



**UNIVERSIDADE  
FEDERAL RURAL  
DE PERNAMBUCO**

**Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em  
Medicamentos**

**Ponto quântico de grafeno (*Graphene Quantum dot*)  
decorado com imatinibe para o tratamento da  
leucemia**

Daniele Mendes Felix

Recife, Pernambuco-Brasil

2020

## **Daniele Mendes Felix**

**Título da tese:** Ponto quântico de grafeno (*Graphene Quantum Dot*) decorado com imatinibe para o tratamento da leucemia

Tese apresentada, como requisito para a obtenção do título de doutor, ao Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos – PGDITM da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

**Orientador:** Prof. Dr. Ralph Santos-Oliveira

**Co-orientador:** Prof. Dr. Frederico Duarte de Menezes

**Recife, Pernambuco-Brasil**

**2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

F316p

Felix, Daniele Mendes

Ponto quântico de grafeno (Graphene quantum dot) decorado com imatinibe para o tratamento da leucemia / Daniele Mendes Felix. - 2020.

63 f. : il.

Orientador: Ralph Santos Santos-Oliveira.

Coorientador: Frederico Duarte de Menezes.

Inclui referências.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, Recife, 2020.

1. Leucemia. 2. Nanopartícula. 3. Ponto quântico de grafeno. 4. Imatinibe. I. Santos-Oliveira, Ralph Santos, orient. II. Menezes, Frederico Duarte de, coorient. III. Título

---

CDD 615

**Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Doutor em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos.**

**“Ponto quântico de grafeno (*Graphene Quantum Dot*) decorado com imatinibe para o tratamento da leucemia”**

**por**

**Daniele Mendes Felix**

**APROVADA EM: 20.11.2020.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof Ralph Santos Oliveira – (CNEN/Rio de Janeiro – RJ) Orientador

---

Prof. Frederico Duarte de Menezes – (IFPE-Recife)

---

Prof. Eduardo Ricci Junior – (UFRJ-Rio de Janeiro)

---

Prof. Pierre Basilio Fachine – (UFCE-Fortaleza)

---

Prof<sup>a</sup> Luciana Magalhães Rebelo Alencar – (UFMA-São Luis)

---

Coordenação PPgDITM/UFRPE

Dedico este trabalho a minha família, apoiadores incondicionais dos meus projetos.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Rita e Edmilson, e aos meus irmãos, Daniel, Danilyson e Daiana, pelo apoio incondicional.

Ao meu companheiro, parceiro, amigo Derciliano por toda paciência e apoio.

Ao meu orientador, Dr. Ralph Santos-Oliveira pela confiança e disponibilidade em conduzir a nossa pesquisa.

À Frederico Menezes, meu co-orientador, por todo suporte e orientação.

Ao amigo Roberto Salvi, pela companhia e ajuda em todos os momentos do doutorado.

Ao Prof. Dr. Severino Júnior e aos seus alunos, em especial à Rodrigo Viana pela ajuda nos momentos em que precisamos.

Aos colegas de laboratório que sempre estiveram disponíveis em ajudar na aquisição de insumos e equipamentos.

À Fernando Campos, secretário do programa, por toda ajuda durante o período do doutorado.

Aos meus colegas de turma pela boa companhia nas viagens e disciplinas.

Aos órgãos de fomento que proporcionam o desenvolvimento da pesquisa científica no Brasil.

A todos que de forma direta ou indireta me ajudaram a finalizar este trabalho.

“É a mente que faz a bondade e a maldade, que faz a tristeza ou a felicidade, a  
riqueza e a pobreza”

Edmund Spenser

## RESUMO

A leucemia é uma doença mieloproliferativa caracterizada por sintomas como anemia, perda de peso, letargia e sangramento anormal. O imatinibe é um dos medicamentos de escolha para o tratamento e tem como alvo a proteína BCR-ABL, uma tirosina quinase que promove a translocação dos cromossomos 9 e 22. O tratamento da leucemia ainda encontra grandes desafios como a incidência elevada de efeitos adversos e a falta de especificidade dos medicamentos. Diante disso, diversos estudos têm utilizado nanopartículas, incluindo os pontos quânticos de grafeno (*Graphene quantum dot* – GQD), no carregamento de fármacos quimioterápicos promovendo um aumento da especificidade e diminuição dos efeitos tóxicos. Diante disso, esse trabalho teve como objetivo decorar o GQD com o imatinibe formando a nanopartícula GDQ@imatinibe para avaliar a sua atividade em células leucêmicas. Assim, o GQD foi sintetizado e conjugado ao imatinibe por meio da funcionalização de carbodiimida. A associação foi confirmada por meio de espectroscopia de infravermelho e a toxicidade do conjugado foi testada em linhagens celulares (RPMI 8226 e NCI-ADR/RES). A indução de apoptose foi avaliada por meio de citometria de fluxo e a capacidade de difusão do conjugado através do meio intracelular foi verificada em células MDA-MB-231. As análises de espectroscopia mostraram a formação de novas bandas que correspondem a ligação formada entre o imatinibe e o GQD, dados que corroboram com os que foram obtidos pela microscopia de força atômica. A citotoxicidade apresentada pelo conjugado foi inferior à citotoxicidade do imatinibe. O GDQ@imatinibe mostrou-se capaz de atravessar a membrana celular e apresentou menor toxicidade celular em relação ao imatinibe. O GQD, por sua vez, apresentou a menor toxicidade em comparação com o imatinibe e o GDQ@imatinibe, mostrando segurança na sua utilização em meios biológicos. Quanto à indução de apoptose, foi observada a presença de células apoptóticas em porcentagens diferentes no tratamento celular com o conjugado e o imatinibe. Contudo, o GQD mostrou ser seguro *in vitro* e compatível para ser associado ao imatinibe, além disso, o GDQ@imatinibe é capaz de atingir o meio intracelular e provocar a morte de células leucêmicas.

**Palavras-chave:** Leucemia, nanopartícula, ponto quântico de grafeno, imatinibe.



## ABSTRACT

Leukemia is a myeloproliferative disease characterized by symptoms such as anemia, weight loss, lethargy, and abnormal bleeding. Imatinib is one of the drugs used for treatment and targets the BCR-ABL protein, a tyrosine kinase that promotes the translocation of chromosomes 9 and 22. The treatment of leukemia has major challenges such as the high incidence of adverse effects and the lack of specificity of the drugs. Several studies have used nanoparticles, including graphene quantum dots (GQD) in chemotherapy drug delivery increasing specificity and decreased toxic effects. Therefore, this study aimed to associate imatinib with GQD forming the nanoparticle GQD@imatinibe to evaluate its activity in leukemic cells. Thus, GQD was synthesized and conjugated to imatinib by functionalization with carbodiimide. The association was confirmed by Fourier-transform infrared spectroscopy and toxicity was tested in cell lines (RPMI 8226 and NCI-ADR/RES). The induction of apoptosis was evaluated by flow cytometry and the diffusion of the conjugate through the cellular membrane was verified in MDA-MB-231 cells. Spectroscopy analyses showed the formation of new bands that correspond to the bond formed between imatinib and GQD, these data corroborate by atomic force microscopy assay results. Cytotoxicity assay showed by the conjugate was lower than imatinib cytotoxicity. GQD@imatinibe was able to cross the cell membrane and showed lower cellular toxicity in relation to imatinib. GQD showed the lowest toxicity, presenting safety to use in biological systems. Regarding the induction of apoptosis, cell apoptosis was observed in different percentages in the cell treatment with imatinib and GQD@imatinibe. Therefore, The GQD proved to be safe in vitro and compatible to be associated with imatinib, in addition, GQD@imatinibe is capable of reaching the intracellular medium and causing the death of leukemic cells.

**Keywords:** Leukemia, nanoparticle, graphene quantum dot, imatinib.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Formação e diferenciação das células sanguíneas.....	19
Figura 2. Representação química do grafeno e seus derivados óxido de grafeno, óxido de grafeno reduzido e o ponto quântico de grafeno ( <i>Graphene quantum dot</i> ).....	24
Figura 3. Os derivados do grafeno podem ser sintetizados a partir de compostos precursores de carbono maiores ou de precursores moleculares submetidos à diferentes processos químicos.....	26
Figura 4. As nanopartículas derivadas do grafeno podem ser associadas a diferentes substâncias.....	28
Figura 5. Uso do ponto quântico de grafeno no tratamento da leucemia. ....	35
Figura 6. Fórmula molecular do imatinibe. ....	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Uso do ponto quântico de grafeno no tratamento e diagnóstico do câncer. .....	34
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-MP - 6-metilmercaptapurina

ATP - Adenosina trifosfato

BCL2 - *B-cell lymphoma 2*

BCL6 - *B-cell lymphoma 6*

BCR-ABL - *Abelson Leukemia Gene - Breakpoint cluster region*

CCRF-CEM - Células de leucemia linfoblástica aguda

c-KIT - Proteína tirosina quinase C

DCC - N.N'-díciclohexilcarbodiimida

EDC - 1-etil-3 (3-dimetilaminopropil)-carbodiimida

FDA - *Food and drug administration*

FTIR - Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

GQD - *Graphene quantum dot* – Pontos quânticos de grafeno

HDC - Dicloridrato de histamina

HeLa – Células de carcinoma cervical humano

INCA - Instituto Nacional de Câncer

MTHFR - *Methylenetetrahydrofolate reductase* - metileno tetrahidrofolato redutase

NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido

NHS - N-hidroxisuccinimida

OMS – Organização mundial da saúde

PDGFRA - Receptor A do fator derivado de plaquetas

PET - Tomografia computadorizada por Emissão de Pósitrons

Rpm - Rotações por minuto

SOCl<sub>2</sub> - Cloreto de tionila

SPECT - Tomografia computadorizada por emissão de fótons

FLT3 - Tirosina-quinase 3 Fms-relacionado

IDH - Isocitrato desidrogenase isocitrato desidrogenase

TP53 - Proteína do tumor 53 (*tumor protein*)

XRCC1 - *X-ray repair cross-complementing protein 1* - Proteína 1 de complementação cruzada de reparo de raios-x

## LISTA DE SÍMBOLOS

-OH – grupo hidroxila

> O - grupo epóxi

-COOH - grupo carboxílico

C=O - grupo carbonila

C=C - dupla ligação de carbono

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
2.1 CÂNCER.....	18
<b>2.1.1 Leucemia</b> .....	19
2.2 NANOPARTÍCULAS .....	22
<b>2.2.1 Grafeno e derivados</b> .....	23
<b>2.2.2 Rotas sintéticas do grafeno e seus derivados</b> .....	25
<b>2.2.3 Funcionalização</b> .....	27
<b>2.2.4 Ponto quântico de grafeno</b> .....	29
2.3 CÂNCER X NANOPARTÍCULAS DE GRAFENO.....	30
<b>2.3.1 Tratamento</b> .....	30
<b>2.3.2 Diagnóstico</b> .....	31
2.4. LEUCEMIA X GQD.....	32
2.5. IMATINIBE .....	35
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	38
3.1 GERAL .....	38
3.2 ESPECÍFICOS .....	38
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	39
<b>5. RESULTADOS</b> .....	50
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	51
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	52

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo a organização mundial da saúde (OMS), o câncer é responsável por um grande número de mortes em todo o mundo. Os dados mostram que até 2018 ocorreram 9.555.027 mortes, no Brasil foram registradas 243.588 óbitos (WHO, 2020a; WHO, 2020b; SANTUCCI et al., 2020; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2020; ARNOLD et al., 2019; MILLER et al., 2019). A leucemia também apresenta incidência e mortalidade relevante. Estima-se que o risco para novos casos da doença no sexo masculino é de 5,67 para cada 100 mil homens e 4,56 para cada 100 mil mulheres. Enquanto isso, mais de 7 000 pessoas, entre homens e mulheres, crianças, adultos e idosos morreram no ano de 2018 por causa da leucemia (DONG et al., 2020; KAKAJE et al., 2020; INCA, 2019; SILVA et al., 2019).

A leucemia é caracterizada por uma desordem na formação das células sanguíneas que levam ao desenvolvimento anormal das células brancas. A doença pode se manifestar em quatro tipos de acordo com o tipo celular afetado, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crônica, leucemia linfocítica aguda e leucemia linfocítica crônica. De uma forma geral, ocorre um aumento do número de células brancas e algumas vezes células imaturas. O paciente apresenta cansaço, hemorragias, mal estar e outros sintomas debilitantes. O diagnóstico é realizado por meio de amostras de sangue que podem ser avaliadas pelo hemograma, técnicas de biologia molecular e citogenética. Os medicamentos que inibem a progressão da leucemia ainda apresentam muitas limitações e o número anual de mortes e a expectativa de novos casos alerta para a necessidade de aprimorar o diagnóstico e o tratamento da doença.

O tratamento do câncer compreende procedimentos cirúrgicos, radioterapia e quimioterapia. O uso de fármacos quimioterápicos tem por finalidade promover a remissão do tumor através da diminuição do número de replicação de células tumorais, bem como inibir alterações genéticas que desencadeiam na proliferação de células cancerígenas. A administração dos medicamentos, por via parenteral ou via oral, provoca muitas reações adversas e podem não induzir resposta mediante a ausência de ação efetiva contra o tumor (CUZICK et al., 2020; DAVIDS et al., 2020; FARES et al., 2020; MAURI et al., 2020; RAFEI; KANTARJIAN; JABBOUR, 2020; S. et al., 2020; BLACKBURN; BENDER; BROWN, 2019; CROSSNOHERE et al., 2019; FARMER, 2019; RAFEI; KANTARJIAN; JABBOUR, 2019).



O imatinibe é o medicamento de primeira escolha no tratamento da leucemia mieloide crônica e tem como mecanismo de ação a inibição da tirosina quinase, enzima que promove a translocação dos cromossomos 9 e 21 e forma o cromossomo Filadélfia. A presença deste cromossomo caracteriza o estabelecimento da doença e é utilizado para o seu diagnóstico. Outros medicamentos semelhantes ao imatinibe já foram desenvolvidas para os casos de resistência e toxicidade relacionado ao tratamento, entretanto, muitos pacientes ainda não apresentam resposta satisfatória. (ERCALISKAN; ESKAZAN, 2020; JABBOUR; KANTARJIAN, 2020; LE CESNE et al., 2020; LIAKOULI et al., 2020; GARCÍA-FERRER et al., 2019).

Melhorar a ação e diminuir os efeitos adversos de quimioterápicos novos ou já existentes contribui para um tratamento mais eficaz e menos tóxico ao paciente. Nesse contexto, o uso de as nanopartículas tem sido utilizado com sucesso. A associação de quimioterápicos com carreadores de fármacos tem aumentado a concentração do fármaco no local do tumor e reduzido os efeitos adversos induzidos pelo fármaco. Esses elementos geralmente apresentam a possibilidade de melhorar a distribuição do fármaco no organismo e tem sido aplicada em diversas áreas da biomedicina devido às características químicas que apresentam (FU et al., 2020; JIN et al., 2020; SÁNCHEZ-CORONILLA et al., 2020).

O órgão americano *Food and drug administration* (FDA) já aprovou a utilização de fármacos como a doxorrubicina, plactaxel e irinotecano na forma de nanopartículas. Foi observado que as novas formulações dos fármacos aumentaram a sobrevivência dos pacientes e a especificidade para as células cancerígenas(WANG-GILLAM et al., 2019; UNTCH et al., 2016; BARENHOLZ, 2012).

Materiais derivados do carbono apresentam boa biocompatibilidade e suas propriedades químicas são exploradas com sucesso no desenvolvimento de quimioterápicos e ferramentas para o diagnóstico do tumor (ALEMI et al., 2020; DOLATKHAH et al., 2020; NOVODCHUK; BAJCSY; YAVUZ, 2020).

O grafeno, por exemplo, tem sido utilizado constantemente como carreador de quimioterápicos em razão de suas propriedades químicas e biocompatibilidade. A doxorrubicina, fármaco utilizado no tratamento do câncer de mama, já foi associada ao GQD (LUCHERELLI et al., 2020; YANG et al., 2020). A vancomicina, por exemplo, é um antibiótico glicopeptídeo utilizado no tratamento da sepse, osteomielite, dentre outras infecções bacterianas e pode formar complexos com o

óxido de grafeno por meio de interações  $\pi$ - $\pi$  e ligações de hidrogênio. Com isso, pode ser utilizado como um sistema de liberação controlada do fármaco (HE et al., 2019). A associação do grafeno e seus derivados com vários quimioterápicos tem demonstrado que o uso dessas substâncias constitui uma plataforma promissora para o desenvolvimento de medicamentos com finalidade terapêutica e de diagnóstico (ALEMI et al., 2020; HUANG et al., 2019; TIWARI et al., 2019; LIN et al., 2015).

Diante do exposto, o presente trabalho utilizou a associação do imatinibe ao GQD com o objetivo de melhorar a atividade antileucêmica do fármaco. A nanopartícula utilizada foi produzida utilizando técnicas que não induzem a formação de substâncias tóxicas e não contaminam o meio ambiente ou o manipulador. O GQD foi decorado com imatinibe por meio da ativação dos seus grupos químicos com 1-etil-3 (3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS). Após a adição do imatinibe foi formada uma ligação estável entre as partículas e a nanopartícula foi submetida à ensaios químicos e biológicos para confirmação da formação do conjugado e do efeito em células leucêmicas. Ensaios de Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e microscopia de força atômica mostram a associação entre o GQD e imatinibe e que o conjugado formado é capaz de induzir a morte de células leucêmicas com baixa toxicidade celular. O imatinibe apresentou toxicidade celular maior em relação à nanopartícula formada e ao GQD. Assim como em outros trabalhos, o GQD apresentou baixa toxicidade celular e reafirma a sua vantagem para ser utilizado como carreador de fármacos. Contudo, GQD@imatinibe mostra-se seguro e promissor para obtenção de resultados positivos em estudos *in vivo*.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. CÂNCER

O tumor caracteriza-se pelo crescimento anormal das células e pode ser benigno ou maligno. Os tumores malignos crescem desordenadamente e podem se disseminar para diferentes partes do corpo originando as metástases (WANG; LEI; HAN, 2018).

Dados do instituto nacional de câncer (INCA) mostram que aproximadamente 625 mil novos casos de câncer ocorrerão no Brasil entre 2020 e 2022. A estimativa do número de casos para leucemia é de aproximadamente 10 810, do total a maioria correspondente ao sexo masculino (INCA, 2019).

O tratamento do câncer depende do tipo e da característica do tumor. De uma forma geral, compreende remoção cirúrgica, quimioterapia, radioterapia e terapia hormonal. A quimioterapia consiste no uso medicamentos que tem como objetivo destruir as células tumorais e impedir o crescimento tumoral. Geralmente faz-se necessário a associação de medicamentos para a obtenção de eficácia satisfatória. Como desvantagem, os quimioterápicos apresentam um elevado índice de efeitos adversos promovendo desconforto para o paciente durante o tratamento (WANG; LEI; HAN, 2018).

Diante dos desafios para promover um tratamento seguro e eficaz, diversas estratégias têm sido avaliadas, dentre elas terapias que são direcionadas para anormalidades gênicas e em conformidade com a imunidade do hospedeiro (ZUGAZAGOITIA et al., 2016).

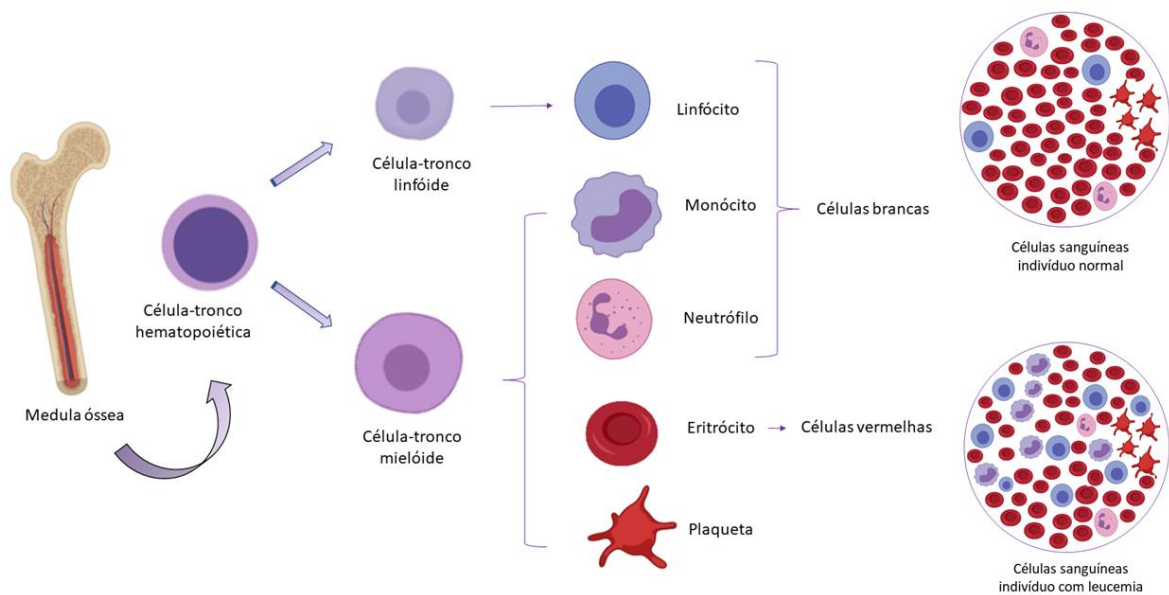
As nanopartículas estão sendo utilizadas em diferentes áreas da biomedicina, especialmente na terapia e diagnóstico do câncer. Elas têm se apresentado como uma ferramenta útil para diminuir os problemas relacionadas à baixa eficácia e grande índice de reação adversa dos medicamentos existentes, bem como no desenvolvimento de métodos diagnósticos mais eficientes. Fármacos como o imatinibe, doxorrubicina e vincristina mostraram melhora da eficácia do tratamento quando associadas a um nanocarreador (ZAIMY et al., 2017).

Um estudo em fase clínica já demonstra que o docetaxel quando associado às nanopartículas pode causar menos efeitos adversos e aumentar a exposição do tumor ao medicamento (ATRAFI et al., 2020).

### 2.1.1. Leucemia

O sangue é composto por células brancas, os leucócitos (linfócitos, neutrófilos e monócitos) e por células vermelhas, as hemácias. A síntese celular é realizada por meio da medula óssea e as células tronco formadas podem se diferenciar em todas as células do sangue (Figura 1).

Figura 1. Formação e diferenciação das células sanguíneas.



Fonte: Adaptado de SONI; YADAV, 2015.

A leucemia é caracterizada pela quantidade anormal de células brancas no sangue e/ou na medula óssea (Figura 1). Os tipos de leucemia são diferenciados de acordo com a maturação e linhagem celular e podem ser divididos em quatro grandes subtipos, a leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide crônica e leucemia linfóide crônica. Na leucemia aguda o alvo são células precursoras de linhagens diferentes, enquanto isso, na leucemia linfóide crônica há domínio das células maduras. Ambos os tipos de células, maduras e precursoras, são o alvo da leucemia mieloide crônica (MIRANDA-FILHO et al., 2018; LIGHTFOOT; SMITH; ROMAN, 2016).

A estimativa de novos casos de leucemia em 2019, apenas nos estados unidos, foi de aproximadamente 61 000 pessoas (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019). Vale destacar que a sobrevivência em adultos é de aproximadamente 40%, enquanto que em crianças atinge 90% (TATAR et al., 2016). O diagnóstico da

doença ainda envolve métodos de alto custo e que necessitam de tempo prolongado para a obtenção dos resultados (KHOSHFETRAT; MEHRGARDI, 2017).

O diagnóstico de leucemia é estabelecido por meio de informações clínicas, imunofenotípicas e morfológicas. Inicialmente, exames hematológicos podem indicar a existência de alterações que caracterizam a doença (HARRIS; CZUCHLEWSKI; ARBER, DANIEL A CZADER, 2019; SHEPHARD et al., 2016). Além disso, metodologias como análise de cariótipo, imunofenotipagem, citometria de fluxo, reação de cadeia de polimerase e hibridização fluorescente *in situ* podem ser utilizadas na definição do diagnóstico (HARRIS; CZUCHLEWSKI; ARBER, DANIEL A CZADER, 2019). Essas técnicas geralmente são de custo elevado e algumas apresentam baixa sensibilidade. Considerando que milhares de pessoas são diagnosticadas com leucemia em todo mundo (FITZMAURICE et al., 2018; TAN et al., 2018), seria interessante que metodologias com menor custo, menor complexidade e alta sensibilidade fossem desenvolvidas com a finalidade de detectar e monitorar a doença.

Os casos de leucemia aguda são mais frequentes em adolescentes e jovens adultos, entretanto, está presente em todas as idades. A incidência é diferente de acordo com a faixa etária. A leucemia mieloide crônica é a mais comum de todas e atinge indivíduos com idade acima de 40 anos (LIGHTFOOT; SMITH; ROMAN, 2016). Em crianças, a leucemia é o tipo de câncer mais comum, dentre elas a leucemia mieloide aguda e leucemia linfoblástica aguda. Sendo esta última a mais frequente, ela ocorre principalmente em crianças do sexo masculino, entre 2 e 6 anos e em brancos hispânicos ou não (J.D., 2016).

A leucemia mieloide aguda apresenta a menor taxa de sobrevivência dentre as demais leucemias e vem apresentando aumento da incidência ao longo dos anos. Ela ocorre com mais frequência em adultos do sexo masculino com idade média de 84 anos (SHALLIS et al., 2019). Foi estimado que apenas no ano de 2019, mais de 11 000 homens e 9000 mulheres foram diagnosticados com leucemia mieloide aguda nos Estados Unidos (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019).

Entre os anos de 2003 e 2007, a quantidade de indivíduos com leucemia linfoblástica aguda foi alta na África, Ásia, América do Sul e Caribe, enquanto que a leucemia linfocítica crônica foi mais frequente em países europeus e norte-americanos (MIRANDA-FILHO et al., 2018).

De uma forma geral, os sintomas da leucemia são caracterizados pelo cansaço, dor, perda de peso e diarreia. Outros sintomas como febre, sangramento, hipertensão e linfadenopatia também podem ocorrer, entretanto, podem ser específicos em cada tipo de leucemia. Nas leucemias agudas, sintomas como febre, cansaço e hemorragias nasais associadas ou não com sangramentos gengivais podem ser comuns. Enquanto isso, perda de peso, contusões e linfadenopatia são mais frequentes em leucemias crônicas (SHEPHARD et al., 2016).

Apesar do conhecimento da relação entre síndromes genéticas, infecções virais e o desenvolvimento da leucemia, a causa da doença ainda não é bem compreendida (MIRANDA-FILHO et al., 2018). Na leucemia mieloide aguda, por exemplo, é recomendado a investigação da presença de mutações do tipo duplicação interna em tandem no gene tirosina-quinase 3 Fms-relacionado (FLT3) e mutações na isocitrato desidrogenase 1 (IDH1), isocitrato desidrogenase 2 (IDH2), proteína do tumor 53 (TP53 – *tumor protein*) (HARRIS; CZUCHLEWSKI; ARBER, DANIEL A CZADER, 2019).

A genética molecular é uma forte aliada para entender os fatores que estão relacionados ao desenvolvimento do câncer. Genes podem revelar a predisposição a doença, mas muitos deles podem não estar associados a casos hereditários (LIGHTFOOT; SMITH; ROMAN, 2016). Casos de gêmeos com leucemia linfoblástica aguda que possuíam os mesmos pontos de translocação sugerem que clones pré-leucêmicos atravessem a barreira hematoencefálica ainda no útero. A identificação dos genes relacionados a leucemia é um trabalho difícil e deve ser associado a biologia da doença. Na leucemia linfoblástica aguda, por exemplo, genes como da proteína 1 de complementação cruzada de reparo de raios-x (*X-ray repair cross-complementing protein 1* - XRCC1) e metilenotetrahidrofolato redutase (*Methylenetetrahydrofolate reductase* – MTHFR) estão relacionados com a reparação do DNA e o metabolismo do folato, respectivamente. Vale destacar que variantes genéticas em tais genes podem ser encontradas de acordo com etnia (J.D., 2016). Na leucemia linfoblástica aguda de precursor B, rearranjos envolvendo o fator de transcrição MYC e os genes BCL2 (*B-cell lymphoma 2*) e/ou BCL6 (*B-cell lymphoma 6*) são identificados em pacientes como casos raros e agressivos (STRATMANN et al., 2019).

Além do diagnóstico, as anormalidades genéticas são importantes para o tratamento do câncer, genes específicos podem ser utilizados como alvo para

detecção e tratamento da doença. Na leucemia mieloide crônica, por exemplo, o gene *Abelson Leukemia - breakpoint cluster region* (BCR-ABL) 1, é responsável pela translocação entre os cromossomos 9 e 21, gerando o cromossomo Filadélfia (SHIBATA et al., 2019). Esse cromossomo também está presente em pacientes com leucemia mieloide aguda e é utilizado no diagnóstico da doença. A proteína BCR-ABL também é alvo para a ação do imatinibe, medicamento de primeira escolha utilizada no tratamento e com sítio de ação específico para a proteína (CAROFIGLIO et al., 2020; LIGHTFOOT; SMITH; ROMAN, 2016).

Os inibidores de tirosina quinase são agentes importantes para o tratamento da leucemia, entretanto, devem ser considerados os efeitos adversos e casos de resistência (GARCÍA-GUTIÉRREZ; HERNÁNDEZ-BOLUDA, 2019). Os eventos adversos ocorrem em parte dos pacientes tratados com os inibidores de tirosina quinase, os efeitos variam e o paciente pode apresentar náuseas, vômitos, anorexia, cardiotoxicidade. Polimorfismos genéticos observados em alguns indivíduos são alguns dos fatores que afetam o metabolismo dos fármacos, entretanto, o conhecimento sobre o tema ainda é escasso. A monitorização do paciente é importante, mas é difícil de ser realizada em alguns sistemas. Por esses motivos, o estudo a longo prazo dos efeitos causados pelo tratamento com os inibidores de tirosina quinase devem ser realizados. Atualmente apenas o imatinibe foi estudado com maior frequência (SINGH et al., 2020; STEEGMANN et al., 2016). A conduta a ser adotada após o evento adverso depende da categoria do mesmo. Pode ser necessário apenas a diminuição da dose ou até a suspensão temporária do medicamento (BACCARANI et al., 2013).

## 2.2. NANOPARTÍCULAS

Os nanomateriais têm se apresentado como uma plataforma promissora para auxiliar no tratamento e diagnóstico de várias doenças, inclusive o câncer (CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2020; BANSAL et al., 2019; DE SOUZA ALBERNAZ et al., 2018; VISEU et al., 2018).

A ampla distribuição no organismo, o aumento da seletividade ao alvo biológico e a redução da toxicidade dos fármacos carregados são algumas das vantagens da utilização de nanopartículas como carreadores de fármacos. Apresentam facilidade para atravessar os tecidos e chegar às células alvo em alta

concentração. Outra vantagem é a capacidade de liberar o fármaco de forma prolongada, aumentando o tempo de ação do fármaco, diminuindo a necessidade de dose diária e o índice de efeitos adversos (ALEMI et al., 2020; AMIRI et al., 2020; DOLATKHAH et al., 2020; YAZDI; GHAZIZADEH; NESHASTEHRIZ, 2020; SONI; YADAV, 2015).

Os tipos de materiais utilizados como nanopartículas pode ter origem diversa como polímeros, materiais inorgânicos, proteínas e polissacarídeos. Os materiais podem encapsular e abrigar fármacos com diferentes características químicas. Uma das maiores premissas no uso de nanopartículas é que elas sejam biocompatíveis e apresentem baixa toxicidade ao organismo (JEEVANANDAM et al., 2018; SONI; YADAV, 2015).

Na aplicação farmacêutica vários nanomateriais baseados em carbono tem apresentado destaque. O grafeno é um deles e as suas características químicas permite a sua associação à diferentes substâncias, ampliando a diversidade da aplicação biológica/clínica (ECKHART et al., 2019; TABISH et al., 2019; ZHANG et al., 2019; TADYSZAK; WYCHOWANIEC; LITOWCZENKO, 2018; PATTNAIK; SWAIN; LIN, 2016; TATAR et al., 2016; SHENG et al., 2013).

Fármacos utilizados no tratamento da leucemia já foram associadas às nanopartículas. A 6-metilmercaptipurina (6-MP), um fármaco utilizado no tratamento da leucemia aguda em crianças e adultos, foi associado ao ácido acrílico, quitosana e polietilenoglicol promovendo mudanças na liberação do fármaco que já é comercializado na forma de comprimido (SHI et al., 2016). Além do tratamento, o diagnóstico da leucemia também pode ser melhorado por meio do uso de nanomateriais (SHAMSIPUR et al., 2020; YAZDI; GHAZIZADEH; NESHASTEHRIZ, 2020; SHAMSIPUR et al., 2017; YU et al., 2016).

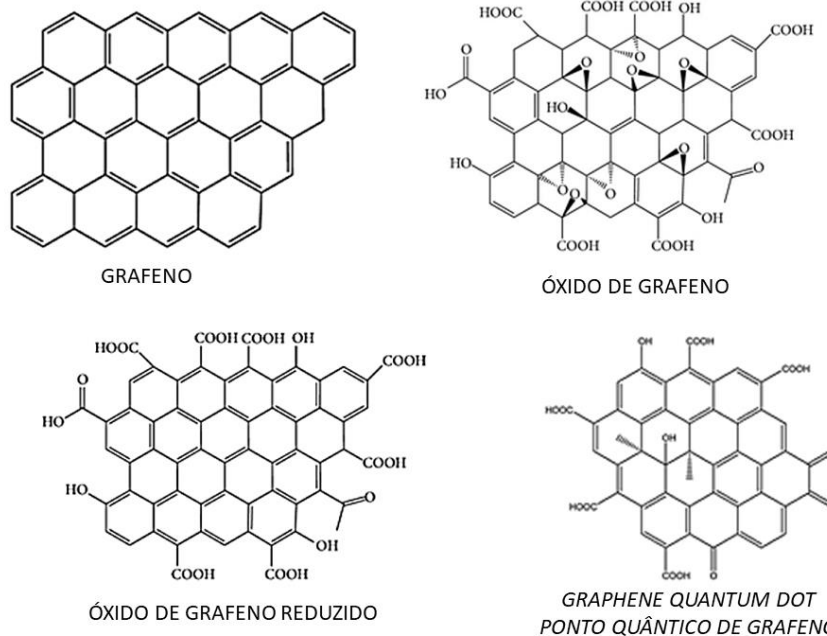
### **2.2.1. Grafeno e derivados**

A família dos materiais do grafeno compreende uma grande quantidade de componentes, sendo os mais representativos o: i) grafeno, ii) óxido de grafeno, iii) óxido de grafeno reduzido, iv) GQD, v) pristino (GURUNATHAN et al., 2019). Os compostos: o óxido de grafeno, o GQD e o óxido de grafeno reduzido, apresentam grupamentos orgânicos como o ácido carboxílico, epóxi e hidroxila que aumentam a capacidade de funcionalização e a sua aplicação em biosensores e carreadores de



fármacos (FU et al., 2019; SINGH et al., 2018; TATAR et al., 2016; SHENG et al., 2013), conseqüentemente habilitando seu uso em medicina, farmácia e biomedicina.

Figura 2. Representação química do grafeno e seus derivados óxido de grafeno, óxido de grafeno reduzido e o ponto quântico de grafeno (*Graphene quantum dot*).



Fonte: O autor.

O grafeno é composto por átomos de carbono dispostos em uma camada bidimensional, com configuração eletrônica  $1s^2 2s^2 2p^2$ . Apresenta propriedades físicas, químicas, térmica, elétrica eletrônicas, ópticas, mecânicas (elasticidade, tensão e deformação), magnéticas e biológicas. Entre suas propriedades, destacam-se a fotoluminescência, alta condutividade, flexibilidade, resistência mecânica e transparência. De acordo com as características químicas do grafeno e seus derivados, cada um deles apresenta propriedades diferenciadas quanto a condutividade, área de superfície, estabilidade térmica e fluorescência. O grafeno pristino, por exemplo, apresenta alta condutividade elétrica, grande área de superfície e hidrofobicidade, o que permite a aplicação do mesmo em biosensores (BANI-YASEEN, 2020; CHEN; LI, 2020; MA; LV; WANG, 2020; XUE; GAO; HU, 2020; ZHAO et al., 2020; CHUNG; REVIA; ZHANG, 2019; FAN et al., 2019; LAWAL, 2019; TIAN et al., 2018; BALAJI; ZHANG, 2017).

A forma oxidada do grafeno, o óxido de grafeno, apresenta átomos de oxigênio que lhe conferem características hidrofílicas. Ele apresenta grupos funcionais como o hidroxila (-OH) e epóxi (> O) na sua estrutura basal e, nas bordas,

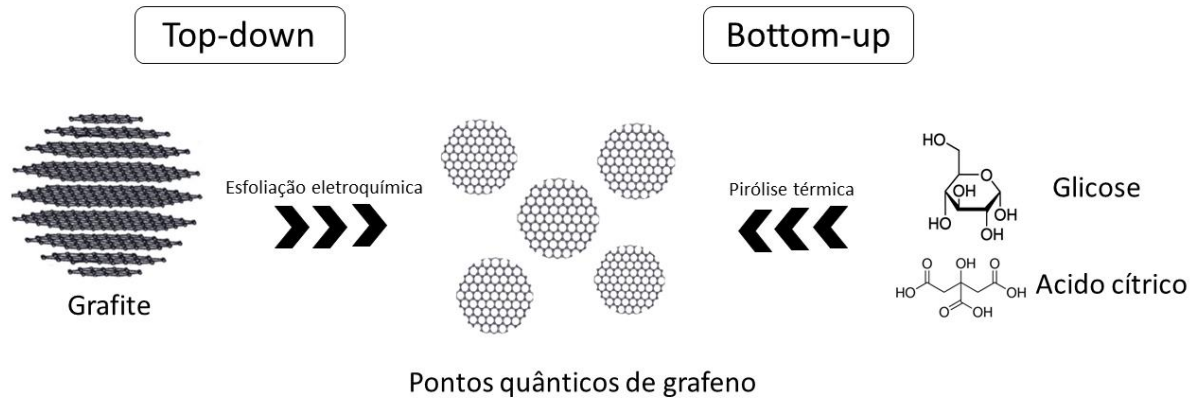
grupos carboxílicos (-COOH) e carbonila (C=O) (LAWAL, 2019; LI et al., 2017) (Figura 1). O óxido de grafeno reduzido também apresenta grupos reativos de oxigênio com melhor dispersão em água do que outras formas do grafeno como o grafeno pristino. As propriedades mecânicas, eletroquímicas e eletrônicas são diretamente influenciadas pela presença dos grupos oxigenados (LAWAL, 2019; PENG; TODOROVA; YAROVSKY, 2018).

Formado por átomos de oxigênio, hidrogênio e oxigênio, o GQD possui estrutura química semelhante ao óxido de grafeno e seus grupos -COOH (Figura 2) são importantes para definir a sua solubilidade e capacidade de ligação com outras substâncias. São nanopartículas esféricas que se apresentam em uma ou poucas camadas possuindo aproximadamente 100nm de tamanho (ZHAO et al., 2020; TIAN et al., 2018).

### **2.2.2. Rotas sintéticas do grafeno e seus derivados**

A síntese do grafeno e seus derivados se caracteriza pela utilização de um precursor baseado em carbono que é submetido a um processo químico, dentre eles, os mais comuns são: grafite, fulereno, pireno, glicose, ácido cítrico. Compostos como o grafite, ácido cítrico e glicose são submetidos às reações de pirólise, carbonização e esfoliação eletroquímica para produzir as partículas derivadas do grafeno. A utilização de precursores de carbono maiores como o grafite caracteriza o método *top-down*, enquanto que a utilização de precursores moleculares como o ácido cítrico caracteriza o método *bottom-up*. Apesar de apresentarem características diferentes, ambos caracterizam-se pela síntese de derivados do grafeno como o GQD (Figura 3) (KUMAR et al., 2020; MANSURIYA; ALTINTAS, 2020; ZHAO et al., 2020; TIAN et al., 2018; CHEN et al., 2017).

Figura 3. Os derivados do grafeno podem ser sintetizados a partir de compostos precursores de carbono maiores ou de precursores moleculares submetidos à diferentes processos químicos.



Fonte: O autor.

Alguns métodos necessitam de várias horas de síntese e podem gerar substâncias tóxicas durante o processo (ABDELKADER, A. M.; KINLOCH, I. A.; DRYFE, 2014; DREYER et al., 2010). Entretanto, a geração de novas rotas tem diminuído o tempo e toxicidade do processo. A síntese do óxido de grafeno, por exemplo, já passou por várias modificações. Na metodologia de Brodie (BRODIE, 1858) e Staudenmaier (STAUDENMAIER, 1899) há emissão de gases tóxicos e risco de explosão. O mesmo é observado na síntese Hummers (HUMMERS; OFFEMAN, 1958), pois ocorre a formação do intermediário reativo óxido de manganês.

A obtenção de derivados do grafeno também pode ser realizada pela carbonização de um precursor orgânico como a glicose, ácido cítrico, grãos de café, etc, nesse processo não há formação de gases e outros materiais tóxicos. Diversos trabalhos têm utilizado esse método para a obtenção do óxido de grafeno e GQD (PONIATOWSKA; TRZASKOWSKI; CIACH, 2019; PRICE et al., 2019; HUANG; RONG; ZHANG, 2016; MALEKI; HAJIZADEH; ABBASI, 2018; WANG et al., 2015; PAUL; MAHANTA, 2015; DONG et al., 2012).

A utilização do ácido cítrico como precursor do óxido de grafeno e GQD é realizada por meio de pirólise após o tratamento térmico (200°C) em diferentes tempos. A substância obtida é resfriada, dissolvida em hidróxido de sódio e dialisada (PONIATOWSKA; TRZASKOWSKI; CIACH, 2019; OH; LEE, 2016; WANG et al., 2015).

A pirólise é um processo endotérmico e, portanto, é necessário o fornecimento de calor externo. A exposição da matéria orgânica à altas temperaturas leva a decomposição da mesma. Acredita-se que inicialmente os compostos condensem domínios  $sp^2$ , que compõe o núcleo. O número de carbono-carbono aumenta ao longo da reação, assim como os grupos hidroxila e carboxílico (CHEN; LI, 2020; IRAVANI; VARMA, 2020; ZHAO et al., 2020; PONIATOWSKA; TRZASKOWSKI; CIACH, 2019; WANG et al., 2015).

Outro método que não gera compostos tóxicos é a síntese eletroquímica, a qual baseia-se no uso de um eletrodo de grafite e um contra eletrodo na presença de um ácido fraco e uma base forte, também é aplicada uma diferença de corrente/potencial entre os eletrodos. O GQD quando formado se dispersa no eletrólito após a quebra das ligações que mantêm a estrutura do grafite. O sinal de corrente ou de potencial é responsável pela inserção dos íons e que promovem a ruptura das ligações. Além do baixo impacto ambiental, o baixo custo, alta rentabilidade e produção em larga escala para síntese também se mostram como vantagens para a utilização dessa metodologia (DE MENEZES et al., 2019a; AHIRWAR; MALLICK; BAHADUR, 2017; HUANG et al., 2018).

O grafeno e óxido de grafeno reduzido também já foram produzidos sem a necessidade de reagentes perigosos e/ou que poluam o meio ambiente (GUO et al., 2009). Por exemplo, RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al. (2016) utilizou extrato de *Pelargonium graveolens* (gerânio) como agente redutor do óxido de grafeno.

### **2.2.3. Funcionalização**

A funcionalização do grafeno e dos seus derivados, que representa uma característica relevante desses compostos, permite que eles adquiram grupos químicos em sua estrutura que podem auxiliar a ligação com diversas substâncias (KUMAR et al., 2020; PRICE et al., 2019), inclusive fármacos com finalidade de tratamento e diagnóstico. Interações por forças de van der Waals, empilhamento via  $\pi$ - $\pi$  e ligações covalentes são algumas das formas de ligações estabelecidas. Por meio da funcionalização é possível inserir grupamentos e estruturas funcionais capazes de dotar esse elemento de novas características, por exemplo a funcionalização de derivados do grafeno com aminas, altera a dispersibilidade do

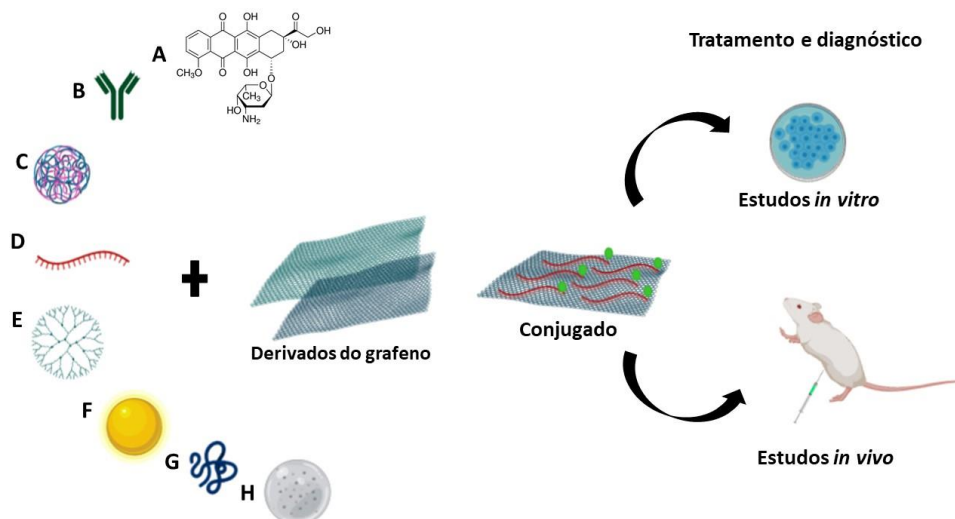
óxido de grafeno em solventes e pode mudar as propriedades eletrônicas do mesmo (DOUDA et al., 2019; DE MELO-DIOGO et al., 2018; KUMAR; RANI, 2015).

NASROLLAHI et al. (2019) ativaram GQD com EDC/NHS para permitir a funcionalização da nanopartícula com o anticorpo (fragmento variável de cadeia simples de anticorpo) e cisplatina formando um composto efetivo e seletivo contra células MDA-MB-231.

LIU et al., 2020 funcionalizaram o GQD com polietilenoglicol também por meio da ativação com EDC/NHS aumentando a eficiência de internalização da nanopartícula em cultivo celular. Por sua vez, BANSAL et al. (2019) realizou a mesma ativação, entretanto, para conjugar o GQD a um biossurfactante que pode ser utilizado no tratamento e diagnóstico do câncer. Por fim, FELIX et al. (2020) funcionalizaram o GQD ao imatinibe formando uma nanopartícula capaz de penetrar nas células e promover apoptose em células leucêmicas.

O grafeno e seus derivados já demonstrou ter atividade contra células cancerígenas e capacidade de formar associações com diferentes tipos de fármacos (BANSAL et al., 2019; VISEU et al., 2018; FIORILLO et al., 2015; ZHOU et al., 2014).

Figura 4. As nanopartículas derivadas do grafeno podem ser associadas a diferentes substâncias.



Legenda: A associação pode ocorrer com fármacos (A), anticorpos (B), dendrímeros (C), nucleotídeos (D), polímeros (E), nanopartículas de ouro (F), proteína (G), hidrogel (H) e outros compostos. As conjugações formadas podem ser avaliadas em estudos *in vitro* e *in vivo* para o tratamento e diagnóstico de diferentes doenças. Fonte: O autor.

Devido as suas propriedades, os nanomateriais baseados em grafeno podem ser utilizados em técnicas de bioimagem (TYSON et al., 2016; ZHANG et al., 2013a). Tais propriedades podem ser inseridas ou aumentadas por meio da funcionalização desses compostos. Imagens obtidas em tomografia computadorizada por emissão de pósitrons (PET-CT) e Tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT-CT) podem usar nanoplateformas de grafeno e seus derivados (HONG et al., 2012). Fármacos antitumorais associados ao grafeno podem ser utilizadas para detecção de tumores de forma específica (LIN; CHEN; HUANG, 2016; YOO; KANG; HONG, 2015; FAZAELI et al., 2014; CORNELISSEN et al., 2013). Conforme descrito por CORNELISSEN et al. (2013), a associação do óxido de nanografeno radiomarcado ao trastuzumabe, anticorpo monoclonal utilizado no tratamento do câncer de mama, é capaz de identificar o tumor por meio de SPECT.

Materiais radioativos também têm sido utilizados em associação ao grafeno e seus derivados. A presença de grupos oxigenados no óxido de grafeno permite a ligação de metais pesados e radionuclídeos. O cobalto II, por exemplo, pode ser adsorvido e absorvido ao óxido de grafeno, mostrando que o óxido de grafeno poderia ser utilizado como um agente de remoção de radionuclídeos (JIN; SHENG; SUN, 2014). O tecnécio foi associado ao óxido de grafeno e testado em animais para avaliar a deposição tecidual. De acordo com os dados, a maior captação ocorre no sangue e rins após 15 minutos da administração endovenosa (CHALLAN; MASSOUD, 2017; LI et al., 2011), também foi encontrado em altas concentrações no fígado, baço e pulmão e estômago (JIANG et al., 2015).

Assim como óxido de grafeno e o óxido de nanografeno, o GQD também já foi radiomarcado e sua distribuição *in vivo* testada, mostrando que é possível criar plataformas utilizando o grafeno e seus derivados para testes de diagnóstico por imagem (DE MENEZES et al., 2019a).

#### **2.2.4. Pontos Quânticos de grafeno**

Assim como óxido de grafeno e o óxido de grafeno reduzido, o GQD também faz parte da família de nanomateriais de grafeno. Eles apresentam características como boa biocompatibilidade, baixa toxicidade e a capacidade de funcionar como carreadores de fármacos (KUMAR et al., 2020; TAJIK et al., 2020; DE MENEZES et al., 2019b).

O GQD apresenta atividade fluorescente que pode ser mensurada e aplicada em diferentes tipos de ensaios (MANSURIYA; ALTINTAS, 2020; BENÍTEZ-MARTÍNEZ; VALCÁRCEL, 2015; DONG et al., 2012). O processo de síntese é diversificado e permite a utilização de fontes de carbono como matéria prima precursora (Figura 3). Essa característica é uma vantagem para a produção de partículas com baixo custo e com reprodutibilidade em larga escala. Além disso, podem ser utilizadas metodologias que não geram compostos tóxicos (IRAVANI; VARMA, 2020).

Sua estrutura química permite boa solubilidade em água e possui facilidade em interagir com outras substâncias, pois é capaz de formar interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações hidrofílicas. O uso de GQDs como um sistema carreador para fármacos tem sido testado nos últimos anos, acredita-se que GQDs com tamanho pequeno não causam danos à camada de lipídica da membrana e podem facilmente penetrar na célula em escala de nanosegundos. Dessa forma, é possível que o fármaco associado a ele possa atingir o alvo intracelular com mais facilidade e em menos tempo (LIU; TANG, 2020; TANG et al., 2020; WU et al., 2019; XUE et al., 2019).

Além do tratamento, os GQDs também são utilizados como ferramenta em biosensores para a detecção do câncer (MANSURIYA; ALTINTAS, 2020). O uso de nanomateriais de grafeno como o GQDs em imunoenaios pode ser realizada em razão de suas propriedades químicas e de detecção de biomoléculas (KUMAR et al., 2020; GANGANBOINA; DOONG, 2019; VARGIS et al., 2018; LIU et al., 2018).

## 2.3. CÂNCER X NANOPARTÍCULAS DE GRAFENO

### 2.3.1. Tratamento

De uma forma geral, medicamentos quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer causam efeitos adversos como alopecia, náusea, leucopenia, dentre outros. O uso de nano materiais como carreadores é promissor, especialmente para fármacos utilizado no tratamento do câncer, pois pode ser realizada a liberação controlada do fármaco e o direcionamento específico para o alvo. Essas ações podem contribuir para a diminuição das reações adversas.

O grafeno já apresentou atividade antitumoral, inclusive contra a leucemia. Ele foi usado no tratamento de monócitos provenientes de pacientes com leucemia mieloide crônica ou leucemia mieloide aguda. O composto foi capaz de reduzir as células cancerígenas com doses a partir de 0,5 µg/ml sem efeito tóxico em outras células. Enquanto isso, o etoposídeo, fármaco controle utilizado no tratamento da leucemia mieloide crônica e leucemia mieloide aguda, também apresentou redução das células cancerígenas, mas também causou morte das células T, B e NK. (RUSSIER et al., 2017).

BAHREYNI et al. (2017) mostrou que é possível aumentar a especificidade dos fármacos por meio da conjugação das mesmas com derivados do grafeno. Para isso, funcionalizou o óxido de grafeno com dois aptâmeros, o Sgc8c e o adenosina trifosfato (ATP), aumentando a especificidade do conjugado às células leucêmicas Molt-4, portadoras de um receptor para a molécula Sgc8c. Logo, os ensaios de citometria de fluxo e fluorescência mostraram que as células Molt-4 foram permissivas à entrada do complexo óxido de grafeno-aptâmero em contraste às células U266, ausentes do receptor para o Sgc8c (BAHREYNI et al., 2017).

Assim como o grafeno e óxido de grafeno, o GQD também é associado à fármacos com a finalidade de tratar tumores malignos. O complexo AS1411@PEGMA@GQD@γ-CD-MOF foi formado associando o GQD, uma estrutura orgânica de metal à base de γ-ciclodextrina, um aptâmero, um polímero e a doxorubicina, fármaco utilizado no tratamento da leucemia, câncer de ovário e câncer de mama. As moléculas associadas à doxorubicina promoveram um aumento da especificidade e diminuição dos efeitos tóxicos com a manutenção do efeito antitumoral do fármaco (JIA et al., 2019). O mesmo fármaco quando associado ao nano-hidrogel de poli(N,N-dietil acrilamida) e o GQD apresentou mudanças na taxa de degradação e progressão da doença (HAVANUR et al., 2019). A terapia fotodinâmica, técnica utilizada no tratamento do câncer, quando associada ao GQD pode ter seu efeito potencializado (FAN et al., 2019).

### **2.3.2. Diagnóstico**

Muitas vezes o diagnóstico do câncer está associado a exames de imagens, como raio x, tomografia computadorizada, ressonância magnética, assim como dosagem de biomarcadores, detecção de genes por reação de polimerase em



cadeia, dentre outros. Na maioria deles faz-se necessário a utilização de equipamentos com custo e manutenção elevados. Sendo assim, a existência de metodologias mais rápidas e com menor custo ainda são necessárias para um diagnóstico precoce (BALAJI; ZHANG, 2017).

O uso do grafeno na composição de biosensores tem sido bastante explorada pelas suas propriedades biológicas e químicas (SINGH et al., 2018). De uma forma geral, vários biosensores baseados no grafeno e óxido de grafeno já foram testados com a finalidade de detectar células cancerígenas e substâncias relacionadas ao câncer apresentando alta sensibilidade e seletividade (BALAJI; ZHANG, 2017; LIN et al., 2015; BIANYING et al., 2013; ZHANG et al., 2013b; WU et al., 2011).

O gene BCR/ABL, usado no diagnóstico da leucemia mieloide crônica, já foi detectado em amostras de sangue por meio de um biosensor que utiliza o óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente e decorado com nanopartículas de Ferro-Platina. O biosensor apresentou uma ampla faixa de detecção ( $1.0 \times 10^{-14}$  a  $1.0 \times 10^{-9}$  mol/L) do gene, o uso do eletrodo modificado com substâncias de alta condutividade como o óxido de grafeno reduzido e as nanopartículas de ferro-platina contribuíram para a alta sensibilidade do material (YANG; ZHANG, 2014).

TAN et al. (2018) desenvolveram um biosensor com limite de detecção de aproximadamente 100 células, valor inferior ao limite de detecção do gene BCR-ABL em outros estudos. Células de leucemia linfocítica aguda CCRF-CEM foram detectadas de forma mais específica do que outros tipos celulares como células Ramos, H22 e 293T, que não possuem o gene BCR-ABL. Para a detecção do gene foi utilizado o aptâmero Sgc8 marcado com carboxifluorescina e associado de forma não covalente ao óxido de grafeno. A vantagem do método ocorre porque a ligação dos aptâmeros, pequenas sequências de nucleotídeos, ao óxido de grafeno permite um aumento da estabilidade dos nucleotídeos que tem por objetivo ligar de forma complementar aos genes que devem ser detectados, como o BCR-ABL.

Aptâmeros também foram utilizados em estudos de detecção de células leucêmicas, mas utilizando nanofolhas de grafeno na superfície de um eletrodo. Com isso, foi desenvolvido um biosensor eletroquímico com o objetivo de amplificar o sinal da análise e facilitar a detecção das células (DONG et al., 2012).

#### 2.4. LEUCEMIA E GQD

O uso de pontos quânticos de carbono como partículas carreadoras é bastante versátil. Pesquisadores isolaram o *wogonin* da planta *Scutellaria baicalensis radix* e associaram ao ponto quântico de telureto de cádmio para tratar células leucêmicas multidroga resistente. Foi observado que a nanopartícula associada ao *wogonin* foi capaz de induzir maior apoptose nas células leucêmicas em comparação ao *wogonin* isoladamente. Além disso, em animais que receberam as células cancerígenas, a nanopartícula formada foi capaz de identificar o tumor em exames de imagem, mostrando a sua aplicação no diagnóstico do tumor (HUANG et al., 2016).

O mesmo composto foi utilizado para detecção do gene BCR-ABL. O método diagnóstico se deu por meio da fluorescência emitida e mensurada após a hibridização de oligonucleotídeo complementar ao gene BCR-ABL conjugado com o GQD. A intensidade da fluorescência é proporcional a quantidade de gene encontrado (SHAMSIPUR et al., 2017).

Um estudo semelhante foi realizado com o GQD associado ao aptâmero Sgc8, elemento capaz de reconhecer células de leucemia linfoblástica aguda (CCRF-CEM). Ensaios de microscopia de fluorescência e citometria de fluxo mostraram que a nanopartícula foi capaz de identificar as células leucêmicas sugerindo a utilização da plataforma em meios de diagnóstico (YU et al., 2016).

Tabela 1. Uso do ponto quântico de grafeno no tratamento e diagnóstico do câncer.

<b>Finalidade</b>	<b>Conjugação</b>	<b>Efeito</b>	<b>Alvo</b>	<b>Referência</b>
<b>Tratamento</b>	GQD +Doxorrubicina+Sílica mesoporosa	Penetração em células cancerígenas com baixa toxicidade	Câncer de mama	YAO et al., 2017
	GQD + Dicloridrato de histamina	Inibição do efeito imunossupressor de espécies reativas de oxigênio	Leucemia	CHERUKUL A et al., 2018
	GQD + Anticorpo+Cisplatina	Seletividade contra as células cancerígenas	Câncer de mama	NASROLLA HI et al., 2019
<b>Diagnóstico</b>	GQD + aptâmero Sgc8	Identificação de células leucêmicas por meio de Ensaios de microscopia de fluorescência e citometria de fluxo	Leucemia	YU et al., 2016
	GQD + Aptâmero	O gene BCR/ABL é identificado por meio da imunofluorescênci a gerada. A intensidade é proporcional a quantidade do gene	Leucemia mieloides crônica	SHAMSIPUR et al., 2017

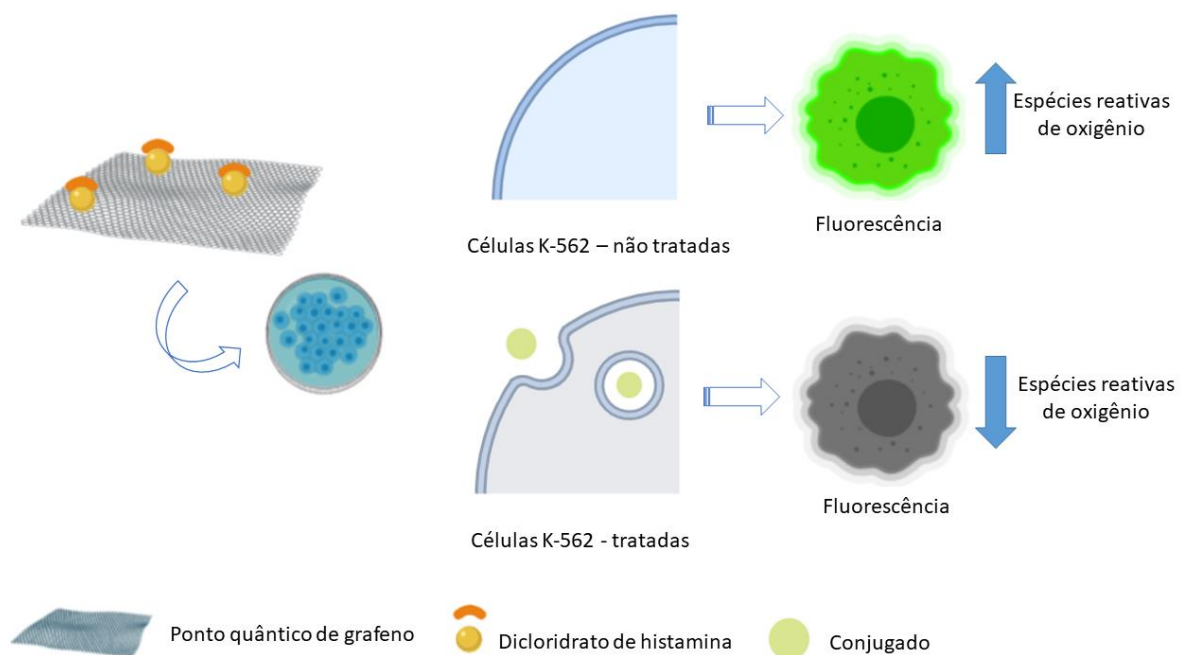
Legenda: Pontos quânticos de grafeno (GQD).

A sílica mesoporosa foi associada ao GQD formando um carreador da doxorrubicina, medicamento utilizada no tratamento da leucemia linfoblástica e mieloblástica aguda. A nanopartícula formada foi capaz de atingir células cancerígenas apresentando baixa citotoxicidade (YAO et al., 2017). Uma estratégia

semelhante foi realizada no tratamento de carcinoma cervical utilizando nanopartícula de carbono mesoporos e o ácido hialurônico, além do GQD e da doxorrubicina. O complexo foi testado e causou maior indução de apoptose e redução do tumor *in vivo* (FANG et al., 2018).

Células leucêmicas K-562 foram tratadas com dicloridrato de histamina associado por meio de ligações do tipo  $\pi$ - $\pi$  ao GQD na tentativa de diminuir espécies reativas de oxigênio na célula, frequentemente associada a imunossupressão. O tratamento foi capaz de melhorar a entrada e distribuição do dicloridrato de histamina na célula e diminuir a formação de espécies reativas de oxigênio (CHERUKULA et al., 2018) (Figura 5).

Figura 5. Uso do ponto quântico de grafeno no tratamento da leucemia.



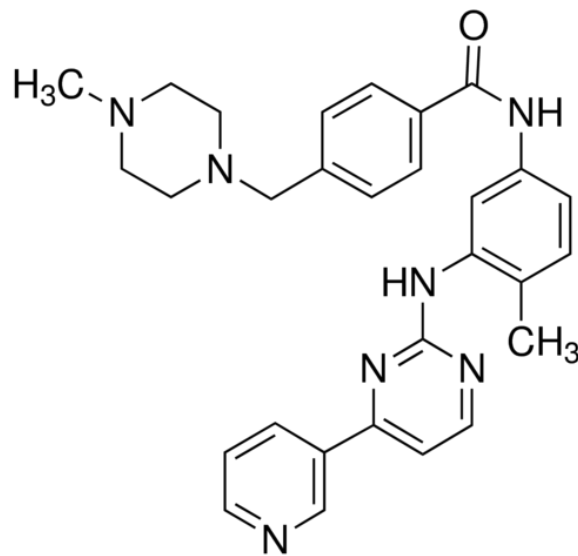
Legenda: Células K-562 foram tratadas com pontos quânticos de grafeno associados ao dicloridrato de histamina. O Conjugado foi capaz de diminuir a formação de espécies reativas de oxigênio que foi mensurado por meio de fluorescência (CHERUKULA et al., 2018). Fonte: O autor.

## 2.5. IMATINIBE

O imatinibe, um derivado do 2-fenil-amino-pirimidina (Figura 7), é o medicamento de primeira escolha no tratamento da leucemia mieloide crônica. Os estudos sobre o fármaco foram iniciados no final da década de 90, e em meados de

1998 foram iniciados os primeiros testes clínicos, com aprovação para uso em 2001, pelo FDA sob o nome de Glivec® (YANG; SHAO; ZHOU, 2020; IQBAL; IQBAL, 2014; CAPDEVILLE; SILBERMAN, 2003; KANTARJIAN; TALPAZ, 2001). Nos últimos anos tem demonstrado que é capaz de reduzir o avanço da leucemia mieloides crônica, inclusive em pacientes inicialmente tratados com o interferon. Ao longo de dez anos, a taxa de sobrevivência nos indivíduos tratados com imatinibe foi de até 79,4% (CAROFIGLIO et al., 2020; MOLICA et al., 2019).

Figura 6. Fórmula molecular do imatinibe.



Fórmula molecular do imatinibe. 4-[(4-metilpiperazinil-1-il)metil]-N-[4-metil-3-[4-(3-pirimidil)-2-pirimidil]amino-fenil]benzamida . Fórmula molecular:  $C_{29}H_{31}N_7O$ . Peso molecular: 493.60 g/mol. Fonte: Adaptado de (PENG; LOYD; SCHRAN, 2005).

O mecanismo de ação do medicamento consiste na inibição da proteína BCR-ABL, proteína codificada pelo gene de mesmo nome e resultante da translocação dos cromossomos 9 e 22. Além da proteína da BCR-ABL, o fármaco também é um inibidor da proteína tirosina quinase C (c-KIT), uma proteína proto-oncogênica e do receptor A do fator derivado de plaquetas (PDGFRA). Os receptores de tirosina cinase estão envolvidos em diversas cascatas de sinalização, especialmente as que levam ao desenvolvimento do câncer (SHANDIZ et al., 2016; IQBAL; IQBAL, 2014).

A atividade da proteína quinase consiste na fosforilação do resíduo de tirosina por meio da adição de um fosfato, proveniente da adenosina trifostato. Esta, por sua vez, estará ligada ao sítio ativo da proteína. Portanto, a ligação do imatinibe próximo

ao sítio ativo da proteína promove uma inibição semicompetitiva da atividade proteica (IQBAL; IQBAL, 2014).

Comercializado na forma de comprimido, o imatinibe é solúvel em água e em tampão aquoso com valores de pH de 5,5 ou inferior. Após a administração via oral, o fármaco é rapidamente absorvida e detectada no plasma após 30 minutos. A metabolização é realizada pelas proteínas do citocromo P450, a CYP3A4 e CYP3A5 (BRAUN; EIDE; DRUKER, 2020; CHU et al., 2020; YANG; SHAO; ZHOU, 2020; IQBAL; IQBAL, 2014; PENG et al., 2004)

O tratamento da leucemia mieloide crônica consiste no uso de inibidores tirosina quinase como o imatinibe, nilotinibe, dasatinibe, dentre outros. Destes o imatinibe é o tratamento de primeira escolha, pacientes resistentes ou intolerantes ao medicamento devem utilizar outros inibidores tirosina quinase (ALADAĞ; HAZNEDAROĞLU, 2019).

Já foi demonstrado que há a possibilidade da associação do imatinibe à nanopartículas que podem funcionar como carreadores de fármacos no tratamento da leucemia, com isso o tempo de liberação do fármaco pode ser alterado, bem como a incidência e gravidade dos efeitos adversos (AMIRI et al., 2020). LI; YANG; ZHANG, (2019) testou a conjugação do imatinibe à nanopartículas poliméricas associadas à galactose com a finalidade de melhorar a biodisponibilidade do fármaco e observou que o conjugado formado é capaz de ser absorvido pelas células intestinais. Considerando que o imatinibe é um medicamento disponível na forma farmacêutica de comprimido e a absorção pode ser prejudicada por vários fatores fisiológicos, é importante buscar melhorias na apresentação farmacêutica do medicamento.

A associação do imatinibe com nanopartículas já mostrou ser eficaz contra células cancerígenas (SOBIERAJSKA et al., 2020; CI et al., 2019; COVA et al., 2016). Lipossomas formados por fosfolipídeos foram utilizados como carreadores do imatinibe e tamoxifeno e apresentaram eficácia na redução do crescimento de células MCF-7 e MDA-MB-231 relacionadas ao câncer de mama (JOSE et al., 2019).

### 3. OBJETIVO

#### 3.1. *Objetivo Geral*

Associar o imatinibe ao GQD formando uma nanopartícula com atividade contra células leucêmicas e com maior segurança em relação ao imatinibe.

#### 3.2. *Objetivos específicos*

- Sintetizar o GQD;
- Associar o GQD ao imatinibe por meio da ativação com EDC e NHS;
- Confirmar a formação do conjugado por meio de análise de espectroscopia de infravermelho e microscopia de força atômica;
- Avaliar a viabilidade celular e indução de apoptose do conjugado;
- Investigar a capacidade de internalização do GQD@imatinibe.

#### 4. METODOLOGIA

A metodologia deste trabalho encontra-se descrita no Artigo intitulado *Graphene Quantum Dots decorated with imatinib for leukemia treatment* publicado na *Journal of Drug Delivery Science and Technology* em 2020 de própria autoria.





Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Drug Delivery Science and Technology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jddst](http://www.elsevier.com/locate/jddst)

Research paper

## Graphene quantum dots decorated with imatinib for leukemia treatment

Daniele Mendes Felix<sup>a</sup>, Luciana Magalhães Rebelo Alencar<sup>b</sup>, Frederico Duarte de Menezes<sup>c</sup>, Victor do Valle Pereira Midlej<sup>d</sup>, Lorayne Aguiar<sup>e</sup>, Sara Gemini Piperni<sup>e</sup>, Jian Zhang<sup>f</sup>, Yin Liu<sup>f</sup>, Eduardo Ricci-Junior<sup>g</sup>, Frank Alexis<sup>h</sup>, Severino Alves Junior<sup>i</sup>, Lin Zhu<sup>f</sup>, Ralph Santos-

Oliveira<sup>a, j, \*</sup>

<sup>a</sup> *Brazilian Nuclear Energy Commission, Nuclear Engineering Institute, Laboratory of Nanoradiopharmaceuticals and Synthesis of Novel Radiopharmaceuticals, Rio de Janeiro, Brazil*

<sup>b</sup> *Federal University of Maranhão, Department of Physics, Maranhão, Brazil*

<sup>c</sup> *Federal Institute of Education, Science and Technology of Pernambuco, Recife, Brazil*

<sup>d</sup> *Fiocruz, Oswaldo Cruz Institute, Laboratory of Cellular Ultrastructure, Rio de Janeiro, Brazil*

<sup>e</sup> *Unigranrio, Laboratory of Multidisciplinary Studies, Rio de Janeiro, Brazil*

<sup>f</sup> *Department of Pharmaceutical Sciences, Irma Lerma Rangel College of Pharmacy, Texas A&M University, USA*

<sup>g</sup> *Federal University of Rio de Janeiro, College of Pharmacy, Rio de Janeiro, Brazil*

<sup>h</sup> *School of Biological Sciences and Engineering, Yachay Tech University, Urcuquí, Imbabura, Ecuador*

<sup>i</sup> *Laboratório de Terras Raras, Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 50740-560, Brazil*

<sup>j</sup> *Zona Oeste State University, Laboratory of Radiopharmacy and Nanoradiopharmaceuticals, Rio de Janeiro, Brazil*

---

*Keywords:*

Drug delivery  
Graphene quantum dot  
Biomedical device  
Smart material  
Nanoparticle

---

The use of graphene quantum dots as biomedical device and drug delivery system has been increasing. This nano- platform of pure carbon has showed unique properties and showed to be safe for human use. The imatinib is a molecule designed to specifically inhibit the tyrosine kinase, used for leukemia treatment. In this study, we successfully decorated the graphene quantum dots (GQDs@imatinb) by a carbodiimide crosslinking reaction. The GQDs@imatinb were characterized by FTIR and AFM. The nanoparticles' in vitro behaviors were evaluated by cellular trafficking (internalization) assay and cell viability and apoptosis assays in various cancer cell lines, including suspension (leukemia) cells and adherent cancer cells. The results showed that the incorporation of the imatinib on the surface of the graphene quantum dots did not change the nanoparticles' morphology and properties. The GQDs@imatinb could be efficiently internalized and kill cancer cells via the induction of apoptosis. The data indicated that the prepared GQDs@imatinb might be a great drug nano-platform for cancer, particularly leukemia treatments.

---

## 1. Introduction

Carbon-based nanomaterials are nanomaterials with a high possibility of structures in diverse geometries and chemical bonds (sp<sup>1</sup>, sp<sup>2</sup>, sp<sup>3</sup>), which significantly changes their properties. The carbon-based nanomaterials include: fullerenes (0D), carbon nanotubes (1D) and more recently (<10 –y) graphene (2D) [1,2]. The latter consists of a monolayer of sp<sup>2</sup> carbon atoms arranged in a hexagonal crystal lattice. Graphene has unique properties related to its dimensionality, such as electronic, optical, mechanical and thermal. The surface of pure

graphene usually interacts with other molecules via physical adsorption ( $\pi$ - $\pi$  interactions). To allow the graphene surface to be more reactive, defects or surface functional groups are generally introduced, like carboxyl, carbonyl and amino groups can adjust the surface properties and electronic properties of graphene. The electrical conductivity (up to 2104 S/cm) can be 100 times higher than silicon [3–8].

A more recent variation of the carbon-based nanomaterials is the graphene quantum dots (GQDs). Among all the carbon-based family the GQDs are the most prominent in the use for biomedical applications, especially due the distinctive and tunable photoluminescence

---

\* Corresponding author. Brazilian Nuclear Energy Commission, Nuclear Engineering Institute, Rua Helio de Almeida, 75, Ilha do Fundão-Rio de Janeiro-Brazil, Rio de Janeiro/RJ, Brazil.

E-mail addresses: [roliveira@ien.gov.br](mailto:roliveira@ien.gov.br), [presidenciaradiofarmacia@gmail.com](mailto:presidenciaradiofarmacia@gmail.com) (R. Santos-Oliveira).

<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102117>

Received 11 May 2020; Received in revised form 1 September 2020; Accepted 24 September 2020

Available online 28 September 2020

1773-2247/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please cite this article as: Daniele Mendes Felix, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102117>

properties, physicochemical properties, high photostability, good biocompatibility, and small size. In general, GQDs are composed of a few layers of graphene fragments, with an absorption in the UV region (230–300 nm), which may change according to the size, since the quantum confinement effect and density of sp<sup>2</sup> sites are size-dependent [9–11]. Finally, GQDs presents low toxicity for cells and in vivo, corroborating their use for biomedical application [12–14].

Leukemia is defined as an aberrant hyper-proliferation of immature blood cells that do not form solid tumor masses (i.e., liquid cancer). Usually, leukemia could be either of the myeloid or lymphoid lineages, and is classified as acute or chronic in nature. Leukemia is the most common type of cancer in children and adolescents, accounting for between 25% and 35% of all pediatric neoplasms. Leukemias arise in cells of the hematopoietic system. They originate from immature cells of the bone marrow. In the early stage of lymphoblast development, for example, a rapid onset disease called acute lymphoid leukemia results. When it originates in cells related to the development of granulocytic and monocytes cells, they are called acute myeloid leukemia. In most countries, acute lymphoid leukemia is more common among children under 5 years of age, its frequency decreases with increasing age and accommodates more boys than girls. For acute myeloid leukemia, these rates are five times lower than all leukemia's combined. Is important to notice that chronic leukemias tend to have more mature cells and are rare in pediatric patients, while the acute ones are typically less mature and commonly occur in patients of all ages and are potentially rapidly fatal if not readily treated [15]. Also, some studies have shown that GQDs are capable to interact with a great variety of molecules, drugs, DNA and radioactive materials, with a wide range of application including: i) bioimaging and biosensing, ii) drug delivery, and ii) photothermal and photodynamic therapy [12,13]. Finally, the GQDs presents low toxicity for cells and in vivo, corroborating their use for biomedical application [14–16].

In this study we have developed, characterized and tested in vitro the potential use of graphene quantum dots decorated with imatinib as a nanodrug for leukemia therapy.

## 2. Materials and methods

The both synthesis and characterization of graphene are comprehensively described in Menezes et al. [18]. Briefly, electrochemically green route was used to produce the graphene. Initially, graphite rod and a platinum, respectively anode and cathode were used in a buffer solution of citric acid: sodium citrate. The decomposition was performed using a constant current of 190 mA for 24 h (ICEL PS-1500). After electrolysis the dispersion was filtered and dried at 60 °C. Then, 50 mL of pure ethanol was added and the upper phase (purified graphene) was collected and dried again at 60 °C. All the characterization methods included atomic force microscopy (AFM) (Bruker, Santa Barbara) (scan resolution of 256 x 256 lines and a frequency of 0.5 Hz), UV–Visible (Cary 60 UV–Vis, Agilent) (emission at wavelength of 395 nm), fluorescence spectrophotometer (Ocean Optics HR2000), powder X-ray diffraction (PXRD) (Bruker AXS D8) using a CuK $\alpha$  radiation source and Raman analysis were performed by Horiba-Jobin-Yvon triple spectrometer (model T64000) [18].

### 2.1. Graphene quantum dots decoration process with imatinib

Imatinib decorated graphene quantum dots (GQDs@imatinib) was obtained via a carbodiimide functionalization reaction. For the reaction, GQDs (Graphene Quantum Dot) (13,5 mg) previously produced and described [16] was dispersed in 10 mL of water by ultrasonication (5 min, 155w of potency, 50/60 Hz of frequency) at room temperature. A solution by 12,5 mg of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) (Oakwood chemical) and 38,2 mg of N-hydroxysuccinimide (NHS) (Alfa Aesar) was prepared in 2,5 ml of distilled water and then added of 13mg of GQDs dispersion. Subsequently, the mixture was stirred for 4 h

at room temperature. Then, 12,9 mg of imatinib (Sigma-Aldrich) was diluted in 1 ml of distilled water and add to the mixture and stirred for 18 h. The resulted material was centrifuged (13 300 rpm, 5 min) and washed three times with distilled water to remove unbound reagents. The quality of the reaction has been confirmed by Fourier-transformed infrared spectroscopy (FTIR) (IR-tracer-100 Simadzu).

### 2.2. FTIR spectroscopy analysis

Infrared absorption spectra were captured using the method FTIR with UATR accessory (universal sampling arm accessory with pressure) were reached at room temperature on a spectrophotometer with transformed by Fourier from PerkinElmer (model: Spectrum 400, Serial No: 82 287) in the region between 4000 and 400 cm<sup>-1</sup>. The spectral resolution was 2 cm<sup>-1</sup> and 32 accumulations.

### 2.3. Atomic force microscopy

Samples of Imatinib decorated graphene quantum dots (GQDs@imatinib) were solubilized in distilled water and 10  $\mu$ m was dropped in fresh cleaved mica and rest until complete drying. The AFM measurements of graphene QDs film was performed using a Multimode 8 microscope (Bruker, Santa Barbara, CA) in QNM (Quantitative Nanomechanics) mode using probes model Scanasyst Air, with nominal spring constant of 0.4 N/m and nominal tip radio of 2 nm approximately. The particle and section analysis was performed with NanoScope Analysis 1.50 software and the images resolution was 256 samples per lines.

### 2.4. Cell viability assay

To study the anticancer activity of imatinib, GQD, and GQDs@imatinib, the human myeloma cells (RPMI 8226) and ovarian cancer cells (NCI-ADR/RES) were grown at  $\approx$  103 cells/well in 96-well plates. The imatinib, GQD, or GQDs@imatinib was incubated with the cells at various concentrations (0.1–1000  $\mu$ g/mL) for 72 h. The cytotoxicity was evaluated by the CellTiter-Blue® Cell Viability Assay [17]. Briefly, 10  $\mu$ L of the reagent was diluted with 90  $\mu$ L of the complete growth medium per well and incubated with the cells at 37 °C for 2 h. Then, the fluorescence intensity was determined at  $\lambda_{ex}$  = 560 nm and  $\lambda_{em}$  = 590 nm on a microplate reader. The four-parameter dose-response curves were made and the corresponding half maximal inhibitory concentrations (IC50) were calculated by GraphPad Prism software v8.3 (GraphPad Software).

### 2.5. Apoptosis analysis

The cell apoptosis was analyzed by the Annexin V-FITC and propidium iodide (PI) double staining [18]. Briefly, the RPMI 8226 cells (6  $\times$  103 cells/well) were incubated with imatinib, GQD, or GQDs@imatinib at 100  $\mu$ g/mL in the complete growth medium for 48 h. The treated cells were collected by centrifugation and resuspended in 100  $\mu$ L of the binding buffer. The cells were stained with 10  $\mu$ L annexin V-FITC and 10  $\mu$ L PI for 15 min at room temperature and analyzed by the flow cytometry.

### 2.6. Trafficking assay

MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) were seeded at 2500 cells/cm<sup>2</sup> and reaching 60% confluence, exposed to 20  $\mu$ g/ml graphene quantum dots for, alternatively, 30 min or 2 h. Following, cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2), post-fixed in 1% osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>) and 0.8% potassium ferrocyanide in 0.1 M cacodylate buffer during 40 min, dehydrated in a series of acetone gradation (70-90-100%), and embedded in epoxy resin. Ultrathin sections (60–70-nm thick) were collected, stained with uranyl acetate and

lead citrate. At the end, the samples were analyzed using a Tecnai Spirit TEM (FEI Co. The Netherlands).

### 3. Results

#### 3.1. Graphene quantum dots decoration process with imatinib

The synthesis of graphene quantum dots@imatinib (GQDs@imatinib) was performed by GQDs functionalization with EDC (ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) and NHS (N-hydroxysuccinimide) to activate carboxyl groups of GQDs (Fig. 1). FTIR spectroscopy analysis GQDs (Fig. 2) shows adsorption bands at 3480-3520  $\text{cm}^{-1}$ , 1762  $\text{cm}^{-1}$  and 1041  $\text{cm}^{-1}$ , corresponding to OH, C=O and >O, respectively. The chemical changes of graphene quantum dots@imatinib (GQDs@imatinib) were analyzed comparing the FITR spectra of the decorated GQDs with the FITR spectra of the pure GQDs.

The data showed the formation of a new band at 1664  $\text{cm}^{-1}$  in the GQDs@imatinib spectra, corresponding to amide vibration, which suggest the covalent ligation formed between amine from imatinib group with the active carboxyl groups from GQDs. Also there are peaks at 1530  $\text{cm}^{-1}$  e 1576  $\text{cm}^{-1}$  which corresponds to C-N and N-H vibration.

#### 3.2. Atomic force microscopy

The atomic force microscopy (Fig. 3) showed quantum dot property of the GQDs and corroborated the topographical 2D. The QNM analysis with energy dispersion evidenced the complexation of imatinib with the graphene quantum dot corroborating the FTIR analysis.

#### 3.3. Cellular trafficking assay

In order to establish the permeation of the GQDs@imatinib into cells and predicts its behavior we performed cellular trafficking assay. Nonetheless, is important to fully understand if GQDs@imatinib is capable to enter cells cytoplasm and block effectively the Bcr-Abl tyrosine kinase, since imatinib inhibits Bcr-Abl kinase, mainly presented in cytoplasm, causing apoptosis [19–21].

First, was evaluated the behavior of GQDs@imatinib into the cells medium. In this direction, 1 mg/ml of GQDs@imatinib was re-suspended in culture medium Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) high glucose supplemented with 10% serum fetal bovine. The influence on the particle was a partial agglomeration with size ranging from 40 to 200 nm (Fig. 4).

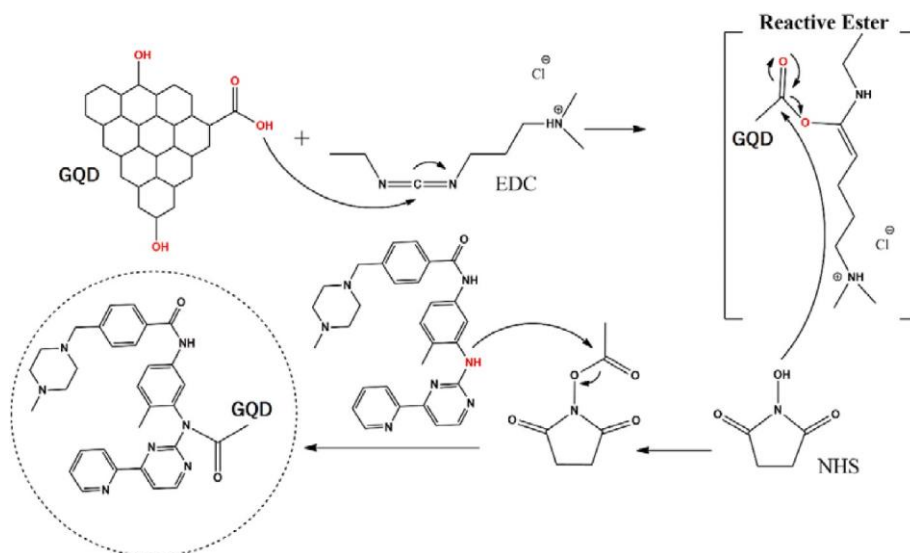


Fig. 1. Functionalization using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) and 38,2 mg N-hydroxisuccinimida (NHS) and decoration with imatinib.

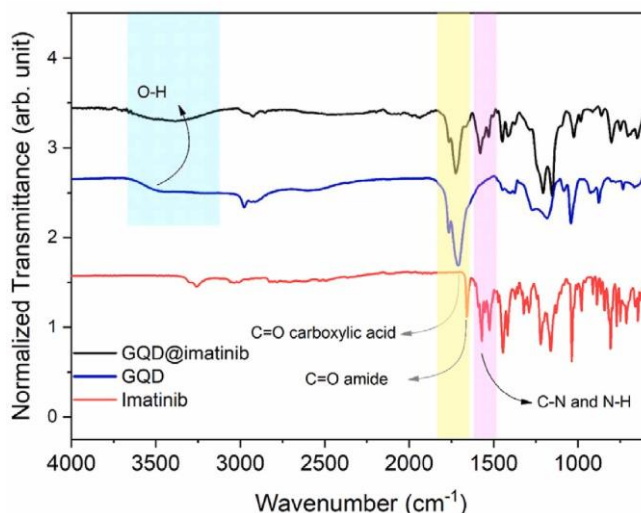
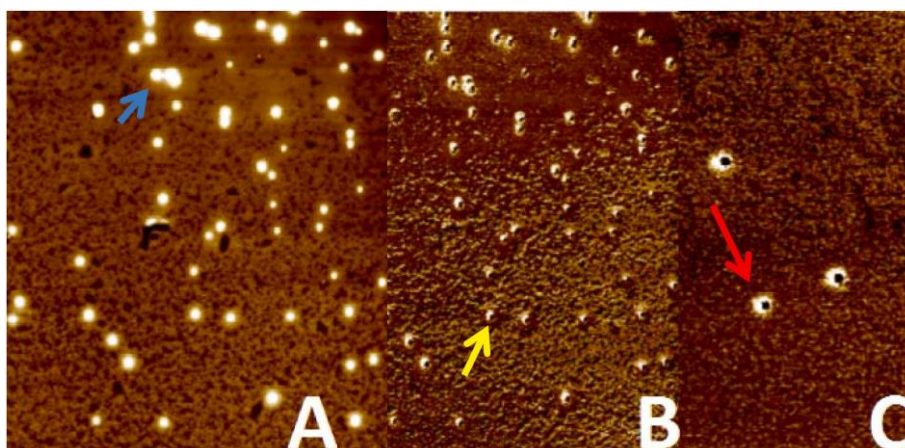


Fig. 2. Fourier-transform infrared spectroscopy analysis comparing the pure GQDs, the GQDs decorated with imatinib and the pure imatinib.

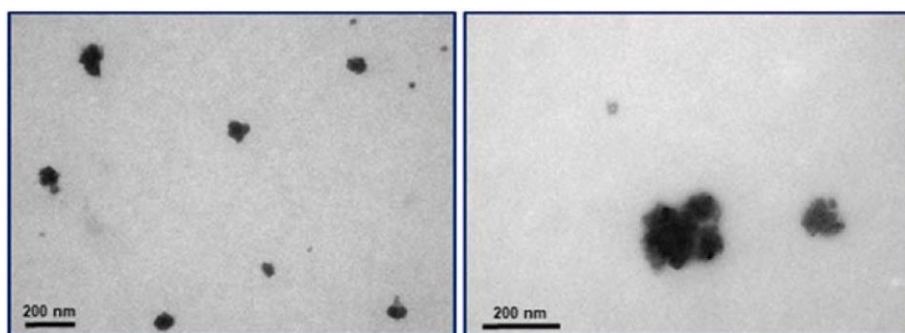
In order to verify cellular internalization of GQDs@imatinib MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™), mammary cell line derived from metastatic site were exposed to 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  GQDs@imatinib during 1 and 24 h (Fig. 5). Recently, a study performed by Chevalier et al. [22] correlated the presence of ABL tyrosine kinase in MBA-MB-231 cells, which influenced our choice for this cell line to perform this assay.

#### 3.4. Cell viability assay

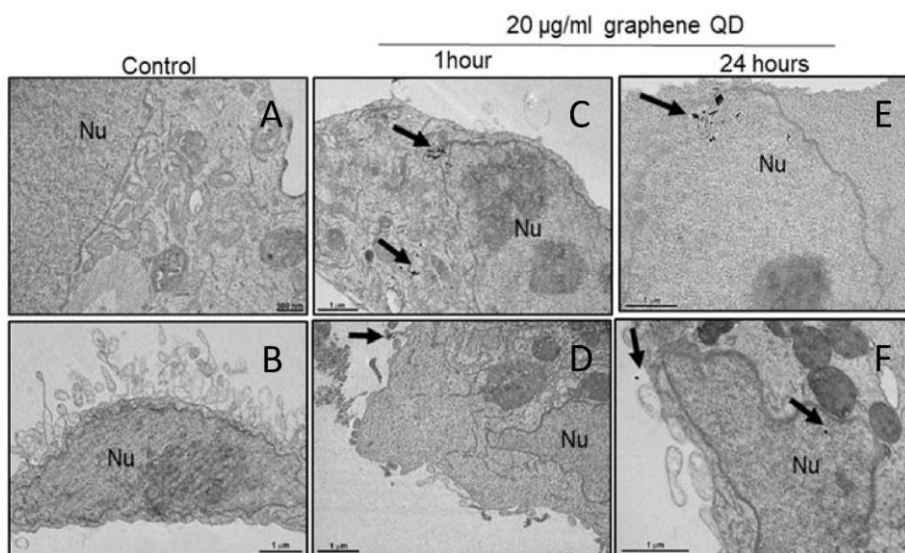
The cytotoxicity of imatinib, GQD, and GQDs@imatinib was evaluated by the CellTiter-Blue® Cell Viability Assay in both adherent cells (NCI-ADR/RES) and suspension cells (RPMI 8226) (Fig. 6). The imatinib showed the highest cytotoxicity among the treatments in both cell lines. The GQDs@imatinib showed a slightly decreased cytotoxicity, which was probably due to the delayed drug release/dissociation. In contrast, the GQDs were very safe, indicating its safety as a delivery nanocarrier. The calculated IC50s showed the same results (Table 1).



**Fig. 3.** A: Overview analysis. B: Topographical analysis and C: QNM mode with energy dispersion analysis. The blue arrow shows the quantum property. The yellow arrow shows the height of the graphene quantum dot and the red arrow shows the energy dispersion regarded to the imatinib complexation. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)



**Fig. 4.** Physicochemical characterization pure graphene quantum dots in medium culture. Representative STEM images of graphene quantum dots agglomerates.



**Fig. 5.** Electron micrographs of MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™): (A and B) untreated cells (C and D) 1 h exposed (E and F) 24 h exposed to graphene quantum dots. Note graphene quantum dots presence (black arrow) in cytoplasm after 1 h's exposition and nuclear translocation after 24 h exposition. Nu- Nucleus.

### 3.5. Apoptosis analysis

The apoptotic and dead cells were stained by the annexin V-FITC and PI and analyzed by flow cytometry. In the RPMI 8226 cells, at 48 h, the number of the apoptotic cells (annexin V positive) upon imatinib and GQDs@Imatinib treatments significantly increased compared to those of the untreated cells (Fig. 7A). The number of the late apoptotic and dead cells (PI positive) upon the imatinib treatment significantly increased compared to the untreated cells, while the GQDs@imatinib only caused the mild cell death (Fig. 7B), in consistent with the cytotoxicity data. In

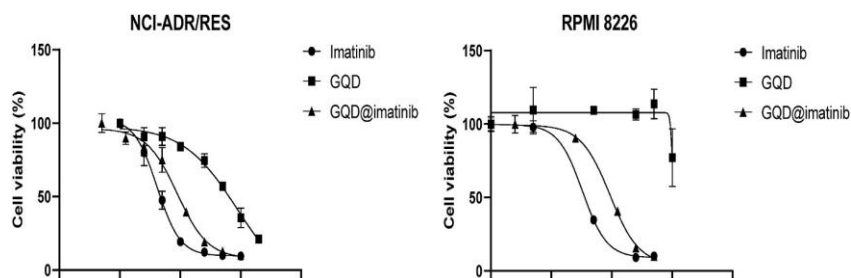


Fig. 6. The cell viability assay after 72 h treatments in the NCI-ADR/RES (A) and RPMI 8226 cells (B).

Table 1

The IC50s of the treatments ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Cell lines	Imatinib	GQD	GQDs@imatinib <sup>a</sup>
RPMI 8226	32.61	991.1	93.59
NCI-ADR/RES	41.35	849.2	88.93

<sup>a</sup> Equivalent imatinib dose.

contrast, the GQDs didn't cause significant cell apoptosis/death.

## 4. Discussion

According to Dreyer et al. [23] graphene and the reduced form (graphene oxide) can easily perform reduction reactions due the disrupted  $\text{sp}^2$  bonding networks. Aside this, graphene shows reactive oxygen: carboxylic acids (in the edges) and epoxy and hydroxyl groups (in the basal planes) [24,25] (Fig. 8). The presence of the carboxylic acids and hydroxyl groups allows the carbodiimide crosslink reaction using EDC (ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) and NHS (N-hydroxysuccinimide).

The activation of acid group by the 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) and subsequent addition of esters (nucleophilic specie) by the use of NHS (N-hydroxysuccinimide) is a common methodology to covalent functionalization, and the final product may be used as a drug delivery device [27–29].

The EDC carbodiimide/NHS crosslink reaction used in this study efficiently produced graphene quantum dots functionalized with imatinib. This reaction active the carboxyl groups from GQDs assisting the formation of amide bond, which increase the applicability for insertion of proteins, peptides and chemotherapeutics that are rich substrates with a great variety of functional groups in their chemical structure [30–32]. The FITR analysis compared pure GQDs, GQDs decorated with imatinib and the pure imatinib. The results showed peaks that evidenced the presence of groups OH and C=O and a new band at  $1664\text{ cm}^{-1}$  corresponding to amide bond formed in the conjugated

GQDs@imatinib.

The atomic force microscopy (AFM) analysis, especially the QNM analysis corroborated the functionalization of the GQDs with imatinib. Also showed that functionalization of GQDs with imatinib did not interfere in the size of the GQDs. The AFM analysis showed a GQD with a size range from 162 to 287 nm with a height of 5 nm, practically the same result described by Menezes et al. [33].

The trafficking assay showed cells internalization of GQDs@imatinib nanoparticles with morphology compatible with graphene quantum dots. These particles appeared after 1 h in cell cytoplasm and after 24 h images shows nuclear translocation (Fig. 5). The presence of GQDs@imatinib nanoparticles into the nucleus is an advantage. According to Huang et al. [34], Bcr-Abl has three nuclear localization signals and one nuclear export signal. Nonetheless, although Bcr-Abl is mainly located in the cytoplasm, the c-Abl shuttles between the nucleus and cytoplasm [35–37]. Thus the presence of GQDs@imatinib, a potent inhibitor of Bcr-Abl and c-ABL in the nucleus may predicts a stronger effect of the nanosystem when compared to the solely effect of pure imatinib.

The cell viability data and apoptosis analysis showed that: i) the graphene quantum dot (GQD) alone is harmless for the cells tested and ii) the GQDs@imatinib was less efficient than the pure imatinib. The first finding is quite desirable and demonstrated that any effect caused by the GQDs@imatinib is due to the presence of the imatinib. Also corroborated the low cytotoxic of the pure GQDs [38]. Regarding the second result, the lower cytotoxic effect of the conjugated imatinib (GQDs@imatinib) observed comparing with the free imatinib can be explained by the delayed release/dissociation of imatinib from the GQDs. According to Liu et al. [39], the similar result was observed using paclitaxel (PTX) nanoconjugate (PEG2000-peptide-PTX), in which the drug release process (cleavage) delayed the PTX's action. As explained above the functionalization of the GQDs with imatinib occurred by a covalent-bond crosslinking reaction. The formed amide bond may be relatively stable and requires a longer contact time for the cleavage. However, controversially with the lower efficacy when compared with the free imatinib, the GQDs@imatinib was able to produce significant

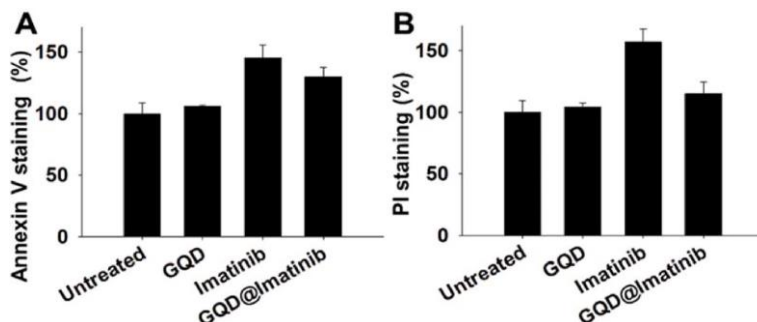


Fig. 7. The apoptosis and death of the RPMI 8226 cells analyzed by the annexin V (A) and PI (B) double staining.

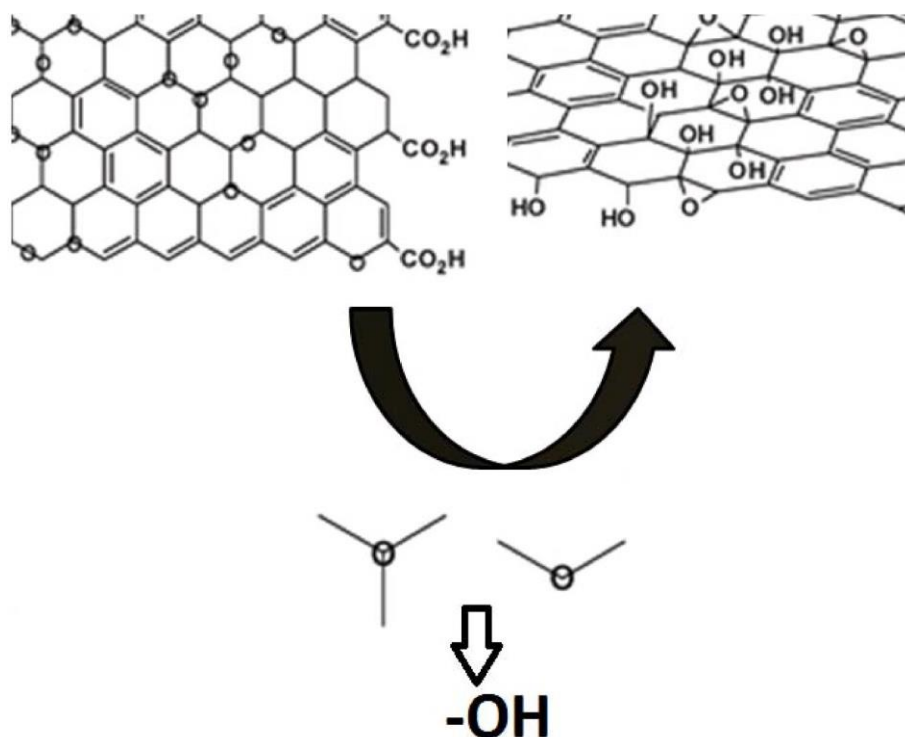


Fig. 8. Schematic representation of the presence of carboxylic acid (edge) and hydroxyl groups in graphene adapted from Ref. [26].

cancer cell-killing effects, supporting the use of this platform as a drug delivery system. Here, we speculate that in an *in vivo* biological environment (human or animals) the GQDs@imatinib's anticancer effects would be more significant, considering the myriads of endogenous factors as the EPR effects and tumor microenvironment, such as pH variation, temperature variation and enzymes [40,41]. Our findings are corroborated by Jian et al. [42], which have used metal-organic framework composite associated with graphene quantum dots for leukemia treatment with positive results. Also, the studies performed by Russier et al. [43] demonstrated that few-layer graphene (FLG) dispersions are capable to specifically kill myelomonocytic leukemia. Thus, the use of GQDs@imatinib may represent a safety and new approach for leukemia treatment.

## 5. Conclusion

The study showed that is possible to functionalize the graphene quantum dot with a small molecule as imatinib using a rapid carbodiimide crosslinking reaction. Also the data showed that conjugation of the imatinib with the GQDs did not change the size as the shape. The trafficking assay corroborates the internalization of the GQDs@imatinib. The cytotoxicity as the apoptosis assay showed that GQDs@imatinib are capable to produce a remarkable cancer cell proliferation.

The results obtained in this study corroborated the potential use of graphene quantum dots decorated with imatinib as a nanosystem for leukemia treatment. The use of a pure-carbon nanosystem, easily decorated, with the ability to penetrates the cancer cell as efficiently kills the target cell is innovative approach in the blood cancer treatment.

### CRedit authorship contribution statement

**Daniele Mendes Felix:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Luciana Magalhães Rebelo Alencar:** Methodology, Formal analysis. **Frederico Duarte de Menezes:** Conceptualization, Methodology, Writing - review & editing. **Victor do Valle Pereira Midlej:** Formal analysis, Investigation, Resources, Data curation. **Lorayne Aguiar:** Formal analysis,

Investigation, Resources, Data curation. **Sara Gemini Piperni:** Formal analysis, Investigation, Resources, Data curation. **Jian Zhang:** Formal analysis, Investigation, Resources, Data curation. **Yin Liu:** Formal analysis, Investigation, Resources, Data curation. **Eduardo Ricci-Junior:** Conceptualization, Methodology, Validation, Writing - original draft, Visualization. **Frank Alexis:** Data curation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization. **Severino Alves Junior:** Data curation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization, Funding acquisition. **Lin Zhu:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Writing - original draft, Visualization, Supervision, Funding acquisition. **Ralph Santos-Oliveira:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Data curation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization, Supervision, Funding acquisition.

## Declaration of competing interest

The authors state that do not have any conflicts of interest.

## Acknowledgement

The authors would like to kindly thank CAPES PROEX-PPGB-UERJ (23038.002824/2018-20) and CNPq Bolsa Produtividade (301069/2018-2) to Dr. Ralph Santos-Oliveira. Also, The work was partially supported by the National Cancer Institute of the National Institutes of Health (R15CA213103) to Dr. Lin Zhu.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102117>.

## References

- [1] Ahmed Raslan, Laura Saenz Del Burgo, Jesús Ciriza, Jose Luis Pedraz, Graphene oxide and reduced graphene oxide-based scaffolds in regenerative medicine, *Int. J. Pharm.* (mar. 2020) 119226–119240, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119226>. Elsevier BV.
- [2] Zhongjian Xie, Yanhong Duo, Zhitao Lin, Taojian Fan, Chenyang Xing, Li Yu, Renheng Wang, Meng Qiu, Yupeng Zhang, Yonghua Zhao, The rise of 2D photothermal materials beyond graphene for clean water production, *Adv. Sci.* 7 (5) (27 jan. 2020) 1902236–1902250, <https://doi.org/10.1002/adv.201902236>. Wiley.
- [3] Rahul S. Tade, Sopan N. Nangare, Ashwini Patil, Abhijeet Pandey, Prashant K. Deshmukh, Dilip Ramsing Patil, Tanisha Agrawal, Srinivas Mutalik, A.M. Patil, Mahesh P. More, Recent advancement in bio-precursor derived graphene quantum dots: synthesis, characterization and toxicological perspective, *Nanotechnology* 10 (4) (16 mar. 2020) 1–70, <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ab803e>. IOP Publishing.
- [4] Ryo Sekiya, Takeharu Haino, Chemically functionalized two-dimensional carbon materials, *Chem. Asian J.* (4 mar. 2020) 327–345, <https://doi.org/10.1002/asia.202000196>. Wiley.
- [5] Gao Yang, Lihua Li, Wing Bun Lee, Man Cheung Ng, Structure of graphene and its disorders: a review, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 19 (1) (29 ago. 2018) 613–648, <https://doi.org/10.1080/14686996.2018.1494493>. Informa UK Limited.
- [6] Matthew J. Allen, Vincent C. Tung, Richard B. Kaner, Honeycomb carbon: a review of graphene, *Chem. Rev.* 110 (1) (13 jan. 2010) 132–145, <https://doi.org/10.1021/cr900070d>. American Chemical Society (ACS).
- [7] Qing Tang, Zhen Zhou, Zhongfang Chen, Graphene-related nanomaterials: tuning properties by functionalization, *Nanoscale* 5 (11) (2013) 4541–4561, <https://doi.org/10.1039/c3nr33218g>. Royal Society of Chemistry (RSC).
- [8] Guoke Zhao, Xinming Li, Meirong Huang, Zhen Zhen, Yujia Zhong, Qiao Chen, Xuanliang Zhao, Yijia He, Ruirui Hu, Tingting Yang, The physics and chemistry of graphene-on-surfaces, *Chem. Soc. Rev.* 46 (15) (2017) 4417–4449, <https://doi.org/10.1039/c7cs00256d>. Royal Society of Chemistry (RSC).
- [9] Luca Banszerus, Samuel Möller, Eike Icking, Kenji Watanabe, Takashi Taniguchi, Christian Volk, Christoph Stampfer, Single-electron double quantum dots in bilayer graphene, *Nano Lett.* 20 (3) (21 fev. 2020) 2005–2011, <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b05295>. American Chemical Society (ACS).
- [10] Chang Q. Sun, Size and confinement effect on nanostructures, *ChemInform* 37 (21) (23 maio 2006) 327–345, <https://doi.org/10.1002/chin.200621219>. Wiley.
- [11] Zhongkai Huang, Jinfeng Qu, Xiangyang Peng, Wenliang Liu, Kaiwang Zhang, Xiaolin Wei, Zhong, Jianxin. Quantum confinement in graphene quantum dots, *Phys. Status Solidi Rapid Res. Lett.* 8 (5) (31 mar. 2014) 436–440, <https://doi.org/10.1002/pssr.201409064>. Wiley.
- [12] Seokhwan Chung, Richard A. Revia, Migin Zhang, Graphene quantum dots and their applications in bioimaging, biosensing, and therapy, *Adv. Mater.* (2019 Dec 12), e1904362, <https://doi.org/10.1002/adma.201904362>.
- [13] Iannazzo, Daniela, Ziccarelli, Ida, Pistone Alessandro. Graphene quantum dots: multifunctional nanoplatfoms for anticancer therapy. *J. Mater. Chem. B* 5(32): 6471-6489.
- [14] Rahul S. Tade, Sopan N. Nangare, Ashwini Patil, Abhijeet Pandey, Prashant K. Deshmukh, Dilip Ramsing Patil, Tanisha Agrawal, Srinivas Mutalik, A.M. Patil, Mahesh P. More, Recent advancement in bio-precursor derived graphene quantum dots: synthesis, characterization and toxicological perspective, *Nanotechnology* 5 (8) (16 mar. 2020) 357–378, <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ab803e>. IOP Publishing.
- [15] Hao Zhang, Sai Ba, Zhaoqi Yang, Tianxiang Wang, Jasmine Yiqin Lee, Tianhu Li, Shao, Fangwei. Graphene quantum dot-based nanocomposites for diagnosing cancer biomarker APE1 in living cells, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 5 (10) (10 mar. 2020) 127–145, <https://doi.org/10.1021/acsami.9b21385>. American Chemical Society (ACS).
- [16] Jing Liu, Chengnan Li, Toon Brans, Aranit Harizaj, Shana Van De Steene, Thomas De Beer, Smedt Stefaan De, Sabine Szunerits, Rabah Boukherroub, Ranhua Xiong, Surface functionalization with polyethylene glycol and polyethyleneimine improves the performance of graphene-based materials for safe and efficient intracellular delivery by laser-induced photoporation, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (4) (24 fev. 2020) 1540–1565, <https://doi.org/10.3390/ijms21041540>. MDPI AG.
- [17] Gunnar Juliusson, Rachael Hough, in: *Leukemia. Progress in Tumor Research*, S. Karger AG, 2016, pp. 87–100, <https://doi.org/10.1159/000447076>.
- [18] Frederico Duarte De Menezes, Sara Rhaissa Rezende Dos Reis, Suyene Rocha Pinto, Filipe Leal Portilho, Francisco Do Vale Chaves E. Mello, Edward Helal-Neto, Aline Oliveira Da Silva De Barros, Luciana Magalhães Rebêlo Alencar, Alan Silva De Menezes, Clenilton Costa dos Santos, Graphene quantum dots unraveling: green synthesis, characterization, radiolabeling with <sup>99m</sup>Tc, in vivo behavior and mutagenicity, *Mater. Sci. Eng. C* 102 (set. 2019) 405–414, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.058>. Elsevier BV.
- [19] Zhi Dai, Qing Yao, Lin Zhu, MMP2-Sensitive PEG–lipid copolymers: a new type of tumor-targeted P-glycoprotein inhibitor, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8 (20) (12 maio 2016) 12661–12673, <https://doi.org/10.1021/acsami.6b03064>. American Chemical Society (ACS).
- [20] Yin Liu, Zhi Dai, Jiao Wang, Ying Tu, Lin Zhu, Folate-targeted pH-sensitive bortezomib conjugates for cancer treatment, *Chem. Commun.* 55 (29) (2019) 4254–4257, <https://doi.org/10.1039/c9cc01344j>. Royal Society of Chemistry (RSC).
- [21] Heikki Joensuu, Sasa Dimitrijevic, Tyrosine kinase inhibitor imatinib (STIS71) as an anticancer agent for solid tumours, *Ann. Med.* 33 (7) (jan. 2001) 451–455, <https://doi.org/10.3109/07853890109002093>. Informa UK Limited.



- [22] P.W. Manley, S.W. Cowan-Jacob, E. Buchdunger, D. Fabbro, G. Fendrich, P. Furet, J. Zimmermann, Imatinib: a selective tyrosine kinase inhibitor *European Journal of Cancer*. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(02\)80599-8](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(02)80599-8), 2002, 38, S19-S27.
- [23] Marina Brama, Sabrina Basciani, Sara Cherubini, Stefania Mariani, Silvia Migliaccio, Mario Arizzi, Giuseppe Rosano, Giovanni Spera, Lucio Gnessi, Osteoblast-conditioned medium promotes proliferation and sensitizes breast cancer cells to imatinib treatment, *Endocr. Relat. Canc.* 14 (1) (mar. 2007) 61–72, <https://doi.org/10.1677/erc.1.01307>. Bioscientifica.
- [24] C. Chevalier, A. Cannet, S. Descamps, A. Sirvent, V. Simon, S. Roche, et al., ABL tyrosine kinase inhibition variable effects on the invasive properties of different triple negative breast cancer cell lines, *PLoS One* 10 (3) (2015), e0118854, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118854>.
- [25] Daniel R. Dreyer, Sungjin Park, Christopher W. Bielawski, Rodney S. Ruoff, The chemistry of graphene oxide, *Chem. Soc. Rev.* 39 (1) (2010) 228–240, <https://doi.org/10.1039/b917103g>. Royal Society of Chemistry (RSC).
- [26] Anton Lerf, Heyong He, Michael Forster, Jacek Klinowski, Structure of graphite oxide revisited, *J. Phys. Chem. B* 102 (23) (jun. 1998) 4477–4482, <https://doi.org/10.1021/jp9731821>. American Chemical Society (ACS).
- [27] Chun Kiang Chua, Martin Pumera, The reduction of graphene oxide with hydrazine: elucidating its reductive capability based on a reaction-model approach, *Chem. Commun.* 52 (1) (2016) 72–75, <https://doi.org/10.1039/c5cc08170j>. Royal Society of Chemistry (RSC).
- [28] Daniel R. Dreyer, Sungjin Park, W. Bielawski Christopher, S. Ruoff Rodney, The chemistry of graphene oxide, *Chem. Soc. Rev.* 39 (1) (2010) 228–240, <https://doi.org/10.1039/b917103g>. Royal Society of Chemistry (RSC).
- [29] Zhuang Liu, Joshua T. Robinson, Xiaoming Sun, Dai Hongjie, PEGylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (33) (2008) 10876–10877, <https://doi.org/10.1021/ja803688x>. American Chemical Society (ACS).
- [30] Mariana Ioniță, Vlăscceanu, Mihail George, Aiza Andreea Watzlawek, Stefan Ioan Voicu, Jorge S. Burns, Iovu Horia, Graphene and functionalized graphene: extraordinary prospects for nanobiocomposite materials, *Compos. B Eng.* 121 (jul. 2017) 34–57, <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2017.03.031>. Elsevier BV.
- [31] Zhuang Liu, Joshua T. Robinson, Xiaoming Sun, Dai Hongjie, PEGylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (33) (2008) 10876–10877, <https://doi.org/10.1021/ja803688x>. American Chemical Society (ACS).
- [32] Jiubiao Guo, W.C. Chan Edward, Sheng Chen, Zeng Zhenling, Development of a novel quantum dots and graphene oxide based FRET assay for rapid detection of invA gene of Salmonella, *Front. Microbiol.* 8 (10) (17 jan. 2017) 327–350, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00008>. Frontiers Media SA.
- [33] Bowen Tian, Yanxia Kou, Xiangmei Jiang, Jijia Lu, Yuanyuan Xue, Meijuan Wang, Liang Tan, Ultrasensitive determination of mercury ions using a glassy carbon electrode modified with nanocomposites consisting of conductive polymer and amino-functionalized graphene quantum dots, *Microchimica Acta* 187 (4) (9 mar. 2020) 357–388, <https://doi.org/10.1007/s00604-020-4191-1>. Springer Science and Business Media LLC.
- [34] Nora Slekiene, Valentinas Snitka, Impact of graphene oxide functionalized with doxorubicin on viability of mouse hepatoma MH-22A cells, *Toxicol. Vitro* (mar. 2020) 104821–104842, <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104821>. Elsevier BV.
- [35] Zheng-Lan Huang, Miao Gao, Qian-Yin Li, Kun Tao, Qing Xiao, Wei-Xi Cao, Wen-Li Feng, Induction of apoptosis by directing oncogenic Bcr-Abl into the nucleus, *Oncotarget* 4 (12) (10 out. 2013) 328–346, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1339>. Impact Journals, LLC.
- [36] Jamil Dierov, Raia Dierova, Martin Carroll, BCR/ABL translocates to the nucleus and disrupts an ATR-dependent intra-S phase checkpoint, *Canc. Cell* 5 (3) (mar.2004) 275–285, [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(04\)00056-x](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(04)00056-x). Elsevier BV.
- [37] Zheng-Lan Huang, Miao Gao, Qian-Yin Li, Kun Tao, Qing Xiao, Wei-Xi Cao, Wen-Li Feng, Induction of apoptosis by directing oncogenic Bcr-Abl into the nucleus, *Oncotarget* 4 (12) (10 out. 2013) 322–342, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1339>. Impact Journals, LLC.
- [38] Oliver Hantschel, Silke Wiesner, Thomas Güttler, Cameron D. Mackereth, Lily L. Rensing Rix, Zsuzsanna Mikes, Jana Dehne, Dirk Görlich, Michael Sattler, Superti-Furga, Giulio, Structural basis for the cytoskeletal association of bcr-abl/c-abl, *Mol. Cell* 19 (4) (2005) 461–473, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.06.030>. Elsevier BV.
- [39] Rickard Arvidsson, Max Boholm, Mikael Johansson, Monica Lindh de Montoya, “Just carbon”: ideas about graphene risks by graphene researchers and innovation advisors, *Nanoethics* 12 (3) (22 out. 2018) 199–210, <https://doi.org/10.1007/s11569-018-0324-y>. Springer Science and Business Media LLC.
- [40] L. Zhu, T. Wang, F. Perche, A. Taigind, V.P. Torchilin, Enhanced anticancer activity of nanopreparation containing an MMP2-sensitive PEG-drug conjugate and cell-penetrating moiety, *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 110 (42) (23 set. 2013) 17047–17052, <https://doi.org/10.1073/pnas.1304987110>. Proceedings of the National Academy of Sciences.
- [41] Nunzio, Di Mattia, Veronica Valli, Lidia Tomás-Cobos, Teresa Tomás-Chisbert, Lucía Murgui-Bosch, Francesca Danesi, Alessandra Bordini, Is cytotoxicity a determinant of the different in vitro and in vivo effects of bioactives? *BMC Compl. Alternative Med.* 17 (1) (7 set. 2017) 327–351, <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1962-2>. Springer Science and Business Media LLC.
- [42] Qiaojuan Jia, et al., A  $\gamma$ -cyclodextrin-based metal-organic framework embedded with graphene quantum dots and modified with PEGMA via SI-ATRP for anticancer drug delivery and therapy, *Nanoscale* 11 (2019) 20956–20967.

- [43] Julie Russier, et al., Few-layer graphene kills selectively tumor cells from myelomonocytic leukemia patients, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 56 (11) (2017 Mar 6) 3014–3019.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão deste trabalho encontra-se descrita no Artigo intitulado *Graphene Quantum Dots decorated with imatinib for leukemia treatment* publicado na *Journal of Drug Delivery Science and Technology* em 2020 de própria autoria.

## 6. CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que é possível realizar a conjugação do GQD ao imatinibe por meio da funcionalização do GQD com EDC e NHS. O GDQ@imatinibe preserva o tamanho médio, a segurança biológica e a capacidade de ser internalizado pelas células assim como o GQD isoladamente. Logo, o conjugado é capaz de induzir a morte de células leucêmicas com menor toxicidade quando comparado ao imatinibe.

Os estudos tem mostrado que o uso de nanopartículas de carbono como carreadores de fármacos tem apresentado eficiência no tratamento do câncer, pois contribuem no direcionamento dos fármacos ao seu alvo específico, bem como apresentam menos efeitos tóxicos nas células saudáveis. Logo, os dados apresentados neste trabalho mostram que o GQD decorado com imatinibe apresenta-se como uma nanopartícula promissora para o tratamento da leucemia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELKADER, A. M.; KINLOCH, I. A.; DRYFE, R. A. W. High-yield electro-oxidative preparation of graphene oxide. **Chem. Commun.**, v. 50, p. 8402–8404, 2014.

AHIRWAR, S.; MALLICK, S.; BAHADUR, D. Electrochemical Method to Prepare Graphene Quantum Dots and Graphene Oxide Quantum Dots. **ACS Omega**, v. 2, n. 11, p. 8343–8353, 2017.

ALADAĞ, E.; HAZNEDAROĞLU, İ. C. **Current perspectives for the treatment of chronic myeloid leukemia** *Turkish Journal of Medical Sciences*, 2019.

ALEMI, F. et al. **Graphene oxide and reduced graphene oxide: Efficient cargo platforms for cancer theranostics** *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2020.

AMIRI, M. et al. The magnetic inorganic-organic nanocomposite based on ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Imatinib-liposome for biomedical applications, in vivo and in vitro study. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 849, 2020.

ARNOLD, M. et al. Progress in cancer survival, mortality, and incidence in seven high-income countries 1995–2014 (ICBP SURVMARK-2): a population-based study. **The Lancet Oncology**, v. 20, n. 11, p. 1493–1505, 2019.

ATRAFI, F. et al. Intratumoral Comparison of Nanoparticle Entrapped Docetaxel (CPC634) with Conventional Docetaxel in Patients with Solid Tumors. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 26, n. 14, p. 3537–3545, 2020.

BACCARANI, M. et al. **European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013** *Blood*, 2013.

BAHREYNI, A. et al. Identification and imaging of leukemia cells using dual-aptamer-functionalized graphene oxide complex. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 32, n. 1, p. 74–81, 2017.

BALAJI, A.; ZHANG, J. **Electrochemical and optical biosensors for early-stage cancer diagnosis by using graphene and graphene oxide** *Cancer Nanotechnology*, 2017.

BANI-YASEEN, A. D. On the molecular properties of graphene-pyrazines conjugated Ru and Fe complexes: Computational insights. **Materials Today Communications**, n. July, p. 101694, 2020.

BANSAL, S. et al. Development of biosurfactant-based graphene quantum dot conjugate as a novel and fluorescent theranostic tool for cancer. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 809–818, 2019.

BARENHOLZ, Y. **Doxil® - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned** *Journal of Controlled Release*, 2012.

BENÍTEZ-MARTÍNEZ, S.; VALCÁRCEL, M. Fluorescent determination of graphene

quantum dots in water samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 896, p. 78–84, 2015.

BIANYING, F. et al. A graphene oxide-based fluorescent biosensor for the analysis of peptide-receptor interactions and imaging in somatostatin receptor subtype 2 overexpressed tumor cells. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 16, p. 7732–7737, 2013.

BLACKBURN, L. M.; BENDER, S.; BROWN, S. **Acute Leukemia: Diagnosis and Treatment Seminars in Oncology Nursing**, 2019.

BRAUN, T. P.; EIDE, C. A.; DRUKER, B. J. **Response and Resistance to BCR-ABL1-Targeted Therapies Cancer Cell**, 2020.

BRODIE, B. C. On the atomic weight of graphite. **Royal Society of London**, v. 149, p. 423–429, 1858.

CAPDEVILLE, R.; SILBERMAN, S. **Imatinib: A targeted clinical drug development**. Seminars in Hematology. **Anais...**2003

CAROFIGLIO, F. et al. **Bcr-abl tyrosine kinase inhibitors in the treatment of pediatric cml International Journal of Molecular Sciences**, 2020.

CAVALCANTI, I. D. L.; CAJUBÁ DE BRITTO LIRA NOGUEIRA, M. **Pharmaceutical nanotechnology: which products are been designed against COVID-19? Journal of Nanoparticle Research**, 2020.

CHALLAN, S. B.; MASSOUD, A. Radiolabeling of graphene oxide by Technetium-99m for infection imaging in rats. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 314, n. 3, p. 2189–2199, 2017.

CHEN, F. et al. Graphene quantum dots in biomedical applications: Recent advances and future challenges. **Frontiers in Laboratory Medicine**, v. 1, n. 4, 2017.

CHEN, J.; LI, L. Effect of oxidation degree on the thermal properties of graphene oxide. **Integrative Medicine Research**, v. 9, n. 6, p. 13740–13748, 2020.

CHERUKULA, K. et al. A targeted graphene nanoplatfom carrying histamine dihydrochloride for effective inhibition of leukemia-induced immunosuppression. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 29, n. 7–9, p. 734–749, 2018.

CHU, C. L. et al. Tyrosine kinase inhibitors modulate dendritic cell activity via confining c-Kit signaling and tryptophan metabolism. **International Immunopharmacology**, v. 82, 2020.

CHUNG, S.; REVIA, R. A.; ZHANG, M. **Graphene Quantum Dots and Their Applications in Bioimaging, Biosensing, and Therapy Advanced Materials**, 2019.

CI, L. Q. et al. Enhanced delivery of imatinib into vaginal mucosa via a new positively charged nanocrystal-loaded in situ hydrogel formulation for treatment of cervical cancer. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 1, 2019.

CORNELISSEN, B. et al. Nanographene oxide-based radioimmunoconstructs for in vivo targeting and SPECT imaging of HER2-positive tumors. **Biomaterials**, v. 34, n. 4, p. 1146–1154, 2013.

COVA, E. et al. **Efficacy of functionalized-imatinib loaded gold nanoparticles on lung fibroblastoid cells from systemic sclerosis patients**. 2016

CROSSNOHERE, N. L. et al. Side effects from acute myeloid leukemia treatment: results from a national survey. **Current Medical Research and Opinion**, v. 35, n. 11, p. 1965–1970, 2019.

CUZICK, J. et al. Use of anastrozole for breast cancer prevention (IBIS-II): long-term results of a randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 395, n. 10218, p. 117–122, 2020.

DAVIDS, M. S. et al. Comparative Efficacy of Acalabrutinib in Frontline Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia: a Systematic Review and Network Meta-analysis. **Clinical Therapeutics**, v. xxx, n. xxx, 2020.

DE MELO-DIOGO, D. et al. **Functionalization of graphene family nanomaterials for application in cancer therapy****Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2018.

DE MENEZES, F. D. et al. Graphene quantum dots unraveling: Green synthesis, characterization, radiolabeling with <sup>99m</sup>Tc, in vivo behavior and mutagenicity. **Materials Science and Engineering C**, v. 102, p. 405–414, 2019a.

DE MENEZES, F. D. et al. Graphene quantum dots unraveling: Green synthesis, characterization, radiolabeling with <sup>99m</sup>Tc, in vivo behavior and mutagenicity. **Materials Science and Engineering C**, v. 102, p. 405–414, 2019b.

DE SOUZA ALBERNAZ, M. et al. Decorated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Monoclonal Antibody and Diethylene-Triamine-Pentaacetic Acid Labeled with Technetium-99m and Gallium-68 for Breast Cancer Imaging. **Pharmaceutical Research**, v. 35, n. 1, 2018.

DOLATKHAH, M. et al. **Graphene-based multifunctional nanosystems for simultaneous detection and treatment of breast cancer****Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2020.

DONG, Y. et al. Blue luminescent graphene quantum dots and graphene oxide prepared by tuning the carbonization degree of citric acid. **Carbon**, v. 50, n. 12, p. 4738–4743, 2012.

DONG, Y. et al. Leukemia incidence trends at the global, regional, and national level between 1990 and 2017. **Experimental Hematology and Oncology**, v. 9, n. 1, 2020.

DOUDA, J. et al. Optical properties of amine-functionalized graphene oxide. **Applied Nanoscience (Switzerland)**, v. 9, n. 4, p. 567–578, 2019.

DREYER, D. R. et al. **The chemistry of graphene oxide****Chemical Society Reviews**, 2010.

ECKHART, K. E. et al. Covalent conjugation of bioactive peptides to graphene oxide for biomedical applications. **Biomaterials Science**, 2019.

ERCALISKAN, A.; ESKAZAN, A. E. Bosutinib – an effective and safe treatment option in the management of chronic myeloid leukemia. **Future Oncology**, v. 16, n.

3, p. 4425–4428, 2020.

FAN, H. et al. Graphene quantum dots ( GQDs ) -based nanomaterials for improving photodynamic therapy in cancer treatment. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 182, p. 111620, 2019.

FANG, J. et al. Graphene quantum dots-gated hollow mesoporous carbon nanoplatform for targeting drug delivery and synergistic chemo-photothermal therapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 5991–6007, 2018.

FARES, J. E. et al. **Metronomic chemotherapy for patients with metastatic breast cancer: Review of effectiveness and potential use during pandemics***Cancer Treatment Reviews*, 2020.

FARMER, J. R. **Testing Immune-Related Adverse Events in Cancer Immunotherapy***Clinics in Laboratory Medicine*, 2019.

FAZAELI, Y. et al. In vivo SPECT imaging of tumors by  $^{198,199}\text{Au}$ -labeled graphene oxide nanostructures. **Materials Science and Engineering C**, v. 45, p. 196–204, 2014.

FELIX, D. M. et al. Graphene quantum dots decorated with imatinib for leukemia treatment. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, p. 1–7, 2020.

FIORILLO, M. et al. Graphene oxide selectively targets cancer stem cells, across multiple tumor types: Implications for non-toxic cancer treatment, via “differentiation-based nano-therapy”. **Oncotarget**, v. 6, n. 6, p. 3553–3562, 2015.

FITZMAURICE, C. et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. **JAMA oncology**, v. 4, n. 11, p. 1553–1568, 2018.

FU, J. et al. Covalent Functionalization of Graphene Oxide with a Presynthesized Metal–Organic Framework Enables a Highly Stable Electrochemical Sensing. **ACS Applied Materials & Interfaces**, p. acsami.9b10531, 29 ago. 2019.

FU, L. et al. An ultra-long circulating nanoparticle for reviving a highly selective BCR-ABL inhibitor in long-term effective and safe treatment of chronic myeloid leukemia. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 29, 2020.

GANGANBOINA, A. B.; DOONG, R.-A. Graphene Quantum Dots Decorated Gold-Polyaniline Nanowire for Impedimetric Detection of Carcinoembryonic Antigen. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 7214, 2019.

GARCÍA-FERRER, M. et al. **Utility of Therapeutic Drug Monitoring of Imatinib, Nilotinib, and Dasatinib in Chronic Myeloid Leukemia: A Systematic Review and Meta-analysis***Clinical Therapeutics*, 2019.

GARCÍA-GUTIÉRREZ, V.; HERNÁNDEZ-BOLUDA, J. C. Tyrosine Kinase Inhibitors Available for Chronic Myeloid Leukemia: Efficacy and Safety. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. July, p. 1–10, 2019.

GUO, H. L. et al. A green approach to the synthesis of graphene nanosheets. **ACS**



**Nano**, v. 3, n. 9, p. 2653–2659, 2009.

GURUNATHAN, S. et al. Differential Immunomodulatory Effect of Graphene Oxide and Vanillin-Functionalized Graphene Oxide Nanoparticles in Human Acute Monocytic Leukemia Cell Line (THP-1). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, p. 247, 2019.

HARRIS, M. H.; CZUCHLEWSKI, D. R.; ARBER, DANIEL A CZADER, M. Genetic Testing in the Diagnosis and Biology of Acute Leukemia. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 152, n. 3, p. 322–346, 2019.

HAVANUR, S. et al. Poly(N,N-diethyl acrylamide)/functionalized graphene quantum dots hydrogels loaded with doxorubicin as a nano-drug carrier for metastatic lung cancer in mice. **Materials Science and Engineering C**, v. 105, 2019.

HE, X. et al. Mechanism of Controlled Release of Vancomycin from Crumpled Graphene Oxides. **ACS Omega**, v. 4, n. 7, p. 12252–12258, 2019.

HONG, H. et al. In vivo targeting and positron emission tomography imaging of tumor vasculature with <sup>66</sup>Ga-labeled nano-graphene. **Biomaterials**, v. 33, n. 16, p. 4147–4156, 2012.

HUANG, B. et al. Apoptosis induction and imaging of cadmium-telluride quantum dots with wogonin in multidrug-resistant leukemia K562/A02 cell. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, n. 3, p. 2499–2503, 2016.

HUANG, C. et al. Tailored graphene oxide-doxorubicin nanovehicles via near-infrared dye-lactobionic acid conjugates for chemo-photothermal therapy. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 545, p. 172–183, 2019.

HUANG, H. et al. Electrochemical Cutting in Weak Aqueous Electrolytes: The Strategy for Efficient and Controllable Preparation of Graphene Quantum Dots. **Langmuir**, v. 34, n. 1, 2018.

HUANG, J. J.; RONG, M. Z.; ZHANG, M. Q. Preparation of graphene oxide and polymer-like quantum dots and their one- and two-photon induced fluorescence properties. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, n. 6, p. 4800–4806, 2016.

HUMMERS, W. S.; OFFEMAN, R. E. Preparation of Graphitic Oxide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 6, p. 1339, 1958.

INCA. Incidência de câncer no Brasil: Estimativa 2020. **Instituto Nacional de Câncer (INCA)**, v. 5, n. 2, p. 1–122, 2019.

IQBAL, N.; IQBAL, N. Imatinib: A Breakthrough of Targeted Therapy in Cancer. **Chemotherapy Research and Practice**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

IRAVANI, S.; VARMA, R. S. **Green synthesis, biomedical and biotechnological applications of carbon and graphene quantum dots. A review** **Environmental Chemistry Letters**, 2020.

J.D., S. Applying molecular epidemiology in pediatric leukemia. **Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research**, v. 64, n. 2, p. 355–360, 2016.

JABBOUR, E.; KANTARJIAN, H. Chronic myeloid leukemia: 2020 update on diagnosis, therapy and monitoring. **American Journal of Hematology**, v. 95, n. 6, p. 691–709, 2020.

JEEVANANDAM, J. et al. **Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations** *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 2018.

JIA, Q. et al. A  $\gamma$ -cyclodextrin-based metal-organic framework embedded with graphene quantum dots and modified with PEGMA: Via SI-ATRP for anticancer drug delivery and therapy. **Nanoscale**, v. 11, n. 43, p. 20956–20967, 2019.

JIANG, D. W. et al. Study on technetium-99m labeling of graphene oxide nanosheets through click chemistry-99mTc labeling of graphene oxide nanosheets. **Nuclear Science and Techniques**, v. 26, n. 4, 2015.

JIN, Y. et al. Anti-leukemia activities of selenium nanoparticles embedded in nanotube consisted of triple-helix  $\beta$ -D-glucan. **Carbohydrate Polymers**, v. 240, 2020.

JIN, Z.; SHENG, J.; SUN, Y. Characterization of radioactive cobalt on graphene oxide by macroscopic and spectroscopic techniques. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 299, n. 3, p. 1979–1986, 2014.

JOSE, A. et al. Temperature-sensitive liposomes for co-delivery of tamoxifen and imatinib for synergistic breast cancer treatment. **Journal of Liposome Research**, v. 29, n. 2, p. 153–162, 2019.

KAKAJE, A. et al. Rates and trends of childhood acute lymphoblastic leukaemia: an epidemiology study. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020.

KANTARJIAN, H. M.; TALPAZ, M. **Imatinib mesylate: Clinical results in Philadelphia chromosome-positive leukemias** *Seminars in Oncology*, 2001.

KHOSHFETRAT, S. M.; MEHRGARDI, M. A. Amplified detection of leukemia cancer cells using an aptamer-conjugated gold-coated magnetic nanoparticles on a nitrogen-doped graphene modified electrode. **Bioelectrochemistry**, v. 114, p. 24–32, 2017.

KUMAR, D.; RANI, S. Synthesis of Amide Functionalized Graphene Oxide for Humidity Sensing Application ( Amide Functionalized Graphene Oxide for Humidity Sensing ). **SENSORDEVICES 2015: The Sixth International Conference on Sensor Device Technologies and Applications Synthesis**, n. c, p. 142–145, 2015.

KUMAR, Y. R. et al. **Graphene quantum dot based materials for sensing, bio-imaging and energy storage applications: a review** *RSC Advances*, 2020.

LAWAL, A. T. **Graphene-based nano composites and their applications. A review** *Biosensors and Bioelectronics*, 2019.

LE CESNE, A. et al. LENVAGIST - A multicenter, comparative, placebo-controlled, double-blinded, phase II study of the efficacy of lenvatinib in patients with locally advanced or metastatic GIST after failure of imatinib and sunitinib. **Journal of Clinical Oncology**, v. 38, n. 15\_suppl, p. TPS11568-TPS11568, 2020.

LI, Q. et al. Rapid evaporation of water on graphene/graphene-oxide: A molecular dynamics study. **Nanomaterials**, v. 7, n. 9, 2017.

LI, Y.; YANG, B.; ZHANG, X. Oral delivery of imatinib through galactosylated polymeric nanoparticles to explore the contribution of a saccharide ligand to absorption. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 568, 2019.

LI, Z. et al. Biodistribution of co-exposure to multi-walled carbon nanotubes and graphene oxide nanoplatelets radiotracers. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, n. 7, p. 2939–2947, 2011.

LIAKOULI, V. et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in systemic sclerosis. A systematic review and meta-analysis. **Expert Review of Clinical Immunology**, 2020.

LIGHTFOOT, T.; SMITH, A.; ROMAN, E. Leukemia. **International Encyclopedia of Public Health**, v. 43, p. 410–418, 2016.

LIN, C. W. et al. A reusable magnetic graphene oxide-modified biosensor for vascular endothelial growth factor detection in cancer diagnosis. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 67, p. 431–437, 2015.

LIN, J.; CHEN, X.; HUANG, P. **Graphene-based nanomaterials for bioimaging** **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2016.

LIU, C. et al. A novel pH-responsive electrochemiluminescence immunosensor for ALV-J detection based on hollow MnO<sub>2</sub> encapsulating Ru(bpy)<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 118, p. 167–173, 2018.

LIU, J. et al. Surface Functionalization with Polyethylene Glycol and Polyethyleneimine Improves the Performance of Graphene-Based Materials for Safe and Efficient Intracellular Delivery by. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, p. 1–16, 2020.

LIU, N.; TANG, M. **Toxicity of different types of quantum dots to mammalian cells in vitro: An update review** **Journal of Hazardous Materials**, 2020.

LUCHERELLI, M. A. et al. Rational Chemical Multifunctionalization of Graphene Interface Enhances Targeted Cancer Therapy. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 59, n. 33, p. 14034–14039, 2020.

MA, H.; LV, H.; WANG, X. Optik Fluorescent property regulation of dyes in graphene-doped polymer films. **Optik**, v. 223, n. September, p. 165567, 2020.

MALEKI, A.; HAJIZADEH, Z.; ABBASI, H. Surface modification of graphene oxide by citric acid and its application as a heterogeneous nanocatalyst in organic condensation reaction. **Carbon Letters**, v. 27, n. 1, p. 42–49, 2018.

MANSURIYA, B. D.; ALTINTAS, Z. **Applications of graphene quantum dots in biomedical sensors** **Sensors (Switzerland)**, 2020.

MAURI, G. et al. Oxaliplatin retreatment in metastatic colorectal cancer: Systematic review and future research opportunities. **Cancer Treatment Reviews**, v. 91, n. August, p. 102112, 2020.

MILLER, K. D. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 69, n. 5, p. 363–385, 2019.

MIRANDA-FILHO, A. et al. Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: a population-based study. **The Lancet Haematology**, v. 5, n. 1, p. e14–e24, 2018.

MOLICA, M. et al. Ten-year outcome of chronic-phase chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib in real life. **Annals of Hematology**, 2019.

NASROLLAHI, F. et al. Targeting graphene quantum dots to epidermal growth factor receptor for delivery of cisplatin and cellular imaging. **Materials Science and Engineering C**, v. 94, p. 247–257, 2019.

NOVODCHUK, I.; BAJCSY, M.; YAVUZ, M. Graphene-Based Field Effect Transistor Biosensors for Breast Cancer Detection: A Review on Biosensing Strategies. **Carbon**, 2020.

OH, B.; LEE, C. H. Development of Thiolated-Graphene Quantum Dots for Regulation of ROS in macrophages. **Pharmaceutical Research**, v. 33, n. 11, p. 2736–2747, 2016.

PATTNAIK, S.; SWAIN, K.; LIN, Z. **Graphene and graphene-based nanocomposites: biomedical applications and biosafety** *Journal of Materials Chemistry B*, 2016.

PAUL, S.; MAHANTA, S. Preparation and Characterization of Self-Assembled Graphene Oxide Supramolecular Structures. **Journal of Medical and Bioengineering**, v. 4, n. 6, p. 480–483, 2015.

PENG, B. et al. Absolute Bioavailability of Imatinib (Glivec®) Orally versus Intravenous Infusion. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 44, n. 2, p. 158–162, 2004.

PENG, B.; LLOYD, P.; SCHRAN, H. **Clinical pharmacokinetics of imatinib** *Clinical Pharmacokinetics*, 2005.

PENG, E.; TODOROVA, N.; YAROVSKY, I. Effects of Size and Functionalization on the Structure and Properties of Graphene Oxide Nanoflakes: An in Silico Investigation. **ACS Omega**, v. 3, n. 9, p. 11497–11503, 2018.

PONIATOWSKA, A.; TRZASKOWSKI, M.; CIACH, T. Production and properties of top-down and bottom-up graphene oxide. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 561, p. 315–324, 2019.

PRICE, R. J. et al. A novel “bottom-up” synthesis of few- and multi-layer graphene platelets with partial oxidation via cavitation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 56, p. 466–473, 2019.

RAFEI, H.; KANTARJIAN, H. M.; JABBOUR, E. J. **Recent advances in the treatment of acute lymphoblastic leukemia** *Leukemia and Lymphoma*, 2019.

RAFEI, H.; KANTARJIAN, H. M.; JABBOUR, E. J. **Targeted therapy paves the way for the cure of acute lymphoblastic leukaemia** *British Journal of Haematology*, 2020.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, C. et al. Green synthesis of nanosilver-decorated graphene oxide sheets. **IET Nanobiotechnology**, v. 10, n. 5, p. 301–307, 2016.

RUSSIER, J. et al. Few-Layer Graphene Kills Selectively Tumor Cells from Myelomonocytic Leukemia Patients. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 56, n. 11, p. 3014–3019, 2017.

S., R.-R. et al. Cost-effectiveness of the regimen proposed by the international consortium on acute promyelocytic leukemia in the treatment of newly diagnosed patients with acute promyelocytic leukemia. **Blood**, v. 130, n. Supplement 1, 2020.

SÁNCHEZ-CORONILLA, A. et al. Theoretical study on the interactions between ibrutinib and gold nanoparticles for being used as drug delivery in the chronic lymphocytic leukemia. **Journal of Molecular Liquids**, v. 316, 2020.

SANTUCCI, C. et al. Progress in cancer mortality, incidence, and survival: A global overview. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 29, n. 5, p. 367–381, 2020.

SHALLIS, R. M. et al. **Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges** *Blood Reviews*, 2019.

SHAMSIPUR, M. et al. Determination of cDNA encoding BCR/ABL fusion gene in patients with chronic myelogenous leukemia using a novel FRET-based quantum dots-DNA nanosensor. **Analytica Chimica Acta**, v. 966, p. 62–70, 2017.

SHAMSIPUR, M. et al. Dual-modal label-free genosensor based on hemoglobin@gold nanocluster stabilized graphene nanosheets for the electrochemical detection of BCR/ABL fusion gene. **Talanta**, v. 217, 2020.

SHANDIZ, S. A. S. et al. Evaluation of imatinib mesylate (Gleevec) on KAI1/CD82 gene expression in breast cancer MCF-7 cells using quantitative real-time PCR. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 2, p. 159–163, 2016.

SHENG, S. et al. Facile assembly of graphene on anion exchange resin microspheres for electrochemical sensing and biosensing. **Chemistry - An Asian Journal**, v. 8, n. 1, p. 191–197, 2013.

SHEPHARD, E. A. et al. Symptoms of adult chronic and acute leukaemia before diagnosis: Large primary care case-control studies using electronic records. **British Journal of General Practice**, v. 66, n. 644, p. e182–e188, 2016.

SHI, L. et al. Preparation, characterization, and in vitro drug release behavior of glutathione-sensitive long-circulation micelles based on polyethylene glycol prodrug. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 27, n. 6, p. 472–489, 2016.

SHIBATA, N. et al. Development of a Potent Protein Degradator against Oncogenic BCR-ABL Protein. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 67, n. 3, p. 165–172, 2019.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics of American 2019. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 69, n. 1, p. 7–34, 2019.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2020. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 70, n. 1, p. 7–30, 2020.

SILVA, A. L. et al. Acute lymphoid and myeloid leukemia in a Brazilian Amazon population: Epidemiology and predictors of comorbidity and deaths. **PLoS ONE**, v. 14, n. 8, 2019.

SINGH, A. P. et al. Cardiotoxicity of the BCR-ABL1 tyrosine kinase inhibitors: Emphasis on ponatinib. **International Journal of Cardiology**, v. 316, p. 214–221, 2020.

SINGH, D. P. et al. **Graphene oxide: An efficient material and recent approach for biotechnological and biomedical applications** **Materials Science and Engineering C**, 2018.

SOBIERAJSKA, P. et al. Nanohydroxyapatite-mediated imatinib delivery for specific anticancer applications. **Molecules**, v. 25, n. 20, 2020.

SONI, G.; YADAV, K. S. **Applications of nanoparticles in treatment and diagnosis of leukemia** **Materials Science and Engineering C**, 2015.

STAUDENMAIER, L. Verfahren zur Darstellung der Graphitsäure. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 32, n. 2, p. 1394–1399, 1899.

STEEGMANN, J. L. et al. **European LeukemiaNet recommendations for the management and avoidance of adverse events of treatment in chronic myeloid leukaemia** **Leukemia**, 2016.

STRATMANN, J. A. et al. Clinical and genetic characterization of de novo double-hit B cell precursor leukemia/lymphoma. **Annals of Hematology**, v. 98, n. 3, p. 647–656, 2019.

TABISH, T. A. et al. Graphene oxide-based targeting of extracellular cathepsin D and Cathepsin L as A Novel anti-metastatic enzyme cancer therapy. **Cancers**, v. 11, n. 3, 2019.

TADYSZAK, K.; WYCHOWANIEC, J. K.; LITOWCZENKO, J. **Biomedical applications of graphene-based structures** **Nanomaterials**, 2018.

TAJIK, S. et al. **Carbon and graphene quantum dots: A review on syntheses, characterization, biological and sensing applications for neurotransmitter determination** **RSC Advances**, 2020.

TAN, J. et al. A Graphene Oxide-Based Fluorescent Aptasensor for the Turn-on Detection of CCRF-CEM. **Nanoscale Research Letters**, v. 13, 2018.

TANG, X. et al. The role of electrostatic potential polarization in the translocation of graphene quantum dots across membranes. **Nanoscale**, v. 12, n. 4, p. 2732–2739, 2020.

TATAR, A. S. et al. **Nanomedicine approaches in acute lymphoblastic leukemia** **Journal of Controlled Release**, 2016.

TIAN, P. et al. Graphene quantum dots from chemistry to applications. **Materials Today Chemistry**, v. 10, 2018.

TIWARI, H. et al. Functionalized graphene oxide as a nanocarrier for dual drug

delivery applications: The synergistic effect of quercetin and gefitinib against ovarian cancer cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 178, p. 452–459, 2019.

TYSON, J. A. et al. Labeling of Graphene, Graphene Oxides, and of Their Congeners: Imaging and Biosensing Applications of Relevance to Cancer Theranostics. In: **Advances in Inorganic Chemistry**. [s.l: s.n.]. v. 68p. 397–440.

UNTCH, M. et al. Nab-paclitaxel versus solvent-based paclitaxel in neoadjuvant chemotherapy for early breast cancer (GeparSepto-GBG 69): A randomised, phase 3 trial. **The Lancet Oncology**, v. 17, n. 3, p. 345–356, 2016.

VARGIS, V. S. et al. Gold nanoparticles decorated reduced graphene oxide nanolabel for voltammetric immunosensing. **IET Nanobiotechnology**, v. 13, n. 2, p. 107–113, 2018.

WISEU, T. et al. **A systematic review and critical analysis of the role of graphene-based nanomaterials in cancer theranostics** **Pharmaceutics**, 2018.

WANG-GILLAM, A. et al. NAPOLI-1 phase 3 study of liposomal irinotecan in metastatic pancreatic cancer: Final overall survival analysis and characteristics of long-term survivors. **European Journal of Cancer**, v. 108, p. 78–87, 2019.

WANG, J. J.; LEI, K. F.; HAN, F. Tumor microenvironment: Recent advances in various cancer treatments. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 12, p. 3855–3864, 2018.

WANG, S. et al. Structural evolution of graphene quantum dots during thermal decomposition of citric acid and the corresponding photoluminescence. **Carbon**, v. 82, n. C, p. 304–313, 2015.

WHO. **Cancer Country Profile 2020 Brazil** **World Health Organization (WHO)**. [s.l: s.n.].

WHO, W. H. O. **Global & Regional Profile**. [s.l: s.n.].

WU, Q. et al. Graphene quantum dots functionalized  $\beta$ -cyclodextrin and cellulose chiral stationary phases with enhanced enantioseparation performance. **Journal of Chromatography A**, p. 1–33, 2019.

WU, X. et al. Highly sensitive recognition of cancer cells by electrochemical biosensor based on the interface of gold nanoparticles/poly lactide nanocomposites. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 656, n. 1–2, p. 174–178, 2011.

XUE, C.; GAO, H.; HU, G. Viscoelastic and fatigue properties of graphene and carbon black hybrid structure filled natural rubber composites under alternating loading. **Construction and Building Materials**, v. 265, p. 120299, 2020.

XUE, Z. et al. Graphene quantum dot assisted translocation of drugs into a cell membrane. **Nanoscale**, v. 11, n. 10, p. 1–29, 2019.

YANG, J.; ZHANG, W. Indicator-free impedimetric detection of BCR/ABL fusion gene based on ordered FePt nanoparticle-decorated electrochemically reduced graphene oxide. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 18, n. 10, p. 2863–2868, 2014.

YANG, L. et al. A hollow-structured nanohybrid: Intelligent and visible drug delivery and photothermal therapy for cancer. **Talanta**, v. 215, 2020.

YANG, Z.; SHAO, D.; ZHOU, G. Solubility profile of imatinib in pure and mixed solvents and calculation of thermodynamic properties. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 144, 2020.

YAO, X. et al. Mesoporous silica nanoparticles capped with graphene quantum dots for potential chemo-photothermal synergistic cancer therapy. **Langmuir**, v. 33, n. 2, p. 591–599, 2017.

YAZDI, M. K.; GHAZIZADEH, E.; NESHASTEHRIZ, A. Different liposome patterns to detection of acute leukemia based on electrochemical cell sensor. **Analytica Chimica Acta**, v. 1109, p. 122–129, 2020.

YOO, J. M.; KANG, J. H.; HONG, B. H. **Graphene-based nanomaterials for versatile imaging studies** *Chemical Society Reviews*, 2015.

YU, Y. et al. Highly sensitive detection of leukemia cells based on aptamer and quantum dots. **Oncology Reports**, v. 36, n. 2, p. 886–892, 2016.

ZAIMY, M. A. et al. **New methods in the diagnosis of cancer and gene therapy of cancer based on nanoparticles** *Cancer Gene Therapy*, 2017.

ZHANG, M. et al. Graphene oxide based theranostic platform for T 1-weighted magnetic resonance imaging and drug delivery. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 5, n. 24, p. 13325–13332, 2013a.

ZHANG, S. et al. An efficient nanomaterial-based electrochemical biosensor for sensitive recognition of drug-resistant leukemia cells. **Analyst**, v. 139, n. 14, p. 3629–3635, 2013b.

ZHANG, X. et al. Two-Dimensional Graphene Family Material: Assembly, Biocompatibility and Sensors Applications. **Sensors**, v. 19, n. 13, p. 2966, 2019.

ZHAO, C. et al. **Synthesis of graphene quantum dots and their applications in drug delivery**. [s.l: s.n.].

ZHOU, H. et al. The inhibition of migration and invasion of cancer cells by graphene via the impairment of mitochondrial respiration. **Biomaterials**, v. 35, n. 5, p. 1597–1607, 2014.

ZUGAZAGOITIA, J. et al. **Current Challenges in Cancer Treatment** *Clinical Therapeutics*, 2016.