



Avaliação in vitro da toxicidade e aplicabilidade de Nanopartículas de Carbono em Terapia Fotodinâmica (PDT)

SABELA RODRIGUEZ REINO

Julho de 2021

**Avaliação *in vitro* da toxicidade e aplicabilidade de
Nanopartículas de Carbono em Terapia Fotodinâmica (PDT)**

***In vitro* evaluation of the toxicity of Carbon Nanoparticles and
its potential application in photodynamic therapy (PDT)**

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em
Engenharia Química, ramo opcional Qualidade

Sabela Rodríguez Reino (número de aluno: 1192156)

Orientadores:

Abel José Duarte - Professor Adjunto / Investigador ISEP ajd@isep.ipp.pt

Helena M. R. Gonçalves – Investigadora REQUIMTE/ISEP helenardrgs@gmail.com

Susana G. Guerreiro – Investigadora I3S/FMUP scgomes@med.up.pt

12/07/2021

Agradecimentos

O desenvolvimento deste projeto só foi possível com o apoio de diversas pessoas, que me apoiaram ao longo do processo e contribuíram direta e indiretamente para a boa execução do mesmo.

Em primeiro lugar, quero agradecer à doutora Helena Rodrigues Gonçalves, por crer e confiar na minha valia para desenvolver este trabalho, transmitindo-me todos os seus conhecimentos e esclarecendo todas as minhas dúvidas até o fim. E também pela sua disponibilidade, entrega, orientação e sobre tudo, pela sua amizade incondicional.

Também quero agradecer ao doutor Abel Duarte, por acolher-me baixo a sua supervisão quando cheguei ao ISEP e sempre transmitir-me o seu apoio, orientação e conhecimento científico e por todo o seu trabalho de revisão da tese.

À doutora Susana Guerreiro, por permitir-me trabalhar com ela e fazer tudo o possível para que me sentisse acolhida na FMUP. Por transmitir-me os seus conhecimentos, ensinar-me as técnicas de cultura celular e por todos os seus conselhos a nível pessoal.

À Susana Neves, pelo apoio dentro e fora das aulas e do laboratório. Por mostrar-me todo o bonito do Porto e acompanhar-me nesta aventura.

Aos meus pais pelo apoio em todas as etapas da minha vida, pelo apoio financeiro e o amor incondicional, por ser faro nos momentos mais duros e celebrar todas as conquistas como se fossem próprias. Sem eles, nem este trabalho nem este mestrado teriam sido possíveis.

Ao meu namorado, Daniel, por acompanhar-me neste percurso longo que é a vida, por remar comigo tanto nos dias bons como nos maus. Pela compreensão e apoio durante o transcurso deste mestrado.

A todos os professores, companheiros de aulas e de bancadas de laboratório, pela ajuda, compreensão, apoio e incentivo. Por nunca deixar que me sentisse só mesmo em terras alheias.

Este trabalho recebeu apoio financeiro de Fundos Nacionais (FCT, Fundação para a Ciência e Tecnologia) através do projeto PTDC/BTM-MAT/30858/2017 – NORTE-01-0145-FEDER-030858.

Resumo

As nanopartículas de carbono Carbon dots (Cdots) são nanopartículas esféricas que consistem num núcleo de carbono sp^2/sp^3 estabilizado por grupos como ácidos carboxílicos, álcoois e cetonas na sua superfície. As suas propriedades eletrónicas permitem-lhes atuar como doadores e recetores de electrões, tornando-os num material versátil, com aplicações em biomedicina, optoelectrónica, sensores e fotocatalise. Esta dissertação tem como principal objetivo avaliar a biocompatibilidade dos nanoflúidos não-Newtonianos baseados em Cdots. Estes foram obtidos a partir de diferentes fontes de carbono (glucose, quitina e fibroína) e funcionalizados *in situ* com duas moléculas, cloreto de 1-butil-3-metillimidazolio [Bmim] e triflato de 1-tosilato-3-metil-imidazólio [Tmi] [Trif], também designado por IL1. De forma a atingir este objetivo testaram-se os nanoflúidos em diferentes linhas celulares humanas e avaliou-se a sua potencial aplicabilidade na terapia fotodinâmica. Deste modo, avaliou-se a citotoxicidade *in vitro* em linhas celulares humanas que mimetizam a pele, como fibroblastos e células endoteliais, e numa linha celular que mimetiza o comportamento do cancro da mama. As células foram sujeitas a tratamentos com diferentes concentrações de nanoflúidos baseados em Cdots na ausência e presença de irradiação com luz UV-A para estudar o seu efeito na viabilidade celular, na proliferação celular e na migração celular. No ensaio de viabilidade celular verificou-se uma estimulação da viabilidade celular quando o tratamento com os Cdots é aplicado, sendo o efeito muito marcado na linha celular de cancro da mama. Por outro lado, nos ensaios de proliferação celular observou-se uma diminuição da proliferação celular na presença dos Cdots, havendo um efeito mais marcado do tratamento na ausência de luz negra UV-A. Por último, no ensaio de migração observou-se uma diminuição da migração dos fibroblastos, das células endoteliais e das células de cancro da mama quando sujeitas a um tratamento com 0,2mg/mL com Cdots. Concluiu-se que os Cdots na ausência e presença de luz UV induziram um efeito diferente nas células. Também se concluiu que a concentração de 0,2 mg/mL era a mais favorável devido possivelmente uma melhor dispersibilidade das nanopartículas.

Palavras-chave: nanopartículas, Cdots, citotoxicidade, viabilidade, migração, proliferação, fibroblastos, angiogénese, cancro da mama, fotoluminescência, ROS, UV-A, PDT.

Abstract

Carbon nanoparticles, Carbon dots (Cdots), are spherical nanoparticles that consist of a sp^2/sp^3 carbon nucleus stabilized by surface groups, such as, carboxylic acids, alcohols and ketones. Their electronic properties allow them to act as electron donors and receivers, making them a versatile material, with applications in biomedicine, optoelectronics, sensors and photocatalysis. The main objective of this dissertation is to evaluate the biocompatibility of non-Newtonian nanofluids based on Cdots. The Cdots were obtained from different carbon sources (glucose, chitin and fibroin) and functionalized *in situ* with two molecules, 1-butyl-3-methylimidazolium chloride [Bmim] and 1-tosylate-3-methyl-imidazolium triflate [Tmi] [Trif], also called IL1. In order to achieve this goal, nanofluids were tested in different human cell lines and their potential applicability in photodynamic therapy was evaluated. Thus, *in vitro* cytotoxicity was evaluated in human cell lines that mimic the skin, such as fibroblasts and endothelial cells, and in a cell line that mimics the behavior of breast cancer. The cells were subjected to treatments with different concentrations of nanofluids based on Cdots in the absence and presence of UV light irradiation to study its effect on cell viability, cell proliferation and cell migration. In the cell viability assay, there was a stimulation of cell viability when treatment with Cdots is applied, the effect being very marked in the breast cancer cell line. On the other hand, cell proliferation assays showed a decrease in cell proliferation in the presence of Cdots, with a more marked effect of the treatment in the absence of UV-A black light. Finally, in the migration assay a decrease in migration of fibroblasts, endothelial cells and breast cancer cells was observed when subjected to a treatment with 0.2mg/ml with Cdots. It was concluded that Cdots in the absence and presence of UV light induced a different effect on cells. It was also concluded that the concentration of 0.2 mg/ml was the most favorable, possibly due to a better dispersibility of the nanoparticles.

Keywords: nanoparticles, Cdots, cytotoxicity, viability, migration, proliferation fibroblasts, angiogenesis, breast cancer, photoluminescence, ROS, UV-A, PDT.

Locais de trabalho

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Biomedicina, unidade de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (FMUP), sob orientação de Susana G. Guerreiro e no Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), sob orientação de Abel José Duarte e Helena M. R. Gonçalves. As partículas de carbono utilizadas em todos os ensaios foram sintetizadas e purificadas por Helena M. R. Gonçalves na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD) e fornecidas para a sua caracterização e avaliação nos ensaios *in vitro*.

Índice

Agradecimentos	2
Resumo	3
Abstract.....	4
Locais de trabalho	5
Lista de figuras	9
Capítulo 1 - Introdução “Carbon dots: métodos de síntese, potencial uso e avaliação da sua toxicidade”	14
1.1 Características e aplicações dos Carbon dots	14
1.2 Ensaio de biocompatibilidade de Cdots.....	19
1.3 Aplicação à Imagiologia.....	21
1.4 O cancro da mama e a terapia fotodinâmica	23
Capítulo 1.5 - “Caracterização das nanopartículas de carbono utilizadas”	25
Capítulo 2 - Materiais e métodos	27
2.1 Preparação dos nanoflúidos	27
2.2 Caracterização dos nanoflúidos	28
2.2.1 Espectro de absorção e emissão	28
2.2.2 Potencial Zeta	28
2.2.3 Condutividade e viscosidade.....	29
2.2.4 TEM de alta resolução.....	29
2.2.5 AFM	29
2.3 Cultura de células humanas	29
2.3.1 Cultura de fibroblastos	29
2.3.2 Cultura de células endoteliais.....	30
2.3.3 Cultura de células de cancro da mama	30
2.3.4 Preparação das culturas celulares para os ensaios <i>in vitro</i>	30
2.3.5 Tratamento com luz UV	30
2.4. Ensaio de Viabilidade celular.....	31
2.5 Ensaio de proliferação celular.....	32
2.6. Ensaio de migração celular.....	33
Capítulo 3 - Resultados	34
3.1 Caracterização dos nanoflúidos	34
3.1.1 Resultados de potencial Zeta.....	34
3.1.2 Resultados de condutividade e viscosidade.....	34
3.1.3 Resultados caracterização da superfície dos Cdots (HRTEM, AFM)	36
3.2 Efeito dos Cdots nos ensaios de viabilidade celular	39

3.3 Efeito dos Cdots nos ensaios de proliferação celular	41
3.4 Efeito dos Cdots nos ensaios de migração celular	44
3.4.1 Efeito dos CdotsBmim nos ensaios de migração celular.....	45
3.4.2 Efeito dos CdotsGlu nos ensaios de migração celular.....	46
3.4.3 Efeito dos CdotsChi nos ensaios de migração celular.....	47
3.4.4 Efeito dos CdotsChitotal nos ensaios de migração celular.....	48
3.4.5 Efeito dos CdotsCocoon nos ensaios de migração celular	49
Capítulo 4 - Discussão	50
Capítulo 5 - Conclusão	54
Capítulo 6 - Perspetivas futuras.....	54
Capítulo 7 - Referências.....	56

Lista de figuras

Figura 1.1. Propriedades e métodos de síntese dos Cdots	15
Figura 1.2. Resultados de imagiologia de fluorescência in vivo com Cdots modificados com PEG injetados subcutaneamente em ratos [2]	22
Figura 1.3. Cdots combinados com hemoglobina usados como biossensores na detecção de colesterol [18]	23
Figura 1.4. Esquema da aplicação de Cdots para teranóstica do cancro da mama [21] .	24
Figura 2.1. Esquema da síntese dos nanoflúidos CdotsChi, CdotsGlu e CdotsCocoon [31]	27
Figura 2.2. Radiação UV de fibroblastos (HDF) antes do ensaio de viabilidade celular	31
Figura 2.3. Estrutura química do reagente MTS e o produto de Formazan [32].....	31
Figura 2.4. Estrutura química do BrdU [35].....	32
Figura 2.5. Ensaio de migração celular em fibroblastos tratados com CdotsChi 0,5 mg/mL e submetidos a radiação UV correspondentes às 0 horas (A), 6 horas (B) e 16 horas (C) pós tratamento.....	33
Figura 3.1. Condutividade em função da temperatura em CdotsBmim, CdotsGlu, CdotsChi e CdotsCocoon	36
Figura 3.2. Imagens de HRTEM da esquerda para a direita: CdotsGlu, CdotsChi e CdotsChitotal	!Error! Marcador no definido.
Figura 3.3. Imagens de AFM da esquerda para a direita: CdotsChi, CdotsChitotal	!Error! Marcador no definido.
Figura 3.4. Resultados do ensaio de viabilidade celular em fibroblastos humanos (HDF). As células foram submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de Cdots (0,5; 0,2 e 0,05 mg/mL) na ausência (sRAD) e presença (cRAD) de UV-A. Os resultados representam a média e desvio padrão, n=3.....	39
Figura 3.5. Resultados do ensaio de viabilidade celular em células endoteliais humanas (HMEC). As células foram submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de Cdots (0,5; 0,2 e 0,05 mg/mL) na ausência (sRAD) e presença (cRAD) de UV-A. Os resultados representam a média e desvio padrão, n=3.	40
Figura 3.6. Resultados do ensaio de viabilidade celular em células de cancro da mama humanos (MCF-7). As células foram submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de Cdots (0,5; 0,2 e 0,05 mg/mL) na ausência (sRAD) e presença (cRAD) de UV-A. Os resultados representam a média e desvio padrão, n=3.	41

Figura 3.7. Ensaio de proliferação celular em fibroblastos humanos (HDF). As células foram submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de Cdots (0,5; 0,2 e 0,05 mg/mL) na ausência (sRAD) e presença (cRAD) de UV-A. Os resultados representam a média e desvio padrão, n=3.	42
Figura 3.8. Ensaio de proliferação celular em células endoteliais humanas (HMEC). As células foram submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de Cdots (0,5; 0,2 e 0,05 mg/mL) na ausência (sRAD) e presença (cRAD) de UV-A. Os resultados representam a média e desvio padrão, n=3.	43
Figura 3.9. Ensaio de proliferação celular em células de cancro de mama (MCF-7). As células foram submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de Cdots (0,5; 0,2 e 0,05 mg/mL) na ausência (sRAD) e presença (cRAD) de UV-A. Os resultados representam a média e desvio padrão, n=3.	44
Figura 3.10. Ensaio de migração em fibroblastos (a, b, c), células endoteliais (d, e, f) e células MCF-7 (g, h, i). Avaliação do fecho a 0 horas (a, d, g) e a 24 horas sem tratamento UV (b, e, h) e com UV preliminar (c, f, i)	45
Figura 3.11. Ensaio de migração em fibroblastos (a, b, c), células endoteliais (d, e, f) e células MCF-7 (g, h, i) submetidas a tratamento com CdotsBmim a 0,2 mg/mL. Avaliação do fecho a 0 horas (a, d, g) e a 24 horas sem tratamento UV (b, e, h) e com UV preliminar (c, f, i)	46
Figura 3.12. Ensaio de migração em fibroblastos (a, b, c), células endoteliais (d, e, f) e células MCF-7 (g, h, i) submetidas a tratamento com CdotsGlu a 0,2 mg/mL. Avaliação do fecho a 0 horas (a, d, g) e a 24 horas sem tratamento UV (b, e, h) e com UV (c, f, i)	47
Figura 3.13. Ensaio de migração em fibroblastos (a, b, c), células endoteliais (d, e, f) e células MCF-7 (g, h, i) submetidas a tratamento com CdotsChi a 0,2 mg/mL. Avaliação do fecho a 0 horas (a, d, g) e a 24 horas sem tratamento UV (b, e, h) e com UV (c, f, i)	48
Figura 3.14. Ensaio de migração em fibroblastos (a, b, c), células endoteliais (d, e, f) e células MCF-7 (g, h, i) submetidas a tratamento com CdotsChi a 0,2 mg/mL. Avaliação do fecho a 0 horas (a, d, g) e a 24 horas sem tratamento UV (b, e, h) e com UV (c, f, i)	49
Figura 3.15. Ensaio de migração em fibroblastos (a, b, c), células endoteliais (d, e, f) e células MCF-7 (g, h, i) submetidas a tratamento com CdotsCocoon a 0,2 mg/mL.	

Avaliação do fecho a 0 horas (a, d, g) e a 24 horas sem tratamento UV (b, e, h) e com UV (c, f, i)	50
--	----

Lista de abreviaturas

AB/AM: Antibiótico/antimicótico

AFM: Microscopia de força atômica

Bmim: 1-Butil-3-metilimidazolio

[Bmim]Cl: cloreto de 1-butil-3-metilimidazolio

BP-CDs/HER3: Complexos de Carbon dots com a proteína HER3

BrdU: 5-bromo-2'-deoxyuridine

BSA: Albumina de Soro Bovino

Cdots: Carbon dots

DAPI: (4',6-diamidino-2-fenilindol)

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DOX: Doxorrubicina

DPPH: (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

EGF: Fator de crescimento epidérmico

FBS: Soro Bovino Fetal

FTIR: Infravermelho por transformada de Fourier

HDF: Fibroblastos humanos da derme da pele

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HFF: Fibroblastos humanos da pele

HMEC: Células humanas microvasculares do endotélio

HeLa: Células Henrietta Lacks

HRTEM: Microscópio eletrônico de transmissão de alta resolução

HUVECs: Células do cordão umbilical

IL: Líquido iônico

IR: Infravermelho

NMR: Ressonância Magnética Nuclear

NPs: Nanopartículas

MALDI-TOF: Espectrometria de massa com fonte de ionização e desorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo-de-voo

MCF-7: Células do cancro da mama

MG63: Células de osteosarcoma

MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio

OH: Radical Hidroxilo

PBS: Solução tamponada de fosfato

PDT: Terapia fotodinâmica

PEG: Polyethylene glycol

PEI: Polietilenamina

PL: Fotoluminescência

PS: Fotosensitizador

QDs: Quantum Dots

RBCs: Células vermelhas do sangue

ROS: Espécies reativas de oxigênio

RPMI: Roswell Park Memorial
Institute medium

RNA: Ácido ribonucleico

SSA: Superfície específica maior

TGA: Análise termogravimétrico

[Tmi] [Trif]: triflato de 1-tosilato-3-
metil-imidazolio

UV-A: Luz ultravioleta negra

XPS: Espectroscopia fotoeletrônica de
raios-X

XTT: (2,3-Bis-(2-Metoxi-4-Nitro-5-
Sulfofenilo) -2*H*-Tetrazólio-5-
Carboxanilide)

Capítulo 1 - Introdução “Carbon dots: métodos de síntese, potencial uso e avaliação da sua toxicidade”

Os objetivos do presente trabalho são:

1. Determinar a toxicidade dos nanoflúidos baseados em Cdots funcionalizados com líquidos iônicos em três linhas celulares (HDF, HMEC e MCF-7) usando três concentrações diferentes (0,5 mg/mL, 0,2 mg/mL e 0,05 mg/mL). Selecionar a concentração mais favorável e a sua possível aplicação em PDT.
2. Comprovar o efeito da irradiação UV na viabilidade, proliferação e migração das células após a inclusão dos Cdots. Determinar se a concentração tem algum efeito filtro na irradiação.

1.1 Características e aplicações dos Carbon dots

A nanotecnologia é uma vertente da tecnologia e das ciências aplicadas cujo mérito é o domínio da matéria e a obtenção de materiais em escala atômica e molecular, com tamanhos entre 1 e 100 nanômetros (nm). Devido a este tamanho peculiar, a nanotecnologia proporciona o desenvolvimento de novos materiais, com aplicações que vão desde os campos da física, química, sistemas biológicos, ciência dos materiais, a áreas como engenharia e medicina, com alcance expressivo no avanço do uso de nanopartículas [1].

As nanopartículas fluorescentes ganharam atenção nas últimas décadas devido as suas propriedades óticas e ao seu amplo campo de aplicações no âmbito da biologia, química, engenharia, entre outras [2].

A necessidade de substituir as nanopartículas baseadas em elementos inorgânicos (*Quantum dots- QDs*) surgiu da sua elevada toxicidade nos sistemas biológicos e a necessidade de encapsulamento se se pretender aplicações biológicas. Nos últimos anos, as nanopartículas baseadas no carbono, Carbon dots (Cdots), foram adquirindo um elevado interesse por parte da comunidade científica devido às suas características apelativas, nomeadamente o baixo custo, a sua superfície química versátil e modificável, as suas propriedades de fotoluminescência estáveis, a sua boa solubilidade

em água, a sua emissão multicolor dependente da excitação e a sua boa biocompatibilidade [2,3].

Os Cdots, descobertos por Xu et al. no ano 2004 e acunhados com o termo específico em 2006, são nanopartículas esféricas que consistem num núcleo de carbono sp^2/sp^3 estabilizado por grupos como ácidos carboxílicos, álcoois e cetonas na sua superfície [4,5]. Os Cdots são compostos de carbono amorfo e grafítico pelo que é possível observar na sua superfície plasmões o que aumentará significativamente o efeito plasmónico [6]. As suas propriedades eletrónicas, permitem-lhes atuar como doadores e recetores de electrões, tornando-os num material versátil, com aplicações destacadas em biomedicina, optoelectrónica, sensores e fotocatalise. Na figura 1.1 mostram-se alguns métodos de síntese e propriedades dos Cdots.

Em comparação com os semicondutores QDs, que são sintetizados a partir de metais pesados tóxicos como catião cádmio ou chumbo, limitando o seu uso em aplicações biológicas *in vivo* por potenciais perigos ambientais e toxicidade a longo prazo. Por outro lado, os Cdots são muito menos tóxicos e biocompatíveis, sendo por isso são considerados mais seguros para o uso biológico [7,8].

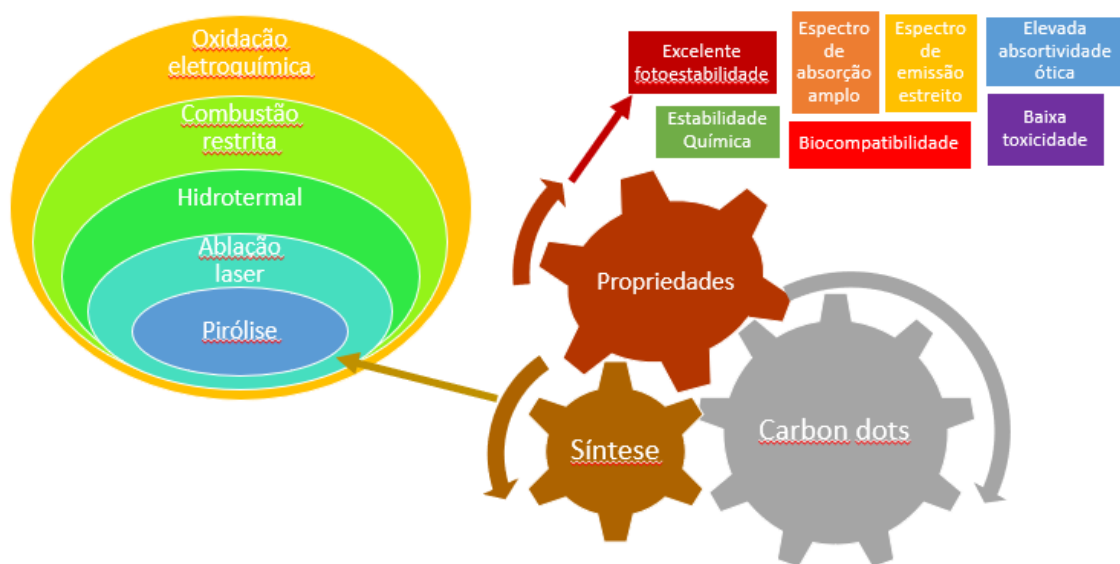


Figura 1.11. Propriedades e métodos de síntese dos Cdots

A síntese dos Cdots pode ser feita a partir de vários precursores, desde proteínas, a carboidratos, bem como resíduos orgânicos alimentares. Entre os exemplos para as

proteínas utilizadas como precursor destacam produtos cárnicos, seda natural, albumina de soro bovino (BSA), membrana de ovo, fibras capilares e gelatinas. Os exemplos dos carboidratos utilizados incluem glicerol, quitosano, quitina, celulose, ciclodextrina e sucrose. Além disso, também foram usados produtos alimentares ou subprodutos, como sumos, pão, caramelos, mel, pimento, entre outros; e também foram testados precursores procedentes de biomassa e resíduos biológicos, como erva, cascas de frutas, folhas de plantas e cinza de papel [2].

O processo de síntese é dividido em dois grandes grupos em função de se são sintetizadas por métodos: *Top-down* ou *Bottom-up* e podem ser produzidos em larga escala [9]. Os métodos *top-down* baseiam-se na obtenção das nanopartículas a partir dos seus materiais *bulk*. Para tal aplicam-se tratamentos físicos ou químicos na grafite ou outros materiais de carbono até diminuir o tamanho, complexidade e se atingir a nanoescala. Entre estes métodos destacam a ablação laser, a oxidação eletroquímica, a combustão restrita e a oxidação química usando ácido nítrico [10]. A grande desvantagem destes métodos é o facto de envolverem condições de síntese complexas e extremas, pelo que consomem muita energia e reagentes. Adicionalmente as nanopartículas produzidas geralmente apresentam um baixo rendimento quântico. Alternativamente existem os métodos *bottom-up*. Recorrendo a estas estratégias é possível conseguir uma síntese mais eficiente e ambientalmente segura utilizando fontes de carbono de baixo custo. Esta síntese consiste em abordagens químicas que convertem fontes de carbono não grafítico em materiais de tamanho nanométrico. Entre os procedimentos *bottom-up* destacam a carbonização química de precursores químicos como glucose, sacarose, glicerol, glicol, ácidos cítricos, entre outros; a pirólise por microondas, métodos de ultrassom e a síntese hidrotermal/solvotermal [10]. Como resultado dos diferentes tipos de síntese, as estruturas químicas, e, portanto, as propriedades dos Cdots são diversas [11].

Após a síntese, os Cdots podem requerer uma oxidação superficial adicional e/ou uma passivação para torná-los fluorescentes e outorgar-lhes uma superfície hidrofílica [3]. Este processo de modificação da superfície pode ser empregue para melhorar o rendimento quântico das partículas, modificar a emissão de fotoluminescência e/ou alcançar os requisitos para uma aplicação concreta [11]. Como resultado estes Cdots fluorescentes não são materiais de carbono “puros”, pois a hibridação e o coeficiente entre o núcleo de carbono e os grupos químicos superficiais influi no comportamento

fotoluminescente das nanopartículas [11]. Mediante a manipulação estrutural é possível melhorar as propriedades óticas dos Cdots, e estender a gama de emissão até a região do vermelho e infravermelho (IR), o que permitiria melhorar a sua aplicação em bioimagem. Este aumento do rendimento quântico dos Cdots pode ser então conseguido com uma passivação superficial mais efetiva do núcleo de Carbono e a funcionalização da superfície [2]. Nanoflúidos típicos são descritos como suspensões estáveis de nanopartículas (NPs) em fluídos de base convencionais. Os nanoflúidos apresentam várias vantagens sobre o fluido de base, como taxas de transferência de calor superiores, que podem se tornar anormalmente altas sempre que o nanofluido exibe um comportamento não-Newtoniano [6].

Para a completa caracterização dos Cdots são empregues diversas técnicas de análise, que permitem descrever os diferentes elementos das nanopartículas. Os métodos de caracterização do núcleo de carbono dos Cdots, incluem o microscópio eletrónico de transmissão de alta resolução (TEM), a espectroscopia Raman, a difração de raios-X e a microscopia de força atómica (AFM). Para avaliar a união dos grupos químicos e determinar a estrutura geral usam-se o Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), a espectroscopia fotoeletrónica de raios-X (XPS), a ressonância magnética nuclear (NMR), a espectrometria de massa com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo-de-voo (MALDI-TOF) [11].

Apesar de apresentar estruturas diferentes em função do processo de síntese e da modificação superficial, as propriedades óticas (absorção e fluorescência ou fotoluminescência, PL) dos Cdots são similares [11]. Enquanto à absorvância, são eficientes na colheita de fotões na região de comprimentos de onda curtos, apresentam um pico máximo de absorção em 230 nm devido á transição $\pi-\pi^*$ da ligação dupla C=C; e também um pico em 300 nm atribuído à transição $n-\pi^*$ da ligação dupla C=O. Portanto, mostram uma forte absorção na região UV (260–320 nm), com uma cauda estendendo-se até a faixa visível. Geralmente os Cdots são mais eficientes na absorção a comprimentos de onda longos, embora os grupos funcionais e a passivação superficial pode alterar as suas características de absorção [12]. Em relação à fotoluminescência (PL) dos Cdots, apresentam propriedades sintonizáveis decorrentes de efeitos de confinamento quântico. Geralmente, o espectro de emissão dos Cdots é simétrico na escala de comprimentos de onda. Os picos de emissão normalmente amplos, com grandes deslocamentos de Stokes em comparação com os espectros de emissão dos

corantes orgânicos. A maioria apresenta forte fluorescência do azul ao verde e alguns também em comprimentos de onda mais elevados. Os Cdots apresentam também um comportamento dependente do comprimento de onda de excitação. Este comportamento pode ser um resultado da diferença de tamanho entre partículas, a diferente composição química da sua superfície, e as diferentes armadilhas de emissão (*solvation effect*) [11]. O rendimento quântico dos Cdots sem modificação superficial é baixo, tipicamente inferior ao 10%, devido às armadilhas emissivas na superfície, portanto, a passivação de superfície é também necessária para melhorar o seu brilho [12]. Um exemplo do aumento do rendimento quântico com a modificação superficial foi demonstrado por Zhu et al. mediante a síntese de Cdots com rendimento quântico de 80,6 % através do método hidrotérmico, tendo como precursores o ácido cítrico e a etilenodiamina. Por outro lado, entre as diferenças em PL entre Cdots e QDs, destacam a ineficiência de controlar o PL mediante a mudança de tamanho dos Cdots, pois na maioria de situações o PL neste tipo de partículas depende maioritariamente dos grupos funcionais da superfície e do seu tamanho [11]; a banda de PL dos Cdots é maior do que a dos QDs devido à heterogeneidade da estrutura química e dos diversos centros PL. As propriedades PL dependentes da excitação permitem que os Cdots sejam empregues em aplicações de biomagem multicolor [11].

Relativamente às aplicações dos Cdots destaca o seu uso em imagiologia de células e tecidos, bem como teranóstica para efeitos simultâneos de bioimagem, libertação de fármacos e terapia fotodinâmica (PDT) [2]. No que confere ao uso dos Cdots em bioimagem destacam como agentes para imagem celular, hibridação fluorescente, imagem de mitocôndrias e imagem *in vivo* [3]. Nos estudos de bioimagem, usa-se uma sonda fluorescente para ver a imagem das células e as amostras específicas. Vários fluoróforos comerciais inorgânicos estão disponíveis e exibem uma ampla gama de emissão, sendo o mais empregue a *Rhodamine 6G*. No entanto, há vários inconvenientes no uso de fluoróforos inorgânicos em bioimagem: as sondas são propensas a perda de intensidade por irradiação (*photobleaching effect*), é fácil que saiam do citoplasma ao meio, tem menos fotoestabilidade, os comprimentos de onda de emissão e excitação são estreitos e é possível que induzam citotoxicidade [10]. É por isso, que os Cdots foram concebidos como uma alternativa aos fluoróforos tradicionais, suprimindo todos os inconvenientes que implicava o uso destes compostos *in vitro* e *in vivo*.

A imagiologia *in vitro* é realizada para obter informação da capacidade de imagem, distribuição e citotoxicidade de sondas nas células [13].

1.2 Ensaios de biocompatibilidade de Cdots

Os Cdots foram usados com sucesso numa variedade de imagens de linhas celulares, tais como HeLa, células-tronco neurais humanas, 4 T1, NIH-3T3, A549, HepG-2, entre outros. O mecanismo típico de atuação dos Cdots é entrar na célula por endocitose e concentrar-se no citoplasma, ainda que também foram detetados casos nos que conseguem migrar até o núcleo celular [13].

Assim, Kamashi et al. em 2017, testou os Cdots produzidos a partir de pó de casca de cebola como terapêutica para acelerar a cicatrização da pele num modelo de rato para aplicação tópica. Os efeitos de diferentes concentrações de Cdots foram testados em duas linhas celulares de humano: uma derivada de fibroblastos da pele (HFF) e outra derivada de um osteosarcoma (MG63) tumor ósseo. Para tal, usaram-se diferentes ensaios de biocompatibilidade relacionados com a caracterização da superfície celular mediante SEM e AFM e perfis celulares em células tratadas e não tratadas; ensaios de doseamento de espécies reactivas de oxigénio DPPH (2,2-diphenyl-1-di-picrylhydrazyl) e de inibição *in vitro* da atividade da superóxido dismutase determinando-se que os Cdots testados apresentam atividade antioxidante com o aumento da concentração; nos ensaios de migração celular os Cdots não limitavam a capacidade de migração das células, pois o dano celular (risco na placa) fechava após 24 horas. Adicionalmente, também testaram a capacidade de hemólise em sangue concluindo que as concentrações testadas (0-5 mg/mL) eram hemocompatíveis pois a hemólise observada foi de 1.2%, sendo menor ao 5% determinado como dano potencial dos RBCs pelo ASTM E2524-08 padrão (*standard test method for the analysis of hemolytic products of NPs*).

Assim, Sharma et al. em 2019, testou os Cdots produzidos a partir de uma combinação de ácido cítrico e ureia para determinar o seu efeito na proliferação, na migração, na angiogénese, formação de novos vasos sanguíneos, no qual participam as células endoteliais. Os efeitos de diferentes concentrações de Cdots foram testados em três linhas celulares de humano: uma derivada de fibroblastos da pele (HFF), outra derivada de células do cordão umbilical (HUVECs) e outra de células transformadas (HeLa). Em

ambas linhas celulares os Cdots aumentaram a viabilidade celular, conseguindo-se níveis mais elevados de proliferação a concentrações superiores (100 e 200 microgramas/mL). Também foi observada uma acumulação dos Cdots no citoplasma celular em todas as linhas celulares. Além disso, foi monitorizada a migração celular mediante a criação de riscos na camada celular de células endoteliais e demonstrou-se que a migração se iniciava 6 horas após o tratamento e que a área do risco era menor nas células tratadas com Cdots que nas células sem tratar (controle) após 12 horas, concluindo-se então que os Cdots estimulam a migração celular. Também foi avaliada a formação de estruturas capilares, usando células endoteliais em ensaios de matrigel *in vitro*, uma matriz extracelular 3D. Verificou-se que a capacidade de angiogênese, rede de capilares formados, após 6 horas nas células tratadas com Cdots era maior do que no controle. Também foi avaliada a expressão de genes pro-angiogênicos por reação quantitativa da cadeia polimerase (qPCR) como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator transformador de crescimento- β (TGF- β), fator de crescimento da placenta (PGF), e a metaloprotease-9 da matriz (MMP-9). Acredita-se que essas moléculas de sinalização, tanto individualmente quanto coletivamente, suportam a sobrevivência de células endoteliais e influenciam a migração endotelial, quimiotaxia e invasão da matriz, levando à formação de novos capilares. Enquanto um aumento de 2 vezes nos níveis de expressão de VEGF e PGF foi observado nas células tratadas, a expressão de PDGF, TGF- β e bFGF aumentou 4 vezes e a de MMP-9 em 3 vezes, respectivamente. Os fatores pró-angiogênicos secretados pelas células endoteliais em resposta aos Cdots podem ser responsáveis pela formação de novos vasos. Além disso, a probabilidade de envolvimento de outros fatores pró-angiogênicos precisa de ser mais explorada. Para confirmar a atividade pró-angiogênica dos Cdots, foi avaliada a influência dos Cdots na formação de novos vasos sanguíneos em comparação ao controle não tratado através do ensaio CEA, um ensaio *in vivo* padrão é a aquisição de imagens após 12 horas de tratamento. Após uma avaliação visual da rede capilar, os embriões tratados com Cdots mostraram um aumento significativo na formação de vasos sanguíneos em comparação com o controle não tratado no mesmo período de tempo. Os vasos sanguíneos apresentaram um aumento nos pontos de ramificação, um aumento no comprimento do vaso e um aumento na área do recipiente na gema de ovo tratado com Cdots em comparação com o controle não tratado, confirmando assim o potencial angiogênico dos Cdots [16].

1.3 Aplicação à Imagiologia

A modificação superficial dos Cdots é essencial para serem usados como sondas multifuncionais de direcionamento de tumor. Exemplos desta aplicação foram relatados por Zhu et al, mediante a utilização de Cdots verdes fluorescentes com baixa toxicidade em imagiologia celular; por Tang et al. através da modificação dos Cdots com ácido fólico e Doxíciclina (DOX) para o reconhecimento da especificidade de células cancerosas, transporte de fármacos e imagens de fluorescência; por Choi et al. recorrendo à modificação dos Cdots com ácido fólico e zinco ftalocianina para direcionamento de tumor e terapia fototérmica [13].

A imagiologia de fluorescência de dois fótons tem atraído cada vez mais interesse nos campos biológico e médico por causa de seu baixo dano às células, alta resolução, grande profundidade de imagem e fácil observação dinâmica. Em comparação com a fluorescência de fóton único, a fluorescência de dois fótons depende quadraticamente da intensidade de excitação, com alta resolução espaço-temporal 3D resultante da região fluorescente confinada a um volume de cerca de um cubo do comprimento de onda de excitação (VB 13) quando excitada pelo laser de focagem. Além disso, ele também pode ser excitado por luz IR (800–1100 nm). Como a água e o sangue são quase transparentes e não espalham a luz do IR próximo, a imagem de fluorescência de dois fótons tem vantagens atraentes, como baixo dano celular, uma taxa de alta resolução, uma grande profundidade de imagem e capacidade de imagem tridimensional. Adicionalmente tem uma maior capacidade de penetração nos tecidos, o que aumenta as suas possíveis aplicações. As técnicas de imagens atuais tornaram-se ferramentas poderosas para observar e pesquisar os processos dinâmicos das células vivas. No entanto, a complexidade e a natureza dinâmica dos fenômenos biológicos requerem que as sondas fluorescentes tenham capacidade de imagem contínua e não invasiva de longo prazo [17].

A imagiologia por dois fótons dos Cdots sobre excitação com luz próxima ao IR (800–900 nm) é útil para eliminar as interferências causadas por a autofluorescência. Exemplos de Cdots em imagiologia por dois fótons foram reportados por Yang et al, Zhang et al e Kong et al. [13]

Na imagiologia *in vivo* os Cdots são injetados em modelos animais, como o peixe zebra ou ratos, para visualizar seletivamente os locais de acumulação das nanopartículas.

Embora os Cdots que emitem em azul e verde não são adequados para a obtenção de imagens *in vivo*, a passivação dos Cdots com PEG e a dopagem com ZnS (CZnS-dots-PEG) foi descrita como efetiva para imagiologia *in vivo*, obtendo-se imagens de fluorescência emitidas em verde e vermelho sob diferentes excitações. A fluorescência dos Cdots pode ser mantida até 60 horas e, portanto, são adequados para a observação dos estágios de desenvolvimento do peixe-zebra a longo prazo. No caso dos ratos, os Cdots são geralmente usados como sondas e administrados por injeção intradérmica, intravenosa ou intramuscular em função do local de atuação desejado. Foi relatado após vários ensaios que a velocidade do metabolismo de Cdots modificados por PEG é mais lento do que os não modificados, pelo que permanecerão mais tempo dentro do animal antes da sua excreção de maneira natural por meio da urina. Um exemplo do uso de Cdots em imagiologia *in vivo* foi relatado por Tao *et al*, obtendo imagens em diferentes fontes de excitação (455–704 nm), e concluindo que os Cdots emissores em azul podiam ser usados *in vivo* e chegavam a entrar no cérebro dos ratos. [10] [13]

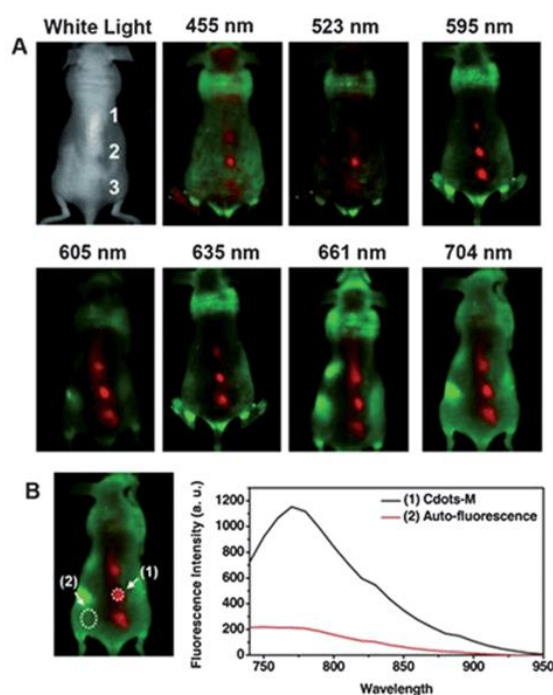


Figura 1.2. Resultados de imagiologia de fluorescência *in vivo* com Cdots modificados com PEG injetados subcutaneamente em ratos [2]

Além do seu uso em bioimagem, os Cdots podem ser empregues em terapia fotodinâmica, na eliminação de microrganismos, na liberação de fármacos e moléculas

e também como biossensores. Para tais fins, as nanopartículas entram na célula permitindo a imagiologia celular com uma ou várias excitações fotofônicas [2].

As propriedades de fotoluminescência, eletrônicas e eletroquímicas dos Cdots são sensíveis a perturbações mínimas, permitindo assim o seu uso como biossensores. Aliás, como o seu tamanho se encontra na escala nano, podem interagir com as biomoléculas, resultando em uma melhor sensibilidade de detecção e seletividade. As propriedades de PL ligado-desligado permitiram aos Cdots serem usados para detetar moléculas biologicamente relevantes, açúcares e proteínas em solução ou no interior das células. [12] Uma ampla gama de sensores químicos e biológicos foram desenhados em base as propriedades de fluorescência e os grupos funcionais de superfície dos Cdots. Um exemplo desta aplicação foi descrito por Tuerhong et al. mediante o uso de Cdots para a detecção de catião mercuroso e tióis biológicos [13]. Outro exemplo de Cdots como biossensores foi relatado por Park et al. que modificaram as nanopartículas mediante a união de hemoglobina para a detecção de colesterol. Este mecanismo está baseado na perda de fluorescência dos Cdots quando estão unidos à hemoglobina, e a sua restauração quando o colesterol está presente no meio [18].

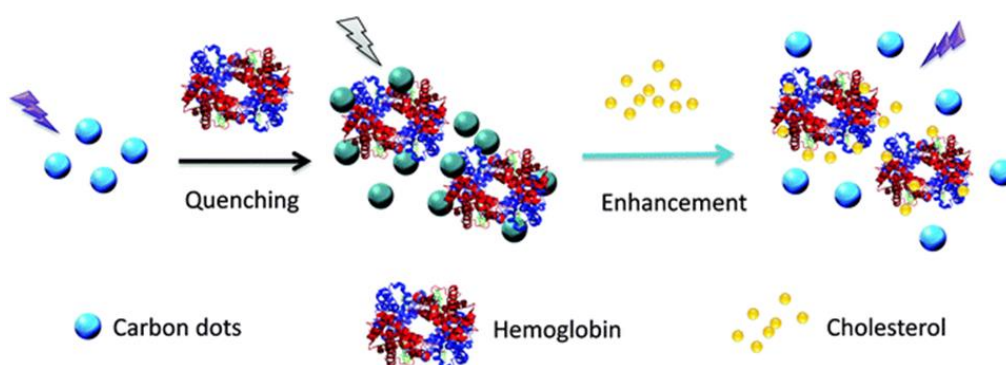


Figura 1.3. Cdots combinados com hemoglobina usados como biossensores na detecção de colesterol [18]

1.4 O cancro da mama e a terapia fotodinâmica

O cancro da mama é o cancro mais comum em mulheres, afetando mais de 1,5 milhões de mulheres ao ano, e a segunda causa de morte relacionada com o cancro depois do cancro de pulmão. Segundo a *World Health Organization* no ano 2020, 2,3 milhões de mulheres foram diagnosticadas com cancro da mama e 685 mil faleceram em todo o mundo, representando o 15% de todas as mortes relacionadas com o cancro em mulheres [19]. O cancro da mama é uma doença complexa e heterogénea, composta por

vários subtipos com diferentes morfologias e implicações clínicas diversas. Os fatores de risco estabelecidos para desenvolver cancro da mama são diversos, desde história familiar, fatores genéticos, fatores reprodutivos, fatores alimentares e fatores ambientais. Atualmente, o rastreio associado a um diagnóstico precoce de cancro da mama é a melhor estratégia para reduzir a mortalidade e morbilidade associada ao cancro da mama [20].

Devido aos efeitos colaterais da quimioterapia, os investigadores continuam a investigar abordagens alternativas para o tratamento. Recentemente, a abordagem teranóstica ganhou notável atenção devido ao conceito duplo de diagnóstico e tratamento. Assume-se que a aproximação teranóstica irá não só melhorar o desenvolvimento dos fármacos, como também reduzirá o risco e o custo do tratamento. Durante a última década várias nanopartículas, como nanotubos de carbono, quantum dots, nanopartículas de ouro, nanopartículas de sílica foram extensamente estudadas para o seu uso em teranóstica do cancro. [21]

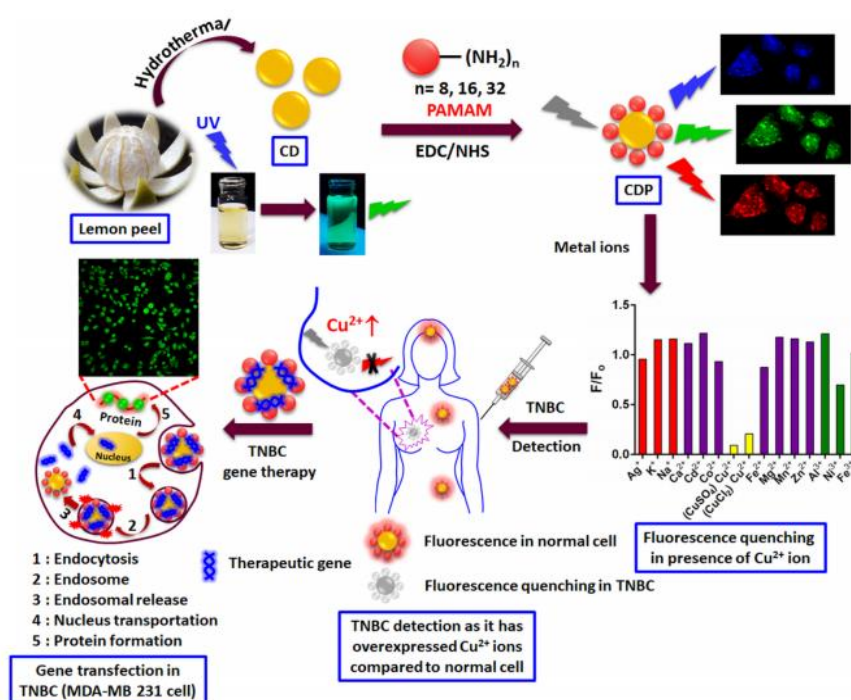


Figura 1.4. Esquema da aplicação de Cdots para teranóstica do cancro da mama [21]

A PDT é uma modalidade teranóstica extraordinária para o tratamento de numerosos tipos de cancro, malignos e não malignos. Ao mesmo tempo, a fluorescência gerada mediante a ativação luminosa, poderá ser usada para deteção molecular em PDT [22].

Um exemplo do estudo do uso dos Cdots no tratamento do cancro da mama foi reportado por *Kong et al.* desenvolvendo um sistema Cdots-DOX, consistente numa conjugação de Cdots com o fármaco doxorrubicina, para a distribuição dirigida do fármaco no local indicado, medindo a eficiência de libertação mediante um espectrofotómetro de fluorescência e estudando a citotoxicidade *in vitro*, a captação celular e o efeito terapêutico numa linha celular de cancro de mama (MCF-7) [23].

Outro exemplo de Cdots utilizados para o tratamento de cancro da mama foi desenvolvido por *Shu et al.*, mediante a funcionalização de Cdots com polyethylenimine e a sua utilização como sistema transportador de genes. Este sistema apresentou alta eficiência no transporte do gene GFP em células Cos-7, e estudos posteriores revelaram que a transfeção com complexos BP-CDs/HER3 siRNA, de maneira individual ou combinados com o fármaco Trastuzumab, exibem uma eficácia superior na inibição da proliferação de células BT-474, sobre-expressando o gene HER2 [24].

Capítulo 1.5 - “Caracterização das nanopartículas de carbono utilizadas”

Nos ensaios a seguir serão testados 6 compostos de diferente natureza química:

1. CdotsBmim: Cdots produzidos a partir de glucose e funcionalizados com Bmim.
2. CdotsGlu: Cdots produzidos a partir de glucose e funcionalizados com Bmim e IL1.
3. CdotsChi: Cdots produzidos a partir de quitina e funcionalizados com Bmim e IL1 (1h reação).
4. CdotsChitotal: Cdots produzidos a partir de quitina e funcionalizados com Bmim e IL1 (2 h reação).
5. CdotsCocoon: Cdots produzidos a partir da de casulos de *Bombyx mori* funcionalizados com Bmim e IL1.
6. IL1: IL1 puro após 72h de diálise

As nanopartículas de carbono foram sintetizadas e purificadas na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro pela doutora Helena M. R. Gonçalves e fornecidas para realizar todos os ensaios de avaliação celular nos locais mencionados anteriormente. O método de síntese utilizado foi a carbonização hidrotermal de carboidratos (glucose e quitina) e

proteínas (seda dos casulos de *Bombyx mori*). Neste processo ocorre a rotura das ligações N-glicosídicas, formando-se moléculas orgânicas de baixo peso molecular, e também pequenos aglomerados de nucleação que conduzem à formação de nanopartículas. O tamanho das nanopartículas aumenta com o tempo de reação, até que um valor estável seja alcançado e permita que eles permaneçam suspensos no meio de reação. O 1-Butyl-3-methylimidazolium chloride ([Bmim]Cl) é um líquido iónico comercial utilizado na funcionalização *in situ* dos Cdots e que permite obter um nanofluído não-newtoniano. Esta molécula desempenha um papel duplo: (i) Devido à sua baixa tensão interfacial, a taxa de nucleação aumenta, facilitando a formação de partículas menores (ii) Além disso, sua baixa energia de interface ajuda a estabilizar os Cdots produzidos, evitando sua agregação. A associação do [Bmim]Cl com os Cdots levou à formação de um nanofluído termotrópico não-Newtoniano, solúvel em água, reutilizável e que exibe um comportamento de autoaperfeiçoamento.

Além do [Bmim]Cl, um líquido iónico (IL1) foi adicionados aos Cdots para melhorar as suas propriedades. Os líquidos iónicos (ILs) são definidos como compostos formados por iões com um ponto de fusão abaixo de 100 °C [29] Este termo engloba os sais fundidos inorgânicos e orgânicos. Na literatura recente destacam ILs sintetizados a partir de compostos de nitrogénio ou fósforo, que contem um catião orgânico dissimétrico: como o alquil-imidazólio, piridínio ou pirrolidínio, amónio ou fosfónio, triflato, dicianamida, acetato, trifluoroacetato, trifluorometilsulfato ou aniões inorgânicos: brometo, cloreto, nitrato, perclorato, cloroaluminato, tetrafluoroborato ou hexafluorofosfato [30].

O uso químico potencial dos ILs está relacionado com as suas propriedades únicas como solventes não moleculares: uma pressão de vapor desprezável associada a uma alta estabilidade térmica [29]. ILs são compostos únicos com enorme interesse tecnológico. Como podem atuar como solventes, reagentes ou agentes direcionadores de estrutura, os ILs são vantajosos para a síntese de materiais [31].

Capítulo 2 - Materiais e métodos

2.1 Preparação dos nanoflúidos

Os CdotsGlu e os CdotsBmim foram preparados em presença de [Bmim]Cl a partir de glucose a 100°C e durante 1 hora de reação em estufa de laboratório, obtendo nanoflúidos de cor castanha-escuro. Os CdotsChi e os CdotsChitotal foram sintetizados a partir de quitina em presença de [Bmim]Cl e [Tmi][Trif], obtendo nanoflúidos de cor laranja.

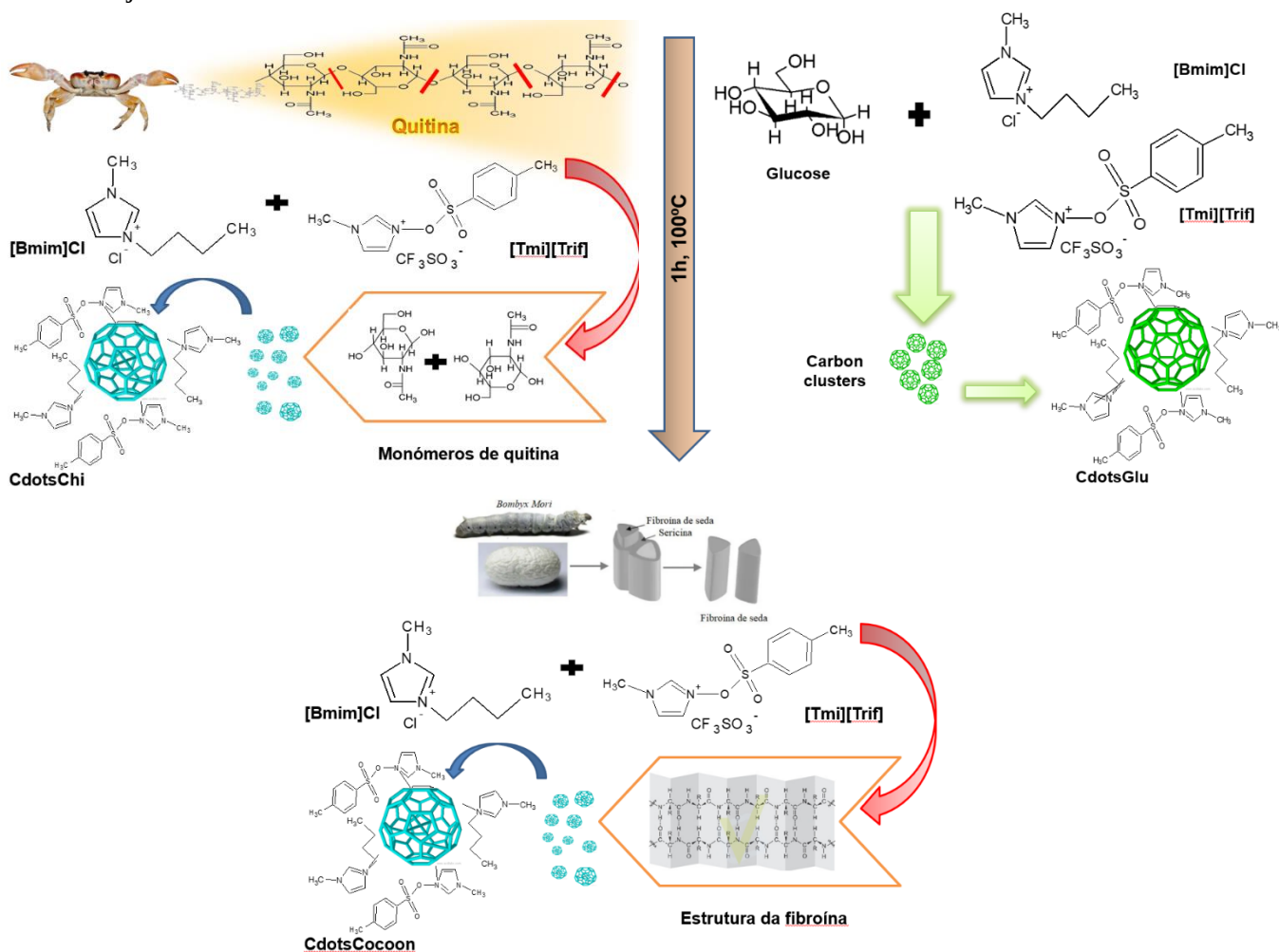


Figura 2.1. Esquema da síntese dos nanoflúidos CdotsChi, CdotsGlu e CdotsCocoon [31]

A síntese dos nanoflúidos baseados em Cdots foi desenvolvida em balão de fundo redondo com agitação magnética constante. Os nanoflúidos obtidos a partir de glucose anidra (CdotsGlu) e os mediante a descomposição de carapaças de caranguejo (CdotsChi) e casulos de seda (CdotsCocoon) foram produzidos pela adição do líquido

Bmim à Glucose, quitina ou fibroína de seda num rácio mássico de 1:10. Depois 1 mL do líquido puro IL₁ foi adicionado à mistura e posto em reação a 100 °C num banho de óleo durante 1 h. As nanopartículas são arrefecidas à temperatura ambiente e posteriormente transferidas para uma manga de diálise tubular com um peso molecular de corte de 100 Da e dialisadas em água ultrapura. As soluções resultantes são liofilizadas durante 3 dias. Os Cdots purificados apresentam uma consistência viscosa à temperatura ambiente [31].

Os Cdots purificados pós-reação são resuspendidos em água ultrapura em concentrações de 0,5 mg/mL; 0,2 mg/mL e 0,05 mg/mL e submetidos a um banho de ultrasons durante 2 horas. Depois, a mistura foi filtrada em filtros de seringa de 200 nm.

2.2 Caracterização dos nanoflúidos

Os nanoflúidos foram caracterizados por diferentes técnicas físico-químicas para determinar a dispersão e tamanho das partículas, bem como a química e carga da superfície.

2.2.1 Espectro de absorção e emissão

Os espectros UV-vis foram obtidos usando um espectrofotómetro UV-vis (U-4100) e uma cuvete de quartzo de 10 mm de percurso ótico.

2.2.2 Potencial Zeta

O potencial zeta dos nanoflúidos foi medido com o equipamento *Zeta PALS potential analyzer* (Brookhaven, USA) com elétrodos pretos de platina de placa paralela espaçados de 5 mm e uma célula de poliestireno descartável retangular de 10 mm de comprimento de caminho.

Todas as amostras foram medidas usando uma tensão senoidal de 80 V com uma frequência de 3 Hz. Para cada amostra, no total, dez valores foram fornecidos automaticamente pelo instrumento, que foi então calculada a média para fornecer o valor final e o desvio padrão.

2.2.3 Condutividade e viscosidade

A medição da viscosidade dinâmica foi realizada num reómetro (*Brookfield DV-II*) equipado com um sistema de placa cônica (*SSA spindle 21*). A condutividade foi determinada num medidor de condutividade analógico WPA CM35 com uma sonda caseira com um valor constante de 0.5468 cm^{-1} . Estes dois parâmetros, viscosidade e condutividade, foram adquiridos em função da temperatura (de 5 a 60 °C), como tal, durante as medições o porta-amostra foi mantido dentro de um banho termostático Julabo F25.

2.2.4 TEM de alta resolução

Imagens de microscopia eletrónica de transmissão de alta resolução (HRTEM) foram registadas num JEOL JEM 2100 (200 kV) com UC-A em grelhas de Cu 400 mesh (*Ted Pella ref. 01824*). A preparação das amostras iniciou-se por dispersão em etanol e, ao se obter uma solução homogénea, os nanoflúidos foram colocados na grelha de análise por *drop-casting*, seguida de secagem à temperatura ambiente.

2.2.5 AFM

As medições de AFM foram realizadas no modo tapping usando um equipamento AFM CSI Nano-Observer (*Scientec*) e uma sonda Si HQ: NSC19 / FORTA que tem uma ressonância de frequência de 60 kHz e uma constante de mola de $0,3 \text{ N.m}^{-1}$. Os dados foram analisados no *software Gwyddion 2.52* e a qualidade das imagens foi aprimorada com o uso de ferramentas de achatamento e eliminação de ruído de linha.

2.3 Cultura de células humanas

2.3.1 Cultura de fibroblastos

Os fibroblastos humanos da derme da pele (HDF) foram cultivados em meio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM; Sigma) suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal (FBS, Sigma) e 1% (v/v) de antibiótico/antimicótico (Gibco, California, Life technologies). As células foram mantidas em câmara humidificada com 95% de ar e 5% de CO₂ a 37 ° C.

2.3.2 Cultura de células endoteliais

As Células endoteliais microvasculares dérmicas humanas (HMVEC, ATCC, Reino Unido) foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Gibco, California, Life Technologies, 52400-025) suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal (Gibco, 10270) e 1% (v/v) de antibiótico/antimicótico (Gibco, California, Life technologies). As células foram mantidas em câmara humidificada com 95% de ar e 5% de CO₂ a 37 ° C.

2.3.3 Cultura de células de cancro da mama

As células de cancro de mama humano *in situ* dependentes de estrogénio (MCF-7, ATCC, Reino Unido) foram cultivados em meio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM; Sigma) suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal (FBS, Sigma) e 1% (v/v) de antibiótico/antimicótico (Gibco, Carlsbad, California, Life technologies). As células foram mantidas em câmara humidificada com 95% de ar e 5% de CO₂ a 37 ° C.

2.3.4 Preparação das culturas celulares para os ensaios *in vitro*

As diferentes linhas celulares HDF, HMEC e MCF-7 foram cultivadas em placas de 21 cm² ou 60 cm² no respetivo meio de cultivo completo e incubadas a 37 °C e 5% CO₂ durante o crescimento até alcançarem 80-90% de confluência. Posteriormente, foram tripsinizadas e transferidas para as placas de cultura celular de 24 ou 96 poços, dependendo do estudo a realizar.

2.3.5 Tratamento com luz UV

Para avaliar o comportamento dos nanofluídos e o seu possível uso em terapia fotodinâmica, foi realizado um tratamento com luz UV-A incidente a 15 cm de distância durante 15 minutos em câmara escura, para evitar a interferência da luz. Este tratamento foi realizado nos ensaios *in vitro* (viabilidade, proliferação e migração) nas três linhas celulares.

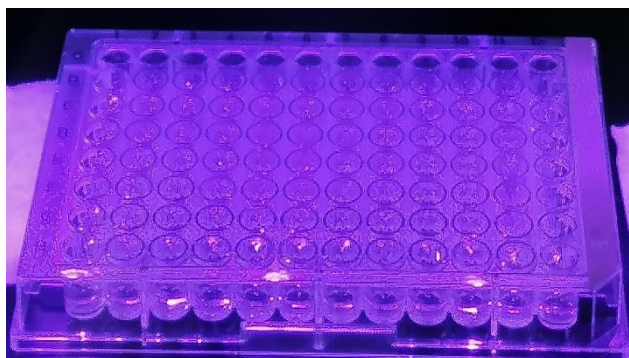


Figura 2.2. Radiação UV de fibroblastos (HDF) antes do ensaio de viabilidade celular

2.4. Ensaio de Viabilidade celular

No ensaio de viabilidade celular usou-se o reagente 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio (MTS). O MTS, em presença de phenazine methosulfate (PMS) é reduzido pelas células viáveis, convertendo o reagente no produto de formazan solúvel no meio de cultura que pode ser quantificado medindo a absorvância a 490-500 nm. A conversão é permitida pelas enzimas desidrogenase dependentes de NADPH presentes nas células metabolicamente ativas. A vantagem do ensaio MTS é que origina um composto solúvel e não tóxico [32], figura 2.3.

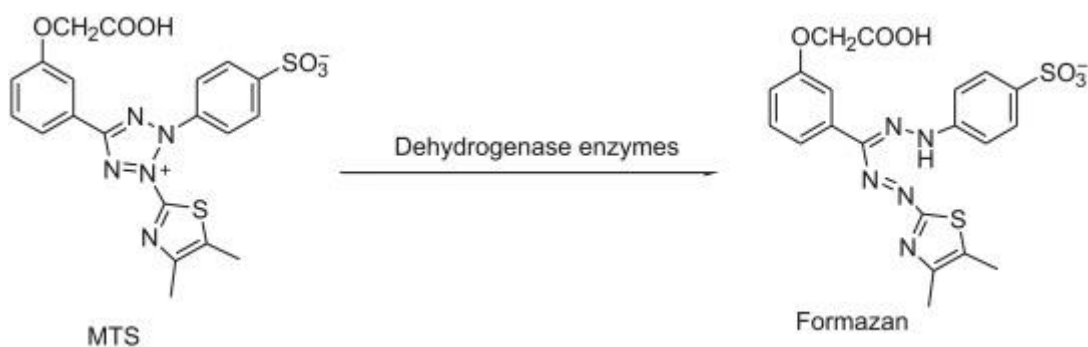


Figura 2.3. Estrutura química do reagente MTS e o produto de Formazan [32]

Os três tipos celulares (HDF, H-MEC, MCF-7) foram cultivados em placas de 96 poços a uma densidade de 1×10^5 células por poço e incubados durante 24 h a 37 °C, 5% CO₂ em meio completo (DMEM ou RPMI com 10% de soro). O meio foi retirado, fez-se uma lavagem prévia com 100 µL de PBS e o tratamento com as soluções de Cdots, (5 µL de Cdots e 95 µL de meio com 2% de soro). O ensaio foi realizado em triplicado.

Após 24 h, adicionou-se 20 µL de reagente MTS a cada poço e incubou-se durante 3 h. Os resultados foram lidos num espectrofotômetro de placas a 490 e 690 nm.

2.5 Ensaio de proliferação celular

Nos ensaios de proliferação celular o 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) é usado como um análogo da timidina. Durante o ensaio de proliferação o BrdU é incorporado no DNA replicante sintetizado pelas células e pode ser detetado usando anticorpos anti-BrdU. Após a marcação, uma hidrólise do DNA pode ser requerida após a fixação e permeabilização para permitir ao anticorpo anti-BrdU aceder ao BrdU [34], figura 2.4.

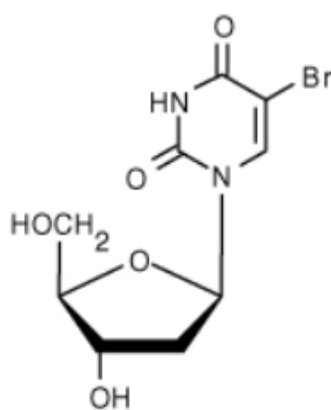


Figura 2.4. Estrutura química do BrdU [35]

Os três tipos celulares (HDF, H-MEC, MCF-7) foram cultivados em placas de 96 poços a uma densidade de 1×10^5 células por poço, 37° C, 5% CO₂ em meio completo (DMEM ou RPMI com 10% de soro) durante 24 h. Posteriormente as soluções de Cdots, compostas por 5 µL de Cdots e 95 µL de meio com 2% de soro foram adicionadas em cada poço, após uma lavagem prévia com 100 µL de PBS. Cada concentração de Cdots foi testada em 3 poços. Após 24 horas, incorporaram-se 10 µL do reagente BrdU a cada poço seguido de um período de reincubação (37°C, 5% CO₂) de 4 horas. Depois adicionaram-se 200µL por poço da solução de fixação FixDenat, seguido de meia hora de incubação à temperatura ambiente. Removeu-se a solução FixDenat e incorporaram-se 200 µL por poço da solução antiBrdU seguidos de uma incubação de 90 minutos à temperatura ambiente. Após, removeu-se a solução antiBrdU e aplicaram-se 3 lavagens consecutivas com 200 µL por poço de solução de lavagem. Por último removeu-se a solução de lavagem e incorporaram-se 100 µL por poço da solução substrato. Após uma

incubação à temperatura ambiente de 5 minutos, os resultados são lidos num espectrofotômetro com leitor de placas a 340 e 492 nm.

2.6. Ensaio de migração celular

O ensaio de migração celular é uma técnica padrão *in vitro* para demonstrar a migração celular coletiva em duas dimensões. Neste ensaio após as células estarem confluentes, aplica-se um dano celular mecânico (um risco) e monitoriza-se a área de fecho do dano [33]. Na figura 2.5 vê-se o dano celular (A, B) e o fecho do risco (C).

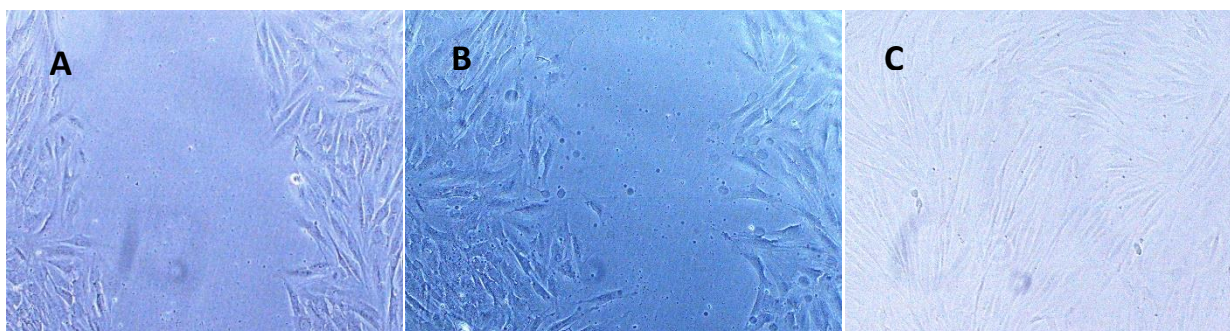


Figura 2.5. Ensaio de migração celular em fibroblastos tratados com CdotsChi 0,5 mg/mL e submetidos a radiação UV correspondentes às 0 horas (A), 6 horas (B) e 16 horas (C) pós tratamento

Os três tipos celulares (HDF, H-MEC, MCF-7) foram cultivados em placas de 24 poços a uma densidade de 1×10^5 células por poço, 37° C, 5% CO₂ em meio completo (DMEM, RPMI). O crescimento celular foi permitido até a formação de uma monocamada. Uma ponta de micropipeta estéril foi usada para a criação de uma fenda em cada poço e realizou-se uma lavagem com PBS para eliminar os detritos celulares. Posteriormente as soluções de Cdots em meio com 2% de soro foram adicionadas a cada poço. Cada concentração de Cdots foi testada em 1 poço. O fecho do dano celular foi monitorizado com fotografias a 40x num microscópio invertido.

Capítulo 3 - Resultados

3.1 Caracterização dos nanoflúidos

As técnicas de caracterização empregues (potencial Zeta, condutividade, viscosidade) tiveram como objetivo determinar a dispersão e tamanho das partículas, bem como a química e carga da superfície.

3.1.1 Resultados de potencial Zeta

O Potencial Zeta dos nanoflúidos CdotsGlu e CdotsChi são marcadamente dependentes da temperatura. No caso dos CdotsGlu foi detetado um comportamento anômalo entre 30 e 35 °C, tanto nos ciclos de aquecimento quanto de resfriamento, que podem estar associados ao TT transição de [Bmim] Cl. Durante o arrefecimento, o Potencial Zeta diminuiu progressivamente, atingindo um valor final de ca. -20 mV a 16 °C, provavelmente como consequência da quebra da rede de ligações de hidrogênio que muito provavelmente promoveu a formação de espécies negativas adicionais. A 16 °C CdotsChi exibe um valor de +0,66 mV que aumentou para +7,1 mV a 50 °C, indicando que na última temperatura os NPs estão próximos à agregação, embora sua estabilidade tenha aumentado dramaticamente com a temperatura. Neste nanofluido, a transição TT não é discernida. Essa observação corrobora lindamente a explicação de que os grupos butil dos catiões imidazólio estão interagindo com a superfície dos Cdots e, portanto, são menos propensos a sofrer uma mudança conformacional.

No caso dos CdotsCocoon durante o resfriamento, o Potencial Zeta diminuiu progressivamente, atingindo um valor final de -18 mV a 16 °C, provavelmente como consequência da quebra da rede de ligações de hidrogênio que muito provavelmente promoveu a formação de espécies negativas adicionais, ao igual que no CdotsGlu.

3.1.2 Resultados de condutividade e viscosidade

O nanofluido CdotsBmim exibiu alta condutividade iónica entre 20 e 65 °C como resultado do transporte de protões via *Gotthus hopping* e / ou mecanismos veiculares. A Figura 3.1 demonstra claramente que a introdução de um segundo IL em torno dos Cdots (isto é, IL1) foi, como previsto, claramente vantajoso. A comparação da condutividade iónica de nanoflúidos CdotsBmim e CdotsGlu no mesmo intervalo de

temperatura permite inferir que a inclusão de [Tmi] [Trif] exerceu um aumento notável de 0,046 para 1 mS cm⁻¹ a 25 °C e de 2,19 para 4,81 mS cm⁻¹ a 50 °C. Para CdotsChi o aumento da condutividade iônica induzida por [Tmi] [Trif] foi ainda maior. Levando em consideração que ambos os nanoflúidos foram funcionalizados com os mesmos ILs, nos sentimos tentados a sugerir que a maior condutividade de CdotsChi está relacionado com a orientação relativa de [Bmim⁺] e [Tmi⁺] em torno da superfície dos Cdots. Outra conclusão interessante é que ambos os nanoflúidos, a condutividade iônica aumentou regularmente com aquecimento sucessivo / ciclos de resfriamento como resultado de histerese não reversível, e o valor inicial nunca é recuperado. Este efeito também foi detectado em CdotsBmim. Essa melhoria contínua da condutividade iônica pode ser interpretada como uma impressão digital da complexidade, revelando um processo de auto-organização. Este último está intimamente associado a uma rede de ligações de hidrogênio que são rompidas com o aquecimento, mas nunca são restabelecidas exatamente com o resfriamento.

Normalmente, um aumento de temperatura é seguido por um aumento na mobilidade das moléculas e, conseqüentemente, no intercâmbio molecular. Quando esse fenômeno ocorre no estado líquido, também é necessário considerar as forças adicionais atrativas e coesivas estabelecidas entre as moléculas do líquido. Nesse sentido, pode-se afirmar que tanto o intercâmbio molecular quanto as forças de coesão contribuem para a viscosidade do líquido. Ao aumentar a temperatura, ocorre uma diminuição na energia de ligação atrativa e, portanto, na viscosidade do líquido.

No caso do novo nanofluido CdotsGlu, a viscosidade dinâmica diminuiu progressivamente conforme a temperatura é aumentada durante os ciclos de aquecimento/resfriamento consecutivos

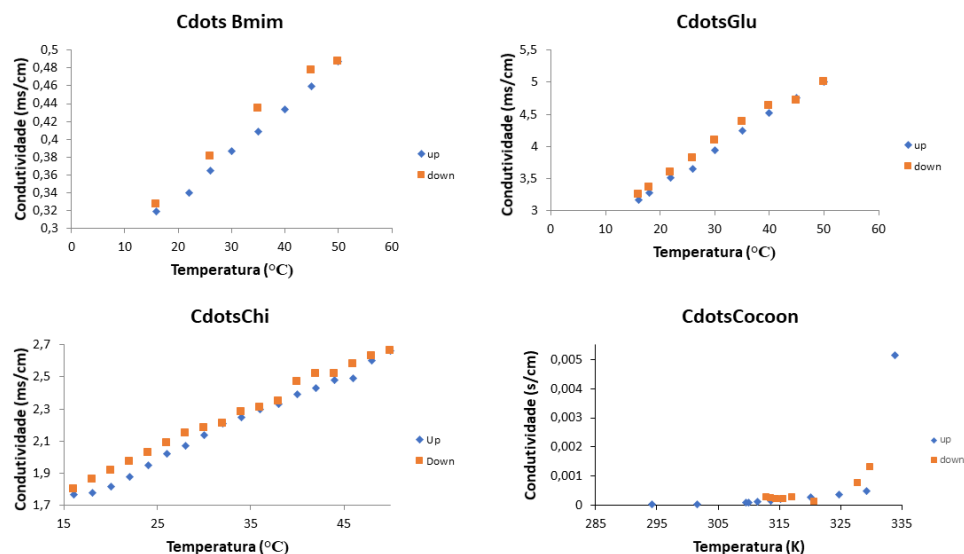


Figura 3.1. Condutividade em função da temperatura em CdotsBmim, CdotsGlu, CdotsChi e CdotsCocoon

3.1.3 Resultados caracterização da superfície dos Cdots (HRTEM, AFM)

A coexistência de [Bmim]Cl e IL1 durante a síntese dos nanoflúidos CdotsChi, CdotsChitotal, CdotsGlu e CdotsBmim além da origem diferente dos Cdots, teve um grande impacto nas propriedades físico-químicas globais dos nanoflúidos resultantes [31].

Os dados de análise elementar revelam a presença de átomos de enxofre em CdotsGlu] e CdotsChi, respetivamente, fornecendo suporte para a funcionalização de Cdots com IL1 [31].

A figura 3.2 permite inferir que as nanopartículas de CdotsGlu apresentam morfologia esférica. Os dados do Dynamic Light Scattering (DLS) indicaram a ocorrência de uma única população de NPs homogeneamente distribuída com um tamanho médio de 44 nm. Isso significa que os Cdots neste nanofluido são consideravelmente maiores ($\approx 6,5$ vezes) do que aqueles encontrados em Cdots / [Bmim] Cl [31].

No caso do CdotsCocoon, os dados do DLS indicaram a ocorrência de uma única população de NPs homogeneamente distribuída com um tamanho médio de 46 nm.

A Transformação Rápida de Fourier (FFT) da imagem de Microscopia Eletrónica de Transmissão de Alta Resolução (HR-TEM) (Figura 3.2) revelou o espaçamento de rede

típico de aproximadamente 0,24 nm, consistente com o plano de rede (020) de grafite. Com base nas informações obtidas do DLS juntamente com as quantidades de reagentes empregados na síntese dos Cdots, calculamos que em sua superfície deve haver cerca de $2,74 \times 10^6$ moléculas de [Bmim] Cl e $1,96 \times 10^7$ moléculas de IL1. Isso nos permitiu deduzir que a densidade de carga superficial era de aproximadamente $4,51 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$. Lembramos que no caso de Cdots / [Bmim] Cl, apenas 37 moléculas [Bmim]Cl foram encontradas na superfície dos Cdots consideravelmente menores (6,8 nm), a densidade de carga superficial sendo ca. $1,10 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$ [31].

O nanofluído CdotsChi apresenta duas populações de tamanhos distintos com tamanhos médios de 45 e 170 nm. As estruturas semelhantes a micelas observadas na imagem HRTEM (Figura 3.2) podem ser responsáveis pelas duas populações encontradas. No entanto, como esses NPs foram suspensos em etanol e água antes de realizar as medições HRTEM e DLS, respectivamente, foi necessário obter evidências adicionais de que essas estruturas micelares existiam no estado nanofluídico. Com este propósito, realizamos análise de AFM do nanofluído CdotsChi que revelou lindamente as mesmas estruturas semelhantes a micelas (Figura 3.3). Isso prova que os Cdots derivados da quitina e funcionalizados com ambos os ILs podem ser considerados como NPs individuais com grande tendência a se agrupar em estruturas semelhantes a micelas de 170 nm de diâmetro [31].

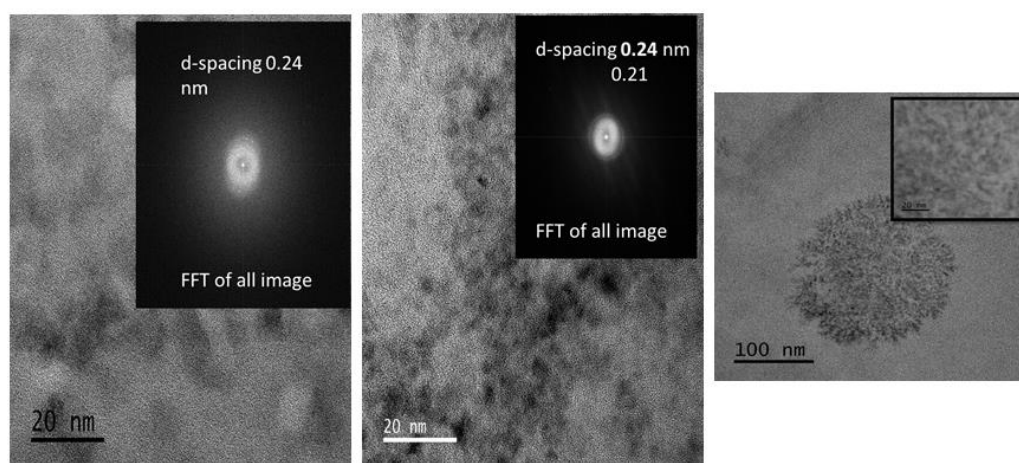


Figura 3.2. Imagens de HRTEM da esquerda para a direita: CdotsGlu, CdotsChi e CdotsChitotal

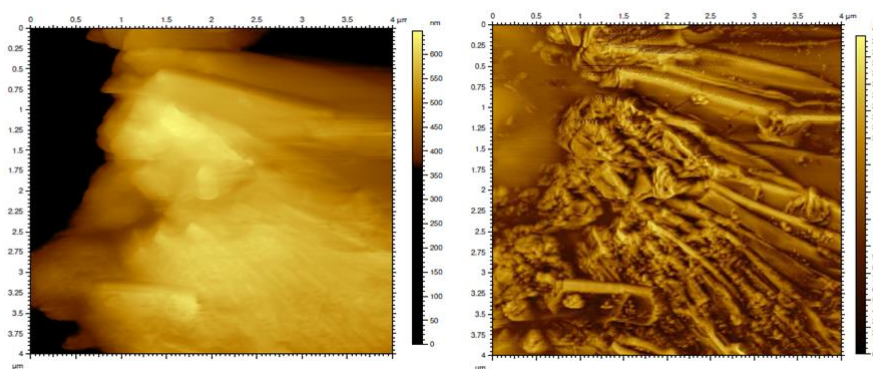


Figura 3.3. Imagens de AFM da esquerda para a direita: CdotsChi, CdotsChitotal

Para verificar se o tempo de reação foi insuficiente quando o complexo de carboidrato de quitina foi usado em vez da glicose, realizamos novamente a síntese do nanofluido CdotsChi permitindo que a reação evoluísse por 2 h. As imagens HRTEM adquiridas posteriormente mostram o espaçamento de rede típico de aproximadamente 0,24 nm, consistente com o plano de rede (020) de grafite, e uma única população de NPs com tamanho médio de 45 nm (Figura 3.2). Esses achados permitem afirmar que, no caso dos Cdots produzidos a partir da quitina, a heterogeneidade de tamanho está inequivocamente relacionada com o tempo de reação, corroborando relatórios anteriores que apontaram a grande influência que a matéria-prima de carbono exerce sobre os NPs, principalmente no seu peso molecular. O número calculado de moléculas [Bmim] Cl e [Tmi] [Trif] na superfície dos Cdots derivados de quitina foi de $4,39 \times 10^6$ e $3,15 \times 10^7$, respectivamente, para a população de 45 nm, e $4,82 \times 10^7$ e $3,46 \times 10^8$, respectivamente, para a população de 170 nm. A partir desses valores, estimamos uma densidade de carga superficial de $6,90 \times 10^{16}$ e $7,58 \times 10^{17} \text{ cm}^{-2}$, respectivamente [31].

3.2 Efeito dos Cdots nos ensaios de viabilidade celular

O tratamento com os Cdots estimula ligeiramente a viabilidade celular nos fibroblastos, em ambos casos, na ausência e presença de UV-A. Não se observando diferenças significativas a nível de concentrações. Observa-se ainda que na concentração 0,2 mg/mL de CdotsChi inibiu-se a viabilidade celular na presença e ausência de luz UV-A versus o controlo. Contudo verifica-se que a atividade mitocondrial está menos diminuída na presença de luz UV-A. Os resultados mostram-se na figura 3.4.

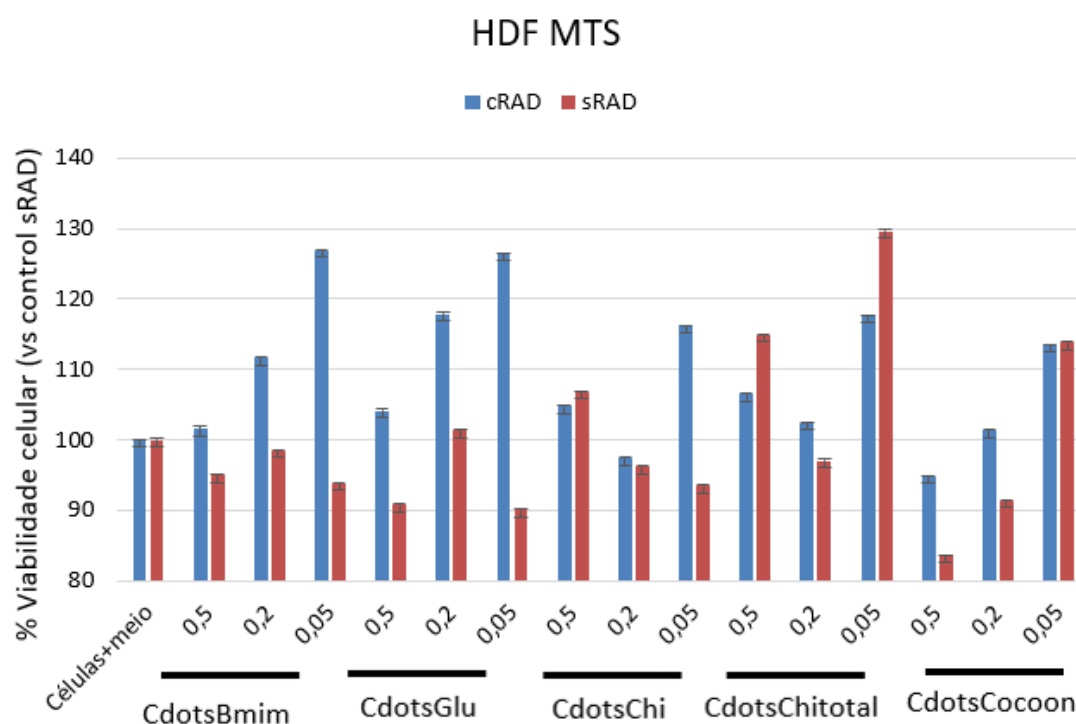


Figura 3.4. Resultados do ensaio de viabilidade celular em fibroblastos humanos (HDF). As células foram submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de Cdots (0,5; 0,2 e 0,05 mg/mL) na ausência (sRAD) e presença (cRAD) de UV-A. Os resultados representam a média e desvio padrão, n=3

O tratamento com os Cdots estimula ligeiramente a viabilidade celular nas células endoteliais, em ambos casos, com tratamento UV-A e sem ele. Não se observando diferenças significativas a nível de concentrações. Contudo, verifica-se ainda que na concentração 0,2 mg/mL de CdotsGlu inibiu-se a viabilidade celular na presença e ausência de luz UV-A versus o controlo. Contudo verifica-se que a atividade mitocondrial está menos diminuída na presença de Luz UV. Os resultados mostram-se na figura 3.5.

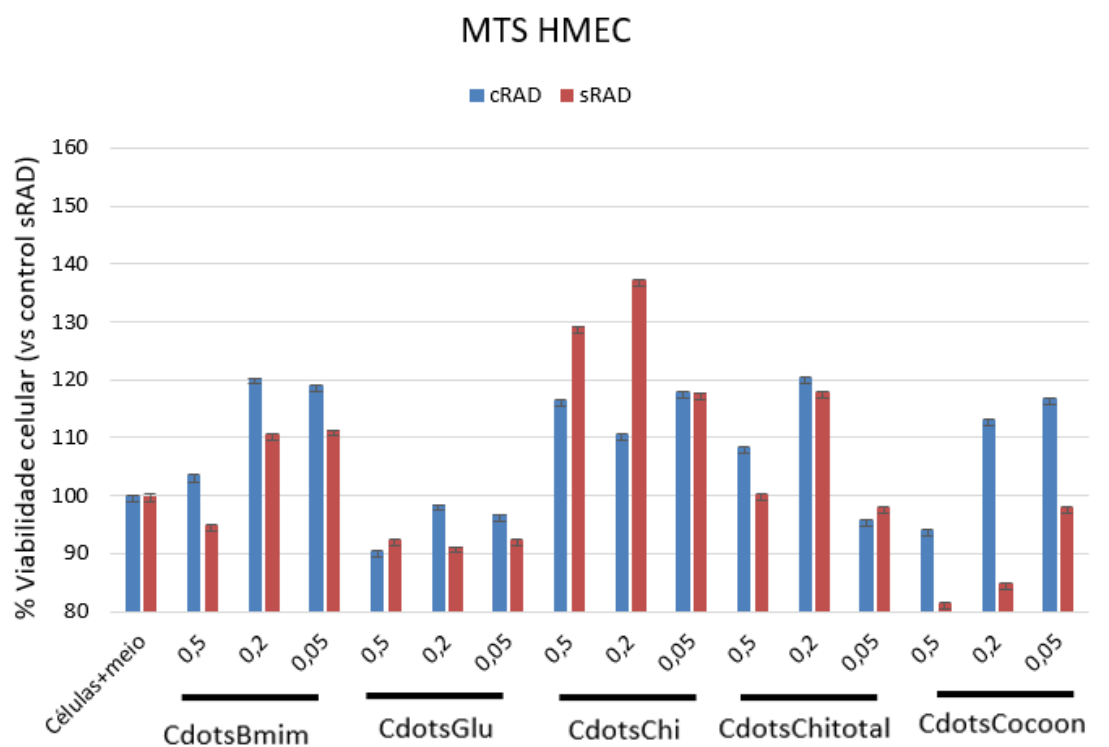


Figura 3.5. Resultados do ensaio de viabilidade celular em células endoteliais humanas (HMEC). As células foram submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de Cdots (0,5; 0,2 e 0,05 mg/mL) na ausência (sRAD) e presença (cRAD) de UV-A. Os resultados representam a média e desvio padrão, n=3.

O tratamento com Cdots estimula a viabilidade celular até o dobro nas células MCF-7, com tratamento UV e sem ele, não se observando diferenças significativas a nível de concentrações. Salienta-se que na concentração 0,2 mg/mL de todos os Cdots na ausência e presença de luz UV versus o controlo a atividade mitocondrial aumentou relativamente ao controlo, tal como se pode ver na figura 3.6.

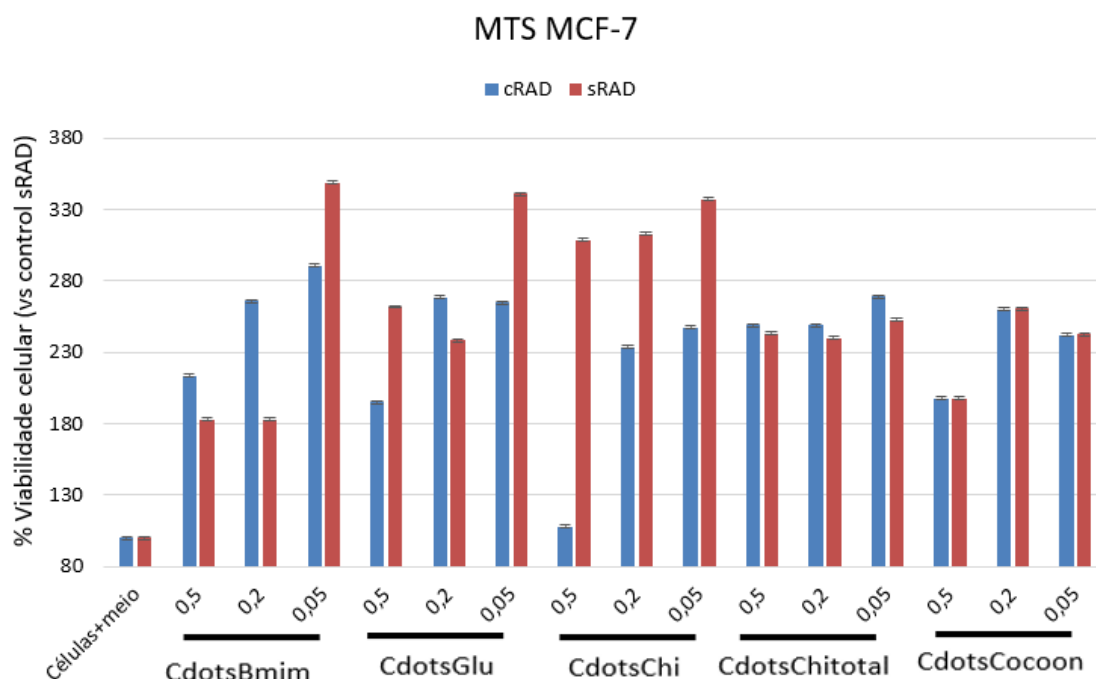


Figura 3.6. Resultados do ensaio de viabilidade celular em células de cancro da mama humanos (MCF-7). As células foram submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de Cdots (0,5; 0,2 e 0,05 mg/mL) na ausência (sRAD) e presença (cRAD) de UV-A. Os resultados representam a média e desvio padrão, n=3.

3.3 Efeito dos Cdots nos ensaios de proliferação celular

O efeito dos Cdots foi avaliado através do ensaio com BrdU nas três linhas celulares e observou-se que relativamente aos fibroblastos, figura 3.7., tratados com a concentração de 0,2 mg/mL CdotsBmim, CdotsGlu, CdotsChi, CdotsChitotal, CdotsCocoon na ausência e na presença de UV-A houve uma diminuição da proliferação celular relativamente com controlo. Na presença de luz versus ausência de luz o efeito inibitório foi ligeiramente superior. De forma geral, trás a análise dos resultados obtidos, aprecia-se uma diminuição da proliferação celular quando o tratamento com os Cdots é aplicado.

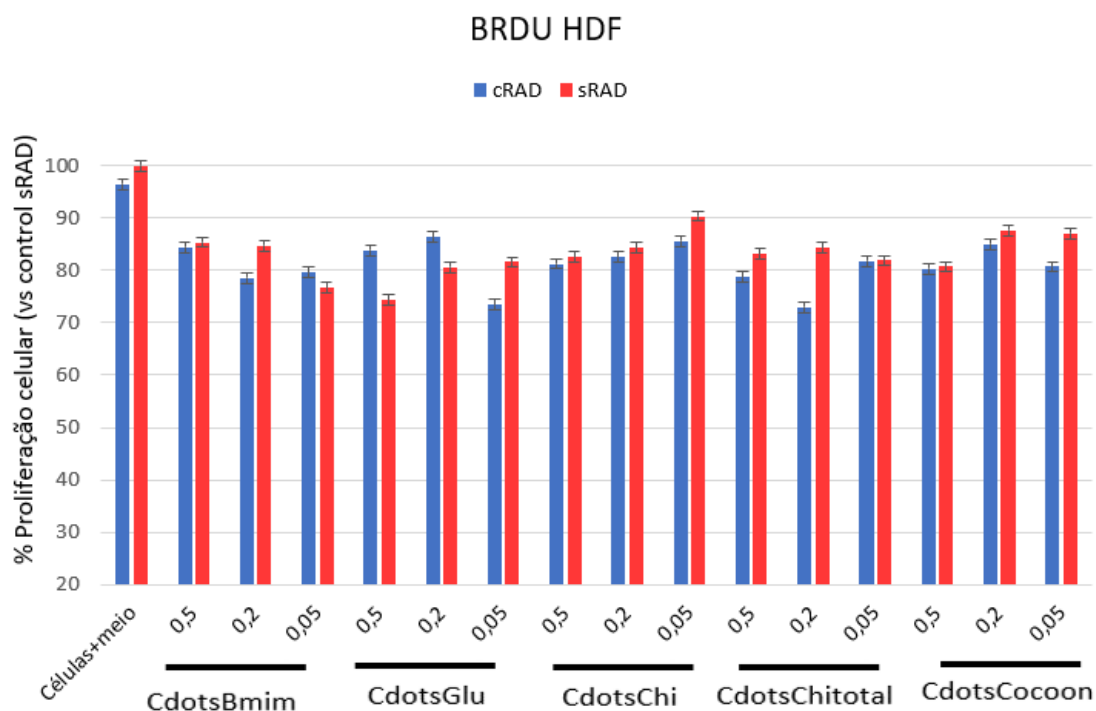


Figura 3.7. Ensaio de proliferação celular em fibroblastos humanos (HDF). As células foram submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de Cdots (0,5; 0,2 e 0,05 mg/mL) na ausência (sRAD) e presença (cRAD) de UV-A. Os resultados representam a média e desvio padrão, n=3.

As células endoteliais quando foram tratadas com as diferentes concentrações de Cdots apresentaram uma inibição da proliferação celular na ausência e presença de UV-A. Não se observando diferenças significativas entre concentrações, figura 3.8. Observou-se que no tratamento com 0,2 mg/mL de CdotsChitotal o efeito inibitório da proliferação celular na presença de UV-A versus ausência foi mais marcado.

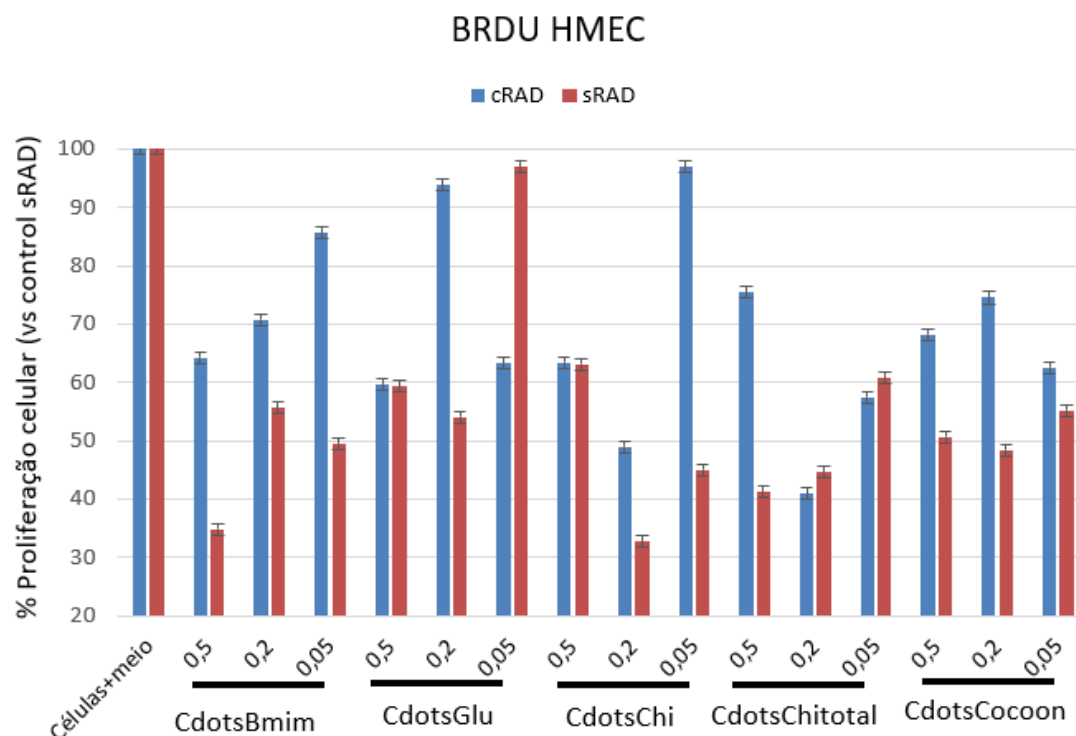


Figura 3.8. Ensaio de proliferação celular em células endoteliais humanas (HMEC). As células foram submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de Cdots (0,5; 0,2 e 0,05 mg/mL) na ausência (sRAD) e presença (cRAD) de UV-A. Os resultados representam a média e desvio padrão, n=3.

O tratamento com os Cdots diminuiu a proliferação celular nas células de cancro da mama, figura 3.9, quando na presença de luz UV-A. Enquanto a ausência de luz UV-A estimulou a proliferação celular, observando-se efeitos mais pronunciados na concentração 0,5 mg/mL. Os resultados ainda apresentam para a concentração 0,2 mg/mL de CdotsBmim, CdotsGlu, CdotsChi e CdotsChitotal uma diminuição da proliferação celular mais marcada quando as células são expostas à luz UV-A versus ausência de luz UV-A.

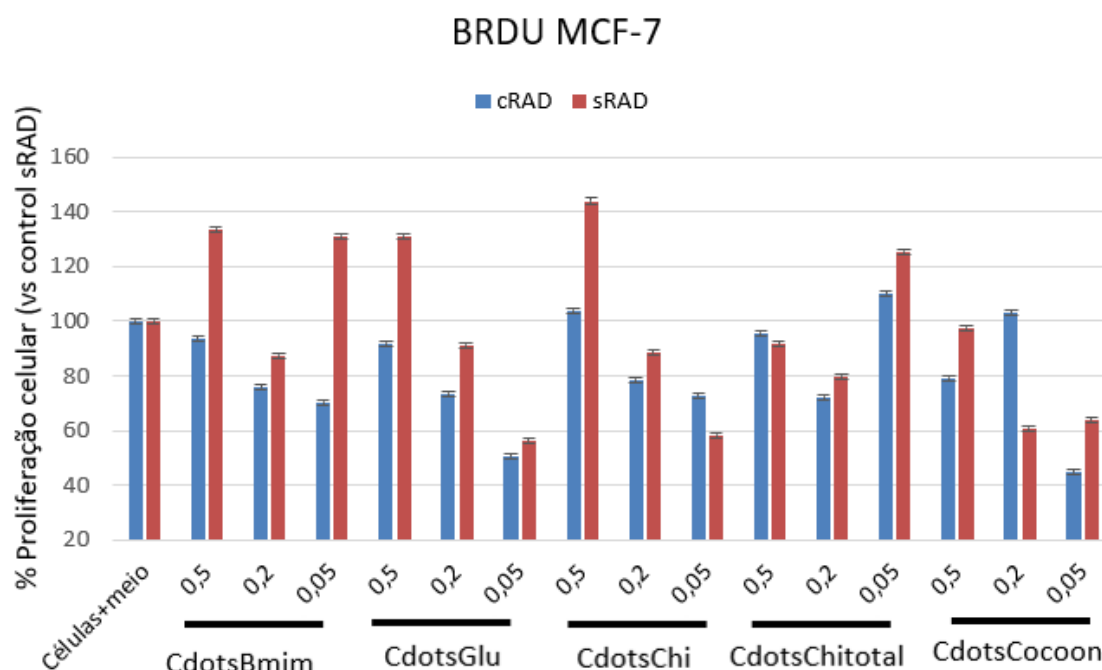


Figura 3.9. Ensaio de proliferação celular em células de cancro de mama (MCF-7). As células foram submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de Cdots (0,5; 0,2 e 0,05 mg/mL) na ausência (sRAD) e presença (cRAD) de UV-A. Os resultados representam a média e desvio padrão, n=3.

3.4 Efeito dos Cdots nos ensaios de migração celular

Avaliou-se o fecho da fenda às 24 horas após o dano nos três tipos celulares, comparando à sua vez as células submetidas à ausência e presença de luz UV-A. As imagens mostram-se nas figuras 3.10-15. A figura 3.10 corresponde às linhas celulares sem tratamento com Cdots. A figura 3.11-15 corresponde às linhas celulares tratadas com Cdots (CdotsBmim, CdotsGlu, CdotsChi, CdotsChitotal, CdotsCocoon) para a concentração de 0,2 mg/mL.

Na Figura 3.10, correspondente ao controlo observa-se que apesar das células apresentarem motilidade no fecho do dano na ausência e presença de luz UV-A. Na presença de luz UV-A existe uma desorganização celular tanto nos fibroblastos como nas células endoteliais após 24 horas. No caso das células MCF-7, a radiação parece limitar a migração, não conseguindo fechar a fenda após 24 horas.

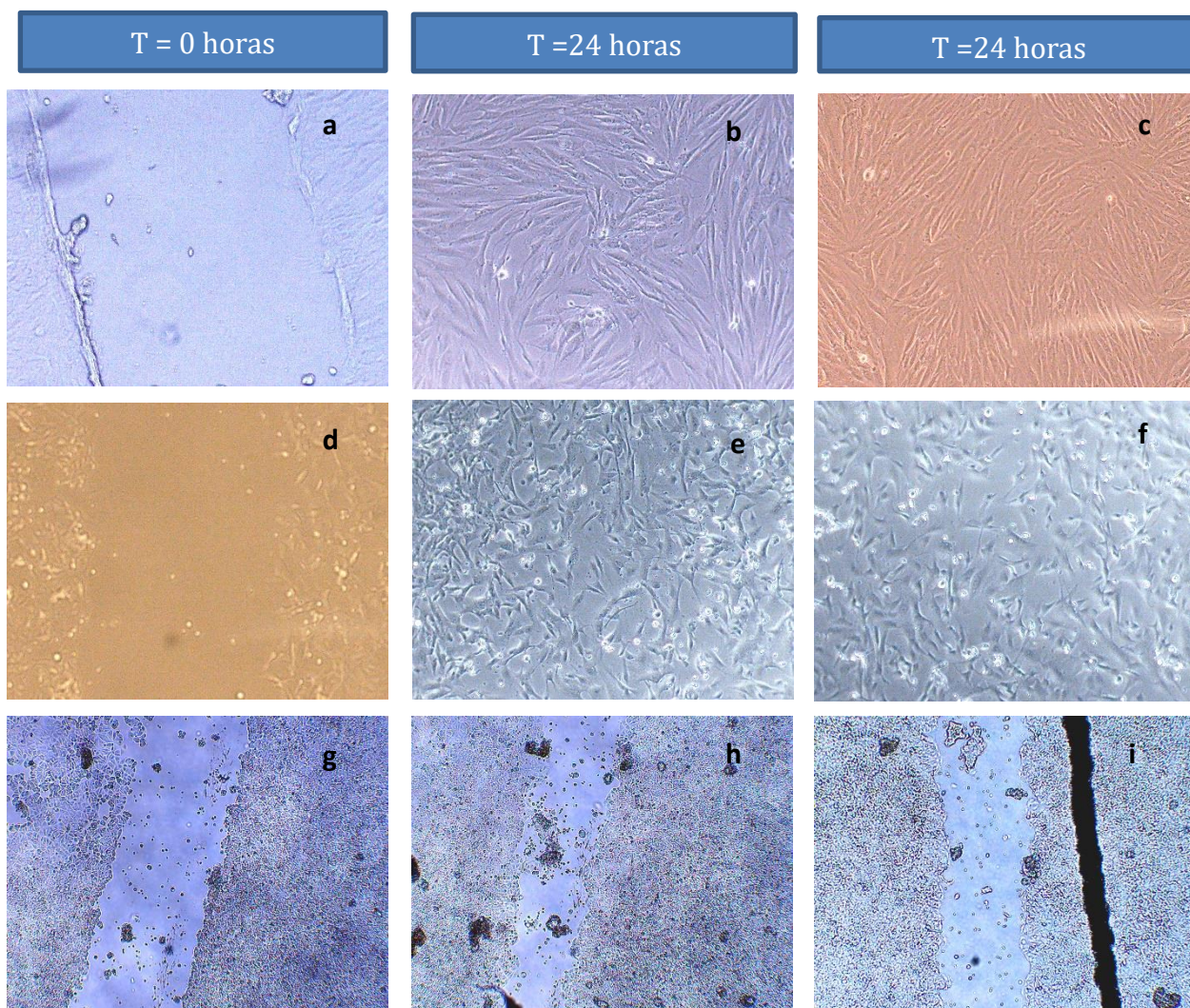


Figura 3.10. Ensaio de migração em fibroblastos (a, b, c), células endoteliais (d, e, f) e células MCF-7 (g, h, i). Avaliação do fecho a 0 horas (a, d, g) e a 24 horas sem tratamento UV (b, e, h) e com UV preliminar (c, f, i)

3.4.1 Efeito dos CdotsBmim nos ensaios de migração celular

O tratamento com CdotsBmim a 0,2 mg/mL parece limitar a migração de fibroblastos e células endoteliais quando submetidas a radiação UV-A, de modo que a fenda não fecha completamente, enquanto quando as células não são radiadas a fenda fecha por completo às 24 horas. No caso das células MCF-7, a fenda não fecha em nenhum dos casos, tanto na radiação, como nas células não radiadas.

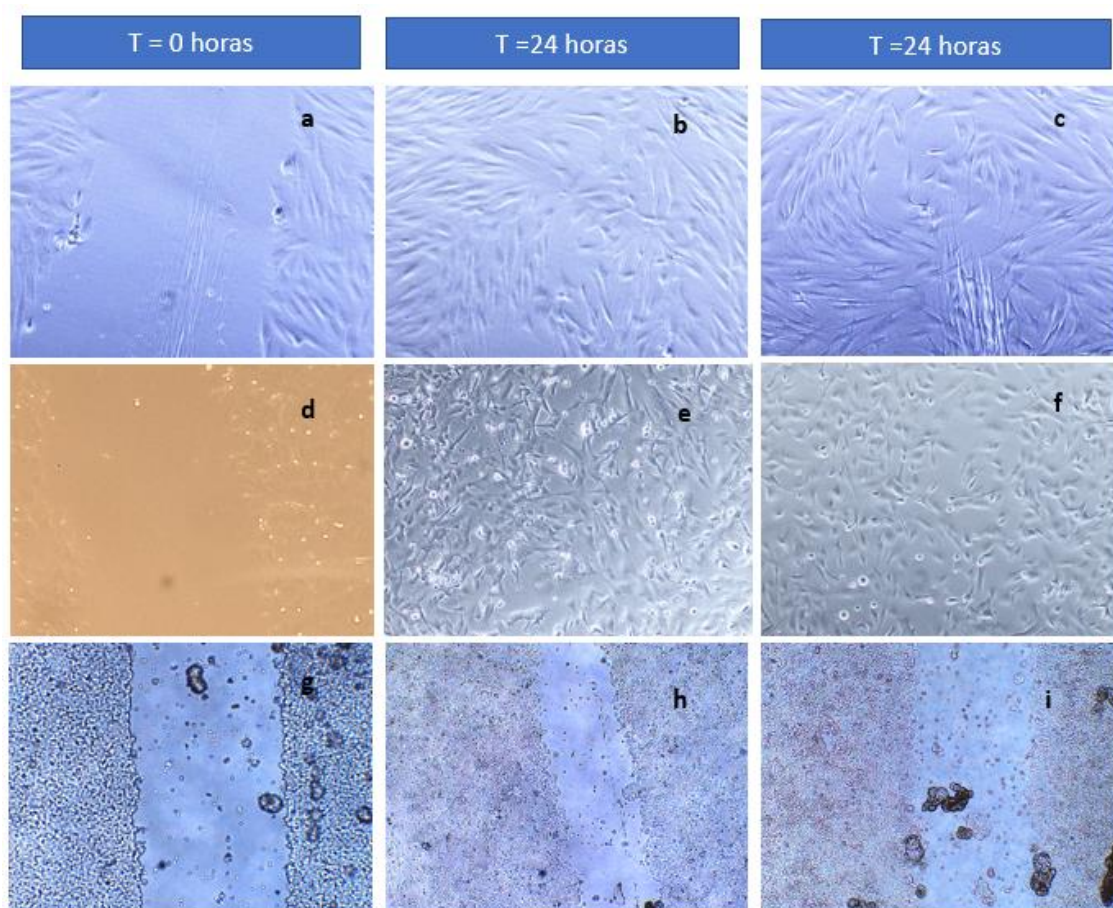


Figura 3.11. Ensaio de migração em fibroblastos (a, b, c), células endoteliais (d, e, f) e células MCF-7 (g, h, i) submetidas a tratamento com CdotsBmim a 0,2 mg/mL. Avaliação do fecho a 0 horas (a, d, g) e a 24 horas sem tratamento UV (b, e, h) e com UV preliminar (c, f, i)

3.4.2 Efeito dos CdotsGlu nos ensaios de migração celular

O tratamento com CdotsGlu a 0,2 mg/mL parece limitar a migração de fibroblastos e células endoteliais quando submetidas a radiação UV-A, de modo que a fenda não fecha completamente, enquanto que quando as células não são radiadas a fenda fecha por completo às 24 horas. No caso das células MCF-7, a fenda não fecha em nenhum dos casos, tanto na radiação, como nas células não radiadas.

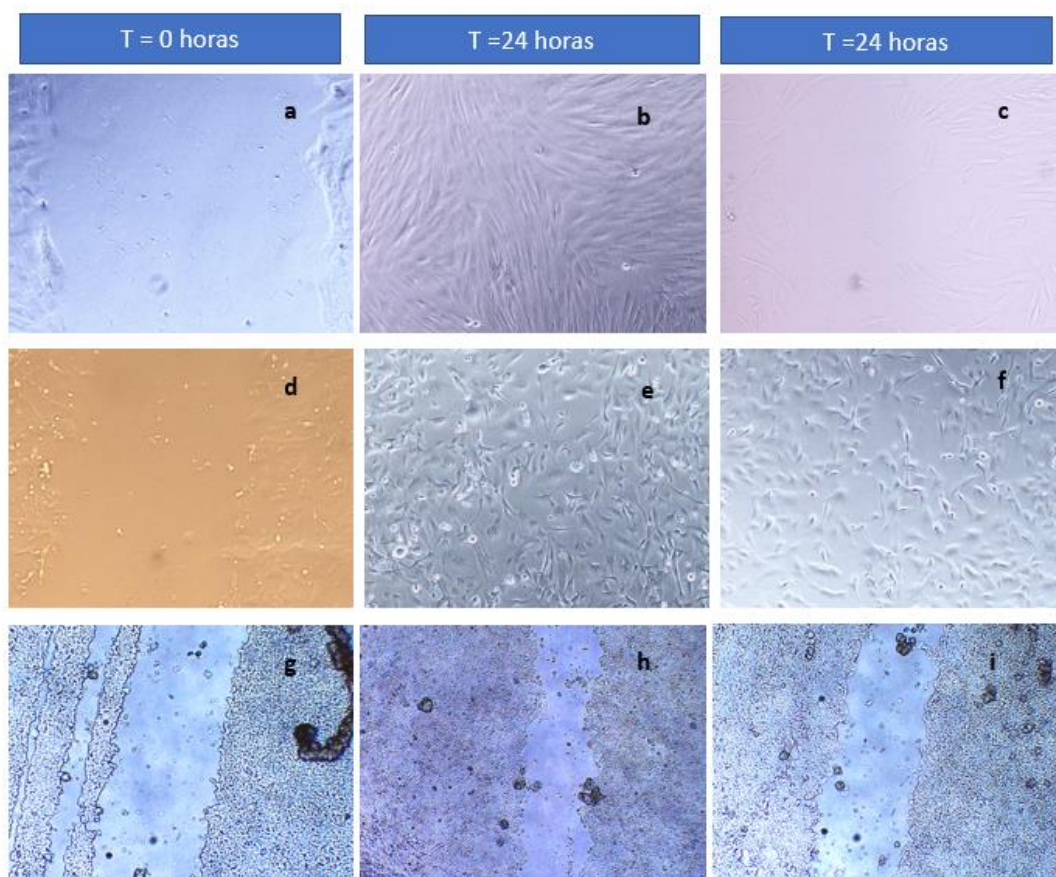


Figura 3.12. Ensaio de migração em fibroblastos (a, b, c), células endoteliais (d, e, f) e células MCF-7 (g, h, i) submetidas a tratamento com CdotsGlu a 0,2 mg/mL. Avaliação do fecho a 0 horas (a, d, g) e a 24 horas sem tratamento UV (b, e, h) e com UV (c, f, i)

3.4.3 Efeito dos CdotsChi nos ensaios de migração celular

O tratamento com CdotsChi a 0,2 mg/mL parece limitar a migração de fibroblastos e células de cancro da mama quando submetidas a radiação UV-A, de modo que a fenda não fecha completamente. Quando as células não são radiadas a fenda fecha por completo após 24 horas de tratamento com Cdots. No caso das células endoteliais a radiação parece estimular a migração, conseguindo-se fechar a fenda completamente às 24 horas.

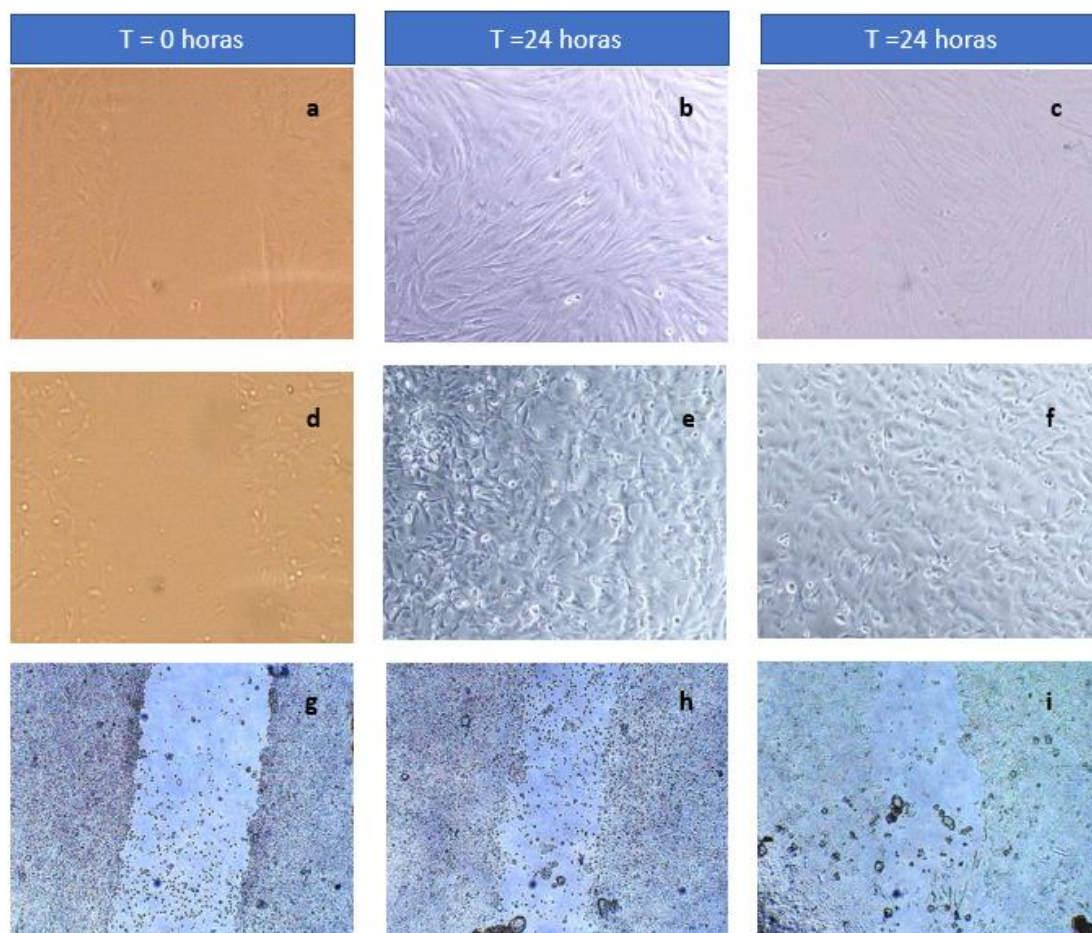


Figura 3.13. Ensaio de migração em fibroblastos (a, b, c), células endoteliais (d, e, f) e células MCF-7 (g, h, i) submetidas a tratamento com CdotsChi a 0,2 mg/mL. Avaliação do fecho a 0 horas (a, d, g) e a 24 horas sem tratamento UV (b, e, h) e com UV (c, f, i)

3.4.4 Efeito dos CdotsChitotal nos ensaios de migração celular

O tratamento com CdotsChitotal a 0,2 mg/mL parece limitar a migração de fibroblastos e quando submetidas a radiação UV-A, de modo que a fenda não fecha completamente. Quando as células não são radiadas a fenda fecha por completo às 24 horas. No caso das células endoteliais e as células MCF-7 a radiação parece estimular a migração, conseguindo-se fechar a fenda completamente às 24 horas.

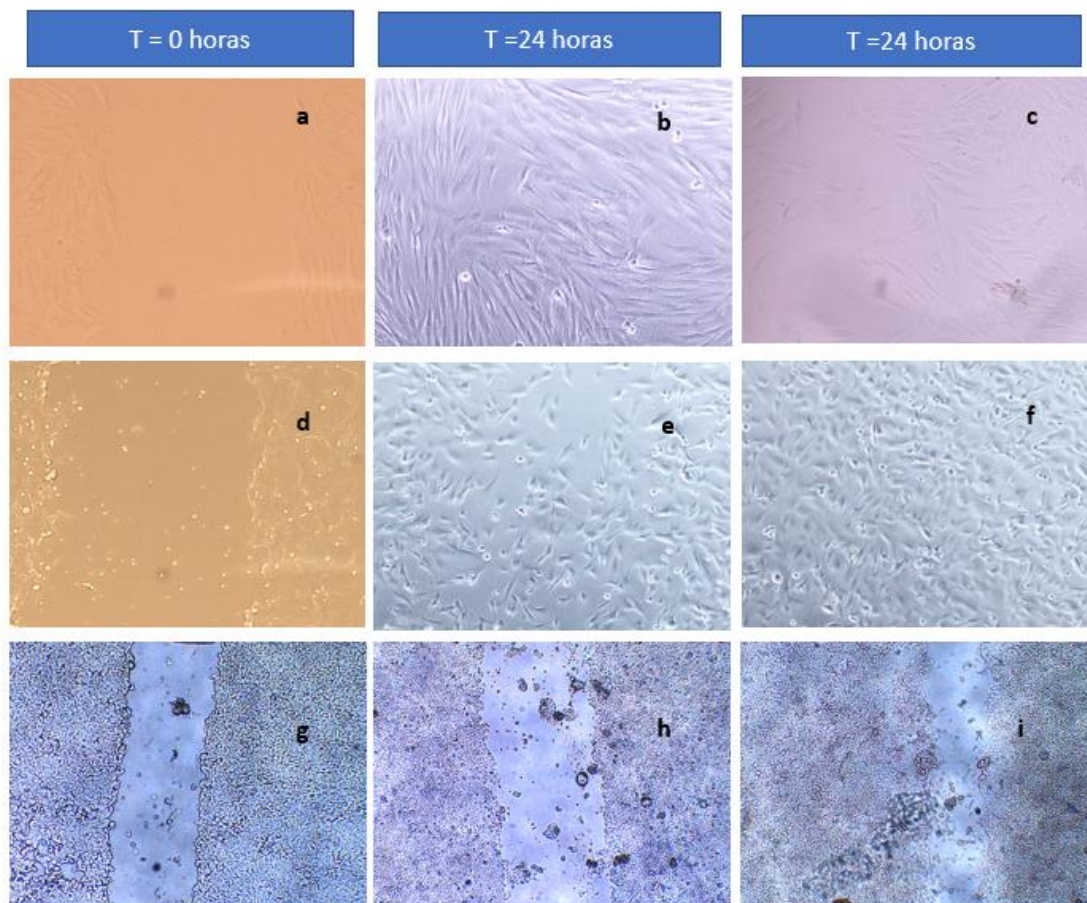


Figura 3.14. Ensaio de migração em fibroblastos (a, b, c), células endoteliais (d, e, f) e células MCF-7 (g, h, i) submetidas a tratamento com CdotsChi a 0,2 mg/mL. Avaliação do fecho a 0 horas (a, d, g) e a 24 horas sem tratamento UV (b, e, h) e com UV (c, f, i)

3.4.5 Efeito dos CdotsCocoon nos ensaios de migração celular

O tratamento com CdotsCocoon a 0,2 mg/mL parece limitar a migração de fibroblastos, células endoteliais e células de cancro da mama quando submetidas a radiação UV-A, de modo que a fenda não fecha completamente. Na ausência de radiação UV-A os fibroblastos e as células endoteliais fecham o dano celular após 24 horas. No caso das células MCF-7, a fenda não fecha em nenhum dos casos, tanto na radiação, como nas células não radiadas.

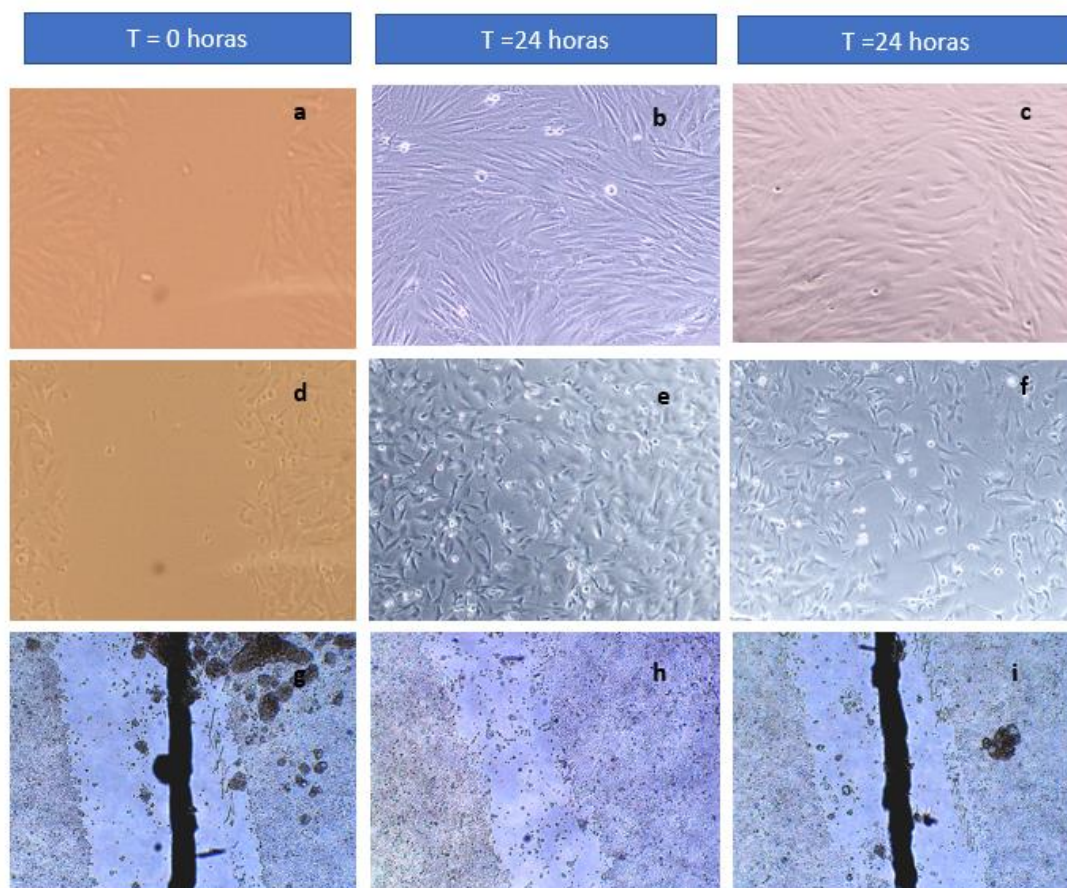


Figura 3.15. Ensaio de migração em fibroblastos (a, b, c), células endoteliais (d, e, f) e células MCF-7 (g, h, i) submetidas a tratamento com CdotsCocoon a 0,2 mg/mL. Avaliação do fecho a 0 horas (a, d, g) e a 24 horas sem tratamento UV (b, e, h) e com UV (c, f, i)

Capítulo 4 - Discussão

Em comparação com ensaios de viabilidade desenvolvidos com QDs por outros autores [36] [37] onde se media as mudanças na atividade metabólica de HDF, os nossos resultados são mais promissores, confirmando que os nanofluidos baseados em Cdots não causam uma diminuição da viabilidade causada pela natureza química dos QDs. [36]. A diminuição da citotoxicidade também pode-se dever à forma esférica dos Cdots testados, pois estudos realizados com nanotubos de carbono, medindo o seu efeito na viabilidade de fibroblastos humanos, concluíram que era necessária uma encapsulação dos mesmos para que a viabilidade diminuísse [37].

Em comparação com ensaios de viabilidade desenvolvidos com QDs por outros autores, medindo as mudanças na atividade metabólica de células HEK, os nossos resultados são muito mais promissores, confirmando que os nanofluidos baseados em Cdots não

causam uma diminuição da viabilidade causada pela natureza química dos QDs [36]. Estes resultados correspondem-se com os obtidos por outros autores para a toxicidade induzida por nanotubos de carbono em células HMEC-1, pelo que pode intuir-se que a forma não é um fator que influa na toxicidade do epitélio [38].

Em comparação com ensaios de viabilidade desenvolvidos com QDs por outros autores, medindo as mudanças, os nossos resultados são muito mais promissores, confirmando que os nanofluidos baseados em Cdots não causam uma diminuição da viabilidade causada pela natureza química dos QDs e até aumentam a viabilidade das células MCF-7 [39]. Contudo, este aumento da viabilidade reflete um aumento da atividade mitocondrial que poderá estar associada a um possível aumento de espécies reativas de oxigénio. No entanto, mais estudos necessitam de ser efetuados para avaliar os processos que levam a observarmos estes efeitos major. Estes resultados diferem com os obtidos por outros autores para a toxicidade induzida por nanotubos de carbono em células MCF-7, onde na mesma gama de concentrações obteve-se uma diminuição de até o 30% na viabilidade celular [40].

A nível da migração celular de células endoteliais e fibroblastos verificou-se que os CdotsGlu e CdotsCocoon para a concentração utilizada e na presença de Luz UV-A apresentam preenchimento do dano celular após as 24h, contudo ainda vemos alguma desorganização celular e algum espaçamento celular. No entanto a nível das células de cancro da mama, vemos que esse preenchimento é dificultado. Estes resultados parecem interessantes a nível de inibição do crescimento tumoral e possível inibição da vascularização das células tumorais. Contudo, mais estudos necessitam de ser realizados para validar as novas hipóteses levantadas com estas experiências. Na literatura observou-se que os Cdots na ausência de luz UV-A foram testados em linhas celulares de fibroblastos humanos e mostraram que aumentaram a viabilidade celular a concentrações de 0,5 a 1,5 mg/mL, e diminuíram ligeiramente a mesma a concentrações superiores (2 a 2,5 mg/mL). Na migração celular de fibroblastos os tratamentos com Cdots fecharam o dano celular em 24 horas em comparação com o controlo sem tratamento [14]. A literatura também descreve o potencial terapêutico destes Cdots na cicatrização da pele usando ensaios *in vivo* em modelos animais de rato, onde duas feridas circulares no dorso do animal foram tratadas topicamente uma com Cdots e outra com PBS (controlo), concluindo que os Cdots aceleram o processo de cicatrização. Ao fim de duas semanas as feridas tratadas com Cdots mostraram 80% de

cicatrização comparado com o controle onde a percentagem de cicatrização foi de 65% [14].

Janus et al. em 2019, verificou em ensaios com fibroblastos humanos e Cdots produzidos a partir de quitosano e síntese por micro-ondas, que estas nanopartículas apresentavam ausência de citotoxicidade [15]. Relativamente às células endoteliais, que formam os vasos sanguíneos e mimetizam os processos de vascularização, os Cdots exibiram uma resposta pro-angiogénica. Estudos sobre os mecanismos de sinalização celular após a internalização dos Cdots demonstraram que continua a ser necessária uma avaliação mais minuciosa da resposta das células endoteliais aos tratamentos com Cdots antes da sua aplicação *in vivo* [16].

A toxicidade das nanopartículas depende de múltiplos mecanismos moleculares e fisicoquímicos. As propriedades físico-químicas das nanopartículas influenciam como interatuam com as células e, assim, a sua toxicidade potencial geral. Teoricamente, o tamanho da partícula contribui para a citotoxicidade [25]. Dada a mesma massa, nanopartículas menores têm uma área de superfície específica maior (SSA) e, portanto, mais área de superfície disponível para interagir com componentes celulares, como ácidos nucleicos, proteínas, ácidos gordos e hidratos de carbono. Por outro lado, tamanhos mais pequenos possibilitam a entrada na célula, causando danos celulares. Em algumas nanopartículas, a toxicidade foi associada ao tamanho e à SSA [25]. A carga da superfície da partícula também pode afetar a absorção celular das partículas, bem como a forma como as partículas interagem com organelos e biomoléculas [25]. Consequentemente, a carga superficial da partícula influencia a citotoxicidade. De acordo com a probabilidade matemática e assumindo que as partículas são tóxicas, uma alta absorção de partículas correlaciona-se com maior toxicidade [25]. A toxicidade das nanopartículas aumenta com o aumento da carga superficial. Isso sugere que quanto maior a carga positiva da nanopartícula, maiores serão as interações eletrostáticas com a célula e, portanto, maior a captação por endocitose. A forma também afeta os níveis de toxicidade. A natureza química das partículas também afeta a toxicidade. Por exemplo, nanopartículas de óxido metálico podem elevar o nível de stresse oxidativo (OS) por meio da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS; por exemplo, $O_2 \cdot^-$, $OH \cdot$, H_2O_2). Essas espécies de alta energia podem atacar lipídios, ácidos nucleicos, proteínas e outras biomoléculas essenciais. As consequências da presença de ROS incluem danos à estrutura mitocondrial, despolarização da membrana mitocondrial, comprometimento

da cadeia de transporte de electrões e a ativação de um sistema semelhante ao NADPH [25].

A PDT é um tratamento efetivo e clinicamente aprovado para a eliminação de tumores sem recorrer a cirurgia invasiva, eliminando as células tumorais mediante o uso de ROS, que são gerados por um fotosensitizador (PS) baixo irradiação [26]. Em comparação com os tratamentos convencionais, a PDT tem numerosas vantagens, como a mínima invasão e poucos efeitos secundários. O único inconveniente salientável é que a localização intracelular do PS pode influenciar a atuação final do PDT [27].

O procedimento geral da PDT envolve a administração sistémica, local ou tópica de um composto não toxico conhecido como fotosensitizador (PS), seguido da iluminação seletiva com luz a um comprimento de onda e potência adequadas. Na presença de oxigénio, o PS pode transferir a energia fotónica absorvida às moléculas de oxigénio próximas, gerando ROS. Na ausência de fonte radioativa de excitação o PS continua a inerte [28]. Porém, os PS eficientes consomem o oxigénio muito rapidamente, o que agrava o ambiente de hipoxia, no qual os tumores proliferam e a PDT torna-se insustentável [26]. Como solução ao problema da hipoxia, algumas estratégias sugeriram o incremento do conteúdo em oxigénio diretamente, mediante veículos físicos e reações químicas. Não obstante, em células tumorais o tempo de vida dos ROS produzidos é dramaticamente restrito até o nível dos nanossegundos e a sua distância efetiva será só de dezenas de nanómetros. Como resultado, a maioria dos ROS são desativados antes de matar as células cancerígenas e o incremento do oxigénio representa um baixo impacto na eficácia do tratamento. Neste contexto, maximizar a utilidade do oxigénio disponível e uma localização mais efetiva, poderá ser a estratégia mais promissora para converter a elevada eficiência do PS *in vitro* na capacidade de eliminar o tumor *in vivo* [26].

O local mais efetivo dentro da célula no que o PS deverá atuar será o mais próximo ao núcleo da célula tumoral, pois aí se encontra o DNA requerido na divisão celular. No entanto, os PS convencionais dificilmente podem penetrar no núcleo celular devido a membrana nuclear protetora. No entanto, os Cdots têm exibido fortes efeitos fotodinâmicos, com usos relevantes em terapias contra o cancro. Quando estão em ambiente tumoral e na presença de oxigénio os Cdots atuam como PS produzindo ROS. Estudos recentes sugerem a possibilidade de adequar a síntese dos Cdots para alcançar o núcleo celular, promovendo a eliminação efetiva da célula tumoral [26].

Como mencionado anteriormente, os Cdots também foram já usados como libertadores de fármacos e outras moléculas, assim como na transferência génica. Um exemplo desta aplicação é o uso de Cdots modificados com ácido fólico para o reconhecimento das células cancerígenas que superexpressam o recetor de folato, promovendo assim uma rota efetiva para o desenvolvimento de triagem celular e diagnóstico clínico. Outra modificação típica dos Cdots é a dopagem da superfície com polietilenamida, PEI, que permite a transferência génica de DNA porque apresenta carga positiva. Em relação com esta modificação Liu *et al* avaliaram a capacidade de transporte dos Cdots e concluíram que permitiam a transferência do DNA, e graças às propriedades de fotoluminescência, também se podia visualizar o plasmídeo de DNA durante a transferência, fornecendo informação detalhada sobre a função fisiológica do mesmo [13].

Capítulo 5 - Conclusão

Os Cdots são nanopartículas esféricas, cujas propriedades eletrónicas as tornam num material versátil e com aplicações destacadas em biomedicina. Através dos ensaios de biocompatibilidade com diferentes linhas celulares verificou-se que os tratamentos com os nanoflúidos de Cdots de diferentes origens tinham efeitos diferentes nas três linhas celulares. Por outro lado, a gama de concentrações com Cdots usada no tratamento das 3 linhas celulares na ausência e presença de irradiação com luz UV induziram um efeito diferente nas células. Também se concluiu que a concentração de 0,2 mg/mL era a mais favorável, devido, possivelmente a uma melhor dispersibilidade das nanopartículas.

Capítulo 6 - Perspetivas futuras

De forma a explorar os processos através dos quais os tratamentos com Cdots atuam a nível da viabilidade, proliferação e migração celular nestas três linhas celulares, seria de todo o interesse realizar os seguintes ensaios:

- 1) o doseamento das espécies reativas de oxigénio (stress oxidativo);
- 2) o doseamento da atividade das enzimas anti-oxidantes da célula (stress oxidativo);

- 3) a quantificação do número de estruturas capilares formadas (angiogénese);
- 4) realização de ensaios *in vivo* em modelos animais (drosófila, musgarenhos, peixe Zebra)

Capítulo 7 - Referências

1. Vaz, R., Vieira, K. O., Machado, C. E., Ferrari, J. L., & Schiavon, M. A. (2015). Preparação de pontos de carbono e sua caracterização óptica: Um experimento para introduzir nanociência na graduação. *Quimica Nova*, 38(10), 1366–1373. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150150>
2. Luo, P. G., Yang, F., Yang, S. T., Sonkar, S. K., Yang, L., Broglie, J. J. U., ... Sun, Y. P. (2014). Carbon-based quantum dots for fluorescence imaging of cells and tissues. *RSC Advances*, 4(21), 10791–10807. <https://doi.org/10.1039/c3ra47683a>
3. Wang, Z., Liao, H., Wu, H., Wang, B., Zhao, H., & Tan, M. (2015). Fluorescent carbon dots from beer for breast cancer cell imaging and drug delivery. *Analytical Methods*, 7(20), 8911–8917. <https://doi.org/10.1039/c5ay01978h>
4. Zhu, S., Song, Y., Zhao, X., Shao, J., Zhang, J., & Yang, B. (2015). The photoluminescence mechanism in carbon dots (graphene quantum dots, carbon nanodots, and polymer dots): current state and future perspective. *Nano Research*, 8(2), 355–381. <https://doi.org/10.1007/s12274-014-0644-3>
5. Chan, K. K., Yap, S. H. K., & Yong, K. T. (2018). *Biogreen Synthesis of Carbon Dots for Biotechnology and Nanomedicine Applications*. *Nano-Micro Letters* (Vol. 10). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/s40820-018-0223-3>
6. Gonçalves, H. M. R., Pereira, R. F. P., Lepleux, E., Carlier, T., Pacheco, L., Pereira, S., ... de Zea Bermudez, V. (2019). Nanofluid Based on Glucose-Derived Carbon Dots Functionalized with [Bmim]Cl for the Next Generation of Smart Windows. *Advanced Sustainable Systems*, 3(7), 1–10. <https://doi.org/10.1002/adsu.201900047>
7. Li, Z., Ni, P., Dai, H., Li, Z., Sun, Y., Hu, J., ... Wang, Y. (2015). Carbon dots based fluorescent sensor for sensitive determination of hydroquinone. *Talanta*, 144, 258–262. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.06.014>
8. Shi, H., Wei, J., Qiang, L., Chen, X., & Meng, X. (2014). Fluorescent carbon dots for bioimaging and biosensing applications. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 10(10), 2677–2699. <https://doi.org/10.1166/jbn.2014.1881>

9. Azizi, M., Valizadeh, H., Shahgolzari, M., Talebi, M., Baybordi, E., Dadpour, M. R., ... Mehrmohammadi, M. (2020). Synthesis of Self-Targeted Carbon Dot with Ultrahigh Quantum Yield for Detection and Therapy of Cancer. *ACS Omega*, 5(38), 24628–24638. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03215>
10. Jhonsi, M. A. (2018). Carbon Quantum Dots for Bioimaging. *State of the Art in Nano-Bioimaging*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72723>
11. Zhu, S., Song, Y., Zhao, X., Shao, J., Zhang, J., & Yang, B. (2015). The photoluminescence mechanism in carbon dots (graphene quantum dots, carbon nanodots, and polymer dots): current state and future perspective. *Nano Research*, 8(2), 355–381. <https://doi.org/10.1007/s12274-014-0644-3>
12. Zheng, A., Guo, T., Guan, F., Chen, X., Shu, Y., & Wang, J. (2019). Ionic liquid mediated carbon dots: Preparations, properties and applications. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 119, 115638. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115638>
13. Tuerhong, M., XU, Y., & YIN, X. B. (2017). Review on Carbon Dots and Their Applications. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 45(1), 139–150. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(16\)60990-8](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(16)60990-8)
14. Bankoti, K., Rameshbabu, A. P., Datta, S., Das, B., Mitra, A., & Dhara, S. (2017). Onion derived carbon nanodots for live cell imaging and accelerated skin wound healing. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(32), 6579–6592. <https://doi.org/10.1039/c7tb00869d>
15. Roshini, A., Jagadeesan, S., Cho, Y. J., Lim, J. H., & Choi, K. H. (2017). Synthesis and evaluation of the cytotoxic and anti-proliferative properties of ZnO quantum dots against MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells. In *Materials Science and Engineering C* (Vol. 81). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.08.014>
16. Sharma, A., Panwar, V., Chopra, V., Thomas, J., Kaushik, S., & Ghosh, D. (2019). Interaction of Carbon Dots with Endothelial Cells: Implications for Biomedical Applications [Research-article]. *ACS Applied Nano Materials*, 2(9), 5483–5491. <https://doi.org/10.1021/acsanm.9b01080>
17. Bui, T. T., & Park, S. Y. (2016). A carbon dot-hemoglobin complex-based biosensor for cholesterol detection. *Green Chemistry*, 18(15), 4245–4253. <https://doi.org/10.1039/c6gc00507a>

18. Ye, Q., Chen, S., Zhu, D., Lu, X., & Lu, Q. (2015). Preparation of aggregation-induced emission dots for long-term two-photon cell imaging. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(15), 3091–3097. <https://doi.org/10.1039/c5tb00207a>
19. WHO. (2020). WHO Cancer Report 2020 Global Profile. 2020, 2019, 2019–2020. www.paho.org
20. Mohammadi, S., Salimi, A., Hamd-Ghadareh, S., Fathi, F., & Soleimani, F. (2018). A FRET immunosensor for sensitive detection of CA 15-3 tumor marker in human serum sample and breast cancer cells using antibody functionalized luminescent carbon-dots and AuNPs-dendrimer aptamer as donor-acceptor pair. *Analytical Biochemistry*, 557(June), 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.06.008>
21. Ghosh, S., Ghosal, K., Mohammad, S. A., & Sarkar, K. (2019). Dendrimer functionalized carbon quantum dot for selective detection of breast cancer and gene therapy. *Chemical Engineering Journal*, 373(April), 468–484. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.05.023>
22. Wu, F., Su, H., Cai, Y., Wong, W. K., Jiang, W., & Zhu, X. (2018). Porphyrin-Implanted Carbon Nanodots for Photoacoustic Imaging and in Vivo Breast Cancer Ablation. *ACS Applied Bio Materials*, 1(1), 110–117. <https://doi.org/10.1021/acsabm.8b00029>
23. Kong, T., Hao, L., Wei, Y., Cai, X., & Zhu, B. (2018). Doxorubicin conjugated carbon dots as a drug delivery system for human breast cancer therapy. *Cell Proliferation*, 51(5), 1–9. <https://doi.org/10.1111/cpr.12488>
24. Shu, M., Gao, F., Yu, C., Zeng, M., He, G., Wu, Y., ... Yang, Z. (2020). Dual Targeted Therapy in HER2-positive Breast Cancer Cells with the Combination of Carbon Dots/HER3 siRNA and Trastuzumab. *Nanotechnology*. <https://doi:10.1088/1361-6528/ab8a8a>
25. Xu, N., Du, J., Yao, Q., Ge, H., Li, H., Xu, F., ... Peng, X. (2020). Precise photodynamic therapy: Penetrating the nuclear envelope with photosensitive carbon dots. *Carbon*, 159, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2019.12.002>
26. Huang, Y. W., Cambre, M., & Lee, H. J. (2017). The Toxicity of Nanoparticles Depends on Multiple Molecular and Physicochemical Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12). <https://doi.org/10.3390/ijms18122702>

27. Pang, W., Jiang, P., Ding, S., Bao, Z., Wang, N., Wang, H., ... Wei, X. (2020). Nucleolus-Targeted Photodynamic Anticancer Therapy Using Renal-Clearable Carbon Dots. *Advanced Healthcare Materials*, 9(16), 1–8. <https://doi.org/10.1002/adhm.202000607>
28. Huang, P., Lin, J., Wang, X., Wang, Z., Zhang, C., He, M., ... Chen, X. (2012). Light-triggered theranostics based on photosensitizer-conjugated carbon dots for simultaneous enhanced-fluorescence imaging and photodynamic therapy. *Advanced Materials*, 24(37), 5104–5110. <https://doi.org/10.1002/adma.201200650>
29. Lei, Z., Chen, B., Koo, Y. M., & Macfarlane, D. R. (2017). Introduction: Ionic Liquids. *Chemical Reviews*, 117(10), 6633–6635. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00246>
30. Berthod, A., Ruiz-Ángel, M. J., & Carda-Broch, S. (2008). Ionic liquids in separation techniques. *Journal of Chromatography A*, 1184(1–2), 6–18. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.11.109>
31. Gonçalves, H. M. R., Pereira, R. F. P., Lepleux, E., Carlier, T., Pacheco, L., Pereira, S., Valente, A. J. M., Fortunato, E., Duarte, A. J., & de Zea Bermudez, V. (2019). Nanofluid Based on Glucose-Derived Carbon Dots Functionalized with [Bmim]Cl for the Next Generation of Smart Windows. *Advanced Sustainable Systems*, 3(7), 1–10. <https://doi.org/10.1002/adsu.201900047>
32. Gonçalves, H. M. R., Pereira, R. F. P., Lepleux, E., Pacheco, L., Valente, A. J. M., Duarte, A. J., & de Zea Bermudez, V. (2020). Non-Newtonian Thermosensitive Nanofluid Based on Carbon Dots Functionalized with Ionic Liquids. *Small*, 16(28), 1–11. <https://doi.org/10.1002/smll.201907661>
33. Kuete, V., Karaosmanoğlu, O., & Sivas, H. (2017). Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. *Medicinal Spices and Vegetables from Africa: Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases*, 271–297. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00010-8>
34. Jonkman, J. E. N., Cathcart, J. A., Xu, F., Bartolini, M. E., Amon, J. E., Stevens, K. M., & Colarusso, P. (2014). An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell Adhesion and Migration*, 8(5), 440–451. <https://doi.org/10.4161/cam.36224>

35. Protocolo do reagente BrdU Creative Biolabs <https://www.antibody-creativebiolabs.com/brdu-protocol.htm>
36. Ficha técnica do reagente BrdU: B23151 ThermoFisher <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/B23151#/B23151>
37. Romoser, A. A., Chen, P. L., Berg, J. M., Seabury, C., Ivanov, I., Criscitiello Michael F., M. F., & Sayes, C. M. (2011). Quantum dots trigger immunomodulation of the NFκB pathway in human skin cells. *Molecular Immunology*, 48(12–13), 1349–1359. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2011.02.009>
38. Sayes, C. M., Liang, F., Hudson, J. L., Mendez, J., Guo, W., Beach, J. M., Moore, V. C., Doyle, C. D., West, J. L., Billups, W. E., Ausman, K. D., & Colvin, V. L. (2006). Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity in vitro. *Toxicology Letters*, 161(2), 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.08.011>
39. Chen, Y. L., Chiang, J. Y., Chou, H. T., Fu, C. Y., Chen, Y. C., Lee, C. Y., Tai, N. H., & Chang, H. Y. (2017). Toxicity analysis of poly(sodium-4-styrenesulfonate) coated graphene on HMEC-1 cells under dynamic conditions mimicking blood flow. *RSC Advances*, 7(82), 51910–51918. <https://doi.org/10.1039/c7ra08286j>
40. Romoser, A., Ritter, D., Majitha, R., Meissner, K. E., McShane, M., & Sayes, C. M. (2011). Mitigation of quantum dot cytotoxicity by microencapsulation. *PLoS ONE*, 6(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022079>
41. Siddiqui, M. A., Wahab, R., Ahmad, J., Farshori, N. N., Musarrat, J., & Al-Khedhairi, A. A. (2017). Evaluation of cytotoxic responses of raw and functionalized multi-walled carbon nanotubes in human breast cancer (MCF-7) cells. *Vacuum*, 146, 578–585. <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2017.05.022>

