conjugation process, were not discussed. The longitudinal relaxation (r_1) of the Ag_2Se-[Gd(DTPA)] QDs was estimated as 2.98 $mM^{-1}s^{-1}$ per Gd^{3+} ion (at 3.0 T). *In vitro* (with Human breast cancer cells, MDA-MB-231) and *in vivo* (with mice) studies confirmed the stability and low cytotoxicity of this system. It was possible to state that the nanostructure could be applied biologically to obtain bimodal images.

Pereira *et al*. (2019)[101] developed CAs for MRI and optical imaging based on CdTe QDs and $[Gd(DOTA)]^-$ chelates. Hydrophilic CdTe QDs stabilized with mercaptosuccinic acid (MSA) were conjugated covalently to $[Gd(DOTA)]^-$ complexes, using EDC and Sulfo-NHS as coupling agents and ethylenediamine as a linker. The nanosystems obtained showed diameters between 16 and 28 nm (by fluorescence correlation spectroscopy, FCS). The conjugation process caused a variation in emission spectra, presenting a redshift and a small decrease in intensity when compared to bare QDs. Furthermore, the nanoprobes showed higher longitudinal relaxivities at least 5 times per Gd^{3+} and 100 times per QD compared to the $[Gd(DOTA)]^-$ chelates (r_1 = 24 and r_2 = 54 $mM^{-1}s^{-1}$ per Gd^{3+} ion, r_1 = 422 and r_2 = 960 $mM^{-1}s^{-1}$ per QD, at 1.4 T and 37 ºC). In this study, a transmetallation assay was also performed showing the stability of the Gd^{3+} chelate. Moreover, *in vitro* assays revealed that the systems successfully labeled HeLa cells with a great relative percentage of cell viability (Figure 15).

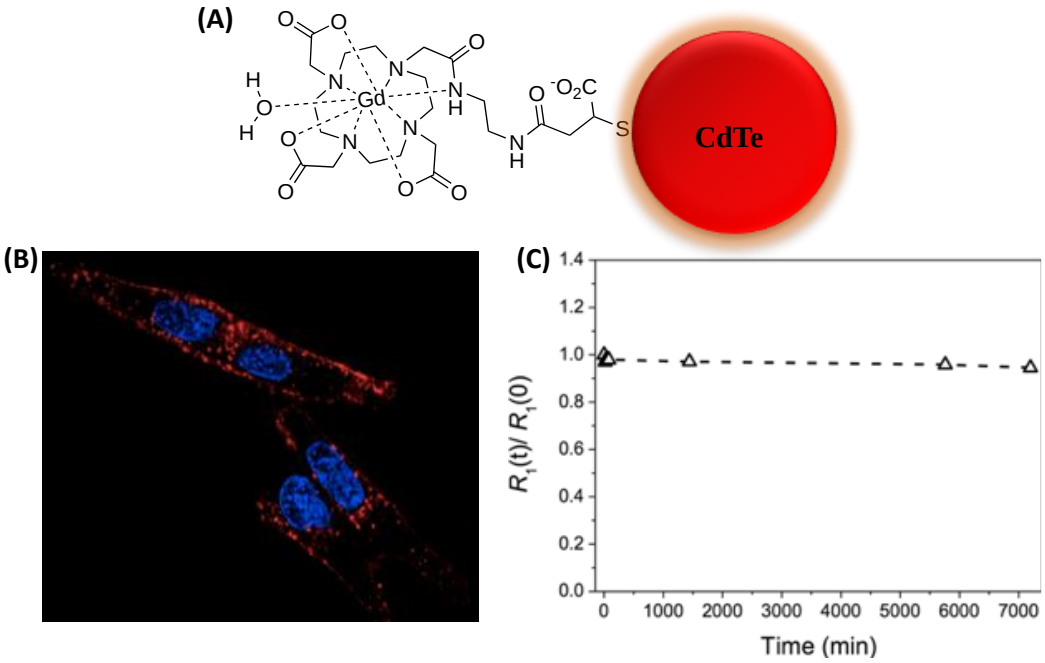


Figure 15 – A) Schematic representation of the biomodal CdTe-[Gd(DOTA)]. B) Fluorescence images of HeLa cells labeled with CdTe-[Gd(DOTA)] (red) and the nuclei was stained with Hoechst dye (blue). C) Transmetalation curve of the $[Gd(DOTA)]^-$ chelate derivative. Adapted with permission from Pereira et al.[101], Scientific reports (2019). Copyright © 2019, Springer Nature.

Table 2 – Summary of the works regarding the development of bimodal nanoprobes based on covalent conjugations.

QD	Chelate	Strategy	Size (nm)	r_1 ($mM^{-1}s^{-1}$ per Gd)	r_1 ($mM^{-1}s^{-1}$ per QD)	r_2 ($mM^{-1}s^{-1}$ per Gd)	r_2 ($mM^{-1}s^{-1}$ per QD)	Ref.
CdSe/ZnS	DOTA-Bn	Thiol-Amine	8-15(1)	23(5)	1019(5)	54(5)	2038(5)	[93]
CdSeTe/CdS	DOTA	Carboxylic acid-Amine	10(2)	---	365(6)	---	6779(6)	[94]
CdTe/ZnS	DOTA	Carboxylic acid-Amine	10-22(3)	4.4-8.2(7)	---	---	---	[95]
$CuInS_2$/ZnS	DTPA	Carboxylic acid-Amine	---	3.7(8)	---	---	---	[96]
$CuInS_2$/ZnS	DTPA	Anhydride-Amine	34(3)	8.45(9)	---	---	---	[97]
Ag_2S	DOTA	Carboxylic acid-Amine	10-20(4)	4.9(6)	---	---	---	[98]
$CuInS_2$	DTPA	Carboxylic acid-Amine	45(3)	1.6(9)	---	23.2(9)	---	[99]
Ag_2Se	DTPA	Carboxylic acid-Amine	13.5(4)	2.98(9)	---	---	---	[100]
CdTe	DOTA	Carboxylic acid-Amine	15-28(2)	24(5)	422(5)	54(5)	960(5)	[101]

(1) Atomic force microscopy (AFM); (2) FCS; (3) TEM; (4) DLS; (5) 1.4 T; (6) 11.7 T; (7) 4.7 T; (8) 7 T; (9) 3 T.

Conclusion

In this review, we analyzed the different approaches used for preparing bimodal nanoprobes based on Gd^{3+} chelates and QDs. The strategies were divided in two groups, non-covalent and covalent. The first attempts to prepare these bimodal nanoprobes were based on non-covalent strategies, and recently the covalent procedures have been gaining the spotlight.

Non-covalent nanosystems presented a size ranging from 7 to 160 nm, and a r_1 of 4.5 (at 1.5 T) to 31.5 (at 35 MHz) $mM^{-1}s^{-1}$ *per* Gd^{3+}. And covalent ones showed diameters from 8 to 45 nm, and r_1 values from 1.6 (at 3 T) to 24 (at 1.5 T) $mM^{-1}s^{-1}$ per Gd^{3+}. Thus, it is clearly that both final nanoprobe size and their relaxivity values are independent of the conjugation strategies applied. The difficulty to compare relaxivities is due to the parameters used to estimate this property since r_1 values depend on the magnetic field and temperature applied.

Another point is that the first systems developed used Cd-based QDs due to their improved optical properties, and recently, with an increased search for better biocompatible and less toxic nanomaterials, Cd-free QDs are gaining attention.

In general, after the association of the Gd^{3+} chelate with the QD an enhancement of the relaxivity was observed, which may be ascribed to the limiting on the rotation time of the final nanoprobe. Also, many research groups present a relaxivity per nanoparticle, being higher than the one per ion, which can be attributed to the possibility to attach a large number of paramagnetic chelates on the QD surface. Furthermore, the chemically active surface of QDs can also be used to conjugate them with biomolecules, enabling specific cell labeling.

Although several works applied these bimodal (or multimodal) nanoprobes *in vivo*, transmetalation studies and clearance from the body avaliations are rare. Thus, it is still required studies about these nanoprobes stability and inertness in the presence of endogenous metals in mammalians, together with more detailed analyses on these nanosystems stability over time and clearance from the body.

Acknowledgements

The authors acknowledge the Brazilian agencies: Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for G. Albuquerque, I. Sobrinha and S. Dantas scholarships, and Fundação de Amparo à Ciência e a Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) for financial support. This work is also linked to the National Institute of Photonics (INCT-INFo) and LARnano/UFPE.

Disclosure

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

[1] P. Verwilst, S. Park, B. Yoon, J.S. Kim. Recent advances in Gd-chelate based bimodal optical/MRI contrast agents. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 1791-1806. Doi: 10.1039/C4CS00336E

[2] G.A. Pereira, C.F.G.C. Geraldes. Design and optimization of gadolinium based contrast agents for magnetic resonance imaging. *Ann. Magn. Reson.* **2007**, 6, 1-33. Doi:

[3] L. Jing, K. Ding, S.V. Kershaw, I.M. Kempson, A.L. Rogach, M. Gao. Magnetically Engineered Semiconductor Quantum Dots as Multimodal Imaging Probes. *Adv. Mat.* **2014**, 26, 6367-6386. Doi: 10.1002/adma.201402296

[4] A. Abdukayum, C.-X. Yang, Q. Zhao, J.-T. Chen, L.-X. Dong, X.-P. Yan. Gadolinium Complexes Functionalized Persistent Luminescent Nanoparticles as a Multimodal Probe for Near-Infrared Luminescence and Magnetic Resonance Imaging in Vivo. *Anal Chem*. **2014**, 86, 4096-4101. Doi: 10.1021/ac500644x

[5] M.F. Ferreira, B. Mousavi, P.M. Ferreira, C.I.O. Martins, L. Helm, J.A. Martins, C.F.G.C. Geraldes. Gold nanoparticles functionalised with stable, fast water exchanging Gd3+ chelates as high relaxivity contrast agents for MRI. *Dalton T.* **2012**, 41, 5472-5475. Doi: 10.1039/C2DT30388D

[6] C.R.A. Cunha, A.D.P.R. Oliveira, T.V.C. Firmino, D.P.L.A. Tenório, G. Pereira, L.B. Carvalho, B.S. Santos, M.T.S. Correia, A. Fontes. Biomedical applications of glyconanoparticles based on quantum dots. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* **2018**, 1862, 427-439. Doi: 10.1016/j.bbagen.2017.11.010

[7] M.G.C. Pereira, E.S. Leite, G.A.L. Pereira, A. Fontes, B.S. Santos, Chapter 4 - Quantum Dots in: M. Sanchez-Dominguez, C. Rodriguez-Abreu (Eds.) Nanocolloids - A Meeting Point for Scientists and Technologists, Elsevier, Amsterdam, 2016, pp. 131-158.

[8] S.H. Lee, B.H. Kim, H.B. Na, T. Hyeon. Paramagnetic inorganic nanoparticles as T1 MRI contrast agents. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2014**, 6, 196-209. Doi: 10.1002/wnan.1243

[9] R. Mout, D.F. Moyano, S. Rana, V.M. Rotello. Surface functionalization of nanoparticles for nanomedicine. *Chem Soc Rev*. **2012**, 41, 2539-2544. Doi: 10.1039/C2CS15294K

[10] A. Fontes, R.B.d. Lira, M.A.B.L. Seabra, T.G.d. Silva, A.G.d.C. Neto, B.S. Santos, Quantum Dots in Biomedical Research, in: R. Hudak (Ed.) Biomedical Engineering - Technical Applications in Medicine, InTech, 2012.

[11] Y. Pu, F. Cai, D. Wang, J.-X. Wang, J.-F. Chen. Colloidal Synthesis of Semiconductor Quantum Dots toward Large-Scale Production: A Review. *Ind Eng Chem Res*. **2018**, 57, 1790-1802. Doi: 10.1021/acs.iecr.7b04836

[12] A. Zebibula, N. Alifu, L. Xia, C. Sun, X. Yu, D. Xue, L. Liu, G. Li, J. Qian. Ultrastable and Biocompatible NIR-II Quantum Dots for Functional Bioimaging. *Advanced Functional Materials*. **2018**, 28, 1703451. Doi: 10.1002/adfm.201703451

[13] S.B. Brichkin, V.F. Razumov. Colloidal quantum dots: synthesis, properties and applications. *Russian Chemical Reviews*. **2016**, 85, 1297-1312. Doi: 10.1070/rcr4656

[14] I.M.A. Viegas, B.S. Santos, A. Fontes, G.A.d.L. Pereira, C.F. Pereira. Multivariate optimization of optical properties of CdSe quantum dots obtained by a facile one-pot aqueous synthesis. *Inorganic Chemistry Frontiers*. **2019**, 6, 1350-1360. Doi: 10.1039/C9QI00105K

[15] Q. Ma, X. Su. Near-infrared quantum dots: synthesis, functionalization and analytical applications. *Analyst*. **2010**, 135, 1867-1877. Doi: 10.1039/C0AN00233J

[16] O. Yarema, M. Yarema, V. Wood. Tuning the Composition of Multicomponent Semiconductor Nanocrystals: The Case of I–III–VI Materials. *Chem Mater*. **2018**, 30, 1446-1461. Doi: 10.1021/acs.chemmater.7b04710

[17] D. Deng, L. Qu, S. Achilefu, Y. Gu. Broad spectrum photoluminescent quaternary quantum dots for cell and animal imaging. *Chem Commun*. **2013**, 49, 9494-9496. Doi: 10.1039/C3CC45751F

[18] Y. Cai, Z. Wei, C. Song, C. Tang, W. Han, X. Dong. Optical nano-agents in the second near-infrared window for biomedical applications. *Chem Soc Rev*. **2019**, 48, 22-37. Doi: 10.1039/C8CS00494C

[19] G. Pereira, C.A.P. Monteiro, G.M. Albuquerque, M.I.A. Pereira, M.P. Cabrera, P.E. Cabral Filho, G.A.L. Pereira, A. Fontesa, B.S. Santos. (Bio)conjugation Strategies Applied to Fluorescent Semiconductor Quantum Dots. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **2019**, 30, 2536-2561. Doi: 10.21577/0103-5053.20190163

[20] A. Shrestha, M. Batmunkh, A. Tricoli, S.Z. Qiao, S. Dai. Near-Infrared Active Lead Chalcogenide Quantum Dots: Preparation, Post-Synthesis Ligand Exchange, and Applications in Solar Cells. *Angewandte Chemie International Edition*. **2019**, 58, 5202-5224. Doi: 10.1002/anie.201804053

[21] E. Petryayeva, W.R. Algar, I.L. Medintz. Quantum dots in bioanalysis: a review of applications across various platforms for fluorescence spectroscopy and imaging. *Appl Spectrosc*. **2013**, 67, 215-252. Doi: 10.1366/12-06948

[22] A. Foubert, N.V. Beloglazova, A. Rajkovic, B. Sas, A. Madder, I.Y. Goryacheva, S. De Saeger. Bioconjugation of quantum dots: Review & impact on future application. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **2016**, 83, 31-48. Doi: 10.1016/j.trac.2016.07.008

[23] M. Díaz-González, A. de la Escosura-Muñiz, M.T. Fernandez-Argüelles, F.J. García Alonso, J.M. Costa-Fernandez. Quantum Dot Bioconjugates for Diagnostic Applications. *Topics in Current Chemistry*. **2020**, 378, 35. Doi: 10.1007/s41061-020-0296-6
[24] D. Gao, P. Zhang, J. Jia, M. Li, Z. Sheng, D. Hu, P. Gong, Q. Wan, L. Cai. Ultrasmall paramagnetic near infrared quantum dots as dual modal nanoprobes. *RSC Advances*. **2013**, 3, 21247-21250. Doi: 10.1039/C3RA40995C
[25] I.V. Martynenko, A.P. Litvin, F. Purcell-Milton, A.V. Baranov, A.V. Fedorov, Y.K. Gun'ko. Application of semiconductor quantum dots in bioimaging and biosensing. *Journal of Materials Chemistry B*. **2017**, 5, 6701-6727. Doi: 10.1039/C7TB01425B
[26] Y. Shang, Z. Ning. Colloidal quantum-dots surface and device structure engineering for high-performance light-emitting diodes. *National Science Review*. **2017**, 4, 170-183. Doi: 10.1093/nsr/nww097
[27] V.G. Reshma, P.V. Mohanan. Quantum dots: Applications and safety consequences. *J Lumin*. **2019**, 205, 287-298. Doi: 10.1016/j.jlumin.2018.09.015
[28] A. Manikandan, Y.-Z. Chen, C.-C. Shen, C.-W. Sher, H.-C. Kuo, Y.-L. Chueh. A critical review on two-dimensional quantum dots (2D QDs): From synthesis toward applications in energy and optoelectronics. *Progress in Quantum Electronics*. **2019**, 68, 100226. Doi: 10.1016/j.pquantelec.2019.100226
[29] S. Pandey, D. Bodas. High-quality quantum dots for multiplexed bioimaging: A critical review. *Advances in Colloid and Interface Science*. **2020**, 278, 102137. Doi: 10.1016/j.cis.2020.102137
[30] R. Damadian. Tumor Detection by Nuclear Magnetic Resonance. *Science*. **1971**, 171, 1151-1153. Doi: 10.1126/science.171.3976.1151
[31] P.C. Lauterbur. Image formation by induced local interactions: examples employing nuclear magnetic resonance. *Nature*. **1973**, 242, 190-191. Doi: 10.1038/242190a0
[32] A. Merbach, L. Helm, É. Tóth, The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging, 2sd ed., Wiley Online Library, 2013.
[33] P. Caravan, J.J. Ellison, T.J. McMurry, R.B. Lauffer. Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. *Chem Rev*. **1999**, 99, 2293-2352. Doi: 10.1021/cr980440x
[34] E. Terreno, D.D. Castelli, A. Viale, S. Aime. Challenges for Molecular Magnetic Resonance Imaging. *Chem Rev*. **2010**, 110, 3019-3042. Doi: 10.1021/cr100025t
[35] B.M. Dale, M.A. Brown, R.C. Semelka, MRI: basic principles and applications, 5th ed., John Wiley & Sons, 2015.
[36] C.F.G.C. Geraldes, S. Laurent. Classification and basic properties of contrast agents for magnetic resonance imaging. *Contrast Media Mol. Imaging*. **2009**, 4, 1-23. Doi: 10.1002/cmmi.265
[37] V.M.S. Gil, C.F.G.C. Geraldes, Ressonância Magnética Nuclear, 12 ed., Fundação Calouste Gulbenkian, 2002.
[38] R.M. Henkelman, G.J. Stanisz, S.J. Graham. Magnetization transfer in MRI: a review. *NMR in Biomedicine*. **2001**, 14, 57-64. Doi: 10.1002/nbm.683
[39] P. Caravan, J.J. Ellison, T.J. McMurry, R.B. Lauffer. Gadolinium (III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics, and applications. *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2293-2352. Doi: 10.1021/cr980440x
[40] L. Leone, G. Ferrauto, M. Cossi, M. Botta, L. Tei. Optimizing the Relaxivity of MRI Probes at High Magnetic Field Strengths With Binuclear Gd(III) Complexes. *Front Chem*. **2018**, 6, 158. Doi: 10.3389/fchem.2018.00158
[41] S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst, R.N. Muller. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 2064-2110. Doi: 10.1021/cr068445e
[42] P. Caravan. Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium based MRI contrast agents. *Chem Soc Rev*. **2006**, 35, 512-523. Doi: 10.1039/B510982P
[43] A. Avasthi, C. Caro, E. Pozo-Torres, M.P. Leal, M.L. García-Martín. Magnetic Nanoparticles as MRI Contrast Agents. *Topics in Current Chemistry*. **2020**, 378, 40. Doi: 10.1007/s41061-020-00302-w
[44] M. Rohrer, H. Bauer, J. Mintorovitch, M. Requardt, H.J. Weinmann. Comparison of magnetic properties of MRI contrast media solutions at different magnetic field strengths. *Invest Radiol*. **2005**, 40, 715-724. Doi: 10.1097/01.rli.0000184756.66360.d3
[45] Sophie Laurent, Delphine Forge, Marc Port, Alain Roch, Caroline Robic, Luce Vander Elst, R.N. Muller. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization,
Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 2064–2110. Doi: 10.1021/cr068445e
[46] H. Lammers, F. Maton, D. Pubanz, M.W. van Laren, H. van Bekkum, A.E. Merbach, R.N. Muller, J.A. Peters. Structures and Dynamics of Lanthanide(III) Complexes of Sugar-Based DTPA-bis(amides) in Aqueous Solution: A Multinuclear NMR Study. *Inorg Chem*. **1997**, 36, 2527-2538. Doi: 10.1021/ic961359k
[47] É. Tóth, L. Burai, E. Brücher, A. E. Merbach. Tuning water-exchange rates on (carboxymethyl)iminobis(ethylenenitrilo)tetraacetate (dtpa)-type gadolinium(III) complexes. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*. **1997**, 1587-1594. Doi: 10.1039/A608505I

[48] S. Laurent, L. Vander Elst, C. Henoumont, R.N. Muller. How to measure the transmetallation of a gadolinium complex. *Contrast Media & Molecular Imaging*. **2010**, 5, 305-308. Doi: 10.1002/cmmi.388
[49] M. Port, J.-M. Idée, C. Medina, C. Robic, M. Sabatou, C. Corot. Efficiency, thermodynamic and kinetic stability of marketed gadolinium chelates and their possible clinical consequences: a critical review. *Biometals*. **2008**, 21, 469-490. Doi: 10.1007/s10534-008-9135-x
[50] J.A. Peters, K. Djanashvili, C.F.G.C. Geraldes, C. Platas-Iglesias. The chemical consequences of the gradual decrease of the ionic radius along the Ln-series. *Coordin Chem Rev*. **2020**, 406, 213146. Doi: 10.1016/j.ccr.2019.213146
[51] Z. Zhou, L. Yang, J. Gao, X. Chen. Structure–Relaxivity Relationships of Magnetic Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging. *Adv Mater*. **2019**, 31, 1804567. Doi: 10.1002/adma.201804567
[52] M. Botta, L. Tei. Relaxivity Enhancement in Macromolecular and Nanosized GdIII-Based MRI Contrast Agents. *Eur J Inorg Chem*. **2012**, 2012, 1945-1960. Doi: 10.1002/ejic.201101305
[53] A.S. Merbach, L. Helm, E. Toth, The chemistry of contrast agents in medical magnetic resonance imaging, John Wiley & Sons, 2013.
[54] I. Solomon. Relaxation Processes in a System of Two Spins. *Physical Review*. **1955**, 99, 559-565. Doi: 10.1103/PhysRev.99.559
[55] N. Bloembergen, L.O. Morgan. Proton Relaxation Times in Paramagnetic Solutions. Effects of Electron Spin Relaxation. *The Journal of Chemical Physics*. **1961**, 34, 842-850. Doi: 10.1063/1.1731684
[56] N. Bloembergen. Proton Relaxation Times in Paramagnetic Solutions. *The Journal of Chemical Physics*. **1957**, 27, 572-573. Doi: 10.1063/1.1743771
[57] Y.A. Mondjinou, B.P. Loren, C.J. Collins, S.-H. Hyun, A. Demoret, J. Skulsky, C. Chaplain, V. Badwaik, D.H. Thompson. Gd3+:DOTA-Modified 2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin/4-Sulfobutyl Ether-β-Cyclodextrin-Based Polyrotaxanes as Long Circulating High Relaxivity MRI Contrast Agents. *Bioconjugate Chemistry*. **2018**, 29, 3550-3560. Doi: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00525
[58] S. Aime, M. Botta, G. Ermondi. NMR study of solution structures and dynamics of lanthanide(III) complexes of DOTA. *Inorg Chem*. **1992**, 31, 4291-4299. Doi: 10.1021/ic00047a016
[59] D.E. O'Reilly, C.P. Poole. NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE OF ALUMINA CONTAINING TRANSITION METALS. *The Journal of Physical Chemistry*. **1963**, 67, 1762-1771. Doi: 10.1021/j100803a006
[60] J.A. Peters, J. Huskens, D.J. Raber. Lanthanide induced shifts and relaxation rate enhancements. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. **1996**, 28, 283-350. Doi: 10.1016/0079-6565(95)01026-2
[61] M. Gueron. Nuclear relaxation in macromolecules by paramagnetic ions: a novel mechanism. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*. **1975**, 19, 58-66. Doi: 10.1016/0022-2364(75)90029-3
[62] J.H. Freed. Dynamic effects of pair correlation functions on spin relaxation by translational diffusion in liquids. II. Finite jumps and independent T1 processes. *The Journal of Chemical Physics*. **1978**, 68, 4034-4037. Doi: 10.1063/1.436302
[63] S.H. Koenig, R.D. Brown. Field-cycling relaxometry of protein solutions and tissue: Implications for MRI. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. **1990**, 22, 487-567. Doi: 10.1016/0079-6565(90)80008-6
[64] M. Botta. Second Coordination Sphere Water Molecules and Relaxivity of Gadolinium(III) Complexes: Implications for MRI Contrast Agents. *Eur J Inorg Chem*. **2000**, 2000, 399-407. Doi: 10.1002/(sici)1099-0682(200003)2000:3<399::Aid-ejic399>3.0.Co;2-b
[65] L. Wang, X. Zhu, X. Tang, C. Wu, Z. Zhou, C. Sun, S.-L. Deng, H. Ai, J. Gao. A multiple gadolinium complex decorated fullerene as a highly sensitive T1 contrast agent. *Chem Commun*. **2015**, 51, 4390-4393. Doi: 10.1039/C5CC00285K
[66] J.P.M. Almeida, A.L. Chen, A. Foster, R. Drezek. In vivo biodistribution of nanoparticles. *Nanomedicine*. **2011**, 6, 815-835. Doi: 10.2217/nnm.11.79
[67] P.F. Jiao, H.Y. Zhou, L.X. Chen, B. Yan. Cancer-targeting multifunctionalized gold nanoparticles in imaging and therapy. *Curr Med Chem*. **2011**, 18, 2086-2102. Doi: 10.2174/092986711795656199
[68] A. Servant, I. Jacobs, C. Bussy, C. Fabbro, T. da Ros, E. Pach, B. Ballesteros, M. Prato, K. Nicolay, K. Kostarelos. Gadolinium-functionalised multi-walled carbon nanotubes as a T1 contrast agent for MRI cell labelling and tracking. *Carbon*. **2016**, 97, 126-133. Doi: 10.1016/j.carbon.2015.08.051
[69] G. Lipari, A. Szabo. Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 2. Analysis of experimental results. *J Am Chem Soc*. **1982**, 104, 4559-4570. Doi: 10.1021/ja00381a010
[70] J.A. Peters, K. Djanashvili, C.F.G.C. Geraldes, C. Platas-iglesias, Structure, Dynamics, and Computational Studies of Lanthanide-Based
Contrast Agents, in: A. Merbach, L. Helm, É. Tóth (Eds.) The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging, John Wiley & Sons, Ltd, 2013, pp. i-xvi.
[71] L. Helm. Optimization of gadolinium-based MRI contrast agents for high magnetic-field applications. *Future Medicinal Chemistry*. **2010**, 2, 385-396. Doi: 10.4155/fmc.09.174

[72] E. Boros, M. Polasek, Z. Zhang, P. Caravan. Gd(DOTAla): A Single Amino Acid Gd-complex as a Modular Tool for High Relaxivity MR Contrast Agent Development. *J Am Chem Soc*. **2012**, 134, 19858-19868. Doi: 10.1021/ja309187m
[73] W.B. Tan, Y. Zhang. Multifunctional Quantum-Dot-Based Magnetic Chitosan Nanobeads. *Adv. Mater.* **2005**, 17, 2375-2380. Doi: 10.1002/adma.200401650
[74] W.B. Tan, Y. Zhang. Multi-Functional Chitosan Nanoparticles Encapsulating Quantum Dots and Gd-DTPA as Imaging Probes for Bio-Applications. *J Nanosci Nanotechno*. **2007**, 7, 2389-2393. Doi: 10.1166/jnn.2007.415
[75] L. Prinzen, R.-J.J.H.M. Miserus, A. Dirksen, T.M. Hackeng, N. Deckers, N.J. Bitsch, Megens, K. Douma, J.W. Heemskerk, M.E. Kooi, P.M. Frederik, D.W. Slaaf, M.A.M.J. van Zandvoort, C.P.M. Reutelingsperger. Optical and Magnetic Resonance Imaging of Cell Death and Platelet Activation Using Annexin A5-Functionalized Quantum Dots. *Nano Letters*. **2007**, 7, 93-100. Doi: 10.1021/nl062226r
[76] M. Oostendorp, K. Douma, T.M. Hackeng, A. Dirksen, M.J. Post, M.A.M.J. van Zandvoort, W.H. Backes. Quantitative Molecular Magnetic Resonance Imaging of Tumor Angiogenesis Using cNGR-Labeled Paramagnetic Quantum Dots. *Cancer Research*. **2008**, 68, 7676. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0689
[77] M. Oostendorp, K. Douma, T.M. Hackeng, M.J. Post, M.A.M.J. van Zandvoort, W.H. Backes. Gadolinium-labeled quantum dots for molecular magnetic resonance imaging: R1 versus R2 mapping. *Magnetic Resonance in Medicine*. **2010**, 64, 291-298. Doi: 10.1002/mrm.22342
[78] V. Biju, M. Hamada, K. Ono, S. Sugino, T. Ohnishi, E.S. Shibu, S. Yamamura, M. Sawada, S. Nakanishi, Y. Shigeri, S.-i. Wakida. Nanoparticles speckled by ready-to-conjugate lanthanide complexes for multimodal imaging. *Nanoscale*. **2015**, 7, 14829-14837. Doi: 10.1039/C5NR00959F
[79] H. Yang, S. Santra, G.A. Walter, P.H. Holloway. Gd^{III}-Functionalized Fluorescent Quantum Dots as Multimodal Imaging Probes. *Adv. Mater.* **2006**, 18, 2890-2894. Doi: 10.1002/adma.200502665
[80] R. Bakalova, Z. Zhelev, I. Aoki, H. Ohba, Y. Imai, I. Kanno. Silica-Shelled Single Quantum Dot Micelles as Imaging Probes with Dual or Multimodality. *Anal Chem*. **2006**, 78, 5925-5932. Doi: 10.1021/ac060412b
[81] R. Bakalova, Z. Zhelev, I. Aoki, K. Masamoto, M. Mileva, T. Obata, M. Higuchi, V. Gadjeva, I. Kanno. Multimodal Silica-Shelled Quantum Dots: Direct Intracellular Delivery, Photosensitization, Toxic, and Microcirculation Effects. *Bioconjugate Chemistry*. **2008**, 19, 1135-1142. Doi: 10.1021/bc700431c
[82] W.J.M. Mulder, R. Koole, R.J. Brandwijk, G. Storm, P.T.K. Chin, G.J. Strijkers, C. de Mello Donegá, K. Nicolay, A.W. Griffioen. Quantum Dots with a Paramagnetic Coating as a Bimodal Molecular Imaging Probe. *Nano Lett.* **2006**, 6, 1-6. Doi: 10.1021/nl051935m
[83] G.A.F. van Tilborg, W.J.M. Mulder, P.T.K. Chin, G. Storm, C.P. Reutelingsperger, K. Nicolay, G.J. Strijkers. Annexin A5-Conjugated Quantum Dots with a Paramagnetic Lipidic Coating for the Multimodal Detection of Apoptotic Cells. *Bioconjugate Chem.* **2006**, 17, 865-868. Doi: 10.1021/bc0600463
[84] R. Koole, M.M. van Schooneveld, J. Hilhorst, K. Castermans, D.P. Cormode, G.J. Strijkers, C. de Mello Donegá, D. Vanmaekelbergh, A.W. Griffioen, K. Nicolay, Z.A. Fayad, A. Meijerink, W.J.M. Mulder. Paramagnetic Lipid-Coated Silica Nanoparticles with a Fluorescent Quantum Dot Core: A New Contrast Agent Platform for Multimodality Imaging. *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19, 2471-2479. Doi: 10.1021/bc800368x
[85] L.W.E. Starmans, M.B. Kok, H.M.H.F. Sanders, Y. Zhao, C. de Mello Donegá, A. Meijerink, W.J.M. Mulder, H. Grüll, G.J. Strijkers, K. Nicolay. Influence of cell-internalization on relaxometric, optical and compositional properties of targeted paramagnetic quantum dot micelles. *Contrast Media Mol. Imaging*. **2011**, 6, 100-109. Doi: 10.1002/cmmi.411
[86] X. Xing, B. Zhang, X. Wang, F. Liu, D. Shi, Y. Cheng. An "imaging-biopsy" strategy for colorectal tumor reconfirmation by multipurpose paramagnetic quantum dots. *Biomaterials*. **2015**, 48, 16-25. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.01.011
[87] G.J. Stasiuk, S. Tamang, D. Imbert, C. Poillot, M. Giardiello, C. Tisseyre, E.L. Barbier, P.H. Fries, M. de Waard, P. Reiss, M. Mazzanti. Cell-Permeable Ln(III) Chelate-Functionalized InP Quantum Dots As Multimodal Imaging Agents. *ACS Nano*. **2011**, 5, 8193-8201. Doi: 10.1021/nn202839w
[88] G.J. Stasiuk, S. Tamang, D. Imbert, C. Gateau, P. Reiss, P. Fries, M. Mazzanti. Optimizing the relaxivity of Gd(iii) complexes appended to InP/ZnS quantum dots by linker tuning. *Dalton Trans.* **2013**, 42, 8197-8200. Doi: 10.1039/C3DT50774B
[89] J. Park, S. Bhuniya, H. Lee, Y.-W. Noh, Y.T. Lim, J.H. Jung, K.S. Hong, J.S. Kim. A DTTA-ligated uridine–quantum dot conjugate as a bimodal contrast agent for cellular imaging. *Chem Commun*. **2012**, 48, 3218-3220. Doi: 10.1039/C2CC17555J
[90] J. Zhang, G. Hao, C. Yao, J. Yu, J. Wang, W. Yang, C. Hu, B. Zhang. Albumin-Mediated Biomineralization of Paramagnetic NIR Ag2S QDs for Tiny Tumor Bimodal Targeted Imaging in Vivo. *ACS Applied Materials & Interfaces*. **2016**, 8, 16612-16621. Doi: 10.1021/acsami.6b04738
[91] Y. Yang, L. Lin, L. Jing, X. Yue, Z. Dai. CuInS2/ZnS Quantum Dots Conjugating Gd(III) Chelates for Near-Infrared Fluorescence and Magnetic Resonance Bimodal Imaging. *ACS Applied Materials & Interfaces*. **2017**, 9, 23450-23457. Doi: 10.1021/acsami.7b05867

[92] S.G. McAdams, D.J. Lewis, P.D. McNaughter, E.A. Lewis, S.J. Haigh, P. O'Brien, F. Tuna. High magnetic relaxivity in a fluorescent CdSe/CdS/ZnS quantum dot functionalized with MRI contrast molecules. *Chem Commun*. **2017**, 53, 10500-10503. Doi: 10.1039/C7CC05537D
[93] D. Gerion, J. Herberg, R. Bok, E. Gjersing, E. Ramon, R. Maxwell, J. Kurhanewicz, T.F. Budinger, J.W. Gray, M.A. Shuman, F.F. Chen. Paramagnetic Silica-Coated Nanocrystals as an Advanced MRI Contrast Agent. *The Journal of Physical Chemistry C*. **2007**, 111, 12542-12551. Doi: 10.1021/jp074072p
[94] T. Jin, Y. Yoshioka, F. Fujii, Y. Komai, J. Seki, A. Seiyama. Gd3+-functionalized near-infrared quantum dots for in vivo dual modal (fluorescence/magnetic resonance) imaging. *Chem Commun*. **2008**, 5764-5766. Doi: 10.1039/B812302K
[95] L. Liu, W.-C. Law, K.-T. Yong, I. Roy, H. Ding, F. Erogbogbo, X. Zhang, P.N. Prasad. Multimodal imaging probes based on Gd-DOTA conjugated quantum dot nanomicelles. *Analyst*. **2011**, 136, 1881-1886. Doi: 10.1039/C0AN01017K
[96] C.-Y. Cheng, K.-L. Ou, W.-T. Huang, J.-K. Chen, J.-Y. Chang, C.-H. Yang. Gadolinium-Based CuInS2/ZnS Nanoprobe for Dual-Modality Magnetic Resonance/Optical Imaging. *ACS Appl. Mater. Inter.* **2013**, 5, 4389-4400. Doi: 10.1021/am401428n
[97] B. Lin, X. Yao, Y. Zhu, J. Shen, X. Yang, C. Li. Multifunctional gadolinium-labeled silica-coated core/shell quantum dots for magnetic resonance and fluorescence imaging of cancer cells. *RSC Advances*. **2014**, 4, 20641-20648. Doi: 10.1039/C4RA02424A
[98] C. Li, L. Cao, Y. Zhang, P. Yi, M. Wang, B. Tan, Z. Deng, D. Wu, Q. Wang. Preoperative Detection and Intraoperative Visualization of Brain Tumors for More Precise Surgery: A New Dual-Modality MRI and NIR Nanoprobe. *Small*. **2015**, 11, 4517-4525. Doi: 10.1002/smll.201500997
[99] J. Shen, Y. Li, Y. Zhu, X. Yang, X. Yao, J. Li, G. Huang, C. Li. Multifunctional gadolinium-labeled silica-coated Fe3O4 and CuInS2 nanoparticles as a platform for in vivo tri-modality magnetic resonance and fluorescence imaging. *J. Mater. Chem. B*. **2015**, 3, 2873-2882. Doi: 10.1039/C5TB00041F
[100] J.-J. Ma, M.-X. Yu, Z. Zhang, W.-G. Cai, Z.-L. Zhang, H.-L. Zhu, Q.-Y. Cheng, Z.-Q. Tian, D.-W. Pang. Gd-DTPA-coupled Ag2Se quantum dots for dual-modality magnetic resonance imaging and fluorescence imaging in the second near-infrared window. *Nanoscale*. **2018**, 10, 10699-10704. Doi: 10.1039/C8NR02017E
[101] M.I.A. Pereira, G. Pereira, C.A.P. Monteiro, C.F.G.C. Geraldes, P.E. Cabral Filho, C.L. Cesar, A.A. de Thomaz, B.S. Santos, G.A.L. Pereira, A. Fontes. Hydrophilic Quantum Dots Functionalized with Gd(III)-DO3A Monoamide Chelates as Bright and Effective T1-weighted Bimodal Nanoprobes. *Scientific Reports*. **2019**, 9, 2341. Doi: 10.1038/s41598-019-38772-8