



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus Araraquara
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



**Desenvolvimento de pontos quânticos de Gd^{3+}/ZnO
conjugados a pontos quânticos de GCIS/ZnS para
imagens multimodais associados à nanocápsulas lipídicas**

Bruna Lallo da Silva

Orientadora: Prof Dra. Leila Aparecida Chiavacci Favorin

Araraquara- SP
2022



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus Araraquara
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



**Desenvolvimento de pontos quânticos de Gd^{3+}/ZnO
conjugados a pontos quânticos de GCIS/ ZnS para
imagens multimodais associados à nanocápsulas lipídicas**

Bruna Lallo da Silva

Tese apresentada ao Programa de Pósgraduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof Dra. Leila Aparecida Chiavacci Favorin

Araraquara- SP
2022

S586d Silva, Bruna Lallo da.
Desenvolvimento de pontos quânticos de Gd^{3+}/ZnO conjugados a pontos quânticos de Gd^{3+}/ZnS para imagens multimodais associados à nanocápsulas lipídicas / Bruna Lallo da. – Araraquara: [S.n.], 2022.
138 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Leila Aparecida Chiavacci Favorin.

1. Pontos Quânticos. 2. Nanocápsulas Lipídicas. 3. Imagens Multimodais. 4. Luminescência. 5. Ressonância Magnética. I. Favorin, Leila Aparecida Chiavacci, orient. II. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Desenvolvimento de pontos quânticos de Gd^{3+}/ZnO conjugados a pontos quânticos de $GCIS/ZnS$ para imagens multimodais associados à nanocápsulas lipídicas

AUTORA: BRUNA LALLO DA SILVA

ORIENTADORA: LEILA APARECIDA CHIAVACCI FAVORIN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LEILA APARECIDA CHIAVACCI FAVORIN (Participação Virtual)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP Araraquara

Profa. Dra. MIRIAN SANAÉ TOKUMOTO (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas / Universidade Estadual de Santa Cruz

Profa. Dra. PAULA SILVIA HADDAD FERREIRA (Participação Virtual)
Departamento de Química / Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Prof. Dr. FERNANDO LUCAS PRIMO (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. LAUDEMIR CARLOS VARANDA (Participação Virtual)
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - USP - São Carlos

Araraquara, 09 de fevereiro de 2022

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha família, em especial ao meu pai pois sua presença e força em períodos difíceis me fizeram resiliente para enfrentar meus próprios desafios. Obrigada por enfrentar as batalhas da vida com fé em dias melhores. “Eu seguro minha mão na sua mão e uno meu coração ao seu, para que juntos possamos fazer aquilo que sozinho eu não consigo “Oração da serenidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelas oportunidades e pessoas que conheci ao longo dessa trajetória. Por me proporcionar conforto para os momentos difíceis e sabedoria para olhar o lado bom mesmo quando tudo parece desabar. Agradeço também pelo autoconhecimento que tive durante essa trajetória.

A minha família, especialmente meus pais, Solange e Sérgio, por me apoiarem em todas as decisões, e principalmente, por sempre acreditarem em mim, minha avó Dolores, meu irmão Rafael, cunhada Daiane e meus sobrinhos Eduardo e Lorenzo pelo apoio e momentos de descontração.

À minha orientadora Prof. Dra. Leila Aparecida Chiavacci Favorin por todos os conhecimentos transmitidos e pela amizade e empatia.

Ao Laurent Lemaire, meu supervisor do estágio BEPE e o laboratório MINT da Universidade de Angers. Obrigada Laurent por ser um supervisor que tanto me ensinou. Sou infinitamente grata pelos meses que trabalhamos juntos e minha estadia em Angers, e no laboratório MINT, um lugar tão acolhedor.

Aos amigos do laboratório de Ciências dos Materiais Aplicados à Farmácia- CMAF, por todos os ensinamentos, companheirismo e incentivo. Pelos momentos de descontração e afeto, Valesa, Marina, Mariana, Camila, Thúlio.

Aos amigos que fiz durante minha estadia em Angers. Vocês estarão para sempre em minha memória. Abdalla, Milad, Umer, Agnese, Helène, Claire, Valentin, Lena, Natália, Caroline, Jéssica e Jaiana

Aos meus amigos e amigas por sempre me acompanharem em todos os momentos, ajudando no que fosse possível. Amo vocês.

À professora Dra. Rogéria Rocha Golçalves, do Departamento de Química da Universidade de São Paulo-USP, da faculdade de filosofia ciências e letras de Ribeirão Preto pela parceria para realizações de experimentos e a Fernanda Hediger, por me acompanhar nas medidas, sendo um apoio importante durante minha trajetória, pessoa que hoje chamo de amiga.

Ao Instituto de Química da UNESP/Araraquara, ao departamento de físico-química, em especial aos professores Celso V. Santilli, Sandra Helena Pulcinelli pela permissão da utilização de equipamentos para caracterização dos materiais.

À professora Regina Célia Galvão Frem e Rafael Romano pela parceria para a realização das medidas de infravermelho.

Ao professor Fernando Lucas Primo e Camila Amantino pela parceria na realização dos ensaios de citotoxicidade e captação celular. Muito obrigada.

À Seção de Pós-graduação e toda Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP).

À FAPESP pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho: Processo 2017/16074-4 e 2018/14164-9. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) pelo apoio financeiro. Código de financiamento 001.

LISTA DE ABREVIATURAS

PQs: pontos quânticos

GCIS/ZnS: Pontos quânticos contendo gadolínio, cobre, índio, enxofre/ sulfeto de zinco

ZnOGd: Pontos quânticos de óxido de zinco associados ao gadolínio

ZnOGd-GCIS/ZnS: Pontos quânticos de óxido de zinco contendo gadolínio associados aos pontos quânticos de gadolínio, cobre, índio, enxofre/ sulfeto de zinco

NCL: nanocápsulas lipídicas

Argn-P54: nanomontagens de arginina com ferrocifeno

HTMS: Hexadeciltrimetoxisilano

GPTMS: 3-glicidiloxipropiltrimetoxisilano

MET: microscopia eletrônica de transmissão

UV-Vis: espectroscopia na região do ultravioleta visível

DRX: difração de raios X

PLE: espectro de excitação

PL: espectro de emissão

RMN: ressonância magnética nuclear

TG: análise termogravimétrica

Fmoc: 9-fluorenilmetiloxycarbonila

DLS: Espalhamento de luz dinâmico

DDT: 1-dodecanetiol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da rotação do próton da água um campo magnético estático B0 (a) e na excitação por radiofrequência B1 (b). A seta tracejada representa o componente Mz (c) e o círculo sólido representa o componente Mx,y (d). Evolução em função do tempo de Mz (c) e (d) Mx,y (d) com, respectivamente, T1 e T2 como constantes de tempo derivadas da inclinação inicial (linhas tracejadas) (LACROIX et al., 2013)	21
Figura 2. Diagrama de Jablonski. E mostra a escala de energia. S0 é o estado singlete, S1 e S2 representam o estado singlete excitado com energia sucessiva mais alta. T1 é o estado tripleto. 1, 2 e 3 são os diferentes níveis de energia vibracional. Figura adaptada do artigo “Fluorescence Spectroscopy” (PETER TC SO, 2002).	24
Figura 3. Esquema experimental para detecção do deslocamento de Stokes. Adaptada de (LAKOWICZ, 2006)	25
Figura 4. Diagrama esquemático mostrando a relação inversamente proporcional entre o band gap e o tamanho dos PQs. Adaptada do artigo “Quantum Confinement Effect of 2D Nanomaterials” (RAMALINGAM et al., 2020).	27
Figura 5. Funcionalização de PQs de ZnO com DOX para a liberação intracelular de DOX em pH ácido. Extraída do artigo “pH-Sensitive ZnO quantum dots–doxorubicin nanoparticles for lung cancer targeted drug delivery” (CAI et al., 2016).	33
Figura 6. Representação das diferentes possibilidades de construção de nanoestruturas multiplamente funcionalizados contendo PQs. Por exemplo, capaz de atingir o tumor, transportar / liberar a carga útil do fármaco e resultar em uma resposta terapêutica simultaneamente. Figura adaptada do artigo “Quantum dot-based theranostics” (HO; LEONG, 2010).	40
Figura 7. Síntese dos PQs de ZnO e ZnOGd	49
Figura 8. Síntese dos PQs de GCIS/ZnS (rota 1 e rota 2)	50
Figura 9. Representação esquemática da síntese da poliarginina (Argn) usando síntese peptídica em fase sólida. Abreviações: Arg: arginina, DMF: N,N-dimethylformamide, Fmoc: 9-fluorenylmethoxycarbonyl, Pbf: 2,2,4,6,7-pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl. HBTU: ativador, DIEA: base ativadora.	55
Figura 10. Esquema do preparo das NCL. Figura adaptada do artigo: ‘Targeting and treatment of glioblastomas with human mesenchymal stem cells carrying ferrociphenol lipid nanocapsules’ (CLAVREUL et al., 2015).	59
Figura 11. Imagens dos PQs de GCIS em DDT (A) e PQs em forma de pó da esquerda para direita: ZnO, GCIS/ZnS-1, ZnO-GCIS/ZnS-1 mistura física e ZnO-GCIS/ZnS-1 após o tratamento térmico a 300°C. Comprimento de onda de excitação: 365nm.	63
Figura 12. Decaimento da intensidade de fotoluminescência dos PQs em forma de pó após diferentes tempos de exposição ($\lambda_{exc}=325$ nm (A). Decaimento da intensidade de fotoluminescência dos PQs em forma de pó (B).	64
Figura 13. Difratomogramas de raios X dos PQs de ZnO, GCIS/ZnS e ZnO-GCIS/ZnS.	65
Figura 14. Microscopia eletrônica de transmissão (A) ZnO PQs, (B) GCIS/ZnS and ZnO-GCIS/ZnS (C).	66
Figura 15. Emissão dos PQs de ZnOGd e PQs de GCIS/ZnS-3.	67
Figura 16. Emissões encontradas para diferentes condições de tratamento térmico e proporções utilizadas entre os PQs de ZnOGd e GCIS/ZnS-3.	69
Figura 17. Imagens de Microscopia eletrônica de transmissão e distribuição de tamanho dos PQs de (A) ZnOGd, (B) GCIS/ZnS e PQs conjugados através do tratamento térmico utilizando diferentes proporções de ZnOGd e GCIS/ZnS de 75-25% (C) e 50-50% (D).	70
Figura 18. Difratomogramas de raios X dos PQs de GCIS e GCIS/ZnS (rota 1).	71
Figura 19. Comparação dos Difratomogramas de raios X dos PQs GCIS/ZnS (rota 1) e da síntese utilizando apenas os reagentes orgânicos, sem adição de Cu, In, Zn e Gd.	73
Figura 20. Comparação entre os difratogramas de raios X dos PQs de GCIS/ZnS, ZnOGd e suas respectivas associações após o tratamento térmico à 260°C.	74
Figura 21. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho dos PQs de ZnOGd, GCIS,	

GCIS/ZnS e PQs de ZnOGd-GCIS/ZnS preparados com diferentes proporções entre os PQs de ZnOGd e GCIS/ZnS.	76
Figura 22. Análises termogravimétricas (TG) e (B) TG, dTA e dTG dos PQs de ZnOGd, GCIS/ZnS e dos PQs conjugados nas proporções 75% e 25%.	78
Figura 23. Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-vis) dos PQs dispersos em clorofórmio sem (A) e com modificação de superfície (B).	81
Figura 24. Difrátogramas de raios X dos PQs modificados pelo HTMS.	82
Figura 25. Espectros de excitação (PLE)-(A) e emissão (PL)-(B) dos PQs dispersos em clorofórmio. Dados normalizados.	83
Figura 26. Espectros de excitação (PLE)-(A) e emissão (PL)-(B) dos PQs modificados pelo HTMS e dispersos em clorofórmio. Dados normalizados.	84
Figura 27. Espectros de excitação (PLE)- (A) e emissão (PL) dos PQs em pó após a excitação a 360 nm (B) e 520 nm (C). Dados normalizados.	86
Figura 28. Espectros de excitação (PLE) e espectros de emissão (PL) de NCL contendo ZnO-GCIS/ZnS-1 excitados a 350 nm. (B) emissão de NCL-ZnO-GCIS/ZnS em diferentes diluições (lâmpada UV a 254 nm). (C) imagem de ressonância magnética T1 e T2 de NCL-ZnO-GCIS/ZnS-1 em diferentes diluições.	88
Figura 29. Espectros de excitação (PLE) e espectros de emissão (PL) de NCL contendo ZnO-GCIS/ZnS-2 excitados a 350 nm. (B) emissão de NCL-ZnO-GCIS/ZnS em diferentes diluições (lâmpada UV a 254 nm). (C) imagem de ressonância magnética T1 e T2 de NCL-GCIS/ZnS-2 em diferentes diluições.	88
Figura 30. Propriedades de fotoluminescência de NCL-PQs preparadas com PQs sintetizados com diferentes proporções entre ZnOGd e GCIS/ZnS-3 e temperatura utilizada para a conjugação dos PQs.	89
Figura 31. Espectros de excitação (PLE) e espectros de emissão (PL) das NCL contendo ZnOGd-GCIS/ZnS-3 (98-2) excitado a 350 nm. (B) imagens de T2 de RMN das NCL preparadas com junções dos PQs a 300 ° C. (B) e a 260°C (C).	91
Figura 32. Espectros de excitação (PLE) e espectros de emissão (PL) das NCL contendo ZnOGd-GCIS / ZnS-3 (90-10) excitado a 350 nm. (B) imagens de T2 de RMN das NCL preparadas com junções dos PQs a 300 ° C. (B) e a 260°C (C).	92
Figura 33. (A) Espectros de excitação (PLE) e espectros de emissão (PL) de NCL contendo ZnOGd-GCIS / ZnS-3 (75-25) excitados a 350 nm. (B) imagens de T2 de RMN das NCL preparadas com junções dos PQs a 260°C.	93
Figura 34. (A) Espectros de excitação (PLE) e espectros de emissão (PL) de NCL contendo ZnOGd-GCIS / ZnS-3 (50-50) excitados a 350 nm. (B) imagens de T2 de RMN das NCL preparadas com junções dos PQs a 260°C.	94
Figura 35. Estudo de estabilidade das NCL-ZnOGd.	96
Figura 36. Luminescência, distribuição de tamanho e índice de polidispersidade de NCL-PQs não dialisadas (A) e dialisadas (B).	97
Figura 37. RMN NCL-PQs.	98
Figura 38. RMN-Difusão das nanocápsulas lipídicas contendo PQs (A) e nanocápsulas lipídicas contendo PQs após a diálise (B).	100
Figura 39. Esquema da associação dos PQs com as NCL e hipótese de sua localização nas NCL.	101
Figura 40. Imagens dos PQs de ZnOGd ; ZnOGd-GCIS/ZnS (75-25) e GCIS/ZnS, modificados pelo GPTMS e dispersos em água, sob lâmpada UV a 365 nm (A). Espectros de emissão (PL) dos PQs PQs de ZnOGd ; ZnOGd-GCIS/ZnS (75-25) e GCIS/ZnS, modificados pelo GPTMS e dispersos em água.	103
Figura 41. imagem de T1 (água)- (A). Imagens de T1 dos PQs de ZnOGd-GCIS/ZnS modificados com GPTMS e dispersos em água- (B). Imagens de T2 (água)- (C). Imagens de T2 dos PQs de ZnOGd-GCIS/ZnS (75-25) modificados com GPTMS e dispersos em água- (D).	104
Figura 42. Citotoxicidade de pontos quânticos modificados com GPTMS e dispersos em água (ZnOGd, GCIS / ZnS e ZnOGd-GCIS / ZnS (75-25)) em células de fibroblasto 3T3 / NIH. As células foram incubadas com diferentes concentrações (5,15,20,50,200 e 250 µg.mL ⁻¹) por 4 h em 5% de CO ₂ e 37 °C. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média de três	

experimentos independentes. A significância estatística foi determinada usando o teste de análise de variância One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparações múltiplas. (CT = controle, * $p < 0,05$).	105
Figura 43. captação celular de pontos quânticos modificados com GPTMS e dispersos em água (ZnOGd, GCIS / ZnS e ZnOGd-GCIS / ZnS (75-25)) em células de fibroblasto 3T3 / NIH. As células foram incubadas com diferentes concentrações por 6 h e 24 h. As células foram lavadas com PBS para remover os pontos quânticos que não foram capturados pelas células.	106
Figura 44. Citotoxicidade de pontos quânticos associados às nanocápsulas lipídicas (ZnOGd, GCIS/ZnS e ZnOGd-GCIS / ZnS (75-25)) em células de fibroblasto 3T3/NIH. As células foram incubadas com diferentes concentrações (20,50, e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) por 4 h em 5% de CO_2 e 37 °C. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes. A significância estatística foi determinada usando o teste de análise de variância One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparações múltiplas. (CT = controle, * $p < 0,05$).	108
Figura 45. captação celular de pontos quânticos associados às NCL (ZnOGd, GCIS / ZnS e ZnOGd-GCIS / ZnS (75-25)) em células de fibroblasto 3T3/NIH. As células foram incubadas com diferentes concentrações por 6 h e 24 h. As células foram lavadas com PBS para remover os pontos quânticos que não foram capturados.....	109
Figura 46. Espectro de excitação (PLE) espectro de emissão (PL) do Arg9-p54-PQs.....	111
Figura 47. Espectros de excitação (PLE) e espectros de emissão (PL) do complexo Arg8-p54-PQs preparados com 2 mg/ml (A) e 1 mg/mL (B) de ZnOGd-GCIS/ZnS-3.	112
Figura 48. Difrátogramas de raios X dos PQs de GCIS e GCIS/ZnS (rota 2).	113
Figura 49. Espectros de absorção UV-vis dos PQs de GCIS/ZnS sintetizados pela rota 2.	114
Figura 50. Análises termogravimétricas dos PQs de GCIS/ZnS sintetizados pela rota 2.....	115
Figura 51. Comparação entre os difratogramas de raios X dos PQs de ZnOGd, GCIS/ZnS e suas respectivas associações após o tratamento térmico à 260°C.	116
Figura 52. Comparação entre os difratogramas de raios X dos PQs de ZnOGdHTMS, GCIS/ZnS e suas respectivas associações após o tratamento térmico à 260°C.....	118
Figura 53. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho dos PQs de ZnOGd HTMS, GCIS/ZnS (rota 2) e PQs de ZnOGd-GCIS/ZnS preparados com diferentes proporções entre os PQs de ZnOGd HTMS e GCIS/ZnS (rota 2).	119
Figura 54. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho dos PQs de ZnOGd, GCIS/ZnS (rota 2) e PQs de ZnOGd-GCIS/ZnS preparados com diferentes proporções entre os PQs de ZnOGd HTMS e GCIS/ZnS (rota 2).	120
Figura 55. Espectros de excitação (PLE)- (a) e emissão (PL) após a excitação na região do UV (b) e do visível (c) dos PQs de ZnOGd, GCIS/ZnS (síntese sem ODE) e dos PQs conjugados após tratamento térmico em utilizando diferentes proporções entre os PQs de ZnOGd e e GCIS/ZnS. Dados normalizados.....	121
Figura 56. Espectros de excitação (PLE)- (a) e emissão (PL) após a excitação na região do UV (b) e do visível (c) dos PQs de ZnOGdHTMS, GCIS/ZnS (síntese sem ODE) e dos PQs conjugados após tratamento térmico em utilizando diferentes proporções entre os PQs de ZnOGdHTMS e GCIS/ZnS. Dados normalizados.	123
Figura 57. Imagens de Microscopia eletrônica de transmissão (A e B) e distribuição de tamanho dos PQs (C) de GCIS/ZnS sintetizados pela rota 2.....	124
Figura 58. Imagem de Microscopia eletrônica de transmissão (A) e distribuição de tamanho (B) dos PQs de ZnOGd-GCIS/ZnS na proporção 75-25 após o tratamento térmico.	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferentes proporções utilizadas para síntese dos PQs de GCIS na rota 1.....	51
Tabela 2. Diferentes proporções dos PQs utilizados para a conjugação.....	52
Tabela 3. Reagentes e concentrações para a síntese do peptídeo.....	56
Tabela 4. Diferentes proporções e temperaturas utilizadas para o acoplamento dos PQs...	68
Tabela 5. PL dos PQs em forma de pó e disperso em clorofórmio e modificados com HTMS e dispersos em clorofórmio	86
Tabela 6. Valores de T2 das NCL associadas aos PQs de ZnOGd-GCIS/ZnS	95
Tabela 7. Valores de intensidade máxima dos espectros de excitação (PLE) e de emissão (PL) dos PQs mostrados na figura 53.....	122
Tabela 8. Valores de intensidade máxima dos espectros de excitação (PLE) e de emissão (PL) dos PQs mostrados na figura 54.....	123

RESUMO

Nos últimos anos, o uso de pontos quânticos (PQs) para obter imagens biológicas tem atraído atenção por suas propriedades luminescentes e a possibilidade de incorporar agentes de contraste para serem utilizados em imagens de ressonância magnética. Nessa tese, foram utilizadas diferentes estratégias para o desenvolvimento de PQs objetivando a aplicação no diagnóstico por meio de imagens óticas e de ressonância magnética. Dessa forma, PQs de ZnO e PQs de ZnOGd foram sintetizados pela rota sol-gel. PQs contendo gadolínio-cobre-índio-enxofre e ZnS (GCIS/ZnS) foram sintetizados através de duas rotas de síntese (rota 1 e rota 2). Os PQs de ZnO e ZnOGd foram conjugados com PQs de GCIS/ZnS por meio de um tratamento térmico, resultando em um novo ponto quântico não previamente descrito na literatura. Os PQs foram caracterizados através das técnicas de Microscopia eletrônica de transmissão (MET), espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), difração de raios X (DRX), análise termogravimétrica, espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis). A avaliação das propriedades fotoluminescentes foi realizada por meio da coleta dos espectros de excitação (PLE) e emissão (PL). Os PQs de ZnOGd-GCIS/ZnS foram associados às automontagens de arginina (Arg) e ferrocifeno (p-54) e às nanocápsulas lipídicas (NCL). Para a associação com as NCL, os PQs foram modificados por Hexadeciltrimetoxisilano (HTMS) para permitir sua dispersão em Labrafac® (triglicerídeos de ácido cáprico-caprílico), constituinte da fase oleosa das NCL, que foram preparadas através do método de inversão de fases. Ainda, uma modificação hidrofílica nos PQs foi realizada usando o 3-glicidiloxipropiltrimetoxisilano (GPTMS) para a dispersão dos PQs em água. As propriedades de imagens tanto dos PQs associados às NCL quanto dos PQs dispersos em água foram avaliadas através de imagens de ressonância magnética e coleta dos espectros de PLE e PL. As propriedades citotóxicas e de captação celular foram determinadas frente às células de fibroblasto embrionário de camundongo (NIH/3T3-ATCC® CRL-1658TM). Os resultados mostraram que os pós de ZnOGd-GCIS/ZnS tratados termicamente podem ser excitados em diferentes regiões. Dessa forma, os PQs interagem entre si de forma a mudar as propriedades luminescentes tanto do ZnOGd quanto do GCIS/ZnS (rota 1), sendo que o máximo de emissão ficou entre a emissão dos dois PQs separadamente. A associação dos PQs de ZnOGd-GCIS/ZnS com Arg-p54 resultou na perda da luminescência. Diferentes proporções entre ZnOGd e GCIS/ZnS (rota 1) foram incorporadas nas NCL e apresentaram bom contraste nas imagens de ressonância magnética. Os novos PQs desenvolvidos (ZnOGd-GCIS/ZnS), dispersos em água, maioritariamente constituído por ZnOGd (75%), apresentaram menor citotoxicidade quando comparado ao ZnOGd, além de maior captação celular. Ainda, as NCL associadas aos PQs apresentaram maior citotoxicidade e menor captação celular que comparados com os PQs sozinhos. A síntese do GCIS/ZnS foi otimizada (rota 2), resultando em PQs com maior grau de pureza. Após a associação do GCIS/ZnS (rota 2) com os PQs de ZnOGd por meio do tratamento térmico, foram encontradas emissões na primeira janela do infravermelho próximo, chegando até 820 nm, conforme aumentou a proporção de GCIS/ZnS em relação ao ZnO Gd. Essa emissão no infravermelho próximo é mais favorável para imagens biológicas pois tem maior penetração nos tecidos além de ser uma região de emissão que se diferencia da autofluorescência das células. Frente aos resultados apresentados, podemos concluir que os PQs desenvolvidos contendo uma associação entre ZnOGd e GCIS/ZnS por meio do tratamento térmico, tanto dispersos em água quanto associados às NCL, apresentam grande potencial para o diagnóstico simultâneo por imagens de ressonância magnética e imagens de luminescência.

Palavras-chaves: Pontos Quânticos; Nanocápsulas Lipídicas; Imagens Multimodais; Luminescência; Ressonância Magnética.

ABSTRACT

In the last years, the use of quantum dots (Qdots) to obtain biological images has stand out due to their luminescent properties and the possibility to incorporated contrast agents to be used in magnetic resonance images. In this thesis, different strategies were used for the Qdots development aiming the application in the diagnosis through optical and magnetic resonance imaging. Thus, ZnO Qdots and ZnOGd Qdots were synthesized by the sol-gel method. Qdots containing gadolinium-copper-indium-sulfur and ZnS (GCIS/ZnS) were synthesized through two synthesis routes (route 1 and route 2). The ZnO and ZnOGd Qdots were conjugated with Qdots containing gadolinium-copper-indium-sulfur and ZnS (GCIS/ZnS) through a heat treatment, resulting in a new quantum dot not previously described in the literature. Qdots were characterized by transmission electron microscopy (TEM), infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD) thermogravimetric analysis (TG) and absorption spectroscopy in the ultraviolet-visible region (UV-vis). The photoluminescent properties were evaluated by excitation (PLE) and emission (PL) spectra. The ZnOGd-GCIS/ZnS Qdots were associated with self-assemblies of arginine (Arg) and ferrocifen (p-54) and lipid nanocapsules (LNC). ZnOGd-GCIS/ZnS Qdots were modified by Hexadecyltrimetoxisilane (HTMS) to allow their dispersion in labrafac® (caprylic-capric acid triglycerides), oil phase constituent of LNC, in which were prepared by phase inversion method. Furthermore, a hydrophilic Qdots modification was carried out using 3-glycidyloxypropyltrimethoxysilane (GPTMS) to disperse the Qdots in water. The image properties of NCL-associated to Qdots and water-dispersed Qdots were evaluated by magnetic resonance images and acquisition of PLE and PL spectra. The cytotoxic and cell uptake properties were determined against mouse embryonic fibroblast cells (NIH/3T3-ATCC® CRL-1658™). The results showed that the heat-treated ZnOGd-GCIS/ZnS powders can be excited in different regions. In this way, Qdots interact with each other changing the luminescent properties of both ZnOGd and GCIS/ZnS (route 1) and the maximum emission was between the emission of the two Qdots separately. The association of ZnOGd-GCIS/ZnS Qdots with Arg-p54 resulted in loss of luminescence. The new Qdots developed (ZnOGd-GCIS/ZnS), dispersed in water, mainly constituted by ZnOGd (75%), showed lower cytotoxicity when compared to ZnOGd, in addition to greater cellular uptake. Furthermore, the NCL associated with the Qdots showed greater cytotoxicity and lower cellular uptake than compared to the Qdots alone. The GCIS/ZnS synthesis was optimized (route 2), resulting in Qdots with a higher purity. After the association of GCIS/ZnS (route 2) with the ZnOGd Qdots through heat treatment, emissions were found in the first near-infrared window, reaching up to 820 nm, as the proportion of GCIS/ZnS in relation to ZnOGd increased. This near-infrared emission is more favorable for biological imaging as it has greater penetration into tissues in addition to being an emission region that differs from the autofluorescence of cells. Based on the results presented, we can conclude that the developed Qdots containing an association between ZnOGd and GCIS/ZnS through thermal treatment, dispersed in water or associated with NCL, have great potential for simultaneous diagnosis by magnetic resonance imaging and luminescence.

Keywords: Quantum dots; Lipid nanocapsules; Multimodal Images; Luminescence, Magnetic resonance imaging.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2.1. Técnicas de diagnóstico por imagens	19
2.1.1. Princípios da ressonância magnética	20
2.2. Espectroscopia de fluorescência	23
2.3. Pontos quânticos	25
2.3.1. Pontos quânticos e seu uso em imagens	28
2.4. Passivação de superfície dos PQs	36
2.5. Nanocarreadores de fármacos na nanomedicina teranóstica	39
2.5.1. Lipossomas	41
2.5.2. Micelas	42
2.5.3. Associação de PQs com peptídeos e nanomontagens	44
2.5.4. Nanocápsulas Lipídicas	46
3. OBJETIVOS.....	48
4. METODOLOGIA.....	49
4.1. Síntese dos Pontos quânticos.....	49
4.1.1. PQs de ZnO e PQs de ZnO dopados com Gd.....	49
4.1.2. Obtenção dos PQs de ZnO dopados e não dopados na forma de pó.....	50
4.1.3. PQs de GCIS/ZnS	50
4.1.4. Conjugação dos PQs	52
4.2. Modificação de superfície dos PQs.....	53
4.2.1. Hexadecyltrimethoxysilane (HTMS).....	53
4.2.2. (3-Glicidiloxipropil) trimetoxissilano (GPTMS)	53
4.3. Caracterização dos PQs.....	53
4.3.1. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	53
4.3.2. Espectroscopia de absorção da região do infravermelho (FTIR).....	54
4.3.3. Difração de raios X	54
4.3.4. Análise Termogravimétrica	54
4.3.5. Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)	54
4.4. Avaliação das propriedades fotoluminescentes dos PQs.....	54
4.5. PQs acoplados com peptídeos	55
4.5.1. Síntese do peptídeo.....	55
4.5.2. Peptídeo –Carboxylthylsilanetriol	56

4.5.3. Associação dos PQs com complexo de arginina-ferrocifeno	57
4.6. Associação dos PQs com as nanocápsulas lipídicas	58
4.6.1. Formulação das NCL e associação com os PQs	58
4.6.2. Caracterização das NCL-PQs.....	59
4.7 Ensaio de citotoxicidade e captação celular	60
4.7.1. PQs modificados com GPTMS e dispersos em água.....	60
4.7.2. PQs associados às NCL.....	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1. PQs ZnO, ZnOGd e GCIS/ZnS (rota de síntese 1)	62
5.1.1. PQs de ZnO e GCIS/ZnS-1 e GCIS/ZnS-2	62
5.1.2. PQs de ZnO dopados com Gd e GCIS/ZnS-3.....	67
5.1.3. Avaliação das propriedades fotoluminescentes dos PQs por meio da coleta dos espectros de excitação (PLE) e emissão (PL).....	82
5.1.4. Nanocápsulas lipídicas contendo PQs	87
5.1.5. Estudo da estabilidade das NCL-ZnOGd em plasma de rato.....	95
5.1.6. Estudo da localização dos PQs nas NCL.....	96
5.1.7. PQs modificados pelo GPTMS e dispersos em água.....	102
5.1.8 Ensaio de citotoxicidade e captação celular	104
5.1.9 Conjugação dos PQs com peptídeo	109
5.2. PQs de GCIS/ZnS sintetizados pela rota 2	112
5.2.1. Acoplamento dos PQs de GCIS/ZnS (rota 2) com PQs de ZnOGd.....	115
6. CONCLUSÕES	126
7. REFERÊNCIAS.....	127

1. INTRODUÇÃO

Um dos principais motivos para a falta de diagnóstico precoce de tumores deve-se ao diagnóstico tardio oriundo da falta de técnicas de imagens adequadas (FRANK et al., 2014). A técnica de ressonância magnética é uma das mais escolhidas para o diagnóstico de câncer, pois é capaz de penetrar profundamente os tecidos moles, fornecendo detalhes anatômicos e imagens tridimensionais de alta qualidade. No entanto possui limitações, pois, detecta apenas objetos com micrômetros de tamanho, dessa forma, tem a sensibilidade menor que métodos radioativos ou óticos. Em contrapartida, as imagens obtidas por fluorescência tem maior sensibilidade e potencial de imagens em tempo real, mas com limitada percepção de profundidade o que restringe sua aplicação apenas em superfície ou próximo à superfície. Nesse sentido, a integração da ressonância magnética e imagem ótica funcionalizada em uma única nanoestrutura permite que as suas respectivas limitações sejam eficazmente superadas. Dessa forma, o desenvolvimento de nano estruturas capazes de integrar essas duas técnicas é uma inovação que promove vantagens em termo de diagnóstico médico e imagens moleculares (LIU et al., 2011b).

Nos últimos anos os pontos quânticos (PQs) vem ganhando destaque. Já para imagens obtidas por ressonância magnética, agentes de contraste são necessários, geralmente utilizando complexos de Gadolínio ou partículas de óxido de ferro, como a magnetita (Fe_3O_4) ou magemita ($\lambda\text{Fe}_2\text{O}_3$). Pesquisas também mostram o uso do manganês e cobalto, mas, em menor número (TERRENO et al., 2010). Esses agentes de contraste podem ser incorporados aos PQs dando origem a um material capaz de obter imagens tanto de ressonância magnética quanto por imagens óticas.

As pesquisas relacionadas ao uso de PQs de ZnO para imagens estão aumentando devido às suas excelentes propriedades luminescentes e baixa toxicidade (DING et al., 2011; XIAO et al., 2011). Além disso, o ZnO é um material biodegradável e menos tóxico e caro que os PQs contendo cádmio. Dessa forma, justifica-se seu possível uso para a obtenção de imagens biológicas (GULIA; KAKKAR, 2013).

No entanto existe um fator limitante: os PQs de ZnO possuem baixa estabilidade fotoluminescente em meios biológicos (CAI et al., 2017; HOU et al., 2017; LIU et al., 2017a). Um outro desafio encontrado consiste na região de emissão do ZnO, por volta de 500 nm, ou seja, bem próxima da emissão das células o que dificulta a visualização

dos PQs de ZnO nas células por poder confundir o que é a emissão dos PQs e o que é referente à autofluorescência das células. Diferentes estratégias podem ser utilizadas para melhorar tanto a estabilidade em diferentes solventes e/ ou meio biológico quanto alterar as suas propriedades fotoluminescentes de modo a permitir a visualização dos PQs de ZnO em células.

Entre essas estratégias, já foram estudadas pelo nosso grupo de pesquisa diferentes modificações de superfície com organosilanos, permitindo a dispersão desses PQs em meios polares e apolares (RISSI; HAMMER; CHIAVACCI, 2017). Além disso, com o intuito de aumentar a estabilidade também foram realizadas associações com nanocarreadores, tais como micelas e lipossomas e nanocápsulas lipídicas (CHIAVACCI et al., 2019; MANAIA, 2016; MANAIA et al., 2015). Em relação às mudanças nas propriedades fotoluminescentes, foram avaliadas alterações na síntese empregada para a produção dos PQs de ZnO além da introdução de dopantes como magnésio (Mg) (MANAIA et al., 2015). Entretanto, ainda foi difícil a visualização em células.

Nesta tese diferentes estratégias foram utilizadas, tais como a associação de PQs de ZnO com gadolínio (Gd) e uma outra estratégia que consistiu na associação dos PQs de ZnO dopados com Gd com PQs que possuam maior estabilidade em diferente pH além de uma região de emissão mais favorável para obter imagens biológicas.

PQs baseados em cobre, índio e enxofre/sulfeto de zinco (CIS/ZnS), associados ou não a outras nanopartículas, estão sendo amplamente estudados para a produção de células solares (SCHEUNEMANN et al., 2015, 2016; SHEN et al., 2012). Além disso, as excelentes propriedades óticas dos PQs de CIS/ZnS foram demonstradas (GUO et al., 2013; XIA et al., 2018). Estes mesmos PQs, mas contendo gadolínio (GCIS/ZnS), mostraram boa estabilidade coloidal em diferentes pH e emissão próxima ao infravermelho. Ainda, foi possível a visualização de imagens de tumores de ratos (YANG et al., 2015). Dessa forma, a associação dos PQs de ZnOGd com GCIS/ZnS pode ser vantajosa.

Os PQs de ZnO e ZnOGd foram associados aos PQs GCIS/ZnS através de um tratamento térmico utilizando um protocolo mostrado por Donat e colaboradores (DONAT et al., 2017) com algumas modificações. Neste trabalho, e em outros, o ZnO foi associado com PQs de CIS/ZnS, mas para a produção de células solares. Não foram

demonstradas suas propriedades fotoluminescentes, principalmente associadas ao ZnO uma vez que este trabalho utilizou nanopartículas de ZnO que possuíam tamanhos maiores, não sendo mais uma nanopartícula luminescente. Além disso, o ponto quântico conjugado ZnO-CIS/ZnS não possui Gd nem outro metal que o torne um bom agente de contraste por ressonância magnética.

Nesta pesquisa, foram realizadas duas estratégias de associação dos PQs: os PQs foram associados às nanomontagens de arginina com ferrocifeno (Argn-p54) e também às nanocápsulas lipídicas (NCL).

A conjugação de medicamentos com diferentes peptídeos é uma área emergente. No entanto conjugados anfifílicos com potencial biológico não são muito estudados (CARRILLO-CARRION et al., 2018; MIKLÁN et al., 2007). Embora o ferrocifeno tenha propriedade anticâncer, seu alto caráter hidrofóbico requer uma estratégia de carreamento adequado para a administração in vivo. Assim, Wang e colaboradores 2014 propuseram o uso de peptídeos penetrantes como a poliarginina (Argn) para formular sistemas pró-fármacos conjugados com ingredientes ativos hidrofóbicos, visando espontaneamente, produzir nanomontagens em água (WANG et al., 2014). As automontagens de Argn-p54 foram tema de tese de doutorado, que estava em andamento no período em que foi realizado o projeto BEPE, no laboratório MINT (GUYON et al., 2019; GUYON; LEPELTIER; PASSIRANI, 2018).

As NCL são uma classe de material promissor, sendo o grupo MINT, onde foram realizadas essa associação, um grupo de referência no desenvolvimento desse material. As NCL são formadas por um núcleo oleoso líquido à temperatura ambiente contendo triglicerídeos rodeado por uma membrana sólida, formada pela mistura de lecitina e tensoativos não iônicos derivados do polietilenoglicol (HUYNH et al., 2009). As NCL já foram utilizadas para encapsular diferentes fármacos anticancerígenos tal como o paclitaxel (LOLLO et al., 2015) e ferroceno (RESNIER et al., 2017). Recentemente, patentes estabeleceram métodos para otimizar o uso de NCL (ANTON; SAULNIER; BENOIT, 2016). As NCL também podem ser conjugadas com diferentes radionuclídeos, permitindo sua aplicação em imagem e radioterapia (LOLLO et al., 2015).

O presente trabalho utilizou diferentes estratégias para o desenvolvimento de PQs com potencial de imagens tanto por luminescência quanto para ressonância magnética. Além disso, a associação de PQs de ZnO e ZnO dopados com Gd com PQs de GCIS/ZnS para estudos em relação as mudanças nas propriedades luminescentes não

foi relatado na literatura, sendo essa associação também uma estratégia para o aumento da estabilidade luminescente dos PQs de ZnO. Além dessa estratégia foram realizadas a associação desses PQs conjugados com nanocarreadores, tais como as NCL e automontagens de Arg-p54, objetivando o desenvolvimento de um sistema capaz de diagnosticar através de imagens de ressonância magnética e luminescência além de futuramente ter a possibilidade de carrear um fármaco, dando origem a um sistema teranóstico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Técnicas de diagnóstico por imagens

Desde a descoberta da potencialidade dos raios X por Röntgen em 1896, as técnicas de imagens vem sendo potencializadas (Röntgen, 1986). Diferentes técnicas podem ser utilizadas, sendo que a mais adequada deve representar um conjunto de características que dependerá da capacidade de penetração, da sensibilidade requerida e da resolução espacial. Entre as técnicas de imagens mais utilizadas podem ser citadas a tomografia computadorizada por raios X, tomografia por emissão de pósitrons, Tomografia opto acústica multiespectral, ressonância magnética ou imagem óptica (AWAN et al., 2021; LACROIX et al., 2013; LV et al., 2016).

Entre todas essas modalidades de imagens, as imagens por fluorescência são muito exploradas na pesquisa pré-clínica, pois apresenta baixo custo e necessita de pouco tempo para a aquisição das imagens. Já para as imagens in vivo, apresenta baixa resolução espacial e profundidade de penetração. Apesar disso, as imagens por fluorescência ainda despertam muito interesse para o rastreamento de moléculas e obtenção de imagens de constituintes celulares devido sua alta sensibilidade. Dessa forma, as imagens por fluorescência permitem a detecção do comportamento dos nanocarreadores in vitro (LV et al., 2016)

A ressonância magnética é uma das técnicas de imagens mais utilizadas nos últimos anos pois é capaz de fornecer imagens com grande resolução e alta capacidade de penetração nos tecidos moles, fornecendo detalhes anatômicos devido ao bom contraste e imagens tridimensionais de alta qualidade (CAI et al., 2020). Hernández et al., 2021 utilizaram as imagens de ressonância magnética para avaliar se objetos achados em mamografias e/ou ultrassonografias poderiam ser malignos. Os resultados mostraram

resolução de problemas para esclarecer achados indeterminados no rastreio do câncer de mama, evitando biópsias desnecessárias (HERNÁNDEZ et al., 2021).

Uma desvantagem é que as imagens de ressonância magnética possuem sensibilidade reduzida quando comparada a outros métodos pois detecta apenas objetos com micrometros de tamanho. Por outro lado, as imagens óticas são capazes de fornecer muito mais sensibilidade e potencial de imagens em tempo real, mas com limitada percepção de profundidade o que restringe sua aplicação apenas em superfície ou próximo à superfície. Estas características complementares elevadas entre elas permitem que as suas respectivas limitações sejam eficazmente superadas através da integração de ressonância magnética e imagem ótica funcionalizada em uma única nanoestrutura (LIU et al., 2011b).

O desenvolvimento de nano estruturas capazes de integrar essas duas técnicas é uma inovação que promove vantagens em termo de diagnóstico médico e imagens moleculares (LIU et al., 2011). Portanto, nos últimos anos, há o aumento do interesse no desenvolvimento de nanopartículas capazes de fornecer funções magnéticas e luminescentes objetivando a obtenção de imagens in vivo em tempo real com alta sensibilidade e capacidade de penetração nos tecidos (LACROIX et al., 2013).

2.1.1. Princípios da ressonância magnética

A ressonância magnética é uma técnica baseada na detecção de moléculas que possuam um núcleo com propriedade de rotação nuclear (CASSIDY; RADDA, 2005).

Na clínica, o princípio da ressonância magnética baseia-se na rotação nuclear dos prótons da água em um forte campo magnético, que em hospitais pode ser de 1,5 a 3,0 T e em laboratórios 9T ou mais. No campo magnético estático (B_0), esquematizado na figura 1, a rotação tende a alinhar-se de forma paralela ou antiparalela (figura 1-A) e processam na frequência de Larmor ω_0 , no qual a rotação será proporcional à intensidade do campo. Uma vez magnetizados pelo campo estático, os prótons podem ser excitados através de um campo pulsado perpendicular B_1 . Este campo girará em torno do eixo B_0 , ou seja, na radiofrequência (RF), levando a uma magnetização M_{xy} que é perpendicular a B_0 (figura 1-B). Após a remoção do campo de radiofrequência, as rotações tendem a se realinhar com B_0 . Esse realinhamento da origem a um relaxamento longitudinal em que

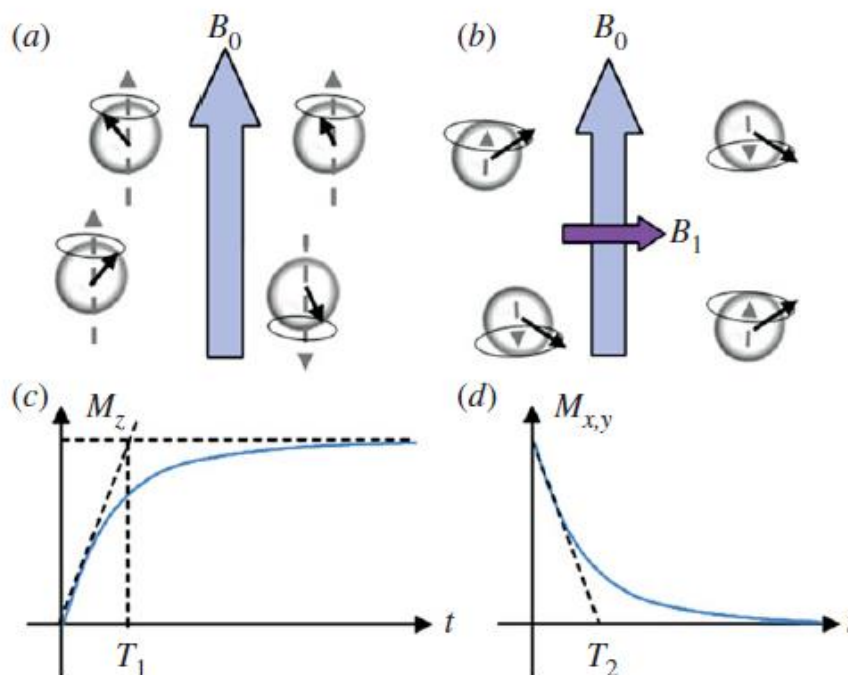
o M_z aumenta de acordo com o aumento do exponencial do tempo T_1 (figura 1-C) e um relaxamento transversal onde há o decaimento da exponencial do tempo T_2 (figura 1-D) (LACROIX et al., 2013).

As imagens são adquiridas enquanto os prótons voltam para o seu estado de equilíbrio, ou seja, do estado de energia mais alto para o mais baixo. O contraste obtido será baseado na diferença das taxas de relaxação (r)- Equação 1 (LACROIX et al., 2013).

$$r_1 = 1/T_1 \text{ ou } r_2 = 1/T_2. \quad (\text{Equação 1})$$

Na prática, há obtenção de imagens de contraste positivo e/ou negativo. A taxa de relaxação dependerá de vários fatores como a natureza do agente de contraste, o número de rotações, intensidade do campo, temperatura e acessibilidade dos prótons (LACROIX et al., 2013).

Figura 1. Esquema da rotação do próton da água um campo magnético estático B_0 (a) e na excitação por radiofrequência B_1 (b). A seta tracejada representa o componente M_z (c) e o círculo sólido representa o componente $M_{x,y}$ (d). Evolução em função do tempo de M_z (c) e (d) $M_{x,y}$ (d) com, respectivamente, T_1 e T_2 como constantes de tempo derivadas da inclinação inicial (linhas tracejadas) (LACROIX et al., 2013) .



Os tempos de relaxamento T1 e T2 dependem do tecido, sendo que os diferentes órgãos geram sinais diferentes, causando contraste nas imagens de ressonância magnética (PAYSEN et al., 2019). As células tumorais possuem diferentes constantes de relaxamento em comparação aos tecidos saudáveis, o que já pode causar um contraste nas imagens de ressonância magnética. Entretanto, as imagens de tumores ainda podem exigir uma melhoria no sinal/ruído. Ainda, se houver pequenas diferenças entre os tempos de relaxamento de tecidos saudáveis e lesões, o contraste inerente da ressonância magnética será inadequado, levando a baixa sensibilidade. Por esses motivos é necessário a melhoria do contraste, que é alcançada por meio da introdução de agentes de contrastes adequados que afetam os processos de relaxamento (BAKHTIARI-ASL et al., 2020; LACROIX et al., 2013).

Os agentes de contraste T1 aumentam a taxa de troca de energia entre o sistema de rotação nuclear e o reservatório térmico e, portanto, reduzem T1 e aumentam o número de rotações que podem absorver energia do próximo pulso de RF. Assim, os agentes de contraste T1 produzem um contraste positivo do sinal nas imagens de ressonância magnética. Os agentes de contraste T2 aumentam a taxa de perda de energia no sistema de rotação nuclear o que leva a perturbações no campo magnético, reduzindo T2 e diminuindo a intensidade do sinal local. Assim, os agentes de contraste T2 produzem um contraste negativo do sinal nas imagens ponderadas em T2 (CASSIDY; RADDA, 2005).

O contraste negativo ocasionado pela diminuição do tempo de relaxamento transversal T2 pode ser visualizado como “pontos negros” nas imagens de ressonância magnética (PAYSEN et al., 2019). Já o contraste positivo leva a um brilho na região de acumulação, sendo relacionados ao relaxamento longitudinal T1 (BAKHTIARI-ASL et al., 2020).

A capacidade de um agente de contraste de ressonância magnética de alterar o relaxamento é conhecido como relaxividade ou taxa de relaxação conforme descrito na equação 1. Dessa forma, quanto maior o relaxamento, maior a capacidade de contraste, pois menor será o T1 ou T2 (BAKHTIARI-ASL et al., 2020).

A categoria dos agentes de contraste T1 baseiam-se principalmente em íons paramagnéticos, em sua maioria gadolínio, que já é usado na clínica, e em um menor número manganês. Já os agentes de contraste T2 são baseados em partículas magnéticas

como as nanopartículas de óxido de ferro, maghemita ou magnetita e também o gadolínio (BAKHTIARI-ASL et al., 2020; CAI et al., 2020; LACROIX et al., 2013).

A quantificação dessas nanopartículas magnéticas também pode ser alcançada pela ressonância magnética, uma vez que a diminuição de T2 é inversamente proporcional à quantidade de nanopartículas (PAYSEN et al., 2019). Nesse sentido, também é possível determinar a quantidade de íons paramagnéticos, pois a diminuição de T1 é proporcional à quantidade de íons.

2.2. Espectroscopia de fluorescência

A luminescência é um processo pelo qual ocorre a emissão de luz de qualquer substância a partir de estados eletronicamente excitados. Quando as moléculas são irradiadas utilizando fonte de irradiação na frequência adequada, os elétrons do estado fundamental são excitados, absorvendo energia, e saem do estado fundamental passando para o estado vibracional excitado. Este estado é instável fazendo com que as moléculas voltem para seu estado fundamental, emitindo um fóton, sendo que este fóton possui a energia fluorescente (PAVONI et al., 2014).

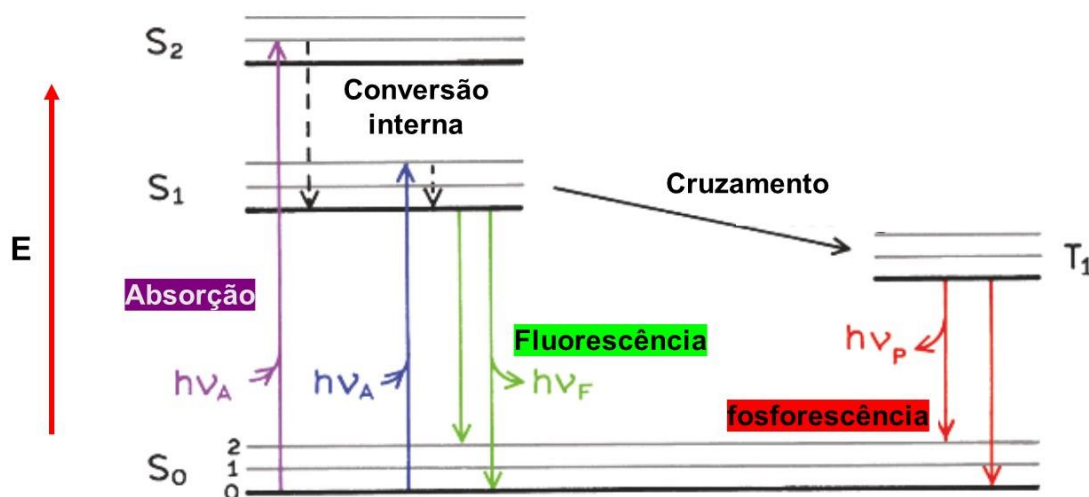
Na fluorescência, nos estados singletos excitados, o elétron no orbital excitado é emparelhado (por spin oposto) ao segundo elétron no orbital do estado fundamental. Consequentemente, o retorno ao estado fundamental ocorre rapidamente (da ordem de 10^{-9} s) com a emissão de um fóton (LAKOWICZ, 2006).

A técnica de espectroscopia de fluorescência tem grande interesse científico devido suas diferentes aplicações. Essa técnica pode ser aplicada para substâncias que absorvem e emitem radiação na faixa do ultravioleta ao visível. Os espectrofotômetros podem apresentar diferentes componentes, mas geralmente consistem em um monocromador, uma fonte de irradiação e um detector (PAVONI et al., 2014). O espectro de fluorescência é apresentado geralmente analisando as intensidades emitidas em diferentes (plot intensidade versus comprimento de onda em nanômetros). A espectroscopia de fluorescência é uma técnica muito usada para a detecção de biomoléculas e biossensores óticos. Essa metodologia possui alta sensibilidade para a detecção de fluorescência (CAMARCA et al., 2021).

O professor Alexander Jablonski é considerado o pai da espectroscopia por seus esforços que culminaram na ilustração, através de um diagrama, dos processos que

ocorrem entre a absorção e a emissão de moléculas orgânicas (figura 2). (PETER TC SO, 2002). Basicamente, esse diagrama mostra que após a absorção da luz, diferentes processos podem acontecer. Geralmente a excitação acontece para um nível vibracional superior S1 ou S2. O processo de relaxação para o nível vibracional mais baixo de S1 é chamado de conversão interna, ocorrendo em 10^{-12} s ou menos. Os tempos de vida de fluorescência são baixos (10^{-8} s), ou seja, essa conversão é concluída antes da emissão. Dessa forma, a emissão da fluorescência geralmente é resultado de um estado de excitação termicamente equilibrado, ou seja, a menor energia vibracional do S1. As moléculas no estado S1 podem sofrer um decaimento para o estado tripleto, sendo a emissão T1 denominada fosforescência. A conversão de S1 em T1 é chamada de cruzamento intersistema (HILARIO, 2018; LAKOWICZ, 2006).

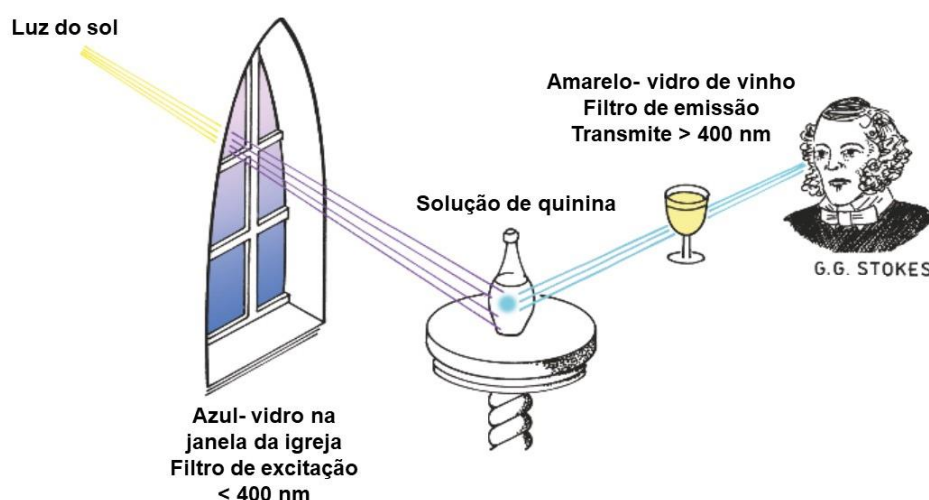
Figura 2. Diagrama de Jablonski. E mostra a escala de energia. S0 é o estado singlete, S1 e S2 representam o estado singlete excitado com energia sucessiva mais alta. T1 é o estado tripleto. 1, 2 e 3 são os diferentes níveis de energia vibracional. Figura adaptada do artigo “Fluorescence Spectroscopy” (PETER TC SO, 2002).



Em 1852, G. G Stokes observou pela primeira vez que a energia da emissão é normalmente menor que a absorção. Dessa forma, a fluorescência é observada em comprimento de ondas maiores ou em energias mais baixas. Essa perda de energia entre os fótons absorvidos e emitidos é chamada de deslocamento de Stokes (CAMARCA et al., 2021). O experimento realizado utilizou uma fonte de luz ultravioleta, que passava

por uma janela de vidro com um filtro azul, que transmitiu luz abaixo de 400 nm. Com a finalidade de evitar o detector (olho) foi colocado um outro filtro, nesse caso um copo amarelo com vinho. Dessa forma, a fluorescência do quinino foi observada perto de 450 nm, ou seja, no visível, tendo uma coloração azul (LAKOWICZ, 2006). A figura 3 mostra o experimento realizado por Stokes.

Figura 3. Esquema experimental para detecção do deslocamento de Stokes. Adaptada de (LAKOWICZ, 2006)



2.3. Pontos quânticos

Pontos quânticos (PQs), ou “*quantum dots*” são nanopartículas geralmente compostos de materiais semicondutores que possuem seu tamanho 2 vezes menores que o raio de Bohr dos éxcitons do material que os constitui (bulk). Possuem todas as três dimensões confinadas em uma escala de 1 a 10 nm. Essa propriedade de confinamento quântico é responsável por originar propriedades distintas do seu material bulk, fornecendo ampla gama de novas aplicações (ALMEIDA, 2013; MURPHY, 2002). A primeira descrição desse material aconteceu em 1981 por Ekimov e Onushchenko (EKIMOV; ONUSHCHENKO, 1981) que abordaram a propriedade de absorção ótica de pequenos cristais de CuCl em matriz vítrea e logo em seguida em 1982 por Rossetti e Brus (ROSSETTI; BRUS, 1982) que mencionaram os PQs em meio coloidal. No entanto, o termo quantum dots foi usado pela primeira vez em 1988 por Reed e colaboradores (REED et al., 1988).

Os PQs de semicondutores com tamanhos abaixo de 10 nm são sintetizados principalmente a partir dos elementos dos grupos II-VI ou III-V da tabela periódica (MOLAEI, 2019).

Os PQs são denominados como “átomos artificiais” porque possuem o mesmo comportamento dos átomos em que os elétrons estão confinados a estados quantizados com energias discretas, sendo a diferença entre o átomo e os PQs é que os PQs possuem centenas ou milhares de átomos com forma, tamanho e energia diferentes (KANDI; MARTHA; PARIDA, 2017).

Nos PQs todas as dimensões estão abaixo de um determinado tamanho crítico (MOLAEI, 2019). O ponto quântico é considerado de dimensão zero e é nomeado como “ponto” porque o movimento de elétrons, buracos e éxcitons é restrito em todas as três dimensões. Como resultado, um sistema dimensional quase zero é formado. A palavra “quântico” está incluída em seu nome porque uma propriedade dela se assemelha à partícula mecânica quântica em uma caixa em que a energia está inversamente relacionada ao tamanho da caixa (KANDI; MARTHA; PARIDA, 2017).

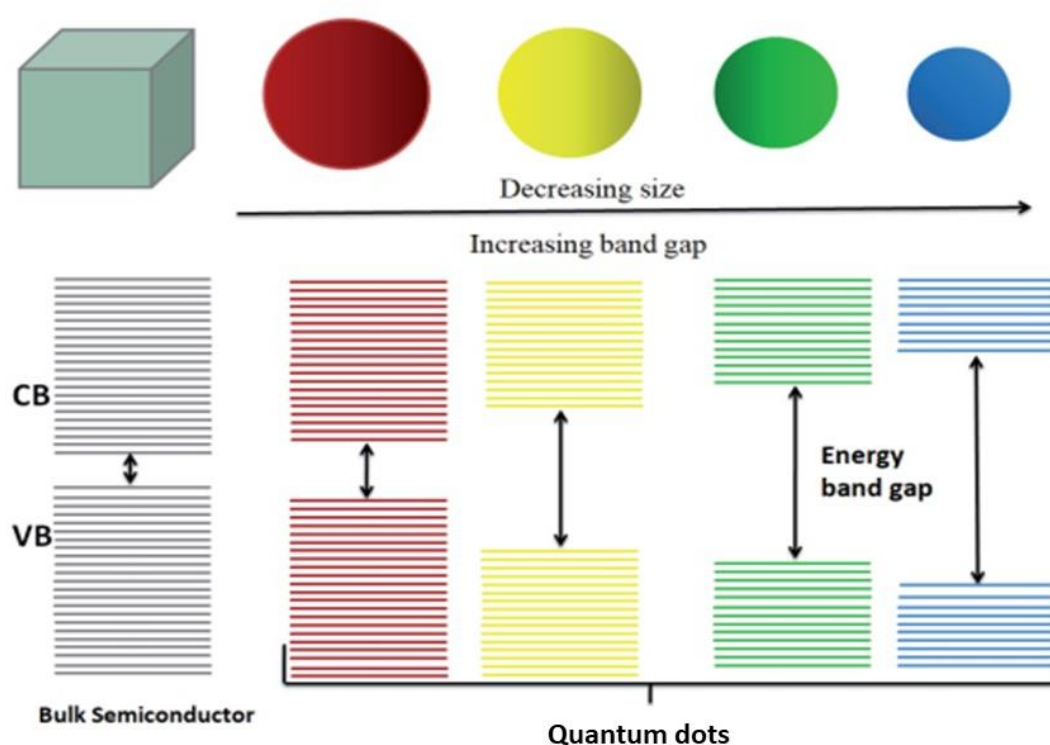
Para entender melhor essas propriedades do confinamento quântico, e como uma partícula semicondutora desse tamanho é interessante, primeiramente é necessário elucidar algumas propriedades. Os PQs possuem uma estrutura eletrônica que com uma banda de valência (BV) preenchida por elétrons e uma banda de condução (BC) vazia, que são separadas por uma lacuna de energia, em inglês termo conhecido como “*band gap*” (Eg). Quando há uma irradiação de fótons de energia maior que o band gap, elétrons são excitados e saem da BV e passam para a BC e dessa forma, há a formação de um buraco com carga oposta na BV. Como resultado, há a interação do elétron e o buraco, formando o éxciton e levando a emissão de um fóton com comprimento de onda determinado pelas dimensões das nanopartículas (DA SILVA et al., 2019; ISNAENI et al., 2011). Nesse sentido seguindo o princípio previamente descrito de uma partícula mecânica em uma caixa, a energia do band gap dos PQs aumenta à medida que o tamanho dos PQs diminui, ou seja, o band gap é dependente do tamanho, sendo este um dos efeitos mais interessantes das estruturas semicondutoras de baixa dimensão (BASKOUTAS; TERZIS, 2006).

Essas propriedades foram descritas por Brus e Efros que, em meados de 1980 observaram que nanocristais de semicondutores em sistemas coloidais de diferentes

tamanhos emitiam diferentes cores, propriedade oriunda do confinamento quântico (BRUS, 1986, 1983), conforme demonstrado na figura 4. Dessa forma, maior energia é necessária para excitar cristais menores. Com isso, é possível modular as propriedades óticas por meio do controle do tamanho dos PQs. Tanto os espectros de absorção quanto de emissão dos PQs sofrem um deslocamento para o azul conforme decresce o tamanho dos PQs (MANAIA et al., 2015).

Além do mecanismo de luminescência supracitado, há a possibilidade de formação de defeitos na estrutura cristalina dos PQs. Como consequência, o elétron excitado pode no lugar de emitir um fóton com energia do band gap, decair via fônons para um estado de superfície. Dessa forma, esse elétron fica aprisionado por um tempo, causando um “desligamento” dos PQs, que é responsável pela ineficiência da emissão (ALMEIDA, 2013).

Figura 4. Diagrama esquemático mostrando a relação inversamente proporcional entre o band gap e o tamanho dos PQs. Adaptada do artigo “Quantum Confinement Effect of 2D Nanomaterials” (RAMALINGAM et al., 2020).



2.3.1. Pontos quânticos e seu uso em imagens

Conforme descrito anteriormente, os PQs possuem propriedades que os tornam interessantes para explorar diferentes tipos de aplicações. O uso dos PQs para obter imagens por fluorescência torna-se vantajoso pois estes possuem propriedades óticas únicas, como a emissão de luz dependente de sua dimensão, um pico de emissão simétrico e estreito e amplo espectro de absorção. Essas propriedades permitem que diferentes comprimentos de onda de fluorescência sejam excitados simultaneamente, ou seja, há a possibilidade de emissão simultânea de várias cores para um único comprimento de onda de excitação (DAZZAZI et al., 2013).

Devido a possibilidade de controle do tamanho e da composição química dos PQs, há como ajustar a emissão de fluorescência da região do UV ao infravermelho próximo (NIR), sendo que a possibilidade de fixar o comprimento de onda dos PQs na região do NIR é uma característica altamente importante para obter imagens biológicas (MANAIA et al., 2015; SCHROEDER et al., 2007; WANG; GAO; SU, 2010). Além disso, é possível acompanhar a biodistribuição de fármacos com o uso de PQs (FRIELER et al., 2021).

Ao contrário dos fluoróforos orgânicos, os PQs tem maior resistência ao fotobranqueamento, apresentando longo tempo de vida da luminescência mesmo após exposto ao ar, além de poderem atingir rendimento quântico de fluorescência que pode chegar a 85% (PAPAGIANNAROS et al., 2009; ZHANG; XIONG, 2015)

Os PQs apresentam estabilidade em um longo período com preservação da característica luminescente, o que é importante para o uso clínico. Essa característica foi demonstrada por diferentes grupos de pesquisa. Shoroeder e colaboradores 2007 mostraram que mesmo após um ano de preparação, os PQs continuaram estáveis, no entanto, houve diminuição da luminescência. Já Papagiannaros e colaboradores 2009 observaram diminuição da luminescência de PQs de selenito de cádmio (CdSe) quando incorporados em micelas. Nessas duas pesquisas foi possível demonstrar claramente imagens de tumores (PAPAGIANNAROS et al., 2009; SCHROEDER et al., 2007).

É possível ainda, conjugar os PQs com outras técnicas de diagnóstico, desenvolvendo sistemas multimodais, capazes de diagnosticar por diferentes técnicas, como é o caso de PQs dopados com agentes de contraste para ressonância magnética (LIU et al., 2011b). A alta sensibilidade e o seu amplo espectro de excitação também

tornam os PQs materiais interessantes na determinação de genótipos, cirurgia guiada por imagens e como diagnóstico molecular (JACKSON; PATANI; EKPA, 2017). Além disso, é possível desenvolver sistemas teranósticos com o uso de PQs, pois estes podem ser conjugados com nanocarreadores e fármacos, desenvolvendo dessa forma sistemas com propriedades de diagnóstico e terapêutico em uma única nanoestrutura (HO; LEONG, 2010). Dessa forma, PQs já foram conjugados com lipossomas (MUTHU et al., 2012; WEN et al., 2012) e outras múltiplas modalidades funcionais como um ligante alvo (peptídeo, anticorpo ou proteína) e agentes terapêutico (HO; LEONG, 2010; HUANG et al., 2017).

2.3.1.1. PQs de CIS/ZnS

Recentemente, PQs com multicomponentes baseados em cobre são amplamente estudados devido às suas propriedades únicas que levam a uma grande gama de aplicação (ADEL et al., 2021; LI et al., 2021; MAO et al., 2021). Quando comparados aos PQs baseados em cádmio mostram vantagens devido ao impacto ambiental reduzido pela ausência de metais pesados e dessa forma se adequam melhor para as aplicações biológicas. Ainda, os PQs baseados em cobre mostram maior capacidade de absorção e emissão. Essa melhora de performance deve-se ao fato de que suas propriedades óticas não são oriundas apenas do band gap dependente do tamanho, mas também da razão estequiométrica. Em outras palavras, isso significa que através da variação da proporção dos cátions que os constituem é possível que as propriedades óticas sejam sintonizadas de acordo com a aplicação almejada. Os PQs baseados em cobre ainda possuem uma grande estabilidade contra o ambiente externo (oxigênio, umidade e foto-radiação), que é aprimorada com o revestimento de uma casca de ZnS (BAI; PURCELL-MILTON; GUN'KO, 2019; LONG et al., 2021).

Nanocristais semicondutores I-III-VI, como CuInS₂ (CIS) possuem um band gap semelhante aos PQs convencionais II-IV, exibindo uma emissão ajustável do visível até o infravermelho próximo. São uma alternativa promissora em relação aos pontos quânticos baseados em cádmio devido à sua menor toxicidade, longa vida útil e alto deslocamento de Stokes. Além disso, o comprimento de onda de excitação pode se estender para um comprimento de onda mais longo na região do visível. Essas

propriedades conferem um potencial significativo para obter imagens *in vivo* além de outras aplicações (JIAO et al., 2020; XIA et al., 2021).

O crescente interesse em pesquisar esses nanomateriais ternários é devido ao seu mérito de propriedades ajustáveis e diversas aplicações nos campos biomédico e energético (JIAO et al., 2020). Dessa forma, PQs de CIS/ZnS associados ou não a outras nanopartículas, estão sendo amplamente estudados para a produção de células solares (SCHEUNEMANN et al., 2015, 2016; SHEN et al., 2012) e para a degradação de solventes orgânicos (FAKHRI; MAHJOUB; KHAVAR, 2014). Além disso, as excelentes propriedades óticas dos PQs de CIS/ZnS foram demonstradas (GUO et al., 2013; XIA et al., 2018). Estes mesmos PQs, mas contendo gadolínio (GCIS/ZnS) para conferir contraste nas imagens de ressonância magnética, mostraram boa estabilidade coloidal em diferentes pH e emissão próxima ao infravermelho. Ainda, foi possível a visualização de imagens de tumores de ratos (YANG et al., 2015).

Lv e colaboradores (2016) exploraram o uso dos PQs de CIS/ZnS como “tudo em um” uma vez que demonstraram a capacidade desses PQs em imagens de fluorescência na geração de imagens de Tomografia optoacústica multiespectral (MSOT) além de propriedades terapêuticas. Esses PQs foram associados ao PEG2000-DSPE dando origem a nanossistemas de diferentes tamanhos. Os pesquisadores verificaram que os nanossistemas contendo CIS/ZnS possuíam efeitos fototérmicos (PTT) e fotodinâmicos (PDT) simultâneos com uma única irradiação a laser de 660 nm, resultando em eficácia da fototerapia sinérgica contra tumores. Além disso, foi possível a geração de imagens MSOT permitindo a visualização de tumores e a distribuição *in vivo* do nanossistema no tumor. A capacidade dos PQs de CIS/ZnS para mediar a ablação de tumor por meio da fotoindução foi intensamente explorada (LV et al., 2016).

2.3.1.2. Pontos quânticos de ZnO

O ZnO é um dos óxidos metálicos mais estudados, pois possui uma variedade de propriedades que o destaca. A diminuição no tamanho das partículas do ZnO causa alterações nas propriedades elétricas, óticas e químicas, devido ao confinamento quântico, o que possibilita uma série de novas aplicações. Além disso, o ZnO tem maiores vantagens porque possui a maior eficiência fotocatalítica entre todos os materiais

fotocatalíticos inorgânicos e é mais biocompatível, além de ter maior durabilidade e resistência ao aquecimento (BUŞILĂ et al., 2015; SILVA et al., 2019; SIRELKHATIM et al., 2015)

As nanopartículas de ZnO são aprovadas pelo Food and Drug Administration (FDA) como um excipiente farmacêutico e são muito utilizadas em formulações farmacêuticas e em cosméticos devido sua estabilidade, biocompatibilidade e segurança (MUKHTAR et al., 2020; THAKUR; POOJARY; SWAIN, 2021). Com o desenvolvimento da nanotecnologia, é possível melhorar as propriedades dos materiais pelo aumento da superfície de contato ocasionada pela redução do tamanho da partícula, sendo possível também manipular a morfologia do material (BANDEIRA et al., 2020).

O grande uso dos PQs de ZnO atualmente deve-se à sua multifuncionalidade, pois possui propriedades semicondutoras, piezelétricas e óticas únicas. Além disso, as terminais hidroxilas do ZnO permitem a funcionalização da superfície com diferentes moléculas, originando sistemas multifuncionais (HONG et al., 2011). Ainda, há a possibilidade de funcionalização da superfície, que pode fornecer novas propriedades químicas ou alterar as já conhecidas e permitir que agentes marcadores sejam fixados, o que é muito importante para a aplicação biomédica (WOŹNIAK et al., 2017). Além disso, é possível variar suas propriedades de fotoluminescência através do ajuste de sua morfologia (tamanho e forma) usando rotas fáceis de síntese química suave (CAETANO et al., 2016a).

É crescente o número de pesquisas que mostram a utilização dos PQs de ZnO para aplicação em diagnóstico por imagens, pois estes possuem excelentes propriedades luminescentes e baixa toxicidade e não tão caro quando comparado à outros PQs, como os à base de cádmio e pode ser utilizado para diversas aplicações (GULIA; KAKKAR, 2013; XIAO et al., 2011), tais como: obtenção de imagens, agentes antimicrobianos, despoluentes, fotocatalise, produção de células solares, entre outras (CAETANO et al., 2016a; DA SILVA et al., 2019; JIAO et al., 2019; MISHRA et al., 2019).

Os PQs de ZnO apresentam um alto band gap de 3,4 eV e energia de ligação de 60 meV, levando a propriedades elétricas e ópticas peculiares (CAETANO et al., 2016a; SILVA et al., 2019). A emissão típica do éxciton (elétrons gerados que recombina com os buracos na banda de valência) dos PQs de ZnO é na faixa no UV. Além dessa emissão uma luminescência no visível em torno de 500 nm pode ser observada. Entretanto, a

origem da luminescência no visível é um mecanismo ainda não tão bem compreendido pela sua complexidade e controvérsia (MANAIA, 2016). Várias hipóteses tem sido propostas para explicar o mecanismo de luminescência no visível, que são dependentes da presença de defeitos na estrutura cristalina do ZnO, tais como vacâncias de oxigênio, vacâncias de zinco, oxigênio e zinco intersticial. Ainda, pode estar relacionada a porções contendo oxigênio na superfície, como grupos OH (ZHANG et al., 2010). Dessa forma, a intensidade de emissão de fotoluminescência esta relacionada tanto com o tamanho das partículas quanto à quantidade de defeitos na estrutura cristalina (RISSI; HAMMER; CHIAVACCI, 2017).

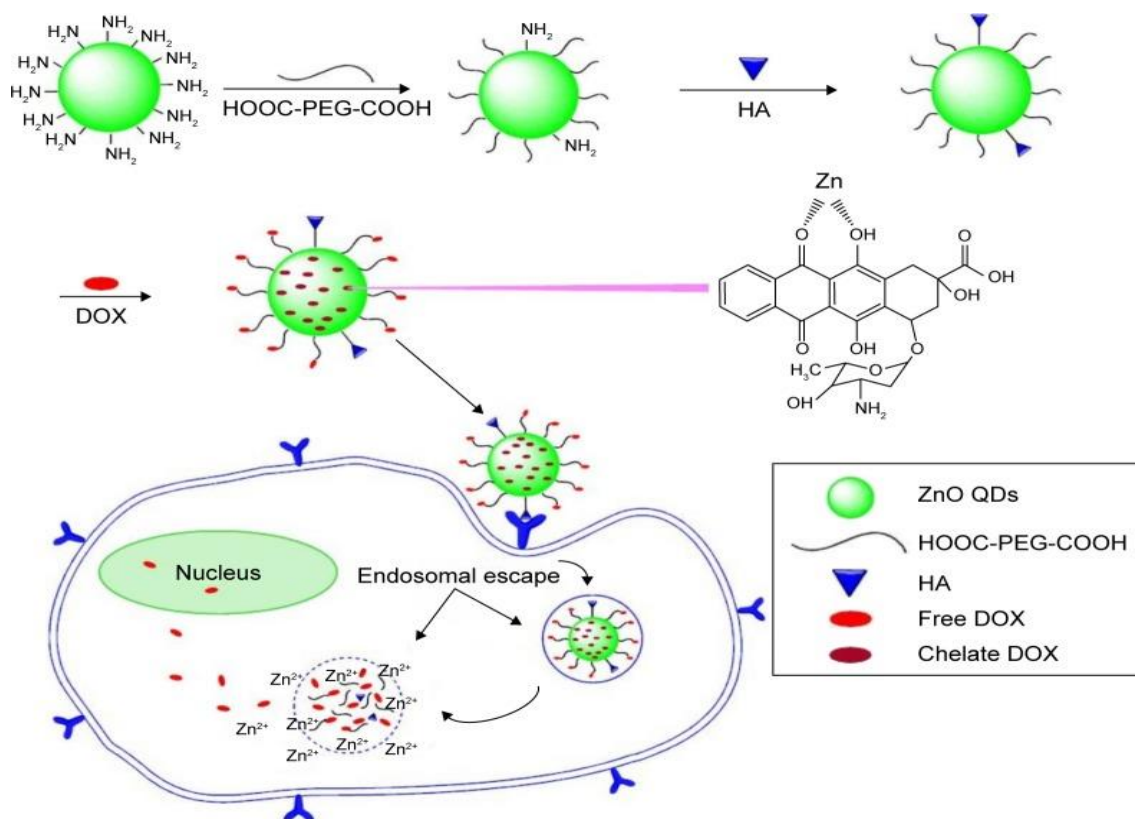
Os defeitos podem ser responsáveis por criar níveis intermediários de energia no band gap e isso interfere na fluorescência emitida. (BERBEL MANAIA et al., 2018; RISSI, 2016). Os defeitos de superfície de PQs podem atuar como armadilhas para os elétrons ou buracos, dificultando sua recombinação. A recombinação não radiativa de um par de elétron-buraco (éxcitons) resulta em um “piscar” da luminescência, diminuindo o rendimento quântico de fluorescência (ISNAENI et al., 2011).

O processo de síntese dos PQs de ZnO pode afetar no tamanho e na quantidade de defeitos, portanto pode alterar suas características luminescentes. Entre as formas de síntese dos PQs de ZnO, o processo sol-gel possui destaque pois pode ser conduzido às temperaturas amenas e ser escalonado industrialmente (HIRATSUKA; SANTILLI; PULCINELLI, 1995). Além disso, é possível acompanhar as etapas de formação e crescimento dos PQs, o que permite o controle do seu tamanho (CAETANO et al., 2016a; TOKUMOTO et al., 1999, 2003). A síntese sol-gel da origem a PQs com baixa emissão na região do UV e alta emissão no visível, o que é mais favorável para obter imagens biológicas (MANAIA, 2016)

A síntese sol-gel atingiu grandes proporções para a produção de nanopartículas de ZnO com Spanhel e Anderson em 1991. Essa rota de síntese, é capaz de produzir partículas de 2-6 nm e envolve basicamente três etapas. A primeira consiste na preparação de um precursor organometálico, formando um produto higroscópico. A segunda etapa envolve a adição de uma base ou água ao precursor, promovendo a etapa de hidrólise, formando uma suspensão coloidal e por último, há a formação do sol por meio da concentração da suspensão coloidal (SPANHEL; ANDERSON, 1991).

Em relação ao uso dos PQs de ZnO para o diagnóstico por imagens e tratamento, diferentes pesquisas já mostraram resultados promissores com o uso dos PQs de ZnO. Cai et al realizaram a conjugação de PQs de ZnO com doxorubicina (DOX), onde foi demonstrado a internalização celular em células cancerígenas e a liberação do fármaco dependente do pH, como demonstrado na figura 5. Para isso, os PQs de ZnO foram funcionalizados com PEG e ácido hialurônico (HA) para direcionar a glicoproteína CD44 superexpressada em células cancerígenas e DOX. Esta plataforma de entrega de fármacos para liberação intracelular controlada poderia liberar carga útil de DOX sob as condições intracelulares ácidas (CAI et al., 2016, 2017).

Figura 5. Funcionalização de PQs de ZnO com DOX para a liberação intracelular de DOX em pH ácido. Extraída do artigo “pH-Sensitive ZnO quantum dots–doxorubicin nanoparticles for lung cancer targeted drug delivery” (CAI et al., 2016).



Abreviações: DOX, doxorubicina; HA, ácido hialurônico; PEG, poli (etilenoglicol); QDs, pontos quânticos.

Com objetivo de desenvolver em uma única nanoestrutura sistemas capazes fornecer propriedades de diagnóstico por imagens de ressonância magnética e

luminescência, diferentes pesquisas associam os PQs de ZnO com agentes capazes de fornecer contraste para a ressonância magnética (BABAYEVSKA et al., 2017; LIU et al., 2011b; WOŹNIAK et al., 2017).

Liu e colaboradores 2011 desenvolveram PQs de ZnO dopados com gadolínio para ressonância magnética e imagens óticas. Sendo que os PQs de ZnO dopados apresentaram aumento da luminescência, possibilitando marcar com sucesso e em pouco tempo células cancerígenas. Não foram apresentados resultados conclusivos sobre a estrutura dos PQs nem sobre a sua eficiência no uso em técnicas de diagnóstico in vivo (Liu et al., 2011).

Já Woźniak e colaboradores 2017 avaliaram as propriedades luminescentes e magnéticas de nanopartículas de ZnO@Gd₂O₃ com estrutura core/shell, sendo que as análises físico-químicas mostraram excelente aplicabilidade do material para contraste em ressonância magnética bem como para obter imagens por fluorescência (também observado em células cancerígenas). As nanopartículas apresentaram biocompatibilidade e a conjugação destas com a doxirrubicina resultou em eficiência na liberação direcionada do fármaco (WOŹNIAK et al., 2017).

PQs de ZnO dopados com íons de ferro associados ao fucoidan foram desenvolvidos por Nguyen e colaboradores (2019) para a obtenção de imagens in vivo de ressonância magnética e imagens de fluorescência ex vivo de arterotrombose. A ressonância magnética permitiu localização de áreas doentes e subsequente imageamento por fluorescência de trombo (NGUYEN et al., 2019).

Embora o uso dos PQs de ZnO se justifique para a obtenção de imagens existem algumas desvantagens que precisam ser superadas. A primeira consiste na limitação do uso dos PQs de ZnO em meios biológicos oriundo de sua baixa estabilidade, que resulta em agregação e diminuição da luminescência. Além disso, pesquisas demonstram que os PQs de ZnO degradam rapidamente em pH ácido e perdem a luminescência, o que pode ser um problema para o diagnóstico por imagens, uma vez que algumas vias de internalização celular apresentam pH ácido e ainda há diferenças de pH nas diferentes organelas, sendo assim, alguns compartimentos intracelulares estão em meio ácido (CAI et al., 2017; HOU et al., 2017; LIU et al., 2017c). Uma outra desvantagem consiste na emissão de fotoluminescência, que é muito próxima da autofluorescência das células, que normalmente é entre 400 e 550 nm. Isso ocorre porque as células têm algumas organelas,

como lipossomos e componentes que produzem sinais fluorescentes (KHALID et al., 2019; MONICI, 2005). É importante também destacar que os PQs de ZnO só podem ser excitados na região do ultravioleta (SOWIK et al., 2019). Os PQs de ZnO tem outra limitação: sua intensidade de fotoluminescência diminui sob a lâmpada UV dependendo do tempo e a cor da luminescência pode mudar devido à agregação das partículas (LI et al., 2015a).

Considerando todas as vantagens em relação ao uso dos PQs de ZnO, mas objetivando superar as limitações supracitadas em relação uso dos PQs para imagens, diferentes pesquisas mostram alternativas desenvolver PQs a base de ZnO com propriedades otimizadas. Essas alternativas serão abordadas ao longo dessa revisão.

2.2.1.3. Conjugação de PQs de CIS/ZnS com nanopartículas de ZnO

O uso de ZnO como foto eletrodo possui uma limitação pois apenas pode absorver na região UV devido ao seu alto band gap, tornando difícil a excitação pela luz visível. Dessa forma, para aumentar essa janela de absorção, uma das estratégias, é associar ao ZnO outros PQs com menor band gap capazes de absorver na luz visível. Entre esses, os PQs I-III-IV vem sendo utilizados amplamente para o desenvolvimento de células solares, como o CuInS_2 (CIS) que possui elevado coeficiente de absorção e band gap de 1,5 eV que é compatível com a aplicação para células solares (FAKHRI; MAHJOUB; KHAVAR, 2014; LI et al., 2012) pois o band gap ótimo para luz solar é de cerca de 1,45 eV (SHEN et al., 2012).

Foi relatado que heterojunções baseadas em ZnO podem inibir a recombinação dos pares elétron-buraco fotogerados, aprimorando sua atividade fotocatalítica. Nesse caso, os níveis de energia dos materiais semicondutores devem coincidir a fim de formar heterojunções escalonadas. Por exemplo, CuInSe_2 e CuInS_2 são dois tipos de materiais sensibilizados ideais para formar heterojunção com esses semicondutores de elevado band gap (SHEN et al., 2012).

Shen e colaboradores 2012 desenvolveram microesferas a base de ZnO e realizaram a heteroconjugação com PQs baseados em cobre, índio e enxofre (CIS) para avaliar a degradação fotocatalítica da solução aquosa de rodamina B à temperatura ambiente. Os resultados mostraram que a heteroconjugação foi benéfica para a

degradação da rodamina, sendo a eficiência fotocatalítica melhorada em comparação as microesferas de ZnO sem CIS (SHEN et al., 2012).

A irradiação de luz no fotocatalisador gera elétrons e buracos. O elétron na banda de condução do CIS é transferido para a banda de condução do ZnO. Os orifícios na banda de valência do ZnO são transferidos para a banda de valência do CIS. No passo seguinte, os elétrons emitidos na BC e no buraco (h^+) na BV são capturados por moléculas de oxigênio ou espécies de H_2O dissolvidas na suspensão, respectivamente. A transferência de elétrons para a molécula de oxigênio gera o ânion superóxido e também a presença de h^+ na superfície do semiconductor leva à produção do radical hidroxila ($OH^\bullet$). Essas espécies depredam o poluente orgânico adsorvido na superfície do catalisador (FAKHRI; MAHJOUB; KHAVAR, 2014).

Embora os PQs de CIS tenham sido associados ao ZnO, mostrando ser um fotossensibilizador promissor para o ZnO, pesquisas mostram a associação dos PQs de CIS com o ZnS (LV et al., 2016; WADA et al., 2017; WANG et al., 2018). Isso por que o band gap dos PQs de CIS pode ser ajustado utilizando Zn como dopante. Além disso, o ZnS pode promover a transição de elétrons entre os PQs de CIS para o ZnO (KUO et al., 2009).

Baseado nessas informações, Kuo e colaboradores 2009 realizaram a associação de CIS/ZnS com nanofios de ZnO de 5 μm de comprimento por meio de um tratamento térmico a 450°C (KUO et al., 2009). Donat et al associaram PQs de CIS contendo zinco (ZCIS) às nanopartículas de ZnO também por meio de um tratamento térmico a 400°C. Os resultados mostraram que as nanopartículas de ZnO (de tamanho maior que 100 nm) associadas a PQs de ZCIS mostraram atividade fotocatalítica sob irradiação solar do corante laranja II. A associação de ZnO com PQs de ZCIS estendeu a faixa de absorção de luz do fotocatalisador. Além disso, com a associação, verificou-se o aumento de peróxido de hidrogênio e oxigênio singlete comparado ao ZnO. Esses achados sugerem que as espécies reativas de oxigênio desempenharam um papel fundamental no mecanismo de fotodegradação (DONAT et al., 2017).

2.4. Passivação de superfície dos PQs

O revestimento da superfície dos PQs é realizado para diferentes finalidades objetivando sempre a otimização de suas propriedades. Conforme citado anteriormente,

os níveis de energia intermediários gerados na BV e BC podem ser um problema para as propriedades luminescentes dos PQs, pois resultam em um “piscar” da luminescência. Esse efeito deletério pode ser corrigido através de uma passivação da superfície dos nanocristais (BERBEL MANAIA et al., 2018).

A passivação de superfície pode ser realizada de forma inorgânica por meio da introdução de uma casca que reveste o núcleo dos PQs. Neste caso, o revestimento dos PQs é realizado através da introdução de um semiconductor com energia maior ou menor que o band gap do PQ que esta no núcleo (VASUDEVAN et al., 2015).

A passivação de superfície com o sulfeto de zinco (ZnS) em PQs de ZnO é amplamente estudada (BERBEL MANAIA et al., 2018; RALEAOOA et al., 2017; SADOLLAHKHANI et al., 2014; SHEN et al., 2012; ZOU et al., 2019). O ZnS possui um band gap maior que o ZnO, eliminando os defeitos que induzem recombinação não-radioativa dos pares elétron-buraco. Dessa forma, pode aumentar o rendimento quântico e a intensidade fotoluminescente (VASUDEVAN et al., 2015). Os PQs de ZnO/ZnS também podem ser funcionalizados com moléculas orgânicas de acordo com suas aplicações.

Uma outra forma de realizar a passivação de superfície dos PQs é por meio do revestimento com materiais orgânicos, que também podem diminuir os defeitos de superfície. Em contrapartida, o uso de ligantes orgânicos formados por longas cadeias orgânicas podem diminuir a luminescência, mas aumentam a fotoestabilidade quando comparado com os ligantes formados por cadeias menores (CARRILLO-CARRIÓN et al., 2009). Por outro lado, revestir a superfície com moléculas orgânicas tem muitas vantagens pois pode diminuir a agregação dos PQs em meios biológicos, reduzir a toxicidade e melhorar sua biocompatibilidade, permitir a incorporação dos PQs em carreadores de fármacos e permitir a marcação de uma molécula alvo ou de um receptor celular (LIU et al., 2011a).

Para revestir a superfície dos PQs de ZnO, pode-se empregar diferentes polímeros como o polietilenoglicol ou a quitosana (KUMAR et al., 2019; PETKOVA et al., 2014; SALMAN et al., 2017). Pesquisas promissoras mostram o uso de organosilanos para a modificação de superfície dos PQs de ZnO (DA SILVA et al., 2019; LI et al., 2015a; LIU et al., 2017b; RISSI; HAMMER; CHIAVACCI, 2017; SURESH et al., 2016). Esse tipo de material permite a dispersão desses PQs em fases oleosas e aquosas dependendo o

silano que é utilizado, pois altera efetivamente a hidrofobicidade da superfície. Os organosilanos possuem baixa toxicidade e ligam-se de forma covalente à superfície hidroxilada dos PQs, criando uma barreira de proteção do núcleo de ZnO com o solvente (ABOULAICH et al., 2012a; JANA; EARHART; YING, 2007; RAGUPATHI; CHOE; M., 2021; WANG; BOCKSTALLER; MATYJASZEWSKI, 2021). Ainda, possuem uma outra vantagem, pois pesquisas demonstraram que as modificações de superfície dos PQs com organosilanos podem resultar em alto rendimento quântico de fluorescência (ABOULAICH et al., 2012b; LI et al., 2015a). Essa característica é muito importante pois maior desafio de modificar a superfície de PQs de ZnO é preservar a sua luminescência no visível.

O grupo de pesquisa de Ciências dos materiais aplicados à farmácia- CMAF, realizou importantes avanços na passivação de superfície dos PQs de ZnO com o intuito de melhorar suas propriedades luminescentes e aumentar a estabilidade. Vale ressaltar ainda que pequenas quantidades de água nas etapas de formação dos PQs pela via sol-gel, que é a síntese utilizada pelo nosso grupo, resultam em agregação, precipitação e perda da luminescência (XIONG, 2010), o que culmina ainda mais no interesse de proteger a superfície dos PQs para as aplicações biológicas. Nesse sentido, diferentes estratégias já foram abordadas. O desenvolvimento de PQs de ZnO contendo ZnS em uma estrutura casca/caroço amplamente discutido em tese de doutorado. Ainda os PQs de ZnO foram dopados pelo magnésio (Mg) e sua superfície modificada por ácido oleico para a associação com lipossomas (BERBEL MANAIA et al., 2018; MANAIA, 2016; MANAIA et al., 2015). Em uma outra tese de doutorado foi realizado a modificação de superfície dos PQs de ZnO com diferentes organosilanos, permitindo a dispersão desses PQs em meio meios polares e apolares. Os PQs também foram associados à micelas poliméricas (RISSI, 2016; RISSI; HAMMER; CHIAVACCI, 2017). Em dissertação de mestrado, os PQs de ZnO modificados com 3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane (GPTMS) e dispersos em água mostraram excelente estabilidade de dois meses, sendo que foi possível utilizar essa dispersão para a avaliação das propriedades antimicrobianas (LALLO DA SILVA, 2017). Nesse sentido, os avanços obtidos pelo grupo por meio da passivação de superfície permitiram melhorar as propriedades dos PQs de ZnO para almejar a aplicação biológica pois possibilitaram a associação dos PQs com nanocarreadores de fármacos e permitiram avaliar as propriedades antimicrobianas.

2.5. Nanocarreadores de fármacos na nanomedicina teranóstica

Nanomateriais funcionais que combinam funções diagnósticas e terapêuticas são chamados de teranósticos (CHIARI-ANDRÉO et al., 2019). As pesquisas mais recentes em relação à nanomedicina teranóstica tem por objetivo acoplar as propriedades diagnósticas de imagens obtidas por ressonância magnética ou fluorescência e terapêuticas oriundas da vetorização de fármacos. As nanopartículas são excelentes para realizarem essas duas funções, pois os agentes terapêuticos e de imagens podem ser combinados em uma única nanopartícula, originando dessa forma um sistema teranóstico capaz de acompanhar a biodistribuição das nanopartículas e a evolução de doenças (LI; LIU; GAO, 2016).

Nanopartículas têm propriedades únicas devido à sua estrutura e tamanho na escala nanométrica. Dessa forma, quando comparadas com agentes de contrastes geralmente formados por complexos, que mesmo utilizados na clínica e aprovados por órgãos reguladores como o food and drug administration (FDA), as NPs possuem ainda vantagens únicas, pois possuem detecção mais sensível devido a sua escala nanométrica e como consequência, uma biodistribuição diferenciada (CHIARI-ANDRÉO et al., 2019).

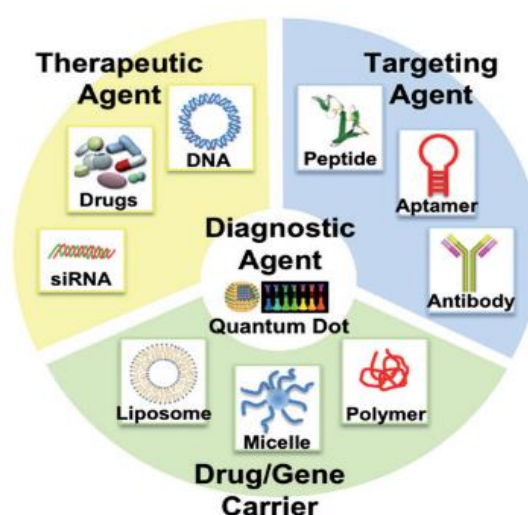
Para a terapia de muitas doenças, e ainda mais especificamente para o tratamento do câncer, um dos maiores desafios encontrados consiste na vetorização de fármacos para sítios específicos. Isso pode ser alcançado com o uso de nanocarreadores, que podem impactar positivamente as interações dos fármacos com o ambiente biológico. Os nanocarreadores modulam a farmacocinética e a biodistribuição de fármacos sendo possível contornar barreiras para o sucesso da terapia de muitas doenças, pois além de possibilitar a vetorização de fármacos para sítios específicos, melhoram a solubilidade e biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis, protegendo fármacos pouco estáveis, diminuindo a toxicidade e aumentando a eficácia do tratamento (BHASKAR et al., 2010; FRANK et al., 2014; PARK et al., 2017).

Os nanocarreadores podem acumular-se especificamente em tumores devido ao efeito permeação e retenção aprimorada (EPR). O efeito EPR ocorre pelas características fisiopatológicas do tumor. Nos tumores sólidos, há amplas fenestrações dos vasos sanguíneos, que combinadas com a baixa drenagem linfática, leva a um acúmulo seletivo das nanopartículas (GOLOMBEK et al., 2018).

Os nanocarreadores de fármacos podem ser baseados em lipídeos (micelas, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, NCL, nanoemulsões) polímeros (micelas, nanoesferas ou nanocápsulas e dendrímeros), proteínas, oligossacarídeos (ciclodextrinas) e materiais inorgânicos (ouro, prata, nanopartículas de sílica, redes metálicas e pontos quânticos (FRANK et al., 2014; PARK et al., 2017).

Atualmente, para o tratamento, existe no mercado formulações baseadas em nanocarreadores como o Doxil® e o Abraxane® (LI; LIU; GAO, 2016). Para o diagnóstico de câncer, nanopartículas ainda não foram empregadas. Em 2015, o FDA aprovou o dispositivo Verigene®, que possui nanopartículas de ouro e é usado para a detecção de ácidos nucleicos e proteínas presente em vírus (CHIARI-ANDRÉO et al., 2019). Pesquisas mostram esforços por desenvolver sistemas teranósticos utilizando diferentes nanocarreadores, os principais serão descritos a seguir, tendo o foco do acoplamento desses nanocarreadores com PQs para fornecer propriedades de diagnóstico, conforme mostrado na figura 6, há diferentes possibilidades de incorporar os pontos quânticos com agentes terapêuticos, com marcadores e nanocarreadores.

Figura 6. Representação das diferentes possibilidades de construção de nanoestruturas multiplamente funcionalizadas contendo PQs. Por exemplo, capaz de atingir o tumor, transportar / liberar a carga útil do fármaco e resultar em uma resposta terapêutica simultaneamente. Figura adaptada do artigo “ Quantum dot-based theranostics” (HO; LEONG, 2010).



2.5.1. Lipossomas

Lipossomas são formados por uma ou mais bicamadas de fosfolipídios contendo compartimento aquoso, o que permite incorporar agentes hidrofílicos no núcleo e hidrofóbicos ou anfifílicos nas camadas lipídicas (CHIARI-ANDRÉO et al., 2019). A primeira vez que os lipossomas foram preparados foi na década de 1960 e agora eles são utilizados para a melhoria da farmacocinética e biodistribuição de fármacos (MUTHU et al., 2012).

Um dos maiores problemas associados ao uso dos lipossomas in vivo é sua rápida remoção da circulação devido a fagocitose. Algumas alternativas foram descritas para diminuir esse efeito, como a fixação de polímeros solúveis em água, como derivados do polietilenoglicol (ÅKERMAN et al., 2002; CHIARI-ANDRÉO et al., 2019). Lipossomas modificados com polímeros podem fornecer solubilidade, captação celular, permeabilidade e estabilidade, aumentar a biodisponibilidade oral de proteínas, peptídeos ou antitumorais (LI et al., 2020).

Os lipossomas podem ser direcionados para uma célula específica, tecidos ou órgãos e também podem incorporar elementos de diagnóstico, dando origem a sistemas teranósticos (CHIARI-ANDRÉO et al., 2019; HO; LEONG, 2010).

Um exemplo de agentes de diagnóstico/imagens que podem ser incorporados nos lipossomas são os PQs. Os PQs podem ser incorporados no núcleo hidrofílico ou ligados covalentemente à superfície. Sendo que tipicamente os PQs são incorporados na bicamada lipídica (HO; LEONG, 2010).

PQs encapsulados em lipossomas também podem melhorar a biocompatibilidade (SELECI et al., 2017; SONALI et al., 2016).

Muthu e colaboradores 2012 evidenciaram o uso potencial de lipossomas contendo PQs e docetaxel para terapia do câncer e diagnóstico do por meio de imagens. Essas partículas foram avaliadas usando células de câncer de mama MCF-7, mostrando que os lipossomas multifuncionais mostraram maior eficácia (MUTHU et al., 2012).

Sonali e colaboradores 2016 desenvolveram lipossomas teranósticos conjugados PQs de CdSe/ZnS para entrega direcionada de docetaxel e PQs em células cancerígenas do cérebro, mostrando resultados promissores quanto a melhoria da geração de imagens e direcionamento do fármaco no cérebro (SONALI et al., 2016).

Seleci e colaboradores 2017 sintetizaram lipossomas contendo o fármaco topotecano e PQs de CdSe/ZnS. Os resultados mostraram que os lipossomas internalizaram nas células, possibilitando a visualização de imagens por meio de microscopia de fluorescência utilizando células HeLa. Além disso, houve um aumento na biocompatibilidade dos PQs, mantendo suas características de fluorescência após a associação com os lipossomas (SELECI et al., 2017).

Li e colaboradores 2020 desenvolveram um sistema baseado em lipossoma funcional de quitosana conjugado com folato (FCL) que foi envolvido em microcápsula -1,3-D-glucana (GPM). O FCL@GPM foi conjugado com o agente quimioterápico gefitinibe (GEF) e com os PQs de ZnO, utilizado tanto com agente sinérgico para quimioterapia quanto como devido ao seu potencial para geração de imagens. Os PQs de ZnO também foram escolhidos devido ao seu potencial de degradação em meio ácido. O sistema apresentou propriedade responsiva à acidez do tumor e induziu uma citotoxicidade nas células cancerígenas em comparação ao GEF, aumentando também sua biodisponibilidade em 1,75 vezes em comparação a sua marca registrada (Iressa®). Além disso, GEF / ZnO-FCL @ GPMs exerceram uma eficácia antitumoral superior (1,47 vezes) em comparação à sua marca registrada em ratos. Nesse trabalho, a associação dos PQs de ZnO com os lipossomas manteve sua característica luminescente (LI et al., 2020).

2.5.2. Micelas

As micelas são um sistema anfifílico caracterizado por terem um núcleo hidrofóbico rodeado por fosfolipídios e tensoativos. Uma das principais propriedades que caracteriza as micelas é a concentração micelar crítica (CMC), além do tamanho e forma (CHIARI-ANDRÉO et al., 2019). As micelas são tipicamente obtidas por auto-montagem de copolímeros em bloco anfifílicos em meio aquoso (DENG et al., 2012), que se arranjam e formam uma estrutura casca/caroço. A parte hidrofílica do copolímero geralmente forma o invólucro e fornece estabilidade no meio aquoso enquanto o núcleo hidrofóbico pode ser usado para encapsulamento de fármacos não polares. (KUMAR et al., 2012).

Geralmente, a cadeia hidrofílica das micelas contém PEG com função de impedir a ligação com as proteínas séricas na superfície das micelas e evitar a rápida eliminação da corrente sanguínea pelos macrófagos. Somado isso, com o tamanho pequeno das

micelas há seu acúmulo muito eficiente no tumor, conhecido como efeito de Permeabilidade e retenção aprimorada (EPR) (KUMAR et al., 2012). Dessa forma, sua utilidade como nanocarreadores de fármacos para terapia direcionada ao câncer é extensivamente investigada (DENG et al., 2012; KUMAR et al., 2012; WANG et al., 2017).

Kumar e colaboradores 2012 desenvolveram micelas encapsuladas com PQs de CdSe e doxirrubicina. Os resultados mostraram que essas micelas foram biocompatíveis e foi possível obter imagens de fluorescência dos PQs usando células Hela, o que mostrou forte potencial dessas micelas teranósticas para imagem e terapia (KUMAR et al., 2012)

Howell e colaboradores 2013 desenvolveram nanopartículas lipídicas-micelares (LMNs) contendo óxido de Mn (M-LMNs) para imagens de ressonância magnética que também podem ser usadas para DNA e entrega de fármacos. Nanopartículas de MnO revestidas com ácido oleico foram encapsuladas em micelas compostas de polietileno glicol (PEG-2000), fosfatidiletanolamina (PE), DC-colesterol e dioleoil-fosfatidiletanolamina. Quando administrados a camundongos por via intranasal, eles se acumulam preferencialmente nos pulmões. Os resultados de ressonância magnética pulmonar in vitro e ex vivo confirmaram que os M-LMNs são capazes de aumentar o contraste T1 nas imagens de ressonância magnética. Além disso, quando esse sistema foi encapsulado com doxirrubicina este foi absorvido pelas células alvo in vivo. Dessa forma, esse sistema tem potencial teranóstico (HOWELL et al., 2013) .

Wang e colaboradores 2017 desenvolveram micelas teranósticas a base de PQs de InP/ZnS funcionalizados com polilactideb-poli (etilenoglicol) (PLA-PEG). Os pesquisadores conjugaram na superfície das micelas contendo os PQs, o anticorpo de receptor de fator de crescimento anti-epidérmico (anti-EGFR-Nb) e aminoflavona (AF) como fármaco anticancerígeno. Os resultados mostraram que as micelas teranósticas levaram a regressão do tumor. Esta formulação de nanocarreador reduziu drasticamente a dose efetiva do fármaco necessária para inibir o crescimento do tumor, contornando assim a toxicidade sistêmica. Ainda, foi possível observar imagens de fluorescência dos tumores em ratos. (WANG et al., 2017).

2.5.3. Associação de PQs com peptídeos e nanomontagens

Os peptídeos são incorporados aos nanocarreadores de fármacos para conferir a eles diferentes propriedades, tais como: melhor interação dos nanocarreadores com as células (SONALI et al., 2016), promover penetração celular (GUYON; LEPELTIER; PASSIRANI, 2018) ou até mesmo para promover o tratamento, como os peptídeos antimicrobianos (CHEN et al., 2015).

Arkeman e colaboradores 2002 reportaram o uso de peptídeos conjugados com PQs de CdSe/ZnS para marcar células do fígado de ratos. Os sinais dos PQs não foram detectados in vivo, entretanto, estudos histológicos in vitro demonstraram que os PQs contendo peptídeos e revestidos com PEG reduziram a liberação reticulo endotelial, aumentando assim o tempo de circulação. A quantificação da fluorescência estimou que a adsorção de PEG com peptídeo na superfície dos PQs reduziu o acúmulo no fígado e baço em cerca de 95%. O revestimento de PEG não alterou visivelmente o acúmulo dos PQs no tecido tumoral (ÅKERMAN et al., 2002).

Cheng e colaboradores 2015 desenvolveram um sistema baseado em peptídeo e PQs de ZnO para o diagnóstico de bactérias e o tratamento com alta especificidade. Os PQs de ZnO estabilizados com BSA foram conjugados com UBI29-41, um fragmento de peptídeo antibacteriano e um corante MPA que emite no infravermelho próximo. Este dispositivo foi denominado ZnO@PEP-MPA. A nanossonda ZnO@PEP-MPA exibiu baixa citotoxicidade e discriminou a infecção bacteriana de inflamação estéril ou câncer in vivo com alta especificidade e baixa limitação de detecção. ZnO@PEP-MPA foi conjugado com vancomicina, demonstrando uma atividade antibacteriana aumentada e biocompatibilidade in vitro e in vivo. O antibiótico metilicina também foi conjugado ao ZnO@BSA-PEP-MPA demonstrando maior capacidade de combater as bactérias resistentes à metilicina em comparação com a metilicina livre devido ao aumento da permeação da membrana celular mediada por ZnO @ BSA-PEP-MPA (CHEN et al., 2015).

Sonali et al., 2016 desenvolveram PQs de de CdSe/ZnS associados a lipossomas para a entrega de docetaxel e PQs em células cancerígenas do cérebro. Além disso, foi utilizado a sequência arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) para aumentar o reconhecimento do nanossistema com as células cancerígenas. RGD é conhecida como

um motivo de reconhecimento em vários receptores de integrina. Integrinas são uma família de receptores de superfície celular responsáveis pelas interações das células com receptores da matrix extracelular. $\alpha\beta3$, membro das integrinas, é um excelente agente de direcionamento usado em imagiologia de tumor e aplicação terapêutica. Dessa forma, nanotransportadores direcionados a RGD podem direcionar especificamente fármacos para células endoteliais angiogênicas e/ou células cancerosas pela ligação do peptídeo RGD as integrinas superexpressas por essas células, permitindo o "direcionamento ativo" dos tumores para aumentar a especificidade (SONALI et al., 2016).

Na nanomedicina, uma das abordagens mais originais consiste no uso de materiais de construção naturais para produzir automontagens. Em meio a esses materiais, os peptídeos se destacam pela biocompatibilidade, biodegradação, diversidade química e estrutura simples (GUYON; LEPELTIER; PASSIRANI, 2018). Assim, foi proposto por Wang e colaboradores (2014) usar peptídeos penetrantes, que podem atravessar membranas celulares e transportar pequenas moléculas, que são frequentemente ligadas de forma covalente ou não covalente. Um exemplo de peptídeo penetrante é poliarginina (Argn), usada para formular sistemas pró-fármacos conjugados com princípios ativos hidrofóbicos visando, espontaneamente, formar conjugados anfifílicos que podem se auto-montar, processo esse em inglês denominado “self-assemble”. Este processo de formulação é, portanto, inovador e único na medida em que permite uma incorporação de fármaco muito maior do que as formulações convencionais. Além disso, é simples, permitindo assim uma transposição em escala e aumentar consideravelmente o direcionamento celular e, portanto, a atividade terapêutica (WANG et al., 2014).

A conjugação de fármacos com diferentes peptídeos é uma área emergente. No entanto, conjugados anfifílicos com potencial de aplicação biológica não são muito explorados (GUYON; LEPELTIER; PASSIRANI, 2018). Na verdade, as moléculas à base de ferroceno têm propriedades anticâncer, mas, por outro lado, seu alto caráter hidrofóbico requer uma estratégia de direcionamento adequada para administração in vivo (JAOUEN; VESSIÈRES; TOP, 2015)

Alguns estudos demonstram a aplicação de automontagens em PQs e substâncias biologicamente ativas, como; i) nanomontagens de PQs fluorados que foram aplicadas à entrega de enzima mediada por pH (em pH ácido)(CARRILLO-CARRIÓN et al., 2018), ii) PQs CdSe-ZnS conjugados às nanoestruturas de DNA por meio de um peptídeo contendo seis histidina, que se liga à superfície dos PQs (GREEN et al., 2021).

A conjugação do ferroceno com peptídeos penetrantes para nebulização pulmonar foi tema de tese de doutorado do laboratório MINT onde foi realizado o estágio BEPE da doutoranda (GUYON et al., 2019; GUYON; LEPELTIER; PASSIRANI, 2018). Nesse sentido, a conjugação de PQs com essas automontagens contendo arginina e ferrocifeno foram uma estratégia adotada nessa tese, sendo uma inovação.

2.5.4. Nanocápsulas Lipídicas

As nanocápsulas lipídicas (NCL) são nanocarreadores baseados em três principais componentes: uma fase oleosa, uma aquosa e um tensoativo não iônico. Possuem um núcleo oleoso líquido à temperatura ambiente contendo triglicerídeos de cadeia média rodeados por uma membrana sólida à temperatura ambiente formada por uma mistura de lecitina e tensoativos não iônicos derivados de polietilenoglicol. São caracterizadas por serem uma estrutura híbrida entre as nanocápsulas poliméricas e os lipossomas. Para sintetizá-las é realizado um método chamado de inversão de fases de uma emulsão que leva à formação de NCL monodispersas com tamanho de 20 a 100 nm, o que possibilita a aplicação intravenosa. Além disso, a temperatura ambiente, as NCL possuem um coração lipídico líquido, o que as diferem dos lipossomas e das NCL sólidas, e resulta em uma maior capacidade de incorporar moléculas lipofílicas (HUYNH et al., 2009). Como as NCL são formadas pela combinação de substâncias de baixa toxicidade, resultando em um sistema seguro para o uso como sistema de liberação controlada de fármacos e diagnóstico por imagem.

O uso de NCL possui vantagens importantes em relação aos demais nanocarreadores lipídicos, tais como: não há uso de solventes para prepará-las além de que o rendimento de encapsulação pode ser superior a 90% (enquanto dos lipossomas chega a 50%), estabilidade em fluidos biológicos, capacidade de incorporar várias moléculas no seu “coração” oleoso e estabilidade física de até 18 meses (HUYNH et al., 2009). Ainda, NCL são excelentes nanocarreadores para liberar fármacos anticancerígenos no seu sítio de ação (ANTONOW et al., 2017). As NCL também podem ser carregadas com diferentes radionuclídeos, permitindo sua aplicação em imagem e radioterapia (CIKANKOWITZ et al., 2017; HUYNH et al., 2009).

Lollo e colaboradores 2015 observaram redução tumoral confirmado por meio da técnica de ressonância magnética. Devido ao baixo contraste natural entre o cérebro tumor e parênquima cerebral foi necessário a aplicação de um agente de contraste (Dotaren®-ácido gadotérico). Dessa forma, os autores concluíram que o nanosistema desenvolvido apresentou grande potencial antitumoral (LOLLO et al., 2015).

Hirsjärvi e colaboradores 2013 mostraram que as NCL de 25 nm desaparecem mais rápido da corrente sanguínea quando comparadas com as NCL maiores devido a boa distribuição nos tecidos e a rápida eliminação. A detecção da fluorescência foi claramente observada permitindo a visualização do tumor (HIRSJÄRVI et al., 2013).

Patentes foram depositadas mostrando uma nova classe de NCL, as quais podem ser escalonadas para a produção industrial por ser um método de baixa energia e que não utiliza solventes. Essas NCL biomimetizam lipoproteínas (HEURTAULT et al., 2000). Outras patentes foram depositadas estabelecendo outros métodos para sintetizar NCL, possibilitando obter um coração aquoso para incorporar moléculas hidrofílicas e/ou lipofílicas (ANTON; SAULNIER; BENOIT, 2016), funcionalização de NCL com grupamento amino (BENOIT; PERRIER, 2016), nanocápsulas com um coração lipídico líquido carregado com agentes ativos solúveis em água ou dispersáveis em água (SAULNIER; BENOIT; ANTON, 2016).

Pan et al., 2013 sintetizaram nanopartículas de silicone luminescentes e associaram em NCL. Os resultados indicaram que essas as NCL apresentam tamanho controlável, boa dispersão, alta taxa de carregamento das nanopartículas de sílica e estabilidade coloidal em diferentes meio além de alta intensidade de fotoluminescência (PAN et al., 2013).

Nandwana et al., 2018 usaram como núcleo magnético nanopartículas de $\text{Zn}_{0.2}\text{Mn}_{0.8}\text{Fe}_2\text{O}_4$ para acoplá-las às NCL. Os autores também encapsularam as nanocápsulas magnéticas com curcumina e paclitaxel. Os resultados mostraram que as NCL conseguiram carrear alta quantidade de fármaco, exibindo uma eficácia terapêutica 16 vezes maior do que o fármaco livre devido a liberação controlada. Além disso, na ressonância magnética, houve um aumento no contraste T2 em 9 vezes quando comparada com o agente de contraste ferumoxitol, que é clinicamente aprovado (NANDWANA et al., 2018).

Valsalakumari et al., 2021 associaram paclitaxel a NCL de diferentes tamanhos 50 nm, 90 nm e 120 nm e estudaram os efeitos citotóxicos em células de câncer de mama. Os resultados mostraram boa porcentagem de encapsulação e estabilidade por pelo menos dois meses. Em relação à captação celular, as NCL menores tiveram menor captação, mas o perfil citotóxico não mudou mesmo alterando o tamanho das NCL (VALSALAKUMARI et al., 2021).

Olerile e colaboradores 2017 usaram paclitaxel juntamente com PQs de CdTe@CdS@ZnS associados a NCL. Os resultados mostraram uma eficiência de encapsulação de 80% com uma taxa de inibição do crescimento tumoral de 77,85%. Os resultados de imagem in vivo e ex vivo indicaram a capacidade das NCL co-carregadas para direcionar e detectar especificamente o tumor H22 (linhagem celular de hepatoma murino). Os autores concluíram que a formulação de NCL co-carregada pode ser qualificada como uma base de sistema de administração de fármacos parenteral como uma formulação teranóstica para o câncer (OLERILE et al., 2017).

Geng et al., 2021 desenvolveram nanocápsulas fotossensíveis à base de fósforo preto (BP) (BP-PNCs), integrando os efeitos fototérmicos e quimioterápicos inerentes do BP. BP-PNCs foram sintetizados encapsulando PQs de BP (BPPQs). Os resultados mostraram alta absorção celular e capacidade de direcionamento de tumor eficaz in vivo após injeção intravenosa. BP-PNCs irradiados de luz infravermelha (NIR) levaram à ablação completa dos tumores. Além disso a hipertermia melhorou o efeito quimioterápico (GENG et al., 2021).

3. OBJETIVOS

Os objetivos da tese foram sintetizar novos PQs, constituídos por PQs de ZnOGd associados a PQs de GCIS/ZnS, capazes de fornecer propriedades de diagnóstico por imagens de ressonância magnética e imagens de luminescência e associá-los às nanocápsulas lipídicas e automontagens de arginina e ferrocifeno.

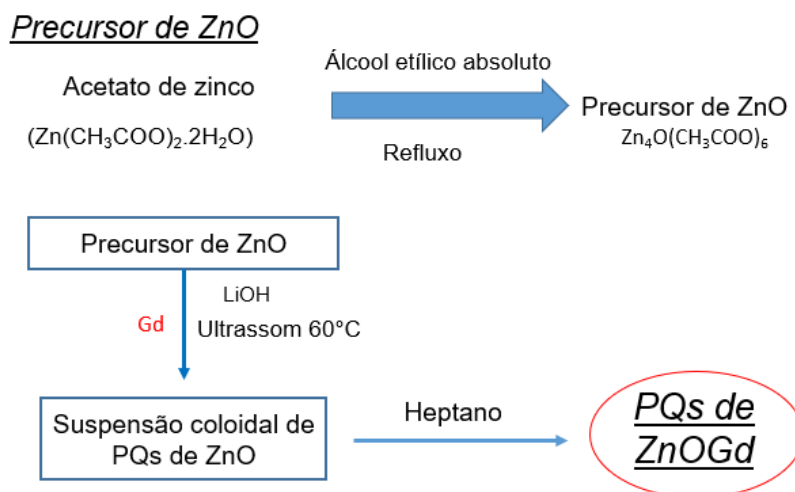
4. METODOLOGIA

4.1. Síntese dos Pontos quânticos

4.1.1. PQs de ZnO e PQs de ZnO dopados com Gd

Os PQs de ZnO foram preparados pelo método sol-gel descrito por Spanhel e Anderson com algumas modificações (SPANHEL; ANDERSON, 1991). Essa síntese possui duas etapas. A primeira consistiu no preparo de um precursor tetraédrico $\text{Zn}_4\text{O}(\text{Ac})_6$ através do refluxo de uma solução etanólica contendo 0,05 M de acetato de zinco a 80°C por duas horas. A segunda etapa corresponde ao preparo da suspensão coloidal de PQs de ZnO, que foi obtida por meio de reações de hidrólise e condensação do precursor através da adição de LiOH em uma razão de hidrólise $r = ([\text{OH}] / [\text{Zn}])$, de 1.0 a 60°C por 1h hora em banho ultrassônico. Para a dopagem dos PQs com Gd, uma solução etanólica de cloreto de gadolínio foi adicionada no precursor de acordo com a metodologia descrita por Chiavacci et al., 2017 A quantidade de Gd foi adicionada de forma a substituir 20% do número de mols de Zn da solução precursora (CHIAVACCI et al., 2019). A figura 7 mostra o esquema de preparo dos PQs de ZnOGd e ZnO.

Figura 7. Síntese dos PQs de ZnO e ZnOGd



4.1.2. Obtenção dos PQs de ZnO dopados e não dopados na forma de pó

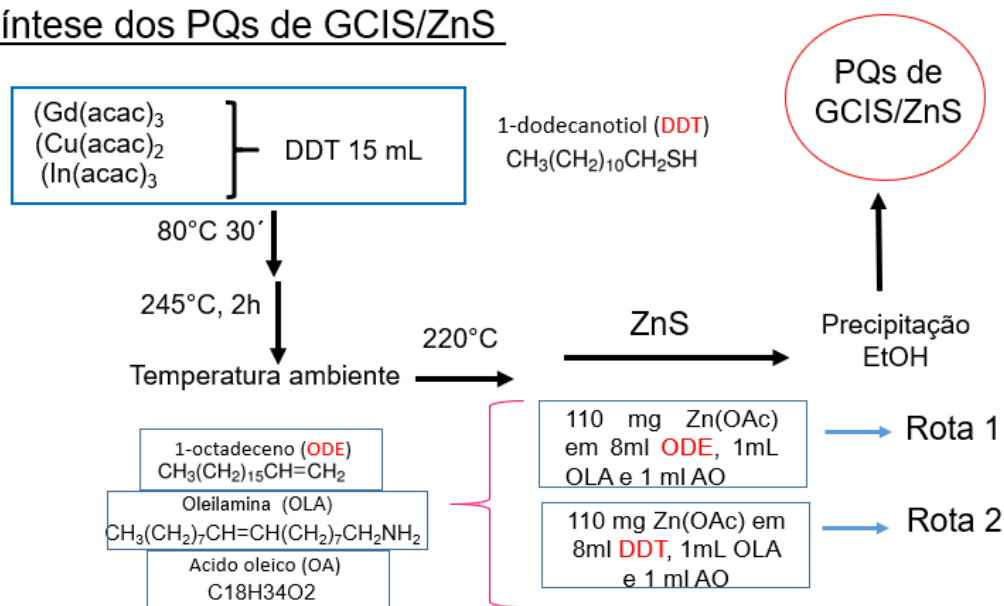
Os PQs de ZnO dopados e não dopados na forma de pós foram extraídos da suspensão coloidal através de uma precipitação com heptano, de acordo com o método descrito por Meulenkamp (MEULENKAMP, 1998) utilizando uma proporção suspensão coloidal:heptano de 1:4. Essa reação deu origem a um precipitado branco que foi centrifugado por 10 minutos a 4000 rpm e seco a 35°C por 24 horas.

4.1.3. PQs de GCIS/ZnS

Os PQs contendo gadolínio, cobre, índio e enxofre/sulfeto de zinco (GCIS/ZnS) foram sintetizados por duas rotas diferentes, conforme mostrado na figura 8.

Figura 8. Síntese dos PQs de GCIS/ZnS (rota 1 e rota 2)

Síntese dos PQs de GCIS/ZnS



4.1.3.1. PQs de GCIS/ZnS pela Rota 1:

A rota 1 foi realizada de acordo com Yang e colaboradores 2015 seguindo algumas modificações (YANG et al., 2015). 1-dodecanetiol (DDT) foi usado como um ligante de superfície, fonte de enxofre e solvente da reação. Primeiro, acetilacetato de índio (III) ($\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{InO}_6$), acetilacetato de cobre (III) ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{CuO}_4$) e acetilacetato de gadolínio (III) hidratado ($\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{GdO}_6 \cdot x\text{H}_2\text{O}$), em diferentes proporções (tabela 1), foram misturados em 15 mL de DDT em atmosfera de

argônio (400 rpm utilizando um balão de 100 mL com 3 bocas e um agitador magnético Ika com controle de temperatura RTC basic com suporte para frascos 100 ml sem cabo-H 135.20). A mistura foi degaseificada a 80°C por 30 minutos. Em seguida, a temperatura da reação foi aumentada para 245°C por 2 horas. A fonte de aquecimento foi removida até a solução atingir a temperatura ambiente e uma porção de 4 ml do núcleo GCIS foi removida e purificada com excesso de etanol. Para a introdução do ZnS, a mistura foi aquecida a 220°C e a uma solução contendo 110 mg de acetato de zinco, 8 ml de 1-ocatadeceno, 1 ml de ácido oleico e 1 ml de olealemina foi adicionada 4 vezes com um intervalo de 20 minutos na solução de GCIS. No final, foi adicionado etanol absoluto para a precipitação e purificação dos PQs e realizado 6 lavagens sendo que em cada lavagem a suspensão foi centrifugada a 4000 rpm por 10 min (esse procedimento foi repetido 6 vezes).

Tabela 1. Diferentes proporções utilizadas para síntese dos PQs de GCIS na rota 1.

Amostra	Gd, Cu, In (número de mols)
GCIS/ZnS-1	6 µmol, 3 µmol, 3 µmol
GCIS/ZnS-2	1.5 µmol, 3 µmol, 3 µmol
GCIS/ZnS-3	100 µmol, 200 µmol, 200 µmol

4.1.3.2. PQs de GCIS/ZnS sintetizados pela Rota 2.

Para a síntese dos PQs de GCIS/ZnS pela rota 2 foi utilizado um protocolo adaptado do Yang e colaboradores 2015, mas retirando o solvente 1-ocatadeceno e substituindo por DDT na etapa de formação do ZnS. Para isso, Primeiro, gadolinium (III) 2,4-pentanedionate hydrate (100 µmol,), Copper(II) acetylacetonate 200 µmol,e indium(III) 2,4-pentanedionate (200 µmol,) foram misturados em 15 ml de DDT em atmosfera de argônio. A mistura foi degaseificada a 80°C por 30 minutos. Em seguida, a temperatura da reação foi aumentada para 245°C por 2 horas. A fonte de aquecimento foi removida até a solução atingir a temperatura ambiente e uma porção de 4 ml do núcleo GCIS foi removida e purificada com excesso de etanol. Para a introdução do ZnS, a mistura foi aquecida a 220°C e a uma solução contendo 110 mg de acetato de zinco, 8 ml de DDT, 1 ml de ácido oleico e 1 ml de olealemina foi adicionada 4 vezes com um

intervalo de 20 minutos na solução de GCIS. No final, foi adicionado etanol absoluto para a precipitação e purificação dos PQs sendo que a suspensão foi centrifugada a 4000 rpm por 10 min.

4.1.4. Conjugação dos PQs

4.1.4.1. ZnO e ZnOGd com GCIS/ZnS (Rota 1)

Os PQs de ZnO e ZnO Gd foram acoplados com GCIS/ZnS PQs seguindo o procedimento descrito por Donat e colaboradores com algumas modificações (DONAT et al., 2017). Os pontos quânticos de ZnO e ZnOGd e GCIS/ZnS foram misturados em clorofórmio e agitados magneticamente à temperatura ambiente até a evaporação do clorofórmio. Foram utilizadas diferentes proporções entre ZnOGd e GCIS/ZnS (tabela 2). Em seguida, para promover a junção, os PQs foram aquecidos a 300 e 260°C por 5 minutos em uma mufla Bravac Contemp TCM77.

Tabela 2. Diferentes proporções dos PQs utilizados para a conjugação.

ZnOGd (%)	GCIS/ZnS-3 (%)
98	2
90	10
75	25
50	50

4.1.4.2. ZnOGd com GCIS/ZnS (Rota 2)

Os PQs de ZnOGd ou ZnOGdHTMS foram acoplados com PQs de GCIS/ZnS seguindo o procedimento descrito por Donat e colaboradores com algumas modificações (DONAT et al., 2017). Após a síntese dos PQs de GCIS/ZnS esses foram secos e dispersos em clorofórmio. Dessa forma, uma alíquota desses PQs foi retirada de forma a conter uma quantidade de massa correspondente às diferentes concentrações analisadas. Já os PQs de ZnOGd foram adicionados em massa. O volume total de clorofórmio

adicionado foi de 5mL. Os PQs de ZnOGd e GCIS/ZnS misturados em clorofórmio foram agitados magneticamente à temperatura ambiente até a evaporação do clorofórmio. Foram utilizadas diferentes proporções entre ZnOGd e GCIS/ZnS. Em seguida, para promover a junção, os PQs foram aquecidos a 260°C por 5 minutos, seguido pelo resfriamento até a temperatura ambiente e mais um ciclo de aquecimento por 5 minutos a 260°C utilizando em uma mufla Bravac Contemp TCM77.

4.2. Modificação de superfície dos PQs

4.2.1. Hexadecyltrimethoxysilane (HTMS)

Para realizar a modificação de superfície dos PQs, 10 mg de ZnO-GCIS/ZnS foram dispersos em 12 ml de etanol. Em seguida, hexadecyltrimethoxysilane-HTMS (0,045 M) e LiOH (0,03 M) foram adicionados na mistura e a reação foi realizada em banho de ultrassom por 15 minutos a 30°C. O precipitado formado foi centrifugado e o pó foi disperso em clorofórmio para caracterizações ou na fase oleosa para a obtenção das nanocápsulas lipídicas.

4.2.2. (3-Glicidiloxipropil) trimetoxissilano (GPTMS)

Para realizar a modificação de superfície hidrofílica, 10 mg de ZnO-GCIS / ZnS foram dispersos em 12 mL de etanol. O modificador de superfície (3-Glicidiloxipropil) trimetoxissilano-GPTMS (0,1 M) foi adicionado à dispersão dos PQs 0,5 M de LiOH foi adicionado à mistura e a reação foi realizada em um banho de ultrassom por 30 minutos. O precipitado formado foi centrifugado e o pó foi disperso em água (5 mg / mL).

4.3. Caracterização dos PQs

4.3.1. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

O equipamento utilizado para realizar as micrografias foi o Microscópio Eletrônico de Transmissão- Institut de Biologie in Santé, Angers França. As amostras de PQs foram diluídas em etanol (0,25 mg em 1 ml) e gotejadas em grades de carbono (5 µL). Para análises de distribuição de partículas, foram realizadas a contagem de 200 partículas de sucessivas imagens usando o software imageJ.

4.3.2. Espectroscopia de absorção da região do infravermelho (FTIR)

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho ($4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) foi obtida usando o equipamento Vertex 70- Bruker. Os acessórios usados para as amostras na forma de pó foram: ATR – espectroscopia de absorção na região do infravermelho médio por meio de reflexão total atenuada (cristal de diamante).

4.3.3. Difração de raios X

Para a realização da difração de raios X das amostras foi utilizado o difratômetro de raios X, marca SIEMENS, modelo D5000 do GFQM-IQ- UNESP Araraquara, usando radiação $\text{CuK } \lambda$, $\lambda = 1.5418\text{ \AA}$. Os parâmetros utilizados foram $2\theta = 5 - 90^\circ$; passo $0,005^\circ$; tempo = 1 segundo.

4.3.4. Análise Termogravimétrica

O equipamento utilizado para obtenção dos termogramas foi o SDT 600 Simultaneous DTA/TG da TA Instruments. As amostras foram acondicionadas em cadinhos de alumina de $90\mu\text{L}$ e aquecidas com uma taxa de 10°C/min sob fluxo de ar. As medidas foram monitoradas entre 25 e 700°C .

4.3.5. Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)

Os espectros de absorção no UV-Vis das dispersões dos PQs modificados e não modificados por HTMS em clorofórmio foram coletados usando o Espectrofotômetro Cary 60 UV-Vis utilizando uma cubeta de quartzo. A faixa de comprimento de onda variou de 240 a 800 nm , sendo o tempo médio de leitura de $0,2\text{ s}$ e o intervalo de dados de 1 nm . O clorofórmio foi utilizado para realizar a medida de linha de base dos experimentos.

4.4. Avaliação das propriedades fotoluminescentes dos PQs

Os espectros de excitação (PLE) e emissão (PL) dos PQs de ZnOGd, GCIS/ZnS e destes PQs conjugados por meio do tratamento térmico (ZnOGd-GCIS/ZnS) foram coletados utilizando um espectrofluorímetro Fluorolog 3 Horiba Scientific (modelo FL3-22) equipado com monocromador duplo de excitação, um monocromador duplo de emissão e fotomultiplicadora Hamamatsu R928 (visível) e H10330-75 (infravermelho

próximo), tendo como fonte de excitação uma lâmpada contínua de Xe de 450 W. Para a avaliação das propriedades fotoluminescentes foram realizadas medidas tanto dos PQs em suspensão (dispersos em clorofórmio) quanto em pó. Além disso, os PQs tiveram sua superfície modificada por HTMS e foram dispersos em clorofórmio. Alteramos esses 3 parâmetros pois a modificação de superfície pode alterar as propriedades fotoluminescentes.

A avaliação das propriedades fotoluminescentes dos PQs também foram performada em leitor de microplaca clariostar e Maestro in vivo imaging system

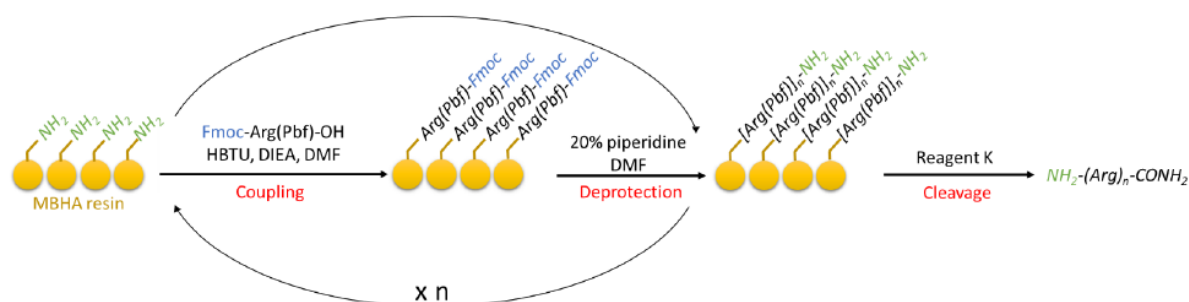
4.5. PQs acoplados com peptídeos

4.5.1. Síntese do peptídeo

A figura 9 mostra a representação esquemática da síntese da poliarginina usando Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonila) como fase sólida da síntese utilizando uma resina Rink Amide MBHA com um sintetizador de peptídeos de micro-ondas automatizado. A desproteção de Fmoc foi realizada com solução contendo 20% de piperidina/DMF (v/v). Depois disso, o aminoácido foi acoplado pela adição de uma solução mista de DMF do aminoácido protetor de Fmoc. Os ciclos padrão foram projetados para fornecer os volumes adequados a fim de obter 5 equivalentes de aminoácidos; 4,5 equivalentes de ativador (HBTU) e 10 equivalentes de base de ativador (DIEA)- (tabela 3). Este processo foi realizado em um sistema assistido por micro-ondas com vários ciclos de desproteção-lavagem-acoplamento-lavagem que foi repetido até a oblação da sequência de aminoácidos (9 ou 8 unidades de arginina). Essa síntese esta descrita no material suplementar publicado por Guyon e colaboradores em 2019 (GUYON et al., 2019).

Figura 9. Representação esquemática da síntese da poliarginina (Argn) usando síntese peptídica em fase sólida. Abreviações: Arg: arginina, DMF: N,N-dimethylformamide, ,

Fmoc: 9-fluorenylmethoxycarbonyl, Pbf: 2,2,4,6,7-pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl. HBTU: ativador, DIEA: base ativadora



Fonte: protocolo do laboratório MINT, realizado por Lena Guyon.

Nós utilizamos o peptídeo para acoplar os PQs e também os conjugamos com ferrocifeno na extreminidade N-terminal do peptídeo de acordo com Guyon e colaboradores (2019). Essa associação do ferrocifeno com a poliarginina foi tema de uma tese de doutorado do grupo de pesquisa em que realizei meu estágio BEPE (GUYON et al., 2019).

Tabela 3. Reagentes e concentrações para a síntese do peptídeo.

Reagentes	Quantidade
Ativador (HBTU)	0.45 M em DMF
Base de ativadores (DIEA)	2 M em NMP
Aminoácido	0.2M em DMF
Desproteção (piperidina)	20% em DMF

4.5.2. Peptídeo –Carboxyethylsilanetriol

Arg9 foi acoplado com Carboxyethylsilanetriol para então depois associa-lo aos PQs. Primeiro, o carboxietiltilsilanotriol foi liofilizado e, em seguida, o pó de Arg9 foi

disperso separadamente nos dois solventes da síntese- dimetilformamida (DMF) e N-metil-2-pirrolidona-NMP para acoplar com Carboxyelthylsilanetriol.

4.5.3. Associação dos PQs com complexo de arginina-ferrocifeno

4.5.3.1 Arginina- Ferrocifeno (Arg9-p54)

O composto anfifílico resultante do acoplamento do Arg9 com o ferrocifeno p54 (Arg9-p54) foi realizado em um sintetizador assistido por micro-ondas. Os PQs de ZnOGd-GCIS/ZnS modificados por HTMS e Arg9-p54 foram dispersos separadamente em THF 0,3 mg/ml de PQs e 1,56 mg/ ml de Arg9-p54. A formulação de automontagens Arg9-p54-PQs foi realizada por nanoprecipitação via processo microfluídico. A solução orgânica contendo Arg9-p54-PQs foi adicionada em um misturador microfluídico (IDEX U-466-02, EUA) a uma taxa de fluxo de 300 μ L/min com uma bomba de seringa (Harvard Apparatus PHD 2000 infusion, EUA). Ao mesmo tempo, adicionou-se água a uma vazão de 1200 μ L/min com uma segunda bomba de seringa (Harvard Apparatus PHD Ultra, EUA). O solvente orgânico foi rotaevaporado. A associação com os PQs foi caracterizada em termos de tamanho e índice de polidispersidade por espalhamento de luz dinâmico-DLS, usando 3 medidas independentes, sendo a distribuição de tamanho realizada através do número de partículas. Além disso foram realizadas aquisições do espectro de emissão (PL) e excitação (PLE) utilizando um espectrofotômetro fluoromax-4 (HORIBA).

4.5.3.2 Arginina- Ferrocifeno (Arg8-p54)

A síntese do composto anfifílico resultante do acoplamento da Arg8 com o ferrocifeno p54 (Arg8-p54) foi realizada em um sintetizador assistido por micro-ondas. Os ZnOGd-GCIS / ZnS (75%- 25%) modificados por HTMS e Arg8-p54 foram dispersos em DMF em duas proporções diferentes de PQs 2mg/mL e 1mg/mL para 3mg / mL de Arg8-p54. A formulação de auto-montagens Arg8-p54-PQs foi realizada por nanoprecipitação via processo microfluídico. A solução orgânica contendo Arg9-p54-PQs foi adicionada em um misturador microfluídico (IDEX U-466-02, EUA) a uma taxa de fluxo de 300 μ L/min com uma bomba de seringa (Harvard Apparatus PHD 2000 infusion, EUA). Ao mesmo tempo, adicionou-se água a uma vazão de 1200 μ L/min com uma segunda bomba de seringa (Harvard Apparatus PHD Ultra, EUA). Depois, a mistura foi agitada durante a noite à temperatura ambiente para evaporação da DMF. A associação

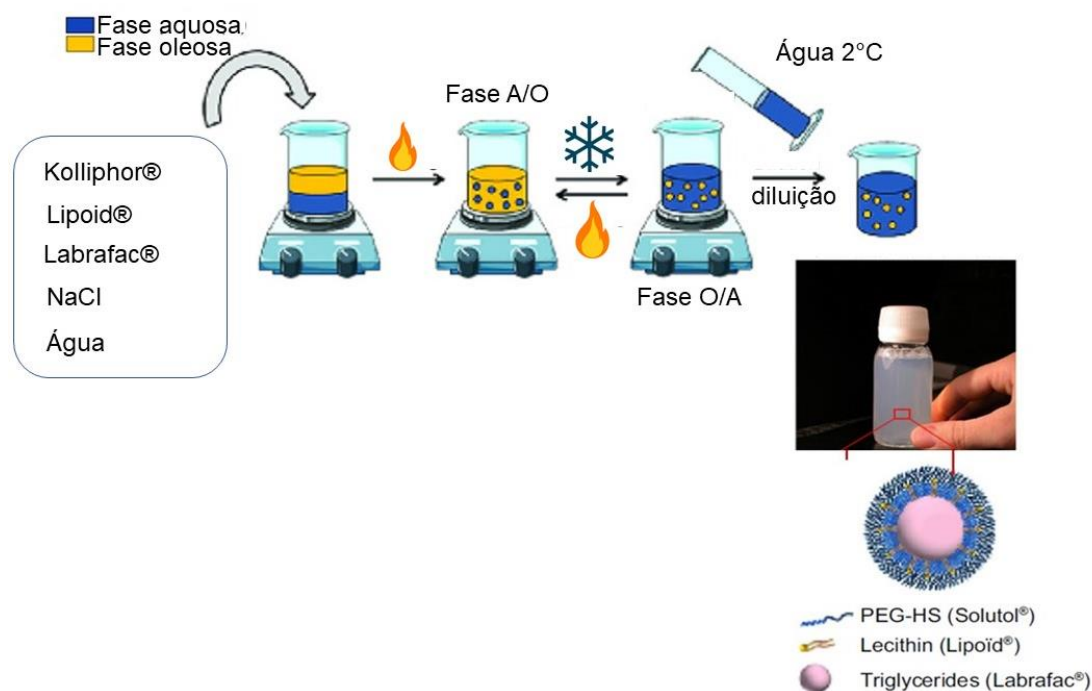
com os PQs foi caracterizada em termos de tamanho e índice de polidispersidade por espalhamento de luz dinâmico-DLS, usando 3 medidas independentes, sendo a distribuição de tamanho realizada através do número de partículas. Além disso foram realizadas aquisições do espectro de emissão (PL) e excitação (PLE) utilizando um espectrofotômetro fluoromax-4 (HORIBA).

4.6. Associação dos PQs com as nanocápsulas lipídicas

4.6.1. Formulação das NCL e associação com os PQs

A formulação das NCL foi realizada pelo método de inversão de fases que corresponde a inversão de uma emulsão óleo/água causada por ciclos de aumento e diminuição da temperatura. Primeiro, uma emulsão óleo/água contendo Labrafac® (triglicerídeos de ácido cáprico-caprílico) (1028 nm), Kolliphor® HS15 (846 mg) (mistura de polietilenoglicol 660 livre e hidroxiestearato de polietilenoglicol 660), Lipoid S75-3 (75 mg), NaCl (148 mg) e água ultrapurificada (2970 mn) foi preparada. Em seguida, a inversão de fases foi realizada através do aumento da temperatura maior que do que a temperatura de inversão de fases (cerca de 90°C), seguido da diminuição da temperatura (cerca de 40°C). Após 3 ciclos, a mistura foi rapidamente resfriada adicionando excesso de água ultrapurificada armazenada na geladeira (2000 mg). Para as NCL contendo PQs, estes foram previamente dispersos em Labrafac (12,85 mg PQs em 1028 mg labrafac) para posterior preparação da emulsão O/A (figura 10).

Figura 10. Esquema do preparo das NCL. Figura adaptada do artigo: ‘Targeting and treatment of glioblastomas with human mesenchymal stem cells carrying ferrociphenol lipid nanocapsules’ (CLAVREUL et al., 2015).



4.6.2. Caracterização das NCL-PQs

Os PQs-NCL foram caracterizados em termos de tamanho (espalhamento de luz dinâmico - DLS) e índice de polidispersidade- PDI Zetasizer NanozS (Malvern).

A avaliação das propriedades fotoluminescentes dos PQs associados as NCL foram avaliadas por meio dos espectros da coleta dos espectros de excitação e emissão usando o espectrofotômetro fluoromax-4 (HORIBA). Além disso foram adquiridos espectros de emissão através do equipamento Maestro in vivo imaging system.

As imagens de ressonância magnética foram coletadas usando um scanner 7T (Biospec 70/20 Avance III, Bruker Wissembourg, França) equipado com o sistema gradiente BGA12S (675 mT / m). A emissão e a recepção foram garantidas por um ressonador de 72 mm de diâmetro. Para a medição em T2, foi adquirido um conjunto de imagens multislice multiecho (tempo de repetição TR = 2000ms, 25 tempos de eco variando de TE = 8ms a 200ms, com um tempo de intereco de 8ms) e para a medição T1, uma sequência de spin com repetição variável foi utilizado o tempo (TE = 8 ms, 6 TR = 200, 400, 800, 1500, 3000 e 5500 ms). Nos dois casos, as imagens foram obtidas com um campo de visão = 4 x 4 e uma

matriz = 256 x 256, 5 fatias de 2 mm). Para medições de relaxividade, as NCL carregadas com PQs foram diluídas com uma quantidade crescente de NCL brancas.

A avaliação da estabilidade luminescente das NCL-ZnOGd foi realizada em uma microplaca preta de 96 poços. Para isso, 40 µl de NCL contendo PQs ZnOGd20% modificados por HTMS colocados em contato com plasma de rato (40 µl) por diferentes tempos de incubação (0 a 6 horas) a 20 °C. Posteriormente, as emissões fotoluminescentes foram medidas em um leitor de microplacas Clariostar com comprimento de onda de excitação de 340 nm. Além disso, a imagem digital foi adquirida após a excitação com uma lâmpada UV ($\lambda_{exc} = 254 \text{ nm}$).

Foram realizadas técnicas de ressonância magnética clássica 1H e Aquisição de gradiente de campo pulsado de 1H (PFG-RMN), também chamada de espectroscopia de difusão ordenada (DOSY) para verificação do coeficiente de difusão (D), correlacionando com o raio hidrodinâmico dos diferentes grupos químicos das NCL contendo PQs para dessa forma, propor a localização dos PQs nas NCL.

4.7 Ensaios de citotoxicidade e captação celular

4.7.1. PQs modificados com GPTMS e dispersos em água

As células de fibroblastos embrionários de camundongo (NIH/3T3 - ATCC® CRL-1658™) foram semeadas em uma placa de 96 poços (5x10³ células/poço). Após 24 h foram adicionados pontos quânticos, modificados com GPTMS e dispersos em água (ZnOGd, GCIS/ZnS e ZnOGd-GCIS/ZnS (75-25) na faixa de concentração de 5-250 µg. mL⁻¹ usando meio DMEM para as diluições e incubado por 4 h. As células foram lavadas com PBS 1x adicionado meio DMEM e incubadas por mais 24 horas antes da adição de 20 µL de solução de resazurina (25 µg.mL⁻¹ em PBS) e 180 mL de DMEM sem vermelho de fenol que foram adicionados e incubados por 4 h. Em seguida, as análises dos poços foram realizadas no leitor de microplaca EnSpire® (PerkinElmer, EUA) em 570 nm. e a absorbância basal foi corrigida em 590 nm

O ensaio de captação celular foi realizado utilizando a linha celular NIH-3T3 - ATCC® CRL-1658™. As células foram semeadas em 24 poços de 3 x 10⁴ células por poço.

Diferentes concentrações foram testadas para os pontos quânticos. Os tempos de incubação testados foram de 6 e 24 horas. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas em PBS para remoção dos pontos quânticos que não foram capturados pelas células, e as análises de fluorescência foram realizadas em leitor de microplacas EnSpire® (PerkinElmer, EUA) com comprimento de onda de excitação em 360 nm e emissão seção a 550 nm.

4.7.2. PQs associados às NCL

As células de fibroblastos embrionários de camundongo (NIH/3T3 - ATCC® CRL-1658™) foram semeadas em uma placa de 96 poços (5×10^3 células/poço). Após 24 h foram adicionados pontos quânticos associados às NCL. As concentrações avaliadas foram escolhidas de acordo com o ensaio de citotoxicidade dos PQs não associados às NCL. Dessa forma, foram avaliadas 3 concentrações dos PQs associados às NCL: 20, 50 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para fins de comparação, as NCL vazias foram diluídas utilizando o mesmo fator de diluição para chegar nas concentrações acima, sendo que as porcentagens de NCL vazias em relação ao volume de meio foram 1, 2,5 e 12,5%. O meio DMEM para as diluições. As células foram lavadas com PBS 1x adicionado meio DMEM e incubadas por mais 24 horas antes da adição de 20 μL de solução de resazurina ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em PBS) e 180 mL de DMEM sem vermelho de fenol que foram adicionados e incubados por 4 h. Em seguida, as análises dos poços foram realizadas no leitor de microplaca EnSpire® (PerkinElmer, EUA) em 570 nm. e a absorbância basal foi corrigida em 590 nm.

O ensaio de captação celular foi realizado utilizando a linha celular NIH-3T3 - ATCC® CRL-1658™. As células foram semeadas em 24 poços de 3×10^4 células por poço. Diferentes concentrações foram testadas para os pontos quânticos. Os tempos de incubação testados foram de 6 e 24 horas. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas em PBS para remoção dos pontos quânticos que não foram capturados pelas células, e as análises de fluorescência foram realizadas em leitor de microplacas EnSpire® (PerkinElmer, EUA) com comprimento de onda de excitação em 360 nm e emissão seção a 550 nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PQs ZnO, ZnOGd e GCIS/ZnS (rota de síntese 1)

Neste tópico serão abordadas as caracterizações dos diferentes PQs sintetizados e conjugados com o GCIS/ZnS sintetizados pela rota 1.

5.1.1. PQs de ZnO e GCIS/ZnS-1 e GCIS/ZnS-2

Para a obtenção de PQs com propriedades magnéticas utilizadas nessa tese, foi realizada a síntese descrita por Yang e colaboradores 2015, com algumas modificações (YANG et al., 2015). Esses PQs são constituídos por um núcleo de Gadolínio, cobre, índio e enxofre (GCIS) e uma casca de sulfeto de zinco (ZnS). Diferentes proporções foram utilizadas entre o Gd, Cu, In e S (conforme descrito na tabela 1). Neste tópico serão abordados os resultados encontrados para os PQs de GCIS/ZnS-1 e GCIS/ZnS-2 e suas associações com os PQs de ZnO.

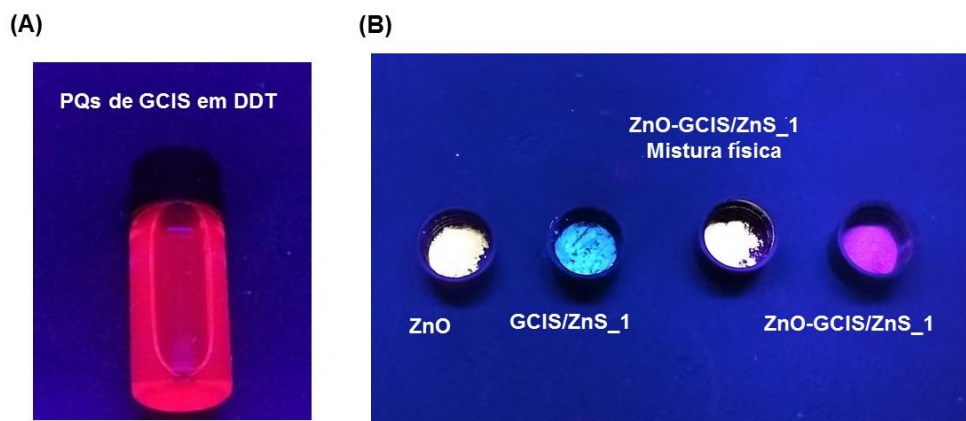
A figura 11 mostra os PQs sob lâmpada UV excitados a 365 nm de GCIS em DDT (A) e os PQs em forma de pó da esquerda para a direita de ZnO, GCIS/ZnS-1, mistura física entre ZnO-GCIS/ZnS-1 usando uma proporção massa-massa de ZnO e GCIS/ZnS-1 de 98 e 2%, respectivamente e ZnO-GCIS/ZnS-1 após o tratamento térmico a 300°C. Pode-se observar que antes da adição do ZnS, os PQs de GCIS apresentam coloração vermelha quando excitados a 365 nm (A), característica essa que muda após a adição de ZnS, resultado em um deslocamento da emissão para o azul, conforme observado nos PQs de GCIS/ZnS-1 (B). A mistura física dos PQs de ZnO com GCIS/ZnS-1 apresenta característica luminescente semelhante ao ZnO, no entanto, após o tratamento térmico, esses PQs adquirem uma nova emissão, podendo ser observada uma coloração rosa/roxa, o que indica mudança nas propriedades fotoluminescentes com o tratamento térmico a 300°C mesmo utilizando pequenas proporções de GCIS/ZnS.

O Tratamento Térmico (HT) é usado para induzir transformações de fases e estruturas para melhorar as propriedades de muitos materiais e pode promover a coalescência entre as partículas (CAETANO et al., 2016b; PIAO et al., 2008; RAOUFI; RAOUFI, 2009). Nós utilizados esse princípio para promover a junção entre os PQs. Além disso, mudanças na temperatura, podem alterar o tamanho dos PQs e,

consequentemente, suas emissões, como observado na figura 8 (mesmo com pequenas proporções dos PQs de GCIS/ZnS em relação aos PQs de ZnO, que nesse caso foi de 2%).

Lallo da Silva e colaboradores, 2019 realizaram tratamento térmico a 600°C para produzir nanopartículas de ZnO com diferentes tamanhos (Lallo da SILVA et al., 2019). Donat e colaboradores, 2017 realizaram o acoplamento de nanopartículas de ZnO com PQs contendo cobre, índio e enxofre (CIS) e sulfeto de zinco (ZnS) para a aplicação dessa associação em células solares (DONAT et al., 2017). Neste trabalho, o ZnO utilizado era de maior tamanho, não apresentando características luminescentes, sendo a associação feita por meio de um tratamento térmico a 400°C. No entanto, ao utilizar essa temperatura para os PQs sintetizados no nosso trabalho, resultou em perda da luminescência dos PQs. Por esse motivo, nós selecionamos a temperatura de 300°C, sendo possível manter a luminescência e mudar a emissão.

Figura 11. Imagens dos PQs de GCIS em DDT (A) e PQs em forma de pó da esquerda para direita: ZnO, GCIS/ZnS-1, ZnO-GCIS/ZnS-1 mistura física e ZnO-GCIS/ZnS-1 após o tratamento térmico a 300°C. Comprimento de onda de excitação: 365nm.



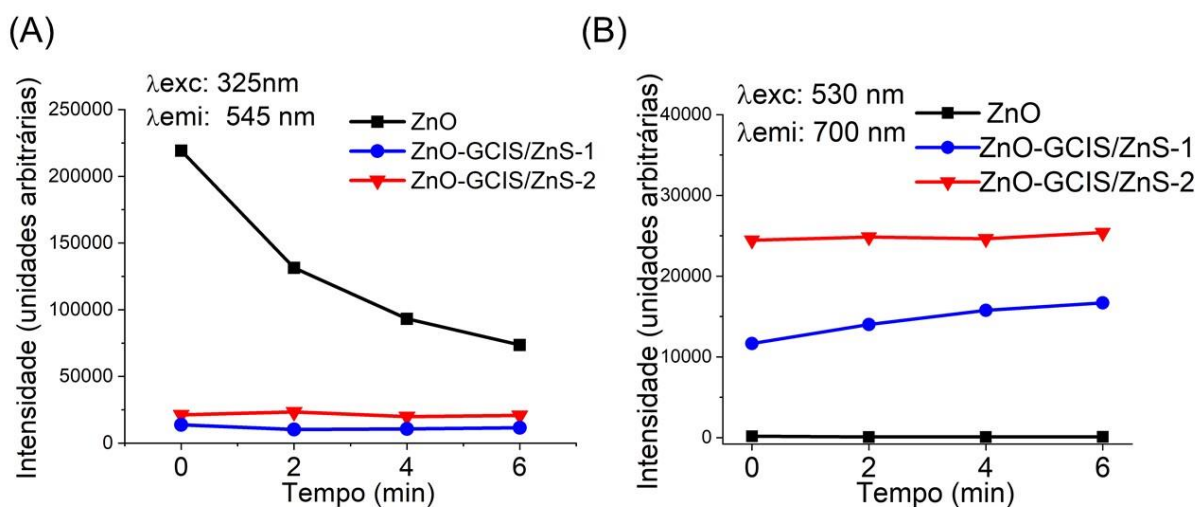
Uma das propostas de associar os PQs de GCIS/ZnS com o ZnO nessa tese foi para promover o aumento da estabilidade luminescente do ZnO. Sabe-se que após sucessivas excitações, o ZnO tem uma diminuição da sua intensidade de emissão fotoluminescente (CAMARDA et al., 2016; LI et al., 2015b).

A figura 12 mostra o decaimento das emissões após sucessivas excitações usando um leitor de microplacas. Quando os PQs de ZnO foram excitados a 325 nm, fixando a

emissão a 542 nm, houve uma diminuição na sua intensidade de emissão, dependentes do tempo de excitação. Após 4 excitações (com intervalo de tempo de 2 minutos cada, ou seja, 6 minutos no total), a intensidade fotoluminescente diminuiu. Em contrapartida, para os PQs conjugados ZnO-GCIS/ZnS, a intensidade fotoluminescente manteve-se constante (Figura 12-A). Esse dado mostra um indício de aumento da estabilidade fotoluminescente dos PQs de ZnO associados a GCIS/ZnS, mesmo utilizando proporções muito pequenas de GCIS/ZnS.

Para os PQs de ZnO, não houve emissão quando excitada a 530 nm. Por outro lado, o ZnO-GCIS/ZnS emitiu a 700 nm quando excitado a 530 nm (figura 12-B). Yang e colaboradores 2015 excitaram os PQs de GCIS/ZnS a 530 nm, portanto, a emissão dos PQs conjugados é associada ao GCIS/ZnS (YANG et al., 2015). Dessa forma, os PQs conjugados podem ser excitados em diferentes regiões e não apenas na UV, como os PQs de ZnO, mesmo com proporções muito pequenas de GCIS/ZnS.

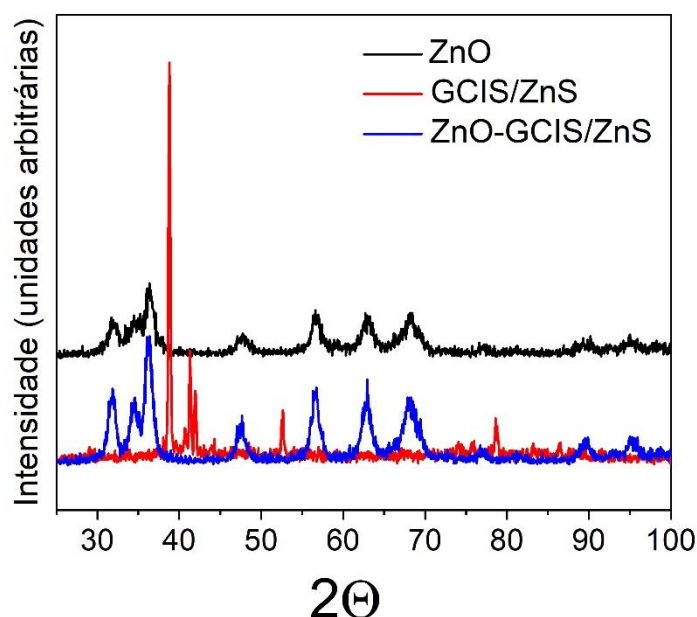
Figura 12. Decaimento da intensidade de fotoluminescência dos PQs em forma de pó após diferentes tempos de exposição ($\lambda_{exc}=325$ nm (A). Decaimento da intensidade de fotoluminescência dos PQs em forma de pó (B).



A figura 13 mostra as difrações de raios X dos PQs. Para os PQs de ZnO, os picos estão relacionados aos planos difratores (002), (101), (102), (110), (103) e (112) e correspondem a fase hexagonal do ZnO com estrutura de wurtzita, situados em $2\theta = 31,80; 34,47; 36,29; 47,60; 56,54, 62,94$ e $67,96^\circ$ indexada em JPDS file 36-1451. Já os PQs de GCIS/ZnS apresentam difração diferente dos encontrados na literatura para estes

PQs (esses resultados serão melhores descritos nos próximos tópicos). Após o acoplamento dos PQs, os perfis de DRX assemelham-se com o dos PQs de ZnO e não foram encontrados picos correspondentes ao GCIS/ZnS, possivelmente devido à baixa concentração destes (2%), sendo esse resultado condizente com os apresentados por Donat e colaboradores (2017) (DONAT et al., 2017).

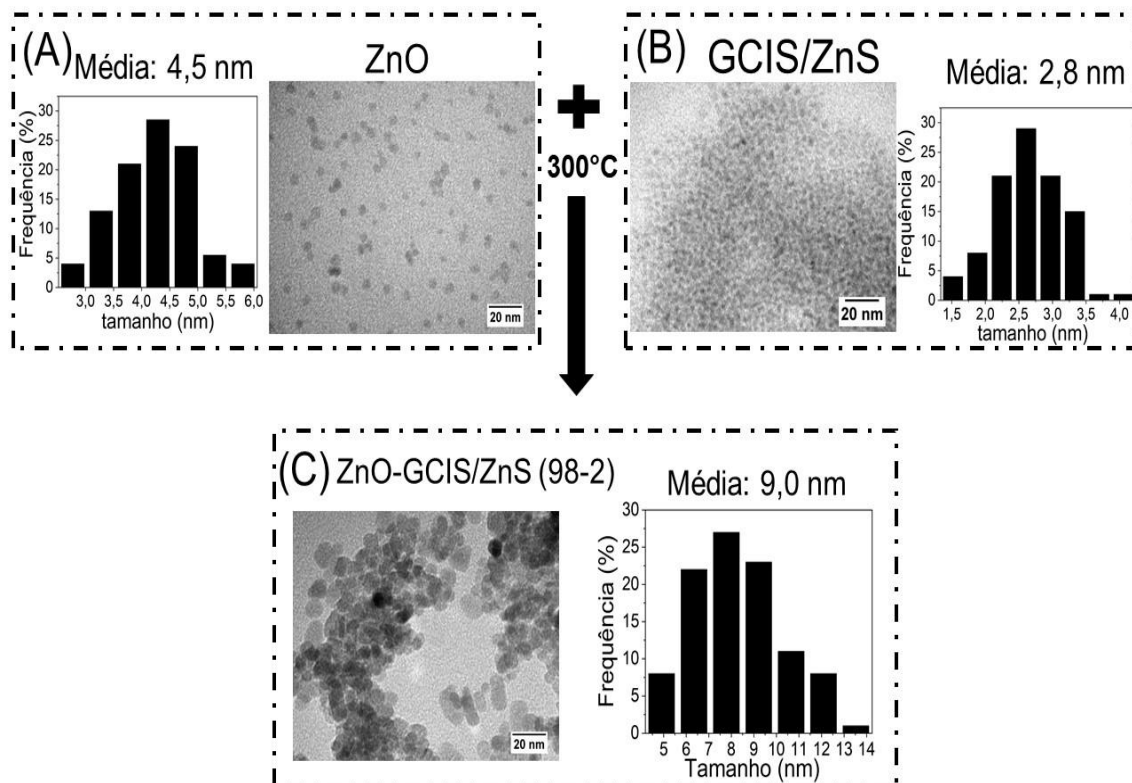
Figura 13. Difratomogramas de raios X dos PQs de ZnO, GCIS/ZnS e ZnO-GCIS/ZnS.



A figura 14 mostra as imagens de microscopia eletrônica de transmissão. Os PQs de ZnO apresentam uma média de tamanho de 4,5 nm, sendo 28,5 % das partículas contadas possuem 4,3 nm (A). Os PQs de GCIS/ZnS são menores que os PQs de ZnO e encontram-se de forma mais aglomerada, tendo uma média de tamanho de 2,7 nm, sendo que cerca de 30% tem 2,6 nm (B). Após a junção dos PQs, houve o aumento do tamanho das partículas. Os PQs de ZnO-GCIS/ZnS tiveram contagem predominante na ordem de 7,8 nm (27%), sendo a média encontrada de 9 nm. Os tamanhos obtidos para os PQs de ZnO sintetizados nessa tese são condizentes com os PQs sintetizados utilizando a rota sol-gel encontrados na literatura (CAETANO et al., 2016a; DA SILVA et al., 2019). Os PQs de GCIS/ZnS também apresentaram tamanho médio semelhante ao encontrado por Yang e colaboradores, de 3,0 nm, que foi a rota de síntese escolhida para produzir os PQs

de GCIS/ZnS nessa tese (YANG et al., 2015). Todavia, para os PQs de ZnO e GCIS/ZnS associados utilizando a temperatura de 300°C, não há dados na literatura, uma vez que essa associação representa uma inovação.

Figura 14. Microscopia eletrônica de transmissão (A) ZnO PQs, (B) GCIS/ZnS and ZnO-GCIS/ZnS (C).



Embora os PQs sintetizados utilizando uma menor concentração do núcleo de gadolínio, cobre e índio (GCIS/ZnS-1 e GCIS/ZnS-2) tenham resultado em uma emissão diferente do ZnO, sendo possível excitar não apenas no UV, mantendo inclusive a intensidade fotoluminescente mesmo após sucessivas excitações (figura 10), a coloração azul dos PQs de GCIS/ZnS-1 mostra que há provavelmente muito ZnS para o núcleo GCIS. Além do objetivo de melhoria da estabilidade, a associação dos PQs de ZnO com GCIS/ZnS, teve por intuito deslocar a emissão mais próxima ao vermelho, além de conferir propriedades magnéticas.

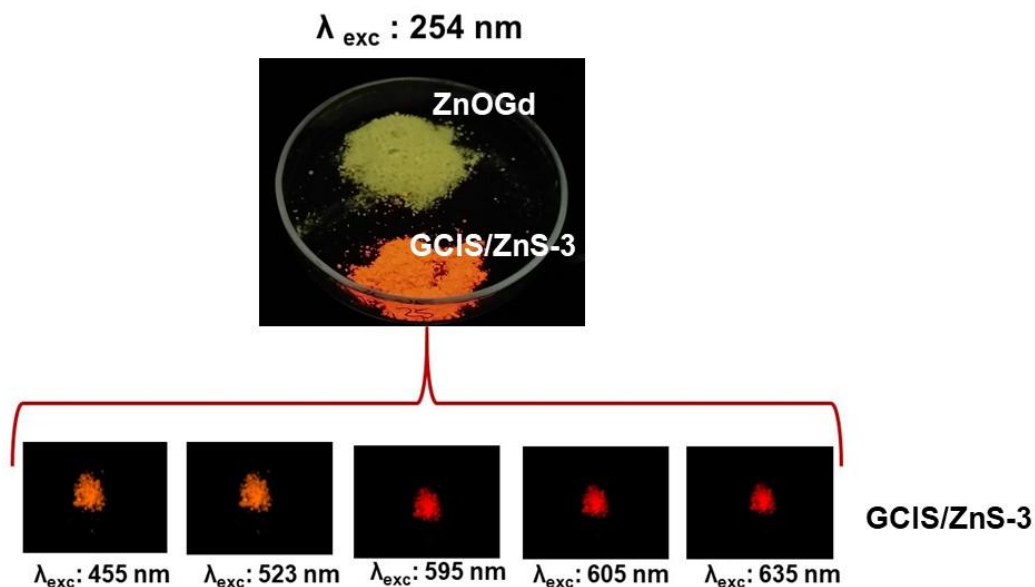
Nesse sentido, foi necessário aumentar a concentração dos reagentes para a síntese do núcleo GCIS, resultado na amostra GCIS/ZnS-3, que será a escolhida para prosseguir as caracterizações. Além disso, uma outra estratégia foi usada para aumentar a proporção

de Gd. Dessa forma, os PQs de ZnO foram dopados com Gd (necessário para melhorar o contraste da ressonância magnética, dados apresentados posteriormente).

5.1.2. PQs de ZnO dopados com Gd e GCIS/ZnS-3

A figura 15 mostra a emissão dos PQs de ZnOGd e PQs de GCIS/ZnS-3 quando iluminados com lâmpadas utilizando o equipamento Maestro in vivo imaging system. Quando submetidos à excitação com uma lâmpada UV a 254 nm, foi possível observar que os PQs de ZnOGd apresentam emissão de cor verde. Para os PQs de GCIS/ZnS a maior concentração de Gd, Cu e In culminaram na emissão de cor laranja, diferente da amostra GCIS/ZnS-1 e GCIS/ZnS-2 em que a coloração após a excitação no UV era azul. É possível observar que os PQs de GCIS/ZnS-3 apresentam luminescência quando excitados com uma lâmpada UV, mas também quando excitados fora da região do UV, do azul até vermelho (455nm-635nm), diferentemente dos PQs de ZnOGd, que possuem luminescência apenas quando excitados com lâmpada UV.

Figura 15. Emissão dos PQs de ZnOGd e PQs de GCIS/ZnS-3.



A temperatura e o tempo de aquecimento são fatores que podem influenciar na formação dos PQs e promover processos de agregação e coalescência das partículas, portanto, pode alterar o tamanho e consequentemente a luminescência, (CAETANO et

al., 2016a; DA SILVA et al., 2019; RAOUFI; RAOUFI, 2009; TOKUMOTO et al., 2003).

Embora estudos tenham demonstrado a associação de nanopartículas de ZnO com PQs semelhantes ao sintetizados nesse trabalho (contendo Cu, In e S, associados ou não ao ZnS), a aplicação nesses trabalhos tem enfoque na produção de células solares e as nanopartículas de ZnO não são luminescentes, pois são de tamanhos maiores. Dessa forma, Donat e colaboradores 2017 realizaram a associação de nanopartículas de ZnO com PQs de CIS/ZnS por meio de um tratamento térmico a 400°C (DONAT et al., 2017). A princípio, nessa tese, foi utilizado a mesma temperatura, no entanto os PQs perderam a luminescência.

Por esses motivos, a temperatura foi um dos parâmetros avaliados na etapa de tratamento térmico. Além disso, foram avaliadas diferentes proporções entre os PQs de ZnOGd e GCIS/ZnS-3 para otimizar os parâmetros de síntese. Esses parâmetros foram alterados para que, juntamente com as imagens de ressonância magnética, que serão apresentadas posteriormente, possamos escolher qual é a proporção que oferecerá melhor contraste junto com as melhores características luminescentes. A tabela 4 mostra as diferentes proporções e temperaturas utilizadas neste estudo.

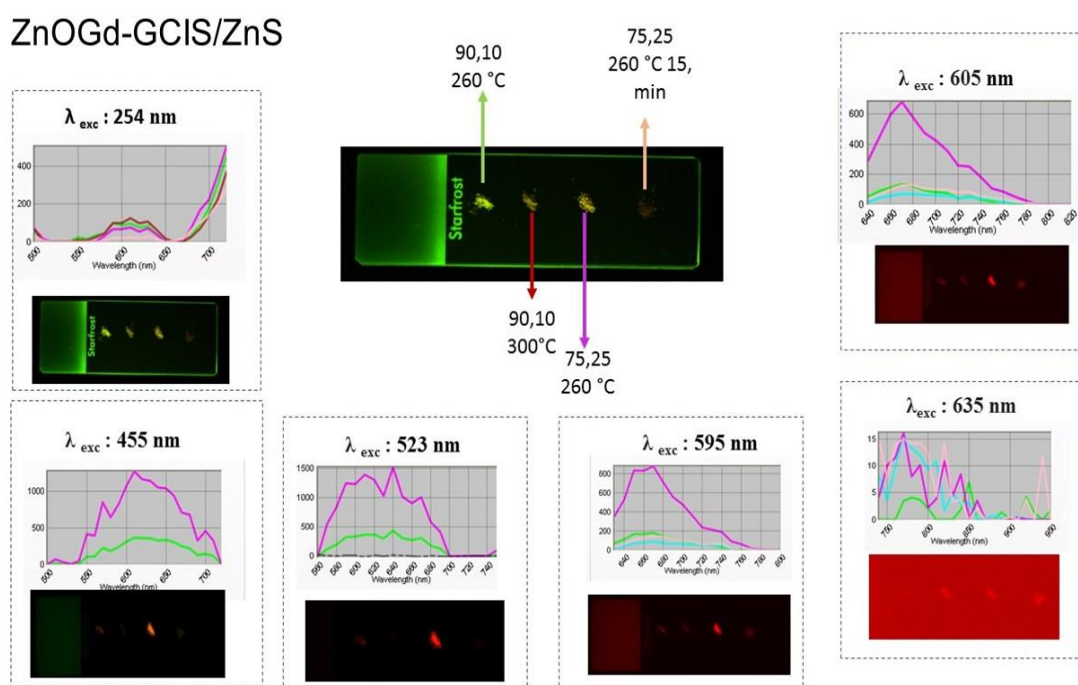
Tabela 4. Diferentes proporções e temperaturas utilizadas para o acoplamento dos PQs.

Amostra	Proporções (%)	Temperatura
ZnOGd-GCIS/ZnS-3	98/2	300°C e 260°C
	90/10	300°C e 260°C
	75/25	260°C
	50/50	260°C

Foram selecionadas amostras presentes na tabela 4 com a finalidade de estabelecer qual a temperatura e o tempo de aquecimento culminariam em uma amostra com maior intensidade fotoluminescente. Para isso, selecionamos os PQs de ZnOGd associados aos PQs de GCIS/ZnS-3, pois estes serão os PQs utilizados nas caracterizações seguintes por terem apresentado características luminescentes desejáveis. A figura 16 uma comparação entre os PQs de ZnOGd-GCIS/ZnS acoplados utilizando a proporção 90% de ZnOGd e

10% de GCIS/ZnS mas com diferentes temperaturas de aquecimento e mantendo o tempo de 5 min (300 e 260°C). Além disso, também foram comparados PQs submetidos a mesma temperatura de 260°C, mas alterando o tempo de aquecimento para a amostra preparada com 75% de ZnOGd e 25% de GCIS/ZnS. Os resultados apresentados mostram que quanto maior o tempo de aquecimento e maior a temperatura, menor a intensidade fotoluminescente. Dessa forma, os PQs tratados termicamente a 260°C por cinco minutos foram selecionados para prosseguir as caracterizações.

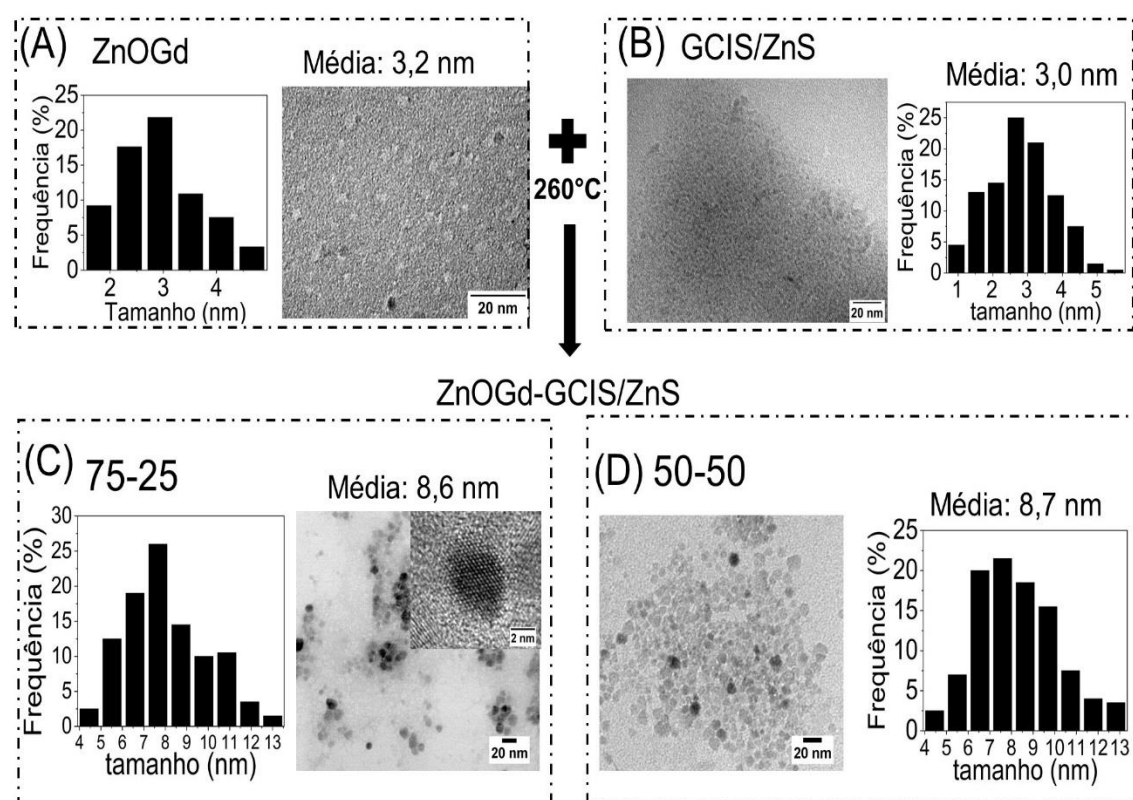
Figura 16. Emissões encontradas para diferentes condições de tratamento térmico e proporções utilizadas entre os PQs de ZnOGd e GCIS/ZnS-3.



A figura 17 corresponde às micrografias obtidas através da microscopia eletrônica de transmissão dos PQs preparados utilizando diferentes proporções entre os PQs de ZnOGd e GCIS/ZnS-3 aquecidos a 260°C. Os PQs de ZnOGd bem como os conjugados, apresentaram morfologia quase que esférica. A contagem de 200 partículas foi efetuada para realizar a distribuição de tamanho. Para os PQs de ZnOGd (A), o tamanho médio dos PQs encontra-se na ordem de 3,2 nm, enquanto para os PQs de GCIS/ZnS (B), a média do tamanho das partículas possuem por volta de 3,0 nm, resultado esse condizente com a o encontrado por Yang e colaboradores (YANG et al., 2015). Após o tratamento térmico, os PQs de ZnOGd-GCIS/ZnS sintetizados utilizando uma proporção massa-

massa de 75% e 25% (C) e 50-50% (D), respectivamente, aumentaram de tamanho, indicando a coalescência das partículas. A média de tamanho encontrada, utilizando diferentes proporções de ZnO Gd e GCIS/ZnS foi praticamente a mesma, o que indica que a temperatura utilizada para o tratamento teve uma influência maior no tamanho dos PQs obtidos que a proporção de cada PQ utilizada para a conjugação. Para a amostra de ZnOGd-GCIS/ZnS (C) foi possível observar um espaçamento interplanar de 0,26, correspondente ao plano (002) da estrutura wurtzita. É importante destacar que a presença do Gd nos PQs de ZnO resultou uma pequena diminuição do tamanho, quando comparamos a microscopia apresentada anteriormente (figura 14). Essa diminuição do tamanho é um resultado já esperado, também encontrado por Liu e colaboradores (2011), que observaram que quanto maior a proporção de Gd associado aos PQs de ZnO, menor foi o tamanho obtido (LIU et al., 2011b).

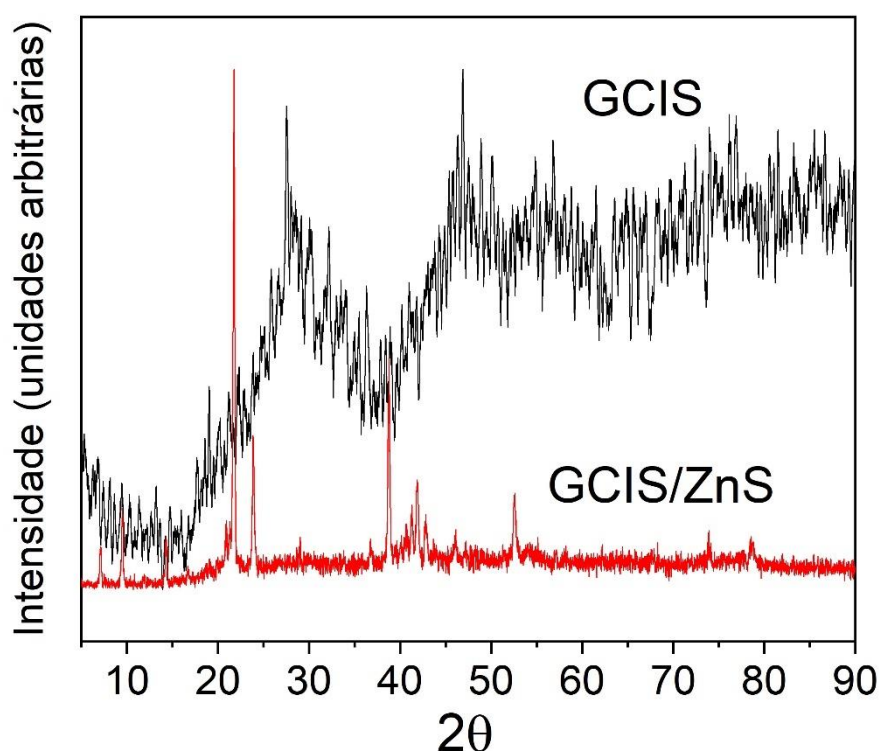
Figura 17. Imagens de Microscopia eletrônica de transmissão e distribuição de tamanho dos PQs de (A) ZnOGd, (B) GCIS/ZnS e PQs conjugados através do tratamento térmico utilizando diferentes proporções de ZnOGd e GCIS/ZnS de 75-25% (C) e 50-50% (D).



A figura 18 mostra uma comparação entre as difrações de raios X dos PQs de GCIS e GCIS/ZnS. Os PQs de GCIS apresentam o difratograma semelhante ao encontrado por

Yang e colaboradores 2015, em que foram observados três picos alargados situados 2θ com valor de $27,46^\circ$; $46,87^\circ$ e $56,05^\circ$. De acordo com Donat e colaboradores (2017) esses picos são correspondentes aos planos cristalográficos (112), (204)/(220) e (116)/(312) da estrutura tetragonal de calcopirita dos PQs de CIS (DONAT et al., 2017; YANG et al., 2015). Após a introdução do ZnS não fica claro a presença desses picos. Para os PQs de GCIS/ZnS foi possível observar a formação de novos picos intensos, sendo que o mais intenso está situado em 2θ com valor de $21,82^\circ$. No entanto, em estudos encontrados para PQs semelhantes a esse, não foram apresentados os difratogramas em 2θ menor que 25° (DONAT et al., 2017; YANG et al., 2015).

Figura 18. Difratogramas de raios X dos PQs de GCIS e GCIS/ZnS (rota 1)



A possibilidade de formação de uma mistura de fases, dependendo da razão molar utilizada entre o In e o Cu para a formação dos PQs, foi discutida por Zhang e colaboradores 2015. Nesse estudo foram sintetizados PQs utilizando diferentes razões molares entre o Cu, In e Zn. Quando foi utilizada uma razão estequiométrica entre o Cu

e In de 1:1 os pesquisadores sugeriram a formação da coexistência da estrutura de calcopirita dos PQs de CIS e estrutura wurtzita do CuS (ZHANG et al., 2015). A razão utilizada entre Cu e In no nosso trabalho para a síntese dos PQs também foi de 1:1, no entanto, vale ressaltar que nossa síntese possui diferenças quando comparado com o artigo de Zhang e colaboradores 2015 sendo que este também não mostrou os difratogramas em ângulos menores que 2θ igual a 25° .

De acordo com esses dados, foi levantado a hipótese de que, após a introdução do ZnS, os reagentes utilizados, tais como: 1-octadeceno, olealemina e ácido oleico se arranjam de tal forma que dão origem à uma estrutura cristalina. Isso é embasado, pois antes de adicionar o ZnS, não foi possível observar esses picos à baixos ângulos para o núcleo GCIS, conforme demonstrado na figura 18.

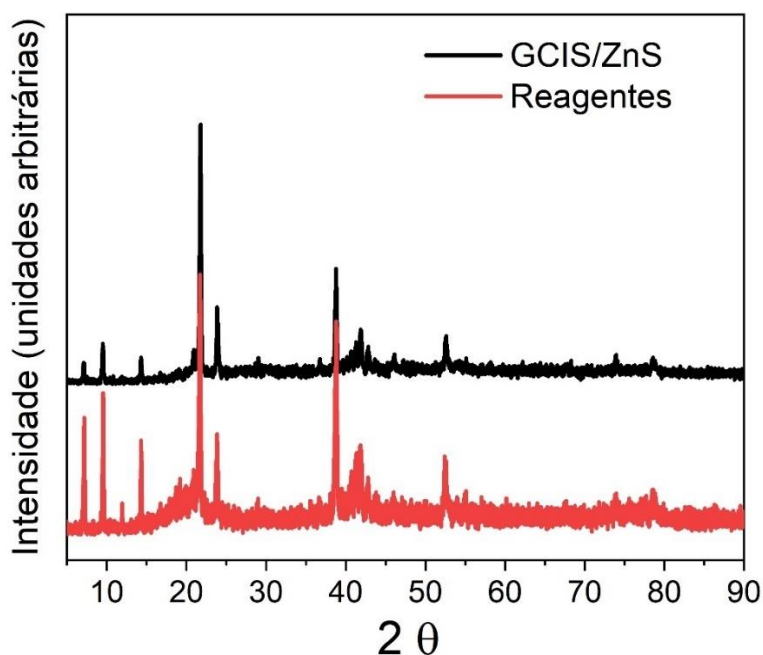
Uma outra hipótese é que após o resfriamento do GCIS/ZnS e reaquecimento a 220°C para a introdução do ZnS, o DDT cristalice. Essa hipótese foi levantada, pois, em um estudo desenvolvido por Ang et al, 2017 houve a presença de picos intensos situados entre 2θ de 10° a 40° , sendo que os pesquisadores atribuíram esses picos intensos ao arranjo DDT, que se auto-arranjam em monocamadas compactas tridimensionais com nanopartículas metálicas (ANG; CHIN, 2005).

Uma outra possibilidade é que além desse arranjo do DDT, com a adição do Zn por meio da introdução do ZnS, novos picos relativamente intensos aparecem situados em 2θ igual a 38° e 57° mude a fase dos PQs. Em uma pesquisa realizada por Singh e colaboradores, esses picos foram relacionados à estrutura de wurtzita de nanobastões de Cu-In-Zn-S, situados em aproximadamente 38° e 57° , correspondentes aos planos difratores (102) e (103), respectivamente (SINGH et al., 2015). De acordo com a figura 18, há também a presença de um pico intenso localizado em 2θ igual a 38° .

Gromova e colaboradores 2017, atribuíram pela técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) picos que corresponderam uma estrutura lamelar formado pelo intermédio da reação, gerado a 100°C , após o resfriamento até a temperatura ambiente. Sendo que, a distância característica encontrada $d = 2\pi/q_1 = 34.9 \text{ \AA}$ correspondeu a uma boa aproximação do dobro do comprimento de um DDT. Dessa forma, seguindo a largura dos picos do DRX a baixo ângulo, os autores encontraram que o domínio da estrutura lamelar foi de 45 a 50 nm, ou seja, 13 a 15 camadas foram empilhadas (GROMOVA et al., 2017)

Para confirmar a nossa hipótese, foi realizada uma síntese sem a adição dos sais de Cu, In, Gd e Zn. Dessa forma, todos os reagentes utilizados foram misturados e submetidos ao aumento e diminuição da temperatura pelos tempos determinados, conforme descrito na metodologia para a síntese dos PQs de GCIS/ZnS. Ao final da síntese, após a adição do etanol, houve a formação de um precipitado branco. A figura 19 mostra uma comparação dos difratogramas de raios X dos PQs de GCIS/ZnS com esse precipitado formado pelos reagentes, mas excluído os materiais inorgânicos. Os resultados mostraram que todos os picos encontrados ficam sobrepostos, confirmando a hipótese de que esses picos correspondem a fase orgânica que não foi eliminada dos PQs. Ainda, não é possível observar os picos correspondentes aos PQs de GCIS, conforme demonstrado na figura 18, pois, provavelmente, estes são muito alargados e podem estar mascarados pelos picos intensos dos reagentes orgânicos.

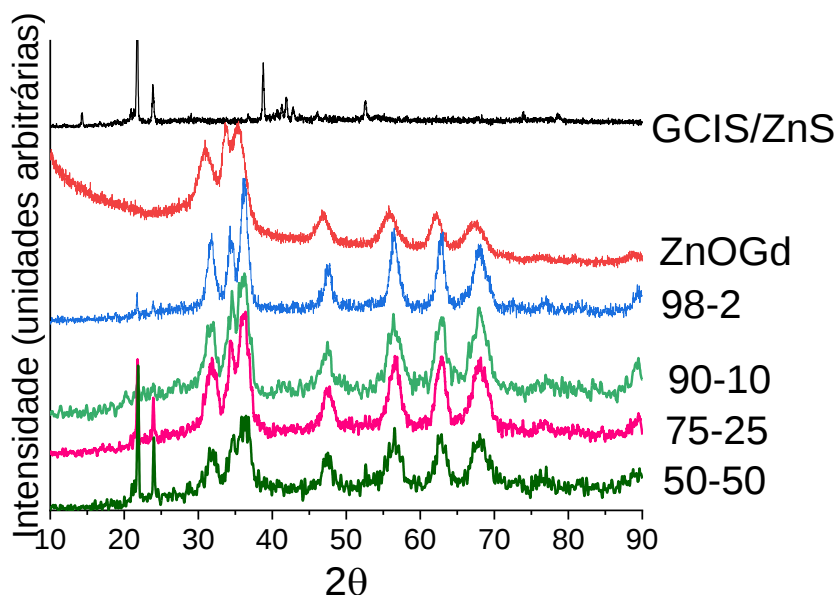
Figura 19. Comparação dos Difratogramas de raios X dos PQs GCIS/ZnS (rota 1) e da síntese utilizando apenas os reagentes orgânicos, sem adição de Cu, In, Zn e Gd.



A figura 20 mostra os difratogramas dos PQs de ZnOGd, GCIS/ZnS e suas associações em diferentes proporções, após o tratamento térmico à 260°C. Para os PQs de ZnOGd, os picos mostrados no DRX correspondem a fase hexagonal do ZnO com estrutura de wurtzita, a qual apresenta picos correspondentes aos planos difratores (100),

(002), (101), (102), (110), (103) e (112), situados em $2\theta = 31,80; 34,47; 36,29; 47,60; 56,54, 62,94$ e $67,96$ e está indexada em JPDS file 36-1451 (JANAKI; SAILATHA; GUNASEKARAN, 2015). Após a associação dos PQs de ZnOGd com GCIS/ZnS não observamos mais os picos referentes aos PQs de GCIS/ZnS em ângulos maiores que 2θ igual à 25° . No entanto, para os PQs associados, independente da proporção utilizada, os picos mais intensos do GCIS/ZnS estão presentes em $2\theta = 21,68^\circ$ e $24,11^\circ$, que ficam mais intensos conforme aumenta a proporção de GCIS/ZnS.

Figura 20. Comparação entre os difratogramas de raios X dos PQs de GCIS/ZnS, ZnOGd e suas respectivas associações após o tratamento térmico à 260°C .

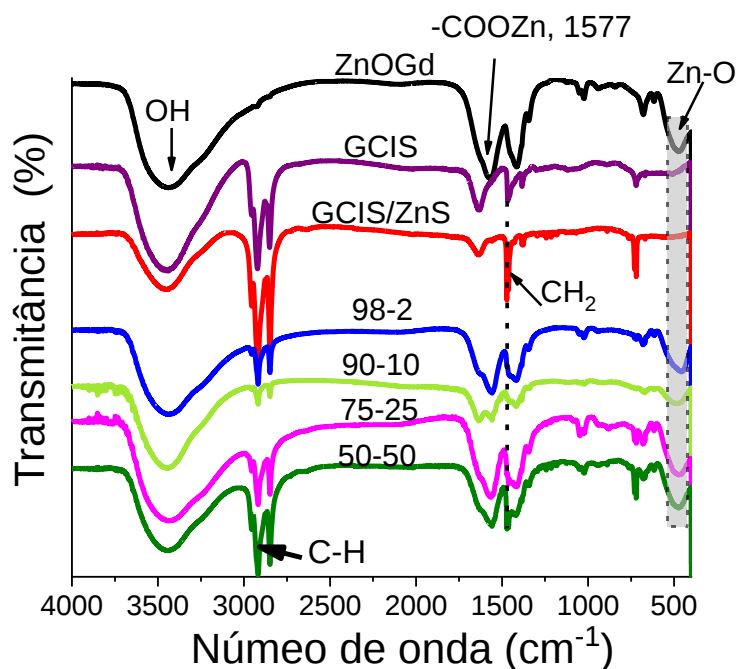


A figura 21 mostra os espectros vibracionais na região do infravermelho para os PQs de ZnOGd GCIS/ZnS e suas associações em diferentes proporções após o tratamento térmico a 260°C . Para os PQs de ZnOGd, GCIS/ZnS e suas associações foi possível observar uma banda de absorção a 3400 cm^{-1} , característica dos grupos hidroxilas OH, indicando a presença de água na superfície do cristal (FAKHRI; MAHJOUB; KHAVAR, 2014). Além disso, para os PQs de ZnOGd foi observada bandas associadas do estiramento simétrico e assimétrico dos grupos acetato na região de $1400\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ (RISSI; HAMMER; CHIAVACCI, 2017). Nos PQs de ZnOGd, é possível observar

vibrações características da ligação Zn-O em 470 cm^{-1} , (CAMARDA et al., 2016; FAKHRI; MAHJOUB; KHAVAR, 2014). Os PQs de GCIS e GCIS/ZnS apresentam estiramentos simétricos e assimétricos atribuídos à ligação C-H, situados entre 2963 e 2853 cm^{-1} . Essa ligação pode estar tanto associada ao DDT quanto aos outros reagentes utilizados para a formação do ZnS. Jayabharathi e colaboradores encontraram para o DTT duas bandas devido ao alongamento assimétrico e simétrico do metileno em 2920 e 2850 cm^{-1} , respectivamente. Os PQs de GCIS/ZnS também possuem vibrações nesses mesmos números de onda. Essas bandas também podem ser encontradas tanto para os espectros de infravermelho da olealemina quanto do ácido oleico (MARTINAZZO, 2013), que são reagentes utilizados para a formação do ZnS. Jayabharathi e colaboradores associaram as bandas presentes em torno de $1400\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$ são devido ao metileno que adotam uma configuração em zigue-zague trans (JAYABHARATHI et al., 2017).

Após a junção dos PQs de ZnOGd com GCIS/ZnS, é possível observar tanto as vibrações características dos PQs de ZnOGd, quanto as características do GCIS/ZnS. Em 1461 cm^{-1} foi encontrado uma banda correspondente a deformação simétrica do CH_2 . Como após a conjugação dos PQs, realizada através do tratamento térmico, essas vibrações continuam a aparecer, isso indica que o tratamento térmico não retira os reagentes utilizados na síntese (MARTINAZZO, 2013). Em contrapartida, isso pode facilitar a dispersão dos PQs em solventes orgânicos e atuar como agentes estabilizantes. O DDT foi encontrado como um agente estabilizante de PQs (GROMOVA et al., 2017).

Figura 21. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho dos PQs de ZnOGd, GCIS, GCIS/ZnS e PQs de ZnOGd-GCIS/ZnS preparados com diferentes proporções entre os PQs de ZnOGd e GCIS/ZnS.



A figura 22 mostra as análises termogravimétricas (TG) dos PQs de ZnOGd, GCIS/ZnS e dos PQs conjugados nas proporções 75% e 25%, respectivamente. Os dados de TG mostram dois eventos importantes para os PQs de ZnOGd (A). O primeiro consiste em uma perda de massa até 100°C, que pode ser oriunda da perda de resíduos de solvente, como etanol e água, que ainda pode estar presente na amostra. O segundo evento consiste na perda a partir de 100°C (que perdeu cerca de 5% até 120°C) até 400°C, podendo indicar a decomposição de resíduos de compostos orgânicos, como por exemplo a perda do grupamento acetato, oriundo do acetato de zinco utilizado para realizar a síntese dos PQs de ZnO, que ainda pode estar presente na amostra (RAOUFI; RAOUFI, 2009). Os PQs de GCIS/ZnS (B) possuem um evento de fusão atingindo a máxima temperatura a 57,16°C. A partir de 200°C, os PQs começam a sofrer uma acentuada decomposição, oriunda dos solventes orgânicos presentes, tais como o DDT.

Os PQs conjugados apresentaram uma característica intermediária entre a perda de massa do ZnOGd e do GCIS/ZnS (A). O evento de fusão que antes foi encontrado a 57,16°C para o GCIS/ZnS deslocou para 54,96°C para os PQs associados, sendo que foi

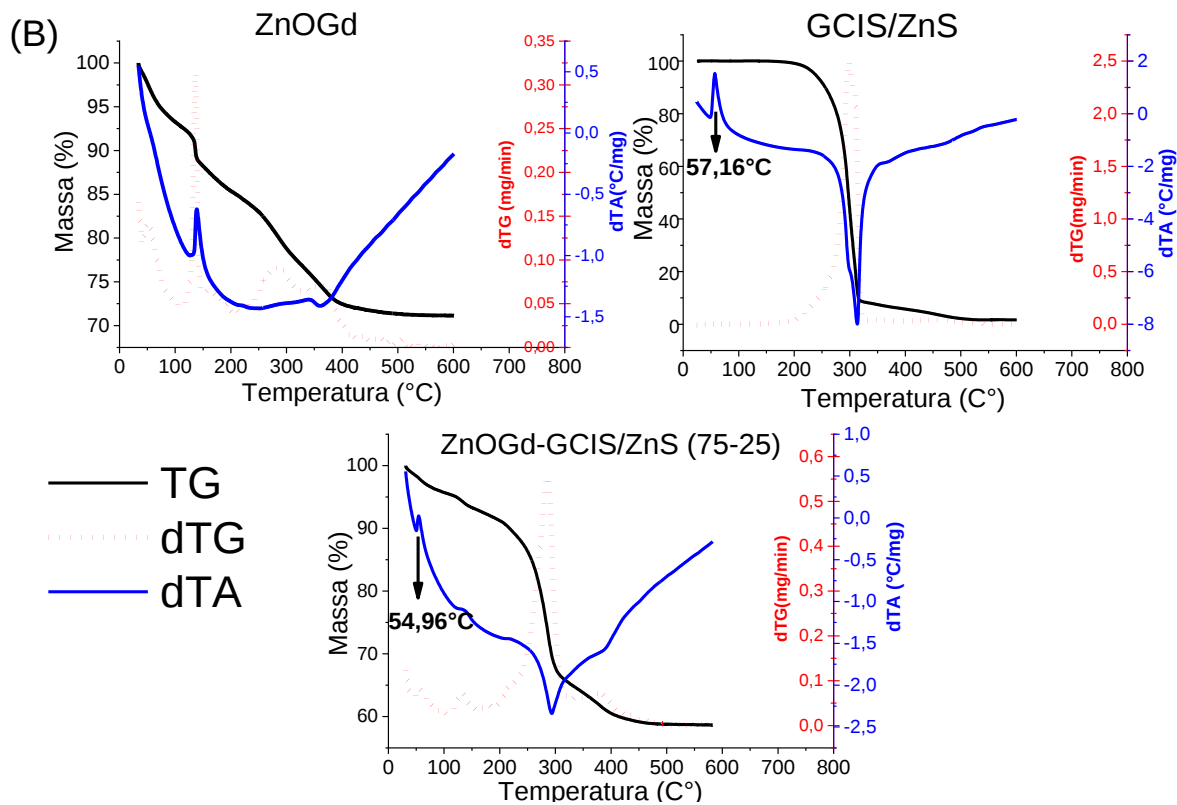
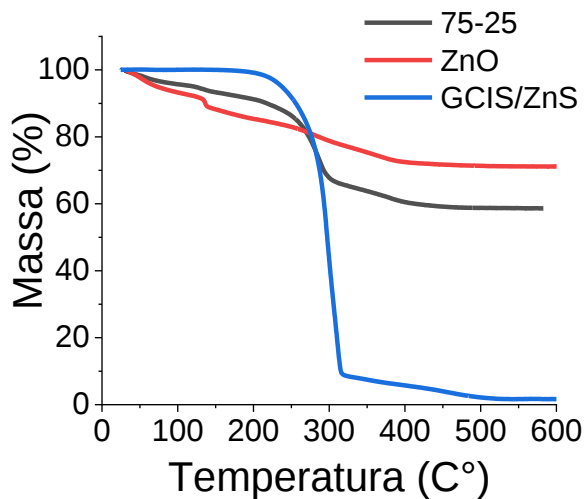
possível observar uma diferença nessa taxa de cerca de 10 vezes, que para os PQs de GCIS/ZnS foi de 0,4142°C/min e os PQs associados foi de 0,04155 °C/min (B). Essa diferença tanto na taxa quanto na temperatura de fusão indica a interação dos PQs de ZnOGd com GCIS/ZnS.

Foi possível observar com a técnica de TG que de fato, os reagentes da síntese não foram totalmente eliminados com o tratamento térmico, devido à perda de massa ainda acentuada à elevadas temperaturas, para os PQs após sua associação por meio do tratamento térmico a 260°C. Esse indício, já encontrado nas outras técnicas foi mais uma vez demonstrado pela análise termogravimétrica.

Dessa forma, sugerimos que tanto do DDT quanto dos outros reagentes utilizados para a síntese, se arranjam de tal forma a interagir com os PQs e protegem sua luminescência, não podendo ser eliminados completamente. Essa hipótese é suportada pois, quando utilizamos maiores temperaturas para o tratamento térmico (300°C) maior porcentagem de matéria orgânica é perdida e menor intensidade de fotoluminescência foi encontrada (figura 14). Ainda, segundo Wada e colaboradores 2017 maior perda de massa dos CIS/ZnS na análise de TG foi atribuída ao DDT em altas temperaturas, que diminuiu após as modificações de superfície PQs (WADA et al., 2017).

Figura 22. Análises termogravimétricas (TG) e (B) TG, dTA e dTG dos PQs de ZnOGd, GCIS/ZnS e dos PQs conjugados nas proporções 75% e 25%.

(A)



O DDT é utilizado com o sem ODE como solvente para a síntese de PQs de CIS ou CIS/ZnS. Há uma clivagem das ligações C-S do DDT à altas temperaturas, que fornece a fonte de enxofre para a reação (RAZGONIAEVA et al., 2018; WANG et al., 2018). Esse método origina PQs com alta intensidade de fotoluminescência. Entretanto, Akdas e colaboradores demonstraram que o ODE pode interagir com o DDT e formar sulfeto de tioéter dodeciloctadecil (AKDAS et al., 2015). Além disso, PQs de CIS preparados com DDT demonstraram ser revestidos com ligantes de dupla camada, em que DDT é a camada interna e didodecil sulfeto (DS) é a camada externa densa com longas cadeias de carbono forma um revestimento isolante em torno dos PQs (GROMOVA et al., 2017). Os PQs de CIS ou CIS/ZnS podem explorados para a aplicação em eletroluminescência. Formando um isolante, isso atrapalharia a essa aplicação por dificultar a transmissão do éxciton. Ainda, é difícil a remoção desses dois ligantes sem afetar as propriedades óticas dos PQs (WANG et al., 2018). Por exemplo, mesmo mudando os solventes utilizados para realizar as lavagens, ainda é difícil a remoção. Conforme demonstrado por Akdas e colaboradores, utilizando uma proporção de ácido acético e acetona, houve uma menor carga orgânica no material, no entanto, a porcentagem de material orgânico ainda foi considerável sendo que a intensidade de emissão de fotoluminescência também diminuiu (AKDAS et al., 2015).

Para a associação dos PQs com os nanocarreadores, foi necessário realizar sua modificação de superfície dos PQs para manter a luminescência. Para isso, foi escolhido um organosilano, o HTMS que permite a dispersão dos PQs em solventes orgânicos e fases oleosas. A figura 23 mostra a absorbância dos PQs sem (A) e com (B) modificação de superfície, dispersos em clorofórmio. Para os PQs de ZnOGd sem modificação e após modificação foi possível calcular o tamanho dos PQs através da fórmula de Brus (BRUS, 1986). A determinação do tamanho médio das NP de ZnO pode ser calculada a partir do comprimento de onda limite (λ_c), por meio do método proposto por Nedeljkovic, determinado através da intersecção da tangente ao pico excitônico até o limiar do comprimento de onda (NEDELIJKOVIC et al., 1993). A partir do λ_c , com a equação 3 proposta por Brus foi possível calcular o tamanho médio dos PQs já que o comprimento de onda limite está relacionado com a banda proibida ($E_g = h_c / \lambda_c$), onde h é a constante de Planck e c é a velocidade da luz, encontrando o valor de E_g é possível obter o raio da partícula.

Os PQs de ZnO Gd com e sem modificação de superfície tiveram um raio médio de 3,6 nm. Os PQs mantiveram sua luminescência após a modificação de superfície com HTMS. Para os PQs de GCIS/ZnS foi possível observar tanto absorção na região do UV quanto do visível. Esse amplo espectro de absorção dos PQs ternários ou quaternários baseados em cobre já é descrito na literatura como uma grande vantagem, pois permite uma série de aplicações. Quando comparamos os PQs de GCIS com os PQs de GCIS/ZnS sem modificação de superfície, é possível observar que há um deslocamento do espectro de absorção para o azul. Esse deslocamento ocorre pela introdução do zinco, sendo que geralmente quanto maior a proporção de Zn introduzindo, maior o deslocamento (BAI; PURCELL-MILTON; GUN'KO, 2019). Após a conjugação dos PQs de ZnOGd com GCIS/ZnS, os espectros de absorção assemelham-se ao espectro de absorção dos PQs de ZnO, com máximo por volta de 360 nm.

$$E_{g(QD)} = E_{bulk} + \frac{h^2}{8R^2} \left(\frac{1}{m_e^*} + \frac{1}{m_h^*} \right) - \frac{1.786e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r R^2}$$

(Equação 3.)

Onde:

E_g = gap de energia da partícula;

E_g^{bulk} = gap de energia da partícula semicondutora;

$h = h/2\pi$, sendo h constante de Plank, assumindo valor de $6,62 \times 10^{-34}$ J·s

R = raio da partícula;

e = carga do elétron = $1,603 \times 10^{-19}$ C;

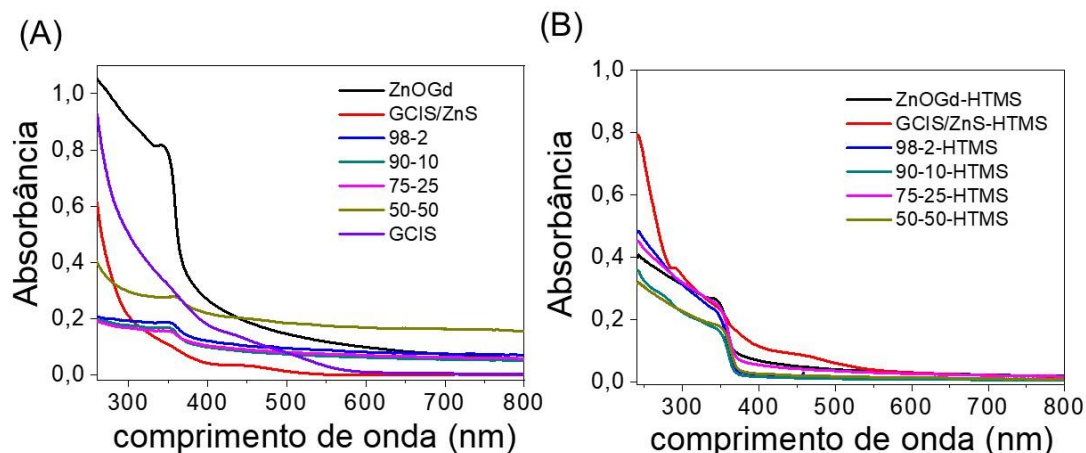
ϵ_0 = permissividade do espaço livre = $8,854 \times 10^{-14}$ F;

ϵ = permissividade relativa = 3,7;

m_e^* = massa efetiva do elétron = 0,24;

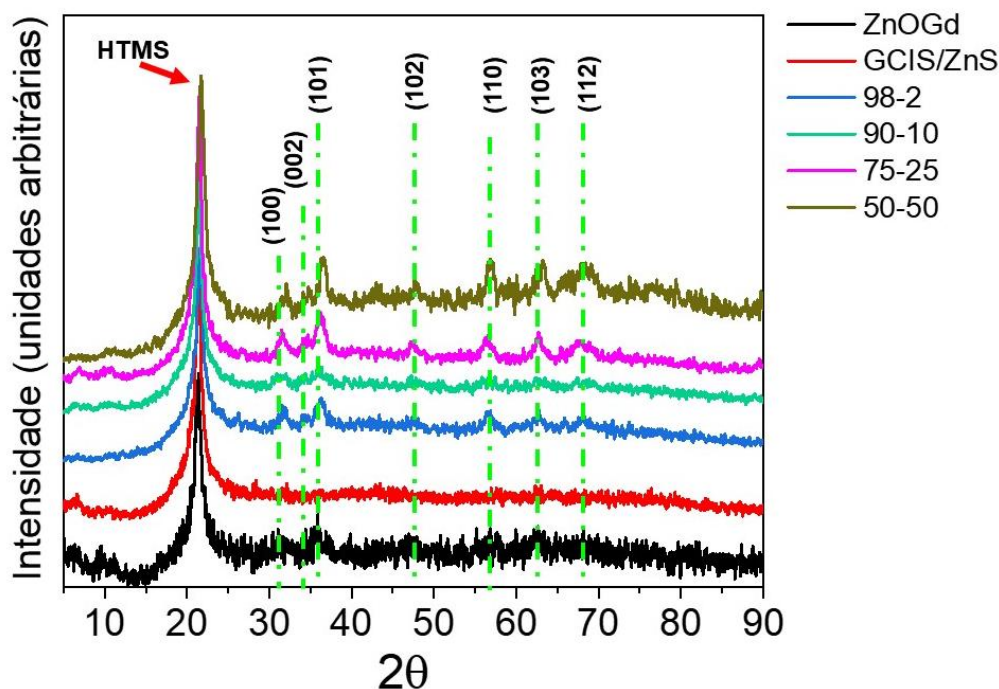
m_h^* = massa efetiva do buraco = 0,45

Figura 23. Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-vis) dos PQs dispersos em clorofórmio sem (A) e com modificação de superfície (B).



A figura 24 mostra os difratogramas de raios X dos PQs de ZnOGd, GCIS/ZnS e os PQs conjugados modificados pelo HTMS. Foi possível observar para os PQs de ZnOGd e os PQs conjugados, indicado na forma de reta tracejada em verde, a presença da fase hexagonal do ZnO com estrutura de wurtzita, a qual apresenta picos correspondentes aos planos difratores (100), (002), (101), (102), (110), (103) e (112), situados em $2\theta = 31,80; 34,47; 36,29; 47,60; 56,54; 62,94$ e $67,96$ (JANAKI; SAILATHA; GUNASEKARAN, 2015; SPANHEL; ANDERSON, 1991). Conforme aumentou a proporção de GCIS/ZnS houve um pequeno deslocamento do plano (002) para maior ângulo. Para os PQs de GCIS/ZnS não foram observados os picos associados a estruturas orgânicas. Wada e colaboradores 2017 mostram que após a modificação de superfície, PQs de CIS/ZnS apresentaram uma diminuição na carga orgânica, evidenciando troca do DDT da superfície dos PQs quando modificados com ácido mercaptopropiônico (MPA) (WADA et al., 2017). Dessa forma, sugere-se que provavelmente os PQs de GCIS/ZnS quando modificados pelo HTMS podem realizar essa troca de ligantes. Todavia, não foram observados picos correspondentes aos planos difratores da estrutura de estrutura tetragonal de calcopirita dos PQs de CIS (figura 19). Para os PQs modificados pelo HTMS há a presença de pico bem intenso, situado em 2θ igual a 22. Esse pico foi encontrado por Rissi e colaboradores 2017 e Li e colaboradores 2015, indicando dessa forma, que houve a formação de uma camada de HTMS ao redor do núcleo dos PQs (LI et al., 2015a; RISSI; HAMMER; CHIAVACCI, 2017).

Figura 24. Difratomogramas de raios X dos PQs modificados pelo HTMS

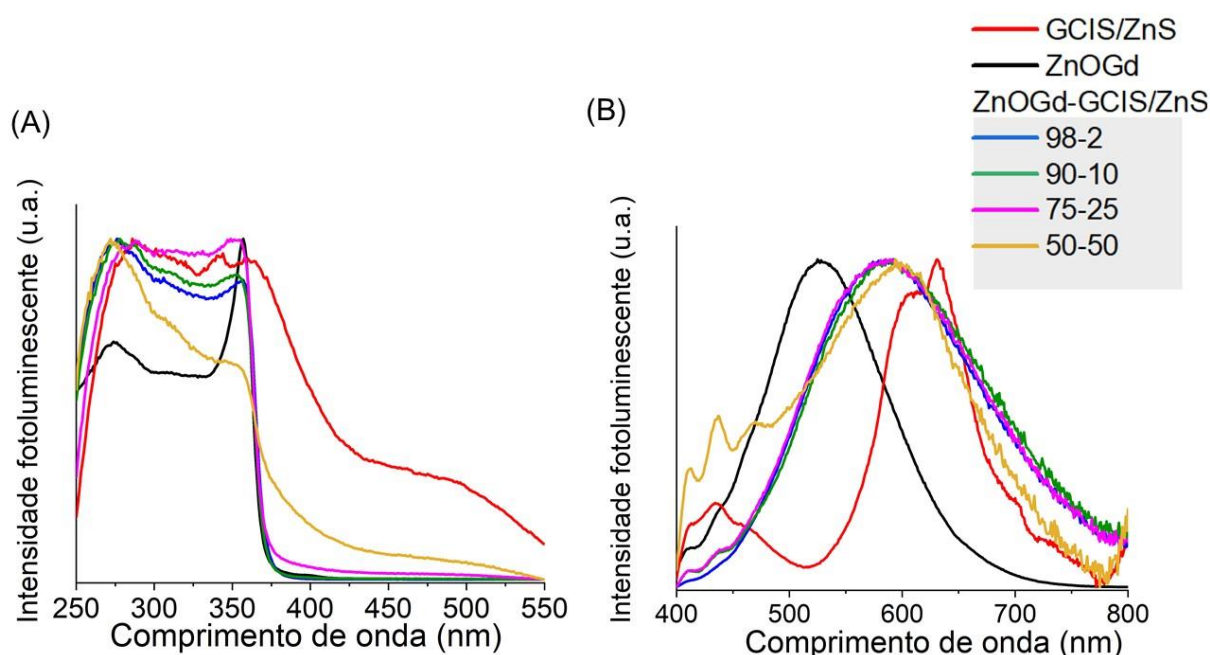


5.1.3. Avaliação das propriedades fotoluminescentes dos PQs por meio da coleta dos espectros de excitação (PLE) e emissão (PL)

Foram avaliadas as propriedades fotoluminescentes dos PQs de ZnO dopados com Gd e dos PQs de GCSIS/ZnS e suas respectivas conjugações utilizando diferentes proporções. As propriedades fotoluminescentes foram avaliadas tanto para os PQs não modificados e modificados pelo HTMS dispersos em clorofórmio quanto para os pós dos PQs sem modificação de superfície. Essa caracterização foi realizada para avaliar as mudanças nas propriedades luminescentes após conjugação desses PQs. As informações sobre os espectros de emissão e excitação estão nas figuras 25 a 27 e na tabela 5. Quando os PQs foram excitados utilizando um comprimento de onda de 270 nm ou 360 nm não mudou o comprimento de onda máximo de emissão (ficam sobrepostos, dados não mostrados). Dessa forma, para nível de comparação selecionamos a excitação em 360 nm para realizar as comparações dos espectros de emissão.

A figura 25 mostra os espectros de excitação (PLE)- (A) e emissão (PL)-(B) para os PQs dispersos em clorofórmio. Para os PQs de ZnOGd é possível observar suas regiões de excitação no UV. Os PQs de GCIS/ZnS apresentam também essas regiões, além de uma próxima a 500 nm. No entanto, para os PQs conjugados não foi possível a visualização do PLE próximo a 500 nm, característico dos PQs de GCIS/ZnS (exceto para a proporção 50% de ZnO e 50% de GCIS/ZnS) (A). Entretanto, vale ressaltar que essas amostras são difíceis de dispersar. Além disso, a não visualização nessa região pode ter relação com um fator de diluição. Os espectros de emissão (B) mostram que após o tratamento térmico, os PQs possuem o máximo de emissão em uma região intermediária entre o ZnOGd e o GCIS/ZnS. O PL máximo varia entre 580-589 nm dependendo da proporção utilizada entre os PQs de ZnOGd e GCIS/ZnS, de forma que conforme aumenta a quantidade de GCIS/ZnS é observado a emissão para regiões de comprimento de onda maior (tabela 5).

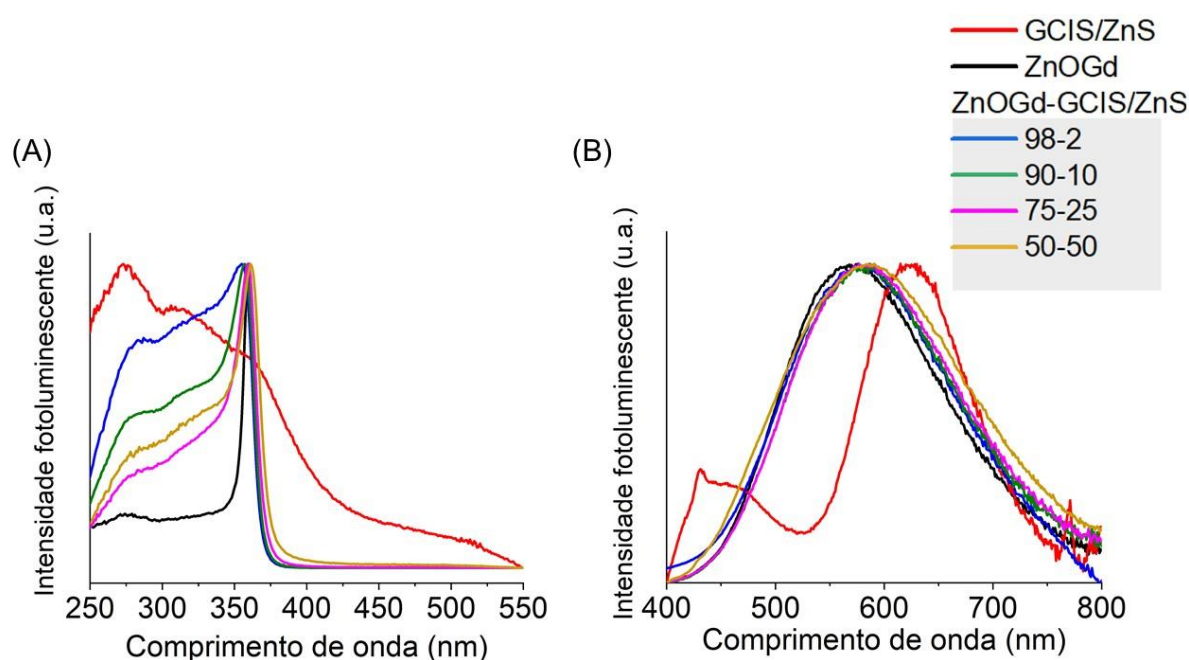
Figura 25. Espectros de excitação (PLE)-(A) e emissão (PL)-(B) dos PQs dispersos em clorofórmio. Dados normalizados.



Os PQs tiveram sua superfície modificada pelo HTMS. Os resultados dos espectros de excitação (A) e emissão (B) obtidos após a sua dispersão em clorofórmio estão presentes na figura 26. Quando comparamos os PQs de ZnOGd sem modificação de superfície com os PQs de ZnOGd modificados por HTMS percebemos que após a modificação de superfície, houve

um deslocamento do PL para regiões de maior comprimento de onda, se excitado a 360 nm. Entretanto, utilizando o PLE de 270 nm, não houve esse deslocamento (dados não apresentados). Os demais PQs de GCIS/ZnS e os PQs associados (ZnOGd-GCIS/ZnS) também deslocaram, mas menos que os PQs de ZnOGd. Foi possível observar que os espectros de emissão dos PQs conjugados e modificados pelo HTMS encontram-se em uma região intermediária entre a emissão do ZnOGd e GCIS/ZnS. No entanto, estão muito mais próximos do PL do ZnOGd, diferentemente dos PQs de ZnOGd-GCIS/ZnS não modificados (figura 25) os quais tiveram um deslocamento para o vermelho em comparação ao ZnOGd. Esse deslocamento do PL para regiões de comprimento de onda menor foi previamente descrito para PQs de ZnO modificados por organosilanos (RISSI; HAMMER; CHIAVACCI, 2017).

Figura 26. Espectros de excitação (PLE)-(A) e emissão (PL)-(B) dos PQs modificados pelo HTMS e dispersos em clorofórmio. Dados normalizados



A figura 27 mostra os espectros de excitação (PLE)-A e emissão (PL)- B e C dos PQs em forma de pó. Os PQs de ZnO apresentam PLE na região do UV, por volta de 270 nm e 360 nm. Para os PQs de GCIS/ZnS, é possível observar 3 bandas situadas em 270 nm, 360 nm e por volta de 520 nm. Após a conjugação, os PQs de ZnOGd-GCIS/ZnS apresentaram essa terceira banda próximo a 520 nm a partir da proporção de 90% de Gd e 10% de GCIS/ZnS. Ainda, conforme aumento a proporção de GCIS/ZnS, há um aumento da intensidade da banda a 520 nm (A). Nos espectros de emissão B e C foi possível observar que os PQs conjugados ZnOGd-

GCIS/ZnS possuem máximo de emissão situados em regiões intermediárias entre o ZnOGd e o GCIS/ZnS, sendo que conforme aumenta a proporção de GCIS/ZnS maior deslocamento para a região do vermelho foi observado. No entanto, esse deslocamento não está linearmente correlacionado com a quantidade de GCIS/ZnS, pois, para 25% de GCIS/ZnS um deslocamento para o vermelho de 53 nm foi observado enquanto que para 50% de GCIS/ZnS, o deslocamento foi de 68 nm (tabela 5). Essa habilidade de excitação utilizando diferentes comprimentos de onda é atribuída aos PQs ternários e quartenários contendo cobre, aqui representado pelo nosso estudo como os PQs de GCIS/ZnS (BAI; PURCELL-MILTON; GUN'KO, 2019). Diferentemente dos PQs modificados ou não pelo HTMS e dispersos em clorofórmio, para os PQs na forma de pó foi possível observar a excitação próximo a 520 nm e demonstrar o PL nessa utilizando esse comprimento de onda de excitação para os PQs que apresentaram PLE nessa região.

Embora interessante, a emissão exibida pelos principais PQs requer uma excitação na faixa de UV, o que limita suas aplicações em um contexto biológico devido ao potencial dano ao tecido (JANJETOVIC et al., 2017) e ao forte sinal de autofluorescência do meio biológico (KHALID et al., 2019; MONICI, 2005). Um dos aspectos mais relevantes deste trabalho foi a obtenção de um material de baixa toxicidade à base de uma maioria de ZnO que, quando conjugado a uma pequena quantidade de GCIS/ZnS, pode ter suas propriedades fotofísicas deslocadas para a faixa do visível.

O material obtido após o tratamento térmico mostra uma mudança significativa em suas propriedades luminescentes à medida que a quantidade de GCIS/ZnS aumenta, mesmo para uma pequena concentração estudada, de 10% de GCIS / ZnS em relação ao ZnOGd. Desta forma, é possível excitar os PQs de ZnOGd-GCIS/ZnS no terceiro pico PLE, localizado por volta de 520 nm.

Figura 27. Espectros de excitação (PLE)- (A) e emissão (PL) dos PQs em pó após a excitação a 360 nm (B) e 520 nm (C). Dados normalizados.

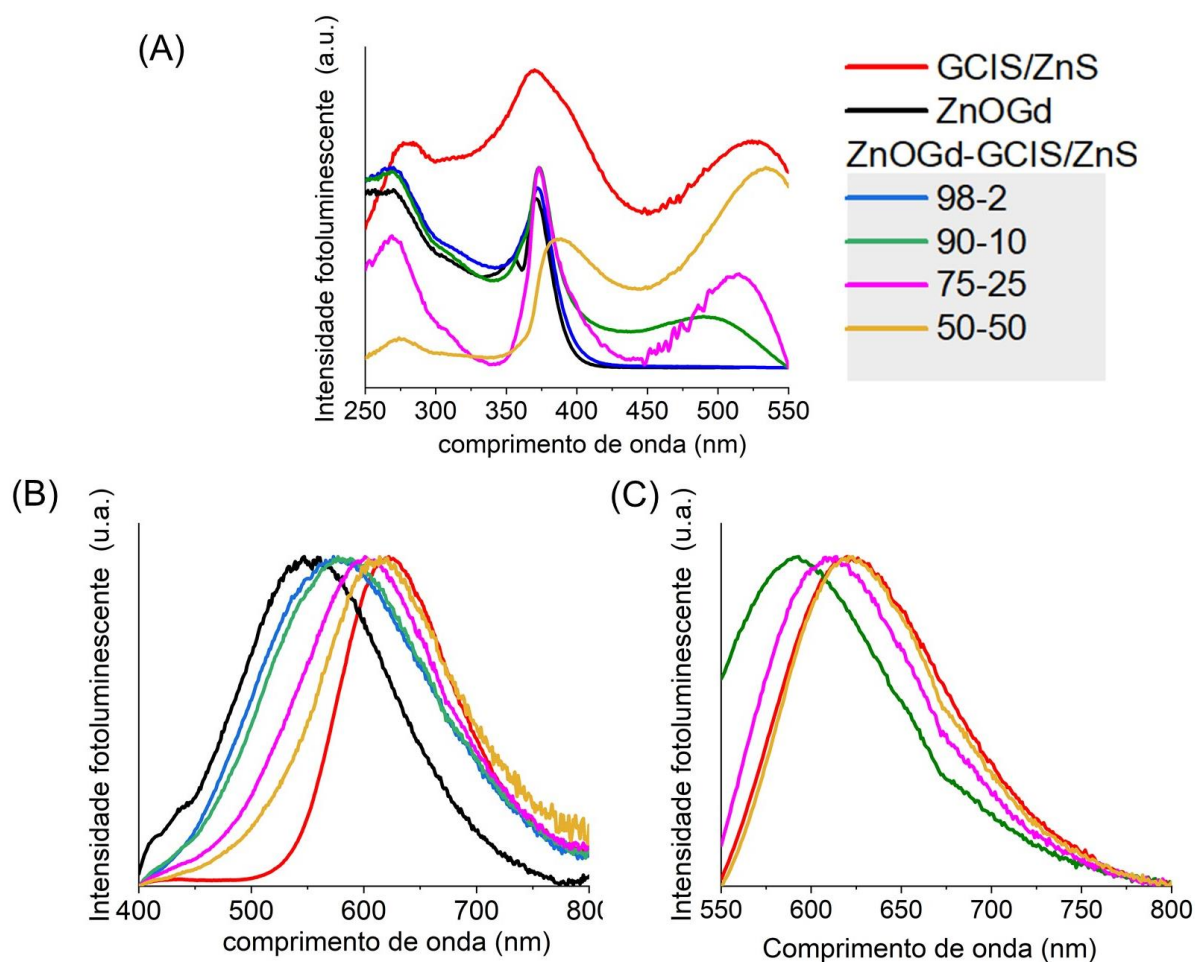


Tabela 5. PL dos PQs em forma de pó e disperso em clorofórmio e modificados com HTMS e dispersos em clorofórmio

Amostra	PL PQs suspensão $\lambda_{exc}: 360 \text{ nm}$	PL PQs-HTMS em suspensão $\lambda_{exc}: 360 \text{ nm}$	PL PQs em pó	
			$\lambda_{exc}: 360 \text{ nm}$	$\lambda_{exc}: 520 \text{ nm}$
ZnOGd	528	570	550	N.D.
GCIS/ZnS	613	620	620	620
98-2	585	580	576	N.D.
90-10	590	583	580	593
75-25	592	580	603	613
50-50	602	588	618	620

N.D. Não detectado

5.1.4. Nanocápsulas lipídicas contendo PQs

A associação dos PQs sintetizados nesse trabalho com as nanocápsulas lipídicas foi parte do trabalho realizado no estágio BEPE, no laboratório MINT, faculdade de Angers, França. Diferentes proporções entre os PQs de ZnOGd e GCIS/ZnS foram sintetizadas e modificadas com HTMS para a associação com NCL. A eficiência do NCL-PQs para o diagnóstico por imagem foi avaliada através de imagens de luminescência e ressonância magnética. Ainda, foram realizados ensaios para avaliação da estabilidade luminescente das nanocápsulas em plasma de rato bem como estudos da localização dos PQs nas nanocápsulas.

5.1.4.1. PQs de ZnO-GCIS/ZnS (98% de ZnO e 2% de GCIS/ZnS-1 e GCIS/ZnS-2) associados às NCL.

As figuras 28 e 29 mostram os espectros de excitação e emissão das NCL contendo PQs de ZnO-GCIS/ZnS. Para os PQs de GCIS/ZnS-1 associados às NCL o espectro de excitação (PLE) apresentou o pico a 350 nm, seguido pelo espectro de emissão (PL) com emissão máxima em 544 nm, ou seja, na região verde quando excitado a 350 nm (A). A luminescência das NCL pode ser observada no equipamento maestro sob lâmpada UV em diferentes diluições, e as emissões máximas foram encontradas em 600 nm quando excitadas em 254 nm (B). As propriedades de contraste foram avaliadas por ressonância magnética com as mesmas diluições utilizadas para a caracterização das propriedades luminescentes. No entanto, nenhum efeito em T1 e T2 foi observado (C). Os mesmos perfis foram obtidos para as NCL-ZnOGd-GCIS/ ZnS-2 (figura 29).

Figura 28. Espectros de excitação (PLE) e espectros de emissão (PL) de NCL contendo ZnO-GCIS/ZnS-1 excitados a 350 nm. (B) emissão de NCL-ZnO-GCIS/ZnS em diferentes diluições (lâmpada UV a 254 nm). (C) imagem de ressonância magnética T1 e T2 de NCL-ZnO-GCIS/ZnS-1 em diferentes diluições.

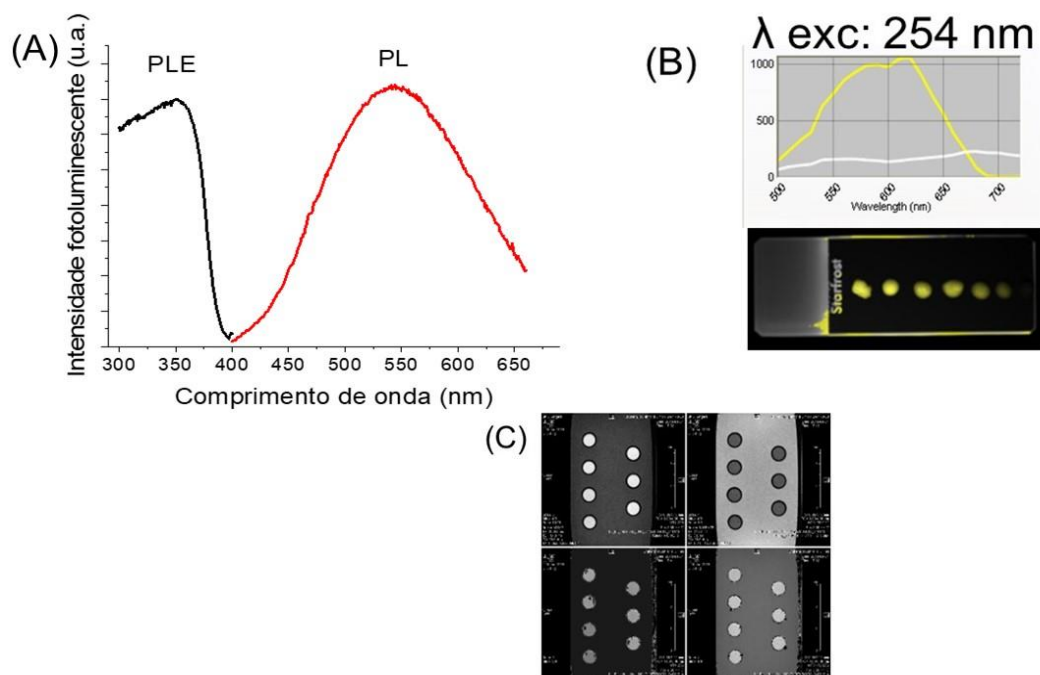
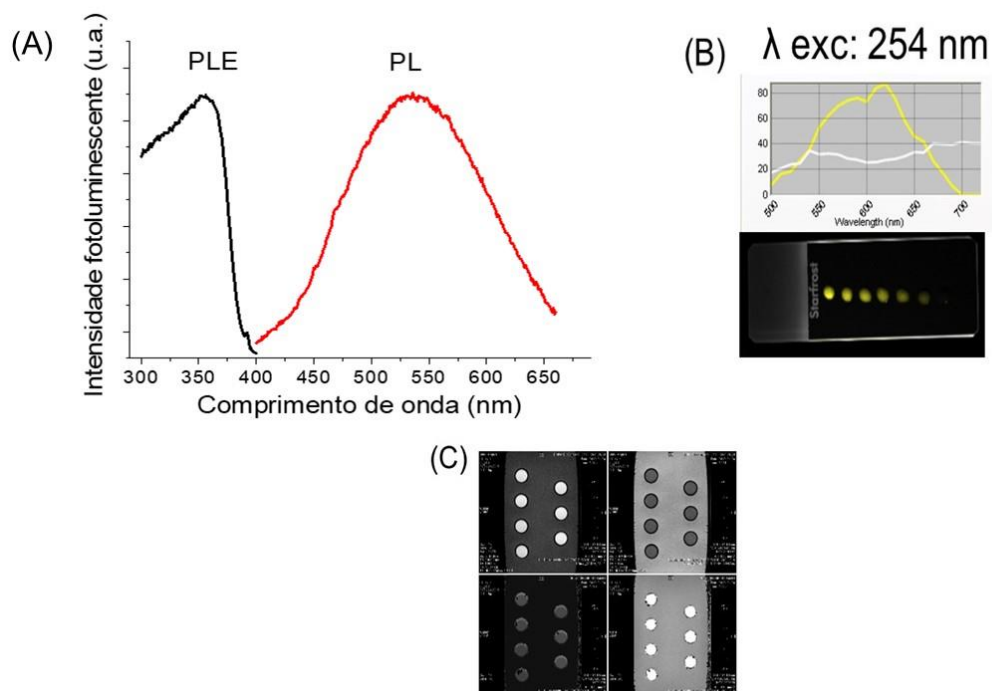


Figura 29. Espectros de excitação (PLE) e espectros de emissão (PL) de NCL contendo ZnO-GCIS/ZnS-2 excitados a 350 nm. (B) emissão de NCL-ZnO-GCIS/ZnS em diferentes diluições (lâmpada UV a 254 nm). (C) imagem de ressonância magnética T1 e T2 de NCL-GCIS/ZnS-2 em diferentes diluições.

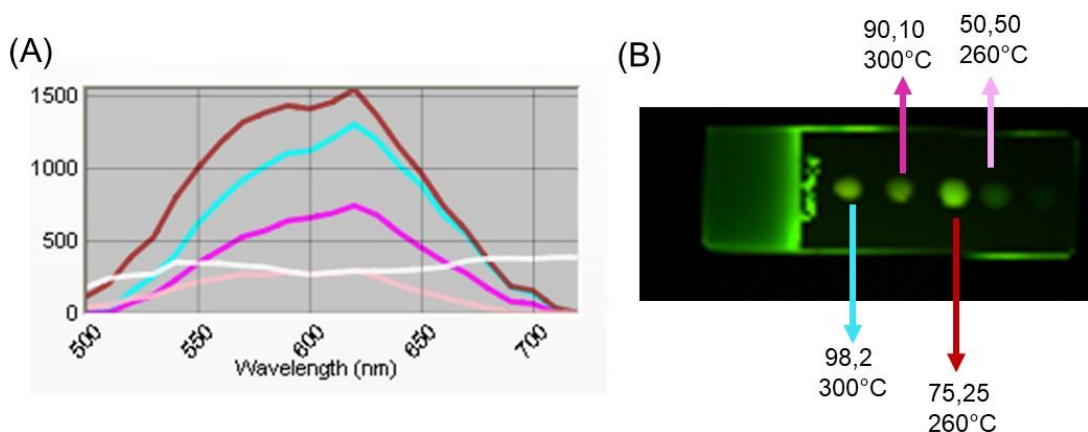


5.1.4.2. PQs de ZnOGd-GCIS/ZnS-3 associados as NCL

Mesmo com o aumento da quantidade dos componentes do núcleo de GCIS para a síntese dos PQs de GCIS/ZnS, não foi possível observar efeito nos tempos de relaxamento T1 e T2, conforme mostrado nas figuras 28 e 29. Portanto, como estratégia, a proporção dos reagentes para a síntese do núcleo GCIS foi aumentada mais uma vez, resultando na amostra denominada GCIS/ZnS-3, conforme descrito anteriormente. Além disso, uma, outra estratégia foi realizada para aumentar a eficiência do complexo como agente de contraste na ressonância magnética: a dopagem de ZnO com Gd. Nos próximos tópicos serão apresentados os resultados obtidos para as NCL preparadas com PQs obtidos em diferentes proporções entre o ZnOGd e o GCIS/ZnS-3.

Também serão avaliados a eficiência dos PQs de ZnOGd-GCIS/ZnS acoplados as NCL obtidos em diferentes condições de aquecimento, uma vez que foi observado na figura 30 que o aquecimento alterou a luminescência do NCL. Assim, também foi avaliado se o aquecimento poderia afetar a eficiência de contraste das imagens obtidas por ressonância magnética.

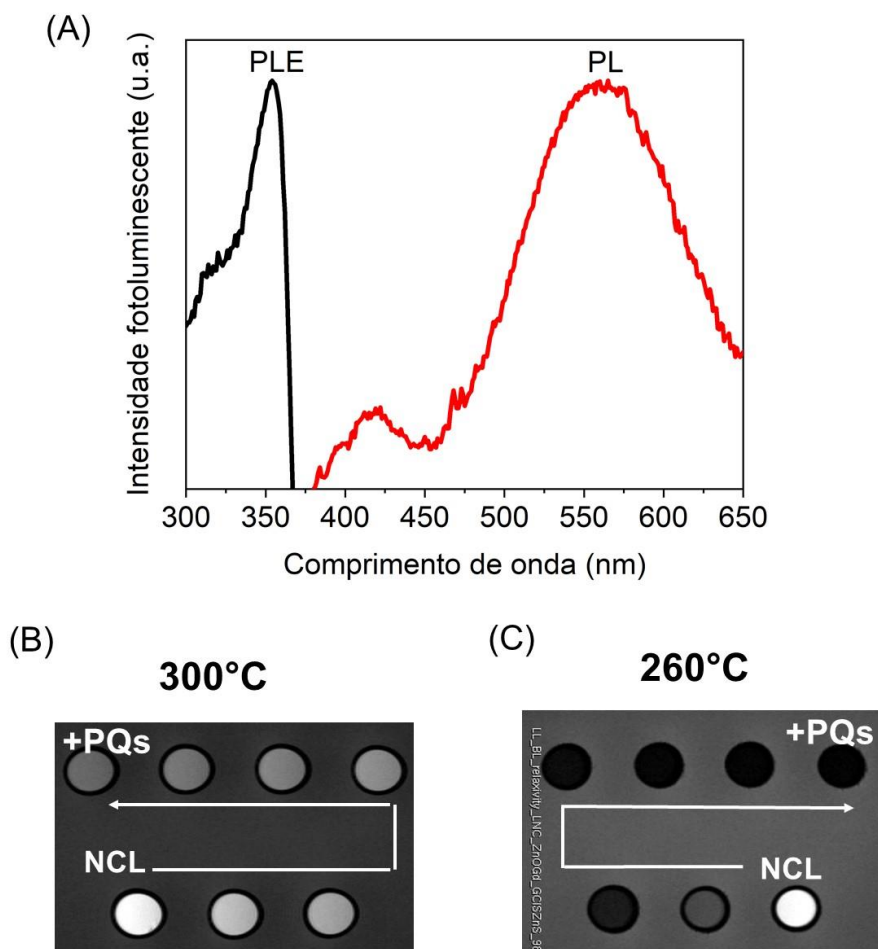
Figura 30. Propriedades de fotoluminescência de NCL-PQs preparadas com PQs sintetizados com diferentes proporções entre ZnOGd e GCIS/ZnS-3 e temperatura utilizada para a conjugação dos PQs.



A figura 31 mostra as propriedades fotoluminescentes e as imagens de ressonância magnética T2 das NCL contendo PQs (98% de ZnOGd e 2% de GCIS/ZnS). O espectro de excitação (PLE) apresentou o pico a 350 nm, seguido pelo espectro de emissão (PL) com emissão máxima a 562 nm quando excitado a 350 nm (A). As NCL contendo PQs não teve efeito significativo em T1 (resultados não mostrados), porém, houve efeito em T2, representados no contraste mais escuro para as NCL que contem mais PQs em comparação às NCL com menores quantidades de PQs e sem PQs (B e C).

Conforme mostrado na figura 16 na etapa de junção dos PQs, a temperatura de aquecimento alterou a luminescência. Na figura 31 o mesmo ocorreu com a luminescência das NCL associadas aos PQs conjugados utilizando diferentes temperaturas. Portanto, os pós de GCIS/ZnS e ZnOGd foram aquecidos a 260°C e 300°C para posteriormente realização da modificação de superfície e preparo das NCL. Dessa forma, foi analisado se a temperatura também modificaria as imagens de ressonância magnética. A diferença do contraste T2 entre as NCL preparadas a partir de pós aquecidos a 300 e 260 ° C pode ser evidenciada na figura 31, imagens (B) e (C), respectivamente. Assim, quanto menor a temperatura utilizada, maior o contraste. As NCL contendo máxima concentração de PQs, que foram preparados com PQs aquecidos a 300°C, tiveram T2 de 387 ms (B) Já as NCL contendo máxima concentração de PQs, que foram preparados com PQs aquecidos a 260°C, o valor de T2 foi de 22ms (C). Dessa forma, o valor de T2 foi 5 vezes menor, podendo ser evidenciado na imagem já que há maior contraste escuro.

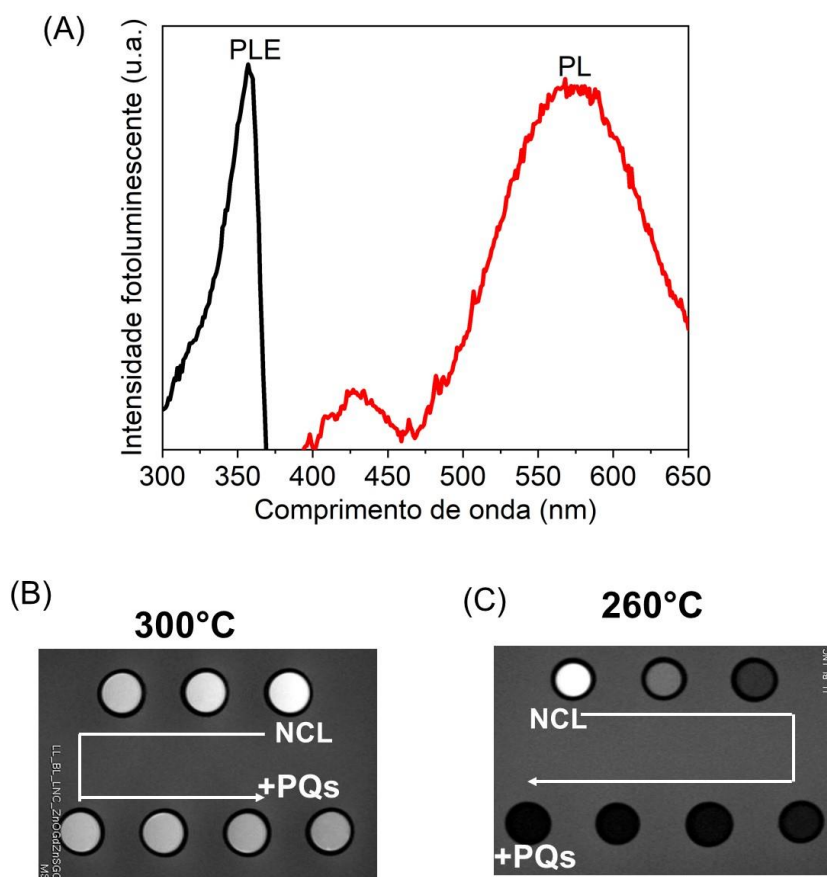
Figura 31. Espectros de excitação (PLE) e espectros de emissão (PL) das NCL contendo ZnOGd-GCIS/ZnS-3 (98-2) excitado a 350 nm. (B) imagens de T2 de RMN das NCL preparadas com junções dos PQs a 300 ° C. (B) e a 260°C (C).



A Figura 32 mostra os espectros de excitação e emissão e as imagens de ressonância magnética das NCL-ZnOGd-GCIS/ZnS-3 (90-10). O espectro de excitação mostrou pico máximo em 350 nm, seguido pelo espectro de emissão com emissão máxima a 560 nm quando excitado a 350 nm (A). As NCL não tiveram efeito significativo em T1 (resultados não mostrados), no entanto, houve efeito em T2 (B) e (C). As NCL com maior quantidade de PQs puderam ser observadas no contraste mais escuro da imagem. Quando comparado as NCL preparadas a partir de pós aquecidos com diferentes temperaturas, novamente uma grande diferença de contraste pode ser observada. As NCL preparadas a partir de PQs aquecidos a

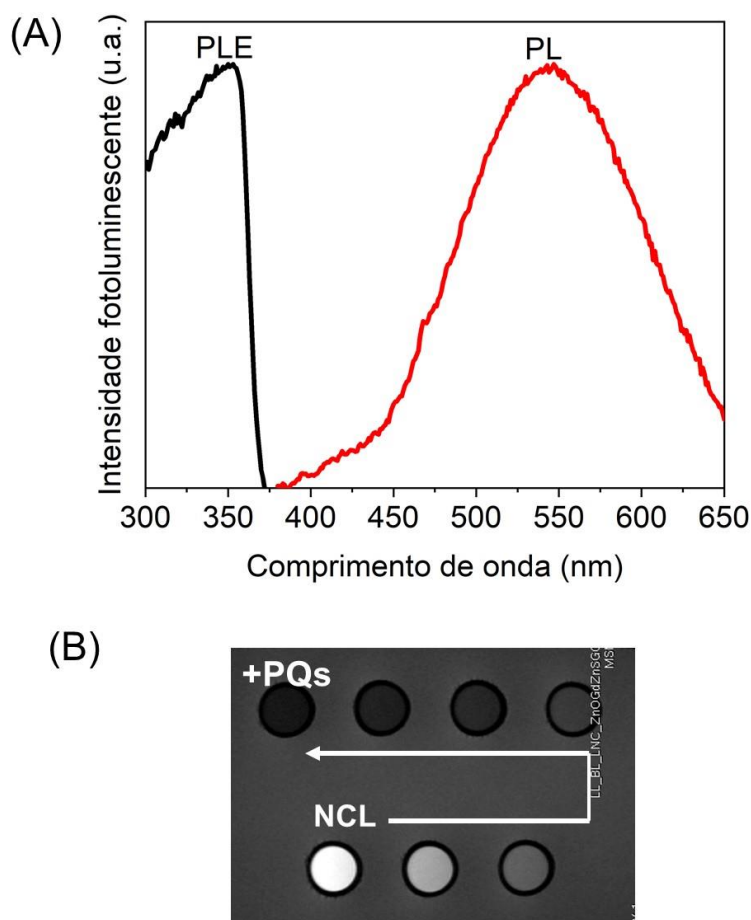
300°C tiveram T2 de 163ms, enquanto as preparadas com PQs aquecidos a 260°C de 27 ms, ou seja, 6 vezes menor, o que leva a um maior contraste.

Figura 32. Espectros de excitação (PLE) e espectros de emissão (PL) das NCL contendo ZnOGd-GCIS / ZnS-3 (90-10) excitado a 350 nm. (B) imagens de T2 de RMN das NCL preparadas com junções dos PQs a 300 ° C. (B) e a 260°C (C).



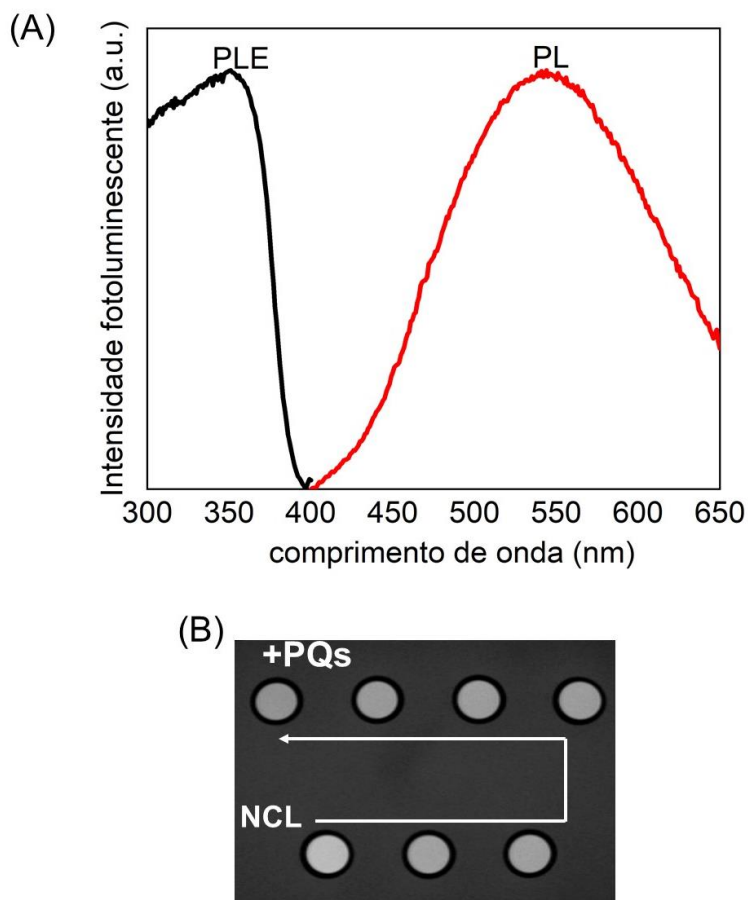
A Figura 33 mostra os espectros de excitação e emissão e as imagens de ressonância magnética das NCL-ZnOGd-GCIS/ZnS-3 (75-25). O PLE apresentou o pico a 350 nm, seguido pelo PL com emissão máxima a 547 nm quando excitado a 350 nm (A). Nenhum efeito T1 foi observado (dados não mostrados). No entanto, para as NCL contendo maior proporção de PQs o valor de T2 foi de 43 ms (B).

Figura 33. (A) Espectros de excitação (PLE) e espectros de emissão (PL) de NCL contendo ZnOGd-GCIS / ZnS-3 (75-25) excitados a 350 nm. (B) imagens de T2 de RMN das NCL preparadas com junções dos PQs a 260°C.



A figura 34 mostra os espectros de excitação e emissão e as imagens de ressonância magnética das NCL-ZnOGd-GCIS/ZnS-3 (50-50). O PLE apresentou o pico a 350 nm, seguido pelo PL com emissão máxima a 537 nm na região verde quando excitado a 350 nm (A). As NCL não tiveram efeito significativo em T1(resultado não mostrado), contudo, houve efeito em T2. As NCL com mais PQs pode ser observado no contraste mais escuro da imagem (B). As NCL sem PQs tiveram valor de T2 de 453 ms enquanto que as NCL contendo maior concentração de PQs o valor de T2 foi de 222 ms.

Figura 34. (A) Espectros de excitação (PLE) e espectros de emissão (PL) de NCL contendo ZnOGd-GCIS / ZnS-3 (50-50) excitados a 350 nm. (B) imagens de T2 de RMN das NCL preparadas com junções dos PQs a 260°C.



A Tabela 6 mostra os valores de T2 obtidos para as NCL preparados com os PQs utilizando diferentes proporções e temperaturas. Comparando as NCL preparadas com PQs que foram conjugados na mesma temperatura, foi possível observar que, à medida que a proporção de ZnOGd diminui, o T2 aumenta. Nesse caso, sugere-se que o ZnOGd tenha a maior contribuição para o contraste, pois quanto menor o T2, maior o contraste.

Essa maior contribuição dos PQs de ZnOGd em relação aos PQs de GCIS/ZnS pode ser devido à alta proporção de ZnOGd em relação ao GCIS/ZnS. Conforme observado nas análises termogravimétricas (figura 22), os PQs de GCIS/ZnS possuem grande quantidade de matéria orgânica. Como para a associação dos PQs de ZnOGd com os PQs de GCIS/ZnS foram utilizadas uma proporção massa/massa, significa que quantidades muito pequenas de GCIS/ZnS foram adicionadas mesmo utilizando na maior proporção (50%). Esse fato, somado ainda com uma nova diminuição da concentração, resultado da associação com as NCL,

resultaram na menor contribuição dos PQs de GCIS/ZnS no contraste para as imagens de ressonância magnética em relação ao ZnOGd. O mesmo pode ser observado para os espectros de PLE e PL, uma vez que não foi possível observar a emissão das NCL-PQs quando excitadas próximo a 500 nm, diferentemente dos pós, que puderam ser excitados próximo a 500 nm, resultado em emissão máxima com deslocamentos dependente da proporção utilizada entre o ZnOGd e GCIS/ZnS (figura 25).

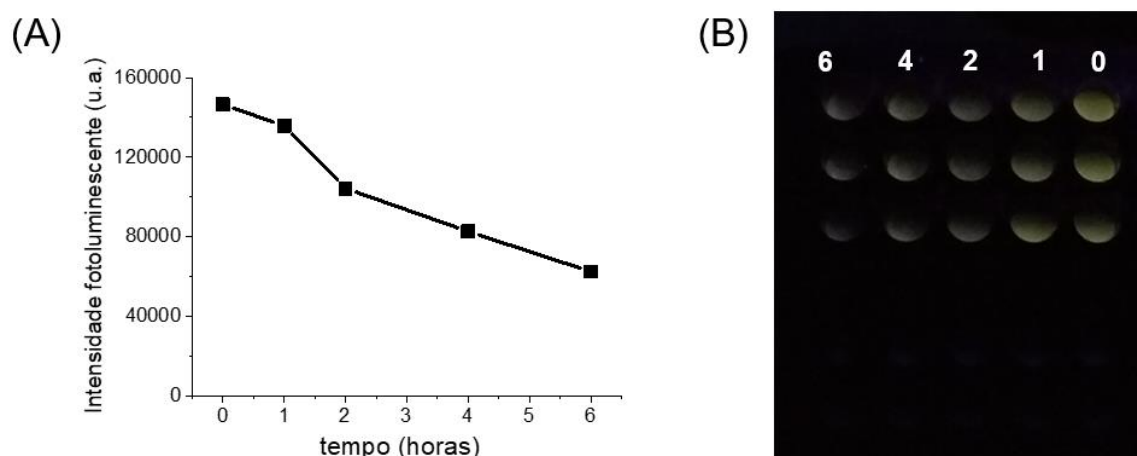
Tabela 6. Valores de T2 das NCL associadas aos PQs de ZnOGd-GCIS/ZnS.

NCL ZnOGd-GCIS/ZnS (%)	Temperatura (°C)	T2 (ms)
98/2	300	113
	260	22
90/10	300	163
	260	27
75/25	260	43
50/50	260	222

5.1.5. Estudo da estabilidade das NCL-ZnOGd em plasma de rato

A Figura 35 mostra o estudo de estabilidade do NCL-ZnOGd em plasma de rato. É possível observar que, quando excitada a 340 nm, a intensidade da fotoluminescência diminui com o tempo, cerca da metade em 6 horas (A). Por outro lado, mesmo com a diminuição, ainda era possível visualizar a luminescência do NCL-ZnOGd após 6 horas de contato com o plasma (B).

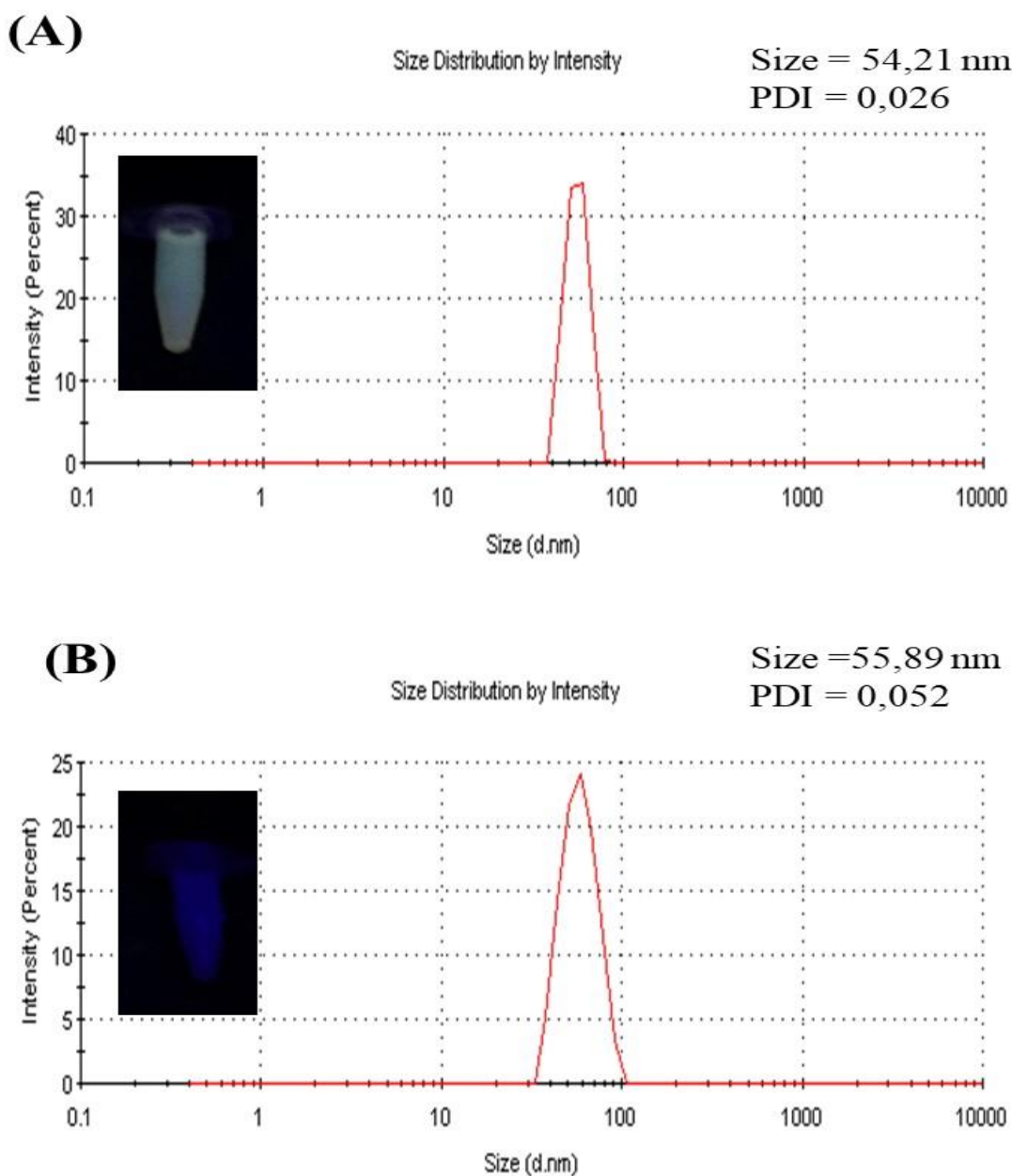
Figura 35. Estudo de estabilidade das NCL-ZnOGd.



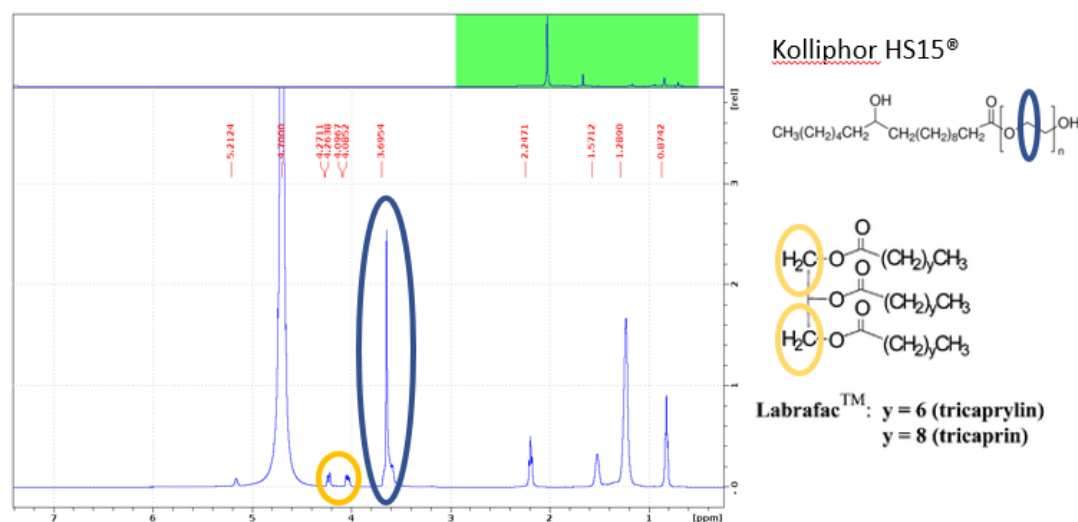
5.1.6. Estudo da localização dos PQs nas NCL.

Os PQs foram associados às NCL sendo que foi possível obter tanto imagens de luminescência quanto de ressonância magnética. A figura 36 mostra a distribuição do tamanho e a luminescência após excitação a 254 nm das NCL-PQs, preparadas com PQs de ZnOGd-GCIS/ZnS na proporção 75-25, antes e após diálise. Antes de realizar a diálise, foi possível visualizar a luminescência das NCL-PQs sendo que o tamanho obtido foi de 54,24 nm e PDI de 0,026 (A). Após a diálise, as NCL-PQs perderam a luminescência, sendo que o tamanho encontrado foi de 55,89 nm e PDI de 0,052 (B).

Figura 36. Luminescência, distribuição de tamanho e índice de polidispersidade de NCL-PQs não dialisadas (A) e dialisadas (B).



Para explicar a perda da luminescência medidas de RMN foram realizados para a identificação dos compostos presentes nas NCL-PQs. A figura 37 mostra em azul um pico específico do tensoativo (o CH₂ do PEG) e em amarelo, um pico específico do núcleo oleoso, o CH₂ do labrafac.

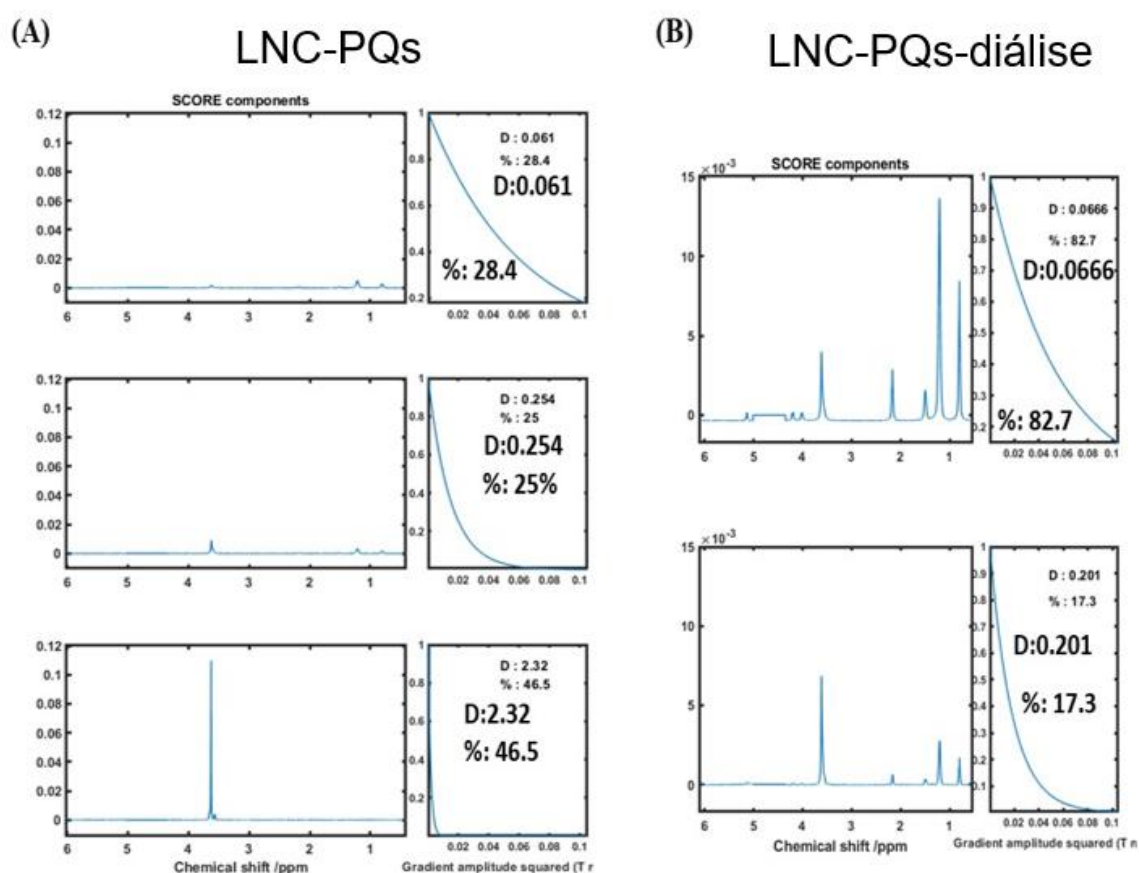
Figura 37. RMN NCL-PQs.

Com a finalidade de evidenciar essas estruturas, foram realizadas medidas do coeficiente de difusão (D) dos diferentes grupamentos químicos através da técnica de DOSY. A figura 38 mostra os resultados encontrados. Se um grupamento está relacionado à uma estrutura química grande, ele difunde lentamente e D é pequeno e, inversamente, se associado à uma estrutura pequena, difunde rapidamente (GUYON et al., 2019) e D é grande. Esse fato obedece a equação de Stokes-Einstein (equação 4), que correlaciona a dependência do coeficiente de difusão de uma partícula em solução com seu raio hidrodinâmico (r), a uma determinada temperatura (T), sendo k a constante de Boltzmann e η a viscosidade do solvente (FRANCONI et al., 2018). A técnica de DODY pode ser aplicada para identificar qualquer substância que possuí núcleos ativos em RMN, sendo que já foi aplicada para identificação de polímeros, petróleo, ciclodextrinas, micelas (ARAÚJO DE SOUZA; LAVERDE, 2002). Gromova e colaboradores (2017) utilizaram a técnica de DOSY para identificar moléculas de DDT livres e associadas a nanocristais de CuInS (GROMOVA et al., 2017). Recentemente parâmetros foram otimizados por Franconi e colaboradores 2018 em micela de dodecilsulfato de sódio e em Caelyx[®], uma preparação lipossomal comercial contendo uma mistura de lipossomas peguillados e sacarose (FRANCONI et al., 2018).

$$D = \frac{KT}{6\pi\eta r} \quad (\text{Equação 4})$$

Conforme apresentado na figura 37 se há a presença de duas populações, então deve-se observar o sinal em azul com um D grande (associação dos PQs com kolliphor) e também um sinal com D pequeno (NCL). Na figura 38 (A) foi observado que o PEG esta presente em 3 populações (a 3ª população é normal e representa o PEG livre e sabe-se que, na preparação do kolliphor, o PEG livre representa ~ 30 % do PEG total). O PEG livre está na parte inferior com um grande valor de D. No gráfico do meio há um sinal de PEG com o D intermediário, que mostra nossa associação de PQs com Kolliphor e, no topo, um D pequeno (as NCL). Quando a diálise foi realizada, o sinal do PEG livre foi perdido, sendo que restou apenas o PEG com estrutura intermediária e grande. Nesse caso poderíamos dizer que, se ainda houvesse PEG intermediário, ainda poderia haver luminescência, porém não suficiente para ser detectado sob lâmpada UV. Por outro lado, observando a respectiva porcentagem de PEG, pode-se observar que na preparação não dialisada, o sinal de PEG é quase tão intenso nas NCL quanto nas associações de PQs com kolliphor (28,4% e 25%, respectivamente) enquanto que após a diálise, há muito mais PEG associado às NCL em comparação às estruturas intermediárias (82,7% e 17,3%, respectivamente).

Figura 38. RMN-Difusão das nanocápsulas lipídicas contendo PQs (A) e nanocápsulas lipídicas contendo PQs após a diálise (B).



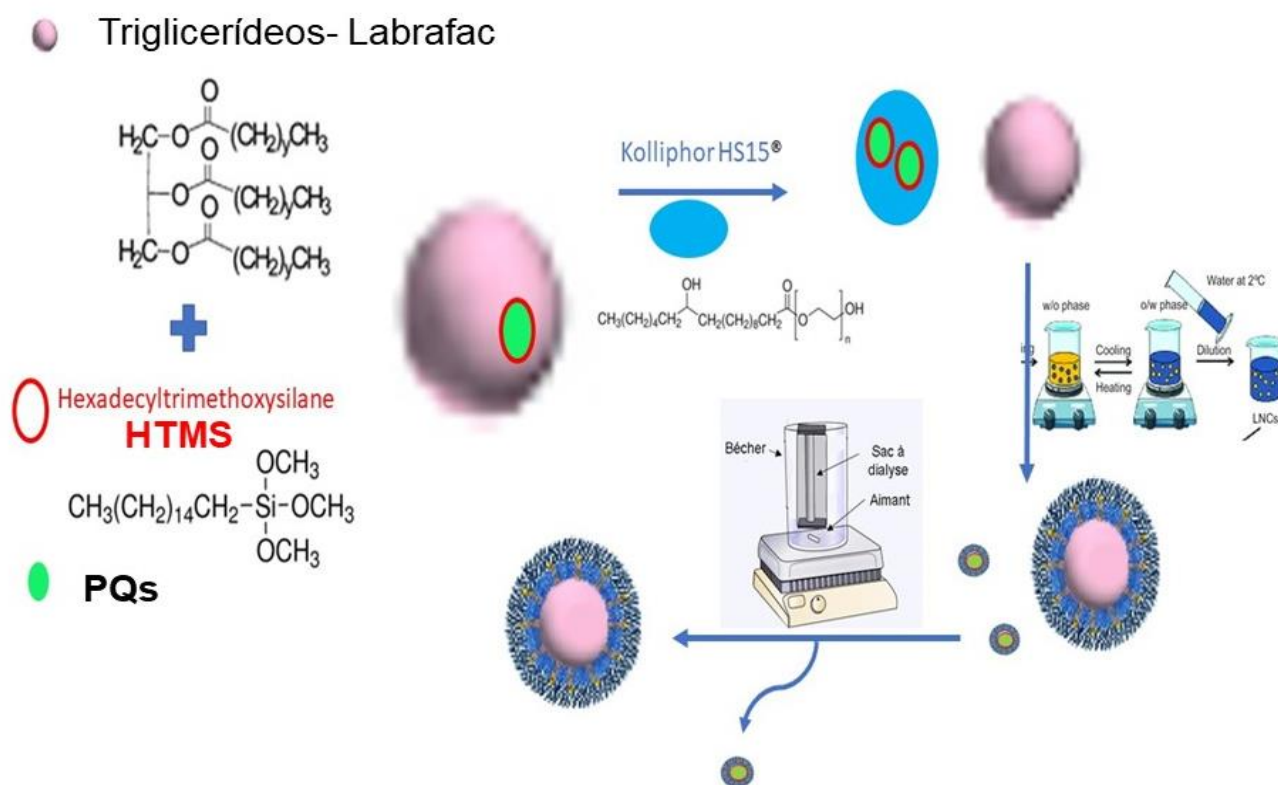
Com os resultados apresentados nas figuras anteriores, a hipótese levantada é que os PQs tem mais afinidade com o Kolliphor do que com o Labrafac. Essa hipótese foi relacionada à afinidade do modificador de superfície HTMS e a figura 39 esquematiza essa hipótese. O HTMS tem uma cadeia hidrocarbônica grande (C16). O labrafac apresenta uma mistura de C8 e C10, enquanto que o Kolliphor C17. Durante a síntese as NCL são formadas, uma vez que o tamanho por DLS é condizente com os encontrados na literatura para essas NCL sem PQs. A hipótese levantada é que, durante a síntese, os PQs estão associados ao HTMS (com sua cadeia em C16), preferindo associar-se ao kolliphor (C17) em vez de permanecer no labrafac (C8-10). E assim, durante a diálise, o efeito de diluição causa um desequilíbrio no kolliphor associado aos PQs e no Kolliphor livre e, portanto, pouco a pouco a luminescência é perdida.

Essa hipótese é condizente com os resultados apresentados para os diferentes coeficientes de difusão encontrados nas NCL-PQs antes e após a diálise, pois não temos mais

a presença do PEG com D intermediário, que representa nossa associação do kolliphor com os PQs (figura 38).

Pan e colaboradores (2013) associaram nanopartículas luminescentes de sílica com nanocápsulas lipídicas produzidas seguindo uma rota muito semelhante e com os mesmos reagentes que utilizamos nessa tese, mas, possuíam tamanhos maiores de 80 nm. Os autores sugeriram que as nanopartículas de sílica se encontram em partes no núcleo oleoso das nanocápsulas, ou seja, no labrafac, mas também perto da superfície nas camadas do tensoativo (PAN et al., 2013).

Figura 39. Esquema da associação dos PQs com as NCL e hipótese de sua localização nas NCL.



Fonte: Autor.

5.1.7. PQs modificados pelo GPTMS e dispersos em água

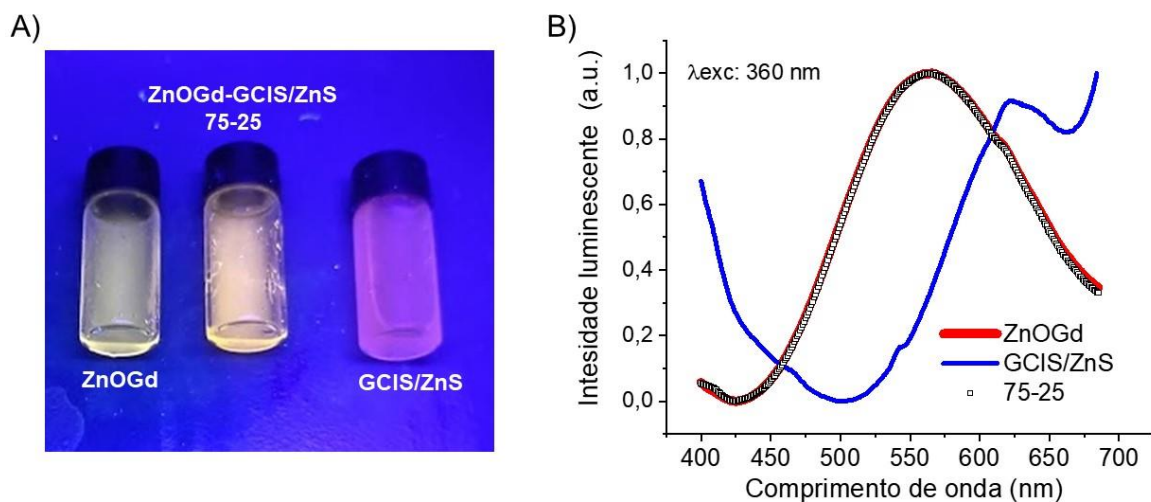
Embora os PQs hidrofóbicos modificados pelo HTMS e dispersos em Labrafac, para a associação com as NCL possuíam importantes propriedades fotoluminescentes e bom contraste na ressonância magnética, uma outra estratégia foi utilizada. Dessa forma, os PQs de ZnOGd-GCIS/ZnS preparados utilizando a proporção 75% de ZnOGd e 25% de GCIS/ZnS em massa foram dispersos em água graças à modificação de superfície dos PQs com o organosilano GPTMS. Organossilanos foram escolhidos para este propósito, pois têm baixa toxicidade e se ligam covalentemente à superfície hidroxilada de PQs, criando uma barreira protetora entre os Qdots e os solventes sem prejudicar as propriedades de luminescência dos PQs de ZnO (ABOULAICH et al., 2012a; LI et al., 2015b). Esta estratégia foi usada para estabilizar o material compósito e permitir a detecção nas imagens de ressonância magnética. Para a coleta das imagens, foram utilizados os PQs conjugados (ZnOGd-GCIS/ZnS 75-25).

5.1.7.1. Avaliação das propriedades luminescentes

A figura 40 mostra imagens dos PQs de ZnOGd, ZnOGd-GCIS/ZnS (75-25) e GCIS/ZnS, dispersos em água, sob lâmpada UV a 365 nm e os espectros de emissão desses PQs quando excitados a 360 nm. É possível observar que a rota de modificação de superfície possibilitou dispersar os PQs, mantendo sua luminescência. Dessa forma, os PQs com características altamente hidrofóbicas, puderam ser dispersos em água. Os espectros de emissão mostraram uma característica muito semelhante entre os PQs de ZnOGd e ZnOGd-GCIS/ZnS (75-25). Quando comparados as propriedades luminescentes dos pós de ZnOGd-GCIS/ZnS, apresentado na tabela 5, esses PQs apresentaram PL máxima a 603 nm, quando excitados a 365 nm, enquanto para os PQs dispersos em água, o PL máximo encontra-se em 550 nm, ou seja, com a modificação de superfície houve um deslocamento para o verde. Esse deslocamento, já foi previamente relatado e poderia ser explicado pois o GPTMS promove uma mudança nos níveis de vacância de oxigênio, acompanhada por uma diminuição nas armadilhas induzidas pelos defeitos de superfície. Consequentemente, utilizar os organossilanos como agentes de passivação pode contribuir tanto para o aprimoramento da fotoluminescência quanto para o aumento da estabilidade em meio aquoso dos PQs (RISSI; HAMMER; CHIAVACCI, 2017). Já para os demais PQs, não houveram deslocamentos quando comparados com os pós, ou seja, embora o GPTMS possa ter contribuído com esse deslocamento, a quantidade significativa

maior de ZnOGd em comparação ao GCIS/ZnS provavelmente foi o fator que mais interferiu na emissão próxima muito semelhante do ZnOGd-GCIS/ZnS com o ZnOGd. Vale ressaltar que conforme observado nas técnicas de caracterizações, há uma quantidade muito grande de matéria orgânica nos PQs de GCIS/ZnS, portanto, ao fazer o acoplamento, quando foi utilizado 25% em massa, a quantidade real dos PQs é menor.

Figura 40. Imagens dos PQs de ZnOGd ; ZnOGd-GCIS/ZnS (75-25) e GCIS/ZnS, modificados pelo GPTMS e dispersos em água, sob lâmpada UV a 365 nm (A). Espectros de emissão (PL) dos PQs PQs de ZnOGd ; ZnOGd-GCIS/ZnS (75-25) e GCIS/ZnS, modificados pelo GPTMS e dispersos em água.

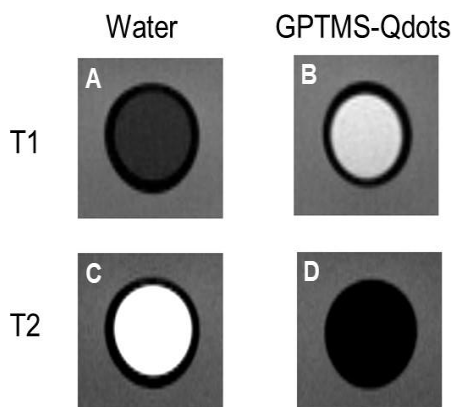


5.1.7.2. Avaliação das propriedades de imagens de ressonância magnética

A Figura 41 mostra imagens de ressonância magnética ponderadas em T1 (A e B) e T2 (C e D) de PQs revestidos com GPTMS dispersos em água. O PQs modificados pelo GPTMS levaram a um efeito T1 (observado como contraste positivo - imagens brilhantes na figura B). O efeito T1 pode ser explicado pela fina camada de revestimento que não isola totalmente os PQs da água circundante e, portanto, permite o processo de relaxamento longitudinal conforme observado, por exemplo, por hidróxidos de gadolínio revestidos com SiO_2 (WANG et al., 2020). Já o efeito T2 é observado através do contraste negativo resultando

em imagem mais escura quando comparado à água. Esse efeito é clássico para um sistema particulado que cria um campo magnético local não homogêneo.

Figura 41. imagem de T1 (água)- (A). Imagens de T1 dos PQs de ZnOGd-GCIS/ZnS modificados com GPTMS e dispersos em água- (B). Imagens de T2 (água)- (C). Imagens de T2 dos PQs de ZnOGd-GCIS/ZnS (75-25) modificados com GPTMS e dispersos em água- (D).



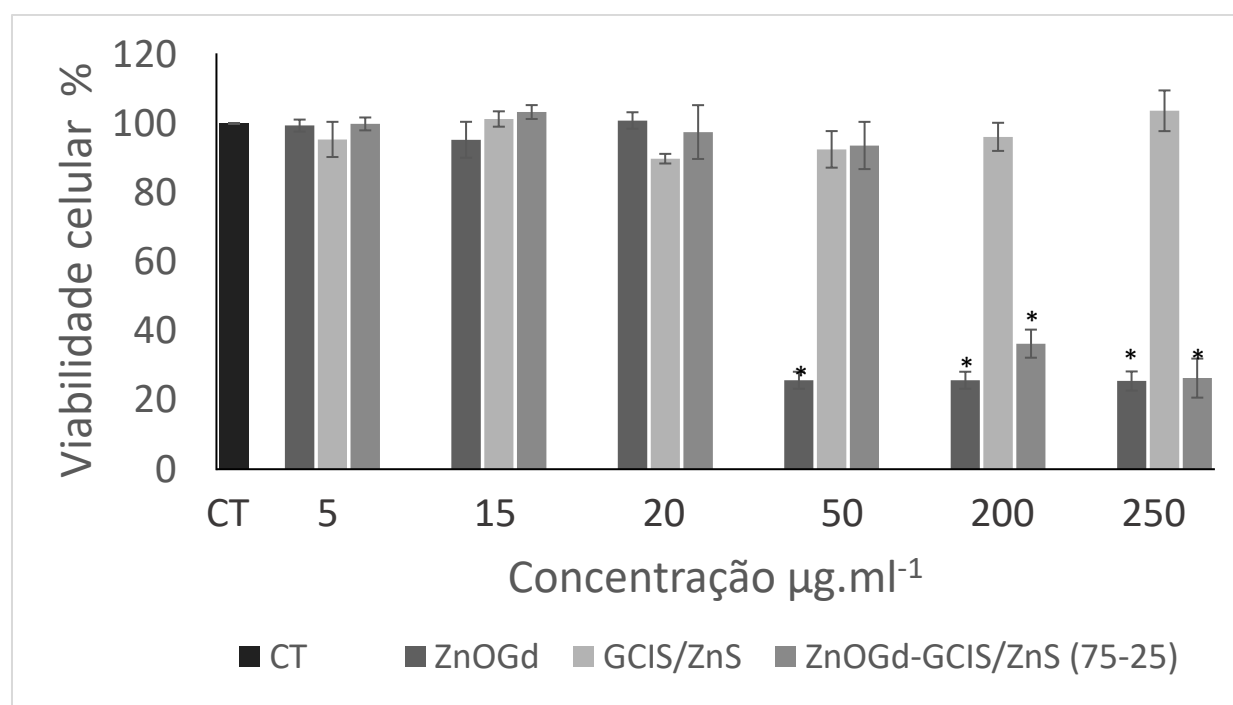
5.1.8 Ensaios de citotoxicidade e captação celular

5.1.8.1. PQs modificados com GPTMS e dispersos em água

A citotoxicidade de PQs modificados com GPTMS e dispersos em água foi avaliada em uma faixa de concentração em células NIH/3T3 - ATCC® CRL-1658™ (Figura 42). Os PQs de GCIS/ZnS apresentaram alta viabilidade celular de pelo menos 80% em todas as concentrações exploradas, indicando que o GCIS/ZnS induz baixa citotoxicidade para células NIH/3T3. Por outro lado, os PQs de ZnOGd tiveram dois perfis porque em baixas concentrações (até 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) a viabilidade celular foi superior a 90%. No entanto, a partir de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a viabilidade celular não ultrapassou 20%. Após a conjugação dos PQs, ZnOGd-GCIS/ZnS resultou em maior viabilidade celular quando comparado ao ZnOGd. É importante destacar que esses PQs são em sua maioria constituídos por ZnOGd. Enquanto que a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a viabilidade celular do ZnOGd foi de quase 20%, para o ZnOGd-GCIS/ZnS foi maior e muito semelhante

ao GCIS/ ZnS. Esses achados revelam que mesmo com pequenas proporções de GCIS/ZnS adicionados ao ZnOGd Qdots, os novos Qdots desenvolvidos têm menos citotoxicidade quando comparados ao ZnOGd.

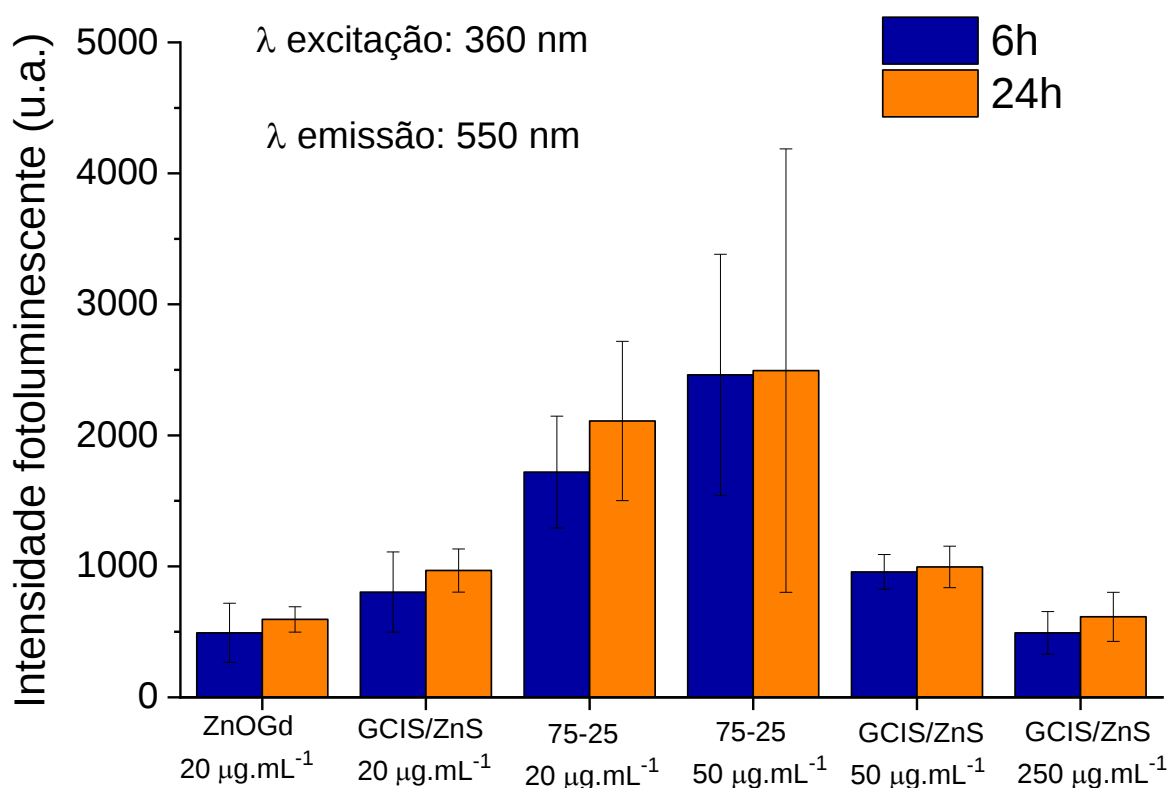
Figura 42. Citotoxicidade de pontos quânticos modificados com GPTMS e dispersos em água (ZnOGd, GCIS / ZnS e ZnOGd-GCIS / ZnS (75-25)) em células de fibroblasto 3T3 / NIH. As células foram incubadas com diferentes concentrações (5,15,20,50,200 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) por 4 h em 5% de CO_2 e 37 °C. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes. A significância estatística foi determinada usando o teste de análise de variância One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparações múltiplas. (CT = controle, * $p < 0,05$).



Para o ensaio de captação celular foram utilizadas diferentes concentrações: i) a mesma concentração na qual todos os PQs não apresentaram citotoxicidade em células NIH/3T3, ou seja, 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e ii) a concentração máxima que cada ponto quântico separadamente não apresentou perda da viabilidade celular em células NIH/3T3, sendo 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para os PQs de ZnOGd, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para os PQs ZnOGd-GCIS/ZnS e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para os PQs de GCIS/ZnS. É importante destacar que esses PQs também foram modificados pelo GPTMS e dispersos em água.

A figura 43 mostra os resultados obtidos utilizando um comprimento de onda de excitação de 360 nm e de emissão de 550 nm. Comparando os três PQs, na concentração de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, foi observado uma maior captação celular para os PQs conjugados (75-25). No entanto, quando foi aumentada destes PQs para 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a média apresentou um pequeno aumento da captação celular. É importante destacar que, o desvio padrão apresentado foi muito alto para esse PQs nessa concentração, principalmente quando incubado por um período de 24 horas. Possivelmente, isso aconteceu devido à sedimentação desses PQs, que se apresentam dispersos em água como uma suspensão, logo, conforme aumenta o tempo de incubação, provavelmente houve uma sedimentação importante. Ainda, a incubação por 24 horas não aumentou significativamente a captação desses PQs nas células NIH/3T3. Independente da concentração testada, os PQs conjugados (75-25) apresentaram maior captação celular.

Figura 43. captação celular de pontos quânticos modificados com GPTMS e dispersos em água (ZnOGd, GCIS / ZnS e ZnOGd-GCIS / ZnS (75-25)) em células de fibroblasto 3T3 / NIH. As células foram incubadas com diferentes concentrações por 6 h e 24 h. As células foram lavadas com PBS para remover os pontos quânticos que não foram capturados pelas células.



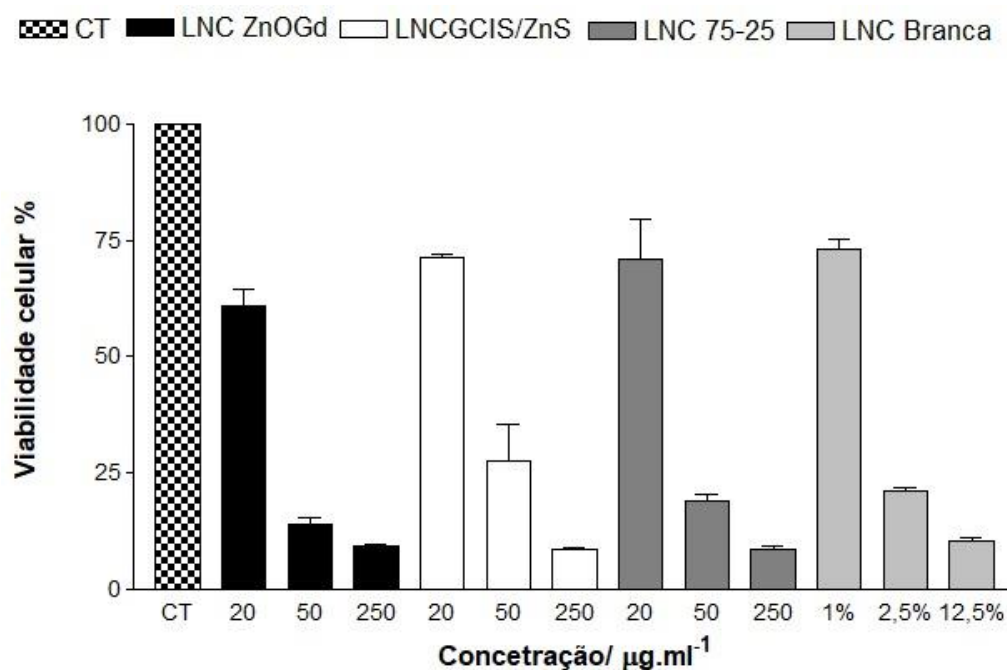
5.1.8.2. PQs associados às nanocápsulas lipídicas

As propriedades citotóxicas dos PQs associados às NCL foram avaliadas em uma faixa de concentração em células NIH/3T3 (figura 44). Para fins de comparação, as NCL brancas foram diluídas utilizando as mesmas proporções para cada concentração testada. Nesse sentido, a figura 44 mostra a porcentagem de nanocápsulas vazias em relação ao volume do meio, sendo que 1% representa a mesma diluição feita para a concentração de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$, 2,5% de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e 12,5% $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Foi possível observar que houve uma perda da viabilidade celular quando comparado aos PQs dispersos em água. Esse efeito acompanha o perfil citotóxico das nanocápsulas lipídicas vazias. Esse efeito também é notado pela semelhança do perfil citotóxico dos 3 PQs em todas as concentrações testadas e é diferente dos PQs modificados e dispersos em água. Enquanto a viabilidade celular dos PQs modificados em água na concentração de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi maior que 80%, para os PQs associados às NCL houve uma diminuição, sendo que para os PQs de ZnOGd, GCIS/ZnS e 75-25 a viabilidade encontrada 61%, 72% e 72%, respectivamente e para as NCL vazias a viabilidade celular foi cerca de 73%. No entanto, quando a concentração dos PQs associados às NCL foi aumentado para $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a viabilidade celular não ultrapassou 30% para todos os PQs associados às NCL, sendo que os valores encontrados para os PQs de ZnOGd, GCIS/ZnS e 75-25 foram de 14%, 27% e 19%, respectivamente e para as NCL vazias, 21%. Quando a concentração dos PQs associados às NCL foi aumentada para $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a viabilidade celular não ultrapassou 10%.

Szwed et al., 2020 estudaram a toxicidade de NCL em células de câncer de mama. Nesse trabalho, as NCL utilizadas eram constituídas dos mesmos componentes que usamos aqui nessa tese. As NCL vazias induziram o aumento do pH lisossomal, mas também acidificação do citosol, uma inibição rápida da síntese de proteínas, geração de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica. É importante destacar que esses efeitos foram diferentes dependendo das células testadas (SZWED et al., 2020).

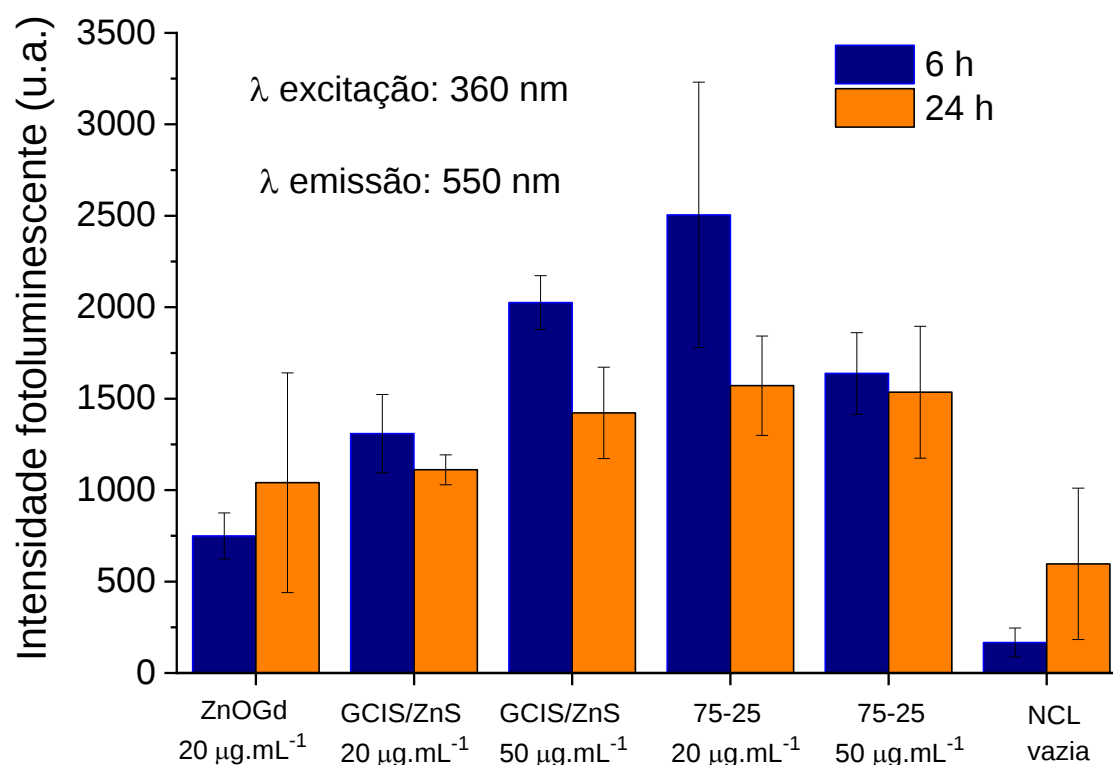
Roux et al., 2017 avaliaram o perfil citotóxico de NCL de diferentes tamanhos (27 a 112 nm) frente linhagem celular de macrófagos RAW264.7. A determinação da concentração letal 50% (LC50) mostrou que o tamanho influenciou nos perfis citotóxicos. Dessa forma, nanocápsulas menores tiveram LC50 menor, ou seja, foram mais citotóxicas comparadas às maiores. O tensoativo Solutol® HS15 demonstrou ser o único componente que resultou em citotoxicidade (ROUX et al., 2017).

Figura 44. Citotoxicidade de pontos quânticos associados às nanocápsulas lipídicas (ZnOGd, GCIS/ZnS e ZnOGd-GCIS / ZnS (75-25)) em células de fibroblasto 3T3/NIH. As células foram incubadas com diferentes concentrações (20,50, e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) por 4 h em 5% de CO_2 e 37 °C. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes. A significância estatística foi determinada usando o teste de análise de variância One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparações múltiplas. (CT = controle, * $p < 0,05$).



A figura 45 mostra os resultados de captação celular dos PQs associados às NCL obtidos utilizando um comprimento de onda de excitação de 360 nm e de emissão de 550 nm. Foi observada uma maior captação celular para as NCL associadas aos PQs conjugados (75-25) na concentração de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, quando utilizado um tempo de incubação de 6h. A captação celular foi diminuída com o aumento do tempo de incubação para 24h, podendo ser explicado por uma maior porcentagem de morte celular com o maior tempo de incubação, ou então pela diminuição da estabilidade fotoluminescente dos PQs devido sua agregação. É importante destacar que em todas as concentrações testadas, foram encontradas perda da viabilidade celular no ensaio de citotoxicidade. Ainda, as NCL vazias também apresentam emissão em 550 nm quando excitadas em 360 nm. No entanto, essa emissão foi menor quando comparado às NCL associadas aos PQs, mostrando que houve captação celular dos mesmos.

Figura 45. captação celular de pontos quânticos associados às NCL (ZnOGd, GCIS / ZnS e ZnOGd-GCIS / ZnS (75-25)) em células de fibroblasto 3T3/NIH. As células foram incubadas com diferentes concentrações por 6 h e 24 h. As células foram lavadas com PBS para remover os pontos quânticos que não foram capturados.



5.1.9 Conjugação dos PQs com peptídeo

Esse tópico contém uma outra alternativa para a associação com PQs a nanocarreadores, objetivando a aplicação teranóstica. A associação dos PQs com peptídeos fez parte do projeto BEPE no laboratório MINT na universidade de Angers, França.

5.1.9.1. Peptídeo-PQs Carboxyelthylsilanetriol

Após a preparação da Arg9, a ideia foi acoplá-los com o Carboxyelthylsilanetriol e, em seguida, adicionar os PQs. No entanto, houve incompatibilidade da solubilidade entre o silano

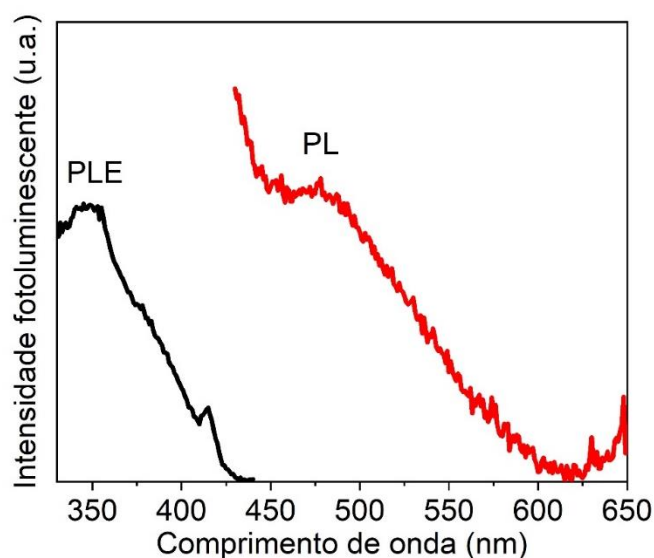
e os solventes da síntese peptídica (dimetilformamida-DMF). O carboxyelthylsilanetriol foi previamente liofilizado, mas quando p DMF foi adicionado, não houve dispersão. Outro solvente de síntese foi testado (N-metil-2-pirrolidona-NMP), mas também não se dispersou.

Outras estratégias foram realizadas. A primeira, foi a modificação da superfície dos PQs para depois acopla-los com o peptídeo. A modificação da superfície foi realizada para proporcionar função carboxílica superficiais e o peptídeo poder ligar-se covalentemente aos PQs através de uma ligação amida. As modificações dos PQs foram realizadas utilizando carboxyelthylsilanetriol como modificador. No final da reação, formou-se um precipitado viscoso. Este gel pode ser disperso em água, resultando em um sistema translúcido com luminescência amarela. No entanto, após 3 dias de armazenamento, o sistema estava turvo e não foi detectado as características luminescentes. Essa estratégia foi descartada por problemas de estabilidade.

5.1.9.2. ZnO-GCIS/ZnS (98-2) acoplado com o complexo Arg9-p54

A figura 46 mostra os perfis de excitação e emissão do complexo Arg9-p54-PQs. O PLE apresentou o pico a 350 nm, seguido pelo espectro de emissão (PL) com emissão máxima em 477 nm. Quando excitados com uma lâmpada UV, os pós dos PQs eram luminescentes. Entretanto, após a junção peptídica, não foi possível ver a luminescência Arg9-p54-PQs excitando com uma lâmpada UV. As auto-montagens foram caracterizadas em termos de tamanho (espalhamento de luz - DLS) e índice de polidispersidade (tamanho: 191 nm / PDI: 0,3).

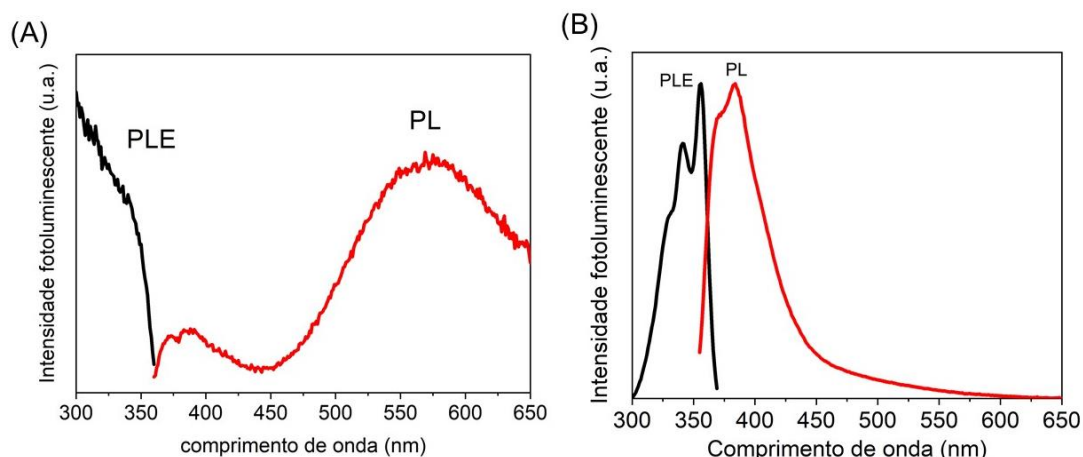
Figura 46. Espectro de excitação (PLE) espectro de emissão (PL) do Arg9-p54-PQs.



5. 1. 9.3. ZnOGd-GCIS/ZnS-3 (75-25%) acoplados com o complexo Arg8-p54

A figura 47 mostra os espectros de excitação e emissão do Arg9-p54-PQs sintetizados com diferentes proporções entre Arg8-p54 e PQs de ZnOGd-GCIS ZnS de 3mg/mL e 2mg/mL e 3mg/mL e 1mg/mL, respectivamente. Para o complexo contendo pequenas proporções de PQs (A), o espectro de excitação (PLE) apresentou o pico a 350 nm, seguido pelo espectro de emissão (PL) com emissão máxima a 485 nm. As automontagens foram caracterizadas em termos de tamanho e índice de polidispersidade (tamanho: 130 nm / PDI: 0,5). Quando houve a diminuição da concentração de PQs para 1mg / ml (B), as propriedades luminescentes foram alteradas. O espectro de excitação (PLE) apresentou o pico máximo a 350 nm, seguido pelo espectro de emissão (PL) com emissão máxima a 386 nm. O tamanho e o PDI foram de 700 nm e 0,7, respectivamente. No entanto, em ambas as concentrações de PQs, não foi possível ver a luminescência de Arg8-p54-PQs quando excitado com uma lâmpada UV.

Figura 47. Espectros de excitação (PLE) e espectros de emissão (PL) do complexo Arg8-p54-PQs preparados com 2 mg/ml (A) e 1 mg/mL (B) de ZnOGd-GCIS/ZnS-3.



5.2. PQs de GCIS/ZnS sintetizados pela rota 2

Embora os PQs de GCIS/ZnS sintetizados pela rota 1 e associados com os PQs de ZnOGd tenham resultado em luminescência otimizada, sendo que a associação dos PQs de ZnOGd-GCIS/ZnS com as nanocápsulas lipídicas possibilitaram também a obtenção de imagens por ressonância magnética, a alta proporção de matéria orgânica resultou em perda da capacidade de excitar os PQs associados as nanocápsulas lipídicas utilizando um comprimento de onda fora do UV, conforme descrito na seção 5.1.4.2.

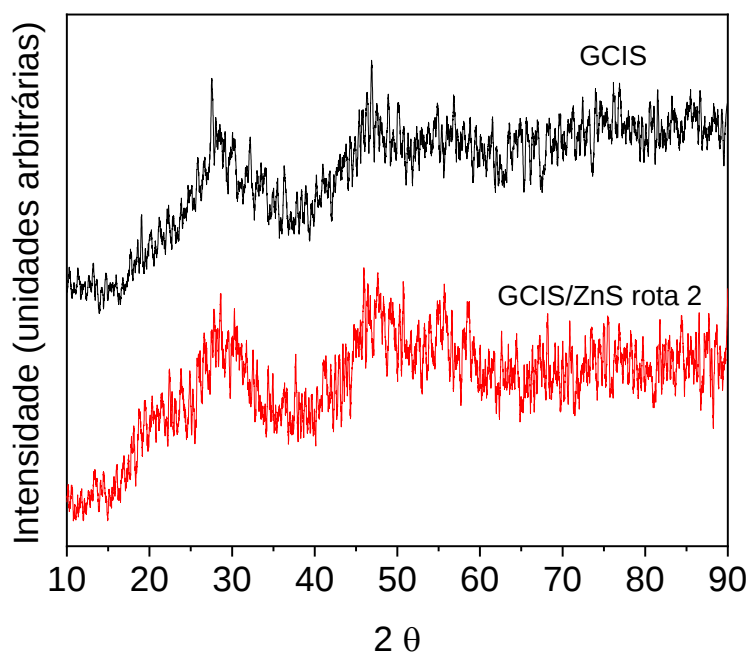
Nesse sentido, com o intuito de otimizar a síntese desenvolvida por Yang e colaboradores 2015, foi pensando em uma estratégia de substituição do 1-octadeceno pelo DDT na etapa de formação do ZnS. Essa estratégia foi utilizada pois, Akdas e colaboradores 2015 mostraram que o DDT pode interagir com o ODE a altas temperaturas e formar tioéter dodeciloctadecil sulfeto, o que induz impurezas extras e traz problemas para o processo de purificação. Esses problemas de purificação foram encontrados para os PQs de GCIS/ZnS sintetizados pela rota 1 uma vez que houve um padrão na difração de raios X diferente do esperado para os PQs de CIS após a introdução do ZnS, conforme observado nas figuras 18 e 19. Além disso, as análises termogravimétricas mostram a presença de elevada carga orgânica.

A figura 48 mostra uma comparação entre os difratogramas de raios X dos PQs de GCIS com os PQs de GCIS/ZnS. Os PQs de GCIS apresentam o difratograma

semelhante ao encontrado por Yang e colaboradores 2015, em que foram observados três picos alargados situados 2θ com valor de $27,46^\circ$; $46,87^\circ$ e $56,05^\circ$. De acordo com Donat e colaboradores 2017 esses picos são correspondentes aos planos cristalográficos (112), (204)/(220) e (116)/(312) da estrutura tetragonal de calcopirita dos PQs de CIS. Os mesmos picos são observados para os PQs de GCIS/ZnS, sendo que há um pequeno deslocamento para ângulos maiores. Yang e colaboradores 2015 atribuíram esse deslocamento à formação do ZnS em torno do GCIS (YANG et al., 2015). Deslocamentos semelhantes foram observados por Wang e colaboradores 2018 para os PQs de CIS/ZnS (WANG et al., 2018). Gu e colaboradores 2013 observaram que conforme houve o aumento da proporção de zinco em relação ao cobre o deslocamento foi maior, sugerindo também que dessa forma, nesse trabalho o zinco foi incorporado na estrutura cristalina do CIS, resultando em ZCIS. Esses pesquisadores adicionaram ZnS à estrutura e observaram os picos do DRX também deslocaram em direção aos ângulos mais altos e está mais próximo dos picos de difração padronizados da estrutura cristalina do zinc blend (GUO et al., 2013)

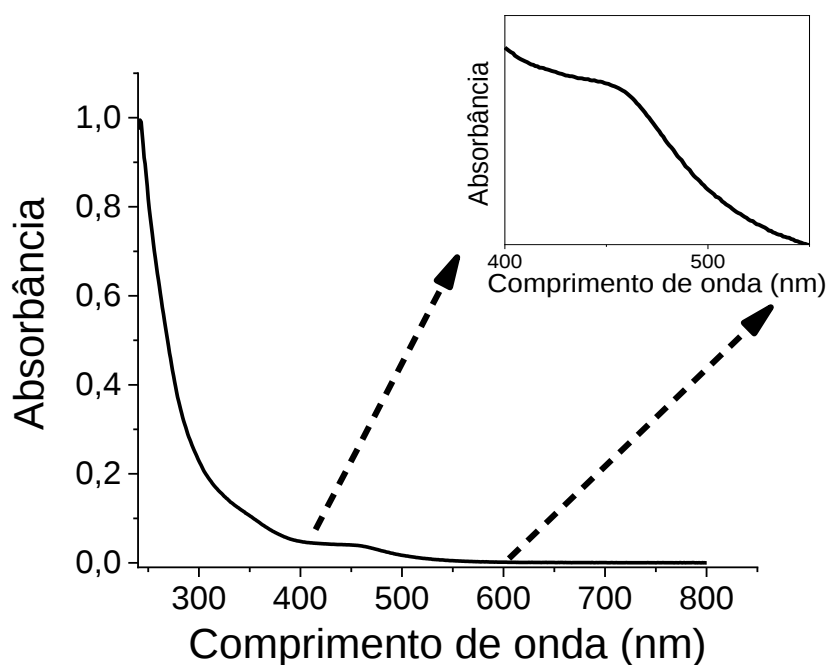
É importante destacar que a rota 2 para a síntese dos PQs de GCIS/ZnS não resultou na presença dos picos intensos em baixos ângulos como na rota de síntese 1, sugerindo que não houve a formação do sulfeto de tioéter dodeciloctadecil (AKDAS et al., 2015), que é de difícil remoção sem a alteração das propriedades fotoluminescentes.

Figura 48. Difratomogramas de raios X dos PQs de GCIS e GCIS/ZnS (rota 2).



A figura 49 mostra os espectros de absorção dos PQs de GCIS/ZnS. Os PQs de GCIS/ZnS apresentam um amplo espectro de absorção que vai desde a região do UV até o visível. É possível observar um ombro entre 400 e 500 nm. Essa característica é comum nos PQs de GCIS/ZnS, sendo encontrada por outro pesquisadores (JIAO et al., 2020; WADA et al., 2017). Não houveram deslocamentos no comprimento de onda máximo de absorção nessa região quando comparamos os PQs de GCIS/ZnS sintetizados pela rota 1 e pela rota 2.

Figura 49. Espectros de absorção UV-vis dos PQs de GCIS/ZnS sintetizados pela rota 2.

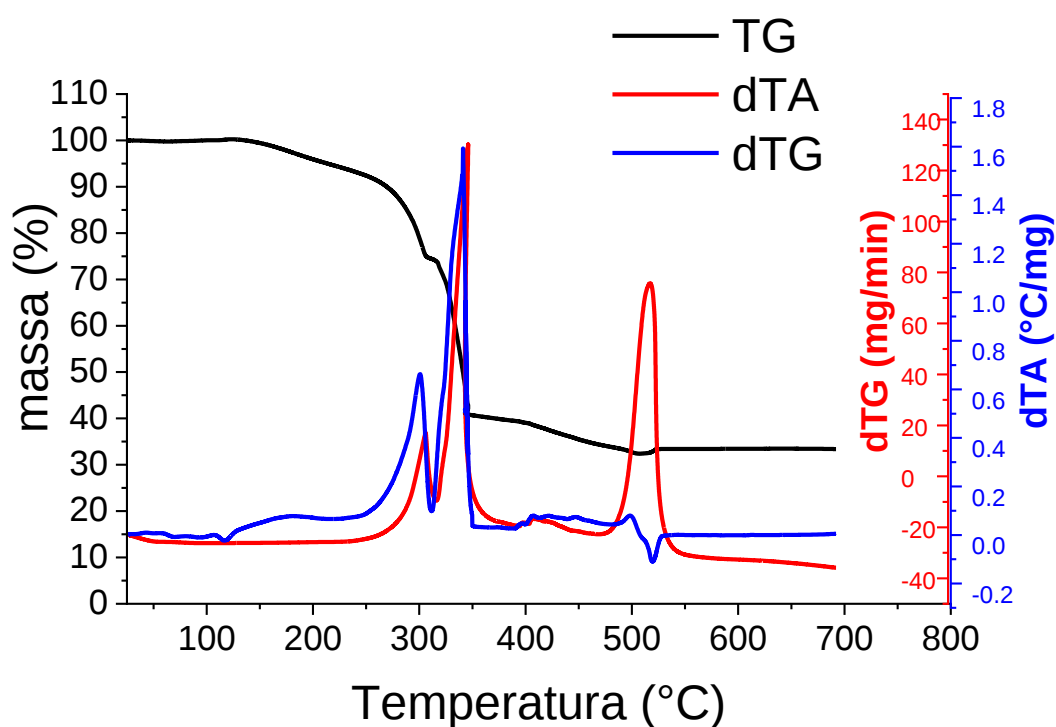


A figura 50 mostra as análises termogravimétricas (TG) dos PQs de GCIS/ZnS sintetizados pela rota 2. Essa rota de síntese resultou em uma menor perda de massa quando comparado com a rota 1 (65 e 93%, respectivamente). Os reagentes utilizados para a síntese do GCIS/ZnS reagem e formam produtos sólidos que incorporam os PQs (AKDAS et al., 2015). Como citado anteriormente, esse fato ocorre pela interação entre o DDT e o ODE, formando sulfeto de tioéter dodeciloctadecil (AKDAS et al., 2015). Dessa forma, sugerimos que a menor perda de carga orgânica quando não utilizados o ODE (rota 2) é devido a não formação desse produto sólido. Entretanto, utilizando a rota

de síntese 2, a quantidade de DDT foi maior, uma vez que foi o reagente escolhido para a substituição do ODE. Somando esse fato com ainda outros reagentes utilizados como a oleilamina e o ácido oleico, a perda de massa de 65% continuou acentuada. Dessa forma, podemos afirmar que ainda há resíduos destes reagentes.

Até 200°C há uma sutil perda de massa de 5% que pode ser oriunda da degradação dos solventes residuais e da água atmosférica adsorvida. A perda de massa que ocorre entre 300 e 400°C pode ser devido a decomposição de moléculas de ácido oleico e oleilamina, pois as temperaturas de ebulição desses dois reagentes são 360°C e 364°C, respectivamente (GALARRETA et al., 2018). Ainda, Wada e colaboradores 2017 atribuíram a acentuada perda de massa à decomposição do DDT, sendo que essa perda diminuiu após as modificações de superfície PQs (WADA et al., 2017).

Figura 50. Análises termogravimétricas dos PQs de GCIS/ZnS sintetizados pela rota 2.



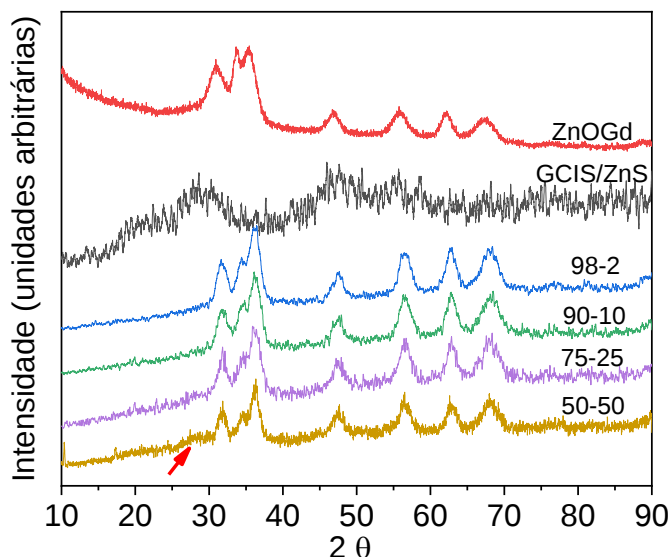
5.2.1. Acoplamento dos PQs de GCIS/ZnS (rota 2) com PQs de ZnOGd

Foram selecionadas duas rotas para realizar esse acoplamento: i) com os pós PQs de ZnOGd modificados por HTMS e ii) com os pós de PQs de ZnOGd sem modificação.

Essa estratégia foi realizada pois os PQs de ZnO quando modificados com HTMS, se dispersam melhor em clorofórmio, solvente utilizado para realizar o acoplamento.

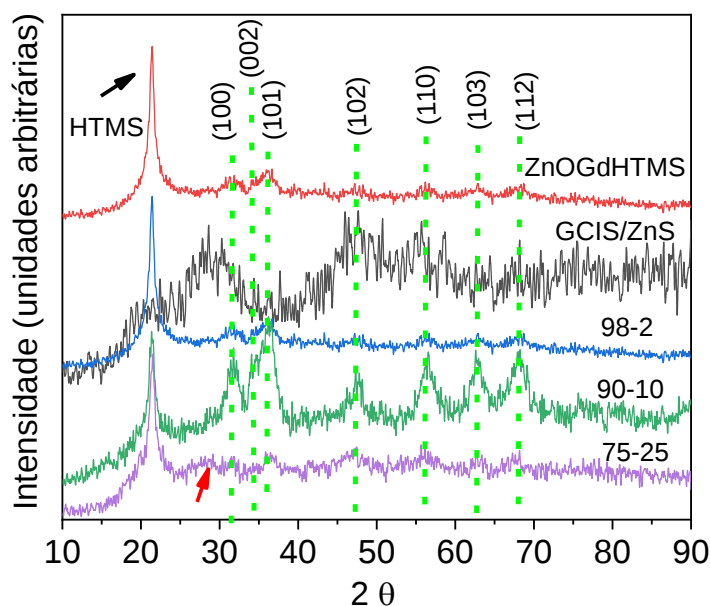
Os difratogramas de raios X dos PQs de ZnOGd, GCIS/ZnS (rota 2) e dos PQs conjugados através do tratamento térmico usando diferentes proporções em massa de cada PQ isolados são apresentados na figura 51. Os PQs conjugados, independente da proporção utilizada, apresentam picos correspondem aos planos difratores característicos do ZnO na sua fase hexagonal com estrutura de wurtizita. Entretanto, esses picos apresentam-se deslocados para ângulos maiores. Após a conjugação, não foi possível observar todos os picos característicos do GCIS/ZnS, ou seja, três picos alargados localizados em 2θ com valor de $27,46^\circ$; $46,87^\circ$ e $56,05^\circ$, correspondentes aos planos cristalográficos (112), (204)/(220) e (116)/(312) da estrutura tetragonal de calcopirita dos PQs de CIS (DONAT et al., 2017; YANG et al., 2015). Entretanto, indicado na forma de seta vermelha, principalmente na proporção 50-50, há a presença de um pico alargado situado em 2θ com valor de $27,46^\circ$, ou seja, característico do plano (112) da estrutura calcopirita do GCIS/ZnS. Diferente dos PQs conjugados usando a rota de síntese 1, não foram observados os picos intensos localizados em 2θ igual a $21,68^\circ$ e $24,11^\circ$.

Figura 51. Comparação entre os difratogramas de raios X dos PQs de ZnOGd, GCIS/ZnS e suas respectivas associações após o tratamento térmico à 260°C .



A figura 52 mostra os difratogramas de raios X dos PQs de ZnOGd HTMS, GCIS/ZnS (rota 2) e dos PQs conjugados através do tratamento térmico usando diferentes proporções em massa de cada PQ isolados. É possível observar os picos correspondentes à fase hexagonal do ZnO com estrutura de wurtizita. Entretanto, em relação aos PQs sem modificação, apresentados na figura anterior, os picos encontram-se mais alargados. Dessa forma, para melhor visualização, foi indicado na forma de reta tracejada em verde, a presença da fase hexagonal do ZnO com estrutura de wurtizita os picos correspondentes aos planos difratadores (100), (002), (101), (102), (110), (103) e (112) (JANAKI; SAILATHA; GUNASEKARAN, 2015; SPANHEL; ANDERSON, 1991). Os PQs de ZnOGd modificados pelo HTMS e os PQs conjugados apresentaram um pico intenso, situado em 2θ igual a 22, podendo ser uma indicação da formação de uma camada de HTMS ao redor do núcleo dos PQs (LI et al., 2015a; RISSI; HAMMER; CHIAVACCI, 2017). Após a conjugação, não foram observados todos os picos característicos do GCIS/ZnS, ou seja, três picos alargados localizados em 2θ com valor de 27,46°; 46,87° e 56,05°, correspondentes aos planos cristalográficos (112), (204)/(220) e (116)/(312) da estrutura tetragonal de calcopirita dos PQs de CIS (DONAT et al., 2017; YANG et al., 2015). Entretanto, indicado na forma de seta vermelha, é possível observar um pico alargado, mais evidente na proporção ZnOGd e GCIS/ZnS 75-25, evidenciando o plano (112) da estrutura de calcopirita do GCIS/ZnS.

Figura 52. Comparação entre os difratogramas de raios X dos PQs de ZnOGdHTMS, GCIS/ZnS e suas respectivas associações após o tratamento térmico à 260°C.

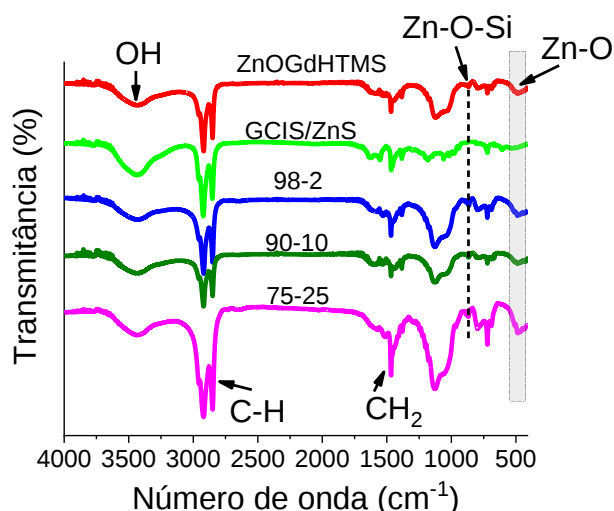


A figura 53 mostra os espectros vibracionais na região do infravermelho para os PQs de ZnOGd modificados com HTMS e GCIS/ZnS e suas associações em diferentes proporções após o tratamento térmico a 260°C por 10 minutos. Para os PQs de ZnOGd, GCIS/ZnS e suas associações foi possível observar uma banda de absorção a 3400 cm^{-1} , característica dos grupos hidroxilas OH, indicando a presença de água na superfície do cristal (FAKHRI; MAHJOUB; KHAVAR, 2014). Nos PQs de ZnOGd, e os PQs conjugados é possível observar vibrações características da ligação Zn-O em 470 cm^{-1} , (CAMARDA et al., 2016; FAKHRI; MAHJOUB; KHAVAR, 2014). Os PQs apresentam estiramentos simétricos e assimétricos atribuídos à ligação C-H, situados entre 2963 e 2853 cm^{-1} . Essa ligação pode estar tanto associada ao modificador de superfície para os PQs de ZnOGd enquanto para os PQs de GCIS/ZnS, pode ser proveniente de resíduos de DDT, ou outros reagentes da síntese, conforme citado anteriormente. Em 1461 cm^{-1} foi encontrado uma banda correspondente a deformação simétrica do CH_2 .

Após a conjugação, é possível observar tanto as vibrações características dos PQs de ZnOGd, quanto as características do GCIS/ZnS. Para os PQs de ZnOGdHTMS e os

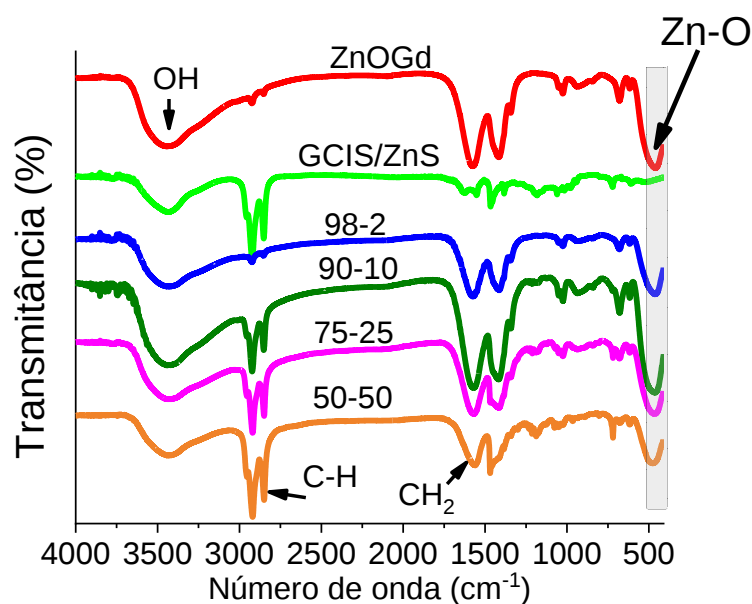
PQs conjugados foram encontradas em 870 cm^{-1} vibrações características às ligações Zn-O-Si, sugerindo que a modificação covalente foi bem sucedida (RISSI et al., 2017).

Figura 53. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho dos PQs de ZnOGd HTMS, GCIS/ZnS (rota 2) e PQs de ZnOGd-GCIS/ZnS preparados com diferentes proporções entre os PQs de ZnOGd HTMS e GCIS/ZnS (rota 2).



A figura 54 mostra os espectros vibracionais na região do infravermelho para os PQs de ZnOGd e GCIS/ZnS e suas associações utilizando diferentes proporções em massa após o tratamento térmico a 260°C por 10 minutos. Os PQs apresentam uma banda de absorção a 3400 cm^{-1} , característica dos grupos hidroxilas OH. Entre 2963 e 2853 cm^{-1} Os PQs apresentam estiramentos simétricos e assimétricos associados à ligação C-H. Essa ligação pode ser oriunda de resíduos de solventes utilizados durante a síntese. Em 1467 cm^{-1} há uma banda que corresponde à deformação simétrica do metileno. Após a conjugação, é possível observar tanto bandas correspondentes ao ZnOGd quanto ao GCIS/ZnS, sendo que os PQs de ZnOGd e os PQs conjugados, independente da proporção utilizada, apresentam vibrações características da ligação Zn-O em 470 cm^{-1} , (CAMARDA et al., 2016; FAKHRI; MAHJOUB; KHAVAR, 2014)

Figura 54. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho dos PQs de ZnOGd, GCIS/ZnS (rota 2) e PQs de ZnOGd-GCIS/ZnS preparados com diferentes proporções entre os PQs de ZnOGd HTMS e GCIS/ZnS (rota 2).



A figura 55 mostra os espectros de excitação (PLE)-A e emissão (PL)- B e C dos PQs de ZnOGd, GCIS/ZnS (rota 2) e suas associações o após tratamento térmico. A tabela 7 mostra os valores máximos encontrados. Os PQs de ZnOGd apresentam PLE na região do UV, por volta de 370 nm. Para os PQs de GCIS/ZnS, é possível observar 2 bandas situadas em 370 nm e 592 nm. Após a conjugação, os PQs de ZnOGd-GCIS/ZnS apresentam tanto a banda próximo a 370 nm quanto a segunda banda, a partir de 10% de GCIS/ZnS, que desloca para regiões de comprimento de onda maior, conforme aumenta a proporção de GCIS/ZnS. Nos espectros de emissão b e c foi possível observar que os PQs de GCIS/ZnS, quando excitados utilizando um comprimento de onda de 370 nm apresentam máximo de emissão em 672 nm. Utilizando um comprimento de onda de excitação de 592 nm, a intensidade máxima de emissão foi alcançada em 705 nm. Enquanto PQs conjugados utilizando os PQs de GCIS/ZnS sintetizados pela rota de 1 possuíam máximo de emissão situados em regiões intermediárias entre o ZnOGd e o GCIS/ZnS, os PQs conjugados utilizando os PQs de GCIS/ZnS sintetizados pela rota de síntese 2, tiveram um deslocamento da emissão para o vermelho (tanto quando excitados na região do UV (b) quanto na do visível (c)) em comparação com os PQs de GCIS/ZnS, sendo que esse deslocamento aumentou conforme aumentou a proporção de GCIS/ZnS.

Embora a conjugação dos PQs quânticos de ZnOGd com GCIS/ZnS sintetizados pela rota 1 tenham mostrado excelentes propriedades fotoluminescentes, aqui os PQs conjugados utilizando os PQs de GCIS/ZnS apresentaram um deslocamento para região do vermelho, sendo que a partir da proporção 90% de ZnOGd e 10% de GCIS/ZnS todos possuíram uma emissão entre 708 a 820 nm, o que torna mais viável para a aplicação biológica.

Os PQs com fluorescência na região do infravermelho próximo (NIR) variando entre 700 a 1000 nm tem recebido atenção. A luz nessa região espectral (primeira janela do NIR) é adequada para imagens biológicas não invasivas in vivo, justificada pela baixa autofluorescência, penetração mais profunda e alta razão sinal-fundo resultante da maioria dos tecidos (DENG; QU; GU, 2014). Além disso, a emissão exibida pelos principais PQs requer uma excitação na faixa de UV, o que limita suas aplicações em um contexto biológico devido ao potencial dano ao tecido (JANJETOVIC et al., 2017) e ao forte sinal de autofluorescência do meio biológico (KHALID et al., 2019; MONICI, 2005).

Figura 55. Espectros de excitação (PLE)- (a) e emissão (PL) após a excitação na região do UV (b) e do visível (c) dos PQs de ZnOGd, GCIS/ZnS (síntese sem ODE) e dos PQs conjugados após tratamento térmico em utilizando diferentes proporções entre os PQs de ZnOGd e e GCIS/ZnS. Dados normalizados.

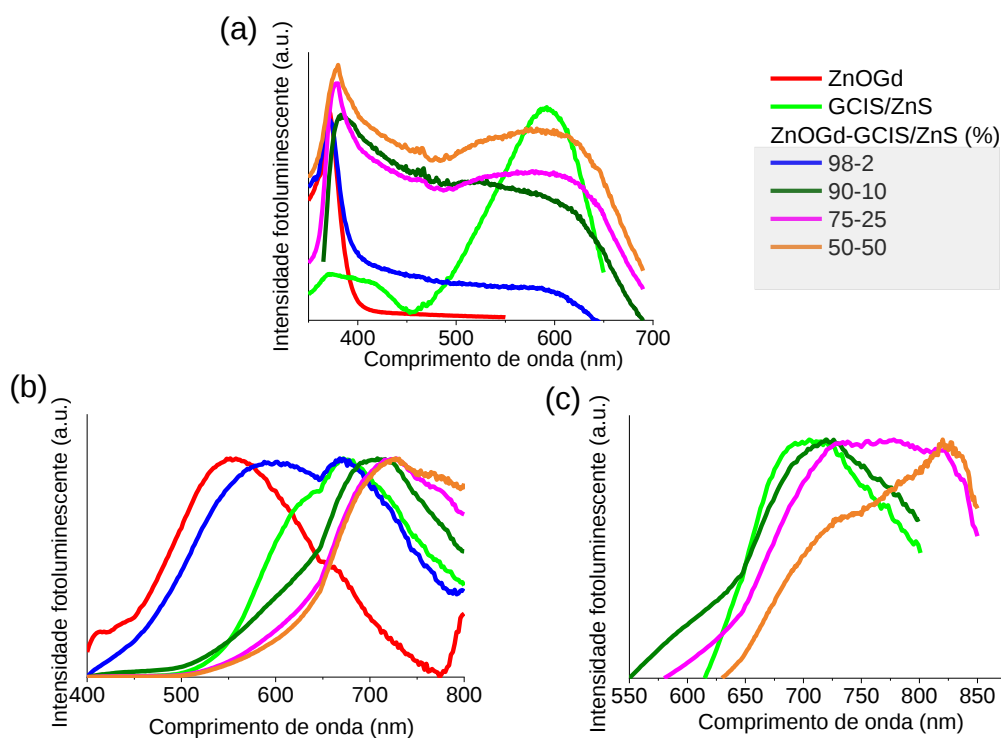


Tabela 7. Valores de intensidade máxima dos espectros de excitação (PLE) e de emissão (PL) dos PQs mostrados na figura 53.

Amostra	PLE (nm)	PL (nm)
GCIS/ZnS	370	672
	592	705
ZnOGd	370	550
98-2	370	595/670
90-10	378	708
	520	724
75-25	377	728
	550	778
50-50	380	727
	600	820

Os PQs de ZnOGd foram modificados pelo HTMS para facilitar a dispersão em clorofórmio e posteriormente realizar o acoplamento com o GCIS/ZnS. A figura 56 mostra os espectros de excitação (PLE) -A e emissão (PL)- B e C dos PQs de ZnOGdHTMS, GCIS/ZnS (rota 2) e suas associações o após tratamento térmico. A tabela 8 mostra os valores máximos encontrados. Os PQs de ZnOGdHTMS possuíram um PLE com máximo em 360, seguido pelo PL com máximo em 588 nm. Os PQs conjugados, apresentaram dois picos um próximo a 380 nm, e outro em torno de 600 nm. Nos espectros de emissão b e c foi possível observar que houve um deslocamento para o visível dos PQs conjugados em relação aos PQs de GCIS/ZnS. Esses deslocamentos não mudaram muito em relação aos PQs conjugados utilizando o ZnOGd sem HTMS. Inclusive para a proporção 75-25 foram encontrados os mesmos valores de PL tanto excitando no UV quanto no visível. Dessa forma, o uso do HTMS para realizar o acoplamento não alterou de forma significativa as propriedades fotoluminescentes.

Figura 56. Espectros de excitação (PLE)- (a) e emissão (PL) após a excitação na região do UV (b) e do visível (c) dos PQs de ZnOGdHTMS, GCIS/ZnS (síntese sem ODE) e dos PQs conjugados após tratamento térmico em utilizando diferentes proporções entre os PQs de ZnOGdHTMS e GCIS/ZnS. Dados normalizados.

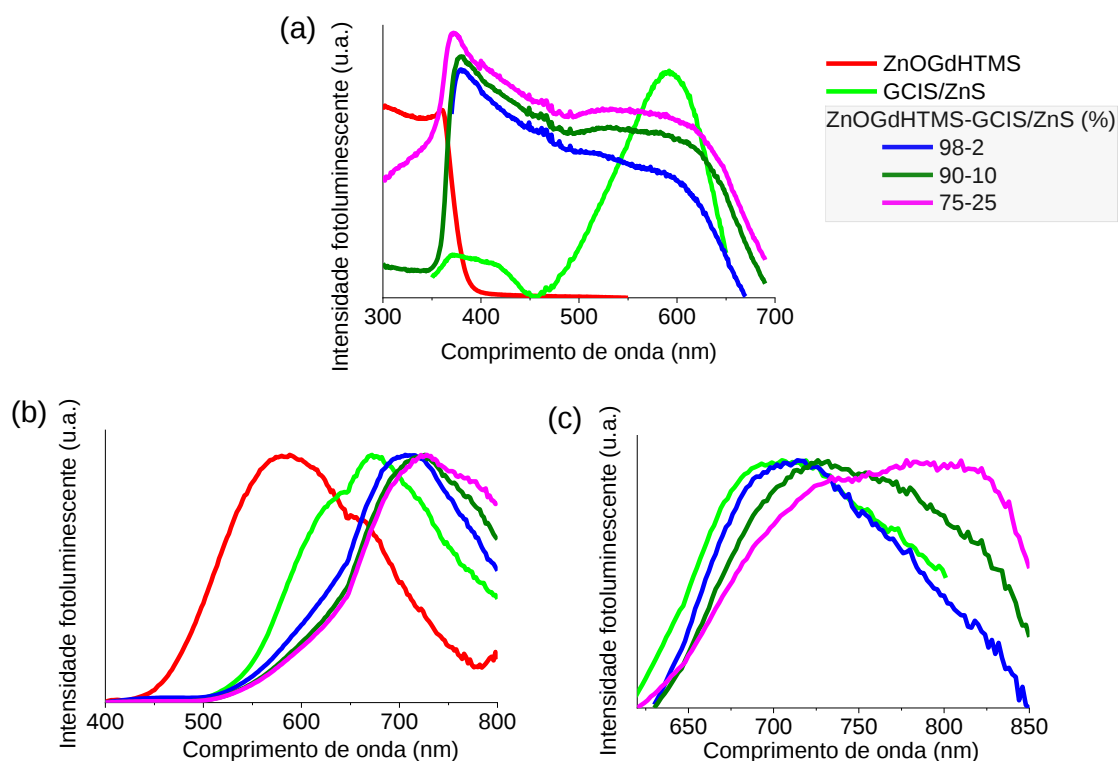
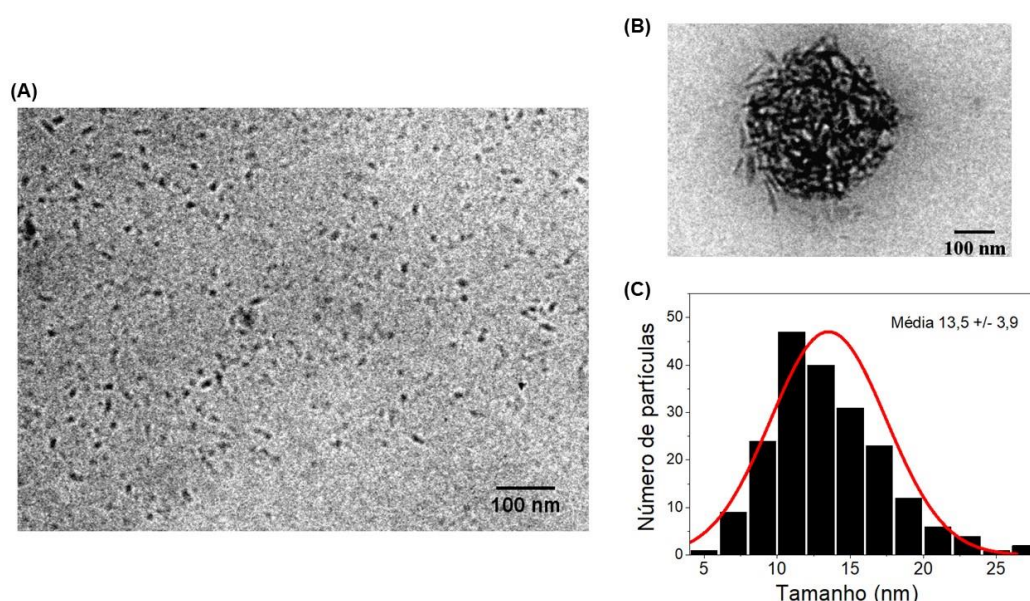


Tabela 8. Valores de intensidade máxima dos espectros de excitação (PLE) e de emissão (PL) dos PQs mostrados na figura 54.

Amostra	PLE (nm)	PL (nm)
GCIS/ZnS	370	672
	592	705
ZnOGdHTMS	360	588
98-2	380	706
	600	714
90-10	380	726
	600	726
75-25	372	728
	590	778

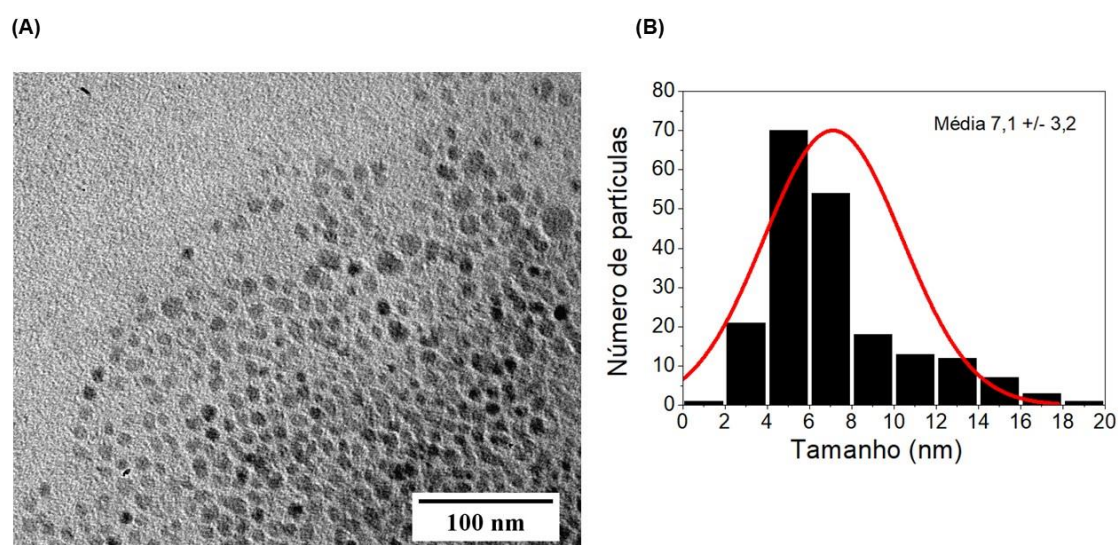
A figura 57 mostra as imagens de microscopia eletrônica de transmissão dos PQs de GCIS/ZnS sintetizados pela rota 2 (A e B). A contagem de 200 partículas foi efetuada para realizar a distribuição de tamanho (C). Diferentemente dos PQs de GCIS/ZnS sintetizados pela rota 1, que apresentavam tamanho médio de 3,0 nm (figura 17), os PQs de GCIS/ZnS sintetizados pela rota 2 apresentaram tamanho médio de 13,5 sendo sua morfologia mais alongada. Esses PQs quando se aglomeram, podem formar estruturas maiores, conforme mostrado na figura B, mostrando uma esfera de 360 nm constituídas de menores partículas na forma de agulhas. Essa rota de síntese utilizada não foi previamente relatada na literatura. Normalmente os trabalhos mostram que os PQs de CIS/ZnS possuem tamanho médio de 3,0 nm (DONAT et al., 2017; YANG et al., 2015). Algumas hipóteses podem ser levantadas para esse tamanho maior encontrado nessa tese. A distribuição de tamanho foi realizada contando 200 partículas a partir do maior lado, pois a morfologia não era esférica. Ainda, não foi possível realizar uma aproximação maior nas imagens de MET, o que nos gera dúvidas de estar mensurando apenas uma partícula ou agregados ou se há uma casca recobrindo os PQs. Gromova e colaboradores 2017 mostraram que PQs de CIS sintetizados utilizando DDT possuíam ligantes constituídos de uma dupla camada composta por moléculas de dodecanotiolato e didodecil sulfeto (GROMOVA et al., 2017). Por isso, técnicas complementares para a análise de tamanho devem ser realizadas para confirmar.

Figura 57. Imagens de Microscopia eletrônica de transmissão (A e B) e distribuição de tamanho dos PQs (C) de GCIS/ZnS sintetizados pela rota 2.



A figura 58 mostra imagem de microscopia eletrônica de transmissão dos PQs após o tratamento térmico utilizando uma proporção de 75% de ZnOGd e 25% de GCIS/ZnS rota 2. Os PQs apresentam morfologia quase esférica (A) e uma média de tamanho de 7,1 nm. Conforme demonstrado anteriormente os PQs de ZnOGd tem cerca de 3,2 nm. Diferentemente dos PQs de GCIS/ZnS sintetizados pela rota 1 (que possuíam 3,0 nm), a microscopia mostrou que os sintetizados pela rota 2 podem ser maiores. No entanto, após o tratamento térmico não houve um aumento somado ao tamanho dos 2 PQs (GCIS/ZnS de 13 nm com ZnOGd de 3,2 nm), conforme ocorreu anteriormente (ver figura 15). Muitas hipóteses podem ser levantadas para isso. Possivelmente, os PQs de GCIS/ZnS perderam alguns componentes durante o tratamento térmico, como por exemplo um revestimento de superfície, o que ocasionou diminuição do tamanho das partículas. Medidas complementares devem ser realizadas para confirmar o que ocorreu nesse processo de tratamento térmico.

Figura 58. Imagem de Microscopia eletrônica de transmissão (A) e distribuição de tamanho (B) dos PQs de ZnOGd-GCIS/ZnS na proporção 75-25 após o tratamento térmico.



6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram realizadas diferentes abordagens para o desenvolvimento de PQs para a aplicação no diagnóstico por luminescência e ressonância magnética. Além da associação com diferentes nanocarreadores, tais como associação dos PQs com NCL e com automontagens contendo peptídeos e ferrocifeno (Arg-p54).

A estratégia de dopar os PQs de ZnO com Gd e associá-los com os PQs de GCIS/ZnS resultou em um material com eficácia para o diagnóstico imagens tanto de ressonância magnética quanto de luminescência. Pequenas proporções de PQs de GCIS/ZnS associados aos PQs de ZnOGd permitiram a excitação em diferentes comprimentos de ondas, característica não encontrada para os PQs de ZnO, que apenas apresentam luminescência quando excitados com lâmpada UV, e não é o ideal para testes *in vivo*.

Com os resultados apresentados nas técnicas de caracterização, sugerimos que os PQs de GCIS/ZnS sintetizados pela rota 1 apresentam uma reação entre o DDT, que interage com o ODE formando um novo composto de difícil remoção, não podendo ser eliminados completamente. Ainda, os PQs associados por meio do tratamento térmico interagem entre si de forma a mudar as propriedades luminescentes tanto do ZnOGd quanto do GCIS/ZnS, portanto sugere-se que uma nova estrutura eletrônica foi formada.

Não foi possível a associação dos PQs Arg-p54 devido à perda da luminescência. No entanto, os PQs de ZnOGd-GCIS/ZnS foram modificados com HTMS para dispersar na fase oleosa do NCL. Assim, o ZnOGd-GCIS/ZnS-NCL pode ser visualizado por imagens de ressonância magnética e luminescência. O ensaio de DOSY-RMN mostrou que esses PQs provavelmente encontram-se associados ao Kolliphor, presentes nas NCL mesmo sem PQs.

Os PQs de ZnOGd, GCIS/ZnS e os PQs conjugados, ZnOGd-GCIS/ZnS também foram modificados pelo GPTMS, permitindo sua dispersão em água e apresentaram excelentes propriedades em imagens de ressonância magnética.

Os PQs conjugados possuíram maior viabilidade celular e captação celular que os PQs de ZnOGd, apresentando assim um material interessante. A avaliação das propriedades citotóxicas e de captação celular dos PQs associados às NCL mostraram uma diminuição da viabilidade e captação celular em relação aos PQs dispersos em água.

No entanto, essa diminuição também foi observada para as NCL vazias, sugerindo que essas nanocápsulas contribuíram para a perda da viabilidade celular.

Uma nova rota de síntese dos PQs de GCIS/ZnS foi realizada (rota 2) mostrando que esses PQs são mais puros, sendo que a associação com o ZnOGd através do tratamento térmico permitiu uma emissão que chegou até 820 nm, ou seja, dentro da primeira janela do infravermelho próximo, região mais favorável para obter imagens biológicas *in vivo*.

Frente aos resultados apresentados, podemos concluir que os PQs desenvolvidos contendo uma associação entre ZnOGd e GCIS/ZnS por meio do tratamento térmico, tanto dispersos em água quanto associados às NCL, apresentam grande potencial para o diagnóstico simultâneo por imagens de ressonância magnética e imagens de luminescência.

7. REFERÊNCIAS

- ABOULAICH, A. et al. Physicochemical properties and cellular toxicity of (poly) aminoalkoxysilanes-functionalized ZnO quantum dots. **Nanotechnology**, v. 23, n. 33, p. 335101, 2012a.
- ABOULAICH, A. et al. Physicochemical properties and cellular toxicity of (poly) aminoalkoxysilanes-functionalized ZnO quantum dots. **Nanotechnology**, v. 23, n. 33, 2012b.
- ADEL, R. et al. Nanocomposite of CuInS/ZnS and Nitrogen-Doped Graphene Quantum Dots for Cholesterol Sensing. **ACS Omega**, v. 6, n. 3, p. 2167–2176, 2021.
- AKDAS, T. et al. The effects of post-processing on the surface and the optical properties of copper indium sulfide quantum dots. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 445, p. 337–347, 2015.
- ÅKERMAN, M. E. et al. Nanocrystal targeting *in vivo*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 20, p. 12617–12621, 2002.
- ALMEIDA, D. B. Pontos quânticos coloidais de semicondutores: sínteses, caracterizações e aplicações. p. 249, 2013.
- ANG, T. P.; CHIN, W. S. Dodecanethiol-protected copper/silver bimetallic nanoclusters and their surface properties. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 47, p. 22228–22236, 2005.
- ANTON, N.; SAULNIER, P.; BENOIT, J.-P. **Aqueous-core lipid nanocapsules for**

encapsulating hydrophilic and/or lipophilic moleculesGoogle Patents, , 2016.

ANTONOW, M. B. et al. Liquid formulation containing doxorubicin-loaded lipid-core nanocapsules: Cytotoxicity in human breast cancer cell line and in vitro uptake mechanism. **Materials Science and Engineering: C**, v. 76, n. Supplement C, p. 374–382, 2017.

ARAÚJO DE SOUZA, A.; LAVERDE, A. Aplicação da espectroscopia de ressonância magnética nuclear para estudos de difusão molecular em líquidos: A técnica dosy. **Química Nova**, v. 25, n. 6 A, p. 1022–1026, 2002.

AWAN, M. J. et al. Efficient Detection of Knee Anterior Cruciate Ligament from Magnetic Resonance Imaging Using Deep Learning Approach. **Diagnostics**, v. 11, n. 1, 2021.

BABAYEVSKA, N. et al. Functionalized multimodal ZnO@ Gd₂O₃ nanosystems to use as perspective contrast agent for MRI. **Applied Surface Science**, v. 404, p. 129–137, 2017.

BAI, X.; PURCELL-MILTON, F.; GUN'KO, Y. K. Optical properties, synthesis, and potential applications of cu-based ternary or quaternary anisotropic quantum dots, polytypic nanocrystals, and core/shell heterostructures. **Nanomaterials**, v. 9, n. 1, 2019.

BAKHTIARI-ASL, F. et al. Bimodal magnetic resonance imaging-computed tomography nanoprobe: A Review. **Nanomedicine Journal**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2020.

BANDEIRA, M. et al. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles: A review of the synthesis methodology and mechanism of formation. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 15, n. June 2019, p. 100223, 2020.

BASKOUTAS, S.; TERZIS, A. F. Size-dependent band gap of colloidal quantum dots. **Journal of Applied Physics**, v. 99, n. 1, 2006.

BENOIT, J.-P.; PERRIER, T. **Method for preparing functionalized lipid capsules**Google Patents, , 2016.

BERBEL MANAIA, E. et al. The Critical Role of Thioacetamide Concentration in the Formation of ZnO/ZnS Heterostructures by Sol-Gel Process. **Nanomaterials**, v. 8, n. 2, 2018.

BHASKAR, S. et al. Multifunctional Nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: perspectives on tracking and neuroimaging. **Particle and fibre toxicology**, v. 7, n. 1, p. 3, 2010.

BRUS, L. Electronic wave functions in semiconductor clusters: experiment and theory. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 90, n. 12, p. 2555–2560, 1986.

BRUS, L. E. A simple model for the ionization potential, electron affinity, and aqueous redox potentials of small semiconductor crystallites. **The Journal of chemical physics**, v. 79, n. 11, p. 5566–5571, 1983.

BUŞILĂ, M. et al. Synthesis and characterization of antimicrobial textile finishing based on Ag: ZnO nanoparticles/chitosan biocomposites. **RSC Advances**, v. 5, n. 28, p. 21562–21571, 2015.

CAETANO, B. L. et al. Revisiting the ZnO Q-dot Formation Toward an Integrated Growth Model: From Coupled Time Resolved UV–Vis/SAXS/XAS Data to Multivariate Analysis. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 121, n. 1, p. 886–895, 2016a.

- CAETANO, B. L. et al. Unified ZnO Q-dot growth mechanism from simultaneous UV–Vis and EXAFS monitoring of sol-gel reactions induced by different alkali base. **Optical Materials**, v. 61, p. 92–97, 2016b.
- CAI, W. et al. Engineering the surface of Gd₂O₃ nanoplates for improved T1-weighted magnetic resonance imaging. **Chemical Engineering Journal**, v. 380, n. July 2019, p. 2–8, 2020.
- CAI, X. et al. PH-Sensitive ZnO Quantum Dots-Doxorubicin Nanoparticles for Lung Cancer Targeted Drug Delivery. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, n. 34, p. 22442–22450, 2016.
- CAI, X. et al. pH-Responsive ZnO Nanocluster for Lung Cancer Chemotherapy. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 9, n. 7, p. 5739–5747, 2017.
- CAMARCA, A. et al. Emergent biosensing technologies based on fluorescence spectroscopy and surface plasmon resonance. **Sensors (Switzerland)**, v. 21, n. 3, p. 1–35, 2021.
- CAMARDA, P. et al. Luminescence mechanisms of defective ZnO nanoparticles. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, n. 24, p. 16237–16244, 2016.
- CARRILLO-CARRIÓN, C. et al. Quantum dots luminescence enhancement due to illumination with UV/Vis light. **Chemical Communications**, n. 35, p. 5214–5226, 2009.
- CARRILLO-CARRIÓN, C. et al. Taking advantage of hydrophobic fluorine interactions for self-assembled nanoclusters of quantum dots as delivery platform for enzymes. **Angewandte Chemie International Edition**, 2018.
- CARRILLO-CARRION, C. et al. Taking Advantage of Hydrophobic Fluorine Interactions for Self-Assembled Quantum Dots as a Delivery Platform for Enzymes. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 57, n. 18, p. 5033–5036, 2018.
- CASSIDY, P. J.; RADDA, G. K. Molecular imaging perspectives. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 2, n. 3, p. 133–144, 2005.
- CHEN, H. et al. Versatile antimicrobial peptide-based ZnO quantum dots for invivo bacteria diagnosis and treatment with high specificity. **Biomaterials**, v. 53, p. 532–544, 2015.
- CHIARI-ANDRÉO, B. G. et al. Drug Delivery Using Theranostics: An Overview of its Use, Advantages and Safety Assessment. **Current Nanoscience**, v. 16, n. 1, p. 3–14, 2019.
- CHIAVACCI, L. A. et al. **ZnO based quantum dots for magnetic resonance and fluorescence imaging**. World Congress on Recent Advances in Nanotechnology. **Anais...2019Disponível em:**
<https://avestia.com/RAN2019_Proceedings/files/paper/ICNNFC/ICNNFC_107.pdf>
- CIKANKOWITZ, A. et al. Characterization of the distribution, retention, and efficacy of internal radiation of ¹⁸⁸Re-lipid nanocapsules in an immunocompromised human glioblastoma model. **Journal of neuro-oncology**, v. 131, n. 1, p. 49–58, 2017.
- DA SILVA, B. L. et al. Increased antibacterial activity of ZnO nanoparticles: Influence of size and surface modification. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 177, p. 440–447, 2019.
- DAZZAZI, A. et al. Oligomeric and polymeric surfactants for the transfer of luminescent

- ZnO nanocrystals to water. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 1, n. 11, p. 2158–2165, 2013.
- DENG, C. et al. Biodegradable polymeric micelles for targeted and controlled anticancer drug delivery: Promises, progress and prospects. **Nano Today**, v. 7, n. 5, p. 467–480, 2012.
- DENG, D.; QU, L.; GU, Y. Near-infrared broadly emissive AgInSe₂/ZnS quantum dots for biomedical optical imaging. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 2, n. 34, p. 7077–7085, 2014.
- DING, H. et al. Non-invasive tumor detection in small animals using novel functional Pluronic nanomicelles conjugated with anti-mesothelin antibody. **Nanoscale**, v. 3, n. 4, p. 1813–1822, 2011.
- DONAT, F. et al. ZnO nanoparticles sensitized by CuInZnS_{2+x} quantum dots as highly efficient solar light driven photocatalysts. **Beilstein journal of nanotechnology**, v. 8, p. 1080, 2017.
- EKIMOV, A.; ONUSHCHENKO, A. Quantum size effect in three-dimensional microscopic semiconductor crystals. **Soviet Journal of Experimental and Theoretical Physics Letters**, v. 34, n. February, p. 345, 1981.
- FAKHRI, H.; MAHJOUB, A. R.; KHAVAR, A. H. C. Synthesis and characterization of ZnO/CuInS₂ nanocomposite and investigation of their photocatalytic properties under visible light irradiation. **Applied Surface Science**, v. 318, p. 65–73, 2014.
- FRANCONI, F. et al. NMR diffusometry data sampling optimization for mixture analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 148, p. 156–162, 2018.
- FRANK, D. et al. Overview of the role of nanotechnological innovations in the detection and treatment of solid tumors. **International journal of nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 589–613, 2014.
- FRIELER, M. et al. Effects of doxorubicin delivery by nitrogen-doped graphene quantum dots on cancer cell growth: Experimental study and mathematical modeling. **Nanomaterials**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 2021.
- GALARRETA, I. et al. Exploring reaction conditions to improve the magnetic response of cobalt-doped ferrite nanoparticles. **Nanomaterials**, v. 8, n. 2, 2018.
- GENG, S. et al. Complete ablation of resistant tumors with photosensitive black phosphorus quantum dots-based lipid nanocapsules. **Chemical Engineering Journal**, v. 421, n. P2, p. 127879, 2021.
- GOLOMBEK, S. K. et al. Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 130, p. 17–38, 2018.
- GREEN, C. M. et al. Direct and Efficient Conjugation of Quantum Dots to DNA Nanostructures with Peptide-PNA. **ACS Nano**, v. 15, n. 5, p. 9101–9110, 2021.
- GROMOVA, M. et al. Growth Mechanism and Surface State of CuInS₂ Nanocrystals Synthesized with Dodecanethiol. **Journal of the American Chemical Society**, v. 139, n. 44, p. 15748–15759, 2017.
- GULIA, S.; KAKKAR, R. ZnO quantum dots for biomedical applications. **Adv. Mat. Lett**, v. 4, n. 12, p. 876–887, 2013.

- GUO, W. et al. Synthesis of Zn-Cu-In-S/ZnS Core/Shell quantum dots with inhibited blue-shift photoluminescence and applications for tumor targeted bioimaging. **Theranostics**, v. 3, n. 2, p. 99–108, 2013.
- GUYON, L. et al. Importance of Combining Advanced Particle Size Analysis Techniques to Characterize Cell-Penetrating Peptide-Ferrocifen Self-Assemblies. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 10, n. 21, p. 6613–6620, 2019.
- GUYON, L.; LEPELTIER, E.; PASSIRANI, C. Self-assembly of peptide-based nanostructures: Synthesis and biological activity. **Nano Research**, v. 11, n. 5, p. 2315–2335, 2018.
- HERNÁNDEZ, L. et al. Magnetic resonance imaging in diagnosis of indeterminate breast (BIRADS 3 & 4A) in a general population. **Insights into Imaging**, v. 12, n. 1, 2021.
- HEURTAULT, B. et al. Lipidic nanocapsules: preparation process and use as Drug Delivery Systems. **World Patent No. WO02688000**, 2000.
- HILARIO, E. G. Universidade De São Paulo Faculdade De Filosofia, Ciências E Letras De Ribeirão Preto Departamento De Física E Matemática. 2018.
- HIRATSUKA, R. S.; SANTILLI, C. V.; PULCINELLI, S. H. O processo sol-gel: uma visão físico-química. **Química nova**, p. 171–180, 1995.
- HIRSJÄRVI, S. et al. Effect of particle size on the biodistribution of lipid nanocapsules: comparison between nuclear and fluorescence imaging and counting. **International journal of pharmaceutics**, v. 453, n. 2, p. 594–600, 2013.
- HO, Y. P.; LEONG, K. W. Quantum dot-based theranostics. **Nanoscale**, v. 2, n. 1, p. 60–68, 2010.
- HONG, H. et al. Cancer-targeted optical imaging with fluorescent zinc oxide nanowires. **Nano letters**, v. 11, n. 9, p. 3744–3750, 2011.
- HOU, J.-T. et al. Fluorescent bioimaging of pH: from design to applications. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 8, p. 2076–2090, 2017.
- HOWELL, M. et al. Manganese-loaded lipid-micellar theranostics for simultaneous drug and gene delivery to lungs. **Journal of Controlled Release**, v. 167, n. 2, p. 210–218, 2013.
- HUANG, N. et al. Efficacy of NGR peptide-modified PEGylated quantum dots for crossing the blood–brain barrier and targeted fluorescence imaging of glioma and tumor vasculature. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 13, n. 1, p. 83–93, 2017.
- HUYNH, N. T. et al. Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine. **International journal of pharmaceutics**, v. 379, n. 2, p. 201–209, 2009.
- ISNAENI et al. Shell layer dependence of photoblinking in CdSe/ZnSe/ZnS quantum dots. **Applied Physics Letters**, v. 98, n. 1, p. 1–4, 2011.
- JACKSON, T. C.; PATANI, B. O.; EKPA, D. E. Nanotechnology in Diagnosis: A Review. **Advances in Nanoparticles**, v. 06, n. 03, p. 93–102, 2017.
- JANA, N. R.; EARHART, C.; YING, J. Y. Synthesis of water-soluble and functionalized nanoparticles by silica coating. **Chemistry of Materials**, v. 19, n. 21, p. 5074–5082, 2007.
- JANAKI, A. C.; SAILATHA, E.; GUNASEKARAN, S. Synthesis, characteristics and

- antimicrobial activity of ZnO nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 144, p. 17–22, 2015.
- JANJETOVIC, Z. et al. Melatonin and its metabolites protect human melanocytes against UVB-induced damage: Involvement of NRF2-mediated pathways. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.
- JAOUEN, G.; VESSIÈRES, A.; TOP, S. Ferrocifen type anti cancer drugs. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 24, p. 8802–8817, 2015.
- JAYABHARATHI, J. et al. A dodecanethiol-functionalized Ag nanoparticle-modified ITO anode for efficient performance of organic light-emitting devices. **RSC Advances**, v. 7, n. 62, p. 38923–38934, 2017.
- JIAO, M. et al. Strongly emitting and long-lived silver indium sulfide quantum dots for bioimaging: Insight into co-ligand effect on enhanced photoluminescence. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 565, p. 35–42, 2020.
- JIAO, Z. et al. Undamaged depositing large-area ZnO quantum dots/RGO films on photoelectrodes for the construction of pure Z-scheme. **Chemical Engineering Journal**, v. 356, n. July 2018, p. 781–790, 2019.
- KANDI, D.; MARTHA, S.; PARIDA, K. M. Quantum dots as enhancer in photocatalytic hydrogen evolution: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 15, p. 9467–9481, 2017.
- KHALID, A. et al. Biocompatible and biodegradable magnesium oxide nanoparticles with in vitro photostable near-infrared emission: Short-term fluorescent markers. **Nanomaterials**, v. 9, n. 10, 2019.
- KUMAR, R. et al. In vitro evaluation of theranostic polymeric micelles for imaging and drug delivery in cancer. **Theranostics**, v. 2, n. 7, p. 714–722, 2012.
- KUMAR, S. et al. Bio-based (chitosan/PVA/ZnO) nanocomposites film: Thermally stable and photoluminescence material for removal of organic dye. **Carbohydrate Polymers**, v. 205, n. October 2018, p. 559–564, 2019.
- KUO, K. T. et al. Core-shell CuInS₂/ZnS quantum dots assembled on short ZnO nanowires with enhanced photo-conversion efficiency. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 37, p. 6780–6788, 2009.
- LACROIX, L. M. et al. New generation of magnetic and luminescent nanoparticles for in vivo real-time imaging. **Interface Focus**, v. 3, n. 3, 2013.
- LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd Principles of fluorescence spectroscopy**, Springer, New York, USA, 3rd edn, 2006. [s.l: s.n.].
- LALLO DA SILVA, B. A INFLUÊNCIA DO TAMANHO DAS NANOPARTÍCULAS NAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DO ZnO. 2017.
- LI, J. et al. A fluorescent nanobiocide based on ROS generation for eliminating pathogenic and multidrug-resistant bacteria. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 9, n. 17, p. 3689–3695, 2021.
- LI, R.; LIU, B.; GAO, J. The application of nanoparticles in diagnosis and theranostics of gastric cancer. **Cancer Letters**, 2016.
- LI, S. et al. ZnO nanocomposites modified by hydrophobic and hydrophilic silanes with dramatically enhanced tunable fluorescence and aqueous ultrastability toward biological

imaging applications. **Scientific reports**, v. 5, p. 8475, 2015a.

LI, S. et al. ZnO nanocomposites modified by hydrophobic and hydrophilic silanes with dramatically enhanced tunable fluorescence and aqueous ultrastability toward biological imaging applications. **Scientific reports**, v. 5, 2015b.

LI, X. et al. Novel β -1,3-d-glucan porous microcapsule enveloped folate-functionalized liposomes as a Trojan horse for facilitated oral tumor-Targeted co-delivery of chemotherapeutic drugs and quantum dots. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 8, n. 11, p. 2307–2320, 2020.

LI, Y. et al. ZnO/CuInS₂ core/shell heterojunction nanoarray for photoelectrochemical water splitting. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 20, p. 15029–15037, 2012.

LIU, K.-K. et al. Advanced encryption based on fluorescence quenching of ZnO nanoparticles. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 5, n. 29, p. 7167–7173, 2017a.

LIU, K.-K. et al. Advanced Encryption based on fluorescence quenching of ZnO nanoparticles. **Journal of Materials Chemistry C**, 2017b.

LIU, L. et al. Application of quantum dots in biological imaging. **Journal of Nanomaterials**, v. 2011, 2011a.

LIU, T.-M. et al. Smart NIR linear and nonlinear optical nanomaterials for cancer theranostics: prospects in photomedicine. **Progress in Materials Science**, 2017c.

LIU, Y. et al. Fluorescence-enhanced gadolinium-doped zinc oxide quantum dots for magnetic resonance and fluorescence imaging. **Biomaterials**, v. 32, n. 4, p. 1185–1192, 2011b.

LOLLO, G. et al. Development of multifunctional lipid nanocapsules for the co-delivery of paclitaxel and CpG-ODN in the treatment of glioblastoma. **International journal of pharmaceuticals**, v. 495, n. 2, p. 972–980, 2015.

LONG, Z. et al. Recent research on the luminous mechanism, synthetic strategies, and applications of CuInS₂ quantum dots. **Inorganic Chemistry Frontiers**, v. 8, n. 4, p. 880–897, 2021.

LV, G. et al. Near-Infrared Emission CuInS/ZnS Quantum Dots: All-in-One Theranostic Nanomedicines with Intrinsic Fluorescence/Photoacoustic Imaging for Tumor Phototherapy. **ACS Nano**, v. 10, n. 10, p. 9637–9645, 2016.

MANAIA, E. B. et al. Surface modified Mg-doped ZnO QDs for biological imaging. **European Journal of Nanomedicine**, v. 7, n. 2, p. 109–120, 2015.

MANAIA, E. B. Pontos Quânticos à base de óxido de zinco (ZnO) para aplicações em bioimagem de nanocarreadores lipídicos. 2016.

MAO, Y. et al. CuInS/ZnS quantum dots modified intraocular lens for photothermal therapy of posterior capsule opacification. **Experimental Eye Research**, v. 202, n. September 2020, p. 108282, 2021.

MARTINAZZO, E. “Propriedades luminescentes de membranas de polidimetilsiloxano contendo nanopartículas de fluoreto de lantânio dopado com íons lantanídeos”. p. 182, 2013.

MEULENKAMP, E. A. Synthesis and growth of ZnO nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 29, p. 5566–5572, 1998.

- MIKLÁN, Z. et al. New ferrocene containing peptide conjugates: Synthesis and effect on human leukemia (HL-60) cells. **Peptide Science: Original Research on Biomolecules**, v. 88, n. 2, p. 108–114, 2007.
- MISHRA, T. et al. Zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) as contrast agent for imaging of animal tissue using swept source optical coherence tomography (SSOCT). **Optik**, v. 176, n. September 2018, p. 302–308, 2019.
- MOLAEI, M. J. A review on nanostructured carbon quantum dots and their applications in biotechnology, sensors, and chemiluminescence. **Talanta**, v. 196, n. December 2018, p. 456–478, 2019.
- MONICI, M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. **Biotechnology Annual Review**, v. 11, n. SUPPL., p. 227–256, 2005.
- MOORADIAN, A. On a New Kind of Rays Author (s): W . C . Röntgen Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/1623595>. **Science**, v. 169, n. 3940, p. 20–25, 1970.
- MUKHTAR, M. et al. Nanomaterials for diagnosis and treatment of brain cancer: Recent updates. **Chemosensors**, v. 8, n. 4, p. 1–31, 2020.
- MURPHY, C. J. **Peer reviewed: optical sensing with quantum dots**ACS Publications, , 2002.
- MUTHU, M. S. et al. Theranostic liposomes of TPGS coating for targeted co-delivery of docetaxel and quantum dots. **Biomaterials**, v. 33, n. 12, p. 3494–3501, 2012.
- NANDWANA, V. et al. Magnetic lipid nanocapsules (MLNCs): Self-assembled lipid-based nanoconstruct for non-invasive theranostic applications. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 6, n. 7, p. 1026–1034, 2018.
- NEDELIJKOVIC, J. M. et al. Synthesis and optical properties of quantum-sized metal sulfide particles in aqueous solution. **J. Chem. Educ**, v. 70, n. 4, p. 342, 1993.
- NGUYEN, H. et al. Bimodal fucoidan-coated zinc oxide/iron oxide-based nanoparticles for the imaging of atherothrombosis. **Molecules**, v. 24, n. 5, p. 1–19, 2019.
- OLERILE, L. D. et al. Near-infrared mediated quantum dots and paclitaxel co-loaded nanostructured lipid carriers for cancer theragnostic. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 150, p. 121–130, 2017.
- PAN, G. H. et al. Preparation and characterization of decyl-terminated silicon nanoparticles encapsulated in lipid nanocapsules. **Langmuir**, v. 29, n. 41, p. 12688–12696, 2013.
- PAPAGIANNAROS, A. et al. Quantum dots encapsulated in phospholipid micelles for imaging and quantification of tumors in the near-infrared region. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 5, n. 2, p. 216–224, 2009.
- PARK, S. J. et al. Development of nanostructured lipid carriers for the encapsulation and controlled release of vitamin D3. **Food Chemistry**, 2017.
- PAVONI, J. F. et al. Uma montagem experimental para a medida de fluorescência. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 36, n. 4, dez. 2014.
- PAYSEN, H. et al. Imaging and quantification of magnetic nanoparticles: Comparison of magnetic resonance imaging and magnetic particle imaging. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 475, n. November 2018, p. 382–388, 2019.

PETER TC SO, C. Y. D. Fluorescence Spectrophotometry. **ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES**, p. 187–190, 2002.

PETKOVA, P. et al. Sonochemical coating of textiles with hybrid ZnO/chitosan antimicrobial nanoparticles. **ACS applied materials & interfaces**, v. 6, n. 2, p. 1164–1172, 2014.

PIAO, Y. et al. Wrap–bake–peel process for nanostructural transformation from β -FeOOH nanorods to biocompatible iron oxide nanocapsules. **Nature materials**, v. 7, n. 3, p. 242, 2008.

RAGUPATHI, H.; CHOE, Y.; M., A. A. Preferential killing of bacterial cells by surface-modified organosilane-treated ZnO quantum dots synthesized through a co-precipitation method. **New Journal of Chemistry**, v. 45, n. 29, p. 12986–12995, 2021.

RALEA OOA, P. V. et al. Luminescent, magnetic and optical properties of ZnO-ZnS nanocomposites. **Physica B: Condensed Matter**, v. 507, n. November 2016, p. 13–20, 2017.

RAOUFI, D.; RAOUFI, T. The effect of heat treatment on the physical properties of sol–gel derived ZnO thin films. **Applied Surface Science**, v. 255, n. 11, p. 5812–5817, 2009.

RAZGONIAEVA, N. et al. Just Add Ligands: Self-Sustained Size Focusing of Colloidal Semiconductor Nanocrystals. **Chemistry of Materials**, v. 30, n. 4, p. 1391–1398, 2018.

REED, M. A. et al. Observation of discrete electronic states in a zero-dimensional semiconductor nanostructure. **Phys. Rev. Lett.**, v. 60, n. 6, p. 535–537, 1988.

RESNIER, P. et al. Efficient ferrocifen anticancer drug and Bcl-2 gene therapy using lipid nanocapsules on human melanoma xenograft in mouse. **Pharmacological Research**, 2017.

RISSI, N. C. Micelas poliméricas contendo pontos quânticos a base de óxido de Zinco com superfície modificada para futura aplicação em diagnóstico e vetorização de fármacos. 2016.

RISSI, N. C.; HAMMER, P.; CHIAVACCI, L. A. Surface modification of ZnO quantum dots by organosilanes and oleic acid with enhanced luminescence for potential biological application. **Materials Research Express**, v. 4, n. 1, p. 15027, 2017.

ROSSETTI, R.; BRUS, L. Electron-hole recombination emission as a probe of surface chemistry in aqueous CdS colloids. **Journal of Physical Chemistry**, v. 86, n. 23, p. 4470–4472, 1982.

ROUX, G. LE et al. PT NU SC. **Toxicology in Vitro**, 2017.

SADOLLAHKHANI, A. et al. Colorimetric disposable paper coated with ZnO@ ZnS core–shell nanoparticles for detection of copper ions in aqueous solutions. **ACS applied materials & interfaces**, v. 6, n. 20, p. 17694–17701, 2014.

SALMAN, M. S. et al. Design and fabrication of covalently linked PEGylated nanohybrids of ZnO quantum dots with preserved and tunable fluorescence. **Materials & Design**, 2017.

SAULNIER, P.; BENOIT, J.-P.; ANTON, N. **Nanocapsules with a liquid lipid core charged with water-soluble or water-dispersible active agents** Google Patents, , 2016.

SCHEUNEMANN, D. et al. Investigation of the Spatially Dependent Charge Collection Probability in CuInS₂/ZnO Colloidal Nanocrystal Solar Cells. **ACS Photonics**, v. 2, n. 7,

p. 864–875, 2015.

SCHEUNEMANN, D. et al. Charge carrier loss mechanisms in CuInS₂/ZnO nanocrystal solar cells. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, n. 24, p. 16258–16265, 2016.

SCHROEDER, J. E. et al. Folate-mediated tumor cell uptake of quantum dots entrapped in lipid nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 124, n. 1, p. 28–34, 2007.

SELECI, M. et al. Theranostic liposome–nanoparticle hybrids for drug delivery and bioimaging. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, 2017.

SHEN, F. et al. Enhanced photocatalytic activity of ZnO microspheres via hybridization with CuInSe₂ and CuInS₂ nanocrystals. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 4, n. 8, p. 4087–4092, 2012.

SILVA, B. L. DA et al. Relationship between structure and antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles: An overview. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 9395–9410, 2019.

SINGH, A. et al. Solution synthesis and assembly of wurtzite-derived Cu-In-Zn-S nanorods with tunable composition and band gap. **Chemistry of Materials**, v. 27, n. 5, p. 1517–1523, 2015.

SIRELKHATIM, A. et al. Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism. **Nano-Micro Letters**, v. 7, n. 3, p. 219–242, 2015.

SONALI et al. RGD-TPGS decorated theranostic liposomes for brain targeted delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 147, p. 129–141, 2016.

SOWIK, J. et al. Optical and photocatalytic properties of rare earth metal-modified ZnO quantum dots. **Applied Surface Science**, v. 464, n. September 2018, p. 651–663, 2019.

SPANHEL, L.; ANDERSON, M. A. Semiconductor clusters in the sol-gel process: quantized aggregation, gelation, and crystal growth in concentrated zinc oxide colloids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 113, n. 8, p. 2826–2833, 1991.

SURESH, S. et al. Development of silane grafted ZnO core shell nanoparticles loaded diglycidyl epoxy nanocomposites film for antimicrobial applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 64, p. 286–292, 2016.

SZWED, M. et al. Biological response and cytotoxicity induced by lipid nanocapsules. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 18, n. 1, p. 1–19, 2020.

TERRENO, E. et al. Advances in metal-based probes for MR molecular imaging applications. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 31, p. 3684–3700, 2010.

THAKUR, M.; POOJARY, S.; SWAIN, N. Green Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles and Its Biomedical Applications. **Nanotechnology in the Life Sciences**, v. 1, n. 1, p. 83–109, 2021.

TOKUMOTO, M. S. et al. SAXS study of the kinetics of formation of ZnO colloidal suspensions. **Journal of non-crystalline solids**, v. 247, n. 1, p. 176–182, 1999.

TOKUMOTO, M. S. et al. Catalysis and temperature dependence on the formation of ZnO nanoparticles and of zinc acetate derivatives prepared by the sol-gel route. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 2, p. 568–574, 2003.

VALSALAKUMARI, R. et al. Mechanism of cellular uptake and cytotoxicity of paclitaxel loaded lipid nanocapsules in breast cancer cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 597, n. January, p. 120217, 2021.

- VASUDEVAN, D. et al. Core-shell quantum dots: Properties and applications. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 636, n. February, p. 395–404, 2015.
- WADA, C. et al. Preparation and photoluminescence properties of yellow-emitting CuInS₂/ZnS quantum dots embedded in TMAH-derived silica. **RSC Advances**, v. 7, n. 13, p. 7936–7943, 2017.
- WANG, C.; GAO, X.; SU, X. In vitro and in vivo imaging with quantum dots. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 397, n. 4, p. 1397–1415, 2010.
- WANG, F. et al. Recent progress of cell-penetrating peptides as new carriers for intracellular cargo delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 174, p. 126–136, 2014.
- WANG, Y. et al. Quantum-Dot-Based Theranostic Micelles Conjugated with an Anti-EGFR Nanobody for Triple-Negative Breast Cancer Therapy. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 9, n. 36, p. 30297–30305, 2017.
- WANG, Y. et al. SiO₂-coated layered gadolinium hydroxides for simultaneous drug delivery and magnetic resonance imaging. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 286, n. March, p. 121291, 2020.
- WANG, Z. et al. Facile Synthesis of Cu-In-S/ZnS Core/Shell Quantum Dots in 1-Dodecanethiol for Efficient Light-Emitting Diodes with an External Quantum Efficiency of 7.8%. **Chemistry of Materials**, v. 30, n. 24, p. 8939–8947, 2018.
- WANG, Z.; BOCKSTALLER, M. R.; MATYJASZEWSKI, K. Synthesis and Applications of ZnO/Polymer Nanohybrids. **ACS Materials Letters**, v. 3, n. 5, p. 599–621, 2021.
- WEN, C. J. et al. Theranostic liposomes loaded with quantum dots and apomorphine for brain targeting and bioimaging. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 1599–1611, 2012.
- WOŹNIAK, A. et al. ZnO@Gd₂O₃ core/shell nanoparticles for biomedical applications: Physicochemical, in vitro and in vivo characterization. **Materials Science and Engineering: C**, v. 80, p. 603–615, 2017.
- XIA, C. et al. Size-dependent band-gap and molar absorption coefficients of colloidal CuInS₂ quantum dots. **ACS Nano**, v. 12, n. 8, p. 8350–8361, 2018.
- XIA, C. et al. Unraveling the Emission Pathways in Copper Indium Sulfide Quantum Dots. **ACS Nano**, v. 15, n. 11, p. 17573–17581, 2021.
- XIAO, J. et al. Effect of ZnO/ZnS QDs heterojunctions on the stilbenes–plasma proteins interactions. **Molecular BioSystems**, v. 7, n. 8, p. 2452–2458, 2011.
- XIONG, H.-M. Photoluminescent ZnO nanoparticles modified by polymers. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 21, p. 4251–4262, 2010.
- YANG, W. et al. Facile synthesis of Gd–Cu–In–S/ZnS bimodal quantum dots with optimized properties for tumor targeted fluorescence/MR in vivo imaging. **ACS applied materials & interfaces**, v. 7, n. 33, p. 18759–18768, 2015.
- ZHANG, A. et al. Non-blinking (Zn)CuInS/ZnS Quantum Dots Prepared by in Situ Interfacial Alloying Approach. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–13, 2015.
- ZHANG, L. et al. Origin of visible photoluminescence of ZnO quantum dots: defect-dependent and size-dependent. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 21, p. 9651–9658, 2010.

ZHANG, Z.-Y.; XIONG, H.-M. Photoluminescent ZnO Nanoparticles and Their Biological Applications. **Materials**, v. 8, n. 6, p. 3101–3127, 2015.

ZOU, Z. et al. Trace carbon-hybridized ZnS/ZnO hollow nanospheres with multi-enhanced visible-light photocatalytic performance. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 775, p. 481–489, 2019.