



UnB

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

TESE DE DOUTORADO

Tecnologias de Novos Materiais Fotoluminescentes: Sínteses e Aplicações Biológicas

Carime Vitória da Silva Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Oliveira Rodrigues

Coorientadora: Profa. Dra. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio

Supervisora em exterior: Profa. Dra. Ana de Bettencourt-Dias (University of Nevada-Reno)

Brasília, DF

2021



UnB

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

TESE DE DOUTORADO

Tecnologias de Novos Materiais Fotoluminescentes: Sínteses e Aplicações Biológicas

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de Brasília, como requisito parcial
para obtenção do título de Doutora em Química.

Carime Vitória da Silva Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Oliveira Rodrigues

Coorientadora: Profa. Dra. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio

Supervisora em exterior: Profa. Dra. Ana de Bettencourt-Dias (University of Nevada-Reno)

Brasília, DF

2021

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha querida Elisa.
“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.”
Marie Curie

Agradecimentos

A Deus, pela força e saúde para superar os desafios diários;

A minha família, pelo apoio, carinho e cuidado constantes;

A meus amigos, pelos momentos de descontração;

Especialmente, a meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Oliveira Rodrigues, por todo o conhecimento, pela orientação cuidadosa, e também pela amizade e compreensão;

A minha coorientadora, Profa. Dra. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio, por todo apoio e paciência;

A minha supervisora no exterior, Dra. Ana de Bettencourt-Dias pela oportunidade e por todos os ensinamentos durante meu período na Universidade de Nevada-Reno;

Ao Prof. Dr. Brenno Amaro da Silveira Neto pela parceria, amizade e valiosos conselhos;

A todos os colegas do LIMA e da KrillTech Nanotecnologia Agro pela amizade e ajuda;

Aos Professores Dr. Sacha Braun, Dra. Izabela Cristina Rodrigues da Silva, Dr. Luiz Kanzaki, Dra. Ingrid Távora Weber, Dr. José Raimundo Corrêa e Dr. Ciro Martins Gomes por terem contribuído para minha formação;

Às amigas Nara Kanzaki e Cintya D'Angelis, que ajudaram em alguns experimentos;

A todos os funcionários e colegas do Instituto de Química (IQ), especialmente à Larissa Pinheiro que tornaram o trabalho mais leve com suas simpatias e gentilezas.

À Universidade de Brasília (UnB) e ao IQ, pela oportunidade de fazer um doutorado, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES), pela bolsa de estudos no Brasil e no exterior, à Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) e ao Decanato de Pós-Graduação da UnB(DPP-UnB), por terem contribuído para o financiamento de minha pesquisa, e ao Instituto Sabin, por meio do Núcleo de Apoio à pesquisa, pelos exames bioquímicos e hemogramas;

Ao Rafael Andrade Rocha, veterinário responsável pelo biotério da Faculdade de Saúde;

À Viviane Medeiros Silva, técnica do Laboratório de Dermatômica e colega de doutorado;

Ao Tercio Rodrigues Pereira, técnico do Laboratório de Dermatômica;

Ao Frederico Hillesheim Horst;

Aos professores da banca por terem aceitado o convite;

E a todos os que contribuíram de alguma maneira para este trabalho;

MUITO OBRIGADA!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)- Código de Financiamento 001.

Resumo

A descrição da síntese, caracterização e aplicação biológica de três novos sistemas fotoluminescentes são apresentadas nesta Tese de Doutorado. No Capítulo 3 é apresentado a síntese, caracterização e aplicação de duas novas moléculas derivadas de tiofeno-dipicolinato, **K_{2n}Tdpa** (**n** = 1 ou 2). Os ânions resultantes destes ligantes foram usados como antenas de íons Ln³⁺ (Gd³⁺, Yb³⁺ e Eu³⁺). Os sistemas fotoluminescentes foram capazes de gerar ¹O₂ em solução aquosa e, por isto, foram testados como fotossensibilizadores de Terapia Fotodinâmica (TFD) em vitro com células HeLa. Experimentos de bioimageamento mostraram que um dos derivados transpôs a membrana celular das células e se acumulou-se preferencialmente nas mitocôndrias. Os valores de IC₅₀ foram explorados, sendo que o composto mais potente entre os testados foi o K₃[Gd(**2Tdpa**)₃], com IC₅₀ = 2,35 µM (λ = 365 nm). Os mecanismos de morte celular foram investigados por meio de citometria de fluxo e observou-se que a morte das células ocorreu predominantemente por necrose nas condições utilizadas nos experimentos. No Capítulo 4 nanopartículas de carbono bioativas com superfícies funcionalizadas com grupo derivado de ácido fenilborônico (**PBAC-Dots**) foram produzidas com sucesso, utilizando-se esterco de vaca como fonte de carbono. As propriedades ópticas e estruturais dos **PBAC-Dots** foram investigadas e experimentos em vitro (em células melanoma murino - B16F10 e fibroblastos murino - NIH3T3) e em vivo (camundongos C57BL/6 saudáveis e com melanoma) foram conduzidos. Os experimentos indicaram a baixa toxicidade dos nanomateriais. O efeito *light-up* dos **PBAC-Dots** permitiu que eles fossem explorados em experimentos de detecção de glicose e de bioimageamento em células MCF-7, nos quais houve acumulação seletiva na região mitocondrial. Experimentos de bioimageamento em vivo revelaram que os **PBAC-Dots** foram eliminadas pelo sistema urinário dos animais. As investigações histológicas mostraram que os tumores de camundongos tratados com **PBAC-Dots** apresentaram um grande número de regiões com necrose e infiltrados inflamatórios, o que não foi identificado em camundongos com câncer e sem o tratamento. Esses resultados sugerem que os **PBAC-Dots** têm potencial para serem explorados como um agente de imunoterapia para o tratamento de melanoma. No Capítulo 5 descreve-se a síntese de **C-Dots** com tamanhos entre 3,3 e 6,7 nm, os quais foram produzidos a partir de método sintético barato e reprodutível. As nanopartículas foram usadas como nanocarreadores fluorescentes de Anfotericina B (AnB), um antifúngico com poucos relatos de resistência, mas que tem uso limitado devido à sua alta tendência à aglomeração, o que causa efeitos colaterais ao paciente. Este sistema foi chamado de **AnB@C-Dots** e foi capaz

de estabilizar em solução aquosa até 1 mg mL^{-1} de AnB. A nova nanoformulação fluorescente foi testada para tratar a leishmaniose cutânea causada pelo protozoário *Leishmania (V.) braziliensis* em um experimento em vivo com camundongos Balb/c. Critérios de eficácia e toxicidade foram avaliados de forma a comparar a **AnB@C-Dots** com formulações comerciais. O grupo tratado com **AnB@C-Dots** apresentou viabilidade celular das *Leishmanias* significativamente igual ao grupo tratado com Ambisome[®], uma formulação de AnB de alto custo. As dosagens de ureia e fosfatase alcalina sugerem que a **AnB@C-Dots** causa menor toxicidade aos rins e ao fígado do que as formulações tradicionais de AnB. Estes resultados indicaram que a **AnB@C-Dots** tem potencial para vir a ser uma formulação de AnB mais barata, eficaz e menos tóxica do que as atualmente utilizadas.

Palavras-chave: Luminescência, Lantanídeos, Terapia fotodinâmica, Bioimageamento, C-Dots, Engenharia de superfície, Detecção de glicose, Imunoterapia, Anfotericina B, *Leishmania (V.) braziliensis*.

Abstract

The synthesis, characterization and biological application of three new photoluminescent systems have been described in the current Doctoral Thesis. In Chapter 3, the synthesis, characterization and application of two new thiophene-dipicolinate derivatives, **K_{2n}Tdpa** (n = 1 or 2) have been presented. The ligands have afforded anions which could be used as antennas for Ln³⁺ ions (Gd³⁺, Yb³⁺ and Eu³⁺). The photoluminescent systems have been able to generate ¹O₂ in aqueous solution and, therefore, they could be tested in vitro as photosensitizers agents for Photodynamic Therapy (PDT) with HeLa cells lineage. Bioimaging experiments have shown that one of these derivatives was capable of transposing the cells' membranes and was localized preferentially at the mitochondria. IC₅₀ values have been obtained and the most potent compound among those tested was K₃[Gd(**2Tdpa**)₃], with IC₅₀ = 2.35 μM (λ = 365 nm). Cell death mechanisms have also been investigated by means of flow cytometry and it has been observed that cell death have occurred predominantly by necrosis at the tested conditions. In Chapter 4, bioactive carbon nanoparticles with functionalized surfaces bearing phenylboronic acid (**PBAC-Dots**) groups have been successfully produced from cow manure as the carbon source. The optical and structural properties of **PBAC-Dots** have also been investigated and both in vitro experiments (in murine melanoma cells - B16F10 and murine fibroblasts - NIH3T3) and in vivo (healthy and melanoma bearing C57BL/6 mice) experiments have been conducted. The experiments have indicated the low toxicity of the nanomaterial. The light-up effect of **PBAC-Dots** have enabled both a sensitive glucose detection and selective staining in bioimaging experiments in MCF-7 cells. A selective accumulation in the mitochondrial region have been performed using the developed fluorescent nanosystem. In vivo bioimaging experiments have also revealed that **PBAC-Dots** were eliminated by the urinary system of the animals. Histological investigations have shown that tumors from mice treated with **PBAC-Dots** display a large number of regions with necrosis and inflammatory infiltrates, which were not noted in those mice with cancer and without treatment. These results have suggested that **PBAC-Dots** bear the potential to be explored as an immunotherapy agent for melanoma treatment. In Chapter 5, designed **C-Dots** with sizes between 3.3-6.7 nm have been presented, which were obtained from a cheap and reproducible synthetic method. The synthesized nanoparticles have been used as fluorescent nanocarriers of AmB, a known antifungal agent with few reports of resistance, but with limited use due to its high agglomeration tendency, which causes side effects on patients. This system has been called **AmB@C-Dots** and was able

to stabilize up to 1 mg mL⁻¹ of AmB in aqueous solution. The new fluorescent nanoformulation has been tested to treat a cutaneous leishmaniasis caused by the protozoan *Leishmania (V.) braziliensis* during in vivo experiment with Balb/c mice. Efficacy and toxicity criteria have been acquired in order to compare **AmB@C-Dots** with commercially available formulations. The group treated with **AmB@C-Dots** has presented cell viability of *Leishmanias* significantly equal to the group treated with Ambisome[®], a high-cost formulation of AmB. The dosages of urea and alkaline phosphatase have suggested that **AmB@C-Dots** afforded less toxicity to the kidneys and liver than traditional formulations of AmB. These results have indicated that **AmB@C-Dots** have the potential to become a cheaper, more effective and less toxic formulation of AmB than those currently and widely used.

Keywords: Luminescence, Lanthanides, Photodynamic therapy, Bioimaging, C-Dots, Surface engineering, Glucose detection, Immunotherapy, Amphotericin B, *Leishmania (V.) braziliensis*.

Sumário

Resumo.....	vi
Abstract	viii
Índice de esquemas	xiv
Índice de equações	xv
Índice de figuras	xvi
Índice de tabelas.....	xxiv
Lista de abreviaturas e acrônimos	xxvi
Capítulo 1	1
Introdução geral e Revisão bibliográfica	1
1. Introdução geral	2
1.1. Revisão bibliográfica	3
1.1.1. Uso de sistemas luminescentes na medicina	3
Capítulo 2.....	10
Materiais e métodos	10
2.1. Geral.....	11
2.2. Sínteses.....	11
2.2.1. Síntese de H₂nTdpa (n = 1 ou 2).....	11
2.2.2. Síntese dos complexos (K₃[Ln(nTdpa)₃] , n = 1 ou 2).....	16
2.2.3. Síntese de PBAC-Dots (Capítulo 4).....	18
2.2.4. Síntese dos C-Dots contendo boro na estrutura (Capítulo 5).....	19
2.2.5. Preparo de AnB@C-Dots (Capítulo 5).....	20
2.3. Caracterização espectroscópica.....	20
Titulações com Glicose e Anfotericina B (AnB)	21
2.4. Outras caracterizações.....	23
2.5. Experimentos de cultivo celular.....	24

2.6. Experimentos em vivo.....	28
2.6.1. Avaliação da toxicidade de PBAC-Dots	28
2.6.2. Avaliação da eficácia e toxicidade da contra Leishmania.....	30
2.6.2.1. Critérios para a avaliação da eficácia	33
2.6.2.2. Critérios para a avaliação de toxicidade.....	35
2.6.3. Análise de lâminas por histologia	36
Capítulo 3	38
Síntese e Caracterização de Complexos de Íons Lantanídeos Luminescentes a Partir de Ligantes Tiofeno e Bitiofeno-Dipocolinato para Terapia Fotodinâmica	38
3.1. Introdução	39
3.2. Revisão bibliográfica	40
3.2.1. Íons lantanídeos.....	40
3.2.2. Ligantes utilizados como antenas.....	41
3.2.3. Terapia fotodinâmica.....	43
3.3. Objetivos	47
3.3.1. Objetivo geral.....	47
3.3.2. Objetivos específicos	47
3.4. Resultados e discussão	48
3.5. Conclusões	66
3.6. Perspectivas.....	68
Capítulo 4.....	69
C-Dots Sintetizados a partir de esterco de vaca bioativos: uma sonda para detecção de glicose, bioimageamento e potencial agente de imunoterapia para melanoma.....	69
4.1. Introdução	70
4.2. Revisão bibliográfica	72
4.2.1. Nanotecnologia no tratamento de cânceres.....	72
4.2.2. Melanoma.....	73

4.2.3.	Quantum dots de carbono (C-Dots)	74
4.3.	Objetivos	76
4.3.1.	Objetivo geral.....	76
4.3.2.	Objetivos específicos	76
4.4.	Resultados e discussão	77
4.5.	Conclusões	94
4.6.	Perspectivas.....	95
Capítulo 5	96
Desenvolvimento de Nanoformulação de Anfotericina B para o Tratamento de Leishmaniose Tegumentar Americana		
		96
5.1.	Introdução	97
5.2.	Revisão bibliográfica	98
5.2.1.	Anfotericina B.....	98
5.2.2.	Leishmaniose.....	103
5.2.3.	C-Dots como carreadores de fármacos.....	107
5.3.	Objetivos	109
5.3.1.	Objetivo geral.....	109
5.3.2.	Objetivos específicos	109
5.4.	Resultados e discussão	110
5.4.1.	Caracterização dos C-Dots	110
5.4.2.	Caracterização do sistema AnB@C-Dots	118
5.4.3.	Avaliação da eficácia e da toxicidade da AnB@C-Dots contra Leishmania em vivo	
	122	
5.4.3.1.	CrITÉRIOS para a avaliação da eficácia.....	125
5.4.3.2.	CrITÉRIOS para a avaliação da toxicidade.....	128
5.5.	Conclusões	137
5.6.	Perspectivas.....	139

Capítulo 6.....	140
Conclusões e perspectivas gerais	140
6.1. Conclusões gerais.....	141
6.2. Perspectivas gerais	143
Referências	144
Anexos.....	177

Índice de esquemas

Esquema 3. 1. Síntese dos precursores ligantes H_{2n}Tdpa (n = 1 ou 2).	50
Esquema 3. 2. Formação dos complexos $K_3[Ln(1Tdpa)_3]$ e $K_3[Ln(2Tdpa)_3]$ ($Ln^{3+} = Eu^{3+}$, Gd^{3+} e Yb^{3+}) a partir de H₂₁Tdpa e H₂₂Tdpa	52
Esquema 4. 1. Formação de ligações entre PBA e glicose ou ácido siálico.	71
Esquema 4. 2. Síntese dos PBAC-Dots a partir do estrume de vaca.	77
Esquema 4. 3. Formação da ligação éster-boronato.	82
Esquema 5. 1. Ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	106
Esquema 5. 2. Síntese dos C-Dots.	110
Esquema 5. 3. Formação das ligações éster-boronato entre os C-Dots e glicose.	116
Esquema 5. 4. Formação das ligações éster-boronato entre C-Dots e AnB – sistema AnB@C-Dots	119
Esquema 5. 6. Experimento em vivo para a avaliação de eficácia e toxicidade da formulação AnB@C-Dots	123

Índice de equações

Equação 2. 1. Fórmula para o cálculo de rendimento quântico.	22
Equação 2. 2. Fórmula para o cálculo do valor q	22
Equação 2. 3. Fórmula para o cálculo do rendimento quântico intrínseco.	23
Equação 2. 4. Fórmula para o cálculo da eficiência de sensibilização.....	23
Equação 2. 5. Contagem de parasitos.	26
Equação 2. 6. Fórmula para o cálculo da viabilidade celular.....	27
Equação 5. 1. Equação de Stern-Volm.	115

Índice de figuras

Figura 1. 1. Exemplos de complexos de Ln^{3+} utilizados em Medicina.....	5
Figura 1. 2. Níveis eletrônicos presentes em átomos, moléculas, pontos quânticos e semicondutores macrocristalinos.	6
Figura 1. 3. Representação de diferentes núcleos de Q-Dots como uma função de seu comprimento de onda de emissão, de acordo com a região correspondente do espectro. Adaptado com permissão da referência ³⁸ 38. <i>Copyright</i> © 2018, <i>American Chemical Society</i> .7	7
Figura 1. 4. Estruturas do (a) grafeno, (b) óxido de grafeno (OG) e (c) óxido de grafeno reduzido.....	8
Figura 1. 5. Estruturas de NTCs de (a) uma só parede e (b) múltiplas paredes. Adaptado com permissão da referência 57. ⁵⁷ <i>Copyright</i> © 2019, <i>Elsevier B.V.</i>	9
Figura 2. 1. Estrutura do 4-bromo piridina-2,6-dicarboxilato de dimetila (1).	12
Figura 2. 2. Estrutura do 4,4,5,5-tetrametil-2-(tiofen-2-il)-1,3,2-dioxaborolano (2).	12
Figura 2. 3. Estrutura do 4-(tiofen-2-il) piridina-2,6-dicarboxilato de dietila (3).	13
Figura 2. 4. Estrutura do ácido 4-(tiofen-2-il)piridina-2,6-dicarboxílico (H₂1Tdpa).	14
Figura 2. 5. Estrutura do 2-(2,2'-bitiofen-5-il)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano (4).	14
Figura 2. 6. Estrutura do 4-(2,2'-bitiofen-5-il)piridina-2,6-dicarboxilato de dietila (5).	15
Figura 2. 7. Estrutura do ácido 4- (2,2'-bitiofeno) piridina-2,6-dicarboxílico (H₂2Tdpa).	16
Figura 2. 8. Estruturas dos sais derivados do H_{2n}Tdpa (n = 1 ou 2).	16
Figura 2. 9. Estruturas dos complexos $\text{K}_3[\text{Ln}(\text{nTdpa})_3]$, n = 1 ou 2 e $\text{Ln}^{3+} = \text{Eu}^{3+}$, Gd^{3+} ou Yb^{3+}	17
Figura 2. 10. Estrutura dos C-Dots derivados do esturmo de vaca.....	18
Figura 2. 11. Estrutura do derivado aminado C-Dots-NH₂	18
Figura 2. 12. Estrutura do derivado PBAC-Dots	19
Figura 2. 13. Estrutura dos C-Dots contendo boro na estrutura.	20
Figura 2. 14. AnB@C-Dots	20
Figura 3. 1. Ligantes que fizeram parte deste estudo.....	39
Figura 3. 2. (a) Diagrama de níveis de energia ilustrando os processos de transferências de energia (ET) que ocorrem tanto para sensibilizar os íons Ln^{3+} , quanto para gerar $^1\text{O}_2$. A energia hu é absorvida pelo ligante, populando um estado singlete excitado (S^*_1). Após um ISC, o	

estado tripleto excitado (T_3^*) é populado e a energia pode ser transferida para o estado emissivo f^* , de onde pode decair na forma de luminescência (L) para o estado fundamental f ou pode formar 1O_2 . A energia também pode decair de forma não radiativa (NR), por meio dos caminhos representados por linhas pontilhadas. Outros processos possíveis são a fluorescência (F) e a fosforescência (P). Os níveis de energia não estão representados com escala correta. (b) Diagrama dos orbitais moleculares do 1O_2 41

Figura 3. 3. Complexos de Ln^{3+} usados como FS para TDF. 43

Figura 3. 4. Reações do tipo I e do tipo II em TFD. Após a absorção de luz, o FS atinge um estado excitado singlete (S_1). Após um ISC, o fóton, agora em um estado excitado tripleto (T_3), pode seguir dois caminhos: (a) reagir com biomoléculas para formar radicais, que reagem com 3O_2 para gerar ROS (reação tipo I); ou (b) reagir diretamente com oxigênio para gerar 1O_2 (reação tipo II). A energia também pode decair de forma não radiativa (NR), por meio dos caminhos representados por linhas pontilhadas. Outros processos possíveis são a fluorescência (F) e a fosforescência (P). Os níveis de energia não estão representados com escala correta. 44

Figura 3. 5. Compostos utilizados como FS de TFD. 45

Figura 3. 6. Complexos de Ln^{3+} que funcionam como agentes teragnósticos. 46

Figura 3. 7. Exemplos de antibióticos e antifúngicos que contém o grupo tiofeno em suas estruturas. 48

Figura 3. 8. Exemplos de moléculas contendo grupos tiofeno promissoras para serem usadas como FS de TFD. 49

Figura 3. 9. Espectros de absorção normalizada (linhas pretas), excitação (linha azul e verde claras) e emissão (linhas azuis e verdes escuras) de (a) K_21Tdpa e (b) K_22Tdpa em água a $25 \pm 0,1$ °C. $[K_2nTdpa] = 50 \mu M$ 51

Figura 3. 10. Titulações de emissão de solução em tampão Tris/HCl de $YbCl_3$, 25 μM com soluções aquosas de K_21Tdpa e K_22Tdpa , 0,93 mM. Os espectros de emissão foram adquiridos a $25 \pm 0,1$ °C e sob excitações de 318 e 360 nm, respectivamente. Em (a) e (c) estão dispostos os espectros originais e em (b) e (d), os gráficos de proporção estequiométrica de Yb^{3+} vs. intensidade de emissão em 977 nm de K_21Tdpa e K_22Tdpa , respectivamente. 53

Figura 3. 11. Espectros normalizados de excitação (linhas pontilhadas) e de emissão (linhas sólidas) de soluções aquosas de complexos $K_3[Ln(nTdpa)_3]$, adquiridos a $25 \pm 0,1$ °C. $Ln^{3+} = Gd^{3+}$ em (a) e (b) e Yb^{3+} em (c) e (d). $K_3[Ln(nTdpa)_3] = 50 \mu M$ 54

Figura 3. 12. Espectros de excitação (linha pontilhada) e de emissão (linha sólida) de $K_3[Eu(1Tdpa)_3]$ em água a $25 \pm 0,1$ °C. $K_3[Eu(1Tdpa)_3] = 50 \mu M$ 55

Figura 3. 13. Gráficos de decaimento da emissão de $\text{K}_3[\text{Eu}(\text{1Tdpa})_3]$ a 616 nm (a) em água e (b) em etanol 95%, $25,0 \pm 0,1$ °C ($\lambda_{\text{exc}} = 320$ nm); $[\text{K}_3[\text{Eu}(\text{1Tdpa})_3]] = 100$ μM	56
Figura 3. 14. (a) Espectros de fosforescência e (b) Intensidades de fosforescência de $^1\text{O}_2$ presente em solução aquosa de K_2nTdpa e $\text{K}_3[\text{Ln}(\text{nTdpa})_3]$ ($n = 1$ ou 2), adquiridos a $25 \pm 0,1$ °C. [espécie] = 500 μM	57
Figura 3. 15. (a) Citotoxicidade, (b) fotocitotoxicidade (365 nm), (c) e (d) curvas de dose resposta de 2Tdpa , $\text{K}_3[\text{Gd}(2\text{Tdpa})_3]$ e $\text{K}_3[\text{Yb}(2\text{Tdpa})_3]$ em ensaios de MTT com células HeLa.	58
Figura 3. 16. Ensaios de citometria de fluxo com células HeLa marcadas com AnV-FITC e PI, 12 h após a incubação com K_22Tdpa , $\text{K}_3[\text{Gd}(2\text{Tdpa})_3]$ e $\text{K}_3[\text{Yb}(2\text{Tdpa})_3]$ em condições de escuro em (a), (b) e (c), e após irradiação com luz 365 nm em (d), (e) e (f), respectivamente. Adaptado com permissão de https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01805 . Copyright © 2021, American Chemical Society.	62
Figura 3. 17. Citotoxicidades de 1Tdpa e $\text{K}_3[\text{Eu}(\text{1Tdpa})_3]$ em ensaios de MTT com células HeLa.	63
Figura 3. 18. Imagens de células HeLa tratadas com $\text{K}_3[\text{Eu}(\text{1Tdpa})_3]$ (12,5 μM) (a) campo claro, (b) 402 nm e (c) sobreposição das imagens. Escala: 50 μm	63
Figura 3. 19. Imagens de células HeLa vivas incubadas com (a) MitoTracker Green FM (50 nM, $\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm), (b) Hoechst 33342 (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, $\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm), (c) $\text{K}_3[\text{Eu}(\text{1Tdpa})_3]$ (12 μM , $\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm) e (d) imagem mesclada. Escala: 50 μm . Adaptado com permissão de https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01805 . Copyright © 2021, American Chemical Society.	65
Figura 4. 1. (a) Imagem de MET (Escala: 5 nm); (b) distribuição do tamanho das partículas; (c) espectro de varredura completa XPS e (d) espectro de IV dos PBAC-Dots . Adaptado com permissão de DOI: 10.1039/d0ra10859f. Copyright © 2021, Royal Society of Chemistry.	78
Figura 4. 2. Espectros de XPS de alta resolução de PBAC-Dots (a) C1s; (b) O1s; (c) N1s e (d) B1s. Adaptado com permissão de DOI: 10.1039/d0ra10859f. Copyright © 2021, Royal Society of Chemistry.	79
Figura 4. 3. (a) Espectros de absorção (Abs) e emissão (Emis, $\lambda_{\text{ex}} = 370$ nm) adquiridos à temperatura ambiente de C-Dots-NH₂ (Preto) e PBAC-Dots (Azul); (b) Espectros de emissão de PBAC-Dots sob diferentes comprimentos de onda de excitação (de 300 a 500 nm); [PBAC-	

Dots] = 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Adaptado com permissão de DOI: 10.1039/d0ra10859f. *Copyright* © 2021, *Royal Society of Chemistry*. 80

Figura 4. 4. (a) Espectros de emissão de **PBAC-Dots** em função da concentração de glicose; (b) Gráfico de emissão integrada em função da concentração de glicose. I_0 e I são os espectros de emissão de **PBAC-Dots** integrados na ausência e na presença do analito. [**PBAC-Dots**] = 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Adaptado com permissão de DOI: 10.1039/d0ra10859f. *Copyright* © 2021, *Royal Society of Chemistry*. 81

Figura 4. 5. Viabilidade celular de (a) fibroblastos murino - NIH/3T3 e (b) células de melanoma murino - B16F10 após 24 h de exposição a 3 concentrações de **PBAC-Dots**: 0,01; 0,05 e 0,1 mg mL^{-1} . Letras diferentes significam estatísticas diferentes. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$. Adaptado com permissão de DOI: 10.1039/d0ra10859f. *Copyright* © 2021, *Royal Society of Chemistry*. 83

Figura 4. 6. Células de câncer de mama MCF-7 incubadas **PBAC-Dots** e visualizadas nos canais verde e vermelho. (a), (b) e (c) são células vivas e (d), (e) e (f) são células fixadas. Nenhuma coloração pôde ser detectada dentro dos núcleos das células, conforme mostrado por espaços escuros (indicados pela letra N). (c) e (f) mostram os aspectos morfológicos normais das células por microscopia de contraste de fase. Escala: 25 μm . Adaptado com permissão de DOI: 10.1039/d0ra10859f. *Copyright* © 2021, *Royal Society of Chemistry*. 84

Figura 4. 7. Desenho experimental de animais saldáveis. $D_L = 0,16 \text{ mg mL}^{-1}$, $D_H = 0,31 \text{ mg mL}^{-1}$. Ct: grupo controle; D_L2d e D_H2d : animais sacrificados após 2 dias; D_L30d e D_H30d : animais sacrificados após 30 dias. Adaptado com permissão de DOI: 10.1039/d0ra10859f. *Copyright* © 2021, *Royal Society of Chemistry*. 85

Figura 4. 8. Desenho experimental de animais com melanoma. Ct-T: grupo controle; D_LT4d e D_HT4d : animais que receberam **PBAC-Dots** (0,16 e 0,31 mg mL^{-1}) após 4 dias de crescimento do melanoma; D_LT8d e D_HT8d : animais que receberam **PBAC-Dots** (0,16 e 0,31 mg mL^{-1}) após 8 dias de crescimento do melanoma; D_LT14d e D_HT14d : animais que receberam **PBAC-Dots** (0,16 e 0,31 mg mL^{-1}) após 14 dias de crescimento do melanoma. Adaptado com permissão de DOI: 10.1039/d0ra10859f. *Copyright* © 2021, *Royal Society of Chemistry*. 86

Figura 4. 9. Bioimagem de fluorescência em vivo representativa para camundongos C57BL/6 anestesiados: (a) controle (PBS); (b) camundongos saldáveis, após 4 h da administração de **PBAC-Dots** (0,16 mg mL^{-1}); (c) camundongos com melanoma, 4 dias após a indução do tumor e 4 h após a administração de **PBAC-Dots** (0,16 mg mL^{-1}); (d) camundongos com melanoma, 8 dias após a indução do tumor e 4 h após a administração de **PBAC-Dots** (0,16 mg mL^{-1}); (e)

camundongos com melanoma, 14 dias após a indução do tumor e 4 h após a administração de **PBAC-Dots** (0,16 mg mL⁻¹). Os círculos brancos indicam fluorescência nas regiões dorsais. Setas brancas enfatizam a fluorescência na região do rim. Os triângulos brancos indicam a fluorescência nas regiões do ureter e os círculos pretos indicam a região do tumor. Adaptado com permissão de DOI: 10.1039/d0ra10859f. *Copyright* © 2021, *Royal Society of Chemistry*.

..... 87

Figura 4. 10. Imagens histológicas do cérebro, pulmões, fígado, baço e rins dos camundongos controle e com câncer tratados com **PBAC-Dots**. Adaptado com permissão de DOI: 10.1039/d0ra10859f. *Copyright* © 2021, *Royal Society of Chemistry*..... 89

Figura 4. 11. Imagens histológicas dos tumores. (a) Camundongos com câncer sem tratamento com **PBAC-Dots**. Imagens histológicas dos camundongos com tumor tratados com 0,16 mg mL⁻¹ de **PBAC-Dots** após 4 (b), 8 (c) e 14 (d) dias de indução do câncer. O “n” indica regiões de necrose, setas vermelhas e pretas indicam tecido tumoral intacto e células imunológicas, respectivamente. Adaptado com permissão de DOI: 10.1039/d0ra10859f. *Copyright* © 2021, *Royal Society of Chemistry*. 90

Figura 4. 12. Hemograma dos camundongos C56BL/6 após 2 e 30 dias da aplicação endovenosa de **PBAC-Dots** (0,16 e 0,31 mg mL⁻¹). (a) Número total de glóbulos brancos e glóbulos vermelhos; (b) hemoglobinas e hematócritos; (c) volume corpuscular médio e hemoglobina corpuscular média e (d) concentração de hemoglobina corpuscular média e número de plaquetas. Letras diferentes significam estatísticas diferentes. * = p <0,05; ** = p <0,01; *** = p <0,005. Adaptado com permissão de DOI: 10.1039/d0ra10859f. *Copyright* © 2021, *Royal Society of Chemistry*. 91

Figura 4. 13. Níveis séricos de camundongos C57BL/6 de (a) Alanina aminotransferase e Aspartato aminotransferase; (b) Creatinina e Desidrogenase láctica e (c) Fosfatase Alcalina e Ureia após 2 e 30 dias de aplicação de **PBAC-Dots** (0,16 e 0,31 mg mL⁻¹). Letras diferentes significam estatísticas diferentes. * = p <0,05; ** = p <0,01; *** = p <0,005. Adaptado com permissão de DOI: 10.1039/d0ra10859f. *Copyright* © 2021, *Royal Society of Chemistry*. 92

Figura 4. 14. (a) Percentual de linfócitos, (b) percentual de neutrófilos e (c) percentual de monócitos dos camundongos C57BL/6 após 2 e 30 dias da aplicação de **PBAC-Dots** (0,16 e 0,31 mg mL⁻¹). Letras diferentes significam estatísticas diferentes. * = p <0,05; ** = p <0,01; *** = p <0,005. Adaptado com permissão de DOI: 10.1039/d0ra10859f. *Copyright* © 2021, *Royal Society of Chemistry*. 93

Figura 5. 1. (a) Estrutura química da AnB (b) Diagrama de níveis de energia da AnB. Adaptado com permissão da referência 261. ²⁶¹ Copyright © 2015, Elsevier B.V.....	99
Figura 5. 2. Estratificação de risco da leishmaniose tegumentar no Brasil (a) por região de infecção entre os anos 2000 e 2019 e (b) entre os anos 2017 e 2019. ²⁸⁴	104
Figura 5. 3. <i>Leishmania</i> em suas formas promastigota e amastigota. Adaptado com permissão da referência 280. ²⁸⁰ Copyright © 2015, Elsevier B.V.....	105
Figura 5. 4. Imagens de MET dos C-Dots a (Escala: 50 nm). (a) Inserção: Histograma de distribuição de tamanhos de a . (b) Inserção: ênfase nos parâmetros de rede de partícula representativa.	111
Figura 5. 5. Espectros de IV dos materiais. As curvas em preto, vermelho e azul referem-se às amostras a , b e c , respectivamente.....	112
Figura 5. 6. Espectros de absorção na região do UV-Vis e de emissão sob excitação de 370 nm de uma solução contendo 0,2 mg mL ⁻¹ dos C-Dots . As curvas preta, vermelha e azul correspondem às sínteses a , b e c , respectivamente. Inserção: Diagrama de cromaticidade de a , b e c	113
Figura 5. 7. (a) Espectros de emissão de a adquiridos a temperatura ambiente sob comprimentos de onda de excitação progressivamente maiores (de 320 nm a 460 nm); (b) Histograma de integrais de emissão em função do comprimento de onda de excitação de a . [C-Dots] = 0,5 mg mL ⁻¹	114
Figura 5. 8. (a) Intensidade do sinal em 460 nm com excitação variando entre 750-900 nm. (b) Espectros de emissão, sob excitações entre 750 e 900 nm de a adquiridos a temperatura ambiente. [C-Dots] = 0,5 mg mL ⁻¹	114
Figura 5. 9. Figura do gráfico de Stern-Volmer obtido para o sistema formado pelos C-Dots a e diferentes concentrações de glicose ($R^2 = 0,96$). [C-Dots] = 20 µg mL ⁻¹	116
Figura 5. 10. (a) Gráficos de fotoestabilidade dos C-Dots a , adquiridos sob excitação de 810 e 370 nm; (b) gráfico de percentagem de carbono inorgânico versus tempo transcorrido do preparo das soluções dos C-Dots a, b e c . [C-Dots] = 0,5 mg mL ⁻¹	117
Figura 5. 11. Espectros de emissão de soluções aquosas de a preparadas a 0 e 10 dias, adquiridos a temperatura ambiente sob os comprimentos de onda de excitação de 310 e 370 nm. [C-Dots] = 0,5 mg mL ⁻¹	118

Figura 5. 12. (a) Espectros de emissão obtidos sob excitação de 370 nm, a temperatura ambiente, para o sistema formado pelos C-Dots a e diferentes concentrações de AnB e (b) espectro de emissão de AnB@C-Dots . [C-Dots] = 1 mg mL ⁻¹	119
Figura 5. 13. Espectro de absorção na região do UV-Vis de [AnB@C-Dots - C-Dots], D-AnB e AnB pura em DMSO (linhas azul, vermelha e preta, respectivamente).	121
Figura 5. 14. Imagens de MET do sistema AnB@C-Dots . (a) Inserção: Histograma de distribuição de tamanhos dos C-Dots . (b) Inserção: ênfase nos parâmetros de rede de partícula representativa.	121
Figura 5. 15. (a) Fotografia de um dos camundongos; (b) Gráfico de evolução do peso corporal dos animais ao longo do esquema terapêutico.	125
Figura 5. 16. Diâmetro das patas dos animais antes da infecção, imediatamente antes do tratamento (0 dias) e após 2,5,7 e 10 dias de tratamento.	126
Figura 5. 17. Viabilidade celular das <i>Leishmanias</i> obtidas pelo método de MTT.....	128
Figura 5. 18. Imagens de microscopia de luz dos rins de animais dos grupos: (a) controle negativo (não infectado), (b) controle positivo (infectado), (c) D-AnB, (d) AmBisome®, (e) AnB@C-Dots . Escala: 200 µm.....	131
Figura 5. 19. Imagens de microscopia de luz dos fígados de animais dos grupos: (a) controle negativo (não infectado), (b) controle positivo (infectado), (c) D-AnB , (d) AmBisome®, (e) AnB@C-Dots . Escala: 200 µm.....	135

Anexos

Figura A 1. ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) de 4-bromo piridina-2,6-dicarboxilato de dimetila (1).	177
Figura A2. ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) de 4,4,5,5-tetrametil-2-(tiofen-2-il)-1,3,2-dioxaborolano (2).	177
Figura A3. ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) de 4-(tiofen-2-il) piridina-2,6-dicarboxilato de dietila (3).	178
Figura A4. ¹ H-RMN (400 MHz, DMSO _{d6}) de ácido 4-(tiofen-2-il)piridina-2,6-dicarboxílico (H ₂ 1Tdpa).	178
Figura A5. ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) de 2-(2,2'-bitiofen-5-il)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano (4).	179
Figura A6. ¹ H-RMN (400 MHz, acetona _{d6}) de 4-(2,2'-bitiofen-5-il)piridina-2,6-dicarboxilato de dietila (5).	179

Figura A7. ^1H -RMN (400 MHz, DMSO_{d6}) de ácido 4- (2,2'-bitiofeno) piridina-2,6-dicarboxílico (H₂Tdpa).	180
Figura A8. Espectro de massas de H₂1Tdpa . As inserções mostram os padrões isotópicos calculado e experimental.	180
Figura A9. Espectro de massas de H₂2Tdpa . As inserções mostram os padrões isotópicos calculado e experimental.	181
Figura A10. Espectro de massas de K₃[Gd(1Tdpa)₃] . As inserções mostram os padrões isotópicos calculado e experimental.	181
Figura A11. Espectro de massas de K₃[Yb(1Tdpa)₃] . As inserções mostram os padrões isotópicos calculado e experimental.	182
Figura A12. Espectro de massas de K₃[Eu(1Tdpa)₃] . As inserções mostram os padrões isotópicos calculado e experimental.	182
Figura A13. Espectro de massas de K₃[Gd(2Tdpa)₃] . As inserções mostram os padrões isotópicos calculado e experimental.	183
Figura A14. Espectro de massas de K₃[Yb(2Tdpa)₃] . As inserções mostram os padrões isotópicos calculado e experimental.	183
Figura A 15. Gráfico de decaimento da emissão de K₃[Eu(1Tdpa)₃] em 616 nm, em água deuterada a $25,0 \pm 0,1$ °C ($\lambda_{\text{exc}} = 320$ nm); [K₃[Eu(1Tdpa)₃]] = 100 μM	184
Figura A16. Declaração de aprovação do experimento em vivo “Avaliação da toxicidade de PBAC-Dots ” pelo Comitê de Ética no uso Animal da UnB.	184
Figura A17. Declaração de aprovação do experimento em vivo “Avaliação da eficácia e toxicidade da AnB@C-Dots contra <i>Leishmania</i> ” pelo Comitê de Ética no uso Animal da UnB.	185
Figura A 18. Gráficos de decaimento da emissão de (a) K₃[Yb(1Tdpa)₃] e (b) K₃[Yb(2Tdpa)₃] em 978 nm, em etanol a 95%, a $25,0 \pm 0,1$ °C ($\lambda_{\text{exc}} = 320$ nm); [K₃[Yb(nTdpa)₃]] = 100 μM	185
Figura A19. Espectros de fosforescência de $^1\text{O}_2$ presente em solução aquosa de (a) K₂2Tdpa e (b) K₂2Tdpa , adquiridos a $25 \pm 0,1$ °C. [K₂nTdpa] = 500 μM	186
Figura A20. Citotoxicidade de GdCl_3 , YbCl_3 e EuCl_3 em ensaios de MTT com células HeLa.	186
Figura A21. Ensaios de citometria de fluxo com células HeLa marcadas com AnV-FITC e PI, 12 h após a incubação com PBS e estaurosporina em condições de escuro em (a) e (b), e após irradiação com luz 365 nm em (c) e (d), respectivamente.	187

Índice de tabelas

Tabela 2. 1. Preparo dos blocos em parafina.....	36
Tabela 2. 2. Coloração das lâminas.....	37
Tabela 3. 1. Rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F), rendimentos quânticos de luminescência (Φ_L) e tempos de vida de luminescência de Ln^{3+} (τ^{Ln}) em etanol 95% a $25 \pm 0,1$ °C ($\text{Ln}^{3+} = \text{Eu}^{3+}$, Gd^{3+} ou Yb^{3+}). 51	
Tabela 3. 2. Caracterização fotofísica de $\text{K}_3[\text{Eu}(\text{1Tdpa})_3]$ em tampão TRIS/ H_2O e em etanol. $\text{K}_3[\text{Eu}(\text{1Tdpa})_3] = 50$ mM.....	56
Tabela 3. 3. Rendimento quântico de geração de oxigênio singlete ($\Phi^1\text{O}_2$) de $\text{K}_3[\text{Ln}(\text{nTdpa})_3]$ ($n = 1$ ou 2) a $25 \pm 0,1$ °C, em etanol 95%.	57
Tabela 3. 4. Valores de IC_{50} no escuro e após irradiação com luz 365 nm.....	59
Tabela 5. 1. Solubilidade da AnB em alguns solventes. ⁷	100
Tabela 5. 2. Vantagens e desvantagens de algumas formulações de AnB.....	103
Tabela 5. 3. Resultados percentuais de análise elementar dos C-Dots a, b e c	112
Tabela 5. 4. Principais características dos animais usados no ensaio pré-clínico de eficácia e toxicidade da AnB@C-Dots.....	122
Tabela 5. 5. Tratamento e doses utilizadas nos grupos de estudo, sendo que os grupos 5 e 6 funcionaram como controles positivo e negativo, respectivamente.....	122
Tabela 5. 6. Confirmação da infecção dos animais, antes do tratamento, por pesquisa direta do parasita em culturas e lâminas de extensão.	124
Tabela 5. 7. Número de parasitos por mL da cultura preparada a partir dos tecidos das patas de dois animais por grupo (Limites de confiança de 95%)......	127
Tabela 5. 8. Efeito dos tratamentos sobre a massa dos rins dos animais em relação à massa corporal.	129
Tabela 5. 9. Dosagem de ureia de camundongos Balb/c tratados com AnB@C-Dots, D-AnB, Ambisome® e o do grupo controle negativo (não infectados e não tratados).	130
Tabela 5. 10. Efeito dos tratamentos sobre a massa do fígado dos animais em relação à massa corporal.	131
Tabela 5. 11. Dosagem de Albumina de camundongos Balb/c tratados com AnB@C-Dots, D-AnB, Ambisome®, C-Dots e o do grupo controle negativo (não infectados e não tratados). 132	

Tabela 5. 12. Dosagem de Bilirrubinas totais de camundongos Balb/c tratados com AnB@C-Dots , D-AnB, Ambisome [®] , C-Dots e o do grupo controle negativo (não infectados e não tratados).....	132
Tabela 5. 13. Dosagem de Transaminase pirúvica (TGP) de camundongos Balb/c tratados com AnB@C-Dots , D-AnB, Ambisome [®] , C-Dots e o do grupo controle negativo (não infectados e não tratados).	133
Tabela 5. 14. Dosagem de Transaminase Oxalacética (TGO) de camundongos Balb/c tratados com AnB@C-Dots , D-AnB, Ambisome [®] , C-Dots e o do grupo controle negativo (não infectados e não tratados).....	133
Tabela 5. 15. Dosagem de Fosfatase alcalina de camundongos Balb/c tratados com AnB@C-Dots , D-AnB, Ambisome [®] , C-Dots e o do grupo controle negativo (não infectados e não tratados).....	134
Tabela 5. 16. Dosagem de hemácias de camundongos Balb/c tratados com AnB@C-Dots , Ambisome [®] e o dos grupos controle positivo (infectados e não tratados) e negativo (não infectados e não tratados).....	136

Lista de abreviaturas e acrônimos

AnB	Anfotericina B
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
B16F10	Linhagem celular derivada de melanoma murinho
BC	Banda de condução
BV	Banda de valência
C-Dots	Quantum dots de carbono
CMC	Concentração micelar crítica
COT	Carga orgânica total
DC	<i>Downconversion</i>
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FS	Fotossensibilizador
HeLa	Linhagem celular câncer cervical humano
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
ISC	Cruzamento intersistemas
IV	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho
J774.1	Linhagem celular de macrófagos
L929	Linhagem celular de fibroblasto de camundongo
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
MBGs	Materiais baseados em grafeno
MET	Microscopia eletrônica de transição de alta resolução
MCF-7	Linhagem celular de câncer de mama

MDA-MB231-----Linhagem celular de câncer de mama
MTT-----Brometo de 3(4,5 dimetiltiazol- 2,5-difenil-tetrazólio
NIH3T3-----Linhagem celular de fibroblastos murinos
NNN-----Meio de cultura bifásico Nove-McNeal-Nicolle
OMS-----Organização Mundial da Saúde
OG-----Óxido de grafeno
OGR-----Óxido de grafeno reduzido
PBA-----Grupo derivado de ácido fenilborônico
PBS-----Tampão fosfato-salino
Q-Dots-----Quantum dots
ROS-----Espécies reativas de oxigênio
SA -----Ácido siálico aberrante
TA-----Temperatura ambiente
TFD-----Terapia fotodinâmica
TGO-----Transaminase oxalacética
TGP-----Transaminase pirúvica
TOM-----Teoria dos Orbitais Moleculares
TPP-----Trifenilfosfônio
UV-Vis-----Espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta-visível
Vero -----Linhagem celular epitelial não tumoral de rim de macaco verde africano
XPS -----Espectroscopia de fotoelétrons excitados por Raios X
UC-----*Upconversion*

Capítulo 1

Introdução geral e Revisão bibliográfica

1. Introdução geral

Inovar no desenvolvimento de materiais e tecnologias as quais tenham potencial para melhorar e prolongar a vida do ser humano é um dos principais compromissos de todos aqueles envolvidos no mundo científico. Neste sentido, a Química tem um papel central no cumprimento dessa tarefa. A Química permite o desenvolvimento e caracterização de novos sistemas e de diversas naturezas para uma infinidade de aplicações. Quando associada com a Biologia, se adentra em um universo que possibilita a avaliação do comportamento de novas tecnologias em sistemas vivos, mesmo com toda a complexidade inerente a tais sistemas, para que eventualmente possam de fato contribuir com segurança para a saúde e bem-estar gerais.

A fotoluminescência é uma propriedade importante e atraente para a aplicação em áreas como a Física, Química, Ciência de Materiais, Biologia, Medicina, Microeletrônica e Toxicologia.^{1, 2} A fotoluminescência é definida como a emissão de luz proveniente da fotoexcitação direta da espécie emissora.¹ Esse fenômeno foi observado pela primeira vez em 1565, mas somente em 1852 que Sir G. G. Stokes o descreveu de uma forma técnica e metodológica.³ Desde então, grandes inovações baseadas neste fenômeno como o tubo fluorescente, por exemplo, foram apresentadas à humanidade. Na Medicina materiais fotoluminescentes são comumente aplicados em experimentos de bioimageamento,^{4, 5} terapia fotodinâmica (TFD)⁶ ou como agentes teragnósticos.

Devido às grandes possibilidades e necessidades de novos sistemas fotoluminescentes, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de se propor tecnologias baseadas em sistemas luminescentes os quais possam trazer uma melhoria na vida das pessoas. Para se atingir tais metas, em diversos momentos, foi preciso percorrer os caminhos da interdisciplinaridade, em especial a observada entre a Química e a Biologia. As características peculiares de luminescência dos íons lantanídeos foram exploradas no Capítulo 3, com o objetivo de se desenvolver agentes que funcionassem tanto como marcadores para bioimageamento quanto como fotossensibilizadores (FS) de TFD. Nos Capítulos 4 e 5, nanopartículas de carbono (C-Dots) tiveram suas características luminescentes estudadas e exploradas. A aplicação de uma estratégia de funcionalização da superfície das partículas visando o ajuste das respostas ópticas e biológicas em vitro e em vivo das nanopartículas foi investigada no Capítulo 4. No Capítulo 5, contudo, **C-Dots** foram utilizados para o carreamento de Anfotericina B (AnB), uma droga já consolidada para o tratamento de diversas doenças, inclusive males considerados negligenciados.⁷ O objetivo era desenvolver o sistema denominado **AnB@C-Dots** e que este

sistema possa ser utilizado como nova formulação de AnB. O novo sistema deve, em princípio, associar menores custo e toxicidade e maior eficiência do que as formulações convencionais.

1.1. Revisão bibliográfica

1.1.1. Uso de sistemas luminescentes na medicina

Complexos luminescentes

Desde a primeira descrição de sucesso da cisplatina como agente antitumoral,⁸ uma grande quantidade de novos complexos vem sendo descrita na literatura para uso em Medicina.⁹ Os complexos têm sobre as moléculas orgânicas algumas vantagens no uso como agentes terapêuticos tais como: (i) os ligantes podem ter suas estruturas alteradas para permitir o controle fino da reatividade e seletividade do complexo metálico; (ii) os centros metálicos, com variados estados de oxidação, podem ter geometrias diferentes e participarem de reações biológicas de oxirredução; (iii) a labilidade de ligantes permite reações de trocas com biomoléculas, o que leva à respostas biológicas diferenciadas.^{9, 10}

Alguns exemplos de complexos com ação terapêutica são os complexos de ouro. Estes complexos são utilizados, por exemplo, em tratamentos da artrite reumatoides. Complexos de prata, por sua vez, podem ser testados como agentes antimicrobianos. Complexos de antimônio são utilizados no tratamento de leishmaniose e complexos de vanádio como antivirais e agentes antidiabéticos.^{9, 10}

Dentre os complexos já descritos e com ação terapêutica, os fotoluminescentes têm sobre outros a vantagem de poderem funcionar como sistemas teragnósticos. O termo “teragnóstico” foi empregado pela primeira vez por Funkhouser e é definido como a combinação de terapia e diagnóstico por imagem na mesma modalidade.¹¹ A vantagem de compostos que possam ser utilizados como agentes teragnósticos é que eles possibilitam o acompanhamento do progressos das doenças enquanto atuam simultaneamente no combate à enfermidade. Além disso, tais compostos podem ter seus mecanismos de ação estudados por meio de técnicas baseadas em fotoluminescência sem necessidade de marcação com outros fluoróforos. As características fotofísicas dos complexos fluorescentes em geral têm como atrativos a suas altas sensibilidades a mudanças no ambiente local e os longos tempos de fosforescência comumente observados. Estas características podem facilitar a eliminação de interferências de meios biológicos, em especial por técnicas de espectroscopia resolvidas no tempo.⁹

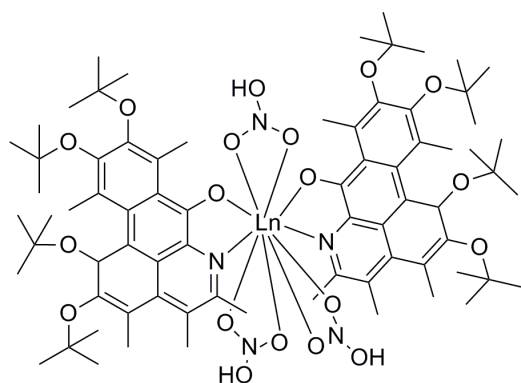
Complexos de lantanídeos

Os complexos de lantanídeos compõem um importante grupo de complexos luminescentes e apresentam características bastante peculiares. A luminescência característica e as propriedades magnéticas, as quais permitem o monitoramento de seus comportamentos em tecidos vivos, exemplificam bem o particular interesse observado na literatura em relação aos complexos de lantanídeos. De forma geral, os complexos de lantanídeos, possuem grandes diferenças entre os comprimentos de onda de excitação e de emissão, além de bandas de transições dos metais finas e em comprimentos de ondas bem definidos.¹² Estas características resultam comumente em uma menor interferência em medidas em meios biológicos.¹³ Devido a sua natureza, que inclui a utilização de orbitais *f*, os complexos de lantanídeos possuem ainda uma propriedade que beneficia as transições do tipo cruzamento intersistemas (ISC), chamado de efeito do átomo pesado. Este efeito favorece, portanto, a estabilização do estado tripleto o qual é ocupado na transição do ISC. Este mesmo efeito contribui, também, para a produção de radicais e/ou espécies reativas de oxigênio (ROS). Ou seja, complexos de lantanídeos são candidatos promissores para o desenvolvimento de FS para TFD.¹³

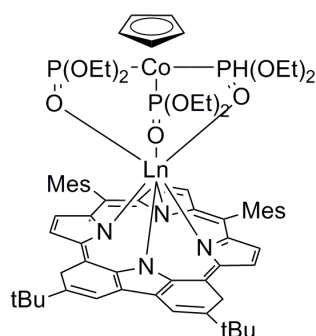
Em termos de solubilidade em água e, conseqüentemente, de aplicabilidade em meios biológicos, a química de complexos de lantanídeos é predominantemente composta por centros metálicos com estado de oxidação III (Ln^{3+}).¹⁴ Nos complexos, os íons Ln^{3+} normalmente atuam como ácidos de Lewis. O caráter iônico dos íons Ln^{3+} e as geometrias de coordenação flexíveis e dominadas por efeitos estéreos favorecem números de coordenação mais elevados (8-12) do que os observados em complexos com metais de transição.¹³ Costuma-se observar a seguinte ordem de prioridade para os átomos de ligantes para a interação com os íons Ln^{3+} : $\text{O} > \text{N} > \text{S}$.¹⁵

Na Medicina os complexos de Ln^{3+} têm vasta aplicabilidade, especialmente em carreamento de fármacos, quimioterapia, TFD e bioimageamento.^{13, 16} Liang e colaboradores¹⁷ reportaram que seus complexos de ítrio³⁺ e disprósio³⁺, contendo unidades de oxoglucina entre os ligantes, apresentaram maior atividade contra células cancerígenas do que o ligante isolado (Figura 1.1). A oxoglucina é uma molécula encontrada em remédios utilizados na medicina tradicional chinesa, cuja atividade antitumoral já foi comprovada.^{18, 19} Em outro exemplo de uso de complexos de Ln^{3+} , Zhang e colaboradores²⁰ descreveram complexos de Gd^{3+} , Yb^{3+} e Er^{3+} com ligantes porfirinóides contendo carbazol (Figura 1.1). Os compostos apresentaram potencial para utilização em imagem fotoacústica e como agente de terapia fototérmica/fotodinâmica.²⁰ Outro trabalho publicado por Wong e colaboradores²¹ utilizou um complexo de Ru^{2+} e Eu^{3+} para liberação por fotodissociação de fármacos que danificam DNA

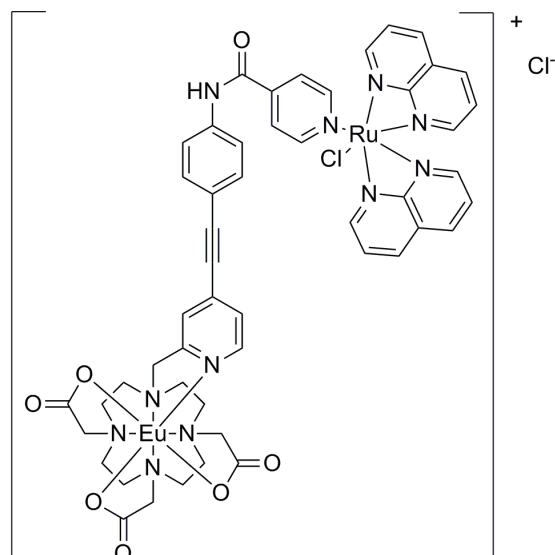
e o todo o processo era monitorado em tempo real por meio da luminescência do Eu^{3+} (Figura 1.1).²¹



Liang, 2015



Zhang, 2021



Wong, 2017

Figura 1. 1. Exemplos de complexos de Ln^{3+} utilizados em Medicina.

Nanomateriais

A capacidade de manipular-se a matéria em níveis nanométricos teve seu desenvolvimento acelerado a partir nos anos 1980.²² Desde então, a chamada nanotecnologia vem sendo explorada como uma alternativa para aplicações em Medicina, tais como diagnóstico, *drug delivery* e imageamento celular.²³

Se comparadas aos corantes orgânicos, nanopartículas em geral possuem algumas vantagens em termos de propriedades fotofísicas. As emissões de fluorescência geralmente possuem maior intensidade e a fotoestabilidade dos nanomateriais também é tipicamente maior.²⁴ Se uma partícula tiver tamanho suficientemente pequeno (2-10 nm) em pelo menos uma dimensão, observa-se o chamado efeito de confinamento quântico.²⁵ Este efeito consiste no confinamento do movimento de elétrons devido ao pequeno tamanho da estrutura. A

consequência disto pode ser compreendida utilizando-se a Teoria dos Orbitais Moleculares (TOM). Segundo esta teoria, a ligação entre os átomos ocorre após a combinação entre os orbitais envolvidos no sistema.²⁶ Em semicondutores, a grande quantidade de orbitais produz duas bandas, a de valência (BV) e a de condução (BC).²⁶ A diferença de energia entre BV e BC depende das características de cada material. Este conceito pode ser extrapolado para explicar o comportamento óptico das nanopartículas. Quanto menor o tamanho da partícula, maior é a diferença de energia entre as BV e BC.²⁷ É esta relativamente elevada diferença de energia que, em geral, permite que as transições eletrônicas produzam radiação. A Figura 1.2 representa este fenômeno.

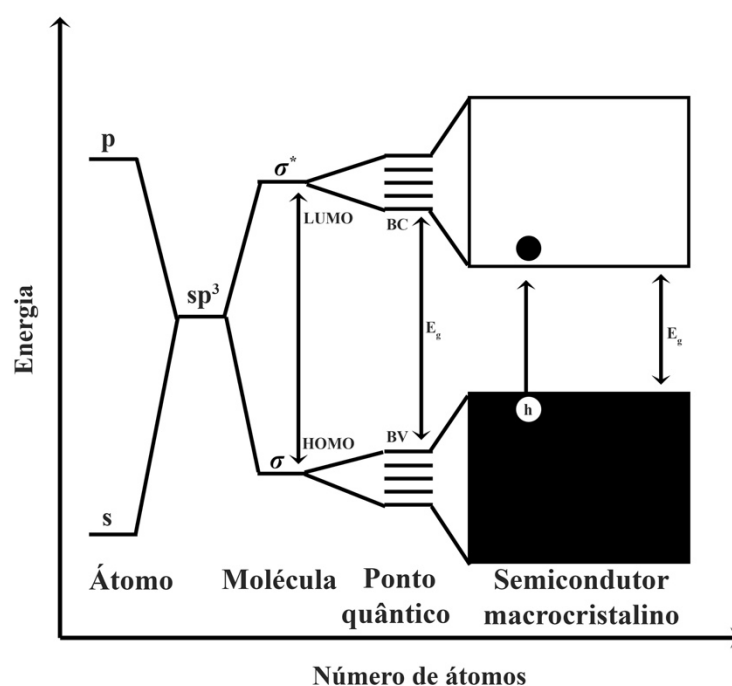


Figura 1. 2. Níveis eletrônicos presentes em átomos, moléculas, pontos quânticos e semicondutores macrocristalinos.

Um exemplo de classe de nanomateriais que tem características de luminescência determinadas pelo efeito de confinamento quântico são os chamados quantum dots (Q-Dots), ou pontos quânticos (Figura 1.3). Estes nanomateriais, também chamados de nanocristais semicondutores cristalinos,²⁸ apresentam diâmetros nanométricos, cujos tamanho e forma podem ser controlados de forma precisa por meio do processo de síntese.²⁸ As propriedades fotofísicas dos Q-Dots incluem alto rendimento quântico, amplo espectro de absorção, emissões estreitas e alta resistência à fotodegradação.²⁹ No entanto, Q-Dots metálicos não são em geral

solúveis em água. Por este motivo, as aplicações biológicas destes nanomateriais dependem de etapas adicionais de passivação superficial.^{28, 29} O resultado disto, não raramente, é a alteração das propriedades fotoluminescentes da partícula, uma vez que tais propriedades são altamente dependentes da superfície do nanomaterial.²⁹ A citotoxicidade dos Q-Dots é outro fator limitante para as aplicações biológicas.^{30, 31} Ainda assim, existem vários exemplo do uso de quantum dots metálicos em bioimagem,³²⁻³⁴ diagnósticos^{31, 35, 36} e *drug delivery*.³⁷

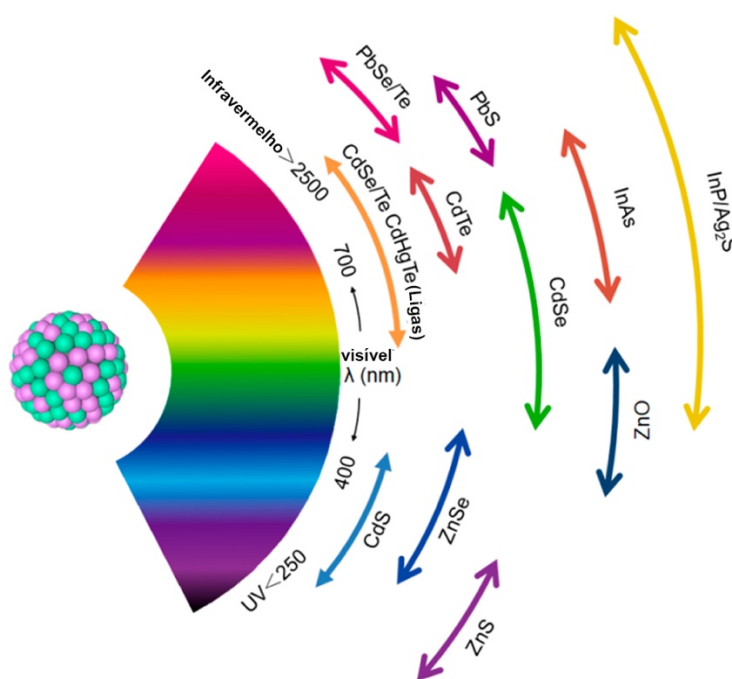


Figura 1. 3. Representação de diferentes núcleos de Q-Dots como uma função de seu comprimento de onda de emissão, de acordo com a região correspondente do espectro. Adaptado com permissão da referência 38. Copyright © 2018, American Chemical Society.

Materiais baseados em grafeno (MBGs, Figura 1.4), por sua vez, consistem em estruturas carbonáceas bidimensionais (2D).³⁹ A primeira descrição do grafeno foi feita em 1859 por Benjamin Collins Brodie.³⁹ Entretanto foi a partir do desenvolvimento do primeiro método de síntese de grafeno com um átomo de espessura, por Novoselov (em 2004),⁴⁰ que o material ganhou destaque no meio científico. Entre as vantagens de MBGs, destacam-se a elevada área superficial e a facilidade de modificação com diferentes grupos funcionais.³⁹ Entretanto, devido às interações de van der Waals entre as folhas de grafeno, este material em geral é de difícil dissolução em água e em solventes orgânicos comuns.⁴¹ O grafeno em si não é fluorescente,⁴² mas outros MBGs como o óxido de grafeno (OG) e o óxido de grafeno reduzido (OGR) o são. O grafeno é constituído por átomos de carbono na hibridização sp^2 ,

enquanto OG e OGR possuem tanto carbonos na hibridização sp^2 , quanto sp^3 . É esta diferença na composição de OG e OGR que produz uma diferença de energia entre BV e BC destas partículas, e permite a emissão de radiação.⁴² A fluorescência de OG e OGR habilita estes materiais para aplicações em Medicina como: marcação fluorescente,^{43, 44} desenvolvimento de dispositivos para *drug delivery*⁴⁵ e TFD.^{46, 47}

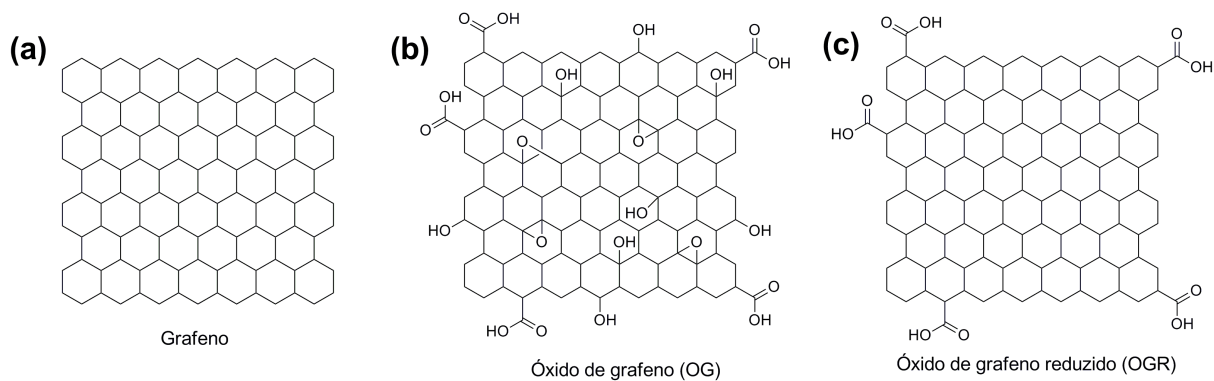


Figura 1. 4. Estruturas do (a) grafeno, (b) óxido de grafeno (OG) e (c) óxido de grafeno reduzido.

Outro grupo de materiais carbonáceos é o dos chamados nanotubos de carbono (NTCs). Cada parede do NTCs pode ser entendida como o resultado do enrolamento de uma folha de grafeno em um tubo com raio constante,⁴⁸ sendo que existem NTCs de uma só parede e de múltiplas paredes (Figura 1.5).⁴⁹ Suas características incluem excepcionais propriedades mecânicas, físicas, elétricas e geométricas.⁴⁸ Entretanto, a toxicidade dos NTCs é um entrave à evolução dos dispositivos baseados em NTCs para aplicações biológicas.⁴⁹ Sua síntese normalmente depende do uso de catalisadores contendo metais pesados, cujos resquícios podem ser o suficiente para uma ação tóxica. NTCs possuem ainda baixa solubilidade, o que torna necessário o uso de surfactantes, que também podem ser fonte de toxicidade.⁵⁰ Entre os efeitos dos NTCs e/ou contaminantes associados aos pulmões estão: estresse oxidativo, inflamação, apoptose, fibrose e granuloma.⁴⁹ Ainda assim, NTCs já foram utilizados em bioimageamento,^{51, 52} *drug delivery*^{53, 54} e TFD.^{55, 56} NTCs são materiais carbonáceos de 1D e existem ainda materiais de carbono de 0D: os C-Dots.

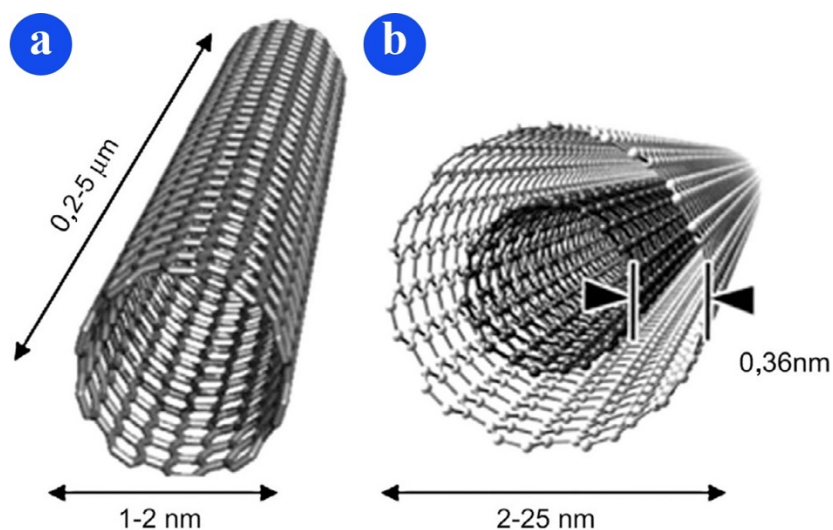


Figura 1. 5. Estruturas de NTCs de (a) uma só parede e (b) múltiplas paredes. Adaptado com permissão da referência 57. Copyright © 2019, Elsevier B.V.

C-Dots ou quantum dots de carbono são nanopartículas com núcleos grafiticos, com diâmetros típicos de até 10 nm, recobertos por carbono orgânico.⁵⁸ As superfícies destas nanopartículas, geralmente podem ser facilmente funcionalizadas,⁵⁹ o que amplia seu rol de aplicabilidades. Devido aos tamanhos nanométricos, C-Dots sofrem efeito do confinamento quântico.^{58, 60} Por isto e por efeitos de superfície,⁶¹ estas nanopartículas possuem propriedades de luminescência úteis, como por exemplo emissão dependente da excitação e alta resistência à fotodegradação.⁶¹ C-Dots não possuem metais pesados em sua composição e, em geral, apresentam baixa citotoxicidade, alta biocompatibilidade e alta solubilidade em água.^{59, 62} Por estes motivos, estes nanomateriais vêm sendo explorados em aplicações voltadas para a Medicina tais como: bioimageamento,⁶³ desenvolvimento de biosensores⁶⁴ e de agentes teragnósticos.⁶¹

Neste trabalho tem-se como objetivos explorar materiais luminescentes baseados em complexos de lantanídeos e nanomateriais carbonáceos com ênfase no desenvolvimento de sistemas que permitam aplicações em TFD, bioimageamento, imunoterapia e aplicação em uma formulação bioativa contra a leishmaniose.

Capítulo 2

Materiais e métodos

2.1. Geral

Os experimentos de bioimageamento, usando-se marcação simultânea com corantes comerciais, com o complexo $K_3[Eu(1Tdp_a)_3]$ foram feitos em colaboração com a Dra. Katherine R. Johnson (University of Nevada, Reno). Os ensaios de citotoxicidade (em vitro) e os experimentos de bioimageamento e de histologia (em vivo, “Avaliação da toxicidade de **PBAC-Dots**”) com **PBAC-Dots** foram realizados em colaboração com MSc. Frederico Hillesheim Horst, sob orientação da Profa. Dra. Mônica Pereira Garcia e do Prof. Dr. Sacha Braun Chaves (UnB). Já os experimentos de bioimageamento em vitro com **PBAC-Dots** foram feitos em colaboração com o Prof. Dr. José Raimundo Corrêa (UnB). As lâminas de histologia do experimento em vivo denominado “Avaliação da eficácia e toxicidade da contra *Leishmania*” foram pré-selecionadas pela aluna de iniciação científica Nara Kanzaki e analisadas pelo Prof. Dr. Sacha Braun (UnB).

Todos os reagentes foram obtidos comercialmente com grau de pureza analítica e usados sem tratamentos prévios. Os solventes foram secos por meio de métodos padrão.⁶⁵ Todas as etapas da síntese dos ligantes H_2nTdp_a ($n = 1$ ou 2) foram realizadas em atmosfera de nitrogênio, exceto quando especificado. O estrume de vaca foi coletado dos animais da Chácara Vitória II, situada em Brazlândia - DF. A AnB foi adquirida da AK Scientific (AK Scientific, Union City, Estados Unidos). Já a D-AnB foi comprada da marca BioXtra (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) e Ambisome[®] da marca Gilead Sciences (Gilead Sciences, Foster City, Califórnia).

2.2. Sínteses

2.2.1. Síntese de H_2nTdp_a ($n = 1$ ou 2)

H_2nTdp_a ($n = 1$ ou 2) foram sintetizados de acordo com um método modificado da literatura.^{66,67} Os detalhes encontram-se abaixo. As Figuras anexas A1 a A7 são dos espectros de 1H -RMN adquiridos de H_2nTdp_a ($n = 1$ ou 2) e seus intermediários. H_2nTdp_a ($n = 1$ ou 2) também foram caracterizados por espectrometria de massas, e os resultados estão nas Figuras A8 e A14.

Síntese de 4-bromo piridina-2,6-dicarboxilato de dimetila (1)(Figura 2.1)

Este composto foi obtido por meio de uma adaptação de um método descrito na literatura.⁶⁸ PBr_5 foi gerado por meio da adição gota a gota de 2,6 mL de PBr_3 (27 mmol) a uma solução de

Br₂ (1,4 mL, 26 mmol) em 30 mL de éter de petróleo. A suspensão foi agitada a TA por 30 minutos. Em seguida, 1,5 g (8,2 mmol) de ácido quelidâmico foi adicionado ao PBr₅ sólido e a mistura foi agitada por 24 h a 80 °C. O sistema reacional foi colocado em banho de gelo, 20 mL de etanol foram adicionados lentamente e a reação foi agitada por mais 1 h. O produto foi extraído com clorofórmio (3 x 15 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas com Na₂SO₄, filtradas e o solvente foi removido a pressão reduzida. O produto foi purificado, usando-se uma coluna de sílica e hexano:EtOAc (1:1 v/v) como eluente (R_f = 0.6) e isolado na forma de um pó branco. Rendimento: 81% (2 g).

¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm 8,43 (s, 2H), 4,50 (q, *J* = 8,0 Hz, H), 1,46 (t, *J* = 8,0 Hz, 6H).

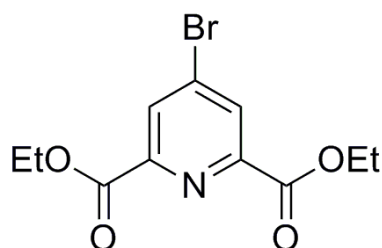


Figura 2. 1. Estrutura do 4-bromo piridina-2,6-dicarboxilato de dimetila (1).

Síntese de 4,4,5,5-tetrametil-2-(tiofen-2-il)-1,3,2-dioxaborolano (2) (Figura 2.2).

Acetato de potássio (1,1 g, 11 mmol), bis(pinacolato)diboro (930 mg, 3,7 mmol), 2-bromotiofeno (0,36 mL, 3,7 mmol) e Pd(dppf)Cl₂ (130 mg, 0,2 mmol) foram adicionados a um balão de fundo redondo e agitados, em condições de refluxo em tolueno seco (5 mL) por 24 h. Depois disso, a reação foi despejada em água e uma extração líquido-líquido com dietil éter foi feita (3 x 10 mL). As fases orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura, separadas e secas com Na₂SO₄. O solvente foi removido sob pressão reduzida, resultando em cristais amarelos. Rendimento: 94% (730 mg).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 7,67-7,63 (m, 2H), 7,22-7,17 (m, 1H), 1,35 (s, 12H).

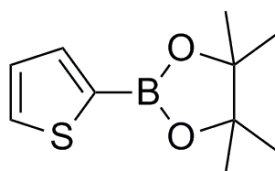


Figura 2. 2. Estrutura do 4,4,5,5-tetrametil-2-(tiofen-2-il)-1,3,2-dioxaborolano (2).

Síntese de 4-(tiofeno-2-il) piridina-2,6-dicarboxilato de dietila (3) (Figura 2.3)

A síntese deste composto foi feita de acordo com método relatado na literatura e adaptado.⁶⁹ **2** (103 mg, 0,49 mmol), **1** (100 mg, 0,33 mmol), e XPhosPd G2 (26 mg, 0,033 mmol) foram dissolvidos em THF desaerado (2 mL). Uma solução aquosa de K₃PO₄ (1,4 mL, 0,5 M em água desaerada) foi adicionada e agitada por 4 h a 50 °C. Água destilada (5 mL) foi adicionada à reação e o produto extraído com CH₂Cl₂ (3 x 10 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas com Na₂SO₄, filtradas e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O produto (cristais amarelos claros) foi purificado usando-se uma coluna de sílica e uma mistura de hexano:acetato de etila (1:1 v/v) como eluente. Rendimento: 50% (50 mg).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 8,44 (s, 2H), 7,70 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H), 7,53 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H), 7,19 (dd, *J* = 4,0 e 4,0 Hz, 1H), 4,52 (q, *J* = 8,0 Hz, 4H), 1,48 (t, *J* = 8,0 Hz, 6H).

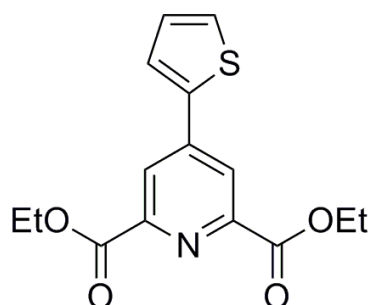


Figura 2. 3. Estrutura do 4-(tiofeno-2-il) piridina-2,6-dicarboxilato de dietila (**3**).

Síntese de ácido 4-(tiofen-2-il)piridina-2,6-dicarboxílico (H₂ITdpa) (Figura 2.4)

NaOH (45 mg, 1,1 mmol) foi dissolvido em água destilada (2 mL) e adicionado gota-a-gota a uma solução de **3** (140 mg, 0,46 mmol) em uma mistura 1:5 de metanol:água (6 mL). A reação foi agitada a 60 °C por 4 h e depois resfriada num banho de gelo. HCl (1 M) foi adicionado até um pH ~ 2, formando assim, um precipitado amarelo. O precipitado foi então filtrado, lavado com água gelada e seco sob pressão reduzida. Rendimento: 61% (16 mg).

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ ppm 8,21 (s, 2H), 7,94 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H), 7,78 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H), 7,22 (dd, *J* = 8,0 e 4,0 Hz, 1H).

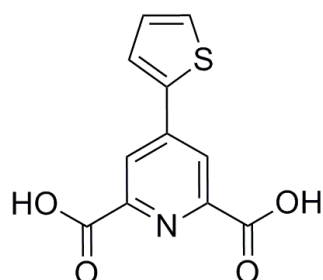


Figura 2. 4. Estrutura do ácido 4-(tiofen-2-il)piridina-2,6-dicarboxílico (**H₂ITdpa**).

Síntese de 2-(2,2'-bitiofen-5-il)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano (4) (Figura 2.5)

Este composto foi obtido por método relatado na literatura e adaptado.⁶⁹ *N*-butillítio (2,6 mL, 6,5 mmol, 2,5 M em hexano) foi adicionado gota-a-gota a uma solução resfriada de 2,2'-bitiofeno (1,0 g, 6,0 mmol) em THF anidro (50 mL) e agitado por 1 h a -78 °C. 2-isopropoxi-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano (1,4 mL, 8,2 mmol) foi então adicionado gota-a-gota, a -78 °C. A temperatura foi elevada com a retirada do banho até atingir a TA e agitada por mais 20 h. Uma solução saturada de NH₄Cl (20 mL) foi usada para extinguir a reação e o produto foi extraído com éter dietílico (3 x 15 mL). As fases orgânicas foram lavadas com água (3 x 10 mL) e salmoura (3 x 10 mL) e secas com Na₂SO₄. O excesso de solvente foi removido sob pressão reduzida e o produto foi purificado usando-se uma coluna de sílica eluída com éter de petróleo:EtOAc (4:1 v/v). O produto puro foi isolado na forma de um óleo azul. Rendimento: 69% (1,2 g)

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 7,53 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H), 7,24-7,23 (m, 3H), 7,03-7,01 (m, 1H), 1,35 (s, 12H).

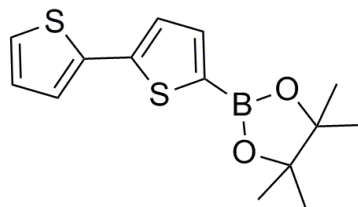


Figura 2. 5. Estrutura do 2-(2,2'-bitiofen-5-il)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano (**4**).

Síntese de 4-(2,2'-bitiofen-5-il)piridina-2,6-dicarboxilato de dietila (5) (Figura 2.6)

Este composto foi sintetizado por método relatado na literatura e adaptado.⁶⁹ **4** (440 mg, 1,5 mmol), **1** (300 mg, 1,0 mmol) e XPhosPd G2 (78 mg, 0,1 mmol) foram dissolvidos em THF

desaerado (4 mL). Uma solução desaerada de K_3PO_4 (4,2 mL, 0,5 M em água desaerada) foi adicionada à reação e agitada por 4 h a 50 °C. 5 mL de água foram adicionadas ao meio reacional e o produto foi extraído com CH_2Cl_2 (3 x 10 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas com Na_2SO_4 , filtradas e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O produto foi isolado na forma de cristais verdes. Rendimento: 54% (210 mg)

1H RMN (400 MHz, $acetona_{d6}$): δ ppm 8,40 (s, 2H), 7,93 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H), 7,55 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H), 7,46 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H), 7,41 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H), 7,15 (dd, $J = 4,0$ e 4,0 Hz, 1H), 4,46 (q, $J = 8,0$ Hz, 4H), 1,42 (t, $J = 8,0$ Hz, 6H) ppm.

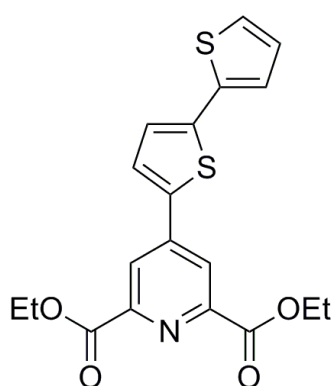


Figura 2. 6. Estrutura do 4-(2,2'-bitiofen-5-il)piridina-2,6-dicarboxilato de dietila (**5**).

Síntese de ácido 4-(2,2'-bitiofeno)piridina-2,6-dicarboxílico (H_2Tdp) (Figura 2.7)

NaOH (45 mg, 1,1 mmol) foi dissolvido em água destilada (2 mL) e adicionado gota-a-gota a uma solução de **5** (150 mg, 0,39 mmol) em uma mistura 1:5 metanol:água (6 mL). A reação foi agitada a 60 °C por 4 h e depois resfriada em um banho de gelo. HCl (1 M) foi adicionado até um pH \sim 2, formando um precipitado amarelo. O produto foi filtrado, lavado com água gelada e seco sob pressão reduzida, o que resultou num pó branco. Rendimento: 76% (930 mg).

1H RMN (400 MHz, $DMSO_{d6}$): δ ppm 8,37 (s, 2 H), 8,05 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H), 7,63 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H), 7,50 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H), 7,46 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H), 7,15 (dd, $J = 4,0$ e 4,0 Hz, 1H).

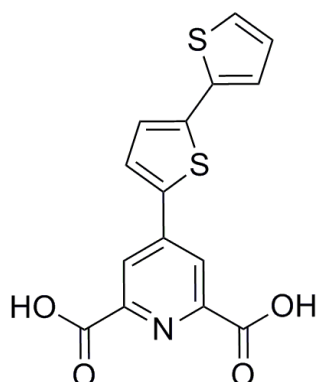


Figura 2. 7. Estrutura do ácido 4- (2,2'-bitiofeno) piridina-2,6-dicarboxílico (**H₂Tdpa**).

*Processo de formação dos sais derivados do **H₂nTdpa** (n = 1 ou 2) (Figura 2.8)*

K_2CO_3 (0,5 mmol) e **H₂nTdpa** (n = 1 ou 2) (0,5 mmol) foram dissolvidos em água destilada e agitados por 30 minutos formando uma solução transparente ou amarela de **K₂1Tdpa** e **K₂2Tdpa**, respectivamente.

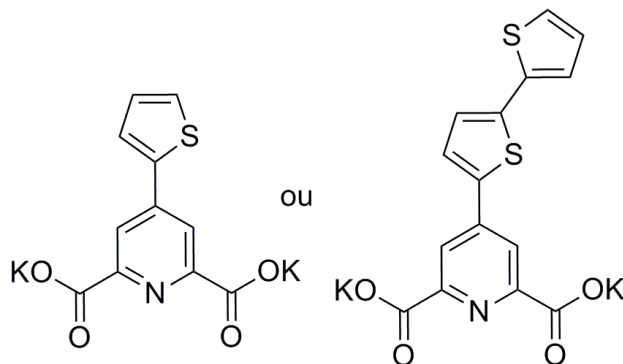


Figura 2. 8. Estruturas dos sais derivados do **H₂nTdpa** (n = 1 ou 2).

2.2.2. Síntese dos complexos (**K₃[Ln(nTdpa)₃]**, n = 1 ou 2) (Figura 2.9)

Todos os complexos de íons lantanídeos foram preparados por meio da mistura de um equivalente de $LnCl_3$ ($Ln^{3+} = Yb^{3+}$, Gd^{3+} ou Eu^{3+} , de soluções estoque em água com concentrações de cerca de 10 mM, confirmadas por titulação com EDTA e laranja de xilenol como indicador) com 3 equivalentes molares de **K₂1Tdpa** ou **K₂2Tdpa** (soluções aquosas, 10 mM) em água e da agitação por 30 minutos. A formação dos complexos foi analisada por espectrometria de massas de alta resolução (Figuras A10 a A14).

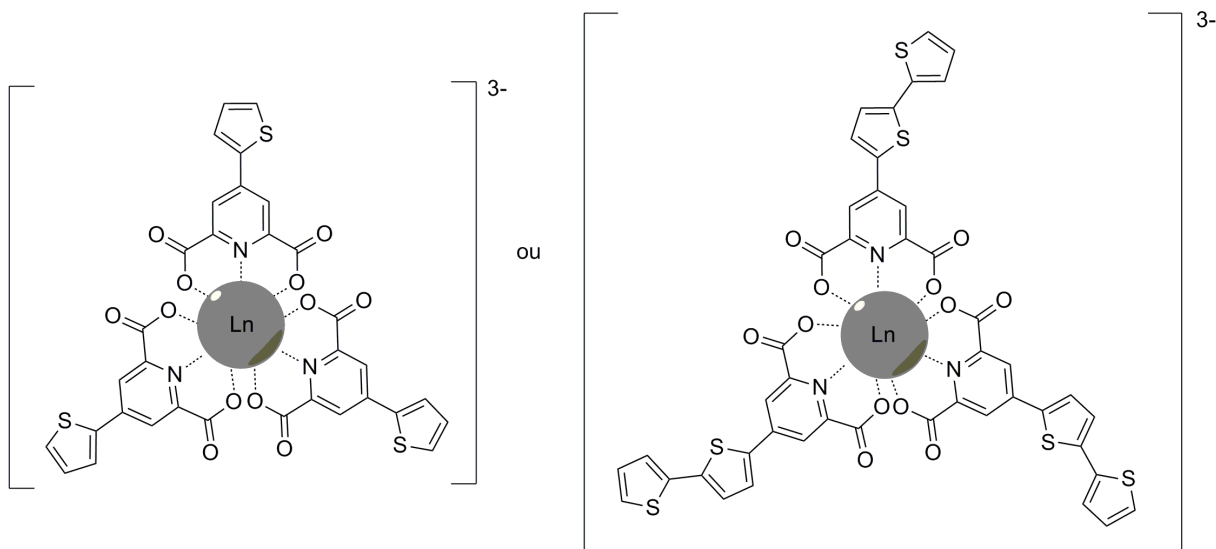


Figura 2. 9. Estruturas dos complexos $K_3[Ln(nTdpa)_3]$, $n = 1$ ou 2 e $Ln^{3+} = Eu^{3+}, Gd^{3+}$ ou Yb^{3+} .



Rendimento: 95%

ESI-MS: $[K_2C_{33}H_{215}GdN_3O_{12}S_3]^-$, m/z : 976.8338 (calc), 976.8147 (exp).



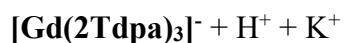
Rendimento: 94%

ESI-MS: $[K_2C_{33}H_{215}EuN_3O_{12}S_3]^-$, m/z : 971.8331 (calc), 971.8295 (exp).



Rendimento: 91%

ESI-MS: $[H_2C_{33}H_{215}YbN_3O_{12}S_3]^-$, m/z : 917.9168 (calc), 917.9208 (exp)



Rendimento: 98%

ESI-MS: $[C_{45}H_{22}GdKN_3O_{12}S_6]^-$, m/z : 1184.8411 (calc), 1184.8529 (exp)



Rendimento: 91%

ESI-MS: $[C_{45}H_{21}YbK_2N_3O_{12}S_6]^-$, m/z : 1162.9000 (calc), 1162.9177 (exp)

2.2.3. Síntese de PBAC-Dots (Capítulo 4)

Síntese dos C-Dots derivados do estrume de vaca (Figura 2.10)

15 g de esterco de vaca foram secos a 120 °C e triturados com almofariz e pistilo. Depois o material foi calcinado a 300 °C durante 3 h e resfriado até a temperatura ambiente. O pó preto resultante foi submetido a refluxo em solução de ácido nítrico (5,0 M; 250 mL) durante 72 h. A suspensão foi então resfriada, filtrada para remover partículas não dissolvidas e centrifugada a 6000 rpm por 20 min. O sobrenadante contendo os **C-Dots** foi filtrado através de uma membrana de 0,22 µm para remover as partículas grandes. A água foi removida (por evaporação) e os **C-Dots** (8,00 g) foram obtidos.

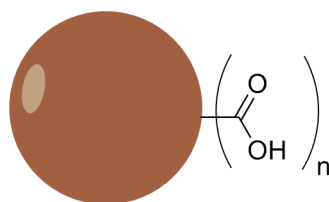


Figura 2. 10. Estrutura dos **C-Dots** derivados do estrume de vaca.

Síntese do derivado aminado C-Dots-NH₂ (Figura 2.11)

C-Dots (4 g) foram tratados com cloreto de tionila recém destilado (10 mL) à temperatura de refluxo por 4 h. Após o resfriamento até a temperatura ambiente, o excesso de cloreto de tionila foi removido sob vácuo e 30 mL de etilenodiamina anidra foram adicionadas. A mistura foi agitada durante 4 h a 115 °C. Após resfriamento e remoção do excesso de etilenodiamina sob vácuo, o sólido bruto foi dissolvido em água, centrifugado a 6000 rpm por 20 min e o sobrenadante foi filtrado através de uma membrana de 0,22 µm. O filtrado foi seco em estufa a 50 °C, resultando nos **C-Dots-NH₂** com rendimento quantitativo.

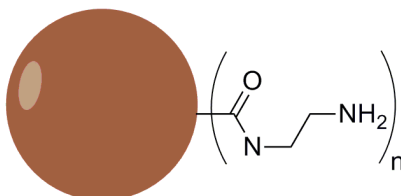


Figura 2. 11. Estrutura do derivado aminado **C-Dots-NH₂**.

Síntese do derivado **PBAC-Dots** (Figura 2.12)

1,00 g de **C-Dots-NH₂** e 5,00 g de ácido 4-formilfenilborônico foram dissolvidos em 500 mL de solução metanólica (70%). A solução foi refluxada por 24 h. Após, boroidreto de sódio (~ 10 g) foi adicionado e a mistura foi agitada vigorosamente. O solvente foi removido sob vácuo e as nanopartículas de **PBAC-Dots** foram lavadas com 200 mL de dioxano, redispersos em água, centrifugados a 6000 rpm por 20 min e, em seguida, filtrados através de membrana de 0,22 μm. A quantidade de **PBAC-Dots** obtida foi 250 mg.

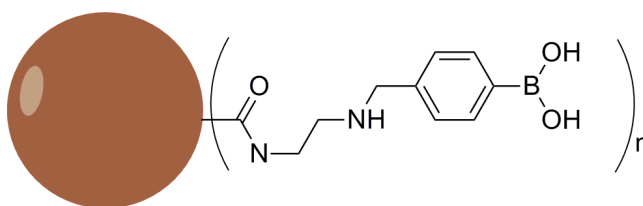


Figura 2. 12. Estrutura do derivado **PBAC-Dots**.

2.2.4. Síntese dos **C-Dots** contendo boro na estrutura (Capítulo 5) (Figura 2.13)

Os **C-Dots** foram obtidos em triplicata por meio de síntese assistida por micro-ondas. Soluções transparentes contendo a fonte de boro, a fonte de nitrogênio e a fonte de carbono, em 10 mL de água destilada foram colocados em um reator de micro-ondas com volume de 30 mL para em seguida sofrerem aquecimento até 170 °C, por 30 minutos, com agitação de 600 rpm. O equipamento de micro-ondas utilizado foi um Anton Paar Monowave (Anton Paar, Graz, Áustria). Após o resfriamento até a temperatura ambiente, as soluções de coloração verde foram filtradas através de membrana de 0,22 μm e aquecidas a 60 °C até a completa evaporação do solvente. Em seguida os materiais foram lavados com etanol quatro vezes para a remoção de reagentes residuais. Os sólidos foram então armazenados e chamados de **C-Dots a, b e c**.

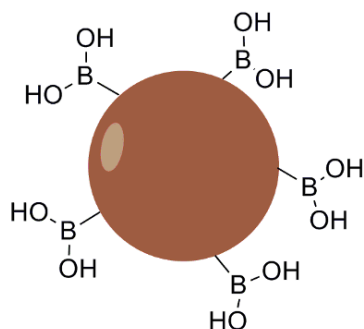


Figura 2. 13. Estrutura dos **C-Dots** contendo boro na estrutura.

2.2.5. Preparo de **AnB@C-Dots** (Capítulo 5) (Figura, 2.14)

Uma solução aquosa de concentração 1 mg mL^{-1} dos **C-Dots**, preparada com 10 dias de antecedência, foi misturada a uma solução de AnB em DMSO com concentração de 100 mg mL^{-1} (preparada por meio de sonicação por 30 minutos). A nova solução foi sonicada por 30 minutos, de forma que a percentagem final de DMSO não excedia 1%, e armazenada a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. O equipamento utilizado foi um banho de limpeza ultrassom (Quimis, Diadema, Brasil), utilizando a frequência ultrassônica de 40 KHz.

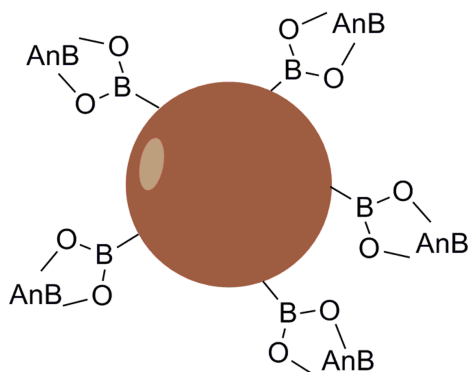


Figura 2. 14. **AnB@C-Dots**.

2.3. Caracterização espectroscópica

Os espectros de absorção, excitação e emissão de **K_2nTdpa** e **$\text{K}_3[\text{Ln}(\text{nTdpa})_3]$** ($n = 1$ ou 2 e $\text{Ln}^{3+} = \text{Eu}^{3+}, \text{Gd}^{3+}$ ou Yb^{3+}) foram adquiridos de soluções aquosas com concentração de $50 \text{ } \mu\text{M}$, e a geração de oxigênio singleto, monitorada por meio da emissão em 1270 nm , foi medida em soluções aquosas de $500 \text{ } \mu\text{M}$ de concentração. Os dados fotofísicos foram adquiridos a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, exceto quando especificado. Um espectrômetro de UV-Vis Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts, EUA) foi usado para adquirir os espectros de absorção na região do ultravioleta-

visível (UV-Vis) de **K₂nTdpa** e **K₃[Ln(nTdpa)₃]** (n = 1 ou 2 e Ln³⁺ = Eu³⁺, Gd³⁺ ou Yb³⁺). Os dados de fotoluminescência de todos os materiais aqui estudados foram adquiridos em um espectrofluorímetro Horiba Fluorolog-3 (Horiba Scientific, Kyoto, Japão). A fonte de excitação usada foi uma lâmpada de xenônio (Ushio, Tokyo, Japão) 450 W livre de ozônio. Todos os espectros de excitação e emissão foram corrigidos por função instrumental.

Os espectros de UV-Vis de **C-Dots-NH₂**, **PBA-CDots** e dos **C-Dots a, b e c** foram registrados usando-se um espectrofotômetro Agilent Technologies Cary 8454 (Agilent, Santa Clara, Estados Unidos). As soluções aquosas das nanopartículas tinham concentração de 0,2 mg mL⁻¹.

Especiação por meio de titulações de emissão

Uma solução 6 mM de YbCl₃ foi adicionada à solução de **K₂1Tdpa** ou **K₂2Tdpa**, preparada em tampão Tris/HCl (pH=7.54), com concentração de 20 μM. Os espectros de emissão foram adquiridos na faixa de 800 a 1300 nm, sob excitação de 374 nm, e o máximo de emissão foi registrado em 975 nm.

Titulações com Glicose e Anfotericina B (AnB)

Soluções contendo os **C-Dots a** na concentração de 20 μg mL⁻¹ e diferentes concentrações de glicose (de uma solução padrão inicial de 1,5 M em água) foram preparadas e espectros de emissão foram registrados sob excitação de 370 nm, a temperatura ambiente. Os máximos de intensidade ocorreram em 470 nm.

Para a titulação com AnB soluções dos **C-Dots a** contendo diferentes concentrações de AnB foram preparadas como descrito anteriormente. Para a aquisição dos espectros essas soluções sofreram diluição de 2x em água destilada e os espectros de emissão foram adquiridos sob excitação de 370 nm, a temperatura ambiente.

Medidas de rendimento quântico de emissão

Os padrões para rendimento quântico de emissão (exceto para os complexos de Yb³⁺ e Eu³⁺), de eficiência de geração de ¹O₂ e de rendimento quântico de emissão de complexos de Yb³⁺ e

Eu³⁺ foram sulfato de quinino ($\phi = 55\%$, 5 μM em solução aquosa 0,5 M de H₂SO₄), 2,2':5',2''-tertiofeno ($\phi = 74\%$, 100 μM em acetonitrila saturada de ar), [Yb(tta)₃(H₂O)₂] ($\phi = 0.12\%$, 100 μM em tolueno saturado de ar) e Cs₃[Eu(dpa)₃] ($\phi = 24\%$, 75 μM em tampão TRIS/HCl (0,1 M, pH ~7.4)) respectivamente. Os comprimentos de onda de excitação para as amostras e os padrões foram escolhidos de forma que a relação linear entre intensidade de luz emitida e a concentração das espécies que absorvem/emitem ($A \leq 0,05$) fosse garantida. Os rendimentos quânticos foram determinados por meio do método de diluição, utilizando a Equação 2.1, onde *Grad* é a inclinação da curva Área da Emissão vs. Absorbância, *n* é o índice de refração do solvente, *I* é a intensidade da fonte de excitação no comprimento de onda usado e ϕ é o rendimento quântico da amostra, *x*, e do padrão (*ref*). Todos os dados apresentados são uma média de pelo menos três medidas independentes.

$$\phi_x = \frac{Grad_x}{Grad_{ref}} \times \frac{n_x^2}{n_{ref}^2} \times \frac{I_{ref}}{I_x} \phi_{ref} 100$$

Equação 2. 1. Fórmula para o cálculo de rendimento quântico.

Cálculo de valor q

O número de moléculas de água coordenadas (*q*) foi determinado por meio da comparação entre os tempos de vida de emissão do Eu³⁺ em água ($\tau_{\text{H}_2\text{O}}$) e em água deuterada ($\tau_{\text{D}_2\text{O}}$, curva de decaimento da emissão do Eu³⁺ em D₂O disponível em Figura A15), usando-se a Equação 2.2, como descrito anteriormente.⁷⁰ Os valores de *A* e α para o íon Eu³⁺ são 1,11 e 0,31, respectivamente.

$$q_{Eu} = A \left(\frac{1}{\tau_{\text{H}_2\text{O}}} - \frac{1}{\tau_{\text{D}_2\text{O}}} - \alpha \right)$$

Equação 2. 2. Fórmula para o cálculo do valor *q*.

Rendimento quântico intrínseco

O rendimento quântico intrínseco, $\phi_{\text{Eu}}^{\text{Eu}}$, foi determinado usando-se a Equação 2.3, na qual *A*_{tot} é a taxa de emissão total ($A_{\text{tot}} = k_R + k_{\text{NR}} = 1/\tau_{\text{exp}}$).⁷¹

$$\phi_{Eu}^{Eu} = \frac{A_{rad}}{A_{tot}}$$

Equação 2. 3. Fórmula para o cálculo do rendimento quântico intrínseco.

Eficiência de sensitização

A eficiência de sensitização (η_{sens}) foi determinada por meio da Equação 2.4, na qual ϕ_{Eu}^L é a eficiência ou rendimento quântico da emissão sensitizada.⁷¹

$$\eta_{sens} = \frac{\phi_{Eu}^L}{\phi_{Eu}^{Eu}}$$

Equação 2. 4. Fórmula para o cálculo da eficiência de sensitização.

2.4. Outras caracterizações

Os seguintes métodos e equipamentos foram utilizados para a caracterização dos materiais aqui descritos:

- Análise elementar: Foi realizada em um analisador elementar CHN modelo 2400 Series II (Perkin Elmer, Stanford, Estados Unidos);
- Carga orgânica total (COT): Foi analisada em um analisador de carga orgânica total (Shimadzu, Kyoto, Japão) de soluções aquosas dos **C-Dots a, b e c**, com concentração igual a 1 mg mL⁻¹;
- Determinação da solubilidade: Uma solução saturada de **C-Dots** foi preparada a temperatura ambiente com volume de água destilada e massa de **C-Dots** previamente conhecidos. Após agitação por 30 minutos e repouso por mais 30 minutos, retirou-se o solvente e o soluto restante foi aquecido a 60 °C por 12 h. A solubilidade foi obtida por meio da diferença entre a massa de soluto inicial e a restante após a secagem, dividida pelo volume de solvente;
- Diagramas de cromaticidade: Foram obtidos por meio do aplicativo SpectraLux (SpectraLux Corporation, Washington, Estados Unidos);
- Espectroscopia de ¹H RMN: Os espectros de RMN foram adquiridos em um espectrômetro Varian de 400 MHz com deslocamentos químicos (δ , ppm) comparados com o de tetrametilsilano (TMS, 0,00 ppm). Os picos residuais de solvente são

atribuídos com um asterisco (*). Os valores das constantes de acoplamento foram expressas em Hz.

- Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV): Os espectros de IV foram adquiridos em pastilhas de KBr (anidro), na região espectral de 4000-400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e usando-se um espectrômetro Jasco FT/IR-4100 (Jasco, Tsukuba, Japão);
- Espectroscopia de fotoelétrons excitados por Raios X (XPS): Os espectros de XPS foram medidos no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas/Brasil), usando-se um monocromador de cristal duplo InSb (111) com energias fixas de fótons de 1840 e 3000 eV. O analisador hemisférico de elétrons foi ajustado para uma energia de passagem de 30 eV, e os incrementos de energia foram de 0,1 eV, com tempo de aquisição de 100 ms ponto⁻¹. A resolução geral foi ca. 0,3 eV.
- Microscopia eletrônica de transição de alta resolução (MET): As imagens de MET foram adquiridas em um microscópio eletrônico JEOL JEM 2010 (JEOL, Akishima, Japão), operando a uma tensão de aceleração de 200 kV. Para tal, uma solução etanólica diluída das nanopartículas foi depositada numa tela de cobre revestida com carbono de 400 malhas (Ted Pella Inc, Redding, Estados Unidos) e secas ao ar. As imagens foram analisadas usando-se o software livre ImageJ (NIH, Rockville, Estados Unidos);

2.5. Experimentos de cultivo celular

Culturas celulares

Células da linhagem celular HeLa (câncer cervical humano) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco, Nova York, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Nova York, EUA), 1% (v/v), antibiótico PenStrep (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de penicilina e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de estreptomicina; Gibco, Nova York, EUA) e glutamina (Gibco, Nova York, EUA). As células foram mantidas em atmosfera de 37 °C e 5% de CO_2 .

As células de melanoma murino (B16F10), fibroblastos murino (NIH3T3) e de câncer de mama (MCF-7) foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco, Nova York, EUA), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Gibco, Nova York, EUA), 1% (v/v), antibiótico PenStrep (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de penicilina e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de estreptomicina; Gibco, Nova York, EUA) e tamponada com bicarbonato de sódio (Sigma-

Aldrich, San Luis, EUA). Todas as linhagens celulares foram mantidas em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37°C.

As células de *Leishmania* usadas neste estudo foram formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* (2483). A amostra de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/2000/LTCP13396 = IOC-L2483) foi fornecida pelo Laboratório de Leishmanioses do Núcleo de Medicina Tropical (NMT) da UnB e mantida em culturas criopreservadas em Dewar de nitrogênio líquido (-196 °C) no laboratório de Dermatômico da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Para o cultivo dos parasitos, uma alíquota da cultura foi descropreservada e coletada com o auxílio de uma seringa de 1 mL contendo 0,2-0,5 mL de solução salina. O material aspirado foi adicionado a meio McNeal, Novy e Nicolle (NNN, pH 7,2) e mantido a 22 °C por cinco dias. Após esse período, a cultura foi transferida para o meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco, Nova York, EUA), suplementado com 7,5% de bicarbonato de sódio, 0,02% de gentamicina e 20 % de soro fetal bovino (SFB) inativado e mantida a 22 °C. A curva de crescimento foi monitorada por contagem diária de parasitos, usando-se um hemocitômetro Neubauer.

Contagem de Leishmanias

A contagem de parasitos foi feita em câmara de Neubauer na parte destinada à contagem de leucócitos. Após atingirem a fase logarítmica de crescimento, os parasitos foram suspensos em uma solução contendo 10 µL do meio de cultura e 90 µL de PBS (tampão fosfato-salino) gelado (4 °C). Depois de homogeneizados, uma alíquota de 10 µL dessa suspensão foi usada para preencher a câmara de Neubauer. Foram contados dois quadrantes opostos e a média obtida para esses dois quadrantes (p) foi aplicada na Equação 2.5 para a obtenção do número de parasitos por mL (P), onde fd é o fator de diluição. O fator 10.000 da Equação é devido ao volume da câmara que é de 0,1 µL³. Esse procedimento foi realizado em triplicata. Os critérios para a contagem foram: (i) emaranhados de parasitos não foram contados; (ii) formas no início da divisão e em estado de divisão avançada foram contados como um e dois, respectivamente; e (iii) formas que estavam em cima da linha ou muito próximos do quadrante também foram contados.

$$P = p \times fd \times 10.000$$

Equação 2. 5. Contagem de parasitos.

Experimentos de incubação

As células HeLa foram semeadas em placas de 96 poços (10^5 células mL^{-1}) e incubadas por 24 h. Depois disso, foram incubadas com os compostos **K_2nTdpa** e **$\text{K}_3[\text{Ln}(\text{nTdpa})_3]$** ($n = 1$ ou 2 e $\text{Ln}^{3+} = \text{Eu}^{3+}$, Gd^{3+} ou Yb^{3+}) por 4 h e o meio de cultura foi substituído por novo meio. As placas denominadas irradiadas foram expostas à luz 365 nm, a uma distância de 5 cm, por 5 minutos. As células foram novamente incubadas durante a noite e a viabilidade celular foi determinada por meio de ensaios MTT. As concentrações testadas foram 3, 6, 12,5, 25 e 50 μM . Cada experimento foi feito três vezes, com no mínimo cinco replicatas cada.

As células NIH/3T3 e B16F10 foram semeadas em placas de 96 poços (3×10^3 células poço⁻¹ de NIH/3T3 e 1×10^4 células poço⁻¹ de B16F10) e incubadas por 24 h. Depois disso, foram incubadas com os compostos por 24 h e o meio de cultura foi substituído por novo meio. As células foram novamente incubadas durante a noite e a viabilidade celular foi determinada por meio de ensaios MTT. As concentrações de **PBAC-Dots** testadas foram 0.01, 0.05 e 0.1 mg mL^{-1} . PBS foi usado como controle. Cada experimento foi feito três vezes, com no mínimo cinco replicatas cada.

Ensaio MTT de viabilidade celular

12,5 μL de uma solução em PBS de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (12 mM) foram adicionados a cada poço. As células foram incubadas por 3 h a 37 °C. O meio foi removido e 100 μL de DMSO foi adicionado a cada poço e as placas foram incubadas por mais 10 minutos. A absorbância em 540 ou 595 nm foi adquirida usando um leitor de placas Spectramax M3 (Molecular Devices, San Jose, Estados Unidos). A viabilidade celular foi obtida por meio da Equação 2.6, na qual A_C e A_B são as absorbâncias do controle negativo (células + MTT + DMSO) e branco (DMSO), respectivamente, e A_A é a absorbância das células incubadas com os compostos.

$$Viabilidade\ celular = \frac{A_A - A_B}{A_C - A_B} \times 100$$

Equação 2. 6. Fórmula para o cálculo da viabilidade celular.

Experimentos de citometria de fluxo

As células da placa de controle foram estimuladas com meio puro e estaurosporina (1,0 µL de uma solução em DMSO 1 mM – Abcam, Cambridge, Reino Unido) durante 4 h. Já as células das placas experimentais foram tratadas como descrito no item *Experimentos de Incubação*. Depois disso, as células foram lavadas com PBS e coradas com FITC anexina V (5,0 µL de uma solução 90 µg mL⁻¹ – BioLegend, San Diego, Estados Unidos) e iodeto de propídio (10 µL de uma solução 50 µg mL⁻¹ – BD Pharmingen™, Nova Jersey, Estados Unidos) de acordo com as instruções do fabricante. Os dados foram analisados usando-se o software FlowJo (Tree Star, San Carlos, Estados Unidos).

Experimentos de bioimageamento

Células da linhagem HeLa foram semeadas em frascos com fundo de vidro (5 x 10⁴ células mL⁻¹) e incubadas durante a noite a 37 °C. Soluções estoque dos corantes Hoechst 33342 (Millipore Sigma, Burlington, EUA) e Mitotracker Green FM (Invitrogen, Oregon, EUA) foram preparadas de acordo com as instruções dos fabricantes. O meio de cultura utilizado neste experimento não foi suplementado com soro fetal bovino. As células foram incubadas com **K₃[Eu(1Tdpa)₃]** por 4 h (12,5 µM), depois lavadas com PBS (2 mL x 3). Nos experimentos em que houve coloração simultânea com os corantes comerciais, as células foram incubadas com Mitotracker Green FM (50 nM em 1:1 PBS: meio de cultura) por 30 minutos e lavadas com PBS (2 mL x 3). Depois disto, as células foram incubadas com Hoechst 33342 (1µg 1 mL⁻¹ em 1:1 PBS: meio de cultura) por 10 minutos e lavadas com PBS (2 mL x 3). PBS foi adicionado às células para o imageamento (3 mL). As imagens foram adquiridas em um sistema de microscópio de varredura a laser confocal Nikon A1R (Nikon, Tokyo, Japan).

Para obtenção das imagens de células vivas na presença de **PBAC-Dots**, células MCF-7 foram plaqueadas em placa de 24 poços com lamínulas de vidro redondas de 13 mm no fundo e deixadas para aderir a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ por 30 min. Após, a placa foi lavada com meio isento de soro com o objetivo de remover as células não aderidas.

Já para os experimentos com células fixadas, uma cultura confluyente de células MCF-7 foi lavada três vezes com solução salina tamponada de fosfato (PBS, pH 7,4) e fixada durante 15 min em solução de formalina 3,7% em PBS à temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas três vezes com PBS.

Tanto as células vivas quanto as fixadas foram incubadas com **PBAC-Dots** (soluções aquosas de 2,5 mg mL⁻¹) por 30 min, à temperatura ambiente. As células foram incubadas em PBS nas mesmas condições, para obtenção do controle negativo. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS. ProLong Gold Antifade (Invitrogen, Oregon, EUA) foi então usado de acordo com as recomendações do fabricante para montagem das lamínulas. As amostras foram analisadas em um microscópio Confocal Leica TCS SP (Leica, Mannheim, Alemanha). Todos os ensaios foram realizados em três séries independentes.

2.6. Experimentos em vivo

2.6.1. Avaliação da toxicidade de PBAC-Dots

Tipo de estudo

Estudo em vivo do tipo experimental ou pré-clínico em camundongos da espécie *Mus musculus*, linhagem C57BL/6.

Animais

Todos os procedimentos com animais descritos no Capítulo 4 foram realizados com aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília (protocolo nº 7652/2015) e o certificado de aprovação encontra-se em anexo (Figura A16). Camundongos fêmeas C57BL/6 com 12 semanas de idade foram divididas em dois grupos principais: (i) camundongos saudáveis (n = 30) e (ii) camundongos com melanoma (n = 42). Animais sem melanoma foram divididos em 5 grupos (cada um com n = 6): (i) Grupo controle (Ct) com camundongos não tratados eutanasiados após 30 dias, e grupos experimentais com camundongos que receberam **PBAC-Dots** com concentrações de (ii) 0,16 mg mL⁻¹, observados por 2 dias (D_L2d); (iii) 0,16 mg mL⁻¹, observados por 30 dias (D_L30d); (iv) 0,31 mg mL⁻¹, observados por 2 dias (D_H2d) e (v) 0,31 mg mL⁻¹, observados por 30 dias (D_H30d). Os animais com melanoma foram divididos em 7 grupos (cada um com n = 6): (i) Grupo controle (Ct-T), com camundongos não tratados observados por 2 dias; e grupos experimentais com camundongos que receberam **PBAC-Dots**

em duas concentrações e foram observados após tempos diferentes de crescimento do tumor: (ii) 0,16 mg mL⁻¹, 4 dias (D_LT4d); (iii) 0,16 mg mL⁻¹, 8 dias (D_LT8d); (iv) 0,16 mg mL⁻¹, 14 dias (D_LT14d); (v) 0,31 mg mL⁻¹, 4 dias (D_HT4d); (vi) 0,31 mg mL⁻¹, 8 dias (D_HT8d) e (vii) 0,31 mg mL⁻¹, 14 dias (D_HT14d). A injeção da solução PBS ou de **PBAC-Dots** (0,16 ou 0,31 mg mL⁻¹, 100µL) foi intravenosa, acessando-se a veia da cauda.

Indução de tumor e imageamento em vivo

Os tumores foram induzidos por injeção subcutânea de 3,25 x 10⁵ células B16F10 suspensas em meio sem soro em camundongos C57BL/6 fêmeas com idades entre 4 e 6 semanas. Após 4, 8 e 14 dias de inoculação do tumor, soluções de **PBAC-Dots** (0,16 e 0,31 mg mL⁻¹) foram injetadas por via intravenosa. A biodistribuição em vivo e ex vivo das nanopartículas foi visualizada em um equipamento Lumina XR Series III[®] (Lumina-Perkin Elmer, Waltham, EUA), com o conjunto de filtros mais adequado para **PBAC-Dots** (excitação em 420 nm e emissão em 520 nm). As imagens foram feitas 0, 2, 4, 6, 24, 48 h (grupos D_L2d, D_H2d, Ct-T, D_LT4d, D_HT4d, D_LT8d, D_HT8d, D_LT14d e D_HT14d) e 30 dias (grupos Ct, D_L30d, D_H30d) após a injeção dos **PBAC-Dots**. As imagens ex vivo foram feitas após a realização da última imagem em vivo (2 ou 30 dias) dos tecidos coletados. Os tecidos foram colocados em solução de paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA).

Avaliação de parâmetros clínicos em vivo

Foram estudados os seguintes parâmetros: variação do peso corporal e ingestão de alimentos e água dos grupos Ct, D_L30d e D_H30d nos dias 1, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 24, 27 e 30 após a injeção de **PBAC-Dots**. Além disso, amostras de sangue e soro foram analisadas para os mesmos grupos e para os grupos D_L2d e D_H2d. As análises das amostras de sangue foram realizadas no analisador hematológico veterinário Sysmex pocH-100iV Diff TM (Sysmex, Kobe, Japão) para os seguintes parâmetros: Leucócitos totais, eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média, plaquetas, células pequenas, células medianas e células grandes. Para amostras de soro

as análises foram feitas em equipamento ChemWell-T (LabTest, Lagoa Santa Brasil) para ALT, AST, creatinina, LDH, fosfatase alcalina e ureia.

Análise de toxicidade PBAC-Dots por histologia

Após a injeção dos **PBAC-Dots** e o tempo de observação, o sangue, o tumor e os órgãos cérebro, rim, fígado, pulmão e baço foram coletados para avaliar a toxicidade das nanopartículas por histologia clássica. Os tecidos foram fixados com solução de paraformaldeído 4% por 3 h em temperatura ambiente e processados para histologia clássica.

Análise estatística

O teste Anova com pós-teste de Tukey e o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn foram usados para avaliar se havia diferença significativa entre os dados obtidos para os diferentes grupos. Para tal o software GraphPad InStat versão 3.00 (GraphPad Software, San Diego, Estados Unidos) foi utilizado. O nível de significância utilizado foi $p < 0,005$. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão.

2.6.2. Avaliação da eficácia e toxicidade da contra *Leishmania*

Tipo de estudo

Estudo em vivo do tipo experimental ou pré-clínico em camundongos da espécie *Mus musculus*, linhagem Balb/c.

Animais

Trinta e seis camundongos fêmeas da linhagem Balb/c compuseram seis grupos de estudo. Elas foram adquiridas com aproximadamente 30 dias do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratórios, da Universidade Estadual de

Campinas (Unicamp). Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB) que conta com infraestrutura para o alojamento dos animais e médico veterinário responsável. Os camundongos ficaram em ambiente com luminosidade controlada, com ciclo de 12 horas no claro e 12 horas no escuro. Cada gaiola acondicionou 3 animais, com água e ração *ad libitum* durante todo o experimento. As gaiolas foram forradas com maravalha.

Com uma média de 90 dias de idade, os camundongos dos grupos 1 a 5 foram infectados com aproximadamente 10^7 formas promastigotas de *L. braziliensis*, cultivadas em meio bifásico Nove-McNeal-Nicolle-NNN, via subcutânea e no coxim plantar direito. Os camundongos do grupo 6 foram inoculados com soro fisiológico 0,9%, em condições similares às praticadas nos animais dos outros grupos, para reduzir vieses relacionados ao estresse. No dia da inoculação os animais tinham peso médio de $26,8 \pm 3,1$ g.

Esquema terapêutico

Trinta e sete dias após a inoculação, os camundongos foram anestesiados com 10 mg Kg^{-1} de xilasina, e 90 mg Kg^{-1} de quetamina por via intraperitoneal para que uma amostra de linfa fosse colhida, por aspiração da pata direita (inoculada com os parasitos), para a realização de culturas e confecção de lâminas para a confirmação ou não da infecção. Uma vez confirmada a infecção, os animais foram submetidos ao esquema terapêutico por 10 dias, sendo que os medicamentos e o soro fisiológico 0,9% (para os grupos controle, 5 e 6) foram administrados por via intraperitoneal (injeção no peritônio).

No décimo dia de tratamento os animais foram anestesiados e uma amostra de linfa da pata que foi inoculada foi novamente colhida para realizar as culturas para crescimento de *Leishmania* (para confirmação ou não de infecção), por metodologia idêntica à utilizada antes do início do esquema terapêutico.

Passados os dez dias de tratamento, os animais foram anestesiados por meio da aplicação de cloridrato de xilasina na dose de 10 mg Kg^{-1} , associado a quetamina na dose de 90 mg Kg^{-1} , por via intramuscular, para posterior coleta de sangue por punção intracárdica (para realização dos testes laboratoriais). Ainda sob o efeito dos anestésicos, os animais foram levados, individualmente, à câmara de saturação de CO_2 , sendo esta fechada de maneira a atingir uma saturação superior a 70%. Isso levou os animais ao óbito por parada cardiorrespiratória. Posteriormente à eutanásia, as patas traseiras direitas foram dissecadas e trituradas (com todos os tecidos, inclusive o ósseo) para realização da quantificação de parasitos

por meio de diluição limitante. Os órgãos rins e fígado foram extraídos para estudos de histologia. Para o descarte, os cadáveres foram colocados em sacos plásticos brancos e mantidos a -20 °C no freezer do biotério da Faculdade de Medicina da UnB, para posterior incineração.

Esse experimento em vivo foi aprovado pela Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília, protocolo nº 8480/2016, e o certificado de aprovação encontra-se em anexo (Figura A17).

Preparo das formulações administradas

As formulações foram preparadas como descrito a seguir de forma que os volumes administrados aos animais variavam de acordo com suas massas, de 240 a 360 µL, que eram pesadas diariamente, antes da administração das substâncias.

- **AnB@C-Dots** (Grupo 1). Uma solução de **AnB@C-Dot** de concentração de 2 mg mL⁻¹ foi preparada como descrito anteriormente no dia anterior ao início do esquema terapêutico, e armazenada em refrigerador, protegida da luz. A partir dessa solução, uma nova solução de concentração de 0,25 mg mL⁻¹ era preparada em água destilada para injeção diariamente ao longo do ensaio em vivo.
- **AnB desoxicolato (D-AnB)** (Grupo 2). Uma solução de **D-AnB** com concentração de 5 mg mL⁻¹ foi preparada em água destilada para injeção no dia anterior ao início do esquema terapêutico e mantida em refrigerador, protegida da luz. A partir dessa solução concentrada, uma solução de **D-AnB** de concentração de 0,25 mg mL⁻¹ era diariamente preparada em dextrose 5% durante os dez dias de experimento.
- **AnB lipossomal (AmBisome®)** (Grupo 3). Uma solução de **AmBisome®** com concentração de 5 mg mL⁻¹ foi preparada em água destilada para injeção no dia anterior ao início do esquema terapêutico, mantida em refrigerador e protegida da luz. A partir dessa solução padrão novas soluções de **AmBisome®** de concentração de 0,25 mg mL⁻¹ eram diariamente preparadas em dextrose 5% durante os dez dias de experimento.
- **C-Dots** (Grupo 4). Uma solução de concentração de 1 mg mL⁻¹ de **C-Dots** foi preparada dez dias antes do início do esquema terapêutico em água destilada para injeção. No dia anterior ao início do tratamento, uma nova solução de concentração de 0,125 mg mL⁻¹ foi produzida por diluição. Esta, por sua vez, foi administrada durante os dez dias.
- Soro fisiológico 0,9% (Grupos 5 e 6). Foi usado sem tratamento prévio.

2.6.2.1. Critérios para a avaliação da eficácia

Durante e após a realização do esquema terapêutico, os critérios para a avaliação da eficácia da **AnB@C-Dots**, quando comparada às formulações comerciais, ao carreador puro e aos controles foram medição das patas, critérios parasitológicos (pesquisa de promastigotas em cultura em meio NNN- Neal, Novy, Nicolle), quantificação de parasitos por meio do método de diluição limitante e estimativa de viabilidade celular por meio de ensaio de MTT.

Medição das patas

As medidas das patas foram feitas com o objetivo de avaliar o desenvolvimento da lesão nos animais. Nos dias 1, 3, 5, 7 e 10 as patas direitas dos camundongos foram medidas com o auxílio de um paquímetro milimétrico (Mitutoyo®, Tsukuba, Japão) por duas pessoas distintas de forma a se obter duas medidas independentes.

Critérios parasitológicos

Após anestesia dos animais, uma amostra de linfa era colhida por aspiração da pata direita e inoculada. A amostra era utilizada para culturas e preparo de lâminas de extensão para pesquisa de formas amastigotas em esfregaço. Esse procedimento foi feito tanto no início quanto no fim do esquema terapêutico.

A aspiração da linfa era realizada usando-se seringas de 1 mL contendo aproximadamente 200 μL de solução PBS (pH 7,2) acrescida de gentamicina na concentração de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A suspensão formada pela linfa e a solução salina era misturada em meio de cultura bifásico Nove-McNeal-Nicolle-NNN e mantida em estufa a 24 °C. A leitura das culturas era feita diariamente em um microscópio de luz invertida (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) com aumento de 40 vezes e sempre que era identificado o movimento das formas promastigotas, o animal era considerado infectado.

As lâminas de extensão, também chamadas de esfregaços, foram fixadas com metanol e coradas com corante de Giemsa. A leitura das lâminas foi realizada em um microscópio da marca Zeiss (Oberkochen, Alemanha) com aumento de 100 vezes. Quando uma forma

amastigota era visualizada, na qual fosse possível identificar a membrana, o cinetoplasto e o núcleo, então o animal era considerado infectado.

Quantificação de parasitos usando o método de diluição limitante

O método de diluição limitante foi utilizado para estimar a quantidade de parasitos presentes nas patas dos animais, por meio da ferramenta web disponível em <http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda/>.⁷² Após a eutanásia, as patas direitas (infectadas) dos animais foram dissecadas de forma mais asséptica possível e homogeneizadas em 5 mL de meio de cultura Schneider, suplementado com 20% de soro fetal bovino e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina, em um homogeneizador de vidro, aos pares (duas patas direitas de dois animais de cada grupo). A diluição foi feita em placas de microtitulação de 96 poços e a análise era então realizada conforme descrito por Titus e colaboradores.⁷³ 200 μL da solução formada pelas duas patas de animais de mesmo grupo e o meio de cultura foram colocados em todos os poços da primeira fileira da placa de 96 poços (A). As fileiras de B a H haviam sido preenchidas com 180 μL do meio de cultura descrito acima, previamente. 20 μL da fileira A foram adicionados à fileira B. Após a homogeneização do conteúdo dos poços da fileira B, 20 μL foram retirados e colocados na fileira C e assim sucessivamente.

A placa foi mantida em estufa a 24 °C. Caso houvesse uma forma amastigota em um poço, após no mínimo 24 h, essa forma se dividiria e multiplicaria dando origem a outras formas promastigotas, que por sua vez poderiam ser vistas em um microscópio de luz invertida (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) com aumento de 40 vezes. A leitura das placas foi feita diariamente durante cinco dias.

Viabilidade celular das Leishmanias

As placas preparadas foram avaliadas por meio do método de MTT para estimar o percentual de formas amastigotas viáveis presentes nas patas dos camundongos. Para tal, 10 μL de uma solução de MTT 12 mM, em solução de PBS, foi adicionada a cada poço. As placas foram incubadas por 4 h a 24 °C. Os cristais de MTT foram solubilizados em 100 μL de DMSO e a absorbância foi adquirida em uma leitora de microplaca Spectramax Plus (Molecular Devices, San José, EUA) em 570 nm. A viabilidade celular foi calculada de acordo com a Equação 2.6.

Análise estatística

Os dados foram analisados com o auxílio do software IBM SPSS Statistics (IBM Corp., Armonk, Estados Unidos), versão 24. As amostras foram consideradas independentes e a normalidade das variáveis e a homogeneidade das variâncias foram verificadas por meio dos testes de Shapiro-Wilk e de Levene, respectivamente. A comparação entre as médias dos grupos foi feita por meio de Análise de Variância (ANOVA), sempre que os critérios de normalidade e homogeneidade eram satisfeitos, seguida pelo pós-teste de Tukey ou de Sheffé, para grupos com mesmo número de indivíduos (N) e com N diferentes. Quando os critérios de normalidade e/ou homogeneidade não eram atingidos, o confronto entre as medianas dos grupos era feito por meio do teste de Kruskal-Wallis. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

2.6.2.2. Critérios para a avaliação de toxicidade

A avaliação da toxicidade da **AnB@C-Dots** foi feita por meio de exames bioquímicos e hematológicos, realizados pelos Laboratórios Sabin e por meio da avaliação de danos causados nos tecidos de alguns órgãos, por meio de estudos histológicos.

Coleta de sangue para exames bioquímicos e hematológicos

O sangue dos animais foi coletado por punção intracárdica utilizando-se seringa de 1 mL sem EDTA, sendo este transferido para microtubos próprios para soro, os quais eram fornecidos pelos Laboratórios Sabin, e enviado ao seu Núcleo de Apoio à Pesquisa (NAP) para avaliações hematológicas e bioquímicas. Dos seis animais de cada grupo, o sangue de três camundongos foi destinado a exames bioquímicos e o dos outros três a realização de hemogramas.

Preparo de lâminas para a análise histológica

Os órgãos rins e fígado foram coletados, imediatamente após a eutanásia por meio de uma incisão na cavidade abdominal de forma mais asséptica possível. Os órgãos foram lavados com soro fisiológico 0,9% e colocados em fixador Davidson, por 24 h. Depois disso, as peças foram lavadas com água da torneira, imersas em PBS e reservadas a 4 °C até que fossem preparadas para histologia clássica.

2.6.3. Análise de lâminas por histologia

Para inclusão em parafina, os órgãos foram imersos em soluções e por períodos que variaram entre 40-60 min (Tabela 2.1) com o objetivo de desidratar e diafanizar os fragmentos. As peças em parafina (Dinâmica Química Contemporânea LTDA., Indaiatuba, Brasil) foram preparadas e os cortes histológicos foram realizados com o auxílio de um micrótomo (Leica, Wetzlar, Alemanha), com espessura de 3 a 5 μm . Os cortes foram colocados em banho-maria a 35°C, coletados em lâminas de vidro e identificados. As lâminas foram mantidas por 24 horas a 37°C para que o material tivesse perfeita adesão.

Tabela 2. 1. Preparo dos blocos em parafina.

Ordem	Solução	Tempo (min)	Temp.
1	Álcool 70%	60	Ambiente
2	Álcool 80%	60	Ambiente
3	Álcool 90%	60	Ambiente
4	Álcool 100%	60	Ambiente
5	Álcool 100%	60	Ambiente
6	Álcool 100%	60	Ambiente
7	Xilol:Álcool (1:1 v/v)	60	Ambiente
8	Xilol	40	Ambiente
9	Xilol	40	Ambiente
10	Xilol	40	Ambiente
11	Parafina	40	60 °C
12	Parafina	40	60 °C
13	Parafina	40	60 °C

As lâminas foram coradas pelo método da hematoxilina & eosina. Para isso, as mesmas passaram por um processo de desparafinização e hidratação, como detalha a Tabela 2.2. Soluções de álcool (Dinâmica Química Contemporânea LTDA., Indaiatuba, Brasil) e xilol (Dinâmica Química Contemporânea LTDA., Indaiatuba, Brasil) foram usados nesse processo. Após o último banho, as lâminas foram cobertas com lamínulas utilizando-se verniz incolor (Acrilex®, São Bernardo do Campo, Brasil) e foram colocadas para secar a temperatura ambiente. As lâminas foram analisadas e fotografadas digitalmente em um microscópio

eletrônico EVOS® FL Auto Imaging System e usando-se o software EVOS® FL Auto (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA).

Tabela 2. 2. Coloração das lâminas.

Ordem	Solução	Tempo (min)
1	Xilol 1	1
2	Xilol 2	1
3	Xilol 3	1
4	Xilol:Álcool (1:1 v/v)	1
5	Álcool 100%	1
6	Álcool 90%	1
7	Álcool 80%	1
8	Álcool 70%	1
9	Água destilada	1
10	Hematoxilina	3
11	Água destilada	1
12	Eosina	2
13	Água destilada	1
14	Álcool 70%	1
15	Álcool 80%	1
16	Álcool 90%	1
17	Álcool 100%	1
18	Xilol 1	1
19	Xilol 2	1
20	Xilol 3	1

Capítulo 3

Síntese e Caracterização de Complexos de Íons Lantanídeos Luminescentes a Partir de Ligantes Tiofeno e Bitiofeno-Dipicolinato para Terapia Fotodinâmica

3.1. Introdução

O câncer é um grande problema de saúde pública em todo o mundo e é a segunda causa mais frequente de mortalidade atualmente.⁷⁴ Além disso, a taxa de incidência de câncer deve aumentar em 50% nas próximas décadas.⁷⁴ Os tratamentos disponíveis para tal doença ainda são muito caros e apresentam efeitos colaterais severos aos pacientes.⁷⁵

A TFD surgiu como uma alternativa menos invasiva para o tratamento de diferentes tipos de cânceres. Além disso, funciona ainda contra doenças infecciosas, o que pode ser uma alternativa para o crescente aumento de resistência aos antibióticos existentes. Sob essa perspectiva, o desenvolvimento de novos sistemas FS que reúnam baixa toxicidade no escuro e alta fototoxicidade, viabilizando a TFD, é necessário.

Este trabalho reporta a síntese de cinco sistemas fluorescentes complexos de íons lantanídeos sensibilizados por antenas contendo grupos tiofeno, os quais foram chamados de **K₂1Tdpa** e **K₂2Tdpa** (Figura 3.1). O ânions derivados dos ligantes, denominados **nTdpa²⁻** (**n** = **1** ou **2**), foram usados para sensibilizar os complexos de Gd³⁺ e Yb³⁺. Suas propriedades fotofísicas e capacidade de geração de ¹O₂ utilizando-se os complexos resultantes foram investigadas. Os compostos de **2Tdpa²⁻** foram testados *in vitro* como FS de TFD com células HeLa. **1Tdpa²⁻**, por sua vez, mostrou-se capaz de também sensibilizar o íon Eu³⁺. Este complexo fluorescente emissor no vermelho foi caracterizado espectroscopicamente e usado em experimentos de bioimageamento celular seletivos.

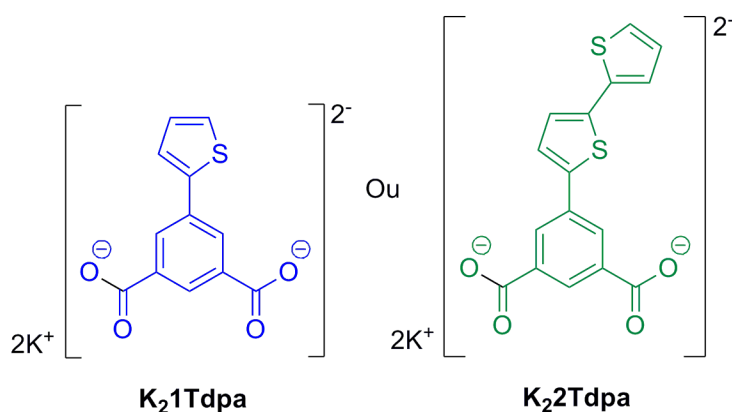


Figura 3. 1. Ligantes que fizeram parte deste estudo.

3.2. Revisão bibliográfica

3.2.1. Íons lantanídeos

Materiais contendo determinados íons Ln^{3+} apresentam espectros de absorção e emissão com linhas estreitas. Um dos fatores determinantes para este tipo característico de emissão é o fato de as transições $4f-4f$ serem proibidas.⁷⁶ Outra característica vista como atrativa nas emissões dos íons Ln^{3+} é que os orbitais $4f$ são blindados pelos elétrons dos orbitais $5s$ e $5p$. Uma das consequências desta blindagem é que a luminescência observada não é drasticamente alterada pelo ambiente de coordenação destes íons.⁷⁷ Dessa forma, os íons Ln^{3+} comumente apresentam longos tempos de vida de luminescência e espectros (absorção/emissão) com linhas finas e frequências típicas para cada espécie.

Contudo, a excitação em quantidades satisfatórias de íons de terras raras não é trivial devido aos seus baixos coeficientes de absorção molar ($< 10 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).^{78,79} Outro problema a ser contornado é o fato de que as vibrações O-H e N-H tendem a desativar a luminescência dos íons de terras raras de forma não-radioativa, limitando assim, a suas aplicações ópticas em meios contendo solventes próticos.⁷⁹⁻⁸⁰

Uma estratégia para se contornar estes obstáculos é a promoção da excitação dos íons lantanídeos de forma indireta, o qual é conhecido como efeito antena (Figura 3.2(a)).⁷⁸ Esta estratégia consiste em coordenar um sensibilizador ao íon que absorverá um fóton, o que comumente leva a um estado excitado singleto (S^*_1). Após a excitação do sensibilizador ocorre normalmente um ISC promovido por acoplamento do tipo spin-órbita que popula um estado excitado tripleto (T^*_3). Se o estado T^*_3 estiver em uma energia apropriada, e devido a seu tempo de vida tipicamente longo, a energia pode ser transferida para popular um estado emissor do íon Ln^{3+} . A energia pode então ser relaxada de forma radiativa ou, em um sistema adequado, ser utilizada para geração de oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) (Figura 3.2(b)).^{76,81}

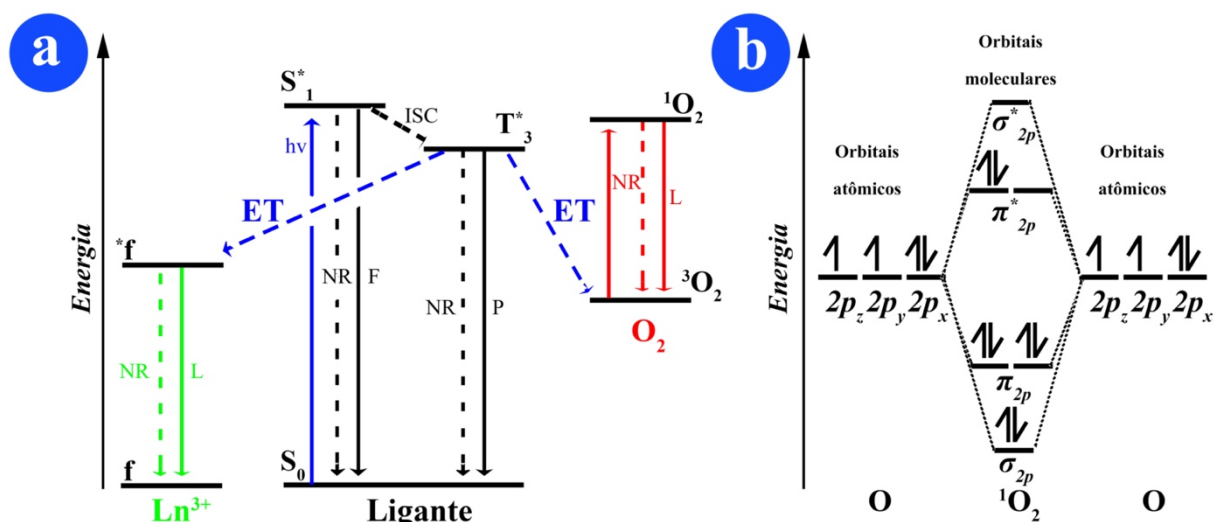


Figura 3. 2. (a) Diagrama de níveis de energia ilustrando os processos de transferências de energia (ET) que ocorrem tanto para sensibilizar os íons Ln³⁺, quanto para gerar ¹O₂. A energia $h\nu$ é absorvida pelo ligante, populando um estado singleto excitado (S₁*). Após um ISC, o estado tripleto excitado (T₃*) é populado e a energia pode ser transferida para o estado emissivo f*, de onde pode decair na forma de luminescência (L) para o estado fundamental f ou pode formar ¹O₂. A energia também pode decair de forma não radiativa (NR), por meio dos caminhos representados por linhas pontilhadas. Outros processos possíveis são a fluorescência (F) e a fosforescência (P). Os níveis de energia não estão representados com escala correta. (b) Diagrama dos orbitais moleculares do ¹O₂.

As características peculiares dos íons lantanídeos permitem a viabilidade de seu uso em uma grande variedade de aplicações tais como a produção de dispositivos conversores de luz,⁶⁶ o desenvolvimento de componentes de magnetos permanentes em turbinas eólicas e de baterias de carros elétricos,¹⁴ a termometria óptica,⁸² a produção de dispositivos utilizados na química forense⁸³ e a pesquisa de materiais com aplicações em medicina, como bioimageamento e desenvolvimento de sensores luminescentes.^{84,67}

3.2.2. Ligantes utilizados como antenas

A escolha da antena para íons Ln³⁺ é determinante para fatores como: as propriedades fotofísicas, a capacidade de proteger o centro emissor de osciladores O-H e N-H, a solubilidade em água e a habilidade de geração de ¹O₂ do complexo. A energia do estado S₁ da antena deve ser próxima o suficiente do nível emissor do íon Ln³⁺ para que a transferência de energia de fato aconteça, mas não tão próxima ao ponto de permitir a retro-transferência da energia.¹³ Em geral, diferenças entre estes dois estados entre 2500-3500 cm⁻¹ promovem maiores rendimentos

quânticos.¹² Outra regra comumente seguida pelos desenvolvedores de ligantes é manter a diferença de energia entre os estados S^*_1 e T^*_3 da antena por volta de 5000 cm^{-1} . Diferenças desta ordem aumentam a eficiência do processo de ISC.¹²

Em um complexo de Ln^{3+} , o centro metálico interage com ligantes neutros ou carregados via ligações de coordenação. Já a interação entre complexos, em geral, se dá por meio de interações eletrostáticas fracas. O resultado disso é que a simetria de coordenação ao redor do íon Ln^{3+} normalmente é determinada apenas pelos ligantes da esfera interna de coordenação.¹³ O número de coordenação de complexos de Ln^{3+} é dependente de fatores estéreos e do balanço entre as forças de repulsão entre os ligantes,¹³ e geralmente variam entre 8 ou 12.⁸⁵ Quando os ligantes não conseguem completar a esfera de coordenação dos íons Ln^{3+} , frequentemente moléculas de solvente são coordenadas ao centro metálico.⁸⁶ Em solventes próticos isto pode comprometer o rendimento quântico do composto, porque os osciladores de alta energia promovem a desativação do estado excitado por vias não radiativas.⁷⁹⁻⁸⁰

Em geral, a solubilidade em água de complexos de íons Ln^{3+} é estabelecida pela escolha do ligante. Complexos solúveis em água são preferíveis em relação aos demais, não só para que as aplicações biológicas se tornem viáveis, mas também para que os processos envolvendo os complexos sejam mais ambientalmente amigáveis.⁸⁷ Apesar de, até alguns anos atrás, tais complexos terem sido a minoria,⁸⁸ existe uma tendência em direção ao desenvolvimento de complexos hidrofílicos.^{87, 89-92}

Para a aplicação específica do desenvolvimento de FS para TFD, é importante que o ligante promova a seletividade do complexo para *delivery* em organelas específicas de células cancerígenas.⁹³ Wong e colaboradores utilizaram complexos de Er^{3+} contendo um derivado de porfirina entre os ligantes que funcionou como unidade geradora de $^1\text{O}_2$.⁹³ Este sistema FS mostrou-se seletivo à região mitocondrial de células de HeLa.⁹³ O grupo de Patra,⁹⁴ por sua vez, relatou o uso dos ligantes dipirido[3,2-d:2',3'-f]quinoxalina e 4,4,4-trifluoro-1-(2-naftil)-1,3-butanediona para o desenvolvimento de FS baseados em complexos de Eu^{3+} e Tb^{3+} . Outra estratégia para geração de $^1\text{O}_2$ foi relatada por Maury e colaboradores.⁹⁵ Nesse trabalho, tris-picolinato 1,4,7-triazaciclonano funcionalizado foi usado para que complexos de Gd^{3+} e Y^{3+} pudessem funcionar como FS.⁹⁵ A Figura 3.3 reúne as estruturas destes complexos.

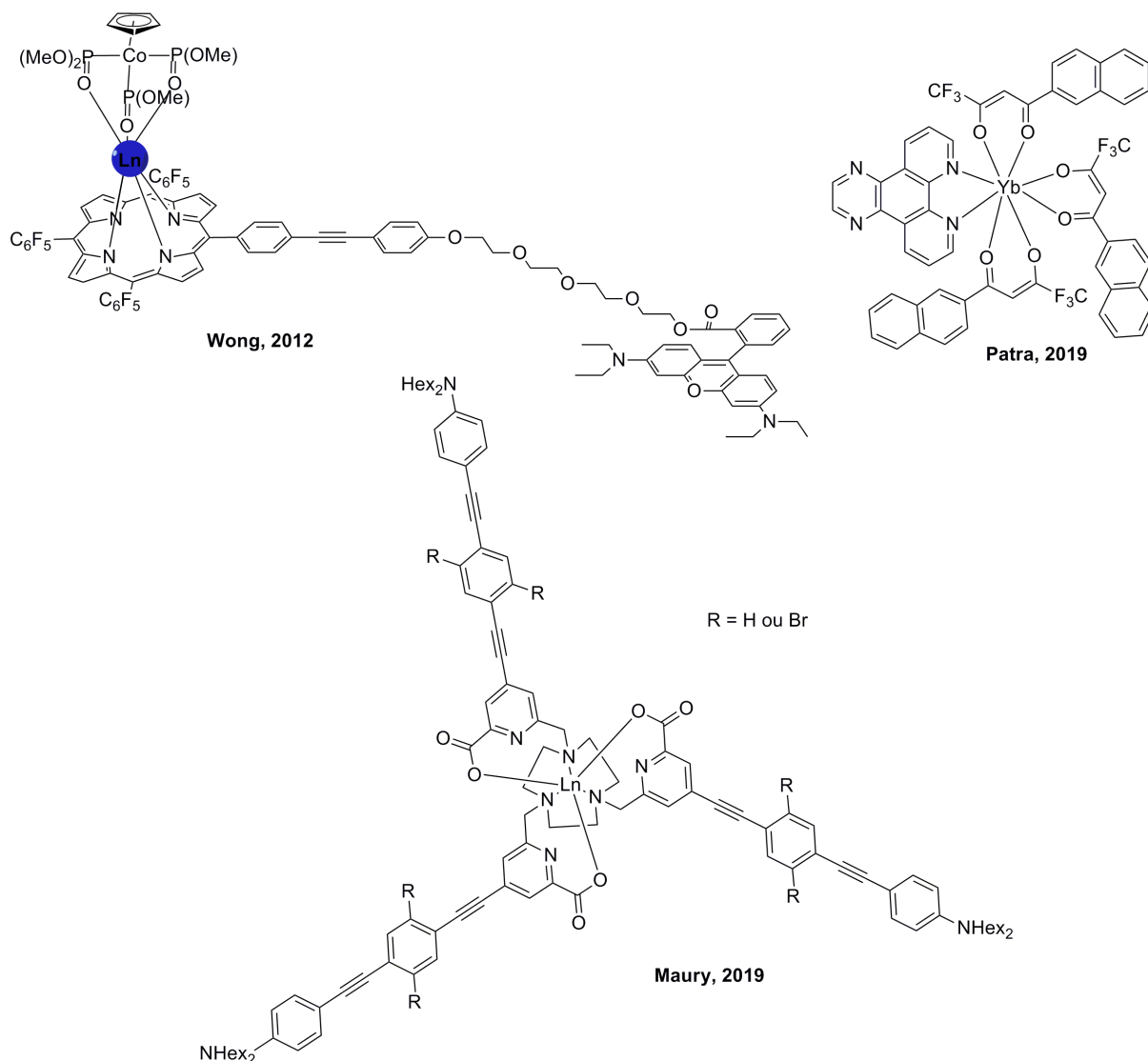


Figura 3. 3. Complexos de Ln^{3+} usados como FS para TDF.

3.2.3. Terapia fotodinâmica

$^1\text{O}_2$ é uma espécie reativa de oxigênio que vem sendo reportada como uma alternativa para o tratamento de doenças e é utilizada na chamada TFD. Essa é uma técnica que emergiu como promissora para o tratamento de câncer e problemas de pele devido a seu caráter pouco invasivo, seguro e efetivo. Seu uso popularizou-se a partir do início do século 20 quando O. Raab relatou que o tratamento de *Paramecium caudatum* com laranja de acridina, que produzia $^1\text{O}_2$ após exposição ao sol, era eficaz. Em outro exemplo, em 1903, Tappeiner and Jesionek concluíram que a eosina associada com luz branca resultavam no efeito tumoricida.⁹⁶

O desequilíbrio de ROS em uma célula pode ocorrer quando uma molécula sensível a luz, chamada de fotossensibilizadora (FS), é ativada por meio de radiação na presença de oxigênio em seu estado fundamental ($^3\text{O}_2$). O aumento da concentração de $^1\text{O}_2$ em níveis não

homeostáticos pode causar morte por irradiação das células tumorais com consequências em suas vasculaturas circundantes devido a danos oxidativos induzidos.⁹⁷ Após a excitação do FS a formação de ROS pode acontecer por meio de dois mecanismos chamados de reações tipo I e tipo II, como ilustra a Figura 3.4. Nas reações do tipo I o FS em seu estado excitado T_3 reage com biomoléculas disponíveis (lipídios, proteínas e ácidos nucleicos) transferindo átomos de hidrogênio via mecanismo radicalar, gerando radicais livres e íons radicais, que por sua vez reagem com o 3O_2 gerando espécies de ROS. Já nas reações do tipo II, o FS no estado T_3 reage com o 3O_2 resultando em 1O_2 . As duas reações acontecem concomitantemente, mas reações do tipo II são as maiores responsáveis pelo efeito citotóxico.⁹⁶

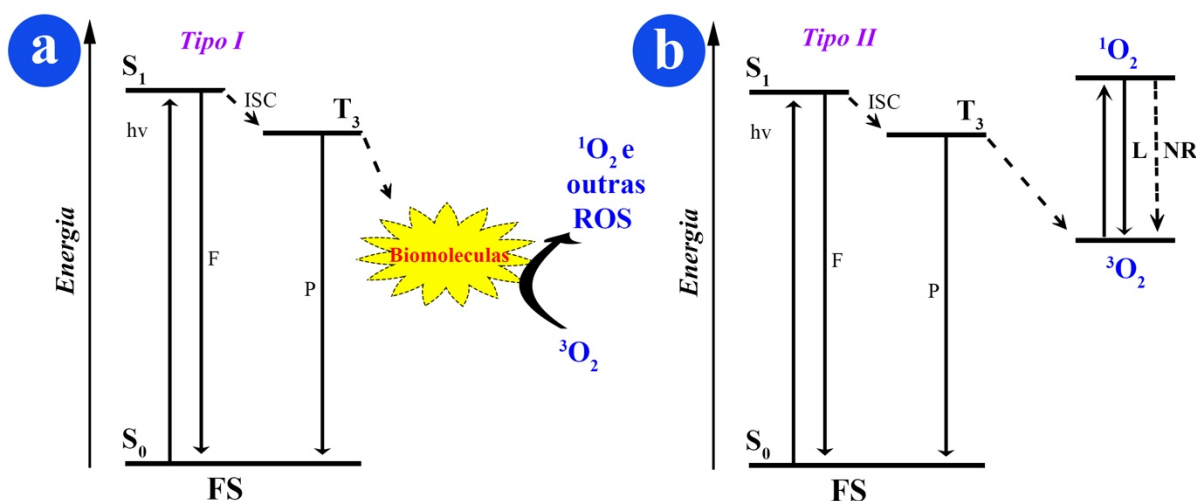


Figura 3. 4. Reações do tipo I e do tipo II em TFD. Após a absorção de luz, o FS atinge um estado excitado singleto (S_1). Após um ISC, o fóton, agora em um estado excitado tripleto (T_3), pode seguir dois caminhos: (a) reagir com biomoléculas para formar radicais, que reagem com 3O_2 para gerar ROS (reação tipo I); ou (b) reagir diretamente com oxigênio para gerar 1O_2 (reação tipo II). A energia também pode decair de forma não radiativa (NR), por meio dos caminhos representados por linhas pontilhadas. Outros processos possíveis são a fluorescência (F) e a fosforescência (P). Os níveis de energia não estão representados com escala correta.

A frequência da utilização da TFD no tratamento de doenças microbianas foi desacelerada após a introdução dos antibióticos e, apesar de a resistência a esses medicamentos reacender o interesse na técnica para tratar tais doenças, foi contra males não infecciosos tais como o câncer que o uso da TFD mais se desenvolveu.⁹⁶ A TFD já mostrou-se efetiva para diversos tipos de câncer incluindo, mas não restrito, a câncer de pulmão, bexiga, esôfago, trato intestinal e cérebro.^{96,98-99}

O FS deve idealmente ser inofensivo às células na ausência de radiação. Os dois compostos mais comumente utilizados para este fim na dermatologia são ácido 5-

aminolevulínico (ALA) e metil-aminolevulinato (MAL), cujas estruturas estão na Figura 3.5.¹⁰⁰ Além deles alguns compostos que vêm sendo usados como FS de TFD com sucesso são porfirinas⁷⁸ e complexos polipiridil Ru^{2+} (Figura 3.5).⁹⁸ Alguns sistemas contendo íons lantanídeos, tais como nanopartículas dopadas com lantanídeos,^{80, 101, 102,} estruturas metal-orgânicas¹⁰³ e complexos^{104, 105-} também já foram usados com êxito para tal finalidade.

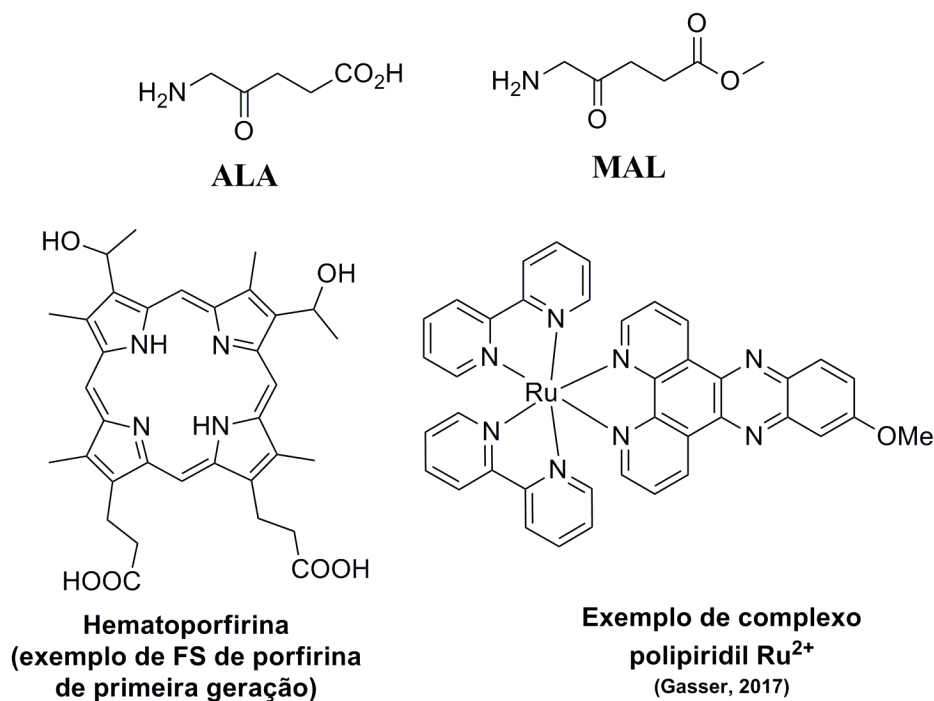


Figura 3. 5. Compostos utilizados como FS de TFD.

É importante que um candidato a FS de TDF possibilite seu rastreamento para que seu mecanismo de atuação seja investigado e para o desenvolvimento de agentes teragnósticos, que são capazes de atuar tanto na terapia quanto como sondas para bioimagem.¹⁰⁶ Com isso em mente, sistemas contendo íons lantanídeos funcionam bem como esse tipo de plataforma multifuncional, conforme demonstrado recentemente.^{103, 104, 107} Por exemplo, Patra e colaboradores¹⁰⁴ reportaram a investigação de complexos de Yb^{3+} em experimentos de bioimagem e TFD.¹⁰⁴ Em outro trabalho, Gasser e colaboradores¹⁰⁵ registraram a obtenção de complexos de Tb^{3+} , também capazes de serem visualizados dentro de células por meio de técnicas de fluorescência e de atuarem como potencial FS para TFD.¹⁰⁵ A Figura 3.6 mostra as estruturas de complexos trabalhados pelos grupos de Patra¹⁰⁴ e Gasser.¹⁰⁵

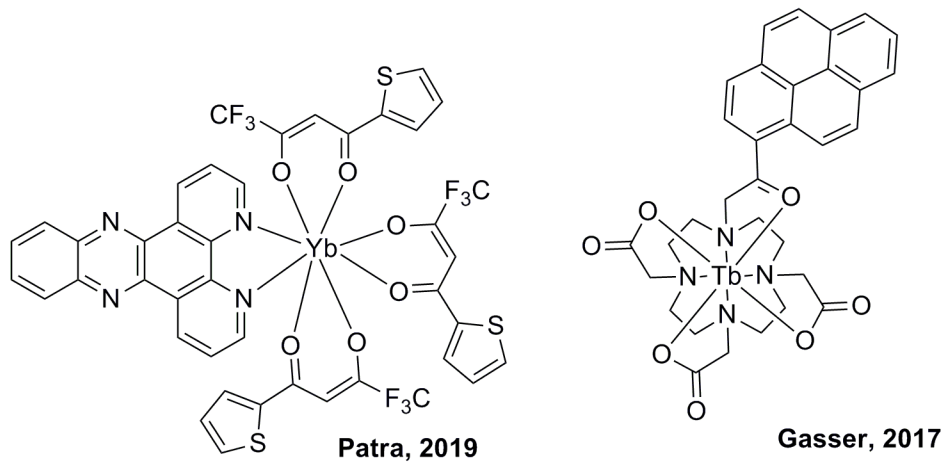


Figura 3. 6. Complexos de Ln³⁺ que funcionam como agentes teragnósticos.

3.3. Objetivos

3.3.1. Objetivo geral

Desenvolver FS de TFD baseados em complexos de íons lantanídeos com moléculas contendo grupos tiofeno-dipicolinato e testar seus potenciais teragnósticos em vitro.

3.3.2. Objetivos específicos

- Sintetizar complexos de íons lantanídeos (Eu^{3+} , Gd^{3+} e Yb^{3+}) contendo grupos tiofeno-dipicolinato e caracterizar as propriedades ópticas destes derivados;
- Analisar o efeito antena e as características fotofísicas dos sistemas sintetizados;
- Avaliar a capacidade dos complexos na geração de $^1\text{O}_2$;
- Testar a toxicidade e a fototoxicidade dos complexos em vitro;
- Investigar os mecanismos de morte celular provocados pelos compostos testados;
- Realizar experimentos de bioimageamento, de preferência seletivos, com os complexos sintetizados.

3.4. Resultados e discussão

Moléculas contendo tiofeno são úteis na Medicina como anticancerígenos, antimicrobianos, anti-inflamatórios, antidepressivos, analgésicos e anticonvulsivos.¹⁰⁸ O tiofeno pode ser fundido com vários outros núcleos heterocíclicos, dando origem assim, a novos compostos com atividades biológicas aprimoradas.¹⁰⁹ Alguns exemplos de antibióticos que contém o grupo tiofeno em suas estruturas são ticarcilina, cefoxitina, cefalotina e cefaloridina (Figura 3.7). Agentes antifúngicos como tioconazol e sertaconazol também contém grupos tiofeno (Figura 3.7).¹⁰⁹ As moléculas contendo grupos tiofeno também são promissoras para serem usadas como FS de TFD devido à baixa toxicidade e habilidade de formarem $^1\text{O}_2$.¹¹⁰ Alguns exemplos foram publicados por Dong,¹¹¹ Feng¹¹² e Song (Figura 3.8).¹¹³ Outra vantagem é a habilidade de moléculas contendo grupos tiofeno de aumentarem o ISC,^{114,115} e por isso funcionam bem como antenas para íons lantanídeos.

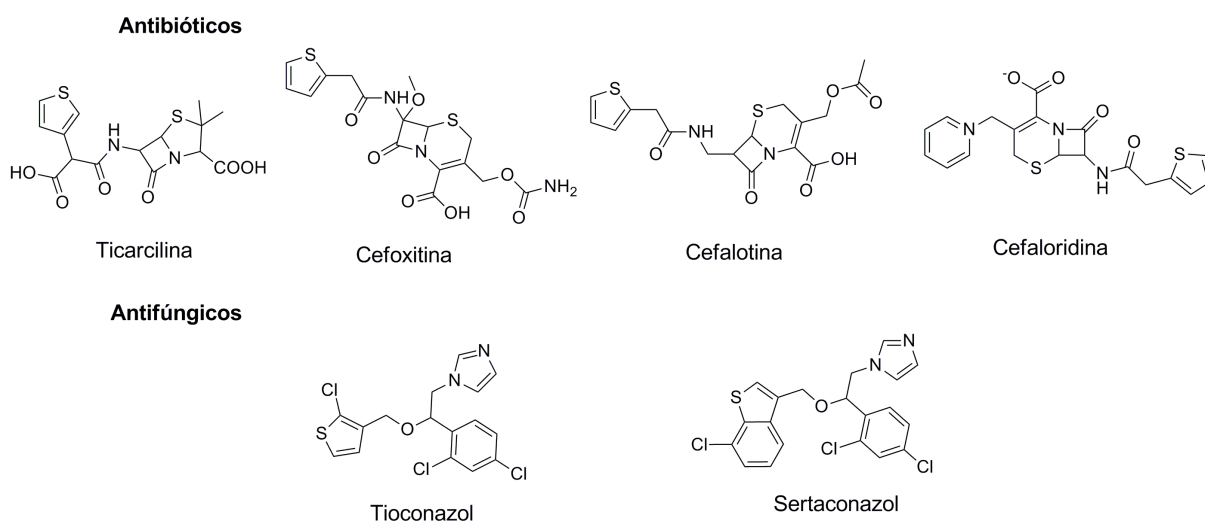


Figura 3. 7. Exemplos de antibióticos e antifúngicos que contém o grupo tiofeno em suas estruturas.

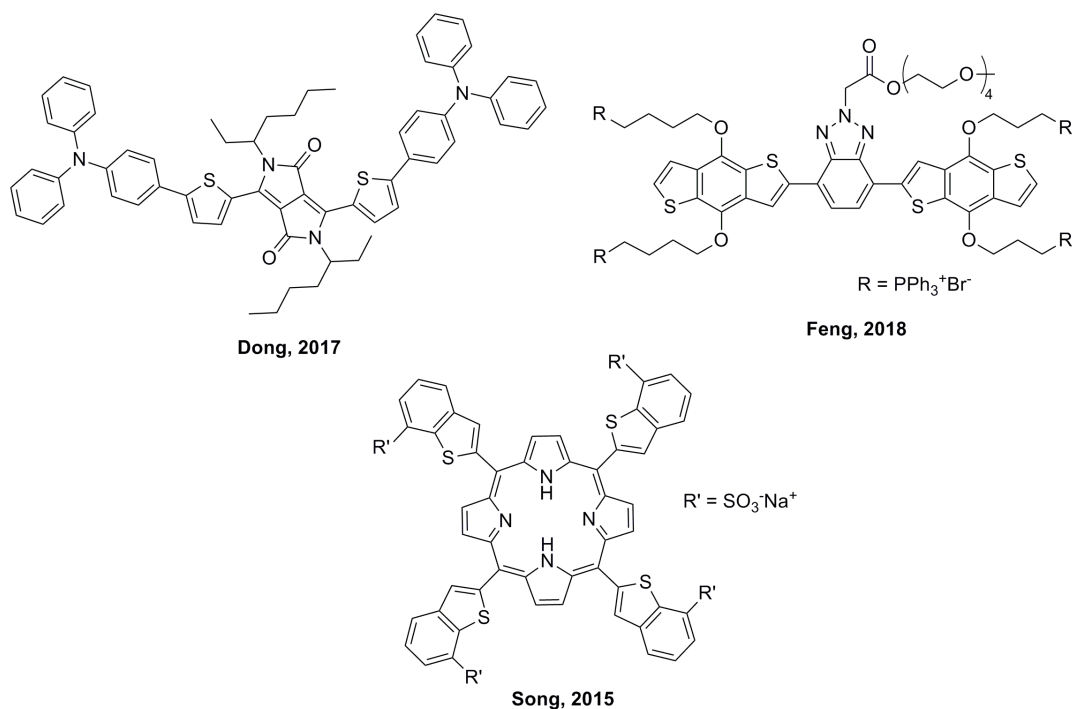
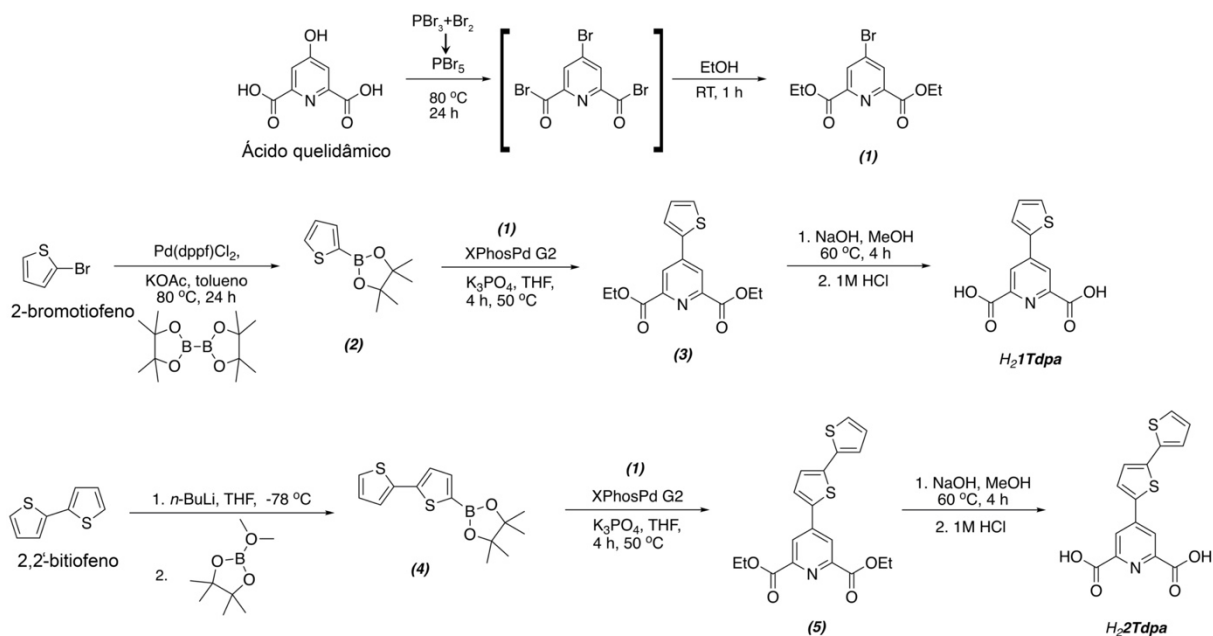


Figura 3. 8. Exemplos de moléculas contendo grupos tiofeno promissoras para serem usadas como FS de TFD.

Compostos derivados de dipicolinato também costumam funcionar bem como antenas para íons Ln^{3+} porque tendem a formarem complexos com estequiometria 1:3 (metal:ligante),¹¹⁶⁻¹¹⁸ o que promove uma boa proteção do centro metálico da desativação não radiativa provocada pelos osciladores de alta energia de solventes próticos.

Os precursores ligantes utilizados neste trabalho foram sintetizados conforme mostrado no Esquema 3.1. O precursor ligante **H₂1Tdpa** foi produzido por meio da saponificação de **1Tdpa-ester**, que por sua vez foi obtido a partir do acoplamento Suzuki do 4,4,5,5-tetrametil-2-(tiofen-2-il)-1,3,2-dioxaborolano com o 4-bromopiridina-2,6-dicarboxilato de dietila (Esquema 3.1). O derivado **2Tdpa-ester**, precursor do composto **H₂2Tdpa**, foi sintetizado por meio do acoplamento Suzuki entre o 2-(2,2'-bitiofen-5-il)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano e o 4-bromopiridina-2,6-dicarboxilato de dietila. O precursor ligante desejado (**H₂2Tdpa**) foi obtido após a saponificação do **2Tdpa-ester**. Ambos os procedimentos foram baseados em rotas sintéticas para compostos similares previamente descritas na literatura,^{68,69} com algumas modificações, e apresentaram rendimento global de 23% (Esquema 3.1). A formação dos compostos desejados, bem como de seus intermediários, foi indicada por ¹H RMN (Figuras A1 a A7). Espectrometria de massas também foi utilizada para evidenciar a formação dos compostos **H₂nTdpa** (n = 1 ou 2) (Figuras A8 e A9).



Esquema 3. 1. Síntese dos precursores ligantes **H_{2n}Tdpa** (n = 1 ou 2).

Os derivados salinos (ligantes) foram utilizados para sintetizar os complexos de íons lantanídeos relatados neste trabalho. Para a realização dos estudos espectroscópicos foram utilizados os sais de potássio (ligantes) derivados dos precursores ligantes. A Figura 3.9 exibe os espectros de absorvância na região do UV-Vis dos ligantes **K_{2n}Tdpa** (n = 1 ou 2). O espectro de **K₂₁Tdpa** apresenta três bandas, centradas em 250, 300 e 355 nm. O espectro de excitação, adquirido monitorando-se a emissão em 380 nm, é composto por uma banda larga centrada em 300 nm. Sob essa excitação, o espectro de emissão mostra uma banda larga entre 330 e 500 nm, centrada em 380 nm. Já no espectro de **K₂₂Tdpa** é possível observar duas bandas principais centradas em 265 e 380 nm. A mesma Figura 3.9 contém os espectros de excitação e de emissão do ligante **K₂₂Tdpa**. O espectro de excitação, adquirido monitorando a emissão em 464 nm, é composto por uma banda larga, de 290 a 425 nm, centrada em 364 nm. Sob essa excitação, o espectro de emissão apresenta uma banda larga de 400 a 600 nm, centrada em 464 nm. Os comportamentos de absorção e excitação de **K_{2n}Tdpa** estão de acordo com os relatos da literatura para moléculas baseadas em dipicolinato,¹¹⁹ e o deslocamento batocrômico de **K₂₂Tdpa** quando comparado a **K₂₁Tdpa** é devido à adição de um grupo tiofeno à estrutura. Os rendimentos quânticos de emissão de **K₂₁Tdpa** e **K₂₂Tdpa** são de 4 ± 1 e $21 \pm 1\%$ (Tabela 3.1).

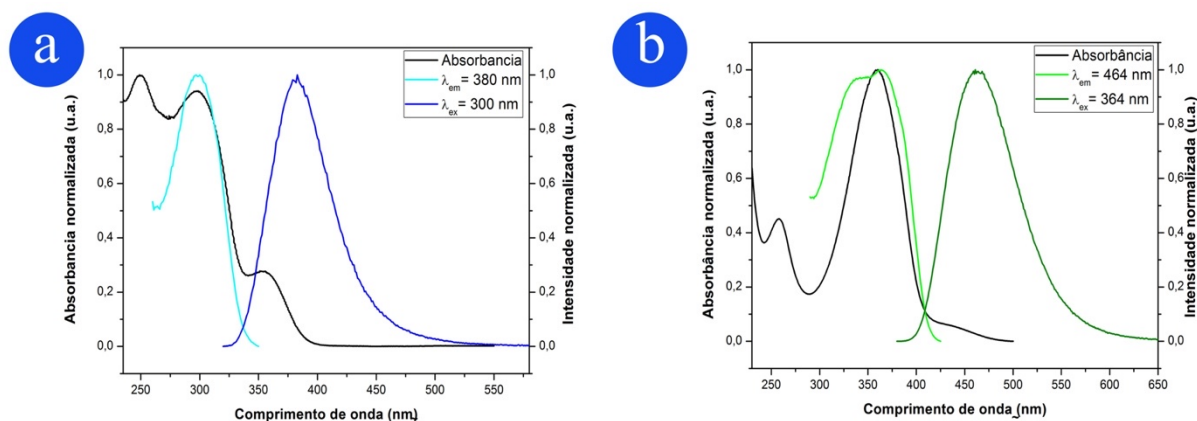


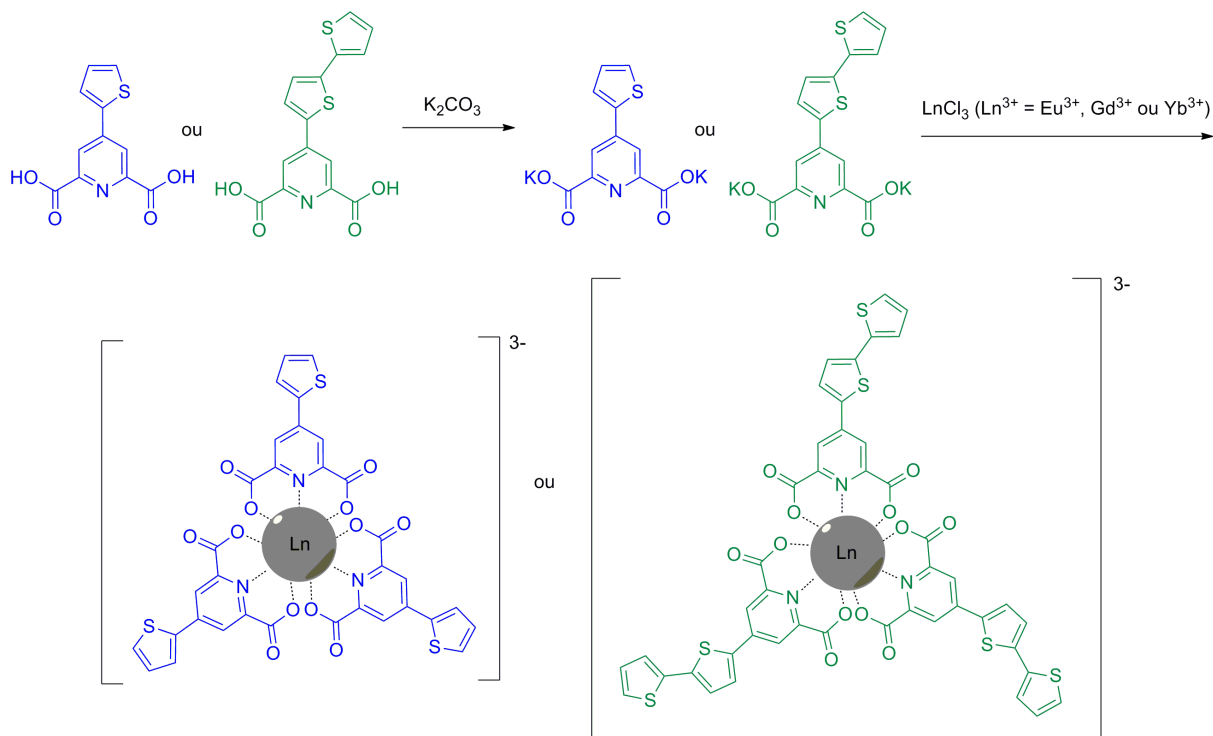
Figura 3. 9. Espectros de absorção normalizada (linhas pretas), excitação (linha azul e verde claras) e emissão (linhas azuis e verdes escuras) de (a) **K₂1Tdpa** e (b) **K₂2Tdpa** em água a $25 \pm 0,1$ °C. $[\text{K}_{2n}\text{Tdpa}] = 50 \mu\text{M}$.

Tabela 3. 1. Rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F), rendimentos quânticos de luminescência (Φ_L) e tempos de vida de luminescência de Ln^{3+} (τ^{Ln}) em etanol 95% a $25 \pm 0,1$ °C ($\text{Ln}^{3+} = \text{Eu}^{3+}$, Gd^{3+} ou Yb^{3+}).

Composto	Φ_F (%)	Φ_F (%)	Φ_L^{Yb}	Φ_L^{Eu}	τ^{Yb}
	Sem Ln^{3+}	Gd^{3+}	(%)	(%)	(μs)
K₃[Ln(1Tdpa)₃]	4 ± 1	6 ± 1	$0,31 \pm 0,00$	$41,0 \pm 0,0$	$8,59 \pm 0,01$
K₃[Ln(2Tdpa)₃]	21 ± 1	55 ± 2	$0,07 \pm 0,00$	-----	$9,76 \pm 0,10$

Os complexos de íons lantanídeos desejados foram obtidos por meio da reação dos ligantes **K_{2n}Tdpa** ($n = 1$ ou 2) com sais de LnCl_3 ($\text{Ln}^{3+} = \text{Gd}^{3+}$, Yb^{3+} e Eu^{3+}) em água (Esquema 3.2). A estequiometria correta dos complexos em solução foi obtida por meio de uma titulação de emissão dos ligantes com uma solução de YbCl_3 (Figura 3.10). A maior intensidade de emissão ajustada foi observada quando os sistemas tinham $0,30 \pm 0,06$ e $0,35 \pm 0,04$ equivalentes molares do metal, indicando que **K₃[Yb(1Tdpa)₃]** e **K₃[Yb(2Tdpa)₃]** são os complexos mais viáveis, respectivamente. Considerando o raio iônico similar ao longo da série de lantanídeos, pode-se assumir que a estequiometria metal:ligante de 1:3 é a mais representativa em soluções aquosas de Ln^{3+} e **K_{2n}Tdpa** ($n = 1$ ou 2) e está de acordo com o observado na literatura destes metais.¹¹⁹ A estequiometria dos derivados complexos dos íons lantanídeos estudados também foi confirmada por análises de espectrometria de massas (Figuras A10 a A14). Estes resultados eram esperados já que ligantes de derivados dipicolinato são reconhecidos por formarem complexos com estequiometria metal:ligante 1:3 com íons lantanídeos,^{119,120} o que pode ser uma vantagem, já que estes ligantes normalmente proporcionam uma maior blindagem do centro emissor da desativação não radiativa de solventes próticos. Os complexos **K₃[Ln(nTdpa)₃]** ($n = 1$ ou 2 , $\text{Ln}^{3+} = \text{Eu}^{3+}$, Gd^{3+} ou Yb^{3+})

foram isolados após evaporação do solvente e redissolvidos em solvente apropriado para os estudos de suas propriedades luminescentes.



Esquema 3. 2. Formação dos complexos $\text{K}_3[\text{Ln}(\text{1Tdpa})_3]$ e $\text{K}_3[\text{Ln}(\text{2Tdpa})_3]$ ($\text{Ln}^{3+} = \text{Eu}^{3+}, \text{Gd}^{3+}$ e Yb^{3+}) a partir de $\text{H}_2\text{1Tdpa}$ e $\text{H}_2\text{2Tdpa}$.

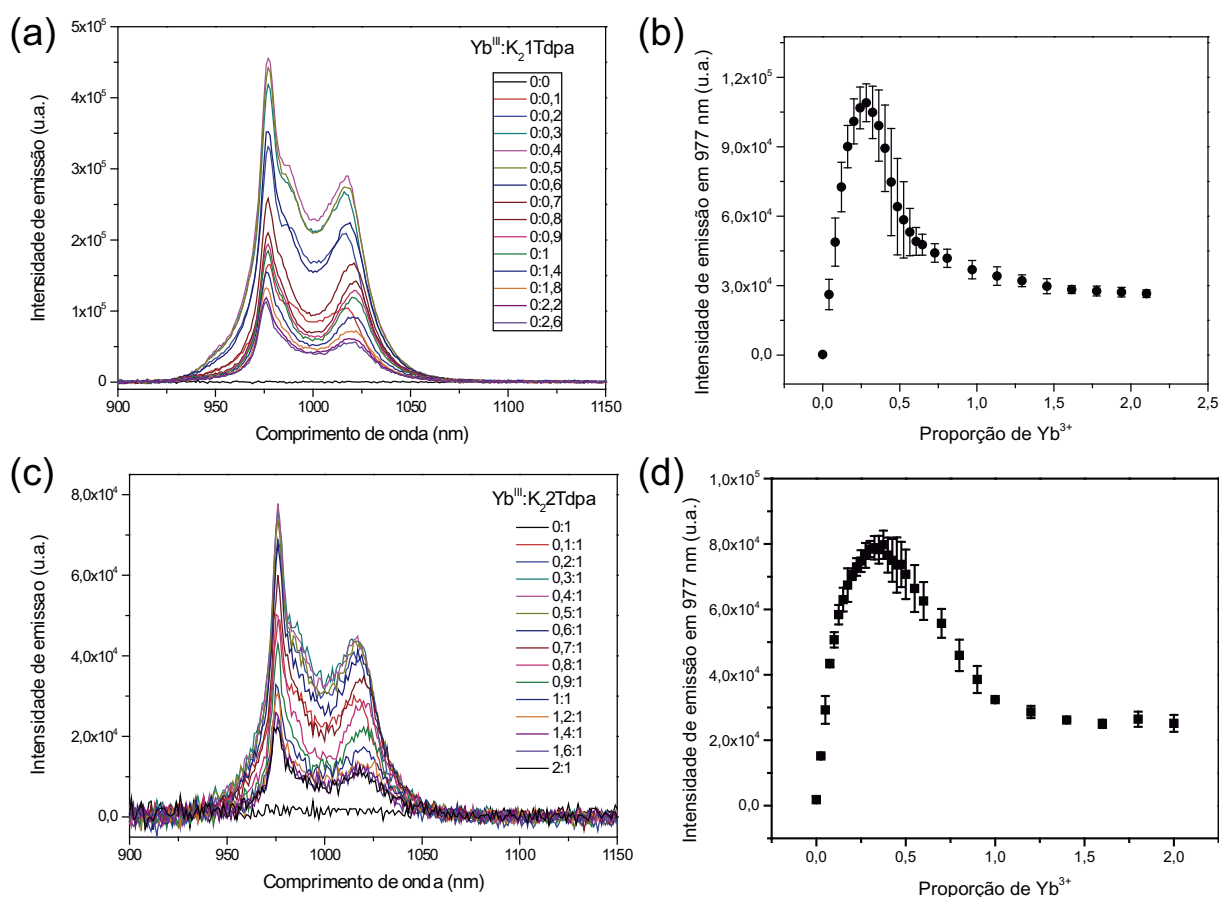


Figura 3. 10. Titulações de emissão de solução em tampão Tris/HCl de YbCl_3 , 25 μM com soluções aquosas de **K_21Tdpa** e **K_22Tdpa** , 0,93 mM. Os espectros de emissão foram adquiridos a $25 \pm 0,1$ °C e sob excitações de 318 e 360 nm, respectivamente. Em (a) e (c) estão dispostos os espectros originais e em (b) e (d), os gráficos de proporção estequiométrica de Yb^{3+} vs. intensidade de emissão em 977 nm de **K_21Tdpa** e **K_22Tdpa** , respectivamente.

As propriedades luminescentes dos complexos **$\text{K}_3[\text{Gd}(\text{nTdpa})_3]$** ($n = 1$ ou 2) foram investigadas. As Figuras 3.11(a) e (b) mostram os espectros de excitação e emissão dessas amostras. **$\text{K}_3[\text{Gd}(1\text{Tdpa})_3]$** e **$\text{K}_3[\text{Gd}(2\text{Tdpa})_3]$** fluorescem na região do UV-Vis, assim como os sais dos ligantes isolados, e possuem espectros de emissão semelhantes aos de **K_21Tdpa** e **K_22Tdpa** . Os rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F), dos complexos medidos em etanol são de $6,0 \pm 1\%$ e $55 \pm 2\%$, respectivamente (Tabela 3.1). O incremento do valor de Φ_F de **$\text{K}_3[\text{Gd}(2\text{Tdpa})_3]$** , comparado a **$2\text{Tdpa}$** é provavelmente devido à planarização da molécula ligante após a coordenação com os íons Gd^{3+} , o que aumenta o efeito da conjugação π . Esse é um efeito que ganha importância em **$\text{K}_3[\text{Gd}(2\text{Tdpa})_3]$** devido à presença de um anel tiofeno que foi incorporado na estrutura do ligante.¹²¹

Os espectros de emissão dos complexos $\mathbf{K}_3[\mathbf{Yb}(\mathbf{nTdpa})_3]$ ($n = 1$ ou 2), mostrados nas Figuras 3.11 (c) e (d), manifestam sinais característicos de materiais contendo íons \mathbf{Yb}^{3+} devido a sua transição ${}^2F_{5/2} \rightarrow {}^2F_{7/2}$ ($\lambda_{\text{max}} = 978$ nm).^{122,123} Os rendimentos quânticos de luminescência de $\mathbf{K}_3[\mathbf{Yb}(\mathbf{1Tdpa})_3]$ e $\mathbf{K}_3[\mathbf{Yb}(\mathbf{2Tdpa})_3]$ em etanol são de $0,31 \pm 0\%$ e $0,07 \pm 0\%$, respectivamente (Tabela 3.1). Os tempos de vida dos complexos de \mathbf{Yb}^{3+} foram medidos em etanol 95% e os valores de $8,59 \pm 0,01$ e $9,76 \pm 0,10$ μs (Figura A18) são compatíveis com o esperado para complexos destes íons lantanídeos.^{124, 125} As curvas de tempos de vida são ajustadas por um único decaimento exponencial, o que significa que existe a predominância de um tipo preferencial de ambiente de coordenação ao redor do íon \mathbf{Yb}^{3+} nas amostras. Desta forma, tem-se outro indicativo da coordenação metal-ligante na proporção de 1:3. Além disso, os valores de tempo de vida próximos entre si indicam geometrias similares.

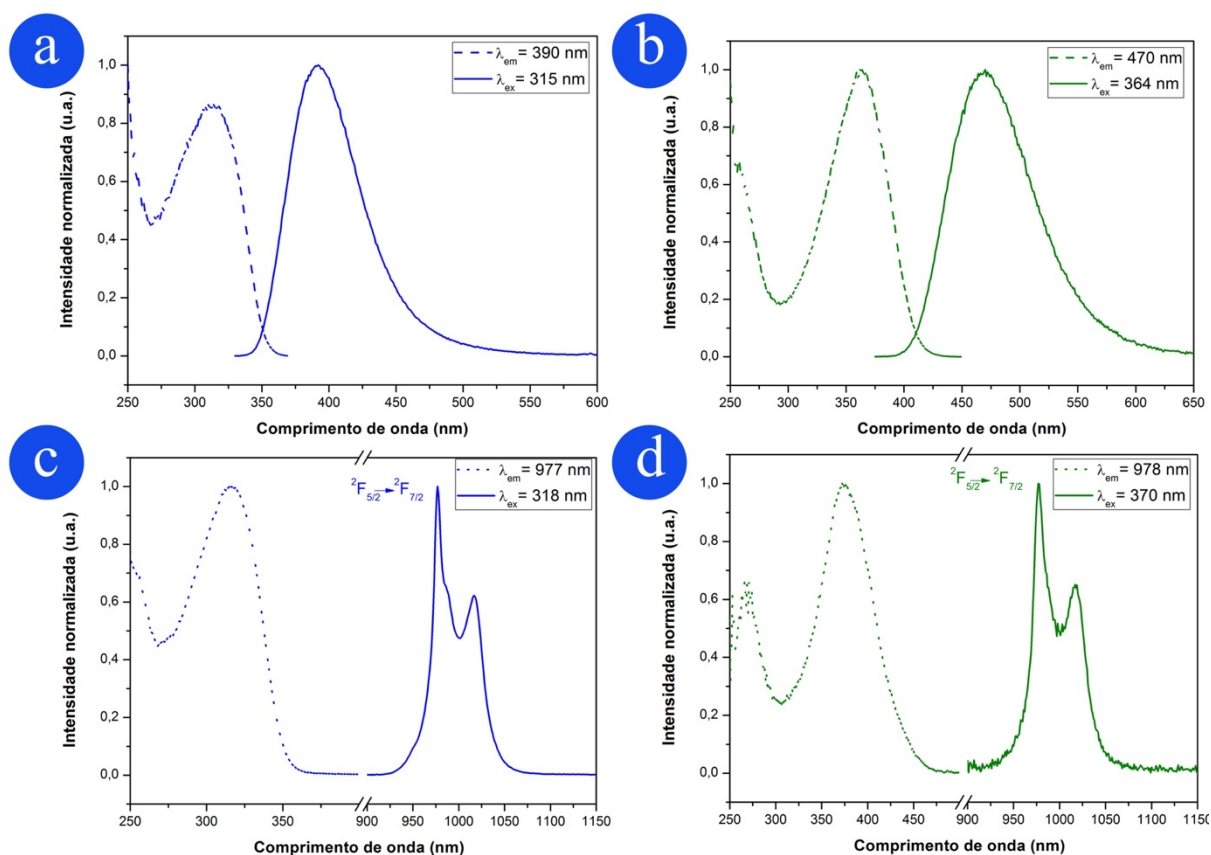


Figura 3. 11. Espectros normalizados de excitação (linhas pontilhadas) e de emissão (linhas sólidas) de soluções aquosas de complexos $\mathbf{K}_3[\mathbf{Ln}(\mathbf{nTdpa})_3]$, adquiridos a $25 \pm 0,1$ °C. $\text{Ln}^{3+} = \text{Gd}^{3+}$ em (a) e (b) e Yb^{3+} em (c) e (d). $\mathbf{K}_3[\mathbf{Ln}(\mathbf{nTdpa})_3] = 50$ μM .

K₂1Tdpa, ao contrário de **K₂2Tdpa** é capaz de sensibilizar o íon Eu³⁺. Sob excitação de 315 nm, o espectro adquirido de uma solução aquosa de **K₃[Eu(1Tdpa)₃]** exibe as emissões características do íon Eu³⁺ com transições ⁵D₀ → ⁷F_J (J = 0 – 4) (Figura 3.12).¹²⁶ Outros dados de caracterização fotofísica do complexo estão reunidos na Tabela 3.2. Os tempos de vida de 1,2 ± 0,0 e 1,6 ± 0,0 ms foram obtidos de soluções de **K₃[Eu(1Tdpa)₃]** em água e etanol, respectivamente, e são similares aos de complexos deste íon lantanídeo relatados na literatura.^{127,119} O aumento do tempo de vida do complexo em etanol era esperado devido à alta energia dos osciladores O-H da água que desativam o estado excitado do Eu³⁺ de forma não radiativa.¹²⁸ Ambas as curvas de tempo de vida (Figura 3.13) apresentam um único decaimento exponencial, indicando assim, a presença de um único tipo de centro emissor nessas soluções.¹²⁹ Os tempos de vida longos resultam em valores de rendimento quântico intrínseco altos (ϕ_{Eu}^{Eu}) de 68 e 93%. Eficiências de emissão sensibilizada (ϕ_{Eu}^L) de 33 e 41% foram observadas para as soluções em água e em etanol, respectivamente. O valor encontrado em água é significativamente maior do que o de um complexo dipicolinato análogo ($\phi_{Eu}^L = 24\%$).¹¹⁶ Os valores de eficiência de sensibilização (η_{sens}) para estas soluções também foram obtidos e são 50 e 44%. O número de moléculas de água coordenadas ao Eu³⁺ em **K₃[Eu(1Tdpa)₃]**, foi calculado por meio da Equação de Horrock (Equação 2.2) e o resultado foi aproximadamente zero. Baixos números de coordenação de água ou nenhuma molécula coordenada tende a ser uma característica vantajosa, visto que moléculas deste solvente, quando coordenadas diretamente ao Eu³⁺, podem desativar o íon de forma não radiativa.¹²⁸

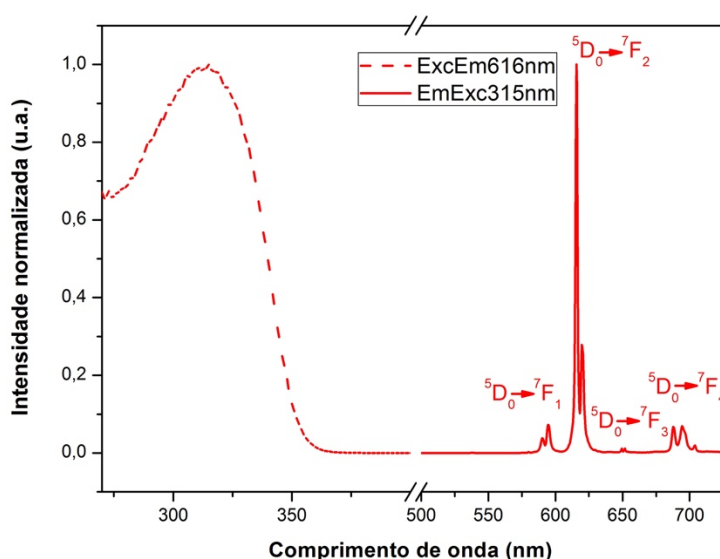


Figura 3. 12. Espectros de excitação (linha pontilhada) e de emissão (linha sólida) de **K₃[Eu(1Tdpa)₃]** em água a 25 ± 0,1 °C. **K₃[Eu(1Tdpa)₃]** = 50 µM.

Tabela 3. 2. Caracterização fotofísica de $\mathbf{K}_3[\mathbf{Eu}(\mathbf{1Tdp}a)_3]$ em tampão TRIS/H₂O e em etanol. $\mathbf{K}_3[\mathbf{Eu}(\mathbf{1Tdp}a)_3]$ = 50 mM.

Solvente	τ (ms)	ϕ^l_{Eu} (%)	ϕ^{Eu}_{Eu} (%)	η_{sens} (%)
H ₂ O	1,2 ± 0,0	33 ± 0,2	68	50
EtOH	1,6 ± 0,0	41 ± 0,2	93	44

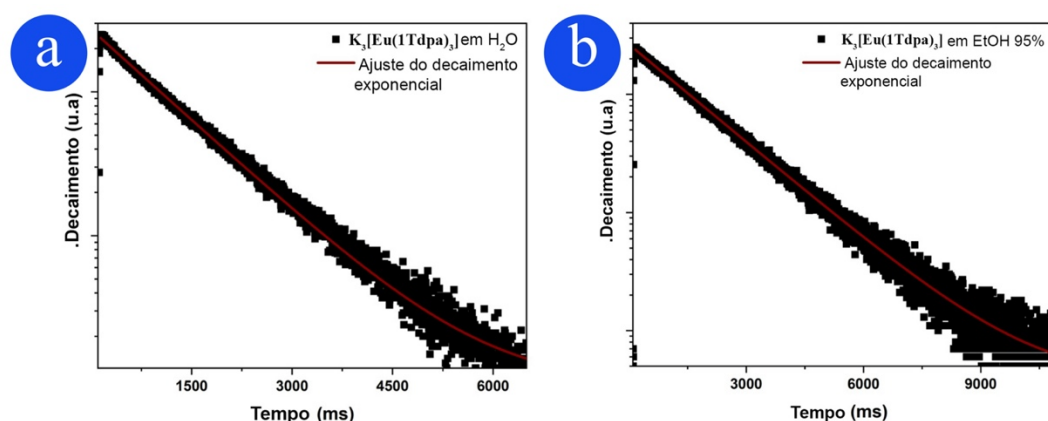


Figura 3. 13. Gráficos de decaimento da emissão de $\mathbf{K}_3[\mathbf{Eu}(\mathbf{1Tdp}a)_3]$ a 616 nm (a) em água e (b) em etanol 95%, 25,0 ± 0,1 °C ($\lambda_{exc} = 320$ nm); $[\mathbf{K}_3[\mathbf{Eu}(\mathbf{1Tdp}a)_3]] = 100 \mu\text{M}$.

A fim de conhecer o potencial de $\mathbf{K}_2n\mathbf{Tdp}a$ e $\mathbf{K}_3[\mathbf{Ln}(n\mathbf{Tdp}a)_3]$ ($n = 1$ ou 2) como FS para TFD, uma série de experimentos foi realizada para geração e detecção de $^1\text{O}_2$ em solução. A habilidade de $\mathbf{K}_2n\mathbf{Tdp}a$ ($n = 1$ ou 2) na formação *in situ* de $^1\text{O}_2$ em meio aquoso foi comprovada pelo monitoramento dos espectros de emissão vistos na Figura A19. A banda centrada em 1270 nm é devido à fosforescência do $^1\text{O}_2$ em solução, a qual indica sua formação.¹³⁰ As eficiências quânticas de geração de $^1\text{O}_2$, obtidas de soluções em etanol, de $\mathbf{K}_22\mathbf{Tdp}a$, $\mathbf{K}_3[\mathbf{Gd}(\mathbf{1Tdp}a)_3]$ e $\mathbf{K}_3[\mathbf{Gd}(\mathbf{2Tdp}a)_3]$ são de 23 ± 0, 13 ± 0 e 45 ± 4% (Tabela 3.3), respectivamente. Não foi possível determinar a eficiência quântica de geração de $^1\text{O}_2$ de $\mathbf{K}_21\mathbf{Tdp}a$, $\mathbf{K}_3[\mathbf{Yb}(n\mathbf{Tdp}a)_3]$ ($n = 1$ ou 2) e $\mathbf{K}_3[\mathbf{Eu}(\mathbf{1Tdp}a)_3]$ devido à baixa intensidade do sinal de $^1\text{O}_2$ produzido por esses compostos, mesmo que o sinal em 1270 nm seja detectado nas soluções aquosas de todos os complexos estudados, como mostrado na Figura 3.14. A tentativa de medir os valores de $\Phi^l\text{O}_2$ em água foi realizada, mas a baixa intensidade do sinal em 1270

nm impossibilitou a determinação destes rendimentos quânticos de forma aceitável (χ_{O_2} em água = $0,2 \times 10^{-4}$,¹³¹ χ_{O_2} em etanol = $5,71 \times 10^{-4}$).¹³²).

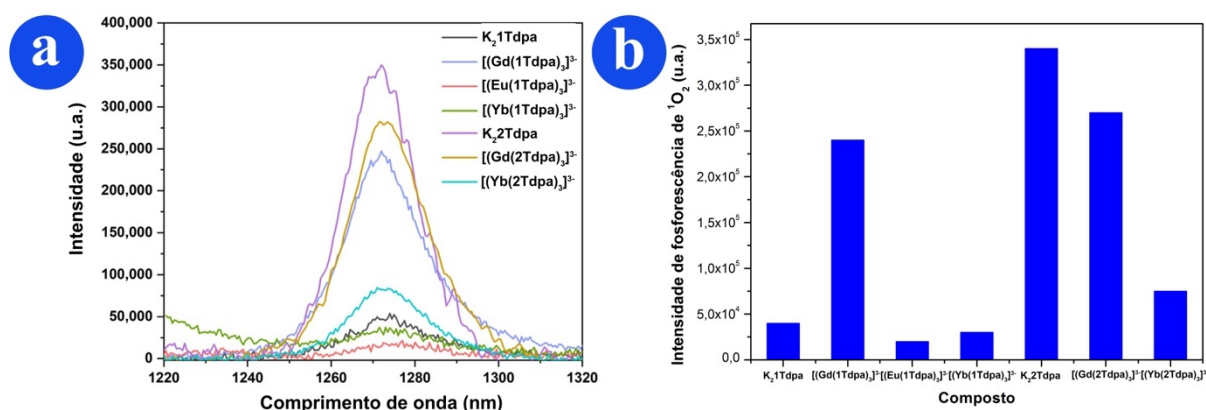


Figura 3. 14. (a) Espectros de fosforescência e (b) Intensidades de fosforescência de ¹O₂ presente em solução aquosa de K₂nTdpa e K₃[Ln(nTdpa)₃] (n = 1 ou 2), adquiridos a 25 ± 0,1 °C. [espécie] = 500 μM.

Tabela 3. 3. Rendimento quântico de geração de oxigênio singlete (Φ^{1O_2}) de K₃[Ln(nTdpa)₃] (n = 1 ou 2) a 25 ± 0,1 °C, em etanol 95%.

Composto	Sem metal	Gd ³⁺	Eu ³⁺	Yb ³⁺
[Ln(1Tdpa) ₃] ³⁻	LE ^a	13 ± 0	LE	LE
[Ln(2Tdpa) ₃] ³⁻	23 ± 0	45 ± 4	--	LE

^a LE = a emissão de ¹O₂ é observada, mas com uma intensidade sinal muito baixa para determinar o rendimento quântico de forma aceitável.

As citotoxicidades de K₂2Tdpa, K₃[Gd(2Tdpa)₃] e K₃[Yb(2Tdpa)₃] foram analisadas em experimentos com células da linhagem HeLa (câncer cervical humano), com duração de 4 h por meio de ensaios de MTT, no escuro e após irradiação por 5 minutos de luz 365 nm (Figuras 3.15(a) e 3.15(b), respectivamente). A escolha de células HeLa para este estudo foi devido a facilidade de cultivo desta linhagem celular o que permite que os experimentos sejam realizados com uma elevada contagem de células.¹³³ Além disto, esta linhagem celular é muito utilizada devido a sua robustez, ou seja, não se observam muitas mutações após a suas multiplicações. Na ausência de luz, a viabilidade celular permaneceu acima de 75% após o tratamento com as três amostras com concentrações até 12,5 μM. Com concentração de 25 μM,

o complexo $\text{K}_3[\text{Gd}(\text{2Tdpa})_3]$ resultou em um decréscimo na viabilidade celular (ca. 60%). Na concentração de 50 μM , este efeito pode ser observado para todas as amostras. Os valores de IC_{50} no escuro de $\text{K}_2\text{2Tdpa}$, $\text{K}_3[\text{Gd}(\text{2Tdpa})_3]$ e $\text{K}_3[\text{Yb}(\text{2Tdpa})_3]$ são $47,5 \pm 2,5$, $39,5 \pm 4,8$ e $43,8 \pm 3,6$ respectivamente (Tabela 3.4 e Figuras 3.15 (c) e (d)).

Após a exposição à radiação, $\text{K}_2\text{2Tdpa}$, $\text{K}_3[\text{Gd}(\text{2Tdpa})_3]$ e $\text{K}_3[\text{Yb}(\text{2Tdpa})_3]$ produziram um decréscimo significativo na viabilidade celular, mesmo na menor concentração testada (3 μM). A fototoxicidade produzida com $\text{K}_2\text{2Tdpa}$ é menor do que a correspondente às mesmas concentrações dos respectivos complexos de Ln^{3+} . Este resultado pode ser explicado devido ao fato de que cada complexo contém três unidades do ligante que contribuem para a geração de $^1\text{O}_2$. Os valores de IC_{50} , conforme mostrados na Tabela 3.4, indicam este efeito da presença dos três ligantes em cada complexo. Ainda que seja bastante baixa a probabilidade de os íons Ln^{3+} serem encontrados em sua forma livre nas soluções, eles também foram testados e não produziram citotoxicidade (Figura A20), como era esperado.¹³⁴ Esses resultados de IC_{50} são competitivos quando comparados com os de outros materiais testados em condições similares.¹³⁵⁻¹³⁷

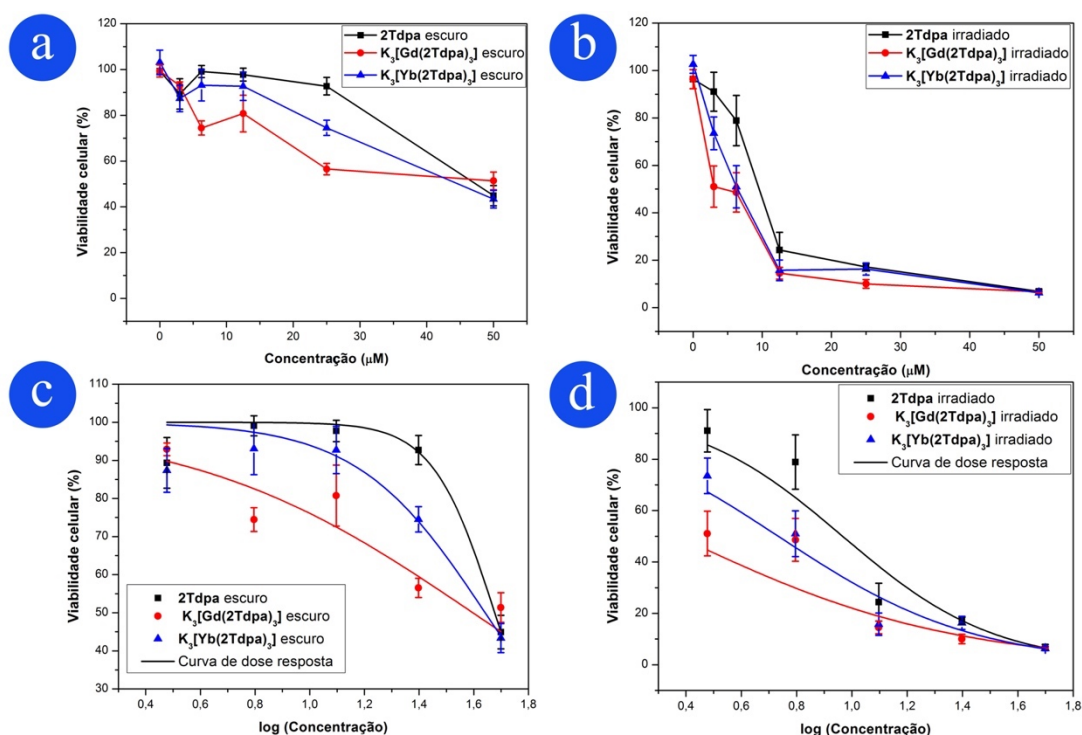
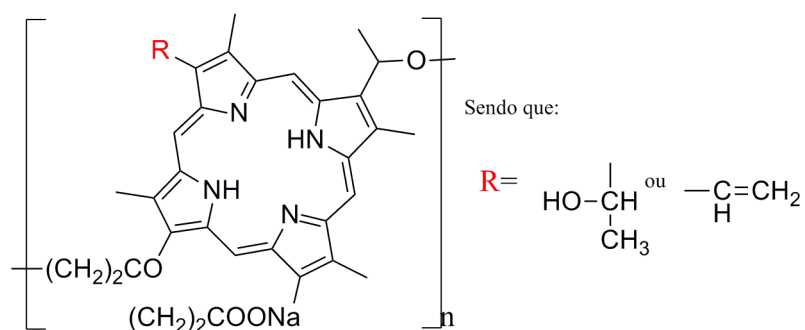


Figura 3. 15. (a) Citotoxicidade, (b) fotocitotoxicidade (365 nm), (c) e (d) curvas de dose resposta de 2Tdpa , $\text{K}_3[\text{Gd}(\text{2Tdpa})_3]$ e $\text{K}_3[\text{Yb}(\text{2Tdpa})_3]$ em ensaios de MTT com células HeLa.

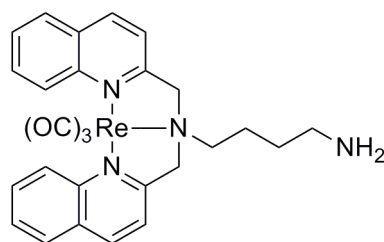
Tabela 3. 4. Valores de IC₅₀ no escuro e após irradiação com luz 365 nm de 2Tdpa, K₃[Gd(2Tdpa)₃], K₃[Yb(2Tdpa)₃], Photofrin, Re-NH₂ e [VO(cur)(fen)]Cl.

Composto	IC ₅₀ irradiado (μM)	IC ₅₀ escuro (μM)	Referência
K ₂ 2Tdpa	9,26 ± 0,8	47,5 ± 2,5	Este trabalho
K ₃ [Gd(2Tdpa) ₃]	2,35 ± 0,5	39,5 ± 4,8	Este trabalho
K ₃ [Yb(2Tdpa) ₃]	5,42 ± 0,6	43,8 ± 3,6	Este trabalho
Photofrin ^a	4,2 ± 0,2	>41	Delacy ¹³⁷
Re-NH ₂ ^b	17,3 ± 2,9	>100	Leonidova ¹³⁵
[VO(cur)(fen)]Cl ^c	8,1 ± 0,3	>50	Banerjee ¹³⁶

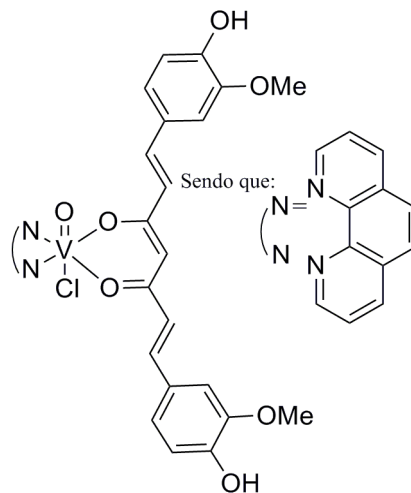
^a IC₅₀ para este composto foi expresso como 2,57 ± 0,12 μg mL⁻¹ (claro) e > 25 μg mL⁻¹ (escuro) em células HeLa (MM = 605,7 g mol⁻¹) após 24 h de incubação e irradiação com lâmpada de amplo espectro; Estrutura:



^b O IC₅₀ para este composto foi determinado após 4 h de incubação e irradiação com luz de 350 nm; Estrutura:



^c cur = curcumina e fen = 1,10-fenantrolina; IC₅₀ para este composto foi determinado após 4 h de incubação e irradiação com lâmpada de amplo espectro. Estrutura:



A morte das células HeLa foi investigada em ensaios de citometria de fluxo usando isotiocianato de fluoresceína-Anexina V (chamada de AnV-FITC) e iodeto de propídio (PI), conforme visto na Figura 3.16. Este é um método usado com frequência para investigar qual a via que mais contribui na indução do processo de morte celular, *i.e.* apoptose (morte celular programada e controlada) ou necrose (morte celular desordenada e acidental).¹³⁸ O PI marca o DNA nuclear seletivamente quando as membranas perdem suas integridades estruturais, fato o qual permite que o marcador transponha as mesmas. Devido a danos que podem ser observados em membranas plasmáticas de células necróticas, o efeito de marcação seletiva no núcleo celular pelo PI pode ser notado nos experimentos. O AnV-FITC, por sua vez, marca seletivamente fosfatidilserina, um fosfolípido que é localizado preferencialmente no folheto interno das membranas celulares, mas que passa a ser exposto na superfície das células durante processos de apoptose.¹³⁹ É preferível que a indução de processos de morte celular seja por apoptose do que por necrose.¹⁴⁰ As células que aparecem no quadrante Q1 (FITC⁻/PI⁺) foram induzidas à morte por processos de necrose, ao passo que em Q2 (FITC⁺/PI⁺), houve a indução de processos de apoptose, mas durante o experimento, estas células se tornaram necróticas. Em Q3 observa-se as células que ainda estão viáveis (FITC⁻/PI⁻) e, em Q4, as que morreram por apoptose (FITC⁺/PI⁻).¹⁴¹

A Figura 3.16 reúne os resultados dos ensaios de citometria de fluxo após a incubação com K_2Tdp_a , $K_3[Yb(2Tdp_a)_3]$ e $K_3[Gd(2Tdp_a)_3]$ com concentração de 12,5 μM no escuro (3.16 (a), 3.16 (b) e 3.16 (c)) e após irradiação (3.16 (d), 3.16 (e) e 3.16 (f), respectivamente). No escuro nenhuma das três amostras produziram morte por meio dos mecanismos estudados. Após irradiação observa-se um aumento considerável na percentagem de células nos quadrantes

Q1 e Q2. No caso das células tratadas com **K₂Tdpa**, a viabilidade celular cai de 91% no escuro para 58% após irradiação, sendo que 26% morreu por necrose e 16%, por apoptose. **K₃[Gd(2Tdpa)₃]** produziu 44% de mortes por necrose e 28%, por apoptose. No escuro a viabilidade celular permaneceu por volta de 80% entre as células que tiveram contato com o composto. **K₃[Yb(2Tdpa)₃]**, por sua vez, manteve a viabilidade celular em torno de 90% no escuro e, após irradiação, houve morte de ca. 32% das células por necrose e 19% por apoptose. Isto significa que as células morrem tanto por apoptose quanto por necrose, o que é comum quando se trata de células que passaram por TFD,^{142,143} sendo que a necrose é o processo induzido predominante nos experimentos aqui apresentados. A preponderância da necrose em relação à apoptose não é absoluta, como demonstraram diversos autores ao relatar que os percentuais dos mecanismos variam de acordo com fatores tais como a dosagem total da TFD (dosagem do FS e de luz), a concentração de oxigênio, o período pós irradiação e a linhagem celular.^{144,145} Os resultados de citometria estão de acordo com os encontrados nos ensaios de MTT e indicam o potencial dos compostos para serem usados como FS em TFD. Os controles positivos (estaurosporina) e negativos (PBS), no escuro e após irradiação deste experimento encontram-se na Figura A21.

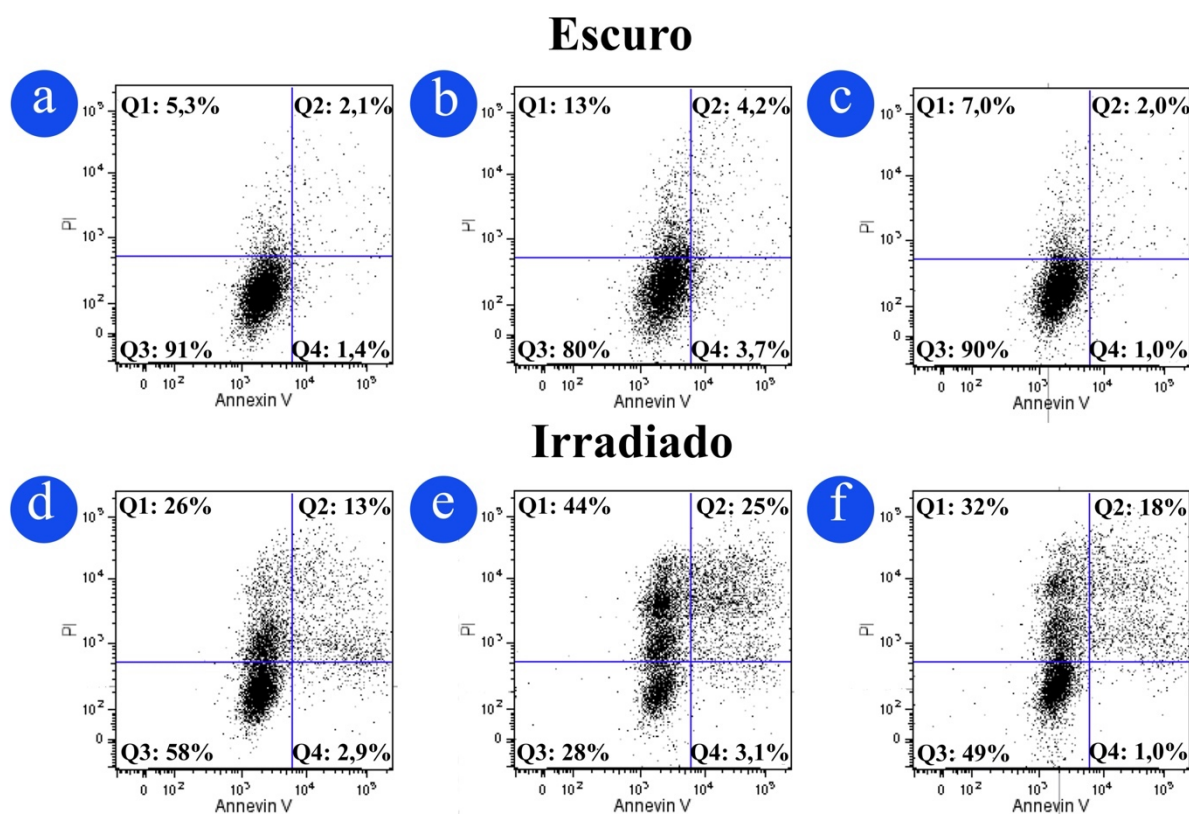


Figura 3. 16. Ensaios de citometria de fluxo com células HeLa marcadas com AnV-FITC e PI, 12 h após a incubação com **K₂Tdpa**, **K₃[Gd(2Tdpa)₃]** e **K₃[Yb(2Tdpa)₃]** em condições de escuro em (a), (b) e (c), e após irradiação com luz 365 nm em (d), (e) e (f), respectivamente. Adaptado com permissão de <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01805>. Copyright © 2021, American Chemical Society.

O comportamento de células HeLa após incubação com soluções de **1Tdpa** e **K₃[Eu(1Tdpa)₃]** por 4 horas também foi investigado. A Figura 3.17 mostra que a viabilidade celular média foi mantida acima de 80% após contato com ambos os compostos, mesmo na maior concentração, de 50 μ M. Não foram determinados valores de IC₅₀ para **1Tdpa** e **K₃[Eu(1Tdpa)₃]** porque nenhuma das concentrações testadas (até 50 μ M) produziu citotoxicidade significativa. O maior efeito citotóxico do ligante **2Tdpa** foi atribuído a presença de uma segunda unidade tiofeno na estrutura em comparação com apenas um anel deste grupo no ligante **1Tdpa**. A fototoxicidade de **1Tdpa** e **K₃[Ln(1Tdpa)₃]** não foram exploradas devido as suas absorções serem preferencialmente nas regiões do UV-B e UV-C (Figura 3.9 (a)). Este fator inviabiliza suas aplicações diretamente em testes de TFD devido ao caráter nocivo em consequência da alta energia requerida para o processo de fotoexcitação.¹⁴⁶

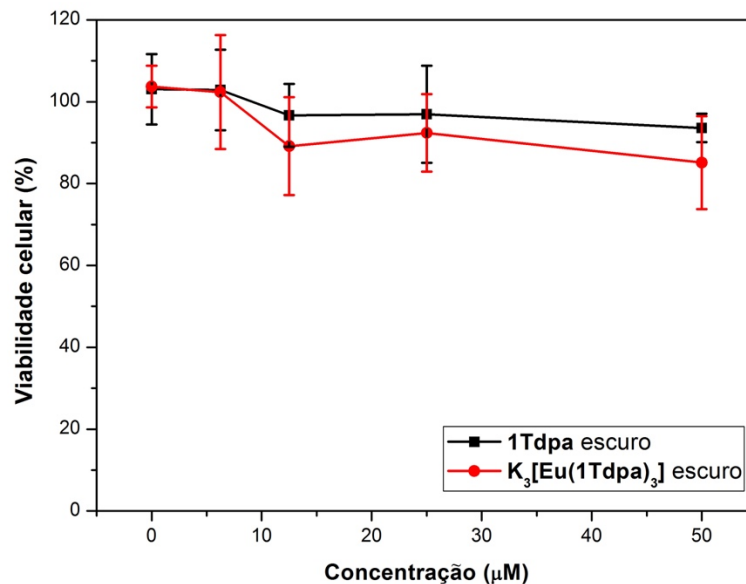


Figura 3. 17. Citotoxicidades de 1Tdpa e K₃[Eu(1Tdpa)₃] em ensaios de MTT com células HeLa.

As respostas fotofísicas observadas em experimentos de luminescência realizados com o complexo K₃[Eu(1Tdpa)₃] sugeriram um aplicação viável em experimentos de bioimageamento em células HeLa. As Figuras 3.18 (a), (b) e (c) mostram o campo claro, a imagem adquirida com laser de 402 nm e as imagens sobrepostas, respectivamente, das células coradas com K₃[Eu(1Tdpa)₃]. As imagens sugerem que o complexo K₃[Eu(1Tdpa)₃] consegue permear a membrana celular das células HeLa.

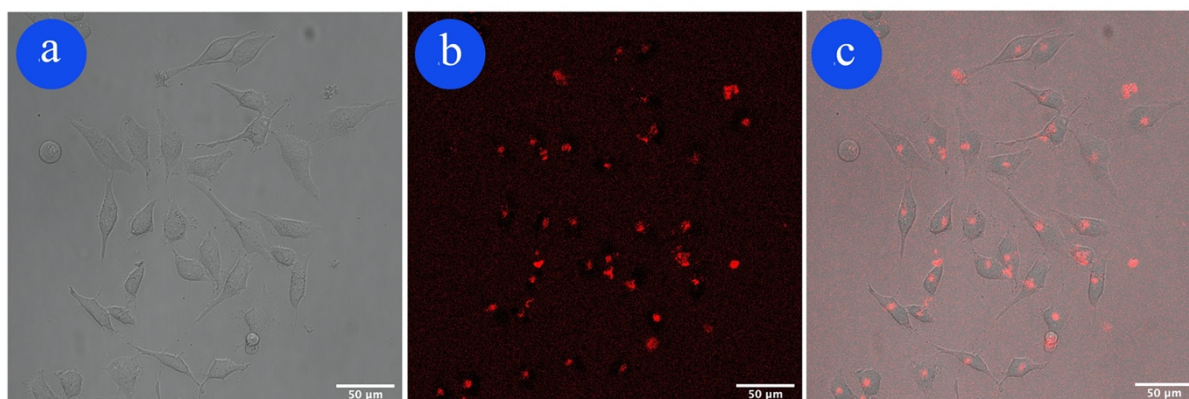


Figura 3. 18. Imagens de células HeLa tratadas com K₃[Eu(1Tdpa)₃] (12,5 µM) (a) campo claro, (b) 402 nm e (c) sobreposição das imagens. Escala: 50 µm.

Experimentos adicionais foram realizados para investigar se houve de fato permeação da membrana celular e a possível localização subcelular de $\text{K}_3[\text{Eu}(\text{1Tdpa})_3]$. Para tal as células HeLa foram incubadas com $12,5 \mu\text{M}$ de $\text{K}_3[\text{Eu}(\text{1Tdpa})_3]$ ($\text{pH} = 7,4$) e com os corantes comerciais Hoechst 33342 (marcador de ácido nucleico, 1 mg mL^{-1}) e Mitotracker Green FM (marcador de mitocôndria, 50 nM) para determinar a permeabilidade celular e localização subcelular. As imagens de células vivas (Figura 3.19) mostram os sinais de luminescência de Mitotracker Green FM quando as células são irradiadas com luz com comprimento de onda de 488 nm (Figura 3.19 (a)) e as luminescências de Eu^{3+} e Hoechst 33342 são observadas quando as células são irradiadas com luz de 405 nm (Figuras 3.19 (b) e (c)). O composto $\text{K}_3[\text{Eu}(\text{1Tdpa})_3]$ parece permear a membrana celular das células HeLa e co-localizar na mesma região que o corante Mitotracker Green FM, indicando especificidade celular na região da mitocôndria (Figura 3.19 (d)). A permeação da membrana celular é determinante para a eficiência do composto como FS para TFD.^{143,145} Outros complexos de Eu^{3+} que também penetram membranas celulares foram reportados pelos grupos de Yuan,^{147,148} e de Bünzli.¹⁴⁹

A mitocôndria é uma organela que desempenha funções importantes para vários processos vitais das células eucarióticas.^{150,151} O mal funcionamento das mitocôndrias tem sido associado ao processo de envelhecimento e a uma série de enfermidades tais como doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, cânceres, enxaqueca, infertilidade e doenças renais e hepáticas.¹⁵² A marcação fluorescente seletiva destas organelas permite a investigação de sua participação no desenvolvimento destas doenças por bioimageamento. Além disto, nas mitocôndrias ficam concentradas grande parte das ROS que são subprodutos da cadeia de transporte de elétrons.¹⁵⁰ Por este motivo, estresses oxidativos iniciados na região mitocondrial podem se propagar por toda a célula, afetando a funcionalidade e metabolismo celulares, e eventualmente levando a célula à morte.¹⁵³ A consequência deste fenômeno é que FS que acumulam-se preferencialmente na região das mitocôndrias são mais eficazes para TDF porque induzem danos com menor quantidade de ROS.⁹³ Outros complexos capazes de marcarem mitocôndrias seletivamente foram reportados pelos grupos de Yuan,^{154,155} Reddy¹⁵⁶ e Wong.⁹³

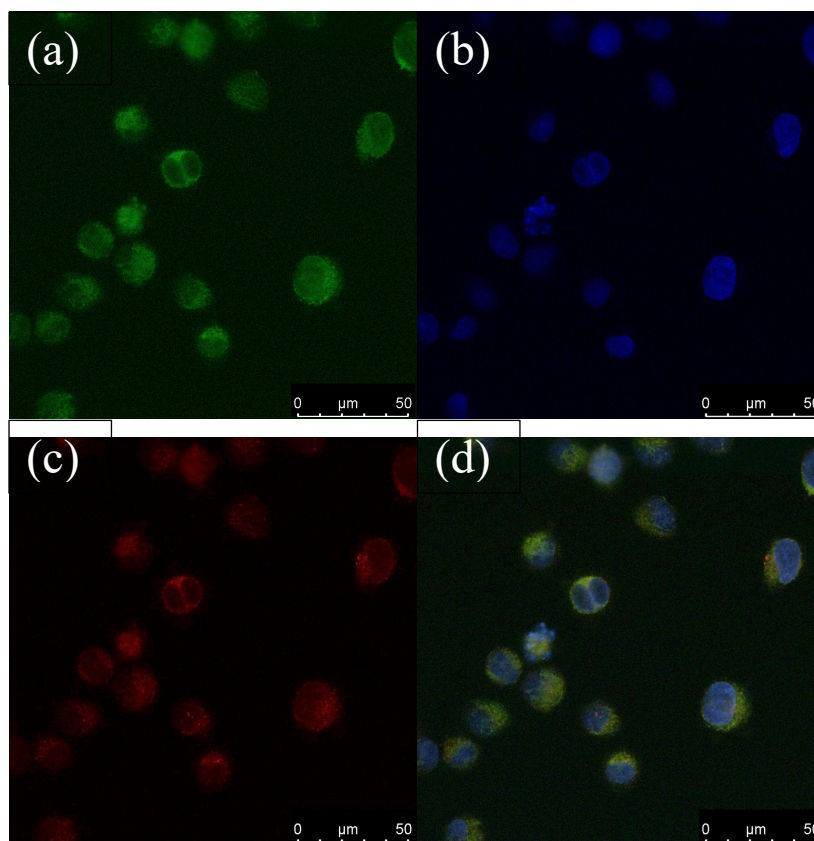


Figura 3. 19. Imagens de células HeLa vivas incubadas com (a) MitoTracker Green FM (50 nM, $\lambda_{exc} = 488$ nm), (b) Hoechst 33342 ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$, $\lambda_{exc} = 405$ nm), (c) $\text{K}_3[\text{Eu}(\text{1Tdpa})_3]_3$ (12 μM , $\lambda_{exc} = 405$ nm) e (d) imagem mesclada. Escala: 50 μm . Adaptado com permissão de <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01805>. Copyright © 2021, American Chemical Society.

3.5. Conclusões

Cinco novos complexos de Ln^{3+} com ligantes contendo grupos derivados de tiofeno-dipicolinato foram aplicados com bons resultados na geração de $^1\text{O}_2$. Os sais utilizados como ligantes para efeito antena, **K_2nTdpa** ($n = 1$ ou 2), foram sintetizados e caracterizados por ^1H RMN e massas de alta resolução.

Os dois ligantes sintetizados (**K_2nTdpa** ($n = 1$ ou 2)) foram investigados em processos de complexação com os íons lantanídeos Eu^{3+} , Gd^{3+} e Yb^{3+} . Todos os complexos tiveram suas propriedades ópticas investigadas por espectroscopia de UV-Vis e de fluorescência/fosforescência estáticas e dinâmicas. As propriedades ópticas indicaram que os ligantes salinos foram antenas eficazes para os complexos metálicos de Eu^{3+} e Yb^{3+} . As propriedades de luminescência observadas indicaram o potencial dos complexos de íons lantanídeos para geração de $^1\text{O}_2$.

O complexo **$\text{K}_3[\text{Ln}(\text{2Tdpa})_3]$** foi o mais eficiente na geração de $^1\text{O}_2$, indicando assim, a importância da incorporação de um segundo anel de tiofeno presente no ligante **$\text{K}_2\text{2Tdpa}$** . **$\text{K}_3[\text{Gd}(\text{2Tdpa})_3]$** e **$\text{K}_3[\text{Yb}(\text{2Tdpa})_3]$** foram testados in vitro com células HeLa. Eles apresentaram baixa citotoxicidade e alta fototoxicidade ($\lambda = 365$ nm) o que os credenciava para testes como FS em TFD. Os valores de IC_{50} iguais a $39,5 \pm 4,8$ e $43,8 \pm 3,6$ μM no escuro e $2,35 \pm 0,5$ e $5,42 \pm 0,6$ μM após irradiação, respectivamente, foram obtidos para os ensaios com os dois complexos. Os valores de IC_{50} das células incubadas com os complexos e irradiadas com luz de 365 nm mostraram-se mais baixos do que os do ligante isolado (**$\text{K}_2\text{2Tdpa}$** $9,26 \pm 0,8$ μM). Este fato foi atribuído a maior quantidade de grupos geradores de $^1\text{O}_2$ na estrutura dos derivados com íons lantanídeos e a uma transferência mais eficaz entre o estado T_3 dos complexos metálicos para o estado T_3 fundamental do O_2 , gerando assim, O_2 no estado S_1 .

Os mecanismos que induziram o processo de morte celular foram investigados em experimentos de citometria de fluxo usando-se AnV-FITC e PI. Observou-se que tanto a apoptose quanto a necrose celulares contribuíram para o processo de morte induzida, sendo que a necrose foi o mecanismo predominante nas condições testadas.

$\text{K}_2\text{1Tdpa}$, diferentemente de **$\text{K}_2\text{2Tdpa}$** , mostrou-se capaz de sensibilizar eficientemente o íon Eu^{3+} . O complexo **$\text{K}_3[\text{Eu}(\text{1Tdpa})_3]$** , que também apresentou baixa citotoxicidade, foi visualizado dentro das células HeLa, confirmando que o complexo de íon lantanídeo utilizado foi capaz de transpor a membrana celular e acumular-se de forma seletiva em uma região específica, as mitocôndrias. Os resultados aqui apresentados indicam que o grupo de compostos estudados tem potencial para o desenvolvimento de sistemas com dupla funcionalidade,

atuando tanto como FS de TFD, quanto como marcador seletivo para ensaios de imageamento celular. Este estudo foi publicado na revista *Journal of Medicinal Chemistry* (<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01805>).¹⁵⁷

3.6. Perspectivas

Novos experimentos em vitro ainda são necessários para chegar às melhores condições de uso dos complexos $K_3[Gd(2Tdpa)_3]$ e $K_3[Yb(2Tdpa)_3]$ como FS de TFD, como melhores tempos de incubação e de exposição à luz e melhor concentração, por exemplo. O composto $K_3[Yb(2Tdpa)_3]$ poderia funcionar bem como agente teragnóstico, permitindo sua visualização dentro das células. Por isto, testes deste complexo como agente teragnóstico deverão ser realizados.

Estratégias de síntese similares à utilizada neste trabalho podem ser usadas para obter outras estruturas contendo grupos tiofenos com potencial para serem usadas como antenas para a produção de complexos de íons lantanídeos, que por sua vez, têm uma possível aplicação como FS de TFD.

Capítulo 4

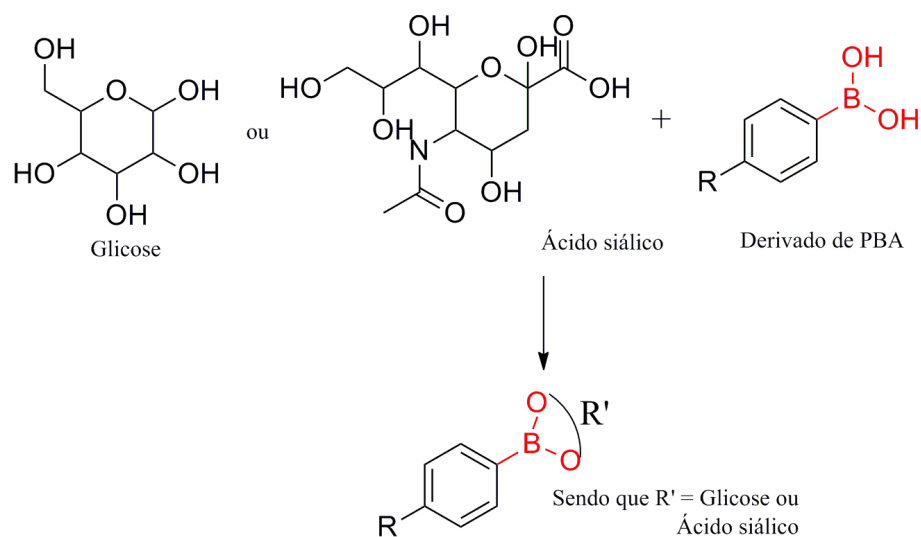
C-Dots Sintetizados a partir de esterco de vaca bioativos: uma sonda para detecção de glicose, bioimageamento e potencial agente de imunoterapia para melanoma

4.1. Introdução

As altas taxas de incidência do câncer, a alta agressividade de alguns tipos de carcinoma e a baixa seletividade dos tratamentos disponíveis, tornam esta doença um dos grandes desafios para a ciência.¹⁵⁸ Entre os diferentes tipos de carcinomas, o melanoma é uma forma extremamente agressiva de câncer de pele que no Brasil é um grave problema de saúde pública.¹⁵⁹ Devido à alta incidência de luz solar em nosso país, percebe-se uma abundância de indivíduos propensos ao desenvolvimento de melanomas.¹⁵⁹

A nanotecnologia tem experimentado um crescimento exponencial em importância, aplicações e possibilidades ao longo dos últimos anos.¹⁶⁰ Partículas com tamanhos tipicamente abaixo de 100 nm manifestam propriedades de superfície e efeitos quânticos que em materiais aglomerados ou maiores não são observados. Nanopartículas de diversas naturezas vêm sendo utilizadas com sucesso em áreas como Agronomia,¹⁶¹ Biologia,¹⁶² Medicina,^{162, 163} Materiais,¹⁶⁴ Química e Física.¹⁶⁵ Na Medicina, uma das aplicações mais exploradas, é o transporte de fármacos. Em geral, sistemas nanocarreadores são utilizados como quimioterápicos quando associados com sistemas de conhecida atividade biológica. Não raramente, estes novos sistemas nanométricos têm toxicidades e mecanismos de atuação alterados em comparação com os sistemas tradicionais.

Entre os diversos nanomateriais, os chamados C-Dots são nanopartículas que vêm ganhando destaque. Desde a sua primeira descrição, em 2004,¹⁶⁶ eles vêm sendo explorados para aplicações diversas, inclusive as biológicas, devido a suas propriedades luminescentes, alta solubilidade em água e baixas toxicidades.^{167, 168} Suas superfícies podem ser alteradas por estratégias simples, o que expande ainda mais seu rol de aplicabilidades. Entre as alternativas de modificação superficial, a incorporação do grupo derivado de ácido fenilborônico (PBA) é de grande interesse devido à ligações com grupos dióis de moléculas como a glicose e o ácido siálico (Esquema 4.1).



Esquema 4. 1. Formação de ligações entre PBA e glicose ou ácido siálico.

Devido ao interesse no desenvolvimento de sondas ópticas com propriedades mais seletivas, este capítulo apresenta a síntese, caracterização e investigação biológica de uma plataforma luminescente simples baseada em **C-Dots** com superfícies modificadas com grupos PBA (**PBAC-Dots**). Também relatamos a exploração de **PBAC-Dots** como uma sonda de efeito *light-up* para sacarídeos, agente de bioimagem seletiva e um potencial ativo para imunoterapia de melanoma.

4.2.Revisão bibliográfica

4.2.1. Nanotecnologia no tratamento de cânceres

A nanotecnologia tem sido uma importante ferramenta utilizada no combate ao câncer.¹⁶⁹ Devido ao tamanho na escala de nano, as nanopartículas podem superar barreiras celulares, anatômicas e fisiológicas.¹⁷⁰ A versatilidade dos nanomateriais na terapia do câncer tem contribuído para inovações recentes nos sistemas de do tipo *drug delivery* e possibilitado a criação de novos agentes terapêuticos baseados na funcionalização da superfície das partículas com moléculas e biomoléculas (e.g. fitas de ácido nucleico, peptídeos, proteínas ou anticorpos).^{169, 170} Estes nanossistemas multifuncionais sofisticados podem contribuir para diagnósticos mais precisos e tratamentos menos invasivos.

Um dos motivos para o sucesso de estratégias baseadas em nanotecnologia no combate ao câncer é o chamado efeito de permeação e retenção. Esse efeito consiste no fato de que as partículas de tamanho entre 10 e 100 nm, uma vez na corrente sanguínea, são muito grandes para escaparem da vasculatura e entrarem em tecidos saudáveis ou para serem eliminadas pelos rins, mas podem escapar da vasculatura disfuncional para tumores, se não forem eliminados pelo sistema reticuloendotelial. Se entrarem no tumor, as partículas são normalmente acumuladas devido ao fato de que os vasos linfáticos defeituosos impedem que ela sejam eliminadas do tecido.^{171, 172} Apesar de o efeito de permeação e retenção normalmente ser observado com nanossistemas de tamanhos médios entre 10-100 nm, também pode-se ter o mesmo efeito com sistemas maiores ou menores.¹⁷³

Desta forma, estratégias envolvendo nanomateriais conseguem alterar os padrões farmacocinéticos e toxicidades de agentes quimioterápicos tradicionais porque permitem novos mecanismos de ação por meio da regulação da distribuição intracelular de compostos impermeáveis às células e da liberação controlada de substâncias bioativas.¹⁷² O fármaco conhecido como Doxil[®], por exemplo, é uma formulação lipossomal de Doxorubicina que, por sua vez, é uma droga quimioterápica amplamente utilizada para pacientes com sarcoma, cânceres de pulmão, de mama e outros.¹⁷⁴ A formulação lipossomal acumula-se mais eficientemente nos tumores como consequência do aumento do efeito de permeação e retenção, mostrando assim, maior atividade em comparação com a Doxorubicina livre.¹⁷⁵

Outras abordagens comuns são sistemas nanométricos que utilizam polímeros, metais, materiais inorgânicos, nanotubos de carbono e grafeno para sistemas do tipo *drug delivery*. Estes sistemas não são utilizados apenas com substâncias quimioterápicas tais como

rituximabe, lestauritinibe, carboplatina, paclitaxel e tirosina quinase,^{176, 177} mas também juntamente com agentes imunoterápicos e ácidos nucleicos.¹⁷⁸ O uso de nanopartículas com efeito quimioterápico por si só, sem associação com bioativos convencionais ou biomoléculas ainda é pouco explorado.

4.2.2. Melanoma

Melanoma é uma forma de câncer de pele que ocorre devido a mutações nos melanócitos, que são as células responsáveis pela produção dos pigmentos da pele, dos olhos, do ouvido interno e das leptomeninges (as duas camadas mais internas de tecido que cobrem o cérebro e a medula espinhal).¹⁷⁹ O número de casos de melanoma corresponde a aproximadamente a 5% da incidência dos cânceres de pele, mas é responsável por mais de 75% das mortes causadas por esse conjunto de doenças.¹⁷⁹ A exposição solar é reconhecida como o fator de risco mais significativo para a ocorrência de melanoma, mas também existem casos que acontecem independentemente do nível de exposição solar, o chamado melanoma acral que ocorre nas unha, palmas e solas¹⁸⁰ e mucosas.¹⁸¹ Em 2020 foram registrados 324.635 casos de melanoma no mundo e 57.043 óbitos causados por essa doença.¹⁸² A incidência é maior entre os indivíduos caucasianos de ambos os sexos.¹⁷⁹

O motivo para as altas taxas de mortalidade devido ao melanoma é a sua tendência a evoluir para a metástase.¹⁸³ Os melanócitos são células derivadas da crista neural cujo desenvolvimento depende da migração para povoar a pele e outros locais.¹⁸³ Essa característica requer que os melanoblastos (precursores imediatos do melanócito) adotem um fenótipo migratório, para que possam interagir e sobreviver em ambientes estranhos e colonizar locais distantes, sendo este comportamento natural um análogo à competência metastática.¹⁸³ O melanoma tende a se espalhar para órgãos distantes como pele ou órgãos viscerais, incluindo fígado (percentual de casos em que ocorre metástase para esse órgão: 14–20%), pulmão (18–36%), ossos (11–17%) e cérebro (12–20 %).¹⁸⁴ Outro fator que contribui para os altos índices de mortalidade entre pessoas acometidas por melanoma é o frequente diagnóstico tardio.¹⁸⁴

As abordagens terapêuticas atualmente utilizadas incluem cirurgia, quimioterapia, TFD, imunoterapia e bioquimioterapia.¹⁷⁹ A escolha de uma ou mais terapias depende de fatores como idade do paciente e estágio da doença e local do tumor.¹⁷⁹ Entretanto, a impressionante capacidade das células de melanoma de se adaptarem a ambientes com diferentes níveis nutricionais eleva os níveis de resistência aos tratamentos conhecidos,¹⁸⁵ tornando o desenvolvimento de terapias alternativas para esta doença extremamente importante.

A imunoterapia tem ganhado destaque entre os tratamentos contra o câncer.¹⁷⁹ A relação entre câncer e o sistema imunológico foi proposta pela primeira vez no século XIX, devido ao aparecimento frequente de tumores nos locais de inflamação crônica e à presença de células do sistema imunológico em tecidos tumorais.¹⁸⁶ Por meio da imunoterapia é possível modular o sistema imunológico do paciente para que ataque as células cancerosas em múltiplos alvos e direções.¹⁸⁷ Sendo o melanoma um dos tumores mais sensíveis à modulação imunológica,¹⁸⁸ tal neoplasia maligna é um bom modelo para teste de novas alternativas baseadas em imunologia.

4.2.3. Quantum dots de carbono (C-Dots)

C-Dots, também chamados de Dots de Carbono, Nanodots de Carbono, Quantum Dots de Carbono, Quantum Dots de grafeno, ou simplesmente nanopartículas de carbono são materiais carbonáceos nanométricos com hibridizações sp^2 e sp^3 , defeitos e heteroátomos,¹⁸⁹ com diâmetros típicos abaixo de 10 nm¹⁶⁶ e natureza grafítica.¹⁹⁰ Diversas rotas sintéticas já foram reportadas para a obtenção destes materiais. Rotas estas que empregam tanto métodos químicos como físicos.¹⁹¹ Em relação às matérias-primas também se observa uma grande variedade da fonte do material carbonáceo. Existem relatos da síntese a partir de moléculas com preço relativamente baixo, como açúcares¹⁹² e ácido cítrico,¹⁹³ e até da síntese a partir de materiais residuais, como refugos industriais¹⁹⁴ e lixo de cozinha,¹⁹⁵ por exemplo.

Um dos heteroátomos que podem fazer parte da composição de C-Dots é o boro, especialmente na forma de grupos funcionais ácidos borônicos nas superfícies das nanopartículas. Esses grupos podem fazer ligações do tipo éster-boronato com moléculas contendo grupos dióis, como derivados de carboidratos ou ácido siálico, por exemplo. Por esse motivo, C-Dots contendo grupos ácidos borônicos em suas superfícies já foram usados para a detecção de açúcares, inclusive de derivados presentes em diferentes componentes celulares.¹⁹⁶

C-Dots apresentam comprimento de onda máximo de emissão dependente da excitação,¹⁹⁷ de forma que os máximos de emissão podem ser ajustados ao longo de toda a janela do visível. Além disso, eles possuem alta fotoestabilidade,¹⁹⁸ o que é importante para aplicações nas quais haja a necessidade de longos períodos de observação, como o bioimageamento. Outra característica desses materiais que provoca muita discussão na literatura é a capacidade de emitir luz com comprimento de onda menor do que o de excitação, chamada de luminescência *upconversion* (UC), ou conversão ascendente.^{191,199} Materiais que possuem essa propriedade têm vasta aplicabilidade, especialmente em meio biológico, já que

radiações com maior comprimento de onda são menos nocivas aos tecidos vivos.²⁰⁰ Não existe, contudo, consenso sobre os mecanismos associados a esse comportamento^{201, 202} e nem mesmo sobre a existência dele nos C-Dots.²⁰³

Tanto as propriedades fotofísicas quanto o comportamento biológico dos C-Dots são extremamente sensíveis às características de suas superfícies e portanto podem ser ajustadas por meio de uma funcionalização adequada da superfície da nanopartícula.²⁰⁴⁻²⁰⁷ Em meio celular, propriedades como a carga e a existência de determinados grupos funcionais na superfície são essências para o comportamento dos C-Dots em termos de mecanismo de captação celular, tráfego intracelular e citotoxicidade.²⁰⁴ Estratégias de engenharia de superfície podem ser utilizadas para deslocar a emissão de C-Dots do azul para o vermelho^{205, 206, 208} e para modular a atividade antibacteriana das nanopartículas, por exemplo.²⁰⁴ O uso de C-Dots para bioimageamento também já foi bastante estudado. Em geral, sem funcionalização da superfície, as nanopartículas apresentam padrões não seletivos de marcação em experimentos de bioimageamento.^{194, 209} Com a devida funcionalização da superfície dos C-Dots, é comum observar-se um direcionamento e acúmulo dos nanomateriais modificados em regiões específicas das células.^{210, 211}

4.3. Objetivos

4.3.1. Objetivo geral

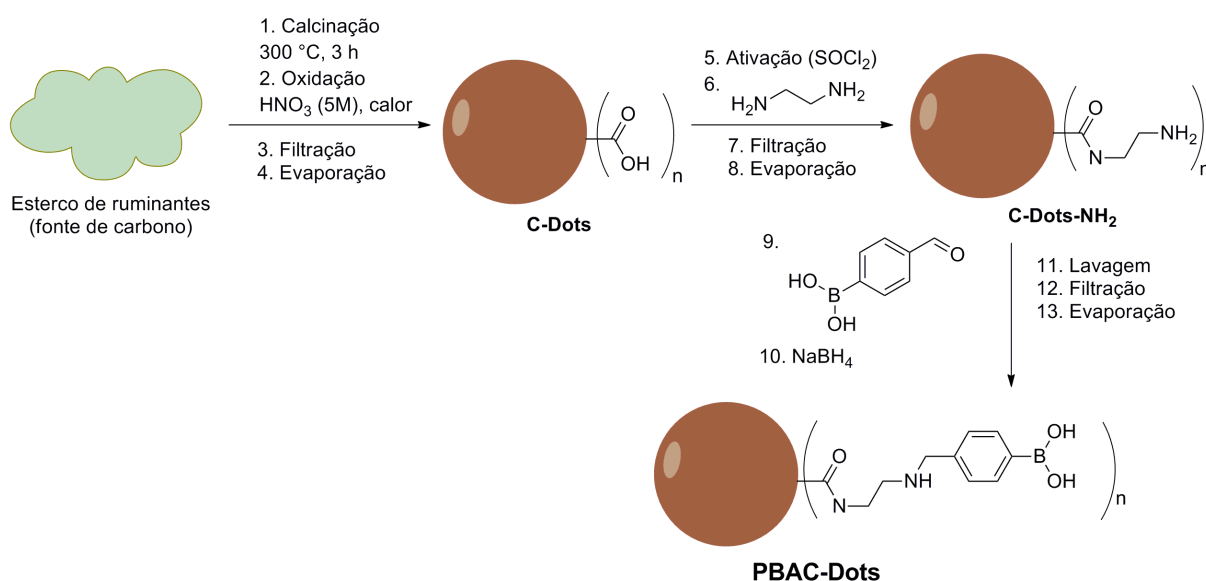
Obter **C-Dots** funcionalizadas com PBA e investigar seu comportamento na presença de glicose, em experimentos de bioimageamento celular e em camundongos saldáveis e com melanoma.

4.3.2. Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar **C-Dots** a partir de esterco de vaca com superfícies funcionalizadas com PBA (**PBAC-Dots**);
- Avaliar o comportamento de tais nanopartículas na presença de glicose;
- Investigar a toxicidade de **PBAC-Dots** em vitro para células saudáveis e cancerígenas;
- Revelar a região de acumulação preferencial dentro de células cancerígenas de **PBAC-Dots** por meio de experimentos de bioimageamento;
- Estimar a localização de **PBAC-Dots** após a injeção em camundongos C57BL/6 por meio de ensaios de bioimageamento em vivo;
- Avaliar o efeito toxicológico e imunoterapêutico de **PBAC-Dots** em camundongos C57BL/6 saldáveis e com melanoma.

4.4. Resultados e discussão

A produção e passivação de **C-Dots** foram feitas de acordo com metodologia estabelecida em trabalho anteriormente realizado no Laboratório de Inorgânica e Materiais (LIMA),²¹² usando-se esterco de vaca como fonte de carbono. O ácido 4-formilfenilborônico (4-FPBA) foi covalentemente ligado a aminas primárias dos **C-Dots** passivados por formação de bases de Schiff. Em seguida houve redução da ligação dupla (C=N) com boroidreto de sódio. A metodologia utilizada na síntese do material nanoparticulado é visualizada no Esquema 4.2.



Esquema 4. 2. Síntese dos **PBAC-Dots** a partir do estrume de vaca.

As Figuras 4.1 (a) e (b) mostram uma imagem MET e o diagrama de distribuição de tamanho dos **PBAC-Dots**. As partículas apresentam morfologia aproximadamente esférica e boa dispersão. A faixa de distribuição de tamanhos é estreita, variando entre 2 e 6 nm, com diâmetro médio de $4,2 \text{ nm} \pm 0,03 \text{ nm}$. A inserção na Figura 4.1 (a) exibe a imagem de MET representativa de uma partícula individual. As nanoestruturas dos **PBAC-Dots** apresentam cristalinidade elevada com valor médio de parâmetro de rede de $2,2 \text{ \AA}$, o que está de acordo com espaçamento de rede [100] do grafeno ao longo do plano de difração [001].²¹³ O espectro de IV dos **PBAC-Dots** (Figura 4.1(d)) mostra sinais característicos de vibração de alongamento de B-O em 1390 cm^{-1} , vibrações de flexão de B-OH em 1165 e 1030 cm^{-1} e de alongamento C-B em 1100 cm^{-1} .

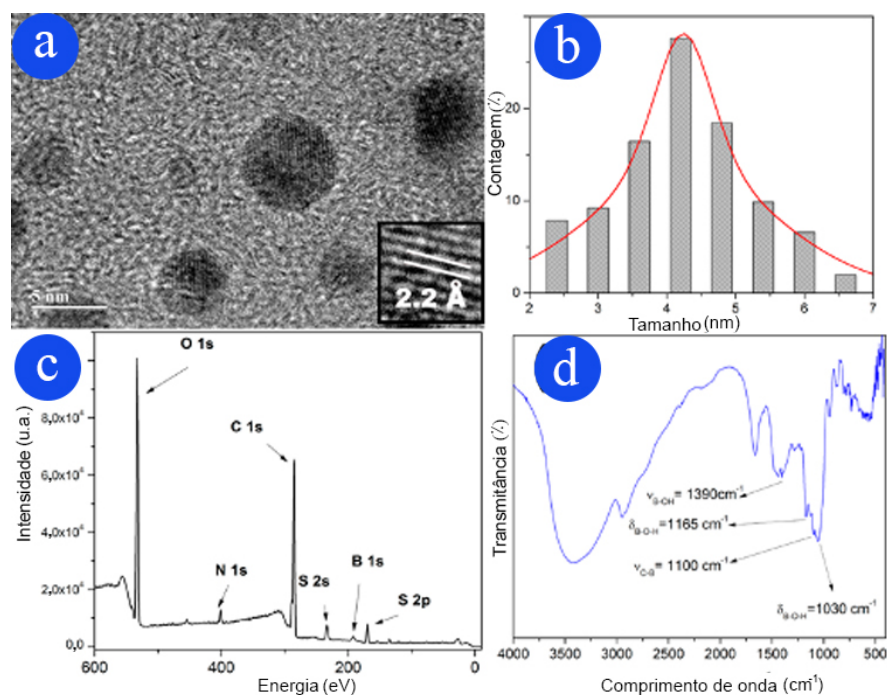


Figura 4. 1. (a) Imagem de MET (Escala: 5 nm); (b) distribuição do tamanho das partículas; (c) espectro de varredura completa XPS e (d) espectro de IV dos **PBAC-Dots**. Adaptado com permissão de DOI: 10.1039/d0ra10859f. Copyright © 2021, Royal Society of Chemistry.

O espectro de XPS dos **PBAC-Dots** (Figura 4.1 (c)) exibe sinais que podem ser atribuídos a cinco elementos, O, N, C, S e B, e seus conteúdos são 39,10%, 4,11%, 48,00%, 3,45% e 5,42%, respectivamente. A presença de boro na superfície de **PBAC-Dots** indica que os grupos PBA foram introduzidos com sucesso pelo processo de funcionalização. O espectro de C 1s apresenta três sinais em 289,4, 286,6 e 285,3 eV que podem ser atribuídos às ligações C=O, C=C e C-C, respectivamente (Figura 4.2 (a)). A Figura 4.2 (b) é o espectro de O 1s que mostra sinais em 532,4, 533,62 e 535,6 eV relacionados aos grupos -C=O, C-O e -B-O, respectivamente. O sinal centrado em 402 eV no espectro de N 1s (Figura 4.2 (c)) pode ser atribuído a (C)₃ - N (sp³). O espectro de B 1s, exibido na Figura 4.2 (d), mostra três sinais centrados em 194,5, 191,7 e 188,3 eV, que são claramente atribuídos às ligações B-O₂, B-O e B-C, respectivamente.

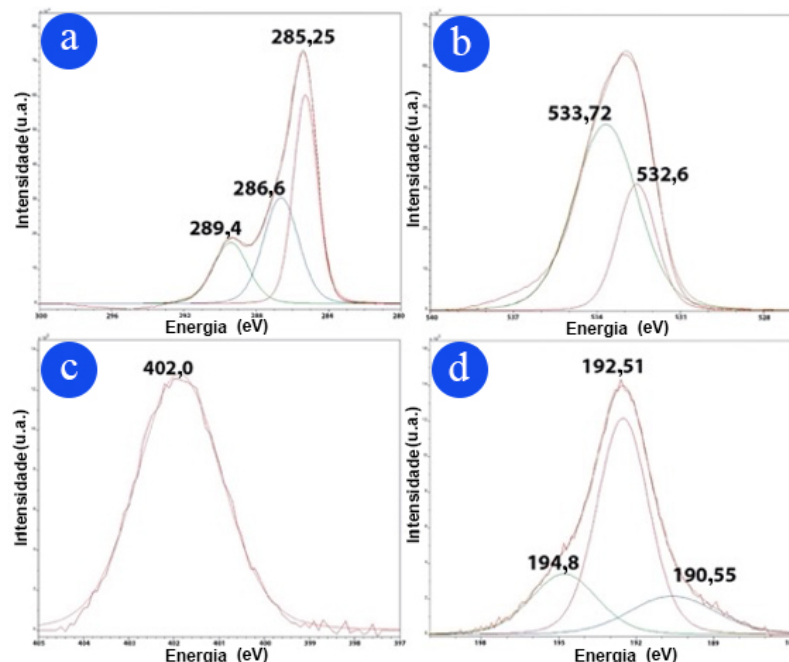


Figura 4. 2. Espectros de XPS de alta resolução de **PBAC-Dots** (a) C1s; (b) O1s; (c) N1s e (d) B1s. Adaptado com permissão de DOI: 10.1039/d0ra10859f. Copyright © 2021, Royal Society of Chemistry.

A engenharia de superfície com moléculas funcionais desempenha um papel importante no desenvolvimento de nanopartículas para aplicações biomédicas, em especial porque essas modificações podem contribuir para a melhoria das propriedades ópticas e magnéticas e para a solubilidade, biocompatibilidade e diminuição da toxicidade.²¹⁴ Além disto, agentes de superfície funcionais contribuem para o aumento da especificidade, ajustando assim, a cinética das nanopartículas em ambientes biológicos e aumentando a estabilidade coloidal. As propriedades ópticas dos C-Dots são especialmente sensíveis a modificações mínimas de superfície. Relatos recentes confirmaram que a presença de grupos doadores ou retiradores de elétrons, o pH, e existência de íons e defeitos de superfície podem perturbar a estrutura eletrônica superficial das nanopartículas.²¹⁵⁻²¹⁷ Os efeitos eletrônicos de **PBAC-Dots** modificados foram investigados por meio de espectroscopia óptica e os resultados são apresentados na Figura 4.3.

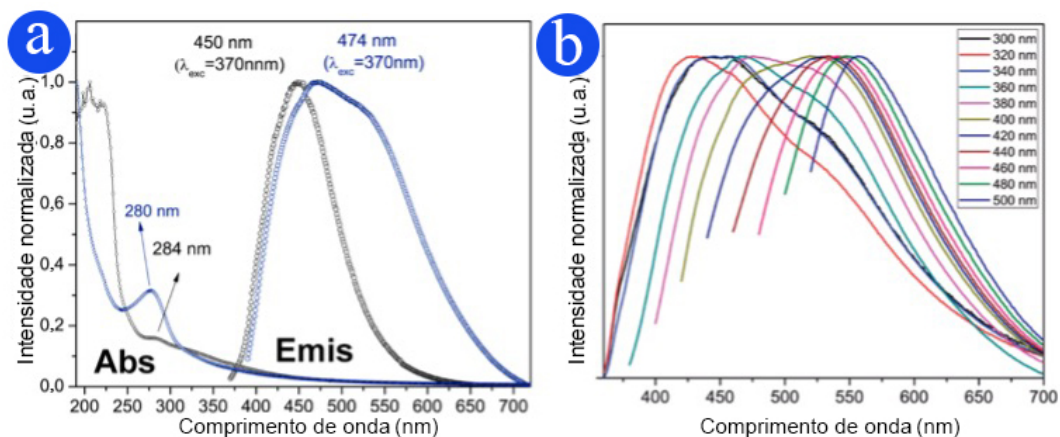


Figura 4. 3. (a) Espectros de absorção (Abs) e emissão (Emis, $\lambda_{exc} = 370$ nm) adquiridos à temperatura ambiente de **C-Dots-NH₂** (Preto) e **PBAC-Dots** (Azul); (b) Espectros de emissão de **PBAC-Dots** sob diferentes comprimentos de onda de excitação (de 300 a 500 nm); **[PBAC-Dots]** = 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Adaptado com permissão de DOI: 10.1039/d0ra10859f. Copyright © 2021, Royal Society of Chemistry.

Os espectros de absorção na região do UV-Vis foram medidos para as amostras **C-Dots-NH₂** (previamente descrito)²¹⁰ e **PBAC-Dots** e mostram bandas centradas em 280 e 284 nm, respectivamente. Essas absorções são típicas da transição $n \rightarrow \pi^*$ ²¹⁸ e fornecem evidências de que a presença de grupos retiradores de densidade eletrônica na superfície de **PBAC-Dots** reduz ligeiramente o gap de energia da partícula.^{219,220} Os espectros de emissão normalizados dos **C-Dots-NH₂** e **PBAC-Dots** adquiridos à temperatura ambiente sob excitação de 370 nm (Figura 4.3 (a)), exibem máximos centrados em 450 e 475 nm, respectivamente. Esses resultados sugerem que as propriedades ópticas dos **C-Dots-NH₂** e **PBAC-Dots** não são totalmente controladas pelo efeito de confinamento quântico e que os diferentes comportamentos podem ser atribuídos à funcionalização da superfície, assim como já havia sido observado para materiais similares.^{221,222} A Figura 4.3 (b) exibe espectros de emissão de **PBAC-Dots** adquiridos sob excitações em comprimentos de ondas, entre 300 e 500 nm. As emissões mostraram-se dependentes do comprimento de onda de excitação, o que sugere a presença de diferentes estados emissivos na superfície dos **PBAC-Dots**. Esse comportamento espectral já foi amplamente relatado para C-Dots obtidos a partir de diferentes fontes de carbono e métodos sintéticos.^{223,224} A estrutura dos C-Dots consiste em um núcleo grafitico cristalino coberto por uma estrutura de carbono amorfa, que é composta por uma população heterogênea de fluoróforos. Esses fluoróforos podem ser responsáveis pelos espectros de emissão dependentes de excitação típicos.²¹⁸

Experimentos de detecção de glicose foram realizados com os **PBAC-Dots**, conforme visto na Figura 4.4. Na presença do analito, percebe-se que a intensidade de emissão dos **PBAC-**

Dots é uma função da concentração de glicose. Com a formação do complexo **PBAC-Dots-glicose**, observa-se um aumento linear das intensidades de emissão em até 6 vezes em relação à solução de **PBAC-Dots** na ausência do analito ($R^2 = 0,998$), conforme mostrado na Figura 4.4 (b). Este fenômeno pode ser explicado pelo estudo de Anslyn e colaboradores.²²⁵ Segundo esses autores, os rotores $-OH$ do grupo $-B(OH)_2$ funcionam como aceptores de energia, enquanto o grupos fluoróforos atuam como doadores de energia quando o sistema é excitado. Após a ligação com um grupo diol, esse efeito de conversão interna é interrompido devido a impossibilidade de rotação destas novas ligações. Esse efeito já foi reportado para materiais similares com derivados de ácidos borônicos.²²⁵

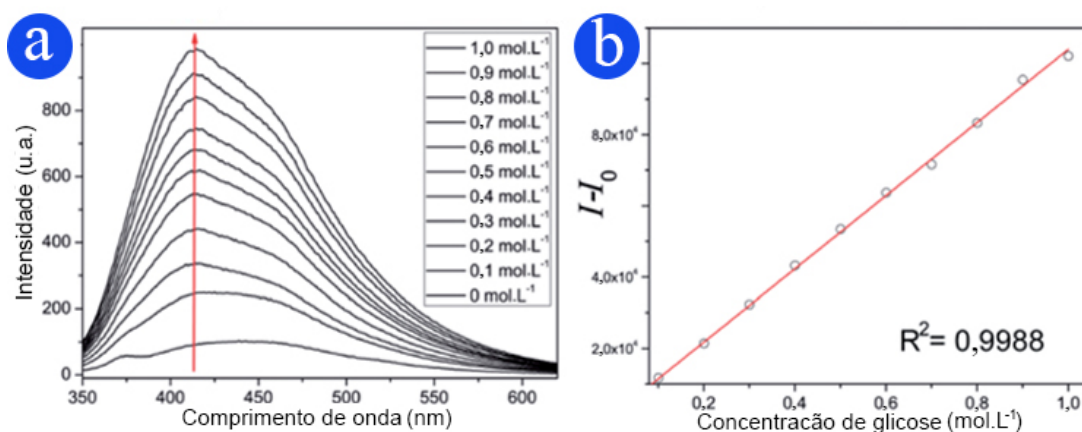
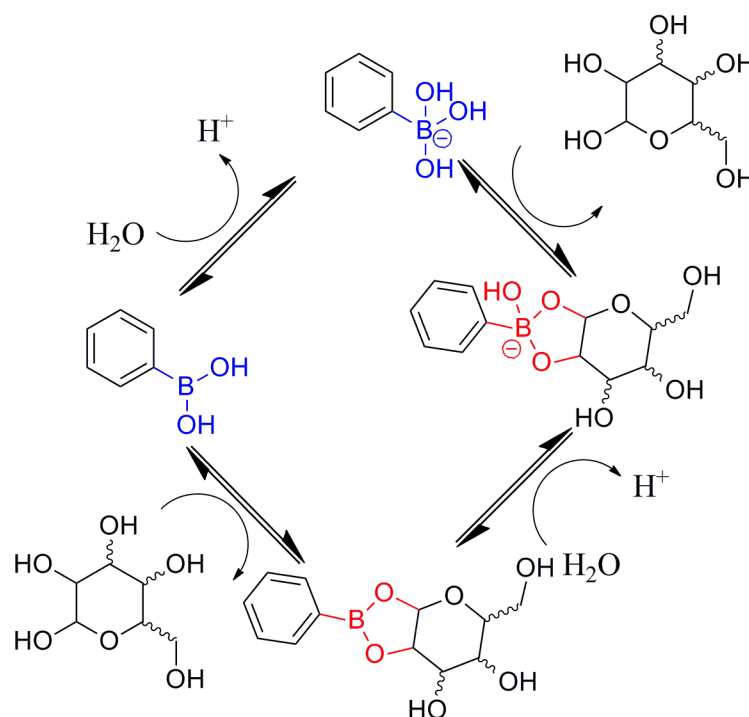


Figura 4. 4. (a) Espectros de emissão de **PBAC-Dots** em função da concentração de glicose; (b) Gráfico de emissão integrada em função da concentração de glicose. I_0 e I são os espectros de emissão de **PBAC-Dots** integrados na ausência e na presença do analito. $[PBAC-Dots] = 20 \mu g mL^{-1}$. Adaptado com permissão de DOI: 10.1039/d0ra10859f. Copyright © 2021, Royal Society of Chemistry.

Sondas *light-off*, que tem o comportamento oposto ao observado, podem ser imprecisas na detecção. Por outro lado, os sensores do tipo *light-up*, como o mostrado nas Figuras 4.4 (a) e (b), são normalmente preferíveis devido à sua capacidade de detecção aprimorada, especialmente em meios biológicos nos quais a fluorescência de fundo pode ser problemática. A produção de C-Dots contendo grupos de ácidos borônicos é relativamente barata, rápida e pode ser feita em uma única etapa, por meio de síntese hidrotérmica ou de microondas.²²⁶ Alguns grupos produziram e exploraram essas sondas ópticas como uma abordagem não enzimática para detecção de sacarídeos em diferentes ambientes.^{196, 227, 228} Por exemplo, Shu e colaboradores obtiveram uma sonda óptica contendo grupos borônicos para detecção de ácido siálico em solução aquosa, usando um único precursor, o ácido 3-piridilborônico em uma

síntese hidrotérmica de uma etapa.²²⁹ PBA e a etilenodiamina foram usados para produzir C-Dots funcionalizados para a detecção de glicoproteínas.²³⁰ No entanto, apesar dos resultados promissores, em todos os casos relatados por outros grupos, as respostas das sondas estão associadas com extinção da luminescência (*light-off*). O mecanismo associado a este efeito de “desligamento” das emissões de C-Dots ainda não é claro. Alguns estudos justificaram que a supressão da luminescência ocorre devido a agregação das partículas associadas com os analitos.^{228, 230, 231} Mudanças na hibridização do boro e/ou presença de canais não radiativos induzidos por forças eletrostáticas (agregação/desagregação) causadas por uma forma aniônica tetraédrica (no átomo de B) derivada dos grupos ácidos borônicos, após a complexação com o analito (formação da ligação éster-boronato), é outra explicação possível para a extinção de luminescência,²³² conforme Esquema 4.3.²³³ Este efeito, provavelmente, não é observado no sistema apresentado neste trabalho, uma vez que observou-se um efeito *light up* do sistema após a adição da glicose.



Esquema 4. 3. Formação da ligação éster-boronato.

A citotoxicidade de **PBAC-Dots** foi avaliada por meio de ensaios de MTT em células cancerígenas (melanoma murino B16F10) e saudáveis (fibroblastos NIH3T3), e os resultados estão resumidos na Figura 4.5. A única concentração que apresentou toxicidade estatisticamente significativa foi a mais alta testada, ou seja, 0,1 mg mL⁻¹, tanto para as células B16F10, quanto

para NIH3T3 ($p < 0,01$). Esse efeito pode ser justificado pela presença de cargas superficiais negativas centradas nos grupos borônicos dos **PBAC-Dots** em pH fisiológico devido a desprotonação do grupo B-OH ácido ($pK_a \approx 8$) em meio alcalino.²³⁴ Ainda assim, as viabilidades celulares permaneceram acima de 60% para a concentração de 0,1 mg mL⁻¹ e acima de 75% para as concentrações de 0,05 e 0,01 mg mL⁻¹.

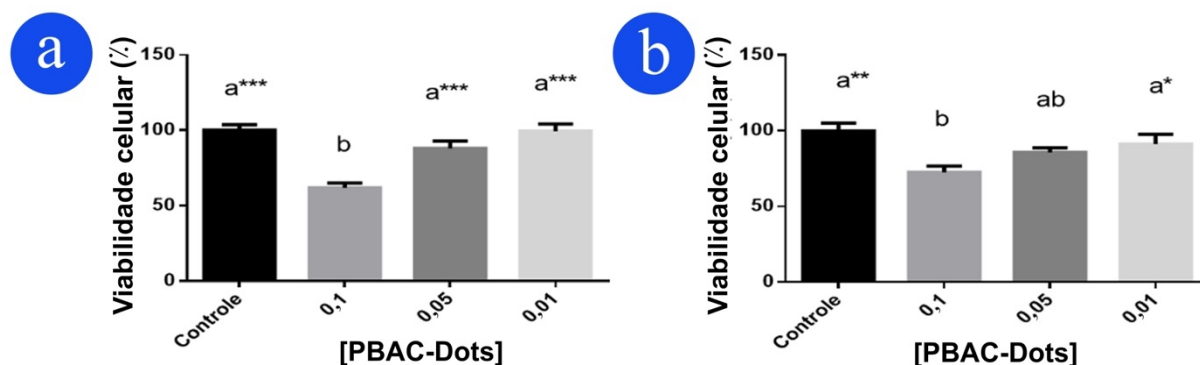


Figura 4. 5. Viabilidade celular de (a) fibroblastos murino - NIH/3T3 e (b) células de melanoma murino - B16F10 após 24 h de exposição a 3 concentrações de **PBAC-Dots**: 0,01; 0,05 e 0,1 mg mL⁻¹. Letras diferentes significam estatísticas diferentes. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$. Adaptado com permissão de DOI: 10.1039/d0ra10859f. Copyright © 2021, Royal Society of Chemistry.

O comportamento dos **PBAC-Dots** em experimentos de bioimageamento *in vitro* também foi avaliado usando-se células MCF-7 (Figura 4.6). Os **PBAC-Dots** manifestaram um sinal fluorescente intenso que pôde ser visualizado em um microscópio confocal nos canais verde e vermelho. O perfil fluorescente obtido nas células após a incubação com as nanopartículas indica coloração mitocondrial seletiva. É notório o fato de que os **PBAC-Dots** não foram encontrados dentro do núcleo das células, o que contrasta com resultados anteriores de C-Dots passivados exclusivamente com etilenodiamina (**C-Dots-NH₂**),²¹⁰ que eram seletivos para componentes de ácido nucléico no interior dos núcleos – os nucléolos. Os resultados observados para o sistema **PBAC-Dots** indicam uma acumulação seletiva em mitocôndrias devido a sua distribuição, morfologia e tamanho médio das estruturas coradas com as nanopartículas.

As mitocôndrias são organelas que desempenham funções vitais para o metabolismo das células e que fazem parte de processos que podem ser relevantes para o surgimento de certas doenças.¹⁵⁰ Por isto, o bioimageamento seletivo de mitocôndrias é importante para a elucidação da relação entre esta organela e doenças humanas e, conseqüentemente, para desenvolvimento de tratamentos mais assertivos.¹⁵² Existem relatos de outros C-Dots capazes de marcarem

mitocôndrias seletivamente,²³⁵⁻²³⁷ sendo que a maioria das estratégias consiste na funcionalização da superfície dos C-Dots com Trifenilfosfônio (TPP).^{235, 236} O uso de TPP para marcação de mitocôndrias é uma estratégia comumente utilizada.²³⁸ Esta é uma molécula que pode acumular-se seletivamente na mitocôndria porque possui carga positiva deslocada ao longo da estrutura e caráter lipofílico suficiente.²³⁸ Ocorre então uma diminuição da energia livre do sistema durante a movimentação de TPP, de um meio aquoso para um ambiente hidrofóbico, em resposta ao potencial de membrana mitocondrial de cerca de -180 a -200 mV.²³⁹ Não foram encontrados registros de C-Dots funcionalizados com outras moléculas capazes de marcar mitocôndrias seletivamente.

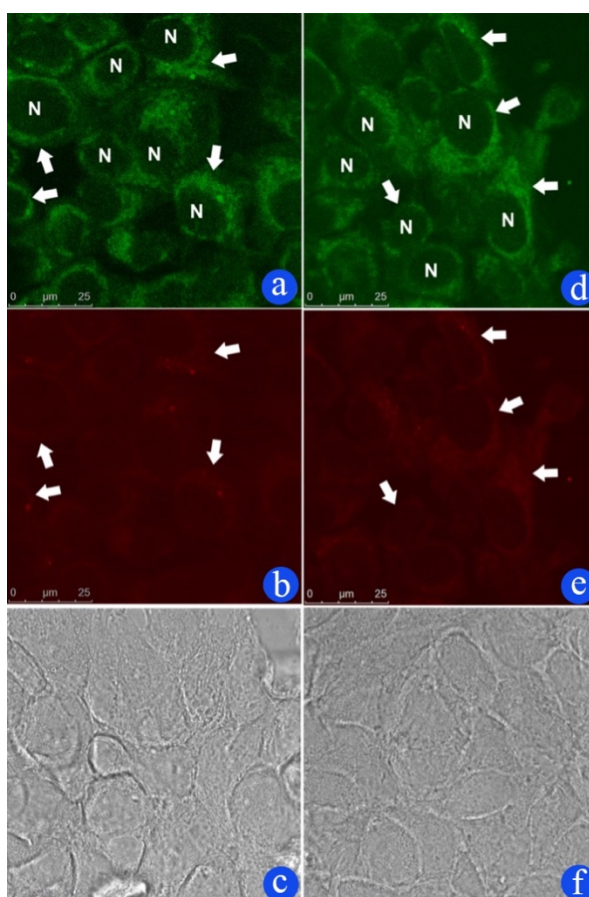


Figura 4. 6. Células de câncer de mama MCF-7 incubadas PBAC-Dots e visualizadas nos canais verde e vermelho. (a), (b) e (c) são células vivas e (d), (e) e (f) são células fixadas. Nenhuma coloração pôde ser detectada dentro dos núcleos das células, conforme mostrado por espaços escuros (indicados pela letra N). (c) e (f) mostram os aspectos morfológicos normais das células por microscopia de contraste de fase. Escala: 25 μ m. Adaptado com permissão de DOI: 10.1039/d0ra10859f. Copyright © 2021, Royal Society of Chemistry.

As células de melanoma murino B16F10 são altamente agressivas e podem sofrer metástase de um sítio subcutâneo primário para os pulmões.^{240, 241} Essa propensão à metástase

está relacionada à presença de altos níveis de ácido siálico expresso nas membranas dessas células.²⁴¹ A característica *light-up* dos **PBAC-Dots** e a alta afinidade de complexação entre os grupos ácido siálico e ácidos borônicos em pH fisiológico abrem a oportunidade de explorar esta nanossonda como um agente de imagem tumoral usando-se modelos em vivo.^{242, 243} Por este motivo, experimentos em camundongos C57BL/6 com câncer de pele induzidos foram realizados seguindo-se as recomendações do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UnB (Figura A15) e o procedimento resumido nas Figuras 4.7 e 4.8. A injeção subcutânea de 10^5 células B16F10 resultou no crescimento do tumor no local da injeção. A bioimagem de fluorescência dos camundongos com a presença do sistema **PBAC-Dots** é vista na Figura 4.9.

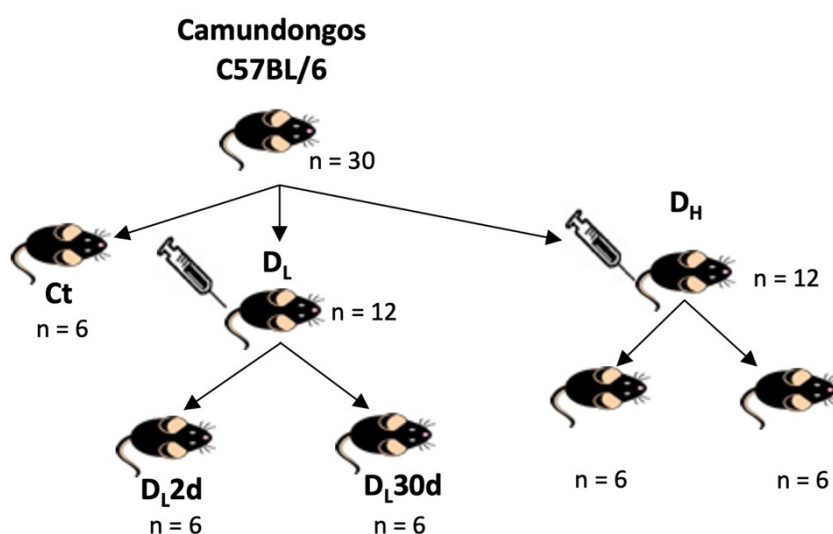


Figura 4. 7. Desenho experimental de animais saldáveis. $D_L = 0,16 \text{ mg mL}^{-1}$, $D_H = 0,31 \text{ mg mL}^{-1}$. Ct: grupo controle; D_L2d e D_H2d : animais sacrificados após 2 dias; D_L30d e D_H30d : animais sacrificados após 30 dias. Adaptado com permissão de DOI: 10.1039/d0ra10859f. Copyright © 2021, Royal Society of Chemistry.

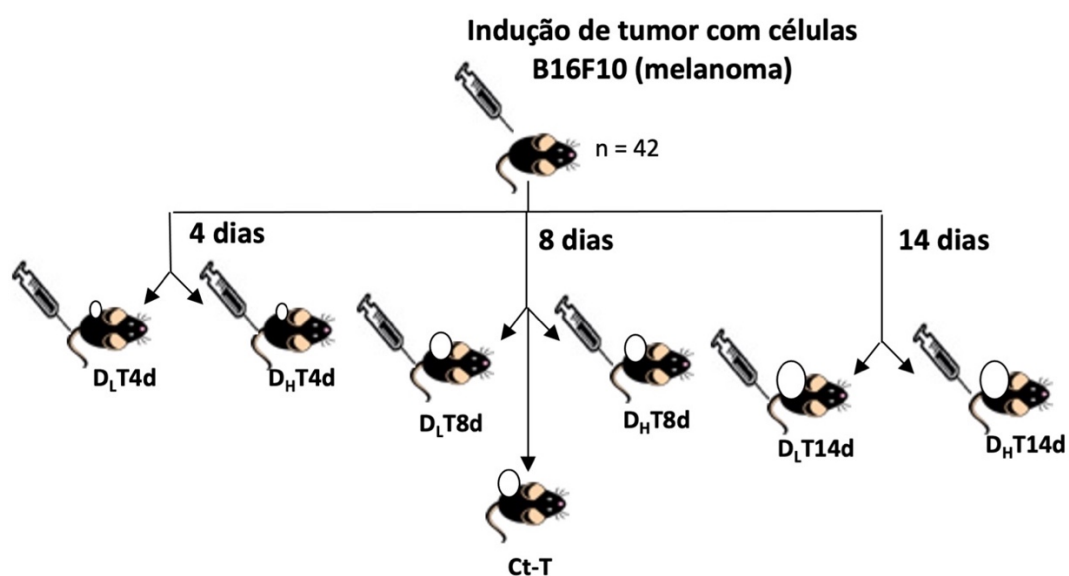


Figura 4. 8. Desenho experimental de animais com melanoma. Ct-T: grupo controle; D_LT4d e D_HT4d: animais que receberam **PBAC-Dots** (0,16 e 0,31 mg mL⁻¹) após 4 dias de crescimento do melanoma; D_LT8d e D_HT8d: animais que receberam **PBAC-Dots** (0,16 e 0,31 mg mL⁻¹) após 8 dias de crescimento do melanoma; D_LT14d e D_HT14d: animais que receberam **PBAC-Dots** (0,16 e 0,31 mg mL⁻¹) após 14 dias de crescimento do melanoma. Adaptado com permissão de DOI: 10.1039/d0ra10859f. Copyright © 2021, Royal Society of Chemistry.

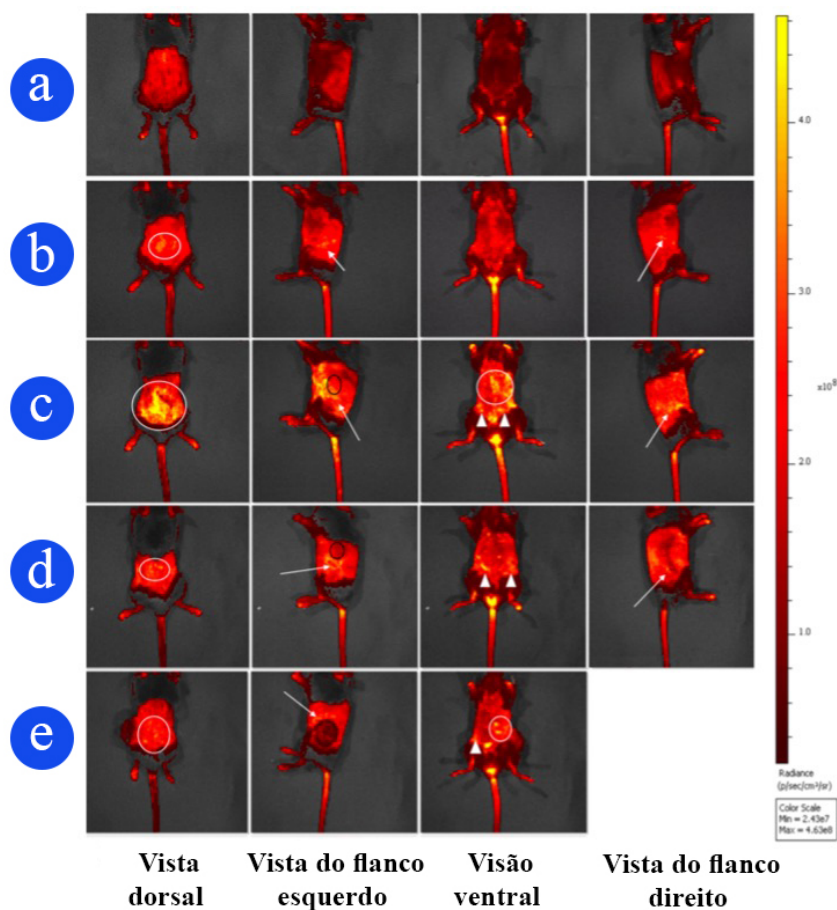


Figura 4. 9. Bioimagem de fluorescência em vivo representativa para camundongos C57BL/6 anestesiados: (a) controle (PBS); (b) camundongos saudáveis, após 4 h da administração de **PBAC-Dots** ($0,16 \text{ mg mL}^{-1}$); (c) camundongos com melanoma, 4 dias após a indução do tumor e 4 h após a administração de **PBAC-Dots** ($0,16 \text{ mg mL}^{-1}$); (d) camundongos com melanoma, 8 dias após a indução do tumor e 4 h após a administração de **PBAC-Dots** ($0,16 \text{ mg mL}^{-1}$); (e) camundongos com melanoma, 14 dias após a indução do tumor e 4 h após a administração de **PBAC-Dots** ($0,16 \text{ mg mL}^{-1}$). Os círculos brancos indicam fluorescência nas regiões dorsais. Setas brancas enfatizam a fluorescência na região do rim. Os triângulos brancos indicam a fluorescência nas regiões do ureter e os círculos pretos indicam a região do tumor. Adaptado com permissão de DOI: 10.1039/d0ra10859f. *Copyright* © 2021, Royal Society of Chemistry.

Todos os camundongos C57BL/6 tratados com **PBAC-Dots** apresentaram vários pontos fluorescentes espalhados ao longo do corpo. A bioimagem de camundongos C57BL/6 saudáveis que receberam **PBAC-Dots** é mostrada na Figura 4.9 (b). Foi possível observar a fluorescência nas regiões dos rins e do ureter, o que é um claro indicio da eliminação dos **PBAC-Dots** pelo sistema urinário do animal. Essa rápida eliminação de C-Dots por meio do sistema urinário está em acordo com os resultados previamente relatados por Stephan e colaboradores.²⁴⁴ As bioimagens dos camundongos com câncer adquiridas 4 h após a administração de **PBAC-Dots** ($0,16 \text{ mg mL}^{-1}$), Figuras 4.9 (c)-(e), mostram um padrão

fluorescente dispersivo sugerindo que a sonda tem uma seletividade limitada para a região do tumor.

As imagens histológicas dos órgãos cérebro, rins, baço, pulmão e fígado estão mostradas na Figura 4.10. Não foram encontradas anormalidades nos tecidos dos rins e do cérebro, como necrose, apoptose ou hemorragia. Isso indica que não houveram danos nesses órgãos causados pela administração do sistema nanofluorescente **PBAC-Dots**. Por outro lado, foram encontrados focos inflamatórios e hiperplasia da polpa branca nos tecidos do fígado e do baço, respectivamente. Os focos inflamatórios presentes no fígado são devido ao melanoma que pode ter sofrido metástase.²⁴⁵ Uma possível causa para a hiperplasia da polpa branca observada no baço dos camundongos é uma resposta imunológica provocada provavelmente pelo câncer,²⁴⁶ que por sua vez gera aumento na quantidade de células do sistema imune na região do baço. No tecido pulmonar, existem áreas de fibrose e infiltrado inflamatório, provavelmente devido à metástase do melanoma.²⁴⁷ O sistema nanométrico **PBAC-Dots**, em testes de nível celular, não induziu citotoxicidade significativa e, portanto, é uma causa improvável para os efeitos negativos observados no animal.

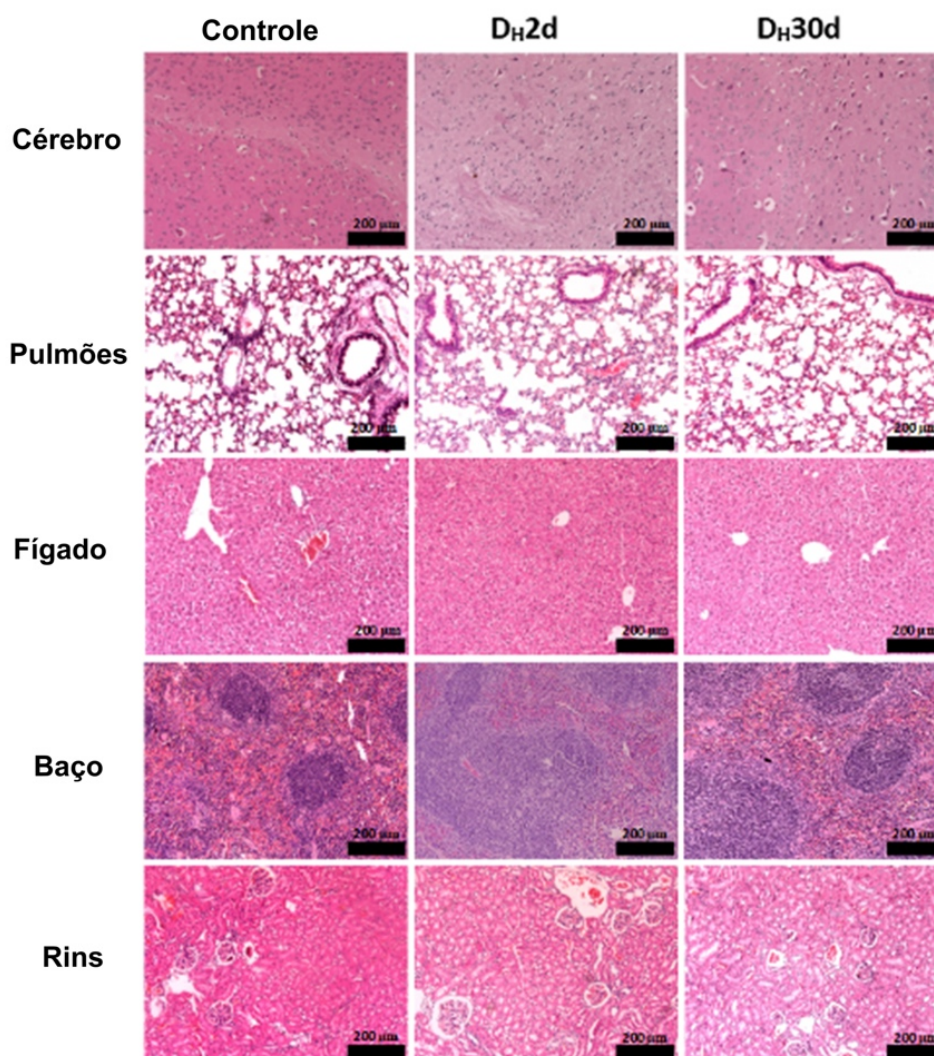


Figura 4. 10. Imagens histológicas do cérebro, pulmões, fígado, baço e rins dos camundongos controle e com câncer tratados com **PBAC-Dots**. Adaptado com permissão de DOI: 10.1039/d0ra10859f. *Copyright* © 2021, *Royal Society of Chemistry*.

Já a análise histológica dos tecidos tumorais, mostrada na Figura 4.11 revela um efeito não previsto. Após o tratamento com os **PBAC-Dots** um grande número de áreas contendo necrose e infiltrado inflamatório foram reveladas. Tais danos não foram visualizados no tecido tumoral de camundongos com câncer e sem o tratamento (Figura 4.11(a)). Resultados semelhantes foram relatados quando C-Dots²⁴⁸ foram conjugados com clorina e6 e hialuronato e usados em TFD. Entretanto, os **PBAC-Dots** foram capazes de introduzir lesão tumoral sem estímulo externo e sem associação com FSs.

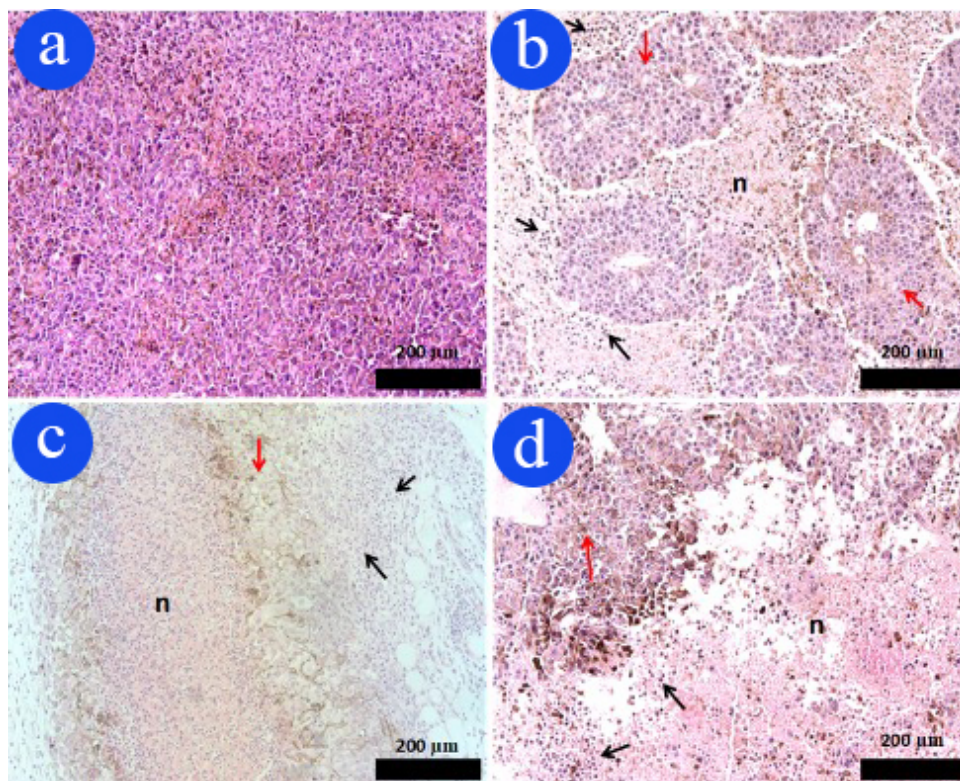


Figura 4. 11. Imagens histológicas dos tumores. (a) Camundongos com câncer sem tratamento com **PBAC-Dots**. Imagens histológicas dos camundongos com tumor tratados com $0,16 \text{ mg mL}^{-1}$ de **PBAC-Dots** após 4 (b), 8 (c) e 14 (d) dias de indução do câncer. O “n” indica regiões de necrose, setas vermelhas e pretas indicam tecido tumoral intacto e células imunológicas, respectivamente. Adaptado com permissão de DOI: 10.1039/d0ra10859f. Copyright © 2021, Royal Society of Chemistry.

Os ensaios hematológicos e de bioquímica sérica foram realizados na tentativa de elucidar este surpreendente efeito terapêutico dos **PBAC-Dots**. Os resultados não mostraram evidências de distúrbios toxicológicos em camundongos saudáveis devido ao tratamento com **PBAC-Dots** (Figuras 4.12 e 4.13). Em relação ao percentual de linfócitos, houve um aumento significativo no hemograma de camundongos com câncer sacrificados 2 e 30 dias após o tratamento com as nanopartículas, quando comparado ao controle (animais com melanoma, sem tratamento) (Figura 4.14). Também houveram diferenças significativas nos percentuais de monócitos e neutrófilos nos grupos sacrificados após 2 e 30 dias do tratamento com **PBAC-Dots**, respectivamente, em relação ao grupo controle. Essa alteração pode ser interpretada como uma resposta do sistema imunológico ao câncer, e corrobora com os danos no tecido tumoral observados por histologia.

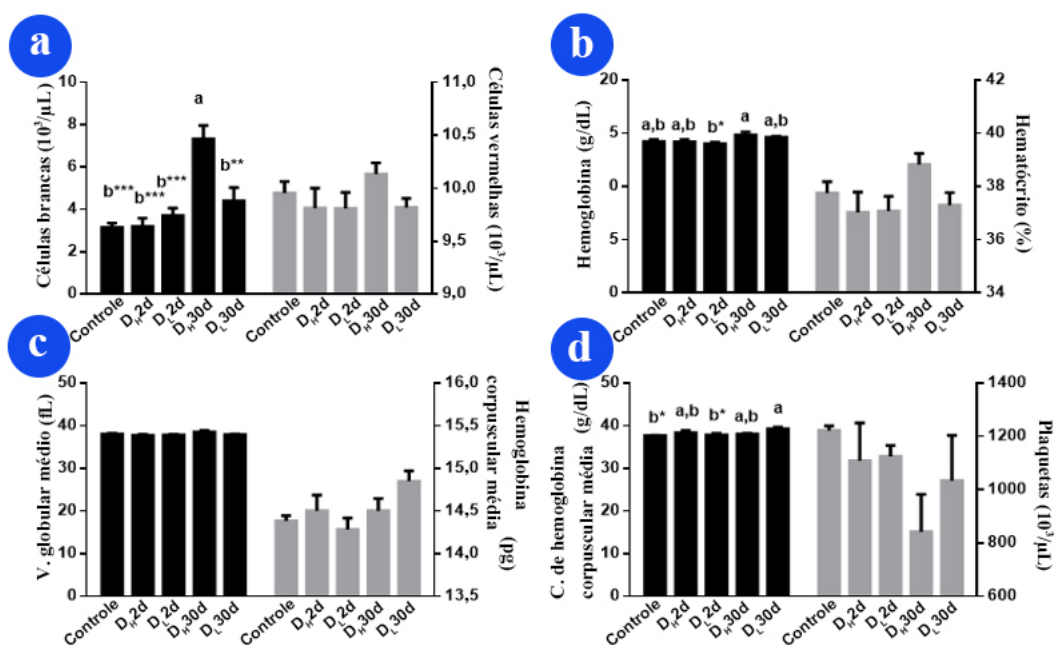


Figura 4. 12. Hemograma dos camundongos C56BL/6 após 2 e 30 dias da aplicação endovenosa de **PBAC-Dots** (0,16 e 0,31 mg mL⁻¹). (a) Número total de glóbulos brancos e glóbulos vermelhos; (b) hemoglobinas e hematócrito; (c) volume corpuscular médio e hemoglobina corpuscular média e (d) concentração de hemoglobina corpuscular média e número de plaquetas. Letras diferentes significam estatísticas diferentes. * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,005. Adaptado com permissão de DOI: 10.1039/d0ra10859f. Copyright © 2021, Royal Society of Chemistry.

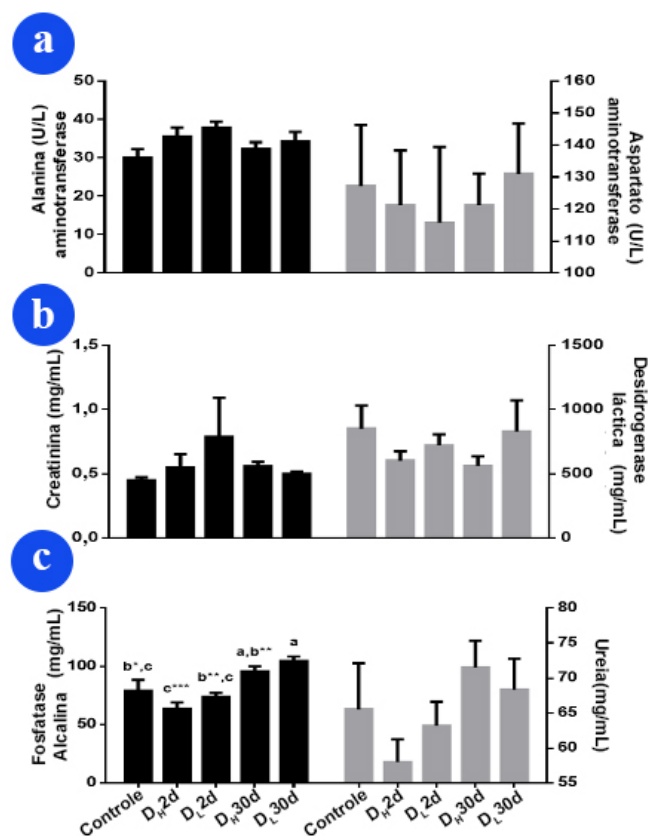


Figura 4. 13. Níveis séricos de camundongos C57BL/6 de (a) Alanina aminotransferase e Aspartato aminotransferase; (b) Creatinina e Desidrogenase láctica e (c) Fosfatase Alcalina e Ureia após 2 e 30 dias de aplicação de **PBAC-Dots** (0,16 e 0,31 mg mL⁻¹). Letras diferentes significam estatísticas diferentes. * = p <0,05; ** = p <0,01; *** = p <0,005. Adaptado com permissão de DOI: 10.1039/d0ra10859f. Copyright © 2021, Royal Society of Chemistry.

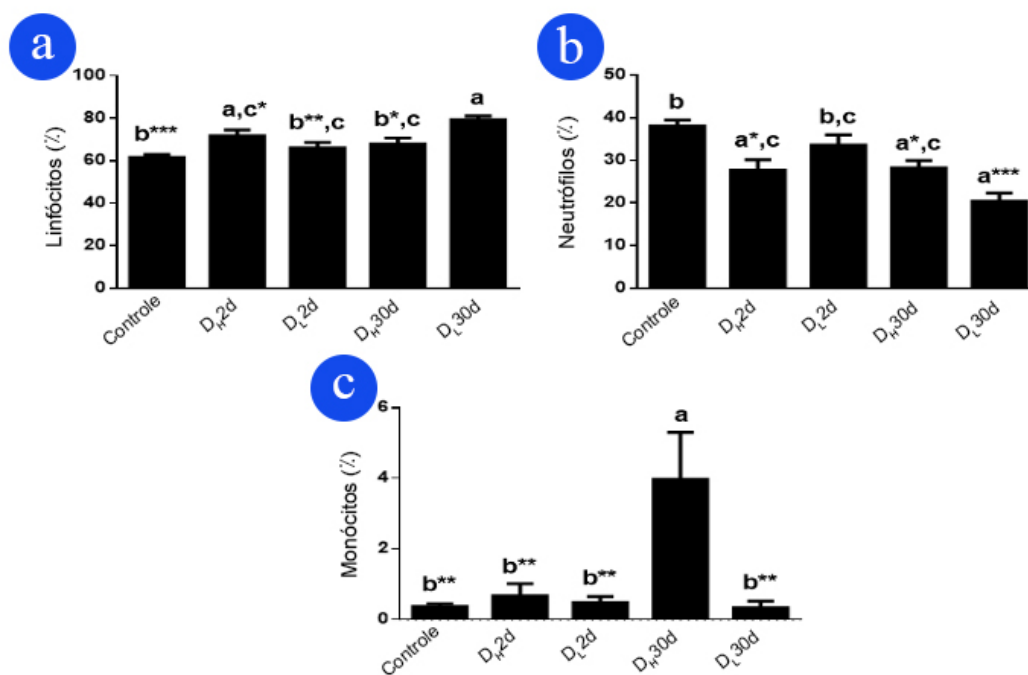


Figura 4. 14. (a) Percentual de linfócitos, (b) percentual de neutrófilos e (c) percentual de monócitos dos camundongos C57BL/6 após 2 e 30 dias da aplicação de **PBAC-Dots** (0,16 e 0,31 mg mL⁻¹). Letras diferentes significam estatísticas diferentes. * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,005. Adaptado com permissão de DOI: 10.1039/d0ra10859f. Copyright © 2021, Royal Society of Chemistry.

Duas possíveis explicações para a resposta imunológica dos camundongos após receberem o tratamento com as nanopartículas são: (i) os **PBAC-Dots** podem interagir com o tumor e estimular o sistema imunológico a responder mais fortemente contra a doença;²⁴⁹ ou (ii) podem interferir na capacidade das células cancerosas de se manterem indetectáveis pelo sistema imunológico.²⁴⁹ Ambas as hipóteses são plausíveis para explicar as lesões no tumor e os aumentos nos percentuais das células de defesa. O conhecimento do mecanismo da sensibilização ao câncer induzido pelos **PBAC-Dots** é vital para expandir sua aplicação em diferentes cânceres e patologias, porém, para isso, seriam necessários estudos mais específicos em nível molecular.

4.5. Conclusões

C-Dots com engenharia de superfície planejada foram sintetizados por método de oxidação química a partir de estrume de vaca. O formato esferoidal das partículas, com tamanho médio de $4,2 \text{ nm} \pm 0,03 \text{ nm}$, conforme determinado por MET de alta resolução, e emissão dependente do comprimento de onda de excitação são característicos da formação de tal material. A incorporação do átomo de boro na superfície dos **C-Dots** foi comprovada por IV e XPS.

Os **PBAC-Dots** revelaram-se uma sonda *light-up* eficiente para detecção de glicose em solução aquosa, tendo sua luminescência aumentada em até 6 vezes na presença do analito. O sistema possui comportamento linear em toda a faixa de concentração de glicose estudada, entre 0 e 1 mol L^{-1} ($R^2 = 0,998$).

A citotoxicidade dos **PBAC-Dots** foi investigada em experimentos *in vitro* com células saudáveis (fibroblastos murino - NIH/3T3) e cancerígenas (melanoma murino - B16F10). As viabilidades celulares permaneceram acima de 60% após incubação com o material por 24 h com concentrações de até $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ das nanopartículas. **PBAC-Dots** também foram bem tolerados por camundongos C57BL/6 em experimento *in vivo*. Isso foi comprovado por exames hematológicos e de bioquímica sérica sem alterações após tratamento com **PBAC-Dots** e pela não identificação de danos que pudessem ter sido causados pelo nanomaterial em lâminas histológicas dos rins, fígado, cérebro, pulmões e baço dos animais.

O sistema fluorescente **PBAC-Dots** também foi avaliado em experimentos de bioimageamento. *In vitro*, as nanopartículas foram visualizadas nos canais verde e vermelho e não adentraram no núcleo de células MCF-7, mas foram localizadas preferencialmente na região mitocondrial. *In vivo*, **PBAC-Dots** foram visualizados em vários pontos dos corpos dos camundongos, com seletividade limitada, inclusive nas regiões dos rins e ureter, o que indica excreção pelo sistema urinário do animal.

Também foi determinado que os **PBAC-Dots** foram capazes de induzir necrose nos tecidos tumorais dos camundongos com melanoma. Além disto, os estudos hematológicos mostraram um aumento significativo de linfócitos que pode estar associado à estimulação imunológica. Esses são indicativos de que os **PBAC-Dots** podem vir a funcionar como um agente imunoterápico sem a necessidade de associação com outros princípios ativos. Este estudo foi publicado na revista *RSC Advances* (DOI: 10.1039/d0ra10859f).²⁵⁰

4.6.Perspectivas

O uso de **PBAC-Dots** como sonda para a detecção de açúcares é promissor, o que poderá ser uma alternativa para os métodos de detecção de glicose no sangue atualmente utilizados, os quais são baseados em enzimas e biosensores.²⁵¹ Entretanto, tal aplicação ainda depende de alguns ensaios como o de seletividade na presença de possíveis interferentes, por exemplo.

A acumulação seletiva dos **PBAC-Dots** na região mitocondrial combinada a suas propriedades luminescentes abre a possibilidade de explorar as nanopartículas como sonda para bioimageamento.

A indução de necrose pelos **PBAC-Dots** em tecidos tumorais indica a possibilidade de que o nanomaterial seja utilizado como agente imunoterápico. Mas isso ainda depende do conhecimento do mecanismo de ação de **PBAC-Dots** contra o melanoma, para expandir sua aplicação para diferentes cânceres e patologias.

Além disto, todas essas aplicações só seriam possíveis em escala comercial se a síntese dos **PBAC-Dots** fosse escalonada. Para isto, provavelmente, seria necessário o abandono de estratégias baseadas em fontes alternativas de carbono e o desenvolvimento de uma rota de síntese comercialmente viável.

Capítulo 5

**Desenvolvimento de Nanoformulação de Anfotericina B para o Tratamento de
Leishmaniose Tegumentar Americana**

5.1. Introdução

A resistência aos antibióticos disponíveis é uma ameaça real e que cresce com a irresponsabilidade em seu uso e com a contínua evolução dos micro-organismos causadores de doenças. A Anfotericina B (AnB) é uma molécula potente, capaz de atuar no tratamento das mais diversas enfermidades. Porém, seu uso é em muito limitado por sua baixa solubilidade em água, o que leva à aglomeração e, conseqüentemente, a efeitos adversos ao ser humano. As propriedades dos estados agregados de AnB também têm efeitos biológicos e propriedades fotofísicas diferentes da molécula livre.²⁵² A AnB e seus agregados têm baixa fotoluminescência, fator este, que dificulta a visualização de seus processos de ação biológica.²⁵² Para contornar estes problemas várias formulações já foram propostas e vêm sendo utilizadas apesar de comumente exibirem alta toxicidade e/ou custo elevados. O desenvolvimento de novas formulações mais viáveis economicamente, mais eficazes tanto do ponto de vista químico como biológico, pode promover não apenas a expansão do uso dessa molécula para o tratamento de outras patologias, mas também melhorar a qualidade de vida dos pacientes que recebem essa substância.

C-Dots possuem propriedades luminescentes atrativas para possíveis aplicações como materiais teragnósticos nanométricos. Por esta razão, **C-Dots** têm enorme potencial para aplicação em diversas áreas, incluindo a farmacêutica. O uso destas partículas como veículo para substâncias utilizadas na Medicina já começou a ser descrito, sendo que a maioria dos trabalhos da área concentram seus esforços no carregamento de substâncias anticancerígenas, em processos típicos de *drug delivery*.

A proposta deste trabalho é a utilização de **C-Dots** como carreadores de AnB. A alta solubilidade dos **C-Dots** faz deles possíveis ferramentas capazes de promover a dispersão dessa molécula em meios aquosos, aumentando assim, a solubilidade do bioativo. O resultado deste efeito é a maior acessibilidade a esse medicamento, o que pode, em princípio, reduzir a dosagem requerida do mesmo sendo observado o mesmo efeito. Além disto, o uso do sistema desenvolvido contra a leishmaniose, num teste pré-clínico em vivo, é aqui descrito.

5.2. Revisão bibliográfica

5.2.1. Anfotericina B

Isolada pela primeira vez em 1955 da bactéria *Streptomyces nodosus*,²⁵³ a AnB é um dos cerca de 200 antimicóticos poliênicos encontrados em fontes naturais já descritos.⁷ A AnB tem sido a droga de escolha para o tratamento de diversas doenças fúngicas, tanto tópicos quanto sistêmicas²⁵⁴ pelos últimos 30 anos, apesar do contínuo surgimento de novos fármacos para este fim.²⁵⁵ Alguns exemplos de doenças tratáveis pela AnB são infecções fúngicas sistêmicas causadas por *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*; e também infecções causadas pelos fungos *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (criptococose, também chamada de doença do pombo) e *Madurella mycetomatis* (micetoma).²⁵⁶ Além disto, patologias causadas por *Trypanosoma cruzi* (doença de Chagas), *Naegleria fowleri* (meningoencefalite amebiana primária)²⁵⁷ e *Balamuthia mandrillaris* (encefalites amebianas)²⁵⁸ também são tratáveis com AnB. A hipótese de usar-se a AnB como antiviral no tratamento da COVID-19 também já foi levantada,²⁵⁹ embora ainda não exista comprovação de que o tratamento seja eficaz.

Contra a leishmaniose, a AnB não é o bioativo de primeira escolha, mas ainda assim é amplamente utilizada, como segunda escolha, especialmente nos casos desta doença em suas formas cutânea e mucocutânea, além de ser uma alternativa consolidada no tratamento de Calazar (leishmaniose visceral).²⁵⁵ Geralmente, a AnB é administrada por via intravenosa àqueles pacientes nos quais a doença mostrou-se resistente aos antimoniais,²⁶⁰ em pacientes com sistemas imunológicos fragilizados pelo HIV ou por tratamentos contra o câncer e em idosos, em grávidas e em pacientes com complicações cardíacas e renais.²⁶¹ A administração por essa via tem o inconveniente de requerer a internação, trazendo altos custos e desconforto ao paciente. Um dos problemas do uso da AnB são os efeitos adversos. 30% das pessoas que recebem tratamento com formulações tradicionais de AnB têm complicações e até falência renal e 80% dos pacientes sofrem com febre, dor de cabeça e vômitos.⁷ A intensidade dos efeitos adversos aumenta com o crescimento da dosagem de AnB, o que é outro fator limitante.²⁵⁵ A dosagem de AnB recomendada pela OMS (Organização Mundial da Saúde) é de 1 a 4 mg kg⁻¹ dia⁻¹ (sendo levada em consideração a massa do paciente em kg), dependendo da formulação, para o tratamento da leishmaniose cutânea.²⁶²

A AnB (Figura 5.1 (a)) é uma molécula de caráter anfótero, ou seja, pode sofrer reações tanto com ácidos como com bases, já que possui grupos amino e ácido carboxílico. Ela também possui uma cadeia poliênica considerável que lhe confere relevância espectroscópica e a cor amarela.²⁶¹ As propriedades espectroscópicas da AnB são advindas do sistema de sete ligações

duplas conjugadas em conformação trans. Esse grupo cromóforo apresenta transições que podem ser melhores visualizadas na Figura 5.1(b).²⁶¹ O diagrama de energia da Figura 5.1(b) é representativo para sistemas contendo, majoritariamente, AnB nas formas de monômeros e dímeros, como é o caso da formulação Fungizone[®] (D-AnB). Apesar do baixo rendimento quântico da AnB,²⁵² sua baixa fluorescência ainda pode ser útil para o desenvolvimento de sistemas teragnósticos e até mesmo para a investigação de seu próprio mecanismo de ação,^{263, 264} apesar das limitações advindas desta baixa emissividade.

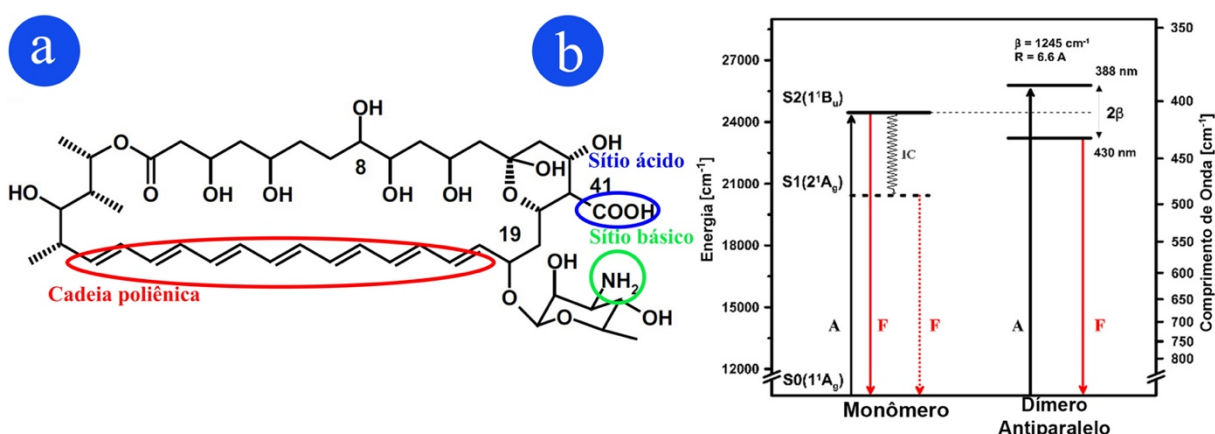


Figura 5. 1. (a) Estrutura química da AnB (b) Diagrama de níveis de energia da AnB. Adaptado com permissão da referência 261. Copyright © 2015, Elsevier B.V.

Uma das características de estruturas poliênicas é a baixa solubilidade em meio aquoso em pH fisiológico. No caso da AnB, sua baixa solubilidade em água é devido à tendência que essa molécula tem de aglomerar-se.²⁶¹ A Tabela 5.1 reúne os valores de solubilidade da AnB em diversos solventes. O resultado disso é a baixa taxa de absorção desses medicamentos pelo sistema gastrointestinal, tornando a administração por via oral inviável.⁷ Outra característica importante desse fármaco é a presença de diferentes estados de agregação em meio aquoso. Sabe-se que os monômeros apresentam uma relativa solubilidade e que os oligômeros e outros agregados são insolúveis.²⁵⁵ Esse comportamento é importante para o entendimento do mecanismo de ação da AnB e depende de diversos fatores tais como a temperatura, o modo de agitação no preparo da solução e, especialmente, da concentração de AnB.²⁵⁵ Algumas pesquisas já demonstraram que a AnB na forma monomérica é tóxica aos fungos, mas é inofensiva às células dos mamíferos. As formas agregadas da AnB, contudo, se mostram não seletivas.²⁶⁵

Tabela 5. 1. Solubilidade da AnB em alguns solventes.⁷

Solvente	Solubilidade (mg L ⁻¹)
Água	<1 (a pH 6–7)
Metanol	2.000
Etanol	500
Clorofórmio	100
Éter de petróleo	10
Dimetilformamida	2,0
Propilenoglicol	1,0
Cicloexano	20

O mecanismo de ação da AnB está relacionado com as diferentes composições das membranas biológicas dos mamíferos e de organismos como fungos, amebas e os protozoários do gênero *Leishmania*. Um importante componente das membranas celulares são os esteróis. Em mamíferos, os esteróis são majoritariamente colesteróis, enquanto nos organismos mais simples acima citados os esteróis presentes em maior quantidade são os ergosteróis.⁷ A AnB é capaz de interagir com as membranas celulares, causando assim, alterações em suas propriedades de permeabilidade, o que resulta em vazamento de constituintes celulares e, conseqüentemente, leva à morte celular.²⁶⁶ Todavia, a AnB tem boa seletividade aos ergosteróis apenas quando na forma monomérica.²⁶⁷ Na forma oligomérica ela passa a aniquilar também as células do hospedeiro²⁵⁵ porque sua seletividade a esteróis fúngicos em relação ao colesterol passa a ser de apenas 10:1.²⁶⁸ É essa afinidade por colesterol da AnB agregada que resulta em sua nefrotoxicidade, segundo alguns pesquisadores,²⁶⁹ já que resulta em morte das células de mamíferos devido ao vazamento de constituintes celulares. Considerando-se que a concentração micelar crítica (CMC) da AnB é de cerca de 0,1 μ M e que a quantidade necessária para o tratamento é de 1 a 4 mg kg⁻¹ dia⁻¹,²⁶² é completamente inviável a terapia usando-se AnB pura, já que, acima da CMC, a AnB começa a se aglomerar.²⁶⁷ Isso significa que seriam necessários entre 540 e 2165 L de solução de AnB pura por dia para o tratamento de um paciente com massa de 50 kg.

Tanto a solubilidade em água quanto a toxicidade da AnB são determinadas por seus sistemas de carreamento, já que a utilização do antimicótico puro é ineficiente. Por isso é extremamente importante conhecer as substâncias que são adicionadas à AnB, bem como,

entender suas interações com ela. Um bom sistema de carreamento é aquele que a AnB só se torna ativa quando atinge os tecidos doentes ou o próprio parasita.⁷ No caso específico da AnB, a formulação deve favorecer a maior proporção possível de formas monoméricas em relação às oligoméricas em meio aquoso. Os principais tipos de formulações existentes da AnB são as poliênicas, os lipossomas, e as sistemas de carreamento em nanopartículas.⁷ Além destas, existem estudos acerca de AnB pura sendo usada após um tratamento térmico, que seria capaz de reduzir sua toxicidade, mantendo sua eficácia, por meio da promoção da formação de superagregados com massa cerca de 100 vezes maior do que a de agregados do D-AnB.²⁵²

A mais importante das formulações poliênicas é a mistura de AnB, tampão fosfato e desoxicolato de sódio, cujo nome comercial é Fungizone® (D-AnB). Essa é a formulação mais utilizada por ter um custo menor do que as outras. O desoxicolato de sódio tem a capacidade de solubilizar uma quantidade cerca de 1000 vezes maior de AnB em água, do que o antimicótico puro, mas forma soluções nas quais a AnB encontra-se quase completamente na forma de agregados.²⁶⁷ Outro fator limitante das formulações micelares em geral é que a quantidade de surfactantes necessária para a completa monomerização da AnB em concentrações suficientemente altas, que viabilizem o tratamento, é próxima à CMC do próprio tensoativo.²⁶⁷ Outra formulação poliênica é a AnB *cochleate*. O sistema de entrega chamado de *cochleate* consiste numa estrutura multicamadas que forma uma camada bilipídica na forma de um espiral. Nesse sistema, a AnB consegue ser absorvida pelo sistema gastrointestinal e depois entrar no sistema circulatório, ou seja, pode ser administrada por via oral. Apesar dessa grande vantagem, a AnB *cochleate* tem baixa estabilidade a temperaturas acima de 4 °C, precipita durante o período de estoque e tem preço de custo elevado.²⁷⁰

A relevância das formulações lipossomais da AnB vem crescendo porque estas mostram-se menos tóxicas do que as tradicionais dispersões micelares e mantêm o grau de eficiência. Os lipossomas consistem em uma ou mais bicamadas concêntricas de fosfolípidios, intercaladas por compartimentos aquosos.²⁵⁵ Das formulações lipossomais, a mais comumente utilizada é a de nome comercial AmBisome®.^{267, 271} Algumas pesquisas sugerem que a redução da toxicidade dessas formulações é resultado de uma mudança nos receptores celulares utilizados para a transferência da AnB para o meio intracelular.²⁶⁷ Outras hipóteses são que apenas as células dos parasitos secretam enzimas lipases, que liberam o fármaco,²⁷² ou ainda que as formulações lipossomais aumentam a proporção de monômeros da AnB.²⁵⁵ Esta menor toxicidade se traduz em diminuição dos casos de disfunção renal e outros efeitos adversos, resultados do tratamento.⁷ A eficácia de uma formulação de AnB depende de sua capacidade

de liberar o antibiótico. Neste aspecto, os lipossomas são menos eficazes do que o Fungizone[®] porque suas afinidades com a AnB são maiores do que a do desoxicolato. Este é um fator limitante, pois os lipossomas chegam a uma dissociação comparável à do Fungizone[®] apenas em baixas concentrações.²⁵⁵ Mesmo assim, o uso de lipossomas é preferível em relação às dispersões micelares, ainda que sua ação seja mais demorada.²⁵⁵ Todavia o alto custo desse medicamento é um entrave à sua utilização.²⁷³ Segundo a Câmara de Regulação do Mercado de Medicamentos (CMED), que é um órgão interministerial responsável pela regulação econômica do mercado brasileiro de medicamentos, em documento publicado no dia 01/02/2021, um frasco de Ambisome[®], que é ressuspenso em 20 mL de água com a quantidade de 50 mg de pó liofilizado, pode chegar a custar R\$ 20.161,74.²⁷⁴

Muitas tentativas foram feitas, desde 1980, de desenvolver-se formulações de AnB com sistemas de carregamento em nanopartículas, a maioria baseada em nanossuspensões e nanopartículas sólidas de lipídios.^{7, 275} Wang e colaboradores²⁷⁶ descreveram três nanoformulações micelares incluindo uma na qual a AnB era encapsulada em policarbonato funcionalizado com PBA, por meio de ligações éster-boronato. Azevedo e colaboradores²⁷⁷ propuseram um sistema de carregamento magnético, no qual a AnB era ligada à superfície de magnetita revestida com uma dupla camada de ácido láurico.²⁷⁷ Outra proposta baseada em nanotecnologia foi desenvolvida por Bianco e colaboradores que propuseram o carregamento de AnB, por meio de sua ligação a nanotubos de carbono.²⁷⁸ Testes *in vitro* contra três espécies de fungos demonstraram que a AnB ligada aos nanotubos é menos tóxica e até mais efetiva que sua forma pura, o que foi atribuído à sua maior solubilidade em meio aquoso.²⁷⁹ Entretanto, não existem estudos sobre o uso dessa formulação na intervenção contra a leishmaniose e os estudos no tratamento de doenças fúngicas ainda não foram concluídos. Pesquisas em direção ao desenvolvimento de novas formulações de AnB são extremamente importantes, não só com vistas ao aumento de sua eficiência e diminuição de sua toxicidade, mas também em busca da diminuição do custo do tratamento com AnB. A Tabela 5.2 resume as vantagens e desvantagens das principais formulações de AnB de cada sistema de carregamento.

Tabela 5. 2. Vantagens e desvantagens de algumas formulações de AnB.

Formulação	Vantagens	Desvantagens	Referências
Fungizone®	Baixo custo, alta eficiência	Alta toxicidade	Kayser ⁷ ; Wasan ²⁷³
AmBisome®	Baixa toxicidade	Alto custo, menor eficiência	Croft ²⁷¹ ; Wasan ²⁷³
Sistema de carreamento em nanotubos de carbono	Baixa toxicidade (comparada ao Fungizone®), alta eficiência	Síntese dispendiosa e cara; uso de catalizadores e surfactantes	Bianco ²⁷⁸

5.2.2. Leishmaniose

O conjunto de doenças infecciosas atualmente conhecidas como leishmanioses atinge pessoas em 88 países tropicais e subtropicais dos continentes asiático, europeu, africano e americano.²⁸⁰ Os primeiros casos foram relatados por Pedro Pizarro, no Peru, em 1571, mas foi apenas no final do século XIX que os agentes etiológicos começaram a ser descobertos.²⁶⁰ Historicamente, os grupos que mais eram infectados pela doença eram aqueles da região rural, entretanto a doença tornou-se democrática e esse perfil endêmico já não é tão demarcado.²⁸⁰

A leishmaniose pode ser visceral (também chamada de Calazar), cutânea ou mucocutânea (essas duas últimas também são chamadas de leishmaniose tegumentar), sendo a primeira delas sua forma mais severa.²⁶⁰ Os sintomas da leishmaniose visceral são a febre e aqueles relacionados à hepatoesplenomegalia, que é a hipertrofia dos órgãos componentes do sistema retículoendotelial e à pancitopenia, que se trata da diminuição da quantidade de hemácias, leucócitos e plaquetas do sangue ao mesmo tempo. Em pacientes já infectados pelo vírus HIV, a Calazar também provoca sintomas envolvendo o sistema gastrointestinal.²⁸¹ Já a manifestação da doença na forma cutânea se dá por meio do aparecimento de ulcerações simples ou múltiplas na pele, podendo causar mutilação e desfiguração no portador da doença.²⁸⁰ No caso da leishmaniose mucocutânea, que é caracterizada pela infecção de regiões contendo membranas mucosas, como nariz e boca, o paciente começa a sentir os efeitos da doença, em média, 3 anos após sofrer leishmaniose cutânea.²⁸¹

De acordo com a OMS 90% dos casos de leishmaniose visceral registrados em 2015 ocorreram em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. No mesmo ano, os dez países com maior ocorrência de leishmaniose cutânea, correspondendo a 87% da incidência da doença, foram: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Peru, Síria, Tunísia e Iêmen. No Brasil os casos de leishmaniose encontram-se espalhados pelas

regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e, mais recentemente, também na região Norte.²⁸⁰ A Figura 5.2(a) é um gráfico do número de casos registrados por região entre os anos 2000 e 2019. Segundo o Ministério da Saúde, em 2019 houve o registro de 15.484 novos casos da forma cutânea da leishmaniose em território brasileiro. O mapa da Figura 5.2(b) detalha a distribuição desses casos. No Distrito Federal foram registrados 13 casos em 2019 e 7 casos em 2020 de leishmaniose tegumentar.²⁸² Em 2021, até a 13ª semana haviam sido registrados oito casos da mesma doença.²⁸³

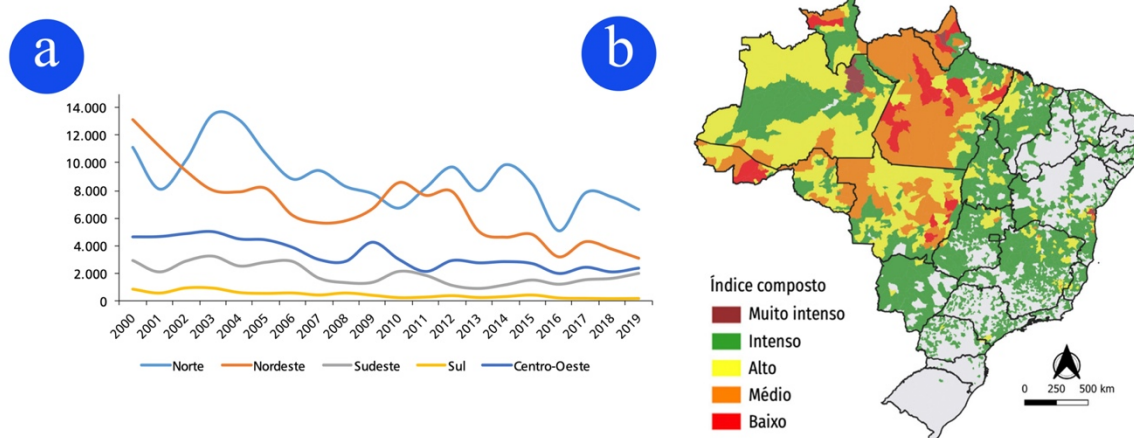


Figura 5. 2. Estratificação de risco da leishmaniose tegumentar no Brasil (a) por região de infecção entre os anos 2000 e 2019 e (b) entre os anos 2017 e 2019.²⁸⁴

Os agentes etiológicos da referida doença são os protozoários do gênero *Leishmania*, de inúmeras espécies. As diferenças entre essas espécies são resultados das diferentes moléculas contidas em suas superfícies.²⁸⁵ Entre as que causam leishmaniose cutânea estão a *Leishmania (V.) braziliensis*, a *Leishmania (V.) guyanensis*, a *Leishmania (V.) naiffi*, a *Leishmania (V.) shawi*, a *Leishmania (V.) lainsoni*, a *Leishmania (L.) amazonenses*, a *Leishmania (L.) mexicana*, a *Leishmania (V.) panamensis* e a *Leishmania pifanoi*. Das espécies causadoras de leishmaniose cutânea, a *L. braziliensis* é a principal responsável pelos casos identificados na América Latina.²⁸⁶ Além disso, pacientes que são acometidos pela infecção causada por essa espécie tem grande propensão ao desenvolvimento de sequelas, como a leishmaniose mucocutânea, por exemplo.²⁸⁷ Já as principais espécies causadoras de leishmaniose visceral são a *Leishmania (L.) donovani* e a *Leishmania infantum*.²⁸⁰ Os vetores da leishmaniose são insetos da ordem Diptera, hematófagos fêmeas, dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, que têm sobrevivência favorecida por climas quentes. Esses insetos tornam-se capazes de transmitir a doença a mamíferos,

inclusive humanos, por ocasião da picada em mamíferos já contaminados (geralmente animais silvestres e cães), quando aspiram macrófagos contendo o protozoário ou mesmo formas amastigotas livres.²⁶⁰

Diz-se que os protozoários do gênero *Leishmania* são organismos digenéticos, por existirem nas formas amastigota e promastigota.²⁸⁸ A Figura 5.3 contém representações da *Leishmania* nas formas promastigota e amastigota.

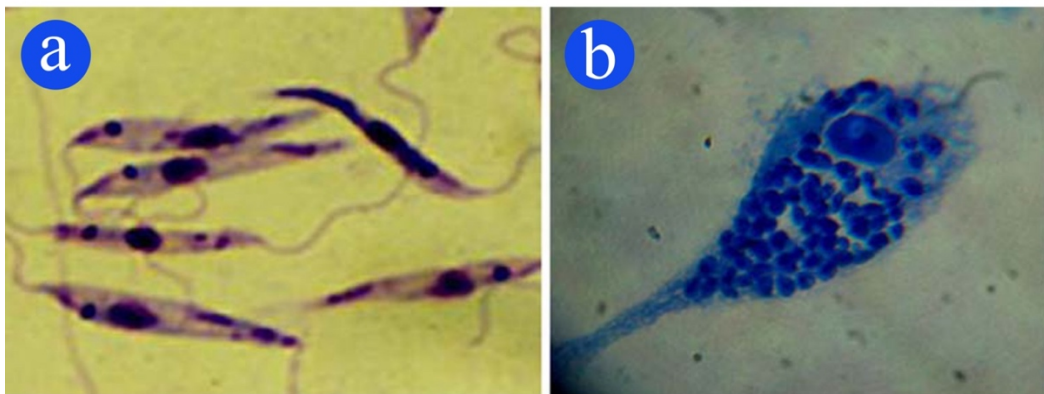
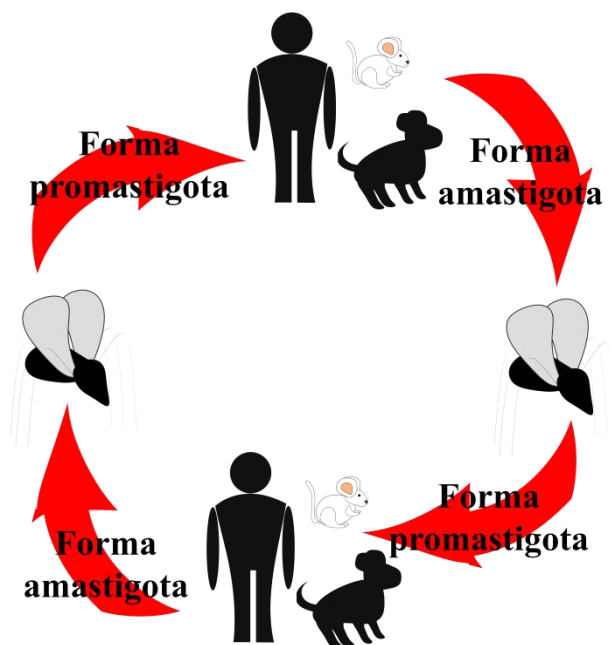


Figura 5. 3. *Leishmania* em suas formas promastigota e amastigota. Adaptado com permissão da referência 280. Copyright © 2015, Elsevier B.V.

A fase promastigota subdivide-se nas fases procíclica e metacíclica.²⁸⁵ Quando os vetores da doença são infectados, os protozoários do gênero *Leishmania* se aloca em seus intestinos na forma amastigota.²⁸⁹ Nesta forma as diversas espécies de *Leishmania* possuem flagelos curtos²⁹⁰ e se reproduzem ao menos uma vez antes de desenvolverem flagelos mais longos,²⁸⁵ tornando-se assim, formas promastigotas.²⁸⁹ Na fase promastigota procíclica a *Leishmania* divide-se rapidamente e não pode ser transmitida aos mamíferos.²⁸⁹ Já na fase promastigota metacíclica, por sua vez, o microorganismo atinge maturidade, cessa suas divisões, adquire receptores que possibilitam sua captação por macrófagos e ganham maior mobilidade devido a seus flagelos maiores.²⁸⁹ É neste estágio que a *Leishmania* migra do intestino médio até as glândulas salivares do inseto, possibilitando a transmissão da leishmaniose aos mamíferos por meio da picada.²⁸⁵ O período entre a contaminação do vetor e a transmissão da leishmaniose aos mamíferos é de 7 a 10 dias.²⁸⁵ Uma vez nos hospedeiros, o parasita, na forma promastigota, tão logo chega à corrente sanguínea, ligar-se-á aos eritrócitos, para em seguida entrarem nos neutrófilos e macrófagos, onde serão destruídos e sobreviverão, respectivamente.²⁹¹ Isso ocorre por causa da diferença de condições, incluindo temperatura e pH, entre o ambiente do vetor e

do hospedeiro, que obriga o parasita a voltar à forma amastigota, com diminuição de seu tamanho e do flagelo.²⁹¹ Dessa forma, os agentes etiológicos serão situados essencialmente em macrófagos, na forma amastigota, ainda que possam ser encontrados em outras células ou na forma extracelular.²⁸⁵ Esse é o ciclo de vida dos protozoários do gênero *Leishmania* (Esquema 5.1).



Esquema 5. 1. Ciclo de vida da *Leishmania*.

O fato de a *Leishmania* residir justamente nos macrófagos, quando em mamíferos, intrigou pesquisadores durante anos, já que a função destas células é eliminar microrganismos. Durante o processo de fagocitose, o protozoário entra nos macrófagos.²⁹¹ Por conseguinte, o protozoário interfere nos mecanismos de sinalização dos macrófagos ao sistema imunológico, que por sua vez não envia macrófagos ativos para a eliminação do microrganismo.²⁹² Dentro da célula hospedeira o microrganismo em questão residirá num compartimento específico chamado de vacúolo parasitário, cujo pH é de 4,7-5,2.²⁸⁵ A *Leishmania* na forma amastigota tem a capacidade de multiplicar-se dentro dos macrófagos e então sair para infectar novas células hospedeiras, estabelecendo assim, uma infecção no mamífero.²⁹¹ Os diversos sintomas causados por essa infecção são resultado das diferentes espécies de *Leishmania* e das diferenças entre os macrófagos, tanto no mesmo indivíduo quanto de um hospedeiro para outro.²⁸⁵

O diagnóstico da leishmaniose, ainda hoje, é extremamente dispendioso. Isso ocorre porque o exame clínico dos sintomas e histórico do paciente não são conclusivos, visto que

doenças como a esquistossomose mansônica associada à bacteriose septicêmica prolongada e outras doenças linfoproliferativas possuem quadro clínico muito parecido com aquele apresentado por portadores de leishmaniose visceral.²⁶⁰ A identificação inequívoca da doença passa por métodos parasitológicos e sorológicos, que nem sempre são disponibilizados pelos estabelecimentos de saúde e que exigem mão-de-obra qualificada.^{260,281} Os métodos parasitológicos são úteis por suas altas especificidades, porém, em pacientes contaminados com o vírus HIV e com leishmaniose, esses testes resultam em positivo em apenas metade dos exames.²⁸¹ No caso dos métodos sorológicos, existem ainda dificuldades relacionadas à sensibilidade e especificidade. Para leishmaniose cutânea, a sensibilidade dessa metodologia está entre 67% e 76%, enquanto para os casos de Calazar, ultrapassa os 90%, mas com alta incidência de falsos positivos.²⁸¹ Métodos baseados em fluorescência também já foram reportados como alternativas para o diagnóstico da leishmaniose. O Teste de anticorpo imunofluorescente indireto é considerado padrão ouro para o diagnóstico de leishmaniose em cachorros.²⁹³ Ashraf e colaboradores,²⁹⁴ propuseram o uso de polímeros dopados com luminol, e o sistema fluorescente foi capaz de marcar *Leishmania* seletivamente.²⁹⁴ Dispositivos baseados em nanopartículas fluorescentes também já foram propostos, mas ainda necessitam de várias etapas até se tornarem métodos padronizados.²⁹⁵

Os medicamentos mais utilizados atualmente no tratamento contra leishmaniose são os antimoniais orgânicos, pentamidina, paromomicina e miltefosine.²⁶⁰ Formulações de AnB também são utilizadas contra essa doença, mas como segunda escolha devido ao alto custo e toxicidade relacionados ao tratamento.²⁵⁵ Outros tratamentos, além do quimioterápico, como a associação das drogas anteriormente citadas com substância que estimulam o sistema imunológico do paciente, estão sendo desenvolvidos.²⁸⁰ Ainda hoje não existem fármacos ativos contra a leishmaniose com baixa toxicidade e com custo economicamente viável. Países economicamente menos favorecidos enfrentam o problema do custo elevado e é justamente nestes países onde se percebe a maioria dos casos desta doença onde a mesma é endêmica.²⁸⁰ Por esse motivo, pesquisas na área de fármacos contra leishmaniose ainda são necessárias.

5.2.3. C-Dots como carreadores de fármacos

A aplicabilidade de nanopartículas de carbono vai além do bioimageamento e do uso como sondas fluorescentes. Isso porque, além do comportamento óptico, os C-Dots possuem ainda boa solubilidade em água, alta permeabilidade em membranas celulares²⁹⁶ e baixa toxicidade. Os valores de solubilidade em água dependem de fatores como método de síntese e estrutura

(passivação) da superfície da nanopartícula. Zhou e colaboradores,¹⁹⁷ por exemplo, reportaram que C-Dots produzidos a partir de cascas de melancia possuem solubilidade de 40 mg mL⁻¹ em água.

A baixa toxicidade de C-Dots já foi comprovada *in vitro* com as linhagens celulares HeLa,²⁹⁷ MCF-7,²⁹⁸ MDA-MB231 (linhagem celular de câncer de mama),²⁹⁸ Vero (linhagem celular epitelial não tumoral de rim de macaco verde africano)²⁹⁹ e L929 (linhagem celular de fibroblasto de camundongo).³⁰⁰ O comportamento de macrófagos J774.1 na presença destas partículas foi investigado por Idris e colaboradores.³⁰¹ Os resultados do grupo apontaram que os C-Dots não causam danos óbvios a essas células. Além disto, os macrófagos têm tendência maior a internalizarem nanopartículas funcionalizadas com grupos contendo boro do que os C-Dots correspondentes não funcionalizados. Quanto à toxicidade *in vivo*, também existem trabalhos que descrevem este efeito. Cui e colaboradores³⁰² relataram estudos de toxicidade aguda, subaguda e de genotoxicidade dos C-Dots produzidos. Segundo esses autores,³⁰² os nanomateriais não induziram nenhum efeito de toxicidade significativa em camundongos Balb/c (dose: 5,1 ou 51 mg kg⁻¹) ou ratos Wistar (doses: 0,2; 2 e 20 mg kg⁻¹). Além disso, o grupo não identificou anormalidades ou lesões nos principais órgãos desses animais nem toxicidade genética. Em outro trabalho publicado por Liu e colaboradores³⁰³ chegou-se à conclusão de que os 20 mg kg⁻¹ de C-Dots que eram aplicados a camundongos Balb/c eram gradualmente excretados por via renal e fecal, ou seja, não havia bioacumulação ou assimilação. Além da comprovada baixa toxicidade dos C-Dots, vale ressaltar que o ser humano tem contato com essas nanopartículas rotineiramente, já que elas podem ser isoladas de alimentos como café,³⁰⁴ cerveja,³⁰⁵ pão,³⁰⁵ açúcar mascavo³⁰⁵ e caramelos de açúcar.³⁰⁶

Por todas as suas características, os C-Dots são materiais de interesse para o carreamento de fármacos.³⁰⁷ A Doxorrubicina (DOX), molécula usualmente prescrita para o tratamento de alguns tipos de linfomas, sarcomas e leucemias, é uma substância cujo carreamento pode ser realizado em nanopartículas de carbono.³⁰⁸ Segundo Tan e colaboradores,³⁰⁹ as nanopartículas conseguem liberar a maioria das unidades de DOX após 6 h de incubação. Liu e colaboradores³¹⁰ também desenvolveram um sistema para carreamento de DOX contendo C-Dots cuja emissão sofria incremento de intensidade após a liberação da molécula, o que permitiria um acompanhamento em tempo real da liberação do fármaco. Outro sistema para carreamento de DOX foi reportado por Wang e colaboradores.³¹¹ A estratégia dos autores foi funcionalizar as superfícies de C-Dots com grupos ácidos aminofenilborônicos a fim de que a β-ciclodextrina fosse adicionada a essa estrutura, que por sua vez possui uma cavidade onde as

unidades de DOX eram encapsuladas. Além disso, Wu e colaboradores³¹² reportaram resultados *in vitro* promissores de C-Dots como veículo de cloridrato de dopamina, uma substância comumente utilizada na terapia de algumas doenças neurológicas. O uso de C-Dots como carreadores de substâncias usadas no tratamento de doenças além do câncer permanece, contudo, um campo fértil para novas ideias e aplicações.

5.3. Objetivos

5.3.1. Objetivo geral

Usar **C-Dots** como nanocarreadores de AnB, de forma a estabilizar a maior quantidade possível dessa molécula em solução aquosa. Essa nova formulação deverá ter toxicidade e custo reduzidos em relação às tradicionais, de forma a expandir as possibilidades de tratamento de doenças negligenciadas tais como a leishmaniose.

5.3.2. Objetivos específicos

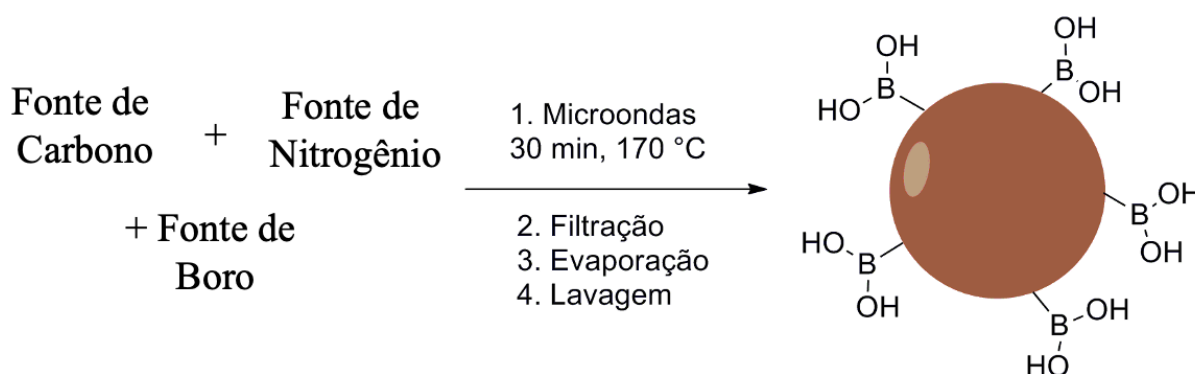
- Obter **C-Dots** com superfícies funcionalizadas com grupos ácido borônico por meio de método sintético barato e reprodutível;
- Caracterizar esses **C-Dots** estrutural e espectroscopicamente e avaliar aspectos relacionados à estabilidade desses nanomateriais;
- Utilizar os **C-Dots** como carreadores de AnB e caracterizar esse sistema;
- Avaliar o incremento de fluorescência da AnB no sistema **AnB@C-Dots**;
- Avaliar a eficácia dessa formulação de AnB contra leishmaniose;
- Investigar a toxicidade associada a essa nova formulação, comparada com as tradicionais Fungizone[®] e AmBisome[®].

5.4. Resultados e discussão

5.4.1. Caracterização dos C-Dots

A produção de C-Dots com superfícies decoradas por grupos ácido borônico pode ser onerosa devido aos elevados preços de substâncias contendo boro e devido à falta de reprodutibilidade das sínteses. Todavia, o uso de fonte de nitrogênio, fonte de carbono e fonte de boro que são produzidos em grandes quantidades permite um custo menor na obtenção destes sistemas nanométricos.

A síntese dos **C-Dots** foi feita em triplicata e eles foram denominados **a**, **b** e **c**. O Esquema 5.2 ilustra o procedimento utilizado. Uma série de caracterizações dos **C-Dots a**, **b** e **c** foi realizada com o objetivo de assegurar que suas propriedades físico-químicas são similares entre si, comprovando assim a reprodutibilidade da rota sintética escolhida. O ponto de fusão determinado dos **C-Dots** foi de $134 \pm 1,6$ °C (1,19%). O desvio padrão relativamente pequeno é um indicativo de que **a**, **b** e **c** apresentam semelhanças estruturais e distribuições de tamanho estreitas.



Esquema 5. 2. Síntese dos C-Dots.

Foi possível a visualização dos **C-Dots** por meio de MET e a Figura 5.4 contém algumas das imagens adquiridas da amostra **a**. A Figura 5.4 (a) mostra que as nanopartículas apresentam morfologia aproximadamente esférica, o que está de acordo com os relatos da literatura referentes a materiais similares.³¹³ Os **C-Dots** apresentaram faixa de distribuição de tamanhos estreita, de 3,3 a 6,7 nm, como ilustrado pelo gráfico da Figura 5.4 (a), e tamanho médio de $4,5 \pm 0,7$ nm. Estes tamanhos nanométricos permitem a utilização do material em meio biológico e contribui para a permeabilidade através de membranas.³¹⁴ É possível visualizar retículos cristalinos na Figura 5.4 (b) e o parâmetro de rede médio de 2,40 Å comprova a cristalinidade

característica de materiais grafiticos,³¹⁵ embora seja bem diferente dos parâmetros de rede obtidos para **C-Dots** sem boro na estrutura.³¹⁶ Esses resultados estão de acordo com a literatura.^{317,318}

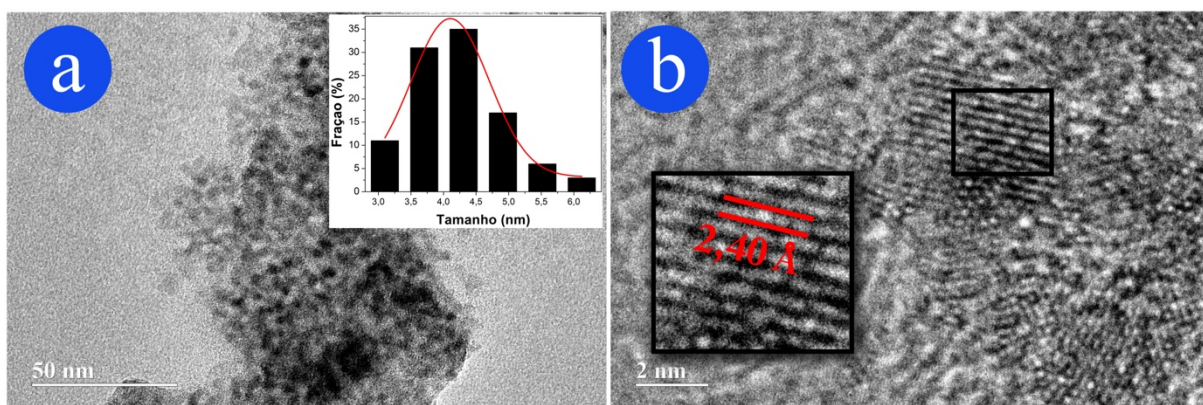


Figura 5. 4. Imagens de MET dos **C-Dots a** (Escala: 50 nm). (a) Inserção: Histograma de distribuição de tamanhos de **a**. (b) Inserção: ênfase nos parâmetros de rede de partícula representativa.

Os grupos funcionais presentes nas superfícies de **a**, **b** e **c** foram analisados por meio de espectroscopia no IV. A Figura 5.5 mostra a sobreposição de três espectros de IV com elevado grau de similaridade entre si, indicando assim, a reprodutibilidade sintética dos nanomateriais. Os sinais centrados em 1350 e 1090 cm^{-1} referem-se aos estiramentos e dobramentos B-O, respectivamente.³¹⁹ Já o sinal em 1030 cm^{-1} é devido aos estiramentos B-O-C.²²⁶ Esses sinais comprovam a presença de boro nas superfícies dos **C-Dots**. O sinal situado em 1580 cm^{-1} é devido ao estiramento C=C,³¹⁹ ou seja, indica a existência da hibridização sp^2 nas estruturas, característica em **C-Dots**. Já a banda de absorção de alta intensidade centrada em 3120 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento das ligações O-H. Isso indica a presença de grupos oxigenados nas superfícies dos **C-Dots** que contribuem para a hidrofiliabilidade necessária a interação fluidica desses materiais em sistemas biológicos.²¹⁷

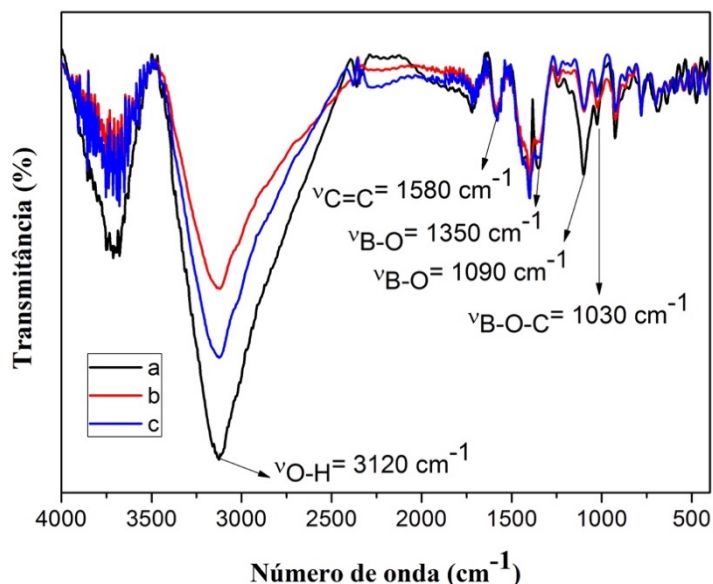


Figura 5. 5. Espectros de IV dos materiais. As curvas em preto, vermelho e azul referem-se às amostras **a**, **b** e **c**, respectivamente.

A presença abundante de grupos funcionais contendo oxigênio e boro nas superfícies dos nanomateriais também é evidenciada por análise elementar e a Tabela 5.3 dispõe os valores percentuais dos constituintes encontrados para os **C-Dots a**, **b** e **c**. Pode-se assumir que o restante da massa das amostras é devido à presença de oxigênio e boro na composição dos **C-Dots**, já que não há outros elementos nos reagentes de partida. Sendo assim, a percentagem média desses elementos combinados nas estruturas dos materiais é de $66,35 \pm 2,29\%$. Os resultados próximos entre si encontrados pelo método de análise elementar para **a**, **b** e **c** corroboram com a reprodutibilidade da síntese. Obteve-se um alto valor de solubilidade em água desses materiais, de $54,8 \text{ mg mL}^{-1}$, a temperatura ambiente.

Tabela 5. 3. Resultados percentuais de análise elementar dos **C-Dots a**, **b** e **c**.

Elemento(s)	Média (%)	Desvio padrão (%)	Desvio padrão relativo (%)
Carbono	19,17	1,46	7,62
Hidrogênio	4,81	0,38	7,90
Nitrogênio	9,67	0,47	4,86
Oxigênio + Boro	66,35	2,29	3,45

Os **C-Dots** tiveram suas propriedades fotofísicas investigadas e os espectros de absorção na região do UV-Vis de **a**, **b** e **c** são mostrados na Figura 5.6. Os três espectros possuem perfis próximos o suficiente para concluir-se, mais uma vez, que a rota de síntese é reprodutível. As

bandas de absorção centradas em 235 e 340 nm são devido às transições $n-\pi^*$ e $\pi-\pi^*$,¹⁹⁶ confirmando a existência de um sistema π conjugado, o que é frequentemente encontrado em C-Dots dopados com boro.^{226,320} A Figura 5.6 também expõe os espectros de emissão sob excitação de 370 nm das três amostras de **C-Dots**, que possuem perfis idênticos. Sob essa excitação os máximos de emissão situam-se por volta de 450 nm, resultando na cor azul, como ilustra o diagrama de cromaticidade inserido na Figura 5.6.

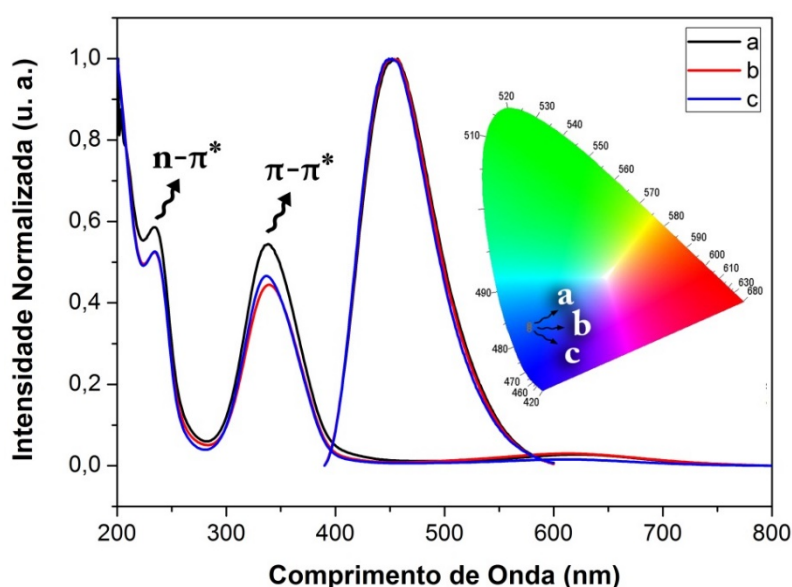


Figura 5. 6. Espectros de absorção na região do UV-Vis e de emissão sob excitação de 370 nm de uma solução contendo $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ dos **C-Dots**. As curvas preta, vermelha e azul correspondem às sínteses **a**, **b** e **c**, respectivamente. Inserção: Diagrama de cromaticidade de **a**, **b** e **c**.

Uma característica óptica marcante de C-Dots é a emissão dependente da excitação. Os espectros obtidos sob comprimentos de onda de excitação variando de 320 a 460 nm dos C-Dots **a** são exibidos na Figura 5.7 (a). Os máximos de emissão deslocam-se de 445 a 540 nm, à medida que a excitação aumenta progressivamente de 320 a 460 nm. O deslocamento batocrômico de 95 nm é resultado da coexistência de **C-Dots** de diferentes tamanhos na amostra e devido à ocorrência de diferentes estados superficiais produzidos por diferentes distribuições de grupos funcionais nas superfícies.³²¹ Os comprimentos de onda que produzem maior intensidade de luminescência estão entre 360 e 390 nm, como ilustra o histograma da Figura 5.7 (b). Esses resultados estão de acordo com os encontrados para materiais similares.³²¹

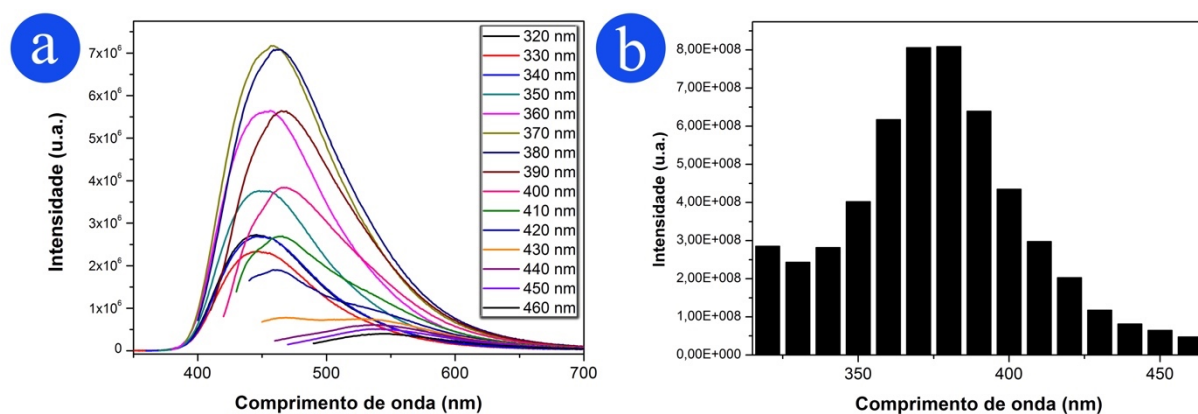


Figura 5. 7. (a) Espectros de emissão de **a** adquiridos a temperatura ambiente sob comprimentos de onda de excitação progressivamente maiores (de 320 nm a 460 nm); (b) Histograma de integrais de emissão em função do comprimento de onda de excitação de **a**. $[\text{C-Dots}] = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$.

Observou-se também que, a exemplo do que acontece com materiais similares,¹⁹¹ os **C-Dots** apresentam luminescência do tipo UC. O espectro de excitação de **a** na região do NIR, adquirido monitorando-se a emissão em 460 nm, encontra-se na Figura 5.8 (a) e mostra que os materiais podem ser mais eficientemente excitados por comprimentos de onda de duas regiões diferentes, entre 770 e 815 nm e por volta de 850 nm. Os espectros de emissão adquiridos sob comprimentos de onda de excitação que variavam de 750 a 900 nm dos **C-Dots a** encontram-se na Figura 5.8 (b). Sob todas as excitações testadas, o material apresentou emissões largas com intensidades máximas entre 460 e 540 nm. O comportamento de emissão UC dependente da excitação já foi descrito para amostras similares.²⁰¹

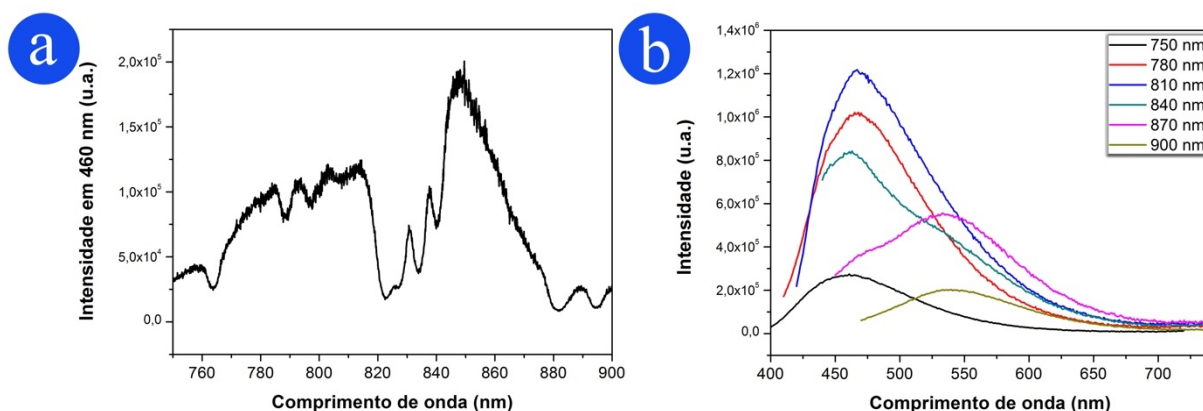


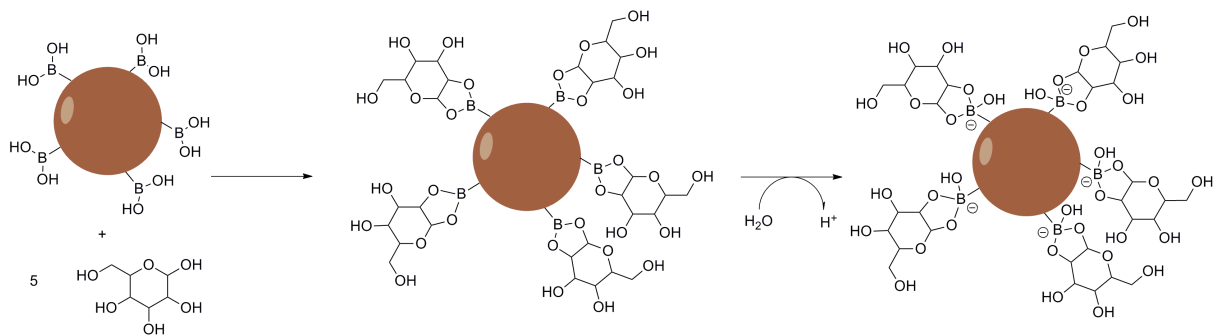
Figura 5. 8. (a) Intensidade do sinal em 460 nm com excitação variando entre 750-900 nm. (b) Espectros de emissão, sob excitações entre 750 e 900 nm de **a** adquiridos a temperatura ambiente. $[\text{C-Dots}] = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$.

Para garantir que os grupos ácidos borônicos permanecem livres nas superfícies dos **C-Dots** com B, para a posterior ligação com o grupo diol da AnB, uma titulação com glicose foi realizada. Sabe-se que os grupos ácidos borônicos possuem alta afinidade por grupos dióis, como os que fazem parte da estrutura da AnB e de açúcares como a glicose. Esses dois grupos formam uma ligação éster-boronato reversível em ambiente aquoso e levemente alcalino, permitindo assim, que se utilize glicose como molécula de estudo para investigação do provável comportamento de complexação dos **C-Dots** com a AnB. O grupo ácido borônico, inicialmente na forma trigonal e eletricamente neutro, após a formação da ligação covalente com a glicose, passa a ser carregado negativamente, conforme ilustra o Esquema 5.3. A combinação entre os efeitos dessa nova conformação eletrônica e o fato de que os **C-Dots** sofrem aglomeração, uma vez que as moléculas de glicose funcionam como pontes ao ligarem-se a mais de uma nanopartícula ao mesmo tempo, resulta em uma diminuição da intensidade da luminescência dos **C-Dots**.³²¹ Por esse motivo, é possível detectar a ocorrência dessas ligações, e até quantificar moléculas contendo o grupo diol usando-se **C-Dots**.³²²

O gráfico de Stern-Volmer obtido para o nanossistema é exibido na Figura 5.9. A medida que a concentração de glicose aumentava, observava-se a diminuição da intensidade de fluorescência dos **C-Dots a** em 470 nm, sob excitação de 370 nm. O processo de supressão da fluorescência de **a** pode ser descrito pela equação de Stern-Volmer (Equação 5.1), sendo que I_0 é a intensidade de emissão dos **C-Dots** em 470 nm, sob excitação de 370 nm, I é a intensidade de emissão dos **C-Dots** na presença de diferentes concentrações de glicose, K_{SV} é a constante de supressão estática e $[Q]$ é a concentração da substância que provoca a supressão, neste caso a glicose. A relação aproximadamente linear entre I_0/I e a concentração de glicose ($R^2 = 0,96$) indica que há apenas um tipo de fluoróforo em solução,³²¹ o que é positivo, já que sugere homogeneidade do comportamento da nanopartícula na presença de grupos dióis.

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV}[Q]$$

Equação 5. 1. Equação de Stern-Volm.



Esquema 5. 3. Formação das ligações éster-boronato entre os **C-Dots** e glicose.

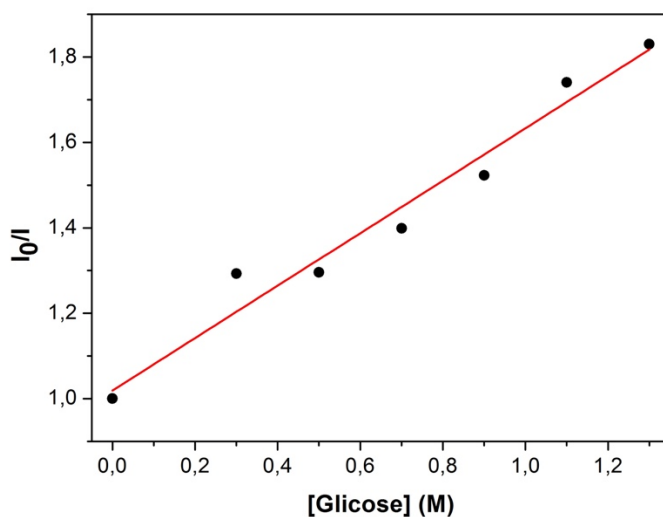


Figura 5. 9. Figura do gráfico de Stern-Volmer obtido para o sistema formado pelos **C-Dots a** e diferentes concentrações de glicose ($R^2 = 0,96$). $[\text{C-Dots}] = 20 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Outro aspecto importante a ser investigado antes da aplicação como carreador de fármacos é a estabilidade dos **C-Dots**, sobretudo em solução. A fotoestabilidade desses nanomateriais sob excitação de 370 e 810 nm foi avaliada e os resultados estão na Figura 5.10 (a). Por pelo menos duas horas, não há decréscimo na intensidade de luminescência dos **C-Dots**, tanto do tipo downconversion (DC) quanto upconversion (UC). Isso indica que não há fotodegradação do material durante esse período. Devido à elevada fotoestabilidade dos **C-Dots** relatadas na literatura científica,^{323,324} este resultado era previsível.

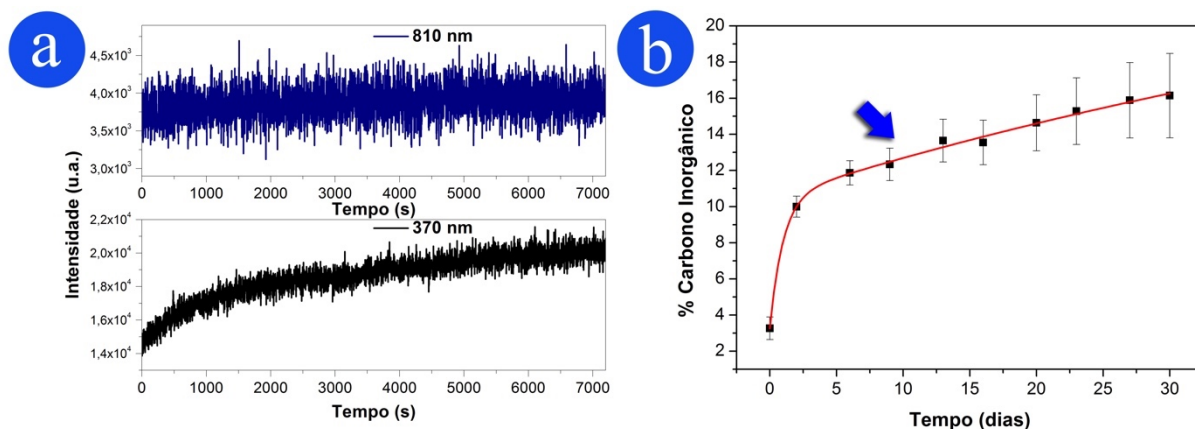


Figura 5. 10. (a) Gráficos de fotoestabilidade dos **C-Dots a**, adquiridos sob excitação de 810 e 370 nm; (b) gráfico de percentagem de carbono inorgânico versus tempo transcorrido do preparo das soluções dos **C-Dots a, b e c**. $[\text{C-Dots}] = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$.

Soluções aquosas dos **C-Dots a, b e c** foram preparadas e acompanhadas durante 30 dias por meio de análises de COT (carbono orgânico total). A quantidade de carbono inorgânico dissolvido está intimamente relacionada ao pH de determinada solução,³²⁵ que por sua vez deve ser controlado para que haja a ligação entre os grupos ácido borônico e AnB. O que é notório na Figura 5.10 (b) é que durante os primeiros dez dias há um aumento acelerado da quantidade de carbono inorgânico em solução. No período entre dez e vinte dias esta velocidade diminui e o desvio padrão não é tão alto a ponto de gerar preocupações acerca da homogeneidade de condições em solução de **a, b e c**. Por essa razão, optou-se por utilizar soluções de **C-Dots** preparadas com dez dias de antecedência para o preparo de **AnB@C-Dots**, embora tenha sido comprovado que a ligação éster-boronato também ocorre entre a AnB e os **C-Dots** em solução recém-preparada, de forma que esperar os dez dias não é essencial.

A Figura 5.11 exibe espectros de emissão dos **C-Dots a** adquiridos no mesmo dia em que a solução aquosa foi preparada e após 10 dias de preparo. Observa-se uma diminuição da intensidade de luminescência após os 10 dias, provavelmente devido a processos oxidativos ocorridos nas superfícies dos **C-Dots**.³²⁶ A oxidação da superfície do material diminui a quantidade de defeitos de superfícies das nanopartículas de carbono, sendo que estes defeitos também estão relacionados com o processo de luminescência dos **C-Dots** devido ao trapeamento eletrônico que ocorre nos mesmos.³²⁶ Para a aplicação pretendida este efeito não é prejudicial, já que as mudanças observadas não resultam em espécies tóxicas.

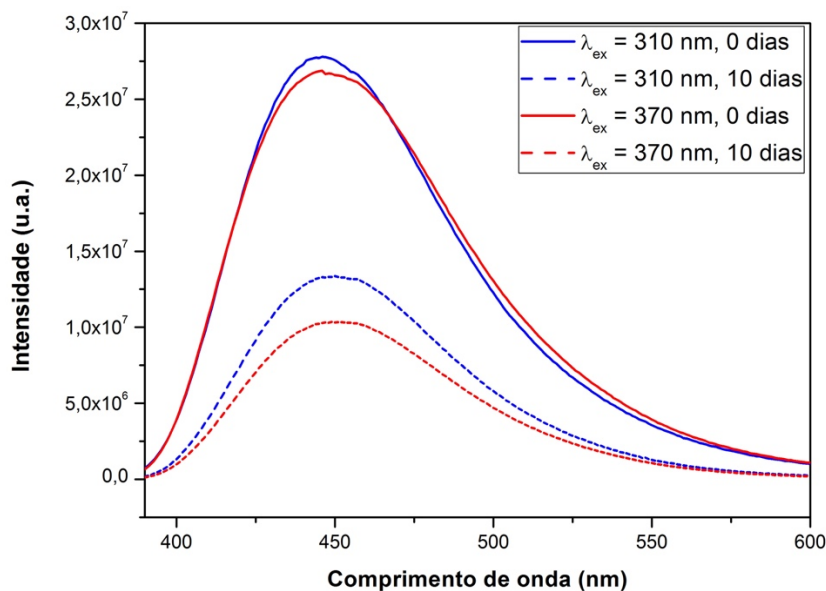


Figura 5. 11. Espectros de emissão de soluções aquosas de **a** preparadas a 0 e 10 dias, adquiridos a temperatura ambiente sob os comprimentos de onda de excitação de 310 e 370 nm. [C-Dots] = 0,5 mg mL⁻¹.

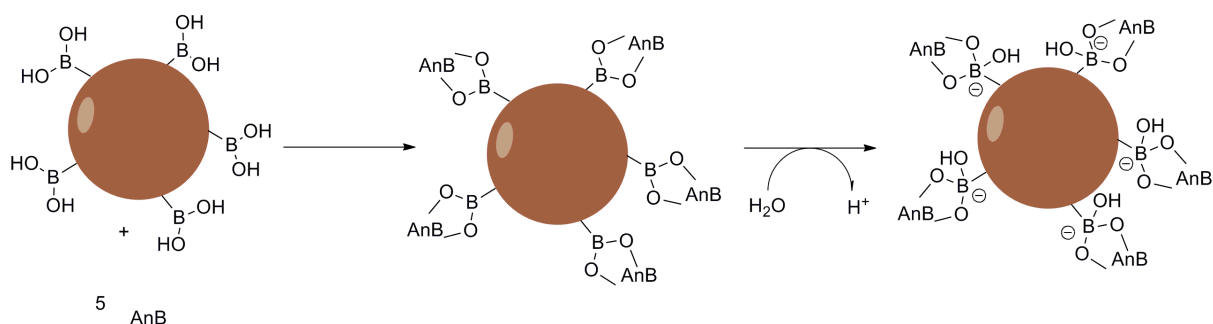
O método de síntese de **C-Dots** aqui apresentado serviu como base para a criação de um Mínimo Produto Viável (MVP) chamado de Arbolina[®] que viabilizou a criação da empresa startup KrillTech Nanotecnologia Agro no ano de 2019, e cuja Fábrica é operante desde 2020 em Dias D’Avila, Bahia.

5.4.2. Caracterização do sistema AnB@C-Dots

Uma vez comprovado que os **C-Dots** podem ser sintetizados por método reprodutível, que esses nanomateriais possuem tamanho adequado para aplicações biológicas e que os grupos ácidos borônicos ficam disponíveis para ligação com a AnB, o sistema foi preparado e caracterizado (Esquema 5.4).

Uma série de soluções de **C-Dots** e AnB em diferentes concentrações foram preparadas e espectros de emissão foram adquiridos sob excitação de 370 nm, afim de assegurar que as ligações éster-boronato eram formadas entre os grupos do ácido borônico dos **C-Dots** com os grupos dióis das moléculas de AnB, assim como ocorre entre os **C-Dots** e glicose. O Esquema 5.4 ilustra a formação do sistema **AnB@C-Dots**. A supressão da luminescência dos **C-Dots** na presença de AnB, que pode ser observada nos espectros da Figura 5.12 (a), é indicativo da formação da ligação entre carreador e fármaco de forma similar a que foi observada entre os **C-Dots** e a glicose. Soluções de **C-Dots** na presença de AnB em concentrações acima de 1 mg mL⁻¹ do bioativo possuem espectros idênticos ao da solução contendo 1 mg mL⁻¹ de fármaco

em **C-Dots**. Além disto, nestas soluções, era visível a precipitação de AnB. Isso acontece, provavelmente, devido ao limite de solubilidade da AnB em DMSO, e não devido a esgotamento dos carreadores disponíveis em solução para ligação com o fármaco. Por esse motivo, 1 mg mL^{-1} foi a concentração de AnB fixada para a formulação **AnB@C-Dots**. Essa concentração de AnB em solução aquosa é considerada alta.³²⁷ Também vale ressaltar que a dissolução de AnB em DMSO é uma estratégia recorrente no preparo de formulações desse fármaco.³²⁷



Esquema 5. 4. Formação das ligações éster-boronato entre **C-Dots** e AnB – sistema **AnB@C-Dots**.

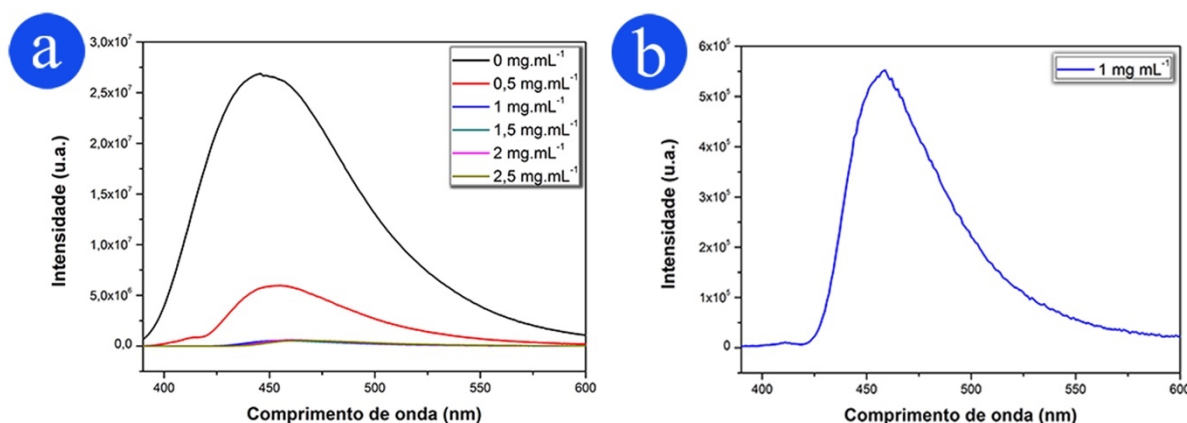


Figura 5. 12. (a) Espectros de emissão obtidos sob excitação de 370 nm, a temperatura ambiente, para o sistema formado pelos **C-Dots** e diferentes concentrações de AnB e (b) espectro de emissão de **AnB@C-Dots**. [**C-Dots**] = 1 mg mL^{-1} .

Mesmo com a supressão da luminescência dos **C-Dots** provocada pela ligação com AnB, o sistema **AnB@C-Dots** possui um espectro de emissão com alta intensidade de luminescência (Figura 5.12 (b)) e, portanto, permite uma melhor visualização em ensaios que demandam emissão de luz. Um exemplo do uso de **C-Dots** associados a AnB para a detecção

de agentes patológicos foi descrito por Qiao e colaboradores.³²⁸ Nesse exemplo o grupo conseguiu detectar *Candida albicans* com mínima interferência de amostras complexas. Investigações do mecanismo de ação da AnB usando sua própria fluorescência foram publicados por Das²⁶³ e Gruszecki.²⁶⁴ O primeiro²⁶³ investigou a permeabilidade da AnB através de membranas contendo ergosterol ou colesterol. Já o segundo,²⁶⁴ conseguiu relacionar a formação de estados agregados da AnB com os efeitos tóxicos de diversos sistemas contendo o fármaco. As propriedades fotofísicas do sistema **AnB@C-Dots** o torna um possível candidato a sensor luminescente tanto para o desenvolvimento de dispositivos para o diagnóstico de doenças como a leishmaniose, quanto para a investigação dos mecanismos de ação da AnB por técnicas envolvendo fluorescência.

Uma das formas de investigar os estados de agregação da AnB é por meio de espectroscopia de absorção molecular na região do UV-Vis. Os espectros de absorção da AnB em seu estado agregado, em água, são marcados pelos sinais em 420 nm, 385 nm, 360 nm e por um sinal intenso em 340 nm.³²⁹ Por outro lado, os espectros de absorção da AnB dispersa em DMSO possuem bandas centradas em 408 nm, 385 nm e 365 nm, características de sua forma monomérica.³²⁹ Os espectros de AnB em dispersões micelares, como é o caso do D-AnB, são bastante semelhantes ao de AnB dispersa em DMSO, já que estas dispersões também contêm o antimicótico na forma monomérica.³²⁹ A Figura 5.13 exibe os espectros de absorção da D-AnB, da AnB pura dispersa em DMSO e da diferença entre os sinais dos sistemas **AnB@C-Dots** e **C-Dots** [**AnB@C-Dots** – **C-Dots**] para efeitos de comparação. Ambos os espectros possuem os três sinais característicos da AnB na forma monomérica (em 408 nm, 385 nm e 365 nm). O sinal mais intenso, em 328 nm, no espectro de D-AnB é atribuído à AnB agregada.²⁵² É amplamente aceito na literatura que essa banda aparece devido ao deslocamento hipsocrômico do sinal, originalmente, em 340 nm (em espectros de AnB pura, em água) devido à interação do desoxicolato com os agregados de AnB, de forma a aproximar os monômeros.³³⁰ No espectro [**AnB@C-Dots** – **C-Dots**] um sinal similar aparece, também por volta de 328 nm, porém com intensidade bem menor. Isso é um indicativo de que a agregação de AnB no sistema **AnB@C-Dots** é menor do que a que ocorre na formulação D-AnB.

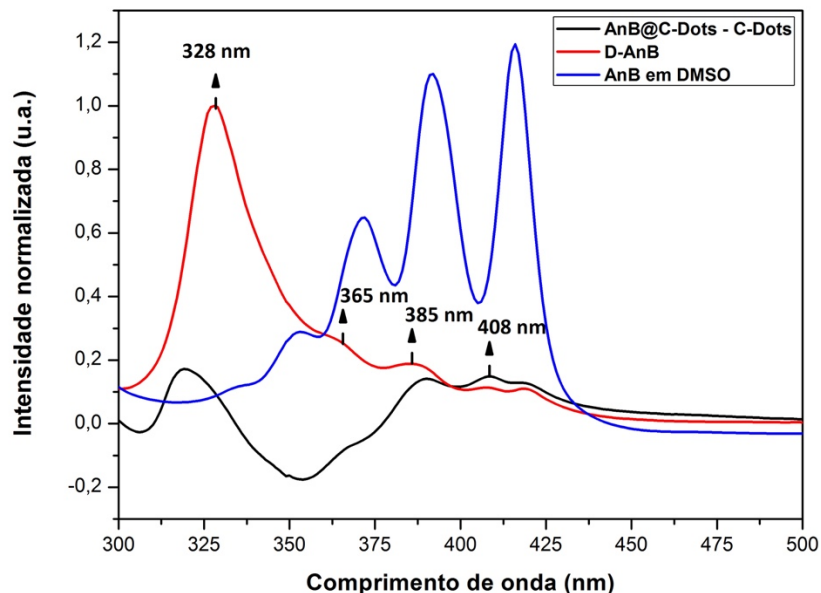


Figura 5. 13. Espectro de absorção na região do UV-Vis de [AnB@C-Dots - C-Dots], D-AnB e AnB pura em DMSO (linhas azul, vermelha e preta, respectivamente).

As imagens de MET (Figura 5.14) do sistema **AnB@C-Dots** que foi utilizado no experimento *in vivo* apresentam perfis próximos das imagens dos **C-Dots** puros (Figura 5.4). Isso dá suporte à localização das moléculas de AnB na superfície das nanopartículas, ligadas à porção de carbono orgânico, que, portanto, não pode ser visualizada nas análises de microscopia. Os tamanhos dos **C-Dots** visualizados na Figura 5.14 (a) distribuem-se entre 2,6-5,9 nm, com média de $4,1 \pm 0,7$ nm. Esses valores são próximos aos encontrados na Figura 5.4 (a).

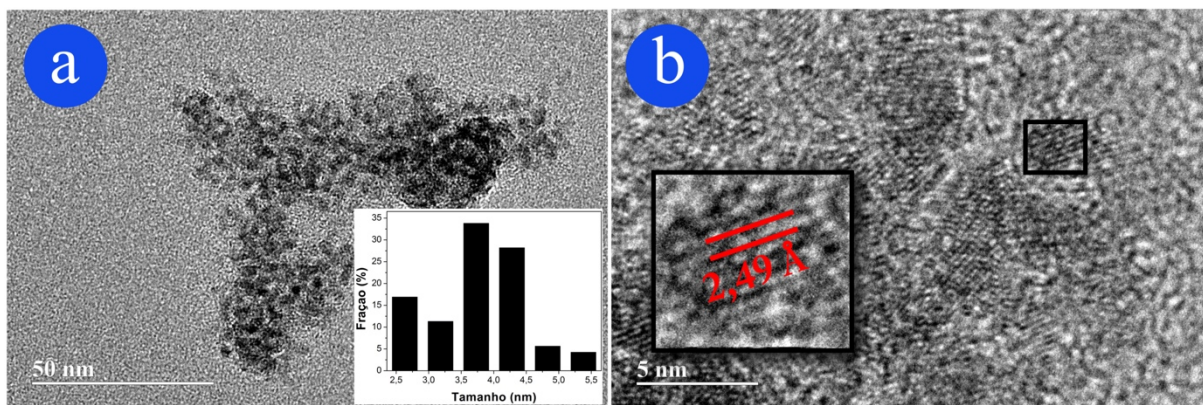


Figura 5. 14. Imagens de MET do sistema **AnB@C-Dots**. (a) Inserção: Histograma de distribuição de tamanhos dos **C-Dots**. (b) Inserção: ênfase nos parâmetros de rede de partícula representativa.

5.4.3. Avaliação da eficácia e da toxicidade da AnB@C-Dots contra *Leishmania* em vivo

Optou-se por um ensaio em vivo porque o objeto deste estudo é a formulação de um fármaco conhecido e amplamente utilizado e com eficiência comprovada no tratamento de leishmaniose cutânea causada pelo parasito *L. braziliensis*.³³¹ A Tabela 5.4 lista as principais características dos animais usados no ensaio pré-clínico. A dosagem de 2 mg kg⁻¹ dia⁻¹ foi utilizada em estudos similares,^{331,332,333} e ao final do esquema terapêutico fornece o total de 20 mg kg⁻¹, que é uma dose de formulações de AnB comumente avaliada em experimentos semelhantes (Tabela 5.5).^{332,334} Essa dosagem corresponde a 1,5 mg kg⁻¹ para um ser humano de 70 kg levando-se em consideração as diferenças entre as taxas metabólicas de humanos e animais, totalizando assim, 105 mg. Para se iniciar os estudos em humanos, essa dosagem ainda deve ser dividida por 10, resultando em 10,5 mg.³³⁵ Esse é um estudo de toxicidade de doses repetidas adaptado para avaliar simultaneamente a eficácia da nova formulação.^{336,337} Dez dias de tratamento é um período compatível com o ciclo de vida da *L. braziliensis*,³³⁸ e por isso foi o tempo adotado para esse estudo, assim como, para ensaios afins.³³² A espécie *L. braziliensis* é a principal responsável pelos casos de leishmanioses cutânea e mucocutânea na América do Sul e por isso foi a escolhida para a infecção dos animais.³³⁹

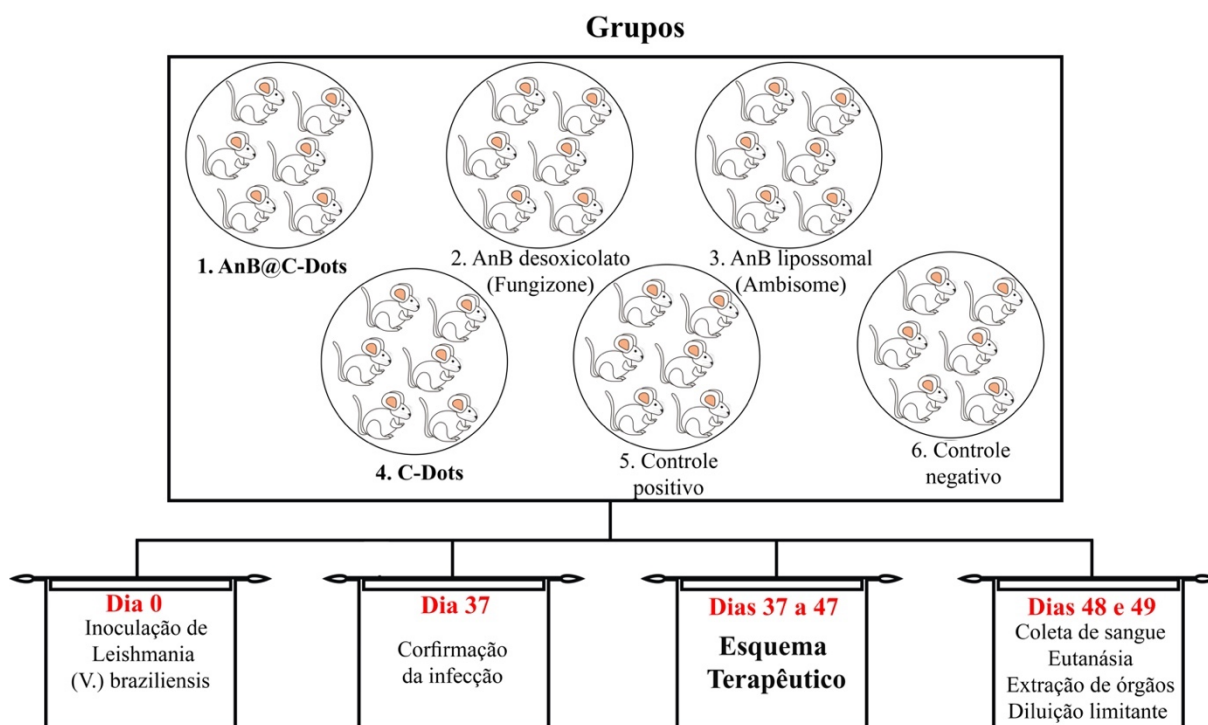
Tabela 5. 4. Principais características dos animais usados no ensaio pré-clínico de eficácia e toxicidade da AnB@C-Dots.

Características	
Linhagem	Balb/c
Sexo	Fêmeas
Idade	≈ 90 dias
Peso médio	26,8 ± 3,1 g

Tabela 5. 5. Tratamento e doses utilizadas nos grupos de estudo, sendo que os grupos 5 e 6 funcionaram como controles positivo e negativo, respectivamente.

Grupo	Infectado	Tratamento	Dose diária (dia ⁻¹ mg kg ⁻¹)	Dose acumulada (mg kg ⁻¹)
1	Sim	AnB@C-Dots	2	20
2	Sim	D-AnB	2	20
3	Sim	AmBisome [®]	2	20
4	Sim	C-Dots	1	10
5	Sim	Soro fisiológico (0,9%)	–	–
6	Não	Soro fisiológico (0,9%)	–	–

Ao longo do esquema terapêutico e no final, no momento da eutanásia, alguns critérios de eficácia e de toxicidade foram avaliados com o objetivo de comparar a formulação **AnB@C-Dots** (grupo 1) com as duas formulações mais recorrentemente utilizadas, Fungizone® (D-AnB) e AmBisome® (grupos 2 e 3, respectivamente). Sabe-se que a formulação Fungizone® mantém a eficiência da AnB contra a *Leishmania* e que possui baixo custo, mas que tem alta toxicidade.²⁶⁷ Por outro lado, a AmBisome® possui boa eficiência e menor toxicidade, porém tem um custo relativamente elevado.²⁶⁷ Espera-se que a **AnB@C-Dots**, que tem potencial para ser produzida a baixo preço, mantenha a eficácia da AnB e seja pouco tóxica aos camundongos. O grupo 4 recebeu a quantidade de **C-Dots** equivalente à recebida pelo grupo 1, para a análise do efeito dessas nanopartículas nos animais, isoladamente. Foi administrado soro fisiológico 0,9% nos animais dos grupos 5 e 6 (para evitar vieses relacionados à diminuição da imunidade dos animais devido à manipulação), que funcionaram como controles positivo e negativo, respectivamente. O Esquema 5.6 ilustra o procedimento realizado.



Esquema 5. 5. Experimento em vivo para a avaliação de eficácia e toxicidade da formulação **AnB@C-Dots**.

Crítérios parasitológicos foram usados para confirmar a infecção dos animais dos grupos 1 a 5 antes do início do esquema terapêutico e para atestar que o grupo 6 não estava infectado com leishmaniose. A Tabela 5.6 apresenta os resultados das culturas e das lâminas de extensão

para pesquisa de amastigotas. As culturas comprovaram que os camundongos dos grupos de 1 a 5 estavam infectados e que de fato o grupo 6 podia funcionar como controle negativo. Não foi possível confirmar, contudo, a infecção por meio de todas as lâminas de extensão dos animais infectados, provavelmente devido a dificuldades relacionadas à fixação e coloração das lâminas, que tornam a pesquisa por formas amastigotas em lâmina de extensão uma técnica de baixa sensibilidade.³⁴⁰

Tabela 5. 6. Confirmação da infecção dos animais, antes do tratamento, por pesquisa direta do parasita em culturas e lâminas de extensão.

Grupo	Culturas		Extensão	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
1. AnB@C-Dots	6	0	3	3
2.D-AnB	6	0	6	0
3.AmBisome [®]	6	0	4	2
4. C-Dots	6	0	3	3
5.Controle Positivo	6	0	4	2
6.Controle Negativo	0	6	0	6

Ao longo do experimento nenhum dos animais apresentou comportamento anormal ou foi a óbito causado pelos tratamentos. Eles permaneceram com a pelagem normal no decorrer do esquema terapêutico, o que é um sinal de boa saúde (Figura 5.15 (a)). Os animais dos diferentes grupos apresentaram evoluções do peso corporal próximas entre si, como mostra o gráfico da Figura 5.15 (b). Além disto, não houveram alterações óbvias na morfologia dos órgãos que pudessem ser observadas no momento da dissecação. Houve a perda de dois animais, um do grupo 2 (D-AnB) e outro do grupo 4 (**C-Dots**), no momento da anestesia realizada na confirmação de infecção do décimo dia.

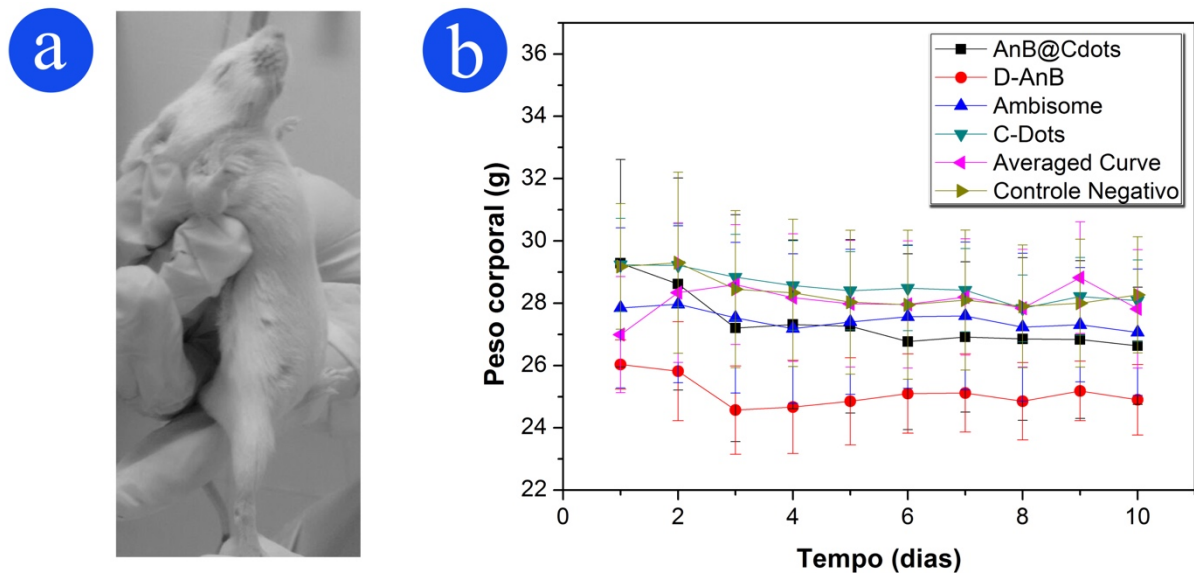


Figura 5. 15. (a) Fotografia de um dos camundongos; (b) Gráfico de evolução do peso corporal dos animais ao longo do esquema terapêutico.

5.4.3.1. Critérios para a avaliação da eficácia

Um dos sintomas da leishmaniose cutânea é o desenvolvimento lesões cutâneas. A medida desta lesão é um dos fatores recorrentemente analisados em experimentos envolvendo essa doença.³³² Além disto, os critérios clínicos são fatores relevantes para o diagnóstico e para avaliar se houve a cura da leishmaniose cutânea em seres humanos.^{341,342} A Figura 5.16 exibe um gráfico das médias dos diâmetros das patas direitas dos camundongos medidos em diferentes momentos. Entretanto, o desenho experimental mostrou-se ineficiente para a avaliação desse parâmetro. Alguns animais haviam desenvolvido lesão na pata inoculada devido à leishmaniose, imediatamente antes do início do esquema terapêutico, como mostra a imagem inserida na Figura 5.16. Todavia, o teste ANOVA revelou que não existia diferença estatística significativa entre o diâmetro da pata direita dos animais dos diferentes grupos antes do tratamento ($p = 0,109$). Ou seja, não houve aumento significativo de infiltrado celular nas patas dos animais infectados em relação aos do grupo controle negativo. Por esse motivo, não foi possível a comparação dos diâmetros das patas dos animais antes do tratamento com os diâmetros após o tratamento.

Estes resultados podem ser explicados pelo estudo de Barral e colaboradores,³³⁹ no qual são constatadas manifestações clínicas diferentes em camundongos Balb/c infectados por cepas de *Leishmania (v.) braziliensis* geneticamente distintas. Segundo esses autores, camundongos da linhagem Balb/c desenvolvem lesão não ulcerada e não necrótica, quando infectados por cepa BA788 de *L. braziliensis*, entre o décimo e vigésimo dia após a infecção, e depois esta

lesão começa a regredir espontaneamente. Os camundongos contaminados por outra cepa de *L. braziliensis*, a H3227, permaneceram livres de lesão durante os 30 dias de experimento. Não foram encontrados trabalhos que descrevam o desenvolvimento de lesões em camundongos balb/c infectados pela cepa utilizada neste trabalho, a IOC-L 2483, mas um fenômeno similar ao observado por Barral e colaboradores pode ter acontecido. Outro motivo que pode ter comprometido a diferenciação entre os diâmetros das patas dos camundongos dos diferentes grupos é o fato de o período do tratamento ter sido curto. Uma vez que o principal critério de avaliação é o parasitológico (presença e número de parasitos) e que não há correlação entre a carga parasitária e o desenvolvimento ou não de lesão³³⁹ o experimento não foi comprometido.

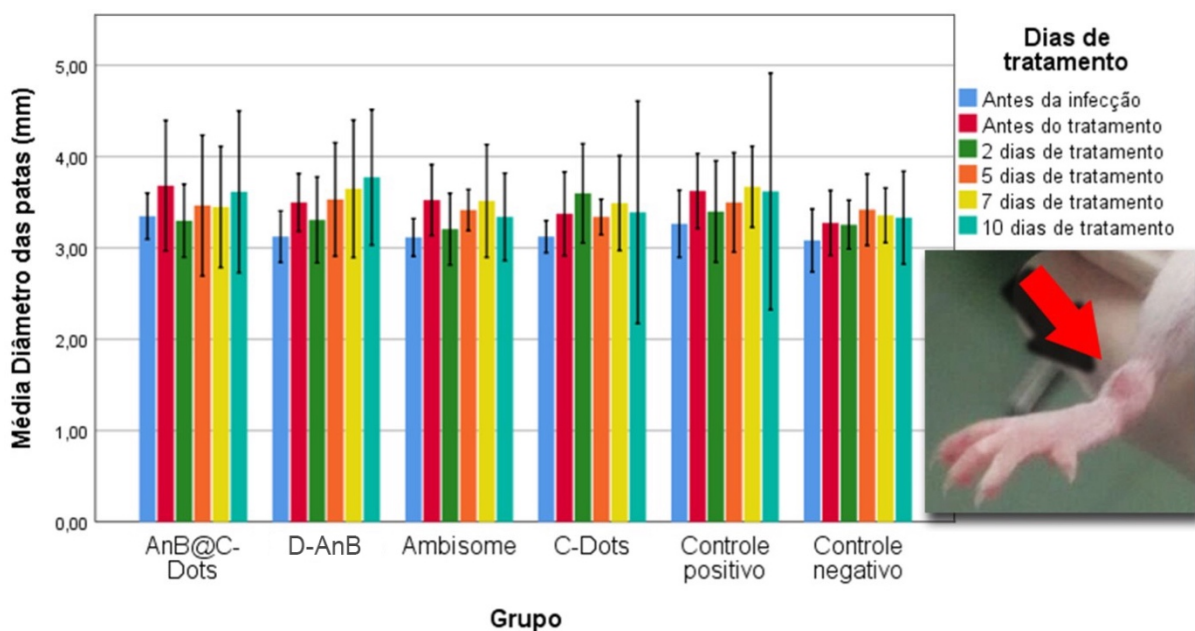


Figura 5. 16. Diâmetro das patas dos animais antes da infecção, imediatamente antes do tratamento (0 dias) e após 2,5,7 e 10 dias de tratamento.

Ensaio foram realizados para assegurar que o sistema **AnB@C-Dots** mantinha a eficiência da AnB. Foram eles: quantificação de parasitos pelo método de diluição limitante e método colorimétrico com uso de MTT.

O ensaio de diluição limitante extrema é uma ferramenta que em geral baseia-se no pressuposto de que uma população biologicamente ativa em cada cultura comporta-se de acordo com a distribuição de Poisson e que uma única célula biologicamente ativa é o suficiente para que a cultura seja considerada positiva.⁷² Esse método é considerado padrão ouro na quantificação de parasitos no modelo animal de infecção por *Leishmania*.³⁴³

A Tabela 5.7 reúne os resultados obtidos para o ensaio, feito de acordo com a metodologia proposta por Titus e colaboradores.⁷³ O teste de qualidade de ajuste confirmou que os dados seguem uma distribuição de Poisson ($\beta = 1$). O teste geral para diferenças nas frequências entre qualquer um dos grupos revelou que existe pelo menos um grupo com diferença estatística significativa dos demais ($p = 0$). As letras diferentes na Tabela 5.7 indicam as diferenças estatísticas. O grupo que recebeu **AnB@C-Dots** não mostrou diferença estatística, em número de parasitos em relação ao grupo que fez uso de **C-Dots** e o grupo controle positivo. Estes são os grupos que apresentaram menor número de parasitos por mL de cultura, com exceção do controle negativo (que não foi inoculado com *Leishmanias*). O valor obtido para o grupo que recebeu a **AnB@C-Dots**, de 14.880 parasitos por mL de cultura, é significativamente menor do que os encontrados para os grupos tratados com as formulações tradicionais, D-AnB e AmBisome (11.961.720 e 57.505 parasitos mL⁻¹, respectivamente). O restante dos grupos são todos diferentes entre si. Vale ressaltar que a pesagem da pata no momento do preparo das placas permitiria uma análise mais precisa, porque possibilitaria que os resultados fossem dados em quantidade de parasitos por grama de tecido.^{344,345}

Tabela 5. 7. Número de parasitos por mL da cultura preparada a partir dos tecidos das patas de dois animais por grupo (Limites de confiança de 95%).

Quantidade de parasitos por mL de cultura	
AnB@C-Dots	14.880 (7.790 – 28.430) ^{a,d}
D-AnB	11.961.720 (6.648.935 – 20.408.165) ^b
AmBisome [®]	57.505 (29.735 – 111.180) ^c
C-Dots	5.650 (2.915 – 10.955) ^a
Controle Positivo	17.965 (9.150 – 35.270) ^d
Controle Negativo	0 ^e

Um experimento de MTT foi realizado para avaliar a viabilidade celular dos parasitos presentes nas placas dos diferentes grupos e os resultados estão resumidos no gráfico de barras da Figura 5.17. O ensaio foi realizado após cinco dias do preparo das placas a partir das patas infectadas dos animais, período esse no qual as condições de armazenamento favoreciam a sobrevivência do protozoário. Esse tempo era suficiente para que as eventuais formas amastigotas se tornassem promastigotas. O teste de Kruskal-Wallis evidenciou que os valores de viabilidade celular dos vários grupos não são iguais estatisticamente ($p = 0,000$). O grupo que recebeu a **AnB@C-Dots** revelou-se igual aos grupos Ambisome[®] e controle negativo

(viabilidade celular abaixo de 35%) e diferente dos demais. Por outro lado, os grupos D-AnB, C-Dots e controle positivo mostraram-se iguais entre si, ou seja, estatisticamente todos com viabilidade celular acima de 75%. Esse resultado sugere que a **AnB@C-Dots** foi eficaz no tratamento da leishmaniose causada pelo parasito *L. braziliensis* e que os **C-Dots** não tem ação contra a doença, conforme o esperado. O fato de o grupo tratado com D-AnB ter apresentado viabilidade celular semelhante à do controle positivo é surpreendente, e pode ser devido uma ação inferior da D-AnB em relação ao Fungizone[®] comercial, apesar de possuírem composições equivalentes. Outra possível explicação seria que, em pelo menos um dos animais, houve resistência à D-AnB.

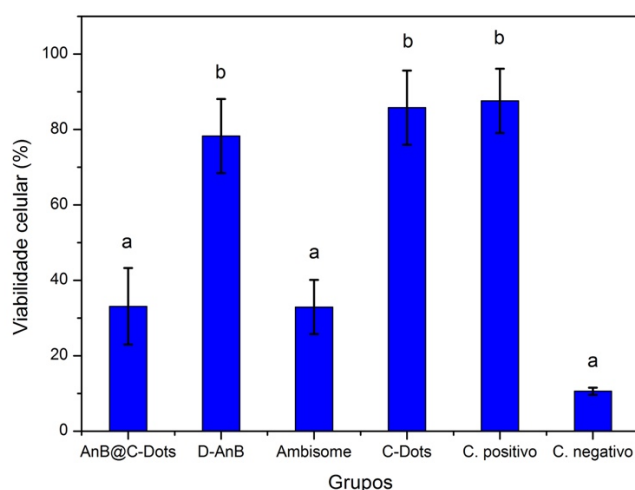


Figura 5. 17. Viabilidade celular das *Leishmanias* obtidas pelo método de MTT.

5.4.3.2. Critérios para a avaliação da toxicidade

O tratamento com AnB causa efeitos colaterais aos pacientes relacionados aos danos provocados por essa droga nos rins e no fígado.³⁴⁶ Por esse motivo, fatores como o peso desses dois órgãos e parâmetros bioquímicos são importantes para a avaliação da toxicidade de novas formulações. A quantidade de sangue que se consegue coletar de camundongos é pequena. Por isso e devido à quantidade de análises gentilmente cedidas pelos laboratórios Sabin, dos seis animais de cada grupo, o sangue de três camundongos foi destinado a exames bioquímicos e o dos outros três a realização de hemogramas. Devido a falhas técnicas durante o experimento, não foi possível coletar sangue do número mínimo de animais do grupo 5 para a realização dos exames bioquímicos. Por esse motivo, o grupo controle positivo (infectado e não tratado) foi excluído dessas análises. Além disto, não foram encontrados valores de referência para todas

as taxas dos exames bioquímicos e hematológicos.^{347, 348} Levando-se em consideração que tais valores sofrem influências de fatores como idade, estresse, condições ambientais, dieta e manuseio, por exemplo,^{348, 349} optou-se por comparar os dados dos grupos estudados entre si, e com valores de referência apenas se adquiridos em condições similares as deste trabalho.

Macroscopicamente os rins de todos os animais deste estudo apresentaram aparência normal, com coloração rosa-vermelha e consistência firme. A Tabela 5.8 relaciona o percentual de massa dos rins em relação à massa corporal dos camundongos. O teste ANOVA revelou que existe pelo menos um grupo cuja média de massa dos rins em relação à massa corporal possui diferença estatisticamente significativa ($p = 0,005$) quando comparado aos demais grupos. O teste de Scheffé foi aplicado para identificar os grupos estatisticamente diferentes e os detalhes encontram-se na Tabela 5.8. Apesar de o grupo tratado com **AnB@C-Dots** apresentar maior massa percentual dos rins média do que a dos grupos que receberam D-AnB e AmBisome[®], não existe diferença estatística entre os grupos **AnB@C-Dots** e os controles positivo e negativo (animais que não receberam tratamento com AnB). Esse resultado é positivo porque a hiperplasia (aumento benigno de um tecido por causa da multiplicação de suas células) renal é um indicativo de nefrotoxicidade.³⁵⁰

Tabela 5. 8. Efeito dos tratamentos sobre a massa dos rins dos animais em relação à massa corporal.

	Massa dos rins como % da massa corporal					
	Grupo					
	AnB@C-Dots	D-AnB	AmBisome [®]	C-Dots	Controle positivo	Controle negativo
N válido	6	4	6	5	5	6
Média	1,55 ^a	1,39 ^b	1,40 ^b	1,48 ^{a,b}	1,44 ^{a,b}	1,43 ^{a,b}
Desvio padrão	0,07	0,06	0,08	0,08	0,05	0,06
p-valor	0,005					

Letras diferentes indicam $p < 0,05$, pelo teste de Scheffé

Outro fator usado para avaliar a saúde dos rins dos animais foi a dosagem de ureia. Juntamente com a creatinina, esta substância, quando encontrada em grandes quantidades no sangue, pode indicar a diminuição da taxa de filtração glomerular e, conseqüentemente, insuficiência renal.³⁴⁶ A Tabela 5.9 relaciona as médias de dosagem de ureia encontrados neste experimento. O teste ANOVA delatou a existência de pelo menos um grupo estatisticamente diferente dos demais ($p = 0,032$). Os resultados indicaram leve azotemia (aumento de

compostos nitrogenados no sangue) nos animais dos grupos 2 e 3 que usaram as formulações convencionais a D-AnB e AmBisome[®]. De acordo com o teste de Tukey, o grupo **AnB@C-Dots** não é diferente estatisticamente do controle negativo (animais sadios), ao contrário do grupo tratado com AmBisome[®], que apresentou diferença. Considerando que a faixa considerada normal para dosagem de ureia em camundongos Balb/c é entre 42,37 e 60,02 mg dL⁻¹,³⁴⁸ pode-se dizer que o grupo tratado com **AnB@C-Dots**, assim como o controle negativo, não apresentou alterações na dosagem ureia. Isso indica boa saúde renal desses animais, ao contrário dos camundongos tratados com D-AnB e AmBisome[®], que apresentaram dosagem de ureia acima da faixa considerada normal. Esses resultados indicam que o sistema **AnB@C-Dots** não provocou danos no tecido renal dos animais estudados.

Tabela 5. 9. Dosagem de ureia de camundongos Balb/c tratados com **AnB@C-Dots**, D-AnB, Ambisome[®] e o do grupo controle negativo (não infectados e não tratados).

	Ureia (mg dL ⁻¹)			
	Grupo			
	AnB@C-Dots	D-AnB	AmBisome [®]	Controle negativo
N válido	3	3	3	3
Média	58 ^{a,b}	62 ^{a,b}	72 ^a	56 ^b
Desvio padrão	8	5	7	3
p-valor	0,032			

Letras diferentes indicam $p < 0,05$, pelo teste de Tukey

Nenhum dos tratamentos utilizados, inclusive o do sistema **AnB@C-Dots** produziu danos visíveis nos estudos de histologia. A Figura 5.18 reúne imagens adquiridas dos rins dos animais dos grupos que receberam **AnB@C-Dots**, D-AnB e AmBisome[®], comparados aos animais dos grupos controle (infectados e não infectados). Os tecidos apresentaram morfologia normal, sem sinais de necrose. Nas imagens visualizou-se glomérulos e túbulos contorcidos distais e proximais normais e sem alterações morfológicas. O esquema de tratamento utilizado possivelmente produziria um aumento no número de células apoptóticas nos rins dos animais pertencentes ao grupo tratado com D-AnB, caso a via de administração fosse a intravenosa.²⁷⁶

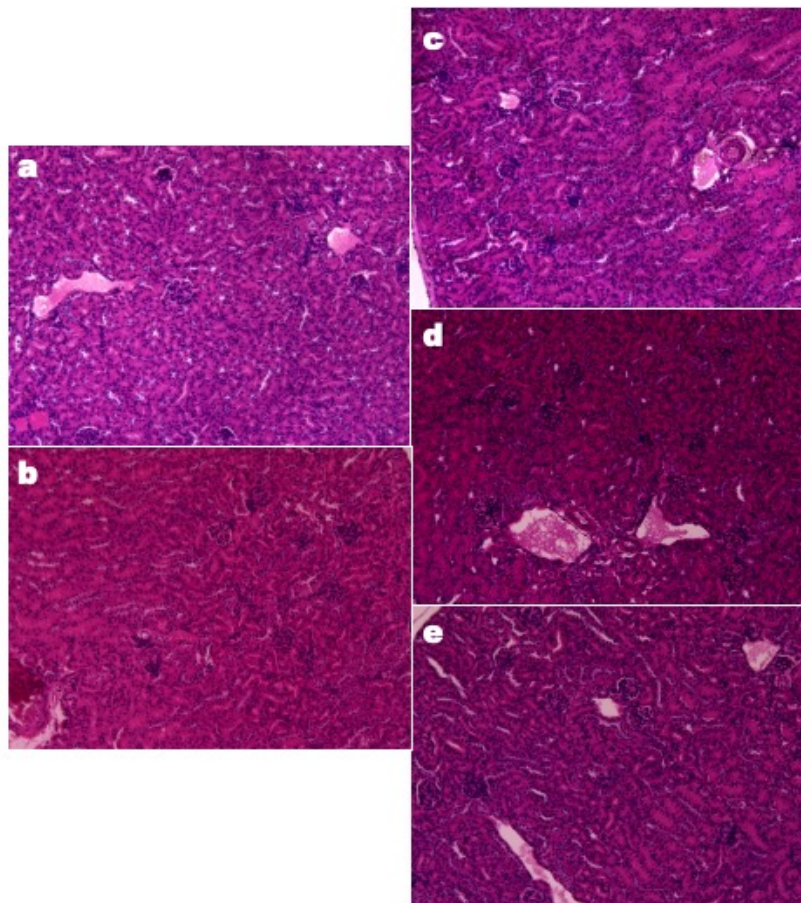


Figura 5. 18. Imagens de microscopia de luz dos rins de animais dos grupos: (a) controle negativo (não infectado), (b) controle positivo (infectado), (c) D-AnB, (d) AmBisome[®], (e) **AnB@C-Dots**. Escala: 200 μ m.

A aparência dos fígados dos animais, macroscopicamente, era normal e com cor marrom-avermelhada apresentando consistência firme. Os valores relacionados à percentagem de massa do fígado em relação à massa corporal dos camundongos estão organizados na Tabela 5.10. Um incremento no peso do fígado é um critério utilizado na atribuição de toxicidade.³⁵¹ Novamente, o teste ANOVA permitiu a detecção de ao menos um grupo com massa percentual do fígado média estatisticamente diferente dos demais ($p = 0,011$). Apesar de a média obtida para o grupo tratado com **AnB@C-Dots** ser maior do que a obtida para os demais grupos, inclusive os tratados com as formulações tradicionais, o teste de Scheffé apontou que não existe diferença estatística entre os grupos **AnB@C-Dots** e controle negativo (animais não infectados).

Tabela 5. 10. Efeito dos tratamentos sobre a massa do fígado dos animais em relação à massa corporal.

Massa do fígado como % da massa corporal	
Grupo	

	AnB@C-Dots	D-AnB	Ambisome®	C-Dots	Controle positivo	Controle negativo
N válido	6	5	6	5	6	6
Média	5,73 ^a	5,07 ^{a,b}	5,13 ^{a,b}	5,15 ^{a,b}	4,77 ^b	5,21 ^{a,b}
Desvio padrão	0,25	0,55	0,48	0,25	0,33	0,44
p-valor	0,011					

Letras diferentes indicam $p < 0,05$, pelo teste de Scheffé

Parâmetros bioquímicos foram usados para averiguar alterações nas funções hepáticas dos animais. As quantidades de albumina e bilirrubinas no soro sanguíneo são dois importantes marcadores usados para avaliar a saúde do fígado.³⁵² Baixos índices de albumina podem estar associados a problemas hepáticos e até mesmo a renais,³⁵³ já altos níveis de bilirrubinas podem ser sinal de danos no fígado causados por drogas.³⁵² Os animais dos diferentes grupos apresentaram medianas iguais estatisticamente para esses dois marcadores, segundo o teste de Kruskal-Wallis, conforme detalham as Tabelas 5.11 e 5.12.

Tabela 5. 11. Dosagem de Albumina de camundongos Balb/c tratados com AnB@C-Dots, D-AnB, Ambisome®, C-Dots e o do grupo controle negativo (não infectados e não tratados).

	Albumina (g dL ⁻¹)				
	Grupo				
	AnB@C-Dots	D-AnB	Ambisome®	C-Dots	Controle negativo
N válido	3	3	3	3	3
Mediana	2,6	2,8	2,6	2,9	2,7
Intervalo	0,2	0,6	0,2	0,1	0,2
p-valor	0,335				

Tabela 5. 12. Dosagem de Bilirrubinas totais de camundongos Balb/c tratados com AnB@C-Dots, D-AnB, Ambisome®, C-Dots e o do grupo controle negativo (não infectados e não tratados).

	Bilirrubinas totais (mg dL ⁻¹)				
	Grupo				
	AnB@C-Dots	D-AnB	Ambisome®	C-Dots	Controle negativo
N válido	3	3	3	3	3
Mediana	0,06	0,03	0,03	0,04	0,03
Intervalo	0,16	0,00	0,00	0,01	0,37
p-valor	0,096				

A transaminase pirúvica (TGP), juntamente com a transaminase oxalacética (TGO), é uma enzima que exerce papel essencial no ciclo do ácido cítrico, ainda que indiretamente. Nas células hepáticas, essa enzima situa-se no citoplasma. Por isso altos níveis de TGP no plasma sanguíneo são indicativos de dano nas células do fígado. Já a TGO é encontrada tanto no citoplasma quanto nas mitocôndrias das células do fígado e sua presença em grandes quantidades no sangue também indica disfunção hepática.³⁵² O teste ANOVA foi usado para comparar as dosagens de TGP e TGO médias obtidas para os grupos e permitiu a conclusão de que não existe diferença estatística entre essas médias (Tabelas 5.13 e 5.14), ou seja, não houveram alterações nesses parâmetros provocadas pelo uso de **AnB@C-Dots**.

Tabela 5. 13. Dosagem de Transaminase pirúvica (TGP) de camundongos Balb/c tratados com **AnB@C-Dots**, D-AnB, Ambisome[®], **C-Dots** e o do grupo controle negativo (não infectados e não tratados).

	Transaminase piruvica (TGP) (UI L ⁻¹)				
	Grupo				
	AnB@C-Dots	D-AnB	Ambisome [®]	C-Dots	Controle negativo
N válido	3	3	3	3	3
Média	32	31	31	23	24
Desvio padrão	12	8	5	4	3
p-valor	0,366				

Tabela 5. 14. Dosagem de Transaminase Oxalacética (TGO) de camundongos Balb/c tratados com **AnB@C-Dots**, D-AnB, Ambisome[®], **C-Dots** e o do grupo controle negativo (não infectados e não tratados).

	Transaminase oxalacética (TGO) (UI L ⁻¹)				
	Grupo				
	AnB@C-Dots	D-AnB	Ambisome [®]	C-Dots	Controle negativo
N válido	3	3	3	3	3
Média	229	134	190	75	105
Desvio padrão	100	46	97	17	33
p-valor	0,102				

O último parâmetro bioquímico avaliado foi a dosagem de fosfatase alcalina e os resultados estão resumidos na Tabela 5.15. Essa enzima é responsável pelo transporte de metabólitos através das membranas celulares. A elevação da quantidade dessa enzima no

sangue também é indicativo de problemas hepáticos, frequentemente causados pelo uso de drogas.³⁵² Já a diminuição, geralmente não consegue ser explicada, e por isso geralmente passa despercebida.^{354,355} A hipótese de que as medianas obtidas para os diferentes grupos de camundongos eram iguais foi descartada por meio do teste de Kruskal-Wallis. Existe diferença estatística do grupo tratado com **AnB@C-Dots** quando comparado com os grupos que receberam AmBisome[®] e **C-Dots**, mas nenhum desses grupos tem diferença estatística do grupo controle negativo (sadios) no nível de significância considerado.

Tabela 5. 15. Dosagem de Fosfatase alcalina de camundongos Balb/c tratados com **AnB@C-Dots**, D-AnB, AmBisome[®], **C-Dots** e o do grupo controle negativo (não infectados e não tratados).

	Fosfatase alcalina (U L ⁻¹)				
	Grupo				
	AnB@C-Dots	D-AnB	AmBisome [®]	C-Dots	Controle negativo
N válido	3	3	3	3	3
Mediana	48 ^a	76 ^{a,b}	93 ^b	94 ^b	89 ^{a,b}
Intervalo	15	16	22	1	34
p-valor	0,034				

Letras diferentes indicam $p < 0,05$

A Figura 5.19 contém imagens dos estudos histológicos dos fígados de animais dos grupos tratados com **AnB@C-Dots**, D-AnB e AmBisome[®] e controles (infectados e não infectados). Os tecidos apresentaram morfologia normal, sem danos visíveis como infiltrados celulares, alterações vasculares e necrose que possam ser atribuídos aos tratamentos.

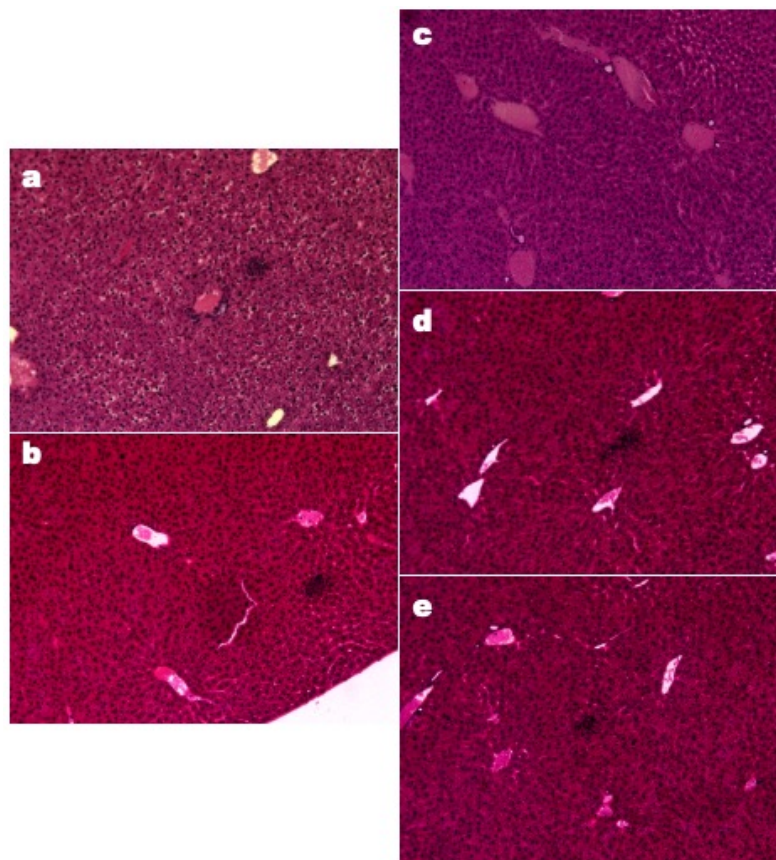


Figura 5. 19. Imagens de microscopia de luz dos fígados de animais dos grupos: (a) controle negativo (não infectado), (b) controle positivo (infectado), (c) D-AnB , (d) AmBisome[®], (e) **AnB@C-Dots**. Escala: 200 μ m.

A leve alteração hepática (hiperplasia e diminuição da fosfatase alcalina) observada nos animais tratados com as formulações tradicionais e não observada nos camundongos que receberam a **AnB@C-Dots** sugerem, mesmo que de forma discreta, que os danos nos rins e nos fígados dos animais causados pela **AnB@C-Dots** são menos significativos do que o das formulações D-AnB e AmBisome[®]. Apesar de a maioria dos parâmetros considerados não ter revelado diferença estatisticamente relevante, a dosagem de ureia e de fosfatase alcalina indicam menor quantidade de danos nefrológicos e hepáticos causados pela formulação em estudo. O ideal seria que o experimento tivesse sido realizado com maiores dosagens e em maior número de animais para que essa conclusão fosse mais assertiva.

Sabe-se que a AnB tem efeito hemolítico,³⁵³ por isso os hemogramas de alguns dos animais também foram realizados e analisados. Falhas técnicas durante o experimento impossibilitaram a aquisição do número de amostras mínimo dos grupos que receberam D-AnB e **C-Dots** e, por isto, fez-se necessária a exclusão desses grupos. Teste ANOVA revelou que não existia diferenças estatísticas no nível de significância considerado entre os grupos tratados com **AnB@C-Dots** e AmBisome[®], que é uma formulação na qual a toxicidade da AnB às

hemácias é amenizada ($p = 0,719$).³²⁷ Além disto, também não há diferença entre o grupo que recebeu a nanoformulação e os controles, os quais não receberam o fármaco. A Tabela 5.16 apresenta estes resultados.

Tabela 5. 16. Dosagem de hemácias de camundongos Balb/c tratados com **AnB@C-Dots**, Ambisome[®] e o dos grupos controle positivo (infectados e não tratados) e negativo (não infectados e não tratados).

	Hemácias (milhões.mm ⁻³)			
	Grupo			
	AnB@C-Dots	Ambisome [®]	Controle positivo	Controle negativo
N válido	3	3	3	3
Média	6,05	6,86	7,28	7,61
Desvio padrão	1,56	2,09	0,74	2,13
p-valor	0,719			

Algumas dificuldades enfrentadas durante a realização do experimento que impediram a otimização na extração de informações relevantes foram: a impossibilidade de usar-se as patas infectadas de todos os camundongos por grupo nos experimentos de contagem e viabilidade celular da *Leishmania*; a não viabilidade de realizar ensaios bioquímicos e hematológicos no mesmo animal devido à pequena quantidade de amostra de sangue por camundongo; a quantidade limitada de análises bioquímicas e hematológicas disponíveis e a perda de dois animais no décimo dia de experimento durante a anestesia.

5.5. Conclusões

C-Dots foram sintetizados por meio de uma rota sintética simples e reproduzível. Isto foi comprovado após a visualização das partículas por meio de MET e constatação da existência de comportamento óptico típico desses nanomateriais. A reprodutibilidade do método de obtenção foi acessada por meio das análises de ponto de fusão, CHN, e os espectros de IV e UV-Vis. Essa reprodutibilidade na síntese permitiu que nosso grupo desenvolvesse soluções baseadas em nanomateriais para a agricultura, dando origem à empresa KrillTech Nanotecnologia Agro (<https://krilltech.com.br/>).

Os **C-Dots** foram usados com sucesso no carreamento de AnB. Foi possível a estabilização de 1 mg mL⁻¹ dessa molécula em solução aquosa, que é considerada uma concentração alta, tendo em vista sua forte tendência a aglomeração.

Os dados acerca do uso da **AnB@C-Dots** contra a leishmaniose causada pelo parasito *L. braziliensis* obtidos no experimento pré-clínico são animadores, apesar de o modelo experimental não ter sido o ideal para obtenção de dados sobre a eficácia e a toxicidade da formulação, devido à necessidade de extrair-se os dois tipos de informações do mesmo experimento. A avaliação da viabilidade celular das *Leishmanias* por MTT realizada nas culturas preparadas a partir das patas infectadas e após os tratamentos indica que a **AnB@C-Dots** tem eficácia equiparável à da Ambisome[®]. Além disto, os parâmetros renais e hepáticos, ureia e fosfatase alcalina, indicam que a nanoformulação testada provoca quantidade de alterações devido a toxicidade aos rins e ao fígado ligeiramente menor do que as formulações de AnB tradicionalmente utilizadas.

O ideal seria que experimentos independentes tivessem sido realizados, um avaliando a eficácia da formulação e outro, a toxicidade. Para a avaliação da toxicidade, doses mais altas seriam mais adequadas, visto que a dosagem relativamente baixa não produziu danos histológicos e nem produziu diferença estatisticamente relevante na maioria dos parâmetros bioquímicos.

Os resultados alcançados com o sistema **AnB@C-Dots** neste trabalho abrem precedentes para testes do uso dessa nanoformulação contra outras enfermidades como infecções sistêmicas causadas por fungos e bactérias, os quais também são tratáveis com AnB. Além disto, pode ser possível que nossa nanoformulação permita o tratamento por outras vias, além da intravenosa, o que resultaria em ampliação do espectro de atuação da AnB e melhoria da qualidade de vida do paciente. Testes pré-clínicos adicionais ainda são necessários para

confirmar a eficácia e segurança da **AnB@C-Dots**. Os resultados deste trabalho são parte do pedido de patente de número BR 10 2020 002162 1, depositado no dia 31/01/2020 junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI).

5.6. Perspectivas

O potencial da **AnB@C-Dots** no tratamento de outras doenças tratáveis com a AnB é algo que vale a pena ser explorado em trabalhos futuros. Doenças negligenciadas como criptococose, micetoma e doença de Chagas, além de infecções hospitalares podem tornarem-se menos avassaladoras para o paciente se uma formulação mais barata e menos tóxica de AnB tiver sua eficiência comprovada.

Além disso, estudos acerca da possibilidade do uso da via de administração oral da **AnB@C-Dots** são necessários, já que esta via proporcionaria ao paciente melhor qualidade de vida e a possibilidade de a internação ser dispensada, o que também traria vantagens econômicas. Também existe a possibilidade de que a **AnB@C-Dots** consiga diminuir as dosagens necessárias de AnB para os tratamentos, e a confirmação desta hipótese depende de novos experimentos *in vitro* e *in vivo*.

O registro da **AnB@C-Dots** junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) ainda depende de, no mínimo, resultados de exames pré-clínicos de toxicidade de dose única (aguda), toxicidade de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, tolerância local, especialmente se outras vias de aplicação forem exploradas, carcinogenicidade, além dos ensaios clínicos.³³⁶

As propriedades luminescentes do sistema **AnB@C-Dots** são dignas de nota e, após investigação apropriada, podem viabilizar a aplicação do sistema como sensor para detecção de agentes patológicos para o desenvolvimento de futuros kits de diagnóstico de doenças tratáveis com a AnB e para a investigação do mecanismo de ação do próprio sistema.

A possibilidade de empregar o mesmo princípio de ancorar drogas insolúveis em água na superfície de **C-Dots** pode ser explorada para a formulação de outras substâncias úteis para a medicina e até para outras áreas.

Capítulo 6

Conclusões e perspectivas gerais

6.1. Conclusões gerais

Três tipos de sistemas fotoluminescentes foram sintetizados, caracterizados estrutural e espectroscopicamente e explorados em aplicações biológicas. O primeiro, discutido no Capítulo 3, é um conjunto de complexos de íons lantanídeos ($K_3[Ln(nTdpa)_3]$, $Ln^{3+} = Gd^{3+}, Yb^{3+}$ e Eu^{3+} , $n = 1$ ou 2) capazes de gerar 1O_2 com o auxílio dos grupos tiofeno presentes nas estruturas dos ligantes. Tanto os complexos quanto os ligantes isolados foram testados como FS para TFD *in vitro* com células HeLa, sendo que os valores de IC_{50} sofreram decréscimo após a complexação com o íon Ln^{3+} , tanto no escuro quanto após irradiação ($\lambda = 365$ nm), devido à estequiometria metal: ligante 1:3 dos complexos. Foi comprovado por citometria de fluxo que as células incubadas com os compostos morrem preferencialmente por necrose nas condições testadas. Além disso as propriedades fotofísicas de $K_3[Eu(1Tdpa)_3]$ permitiram a visualização do composto dentro das células em experimentos de bioimageamento sendo marcadas as mitocôndrias de forma seletiva.

A obtenção e funcionalização de **C-Dots** a partir de esterco de vaca (**PBAC-Dots**) foram descritas no Capítulo 4. A engenharia de superfície empregada em tais partículas permitiu um efeito *light-up* após a ligação com glicose e sua acumulação na região mitocondrial de células MCF-7, diferentemente do que havia sido descrito na literatura para **C-Dots** produzidos por mesmo método e mesma fonte de carbono.²¹⁰ Além disso, **PBAC-Dots** apresentaram propriedades imunoterapêuticas em um experimento com camundongos C57BL/6 com melanoma. Isso foi comprovado pelo incremento na quantidade de regiões necróticas nos tumores, visualizados por meio de experimentos de histologia. Não foram encontrados danos nos tecidos de outros órgãos do camundongo que pudessem ter sido causados pelos **PBAC-Dots**.

No Capítulo 5, a produção de **C-Dots** com superfícies contendo grupos ácidos borônicos, sem etapas posteriores de funcionalização e em triplicata, foi relatada. A caracterização, com o objetivo de garantir a reprodutibilidade da síntese, foi demonstrada. Os **C-Dots** funcionaram como carreadores de AnB e conseguiram estabilizar 1 mg mL^{-1} do composto em solução aquosa, apesar da alta tendência à aglomeração inerente a este fármaco. O novo sistema chamado de **AnB@C-Dots** apresentou espectro de emissão de alta intensidade e foi testado no tratamento da leishmaniose tegumentar americana causada pelo parasito *L. braziliensis* em um experimento *in vivo* com camundongos balb/c. Os resultados do experimento de viabilidade celular de leishmanias indicaram que a eficácia da nova formulação é comparável à da formulação comercial Ambisome® e as medidas de parâmetros bioquímicos

sugerem que a toxicidade da **AnB@C-Dots** é menor do que a das outras formulações de AnB testadas.

As tecnologias luminescentes descritas neste trabalho têm o potencial de somarem valiosas contribuições para a Biologia e Medicina, seja na forma de novos FS para TFD ou agente imunoterápico para o tratamento de cânceres, ou na forma de agentes teragnósticos e carreadores de fármacos para doenças diversas.

6.2. Perspectivas gerais

Os sistemas aqui propostos podem vir a produzir impactos positivos na saúde humana e na economia, mas para isto ainda devem passar por algumas etapas.

A estratégia utilizada para obter os ligantes **nTdp_a** (n = 1 ou 2) pode sofrer alterações simples para que novas estruturas sejam obtidas. Dessa forma novos compostos que possam ser utilizados como FS de TFD e como sondas para bioimageamento ao mesmo tempo, e que reúnam maior fotocitotoxicidade, menor citotoxicidade e alta solubilidade em água podem ser desenvolvidos. Depois disso o sistema aprimorado deve ter as melhores condições (concentração, tempo de incubação e tempo de exposição à luz por exemplo) determinadas *in vitro* antes que os experimentos pré-clínicos sejam considerados.

PBAC-Dots mostraram-se extremamente promissores para serem utilizados como agentes de imunoterapia contra o câncer. Para tal aplicação, seu mecanismo de ação deve ser elucidado contra o melanoma e eventualmente contra outros cânceres. A sua característica *light-up* também o torna atrativo para o desenvolvimento de sensores de glicose e de bioimageamento seletivo e, até mesmo, de uma formulação de AnB similar ao sistema **AnB@C-Dots**.

A nanoformulação de AnB e C-Dots tem potencial para contribuir com o tratamento de diversas doenças negligenciadas. Para isso, deve passar pelos testes pré-clínicos exigidos pela ANVISA³³⁶ e deve ter eficácia comprovada no tratamento de cada uma dessas doenças. Em seguida o sistema **AnB@C-Dots** deve passar por testes clínicos e deve ter sua produção escalonada para que possa ser comercializada.

Referências

1. Valeur, B.; Berberan-Santos, M. N., A Brief History of Fluorescence and Phosphorescence before the Emergence of Quantum Theory. *J. Chem. Educ.* **2011**, *88* (6), 731-738.
2. Dave, P., Review On Lanthanides: Rare Earth Dual Fluorescent Material. *IJNMN* **2021**, *3*(1), 1-11.
3. Stokes, G. G., XXX. On the change of refrangibility of light. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **1852**, (142), 463-562.
4. Collot, M., Recent advances in dioxaborine-based fluorescent materials for bioimaging applications. *Mater. Horiz.* **2020**, *8*, 501-514.
5. Molkenova, A.; Toleshova, A.; Song, S.-J.; Kang, M. S.; Abduraimova, A.; Han, D.-W.; Atabaev, T. S., Rapid synthesis of nontoxic and photostable carbon nanoparticles for bioimaging applications. *Mater. Lett.* **2020**, *261*, 127012.
6. Zhang, Z.; Liu, G.; Li, X.; Zhang, S.; Lü, X.; Wang, Y., Design and synthesis of fluorescent nanocelluloses for sensing and bioimaging applications. *ChemPlusChem* **2020**, *85*, 487-502.
7. Lemke, A.; Kiderlen, A.; Kayser, O., amphotericin B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *68* (2), 151-162.
8. Rosenberg, B.; Vancamp, L.; Trosko, J. E.; Mansour, V. H., Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* **1969**, *222* (5191), 385-386.
9. Ma, D. L.; He, H. Z.; Leung, K. H.; Chan, D. S. H.; Leung, C. H., Bioactive luminescent transition-metal complexes for biomedical applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (30), 7666-7682.
10. Sun, R. W.-Y.; Ma, D.-L.; Wong, E. L.-M.; Che, C.-M., Some uses of transition metal complexes as anti-cancer and anti-HIV agents. *Dalton Trans.* **2007**, (43), 4884-4892.
11. Funkhouser, J., Reinventing pharma: the theranostic revolution. *Curr Drug Discov* **2002**, *2*, 17-19.
12. Eliseeva, S. V.; Bünzli, J.-C. G., Lanthanide luminescence for functional materials and bio-sciences. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (1), 189-227.
13. Bao, G., Lanthanide complexes for drug delivery and therapeutics. *J. Lumin.* **2020**, *228*, 117622.
14. Cotruvo Jr, J. A., The chemistry of lanthanides in biology: recent discoveries, emerging principles, and technological applications. *ACS Cent. Sci.* **2019**, *5* (9), 1496-1506.

15. Richardson, F. S., Terbium (III) and europium (III) ions as luminescent probes and stains for biomolecular systems. *Chem. Rev.* **1982**, 82 (5), 541-552.
16. Teo, R. D.; Termini, J.; Gray, H. B., Lanthanides: Applications in Cancer Diagnosis and Therapy: Miniperspective. *J. Med. Chem.* **2016**, 59 (13), 6012-6024.
17. Wei, J.-H.; Chen, Z.-F.; Qin, J.-L.; Liu, Y.-C.; Li, Z.-Q.; Khan, T.-M.; Wang, M.; Jiang, Y.-H.; Shen, W.-Y.; Liang, H., Water-soluble oxoglucine-Y (III), Dy (III) complexes: in vitro and in vivo anticancer activities by triggering DNA damage, leading to S phase arrest and apoptosis. *Dalton Trans.* **2015**, 44 (25), 11408-11419.
18. Wu, Y.-C.; Liou, Y.-F.; Lu, S.-T.; Chen, C.-H.; Chang, J.-J.; Lee, K.-H., Cytotoxicity of Isoquinoline Alkaloids and Their N-Oxides. *Planta Med.* **1989**, 55 (02), 163-165.
19. Chen, S.-B.; Gao, G.-Y.; Li, Y.-S.; Yu, S.-C.; Xiao, P.-G., Cytotoxic constituents from *Aquilegia ecalcarata*. *Planta Med.* **2002**, 68 (06), 554-556.
20. Zhu, M.; Zhang, H.; Ran, G.; Mangel, D. N.; Yao, Y.; Zhang, R.; Tan, J.; Zhang, W.; Song, J.; Sessler, J. L., Metal Modulation: An Easy-to-Implement Tactic for Tuning Lanthanide Phototheranostics. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, 143 (19), 7541-7552.
21. Li, H.; Xie, C.; Lan, R.; Zha, S.; Chan, C.-F.; Wong, W.-Y.; Ho, K.-L.; Chan, B. D.; Luo, Y.; Zhang, J.-X., A Smart Europium–Ruthenium Complex as Anticancer Prodrug: Controllable Drug Release and Real-Time Monitoring under Different Light Excitations. *J. Med. Chem.* **2017**, 60 (21), 8923-8932.
22. Bayda, S.; Adeel, M.; Tuccinardi, T.; Cordani, M.; Rizzolio, F., The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical–physical applications to nanomedicine. *Molecules* **2020**, 25 (1), 112.
23. Contera, S.; Bernardino de la Serna, J.; Tetley, T. D., Biotechnology, nanotechnology and medicine. *Emerg Top Life Sci* **2020**, 4 (6), 551–554.
24. Ruedas-Rama, M. J.; Walters, J. D.; Orte, A.; Hall, E. A., Fluorescent nanoparticles for intracellular sensing: a review. *Anal. Chim. Acta* **2012**, 751, 1-23.
25. Liu, X.; Zhang, Y.; Yu, T.; Qiao, X.; Gresback, R.; Pi, X.; Yang, D., Optimum quantum yield of the light emission from 2 to 10 nm hydrosilylated silicon quantum dots. *Part. Part. Syst. Charact.* **2016**, 33 (1), 44-52.
26. Atkins, P.; Shriver, D., Química Inorgânica; 3a edição. Bookman Oxford University Press, Oxford: **1999**.

27. Park, N.-M.; Choi, C.-J.; Seong, T.-Y.; Park, S.-J., Quantum confinement in amorphous silicon quantum dots embedded in silicon nitride. *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *86* (7), 1355.
28. Michalet, X.; Pinaud, F.; Bentolila, L.; Tsay, J.; Doose, S.; Li, J.; Sundaresan, G.; Wu, A.; Gambhir, S.; Weiss, S., Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science* **2005**, *307* (5709), 538-544.
29. Sapsford, K. E.; Pons, T.; Medintz, I. L.; Mattoussi, H., Biosensing with luminescent semiconductor quantum dots. *Sensors* **2006**, *6* (8), 925-953.
30. Martynenko, I.; Litvin, A.; Purcell-Milton, F.; Baranov, A.; Fedorov, A.; Gun'Ko, Y., Application of semiconductor quantum dots in bioimaging and biosensing. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5* (33), 6701-6727.
31. Wagner, A. M.; Knipe, J. M.; Orive, G.; Peppas, N. A., Quantum dots in biomedical applications. *Acta Biomater.* **2019**, *94*, 44-63.
32. Mansur, A. A.; Mansur, H. S.; Mansur, R. L.; de Carvalho, F. G.; Carvalho, S. M., Bioengineered II–VI semiconductor quantum dot–carboxymethylcellulose nanoconjugates as multifunctional fluorescent nanoprobe for bioimaging live cells. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2018**, *189*, 393-404.
33. Shivaji, K.; Mani, S.; Ponmurugan, P.; De Castro, C. S.; Lloyd Davies, M.; Balasubramanian, M. G.; Pitchaimuthu, S., Green-synthesis-derived CdS quantum dots using tea leaf extract: antimicrobial, bioimaging, and therapeutic applications in lung cancer cells. *ACS Appl. Nano Mater.* **2018**, *1* (4), 1683-1693.
34. Tian, L.-J.; Min, Y.; Li, W.-W.; Chen, J.-J.; Zhou, N.-Q.; Zhu, T.-T.; Li, D.-B.; Ma, J.-Y.; An, P.-F.; Zheng, L.-R., Substrate Metabolism-Driven Assembly of High-Quality CdS x Se $1-x$ Quantum Dots in Escherichia coli: Molecular Mechanisms and Bioimaging Application. *ACS nano* **2019**, *13* (5), 5841-5851.
35. Yezhelyev, M. V.; Al-Hajj, A.; Morris, C.; Marcus, A. I.; Liu, T.; Lewis, M.; Cohen, C.; Zrazhevskiy, P.; Simons, J. W.; Rogatko, A., In situ molecular profiling of breast cancer biomarkers with multicolor quantum dots. *J. Adv. Mater.* **2007**, *19* (20), 3146-3151.
36. Liu, J.; Lau, S. K.; Varma, V. A.; Moffitt, R. A.; Caldwell, M.; Liu, T.; Young, A. N.; Petros, J. A.; Osunkoya, A. O.; Krogstad, T., Molecular mapping of tumor heterogeneity on clinical tissue specimens with multiplexed quantum dots. *ACS nano* **2010**, *4* (5), 2755-2765.

37. Savla, R.; Taratula, O.; Garbuzenko, O.; Minko, T., Tumor targeted quantum dot-mucin 1 aptamer-doxorubicin conjugate for imaging and treatment of cancer. *J. Control. Release* **2011**, *153* (1), 16-22.
38. Pu, Y.; Cai, F.; Wang, D.; Wang, J.-X.; Chen, J.-F., Colloidal synthesis of semiconductor quantum dots toward large-scale production: a review. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2018**, *57* (6), 1790-1802.
39. Shareena, T. P. D.; McShan, D.; Dasmahapatra, A. K.; Tchounwou, P. B., A review on graphene-based nanomaterials in biomedical applications and risks in environment and health. *Nano-Micro Lett.* **2018**, *10* (3), 1-34.
40. Novoselov, K. S.; Geim, A. K.; Morozov, S. V.; Jiang, D.; Zhang, Y.; Dubonos, S. V.; Grigorieva, I. V.; Firsov, A. A., Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science* **2004**, *306* (5696), 666-669.
41. Wang, W.; Su, H.; Wu, Y.; Zhou, T.; Li, T., Biosensing and biomedical applications of graphene: a review of current progress and future prospect. *J. Electrochem. Soc.* **2019**, *166* (6), B505.
42. Zheng, P.; Wu, N., Fluorescence and sensing applications of graphene oxide and graphene quantum dots: a review. *Chem. Asian J.* **2017**, *12* (18), 2343-2353.
43. Kushwaha, H.; Sao, R.; Vaish, R., Label free selective detection of estriol using graphene oxide-based fluorescence sensor. *Int. J. Appl. Phys.* **2014**, *116* (3), 034701.
44. Lu, Y.; Kong, H.; Wen, F.; Zhang, S.; Zhang, X., Lab-on-graphene: graphene oxide as a triple-channel sensing device for protein discrimination. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (1), 81-83.
45. Gao, Y.; Zou, X.; Zhao, J. X.; Li, Y.; Su, X., Graphene oxide-based magnetic fluorescent hybrids for drug delivery and cellular imaging. *Colloids Surf. B* **2013**, *112*, 128-133.
46. Gollavelli, G.; Ling, Y.-C., Magnetic and fluorescent graphene for dual modal imaging and single light induced photothermal and photodynamic therapy of cancer cells. *Biomaterials* **2014**, *35* (15), 4499-4507.
47. Tian, B.; Wang, C.; Zhang, S.; Feng, L.; Liu, Z., Photothermally enhanced photodynamic therapy delivered by nano-graphene oxide. *ACS nano* **2011**, *5* (9), 7000-7009.
48. Rafiee, R.; Moghadam, R. M., On the modeling of carbon nanotubes: a critical review. *Compos. B: Eng* **2014**, *56*, 435-449.

49. Francis, A. P.; Devasena, T., Toxicity of carbon nanotubes: A review. *Toxicol. Ind. Health* **2018**, *34* (3), 200-210.
50. Loh, K. P.; Bao, Q.; Eda, G.; Chhowalla, M., Graphene oxide as a chemically tunable platform for optical applications. *Nat. Chem.* **2010**, *2* (12), 1015.
51. Nagai, Y.; Nakamura, K.; Yudasaka, M.; Shiraki, T.; Fujigaya, T., Radical Polymer Grafting on the Surface of Single-Walled Carbon Nanotubes Enhances Photoluminescence in the Near-Infrared Region: Implications for Bioimaging and Biosensing. *ACS Appl. Nano Mater.* **2020**, *3* (9), 8840-8847.
52. Singh, V.; Chatterjee, S.; Palecha, M.; Sen, P.; Ateeq, B.; Verma, V., Chickpea peel waste as sustainable precursor for synthesis of fluorescent carbon nanotubes for bioimaging application. *Carbon Lett.* **2021**, *31*, 117-123.
53. Guo, Q.; Shen, X.-t.; Li, Y.-y.; Xu, S.-q., Carbon nanotubes-based drug delivery to cancer and brain. *Curr. Med. Sci.* **2017**, *37* (5), 635-641.
54. Kaur, J.; Gill, G. S.; Jeet, K., Applications of carbon nanotubes in drug delivery: A comprehensive review. *Characterization and biology of nanomaterials for drug delivery* **2019**, 113-135.
55. Zhao, Y.; Zhao, T.; Cao, Y.; Sun, J.; Zhou, Q.; Chen, H.; Guo, S.; Wang, Y.; Zhen, Y.; Liang, X.-J., Temperature-sensitive lipid-coated carbon nanotubes for synergistic photothermal therapy and gene therapy. *ACS nano* **2021**, *15* (4), 6517-6529.
56. Sobhani, Z.; Behnam, M. A.; Emami, F.; Dehghanian, A.; Jamhiri, I., Photothermal therapy of melanoma tumor using multiwalled carbon nanotubes. *Int. J. Nanomed* **2017**, *12*, 4509.
57. Fiyadh, S. S.; AlSaadi, M. A.; Jaafar, W. Z.; AlOmar, M. K.; Fayaed, S. S.; Mohd, N. S.; Hin, L. S.; El-Shafie, A., Review on heavy metal adsorption processes by carbon nanotubes. *J. Clean. Prod.* **2019**, *230*, 783-793.
58. Abd Rani, U.; Ng, L. Y.; Ng, C. Y.; Mahmoudi, E., A review of carbon quantum dots and their applications in wastewater treatment. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2020**, *278*, 102124.
59. Irvani, S.; Varma, R. S., Green synthesis, biomedical and biotechnological applications of carbon and graphene quantum dots. A review. *Environ. Chem. Lett.* **2020**, *18* (3), 703-727.
60. Huang, D.; Chen, Y.; Cheng, M.; Lei, L.; Chen, S.; Wang, W.; Liu, X., Carbon Dots-Decorated Carbon-Based Metal-Free Catalysts for Electrochemical Energy Storage. *Small* **2021**, *17* (4), 2002998.

61. Ashrafizadeh, M.; Mohammadinejad, R.; Kailasa, S. K.; Ahmadi, Z.; Afshar, E. G.; Pardakhty, A., Carbon dots as versatile nanoarchitectures for the treatment of neurological disorders and their theranostic applications: A review. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2020**, *278*, 102123.
62. Tuerhong, M.; Yang, X.; Xue-Bo, Y., Review on carbon dots and their applications. *Chin. J. Anal. Chem.* **2017**, *45* (1), 139-150.
63. Li, H.; Yan, X.; Kong, D.; Jin, R.; Sun, C.; Du, D.; Lin, Y.; Lu, G., Recent advances in carbon dots for bioimaging applications. *Nanoscale Horiz.* **2020**, *5* (2), 218-234.
64. Ji, C.; Zhou, Y.; Leblanc, R. M.; Peng, Z., Recent developments of carbon dots in biosensing: A review. *ACS sensors* **2020**, *5* (9), 2724-2741.
65. Perrin, D. D. *Purification of laboratory chemicals*; **1980**.
66. Fan, Y.; Wang, P.; Lu, Y.; Wang, R.; Zhou, L.; Zheng, X.; Li, X.; Piper, J. A.; Zhang, F., Lifetime-engineered NIR-II nanoparticles unlock multiplexed in vivo imaging. *Nat. Nanotechnol.* **2018**, *13* (10), 941.
67. Ananias, D.; Almeida Paz, F. A.; Carlos, L. D.; Rocha, J., Near-Infrared Ratiometric Luminescent Thermometer Based on a New Lanthanide Silicate. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24* (46), 11926-11935.
68. Kleoff, M.; Suhr, S.; Sarkar, B.; Zimmer, R.; Reissig, H. U.; Marin-Luna, M.; Zipse, H., Efficient Syntheses of New Super Lewis Basic Tris (dialkylamino)-Substituted Terpyridines and Comparison of Their Methyl Cation Affinities. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25* (31), 7526-7533.
69. Gabrielsson, E.; Tian, H.; Eriksson, S. K.; Gao, J.; Chen, H.; Li, F.; Oscarsson, J.; Sun, J.; Rensmo, H.; Kloo, L., Dipicolinic acid: a strong anchoring group with tunable redox and spectral behavior for stable dye-sensitized solar cells. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (18), 3858-3861.
70. Supkowski, R. M.; Horrocks Jr, W. D., On the determination of the number of water molecules, q, coordinated to europium (III) ions in solution from luminescence decay lifetimes. *Inorganica Chim. Acta* **2002**, *340*, 44-48.
71. Aebischer, A.; Gumy, F.; Bünzli, J.-C. G., Intrinsic quantum yields and radiative lifetimes of lanthanide tris (dipicolinates). *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11* (9), 1346-1353.
72. Hu, Y.; Smyth, G. K., ELDA: extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *J. Immunol. Methods* **2009**, *347* (1-2), 70-78.

73. Titus, R. G.; Marchand, M.; Boon, T.; Louis, J., A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunol.* **1985**, *7* (5), 545-555.
74. The, I.; of Whole, T. P.-C. A.; Consortium, G., Pan-cancer analysis of whole genomes. *Nature* **2020**, *578* (7793), 82.
75. Schirmacher, V., From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment. *Int. J. Oncol.* **2019**, *54* (2), 407-419.
76. Weissman, S., Intramolecular energy transfer the fluorescence of complexes of europium. *J. Chem. Phys.* **1942**, *10* (4), 214-217.
77. Buenzli, J.-C. G., On the design of highly luminescent lanthanide complexes. *Coord. Chem. Rev.* **2015**, *293*, 19-47.
78. O'Connor, A. E.; Gallagher, W. M.; Byrne, A. T., Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **2009**, *85* (5), 1053-1074.
79. Lammer, A. D.; Thiabaud, G. g.; Brewster, J. T.; Alaniz, J.; Bender, J. A.; Sessler, J. L., Lanthanide Texaphyrins as Photocatalysts. *Inorg. Chem.* **2018**, *57* (6), 3458-3464.
80. Thanasekaran, P.; Chu, C.-H.; Wang, S.-B.; Chen, K.-Y.; Gao, H.-D.; Lee, M. M.; Sun, S.-S.; Li, J.-P.; Chen, J.-Y.; Chen, J.-K., Lipid-Wrapped Upconversion Nanoconstruct/Photosensitizer Complex for Near-Infrared Light-Mediated Photodynamic Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *11* (1), 84-95.
81. Zhang, Q.; Cheng, G.; Ke, H.; Zhu, X.; Zhu, N.; Wong, W.-Y.; Wong, W.-K., Effects of peripheral substitutions on the singlet oxygen quantum yields of monophthalocyaninato ytterbium (III) complexes. *RSC Adv.* **2015**, *5* (28), 22294-22299.
82. Brites, C. D.; Balabhadra, S.; Carlos, L. D., Lanthanide-based thermometers: at the cutting-edge of luminescence thermometry. *Adv. Opt. Mater.* **2019**, *7* (5), 1801239.
83. Lucena, M. A.; Oliveira, M. F.; Arouca, A. M.; Talhavini, M. r.; Ferreira, E. A.; Alves Jr, S.; Veiga-Souza, F. H.; Weber, I. T., Application of the metal-organic framework [Eu (BTC)] as a luminescent marker for gunshot residues: a synthesis, characterization, and toxicity study. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (5), 4684-4691.
84. Harvey, P.; Nonat, A.; Platas Iglesias, C.; Natrajan, L.; Charbonniere, L., Sensing Uranyl (VI) by Coordination and Energy Transfer to a Luminescent Europium (III) Complex. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**.

85. Aulsebrook, M. L.; Graham, B.; Grace, M. R.; Tuck, K. L., Lanthanide complexes for luminescence-based sensing of low molecular weight analytes. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *375*, 191-220.
86. Nonat, A.; Chan, C. F.; Liu, T.; Platas-Iglesias, C.; Liu, Z.; Wong, W.-T.; Wong, W.-K.; Wong, K.-L.; Charbonnière, L. J., Room temperature molecular up conversion in solution. *Nat. Commun* **2016**, *7* (1), 1-8.
87. de Bettencourt-Dias, A.; Barber, P. S.; Bauer, S., A water-soluble pybox derivative and its highly luminescent lanthanide ion complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (16), 6987-6994.
88. Diniz, J. R.; Correa, J. R.; Moreira, D. d. A.; Fontenele, R. S.; de Oliveira, A. L.; Abdelnur, P. V.; Dutra, J. D.; Freire, R. O.; Rodrigues, M. O.; Neto, B. A., Water-Soluble Tb³⁺ and Eu³⁺ Complexes with Ionophilic (Ionically Tagged) Ligands as Fluorescence Imaging Probes. *Inorg. Chem.* **2013**, *52* (17), 10199-10205.
89. Ogata, S.; Shimizu, T.; Ishibashi, T.; Ishiyone, Y.; Hanami, M.; Ito, M.; Ishii, A.; Kawaguchi, S.; Sugimoto, K.; Hasegawa, M., Water-soluble lanthanide complexes with a helical ligand modified for strong luminescence in a wide pH region. *New J. Chem.* **2017**, *41* (14), 6385-6394.
90. Krinochkin, A. P.; Kopchuk, D. S.; Kim, G. A.; Gorbunov, E. B.; Kovalev, I. S.; Santra, S.; Zyryanov, G. V.; Majee, A.; Rusinov, V. L.; Chupakhin, O. N., Synthesis and luminescence of new water-soluble lanthanide complexes of DTTA-containing 4-(4-methoxyphenyl)-2, 2'-bipyridine. *Inorganica Chim. Acta* **2018**, *478*, 49-53.
91. An, B.-L.; Huang, X.-D.; Zhang, J.-M.; Zhu, X.-Y.; Xu, J.-Q., Synthesis and strong luminescence of water soluble lanthanide complexes sensitized by a new tridentate organic ligand. *J. Lumin.* **2017**, *187*, 340-346.
92. Dai, L.; Zhang, J.; Chen, Y.; Mackenzie, L. E.; Pal, R.; Law, G.-L., Synthesis of water-soluble chiral DOTA lanthanide complexes with predominantly twisted square antiprism isomers and circularly polarized luminescence. *Inorg. Chem.* **2019**, *58* (19), 12506-12510.
93. Zhang, T.; Chan, C.-F.; Hao, J.; Law, G.-L.; Wong, W.-K.; Wong, K.-L., Fast uptake, water-soluble, mitochondria-specific erbium complex for a dual function molecular probe—imaging and photodynamic therapy. *RSC Adv.* **2013**, *3* (2), 382-385.
94. Dasari, S.; Singh, S.; Sivakumar, S.; Patra, A. K., Dual-sensitized luminescent europium (III) and terbium (III) complexes as bioimaging and light-responsive therapeutic agents. *Chem.-Eur. J* **2016**, *22* (48), 17387-17396.

95. Galland, M.; Le Bahers, T.; Banyasz, A.; Lascoux, N.; Duperray, A.; Grichine, A.; Tripier, R.; Guyot, Y.; Maynadier, M.; Nguyen, C., A “Multi-Heavy-Atom” Approach toward Biphotonic Photosensitizers with Improved Singlet-Oxygen Generation Properties. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25* (38), 9026-9034.
96. Calixto, G. M. F.; Bernegossi, J.; De Freitas, L. M.; Fontana, C. R.; Chorilli, M., Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: a review. *Molecules* **2016**, *21* (3), 342.
97. Shafirstein, G.; Bellnier, D.; Oakley, E.; Hamilton, S.; Potasek, M.; Beeson, K.; Parilov, E., Interstitial photodynamic therapy—a focused review. *Cancers* **2017**, *9* (2), 12.
98. Heinemann, F.; Karges, J.; Gasser, G., Critical Overview of the Use of Ru(II) Polypyridyl Complexes as Photosensitizers in One-Photon and Two-Photon Photodynamic Therapy. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50* (11), 2727-2736.
99. Monroe, S.; Colón, K. L.; Yin, H.; Roque, J.; Konda, P.; Gujar, S.; Thummel, R. P.; Lilje, L.; Cameron, C. G.; McFarland, S. A., Transition Metal Complexes and Photodynamic Therapy from a Tumor-Centered Approach: Challenges, Opportunities, and Highlights from the Development of TLD1433. *Chem. Rev.* **2018**.
100. Ang, J. M.; Riaz, I. B.; Kamal, M. U.; Paragh, G.; Zeitouni, N. C., Photodynamic therapy and pain: A systematic review. *Photodiagnosis Photodyn. Ther* **2017**, *19*, 308-344.
101. Sabri, T.; Pawelek, P. D.; Capobianco, J. A., Dual Activity of Rose Bengal Functionalized to Albumin-Coated Lanthanide-Doped Upconverting Nanoparticles: Targeting and Photodynamic Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (32), 26947-26953.
102. Li, Y.; Wang, R.; Xu, Y.; Zheng, W.; Li, Y., Influence of silica surface coating on operated photodynamic therapy property of Yb³⁺-Tm³⁺: Ga (III)-doped ZnO upconversion nanoparticles. *Inorg. Chem.* **2018**, *57* (13), 8012-8018.
103. Jia, J.; Zhang, Y.; Zheng, M.; Shan, C.; Yan, H.; Wu, W.; Gao, X.; Cheng, B.; Liu, W.; Tang, Y., Functionalized Eu (III)-Based Nanoscale Metal–Organic Framework To Achieve Near-IR-Triggered and-Targeted Two-Photon Absorption Photodynamic Therapy. *Inorg. Chem.* **2017**, *57* (1), 300-310.
104. Dasari, S.; Singh, S.; Kumar, P.; Sivakumar, S.; Patra, A. K., Near-infrared excited cooperative upconversion in luminescent Ytterbium (III) bioprobes as light-responsive theranostic agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *163*, 546-559.
105. Ung, P.; Clerc, M. I.; Huang, H.; Qiu, K.; Chao, H.; Seitz, M.; Boyd, B.; Graham, B.; Gasser, G., Extending the Excitation Wavelength of Potential Photosensitizers via

Appendage of a Kinetically Stable Terbium (III) Macrocyclic Complex for Applications in Photodynamic Therapy. *Inorg. Chem.* **2017**, *56* (14), 7960-7974.

106. Schmitt, J.; Jenni, S.; Sour, A.; Heitz, V.; Bolze, F.; Pallier, A.; Bonnet, C. S.; Tóth, É.; Ventura, B., A Porphyrin Dimer–GdDOTA Conjugate as a Theranostic Agent for One- and Two-Photon Photodynamic Therapy and MRI. *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29* (11), 3726-3738.

107. Xu, F.; Zhao, Y.; Hu, M.; Zhang, P.; Kong, N.; Liu, R.; Liu, C.; Choi, S. K., Lanthanide-doped core–shell nanoparticles as a multimodality platform for imaging and photodynamic therapy. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (68), 9525-9528.

108. Pathania, S.; Chawla, P. A., Thiophene-based derivatives as anticancer agents: An overview on decade's work. *Bioorg. Chem.* **2020**, *101*, 104026.

109. Mishra, R.; Sachan, N.; Kumar, N.; Mishra, I.; Chand, P., Thiophene scaffold as prospective antimicrobial agent: A Review. *J. Heterocycl. Chem.* **2018**, *55* (9), 2019-2034.

110. Becker, R. S.; Seixas de Melo, J.; Macanita, A. L.; Elisei, F., Comprehensive evaluation of the absorption, photophysical, energy transfer, structural, and theoretical properties of α -oligothiophenes with one to seven rings. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100* (48), 18683-18695.

111. Cai, Y.; Liang, P.; Tang, Q.; Yang, X.; Si, W.; Huang, W.; Zhang, Q.; Dong, X., Diketopyrrolopyrrole–triphenylamine organic nanoparticles as multifunctional reagents for photoacoustic imaging-guided photodynamic/photothermal synergistic tumor therapy. *ACS nano* **2017**, *11* (1), 1054-1063.

112. Sun, J.; Li, X.; Du, K.; Feng, F., A water soluble donor–acceptor–donor conjugated oligomer as a photosensitizer for mitochondria-targeted photodynamic therapy. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (66), 9194-9197.

113. Rangasamy, S.; Ju, H.; Um, S.; Oh, D.-C.; Song, J. M., Mitochondria and DNA targeting of 5, 10, 15, 20-tetrakis (7-sulfonatobenzo [b] thiophene) porphyrin-induced photodynamic therapy via intrinsic and extrinsic apoptotic cell death. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (17), 6864-6874.

114. Sadiq, F.; Zhao, J.; Hussain, M.; Wang, Z., Effect of thiophene substitution on the intersystem crossing of arene photosensitizers. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2018**, *17* (11), 1794-1803.

115. Salzmann, S.; Kleinschmidt, M.; Tatchen, J.; Weinkauff, R.; Marian, C. M., Excited states of thiophene: ring opening as deactivation mechanism. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10* (3), 380-392.

116. Chauvin, A. S.; Gumy, F.; Imbert, D.; Bünzli, J. C. G., Europium and terbium tris (dipicolinates) as secondary standards for quantum yield determination. *Spectrosc. Lett.* **2004**, *37* (5), 517-532.
117. D'aléo, A.; Picot, A.; Beeby, A.; Gareth Williams, J.; Le Guennic, B.; Andraud, C.; Maury, O., Efficient sensitization of europium, ytterbium, and neodymium functionalized tris-dipicolinate lanthanide complexes through tunable charge-transfer excited states. *Inorg. Chem.* **2008**, *47* (22), 10258-10268.
118. Monteiro, J. H.; Fetto, N. R.; Tucker, M. J.; de Bettencourt-Dias, A., Luminescent Carbazole-Based EuIII and YbIII Complexes with a High Two-Photon Absorption Cross-Section Enable Viscosity Sensing in the Visible and Near IR with One-and Two-Photon Excitation. *Inorg. Chem.* **2020**, *59* (5), 3193-3199.
119. Monteiro, J.; Machado, D.; de Hollanda, L.; Lancellotti, M.; Sigoli, F.; de Bettencourt-Dias, A., Selective cytotoxicity and luminescence imaging of cancer cells with a dipicolinato-based Eu III complex. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (86), 11818-11821.
120. Gassner, A.-L.; Duhot, C.; G. Bünzli, J.-C.; Chauvin, A.-S., Remarkable tuning of the photophysical properties of bifunctional lanthanide tris (dipicolinates) and its consequence on the design of bioprobes. *Inorg. Chem.* **2008**, *47* (17), 7802-7812.
121. Ko, C.-C.; Yam, V. W.-W., Coordination compounds with photochromic ligands: ready tunability and visible light-sensitized photochromism. *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51* (1), 149-159.
122. Zhou, L.; Tanner, P. A.; Zhou, W.; Ai, Y.; Ning, L.; Wu, M. M.; Liang, H., Unique Spectral Overlap and Resonant Energy Transfer between Europium (II) and Ytterbium (III) Cations: No Quantum Cutting. *Angew. Chem.* **2017**, *129* (35), 10493-10497.
123. Ding, D.; Pereira, L. M.; Bauters, J. F.; Heck, M. J.; Welker, G.; Vantomme, A.; Bowers, J. E.; de Dood, M. J.; Bouwmeester, D., Multidimensional Purcell effect in an ytterbium-doped ring resonator. *Nat. Photonics* **2016**, *10* (6), 385.
124. Zhang, Z.; Zhou, Y.; Li, H.; Gao, T.; Yan, P., Visible light sensitized near-infrared luminescence of ytterbium via ILCT states in quadruple-stranded helicates. *Dalton Trans.* **2019**, *48*, 4026-4034.
125. Ning, Y.; Cheng, S.; Wang, J.; Liu, Y.-W.; Feng, W.; Li, F.; Zhang, J.-L., Fluorescence Lifetime Imaging of Upper Gastrointestinal pH In Vivo with a Lanthanide Based Near-Infrared τ Probe. *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 4227-4235.

126. Carnall, W.; Crosswhite, H.; Crosswhite, H. M. Energy level structure and transition probabilities in the spectra of the trivalent lanthanides in LaF₃; *Argonne National Lab.(ANL), Argonne, IL (United States)*: **1978**.
127. Mohamadi, A.; Miller, L. W., Brightly luminescent and kinetically inert lanthanide bioprobes based on linear and preorganized chelators. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27* (10), 2540-2548.
128. Burek, K.; Eidner, S.; Kuke, S.; Kumke, M. U., Intramolecular deactivation processes of electronically excited lanthanide (III) complexes with organic acids of low molecular weight. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2018**, *191*, 36-49.
129. Bender, J. L.; Corbin, P. S.; Fraser, C. L.; Metcalf, D. H.; Richardson, F. S.; Thomas, E. L.; Urbas, A. M., Site-isolated luminescent europium complexes with polyester macroligands: Metal-centered heteroarm stars and nanoscale assemblies with labile block junctions. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (29), 8526-8527.
130. Toftegaard, R.; Arnbjerg, J.; Daasbjerg, K.; Ogilby, P. R.; Dmitriev, A.; Sutherland, D. S.; Poulsen, L., Metal-enhanced 1270 nm singlet oxygen phosphorescence. *Angew. Chem.* **2008**, *120* (32), 6114-6116.
131. Ramesh, H.; Mayr, T.; Hobisch, M.; Borisov, S.; Klimant, I.; Krühne, U.; Woodley, J. M., Measurement of oxygen transfer from air into organic solvents. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2016**, *91* (3), 832-836.
132. Sato, T.; Hamada, Y.; Sumikawa, M.; Araki, S.; Yamamoto, H., Solubility of oxygen in organic solvents and calculation of the Hansen solubility parameters of oxygen. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2014**, *53* (49), 19331-19337.
133. Lucey, B. P.; Nelson-Rees, W. A.; Hutchins, G. M., Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2009**, *133* (9), 1463-1467.
134. Johnson, K. R.; Lombardi, V. C.; de Bettencourt-Dias, A., Photocytotoxicity of Oligothieryl-Functionalized Chelates That Sensitize Ln(III) Luminescence and Generate ¹O₂. *Chem. Eur. J.* **2020**, *26* (52), 12060-12066.
135. Leonidova, A.; Pierroz, V.; Rubbiani, R.; Heier, J.; Ferrari, S.; Gasser, G., Towards cancer cell-specific phototoxic organometallic rhenium (I) complexes. *Dalton Trans.* **2014**, *43* (11), 4287-4294.
136. Banerjee, S.; Prasad, P.; Hussain, A.; Khan, I.; Kondaiah, P.; Chakravarty, A. R., Remarkable photocytotoxicity of curcumin in HeLa cells in visible light and arresting its

degradation on oxovanadium (IV) complex formation. *Chem. Commun.* **2012**, 48 (62), 7702-7704.

137. Delaey, E.; van Laar, F.; De Vos, D.; Kamuhabwa, A.; Jacobs, P.; de Witte, P., A comparative study of the photosensitizing characteristics of some cyanine dyes. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **2000**, 55 (1), 27-36.

138. Span, L.; Pennings, A.; Vierwinden, G.; Boezeman, J.; Raymakers, R.; De Witte, T., The dynamic process of apoptosis analyzed by flow cytometry using Annexin-V/propidium iodide and a modified in situ end labeling technique. *Cytom., j. Int. Soc. Anal. Cytol* **2002**, 47 (1), 24-31.

139. Vermes, I.; Haanen, C.; Steffens-Nakken, H.; Reutellingsperger, C., A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *J. Immunol. Methods* **1995**, 184 (1), 39-51.

140. Kanduc, D.; Mittelman, A.; Serpico, R.; Sinigaglia, E.; Sinha, A. A.; Natale, C.; Santacroce, R.; Di Corcia, M. G.; Lucchese, A.; Dini, L., Cell death: apoptosis versus necrosis. *Int. J. Oncol.* **2002**, 21 (1), 165-170.

141. Lv, Z.; Zou, L.; Wei, H.; Liu, S.; Huang, W.; Zhao, Q., Phosphorescent Starburst Pt(II) Porphyrins as Bifunctional Therapeutic Agents for Tumor Hypoxia Imaging and Photodynamic Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, 10 (23), 19523-19533.

142. Oleinick, N. L.; Evans, H. H., The Photobiology of Photodynamic Therapy: Cellular Targets and Mechanisms. *Radiat. Res.* **1998**, 150 (5s), S146-S156.

143. Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R., Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn. Ther* **2004**, 1 (4), 279-293.

144. Piette, J.; Volanti, C.; Vantieghem, A.; Matroule, J.-Y.; Habraken, Y.; Agostinis, P., Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane-bound photosensitizers. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, 66 (8), 1651-1659.

145. Castano, A. P.; Mroz, P.; Hamblin, M. R., Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat. Rev. Cancer.* **2006**, 6 (7), 535-545.

146. Allegra, A.; Pioggia, G.; Tonacci, A.; Musolino, C.; Gangemi, S., Oxidative Stress and Photodynamic Therapy of Skin Cancers: Mechanisms, Challenges and Promising Developments. *Antioxidants* **2020**, 9 (5), 448.

147. Dai, Z.; Tian, L.; Xiao, Y.; Ye, Z.; Zhang, R.; Yuan, J., A cell-membrane-permeable europium complex as an efficient luminescent probe for singlet oxygen. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1* (7), 924-927.
148. Song, B.; Wang, G.; Tan, M.; Yuan, J., A europium (III) complex as an efficient singlet oxygen luminescence probe. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (41), 13442-13450.
149. Chauvin, A. S.; Comby, S.; Song, B.; Vandevyver, C. D.; Thomas, F.; Bünzli, J. C. G., A polyoxyethylene-substituted bimetallic europium helicate for luminescent staining of living cells. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13* (34), 9515-9526.
150. Yousif, L. F.; Stewart, K. M.; Kelley, S. O., Targeting mitochondria with organelle-specific compounds: strategies and applications. *ChemBioChem* **2009**, *10* (12), 1939-1950.
151. D'Souza, G. G.; Wagle, M. A.; Saxena, V.; Shah, A., Approaches for targeting mitochondria in cancer therapy. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **2011**, *1807* (6), 689-696.
152. Edeas, M.; Weissig, V., Targeting mitochondria: strategies, innovations and challenges: the future of medicine will come through mitochondria. Elsevier: 2013.
153. Manda, G.; Nechifor, M. T.; Neagu, T.-M., Reactive oxygen species, cancer and anti-cancer therapies. *Curr. Chem. Biol.* **2009**, *3* (1), 22-46.
154. Liu, X.; Tang, Z.; Song, B.; Ma, H.; Yuan, J., A mitochondria-targeting time-gated luminescence probe for hypochlorous acid based on a europium complex. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5* (15), 2849-2855.
155. Liu, X.; Song, B.; Ma, H.; Tang, Z.; Yuan, J., Development of a mitochondria targetable ratiometric time-gated luminescence probe for biothiols based on lanthanide complexes. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6* (12), 1844-1851.
156. Divya, V.; Sankar, V.; Raghu, K.; Reddy, M., A mitochondria-specific visible-light sensitized europium β -diketonate complex with red emission. *Dalton Trans.* **2013**, *42* (34), 12317-12323.
157. Rodrigues, C. V.; Johnson, K. R.; Lombardi, V. C.; Rodrigues, M. O.; Sobrinho, J. A.; de Bettencourt-Dias, A., Photocytotoxicity of Thiophene-and Bithiophene-Dipicolinato Luminescent Lanthanide Complexes. *J. Med. Chem.* **2021**.
158. Pilleron, S.; Soto-Perez-de-Celis, E.; Vignat, J.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Bray, F.; Sarfati, D., Estimated global cancer incidence in the oldest adults in 2018 and projections to 2050. *Int. J. Cancer Res.* **2021**, *148* (3), 601-608.
159. Santos, C. A. d.; Souza, D. L. B., Melanoma mortality in Brazil: trends and projections (1998-2032). *Ciênc. Saúde Colet* **2019**, *24*, 1551-1561.

160. Mustafa, F.; Andreescu, S., Nanotechnology-based approaches for food sensing and packaging applications. *RSC Adv.* **2020**, *10* (33), 19309-19336.
161. Shang, Y.; Hasan, M.; Ahammed, G. J.; Li, M.; Yin, H.; Zhou, J., Applications of nanotechnology in plant growth and crop protection: a review. *Molecules* **2019**, *24* (14), 2558.
162. Chauhan, D. S.; Prasad, R.; Srivastava, R.; Jaggi, M.; Chauhan, S. C.; Yallapu, M. M., Comprehensive review on current interventions, diagnostics, and nanotechnology perspectives against SARS-CoV-2. *Bioconjugate Chem.* **2020**, *31* (9), 2021-2045.
163. Saka, R.; Chella, N., Nanotechnology for delivery of natural therapeutic substances: a review. *Environ. Chem. Lett.* **2020**, *19*, 1-10.
164. Contreras, J.; Rodriguez, E.; Taha-Tijerina, J., Nanotechnology applications for electrical transformers—A review. *Electr. Power Syst. Res* **2017**, *143*, 573-584.
165. Babatunde, D. E.; Denwigwe, I. H.; Babatunde, O. M.; Gbadamosi, S. L.; Babalola, I. P.; Agboola, O., Environmental and societal impact of nanotechnology. *IEEE Access* **2019**, *8*, 4640-4667.
166. Xu, X.; Ray, R.; Gu, Y.; Ploehn, H. J.; Gearheart, L.; Raker, K.; Scrivens, W. A., Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (40), 12736-12737.
167. Himaja, A.; Karthik, P.; Singh, S. P., Carbon dots: the newest member of the carbon nanomaterials family. *Chem. Rec* **2015**, *15* (3), 595-615.
168. Panwar, N.; Soehartono, A. M.; Chan, K. K.; Zeng, S.; Xu, G.; Qu, J.; Coquet, P.; Yong, K.-T.; Chen, X., Nanocarbons for Biology and Medicine: Sensing, Imaging, and Drug Delivery. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (16), 9559-9656.
169. Fan, W.; Yung, B.; Huang, P.; Chen, X., Nanotechnology for multimodal synergistic cancer therapy. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (22), 13566-13638.
170. Labhasetwar, V.; Zborowski, M.; Abramson, A. R.; Basilion, J. P., Nanoparticles for imaging, diagnosis, and therapeutics. *Mol. Pharmaceutics* **2009**, *6* (5), 1261-1262.
171. Maeda, H.; Nakamura, H.; Fang, J., The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65* (1), 71-79.
172. Irvine, D. J.; Dane, E. L., Enhancing cancer immunotherapy with nanomedicine. *Nat. Rev. Immunol.* **2020**, *20* (5), 321-334.
173. Wang, L.; Huang, J.; Chen, H.; Wu, H.; Xu, Y.; Li, Y.; Yi, H.; Wang, Y. A.; Yang, L.; Mao, H., Exerting enhanced permeability and retention effect driven delivery by ultrafine

iron oxide nanoparticles with T₁–T₂ switchable magnetic resonance imaging contrast. *ACS Nano* **2017**, *11* (5), 4582-4592.

174. Rios-Doria, J.; Durham, N.; Wetzel, L.; Rothstein, R.; Chesebrough, J.; Holoweckyj, N.; Zhao, W.; Leow, C. C.; Hollingsworth, R., Doxil synergizes with cancer immunotherapies to enhance antitumor responses in syngeneic mouse models. *Neoplasia* **2015**, *17* (8), 661-670.

175. Tsukioka, Y.; Matsumura, Y.; Hamaguchi, T.; Koike, H.; Moriyasu, F.; Kakizoe, T., Pharmaceutical and biomedical differences between micellar doxorubicin (NK911) and liposomal doxorubicin (Doxil). *Jpn J Cancer Res* **2002**, *93* (10), 1145-1153.

176. Jurj, A.; Braicu, C.; Pop, L.-A.; Tomuleasa, C.; Gherman, C. D.; Berindan-Neagoe, I., The new era of nanotechnology, an alternative to change cancer treatment. *Drug Des. Dev. Ther* **2017**, *11*, 2871.

177. Jain, V.; Kumar, H.; Anod, H. V.; Chand, P.; Gupta, N. V.; Dey, S.; Kesharwani, S. S., A review of nanotechnology-based approaches for breast cancer and triple-negative breast cancer. *J. Control. Release* **2020**.

178. Fabbro, C.; Ali-Boucetta, H.; Da Ros, T.; Kostarelos, K.; Bianco, A.; Prato, M., Targeting carbon nanotubes against cancer. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (33), 3911-3926.

179. Domingues, B.; Lopes, J. M.; Soares, P.; Pópulo, H., Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets Ther* **2018**, *7*, 35.

180. Dika, E.; Lambertini, M.; Pellegrini, C.; Veronesi, G.; Melotti, B.; Riefolo, M.; Sperandi, F.; Patrizi, A.; Ricci, C.; Mussi, M., Cutaneous and Mucosal Melanomas of Uncommon Sites: Where Do We Stand Now? *J. Clin. Med.* **2021**, *10* (3), 478.

181. Merkel, E. A.; Gerami, P., Malignant melanoma of sun-protected sites: a review of clinical, histological, and molecular features. *Lab. Investig* **2017**, *97* (6), 630-635.

182. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F., Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: Cancer J. Clin.* **2021**, *71* (3), 209-249.

183. Marie, K. L.; Sassano, A.; Yang, H. H.; Michalowski, A. M.; Michael, H. T.; Guo, T.; Tsai, Y. C.; Weissman, A. M.; Lee, M. P.; Jenkins, L. M., Melanoblast transcriptome analysis reveals pathways promoting melanoma metastasis. *Nat. Commun* **2020**, *11* (1), 1-18.

184. Davoodvandi, A.; Darvish, M.; Borran, S.; Nejati, M.; Mazaheri, S.; Tamtaji, O. R.; Hamblin, M. R.; Masoudian, N.; Mirzaei, H., The therapeutic potential of resveratrol in a mouse model of melanoma lung metastasis. *Int. Immunopharmacol.* **2020**, *88*, 106905.

185. Rebecca, V. W.; Somasundaram, R.; Herlyn, M., Pre-clinical modeling of cutaneous melanoma. *Nat. Commun* **2020**, *11* (1), 1-9.
186. Balkwill, F.; Mantovani, A., Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* **2001**, *357* (9255), 539-545.
187. Tan, S.; Li, D.; Zhu, X., Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *124*, 109821.
188. Leonardi, G. C.; Candido, S.; Falzone, L.; Spandidos, D. A.; Libra, M., Cutaneous melanoma and the immunotherapy revolution. *Int. J. Oncol.* **2020**, *57* (3), 609-618.
189. Hong, G.; Diao, S.; Antaris, A. L.; Dai, H., Carbon nanomaterials for biological imaging and nanomedicinal therapy. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (19), 10816-10906.
190. Baker, S. N.; Baker, G. A., Luminescent carbon nanodots: emergent nanolights. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49* (38), 6726-6744.
191. Li, H.; Kang, Z.; Liu, Y.; Lee, S.-T., Carbon nanodots: synthesis, properties and applications. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22* (46), 24230-24253.
192. Yang, Z.-C.; Wang, M.; Yong, A. M.; Wong, S. Y.; Zhang, X.-H.; Tan, H.; Chang, A. Y.; Li, X.; Wang, J., Intrinsically fluorescent carbon dots with tunable emission derived from hydrothermal treatment of glucose in the presence of monopotassium phosphate. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (42), 11615-11617.
193. Schneider, J.; Reckmeier, C. J.; Xiong, Y.; von Seckendorff, M.; Susa, A. S.; Kasák, P.; Rogach, A. L., Molecular fluorescence in citric acid-based carbon dots. *J. Phys. Chem. C* **2017**, *121* (3), 2014-2022.
194. Rodrigues, C. V.; Correa, J. R.; Aiube, C. M.; Andrade, L. P.; Galvão, P. M.; Costa, P. A.; Campos, A. L.; Pereira, A. J.; Ghesti, G. F.; Felix, J. F., Down-and up-conversion photoluminescence of carbon-dots from brewing industry waste: application in live cell-imaging experiments. *J. Braz. Chem* **2015**, *26* (12), 2623-2628.
195. Xu, J.; Lai, T.; Feng, Z.; Weng, X.; Huang, C., Formation of fluorescent carbon nanodots from kitchen wastes and their application for detection of Fe³⁺. *J. Lumin.* **2015**, *30* (4), 420-424.
196. Kiran, S.; Misra, R., Mechanism of intracellular detection of glucose through nonenzymatic and boronic acid functionalized carbon dots. *J. Biomed. Mater. Res.* **2015**, *103* (9), 2888-2897.
197. Zhou, J.; Sheng, Z.; Han, H.; Zou, M.; Li, C., Facile synthesis of fluorescent carbon dots using watermelon peel as a carbon source. *Mater. Lett.* **2012**, *66* (1), 222-224.

198. Fang, Y.; Guo, S.; Li, D.; Zhu, C.; Ren, W.; Dong, S.; Wang, E., Easy synthesis and imaging applications of cross-linked green fluorescent hollow carbon nanoparticles. *ACS nano* **2012**, *6* (1), 400-409.
199. Li, D.; Jing, P.; Sun, L.; An, Y.; Shan, X.; Lu, X.; Zhou, D.; Han, D.; Shen, D.; Zhai, Y., Near-infrared excitation/emission and multiphoton-induced fluorescence of carbon dots. *J. Adv. Mater.* **2018**, *30* (13), 1705913.
200. Zhu, S.; Zhang, J.; Tang, S.; Qiao, C.; Wang, L.; Wang, H.; Liu, X.; Li, B.; Li, Y.; Yu, W., Surface chemistry routes to modulate the photoluminescence of graphene quantum dots: from fluorescence mechanism to up-conversion bioimaging applications. *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22* (22), 4732-4740.
201. Wang, F.; Xie, Z.; Zhang, B.; Liu, Y.; Yang, W.; Liu, C.-y., Down-and up-conversion luminescent carbon dot fluid: inkjet printing and gel glass fabrication. *Nanoscale* **2014**, *6* (7), 3818-3823.
202. Zhang, Y.; He, J., Facile synthesis of S, N co-doped carbon dots and investigation of their photoluminescence properties. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17* (31), 20154-20159.
203. Wen, X.; Yu, P.; Toh, Y.-R.; Ma, X.; Tang, J., On the upconversion fluorescence in carbon nanodots and graphene quantum dots. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (36), 4703-4706.
204. Rabe, D. I. A.; Al Awak, M. M.; Yang, F.; Okonjo, P. A.; Dong, X.; Teisl, L. R.; Wang, P.; Tang, Y.; Pan, N.; Sun, Y.-P., The dominant role of surface functionalization in carbon dots' photo-activated antibacterial activity. *Int. J. Nanomed* **2019**, *14*, 2655.
205. Kundelev, E. V.; Tepliakov, N. V.; Leonov, M. Y.; Maslov, V. G.; Baranov, A. V.; Fedorov, A. V.; Rukhlenko, I. D.; Rogach, A. L., Toward Bright Red-Emissive Carbon Dots through Controlling Interaction among Surface Emission Centers. *J. Phys. Chem. Letters* **2020**, *11* (19), 8121-8127.
206. Miao, X.; Qu, D.; Yang, D.; Nie, B.; Zhao, Y.; Fan, H.; Sun, Z., Synthesis of carbon dots with multiple color emission by controlled graphitization and surface functionalization. *J. Adv. Mater.* **2018**, *30* (1), 1704740.
207. Li, M.-Y.; Xiao, C.-Q.; Xu, Z.-Q.; Yin, M.-M.; Yang, Q.-Q.; Yin, Y.-L.; Liu, Y., Role of surface charge on the interaction between carbon nanodots and human serum albumin. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2018**, *204*, 484-494.
208. Ding, H.; Zhou, X.; Qin, B.; Zhou, Z.; Zhao, Y., Highly fluorescent near-infrared emitting carbon dots derived from lemon juice and its bioimaging application. *J. Lumin.* **2019**, *211*, 298-304.

209. Hsu, P.-C.; Shih, Z.-Y.; Lee, C.-H.; Chang, H.-T., Synthesis and analytical applications of photoluminescent carbon nanodots. *Green Chem.* **2012**, *14* (4), 917-920.
210. D'Angelis do ES Barbosa, C.; Corrêa, J. R.; Medeiros, G. A.; Barreto, G.; Magalhães, K. G.; de Oliveira, A. L.; Spencer, J.; Rodrigues, M. O.; Neto, B. A., Carbon dots (C-dots) from cow manure with impressive subcellular selectivity tuned by simple chemical modification. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21* (13), 5055-5060.
211. Gao, M. X.; Yang, L.; Zheng, Y.; Yang, X. X.; Zou, H. Y.; Han, J.; Liu, Z. X.; Li, Y. F.; Huang, C. Z., "Click" on alkynylated carbon quantum dots: an efficient surface functionalization for specific biosensing and bioimaging. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23* (9), 2171-2178.
212. D'Angelis do ES Barbosa, C.; Corrêa, J. R.; Medeiros, G. A.; Barreto, G.; Magalhães, K. G.; de Oliveira, A. L.; Spencer, J.; Rodrigues, M. O.; Amaro Neto, B., Carbon dots (C-dots) from cow manure with impressive subcellular selectivity tuned by simple chemical modification. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21* (13), 5055-5060.
213. Ge, J.; Jia, Q.; Liu, W.; Lan, M.; Zhou, B.; Guo, L.; Zhou, H.; Zhang, H.; Wang, Y.; Gu, Y., Carbon dots with intrinsic theranostic properties for bioimaging, red-light-triggered photodynamic/photothermal simultaneous therapy in vitro and in vivo. *Adv. Healthc. Mater.* **2016**, *5* (6), 665-675.
214. Petros, R. A.; DeSimone, J. M., Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9* (8), 615-627.
215. Dutta Choudhury, S.; Chethodil, J. M.; Gharat, P. M.; PK, P.; Pal, H., pH-elicited luminescence functionalities of carbon dots: mechanistic insights. *J. Phys. Chem. letters* **2017**, *8* (7), 1389-1395.
216. Ding, C.; Zhu, A.; Tian, Y., Functional Surface Engineering of C-Dots for Fluorescent Biosensing and in Vivo Bioimaging. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47* (1), 20-30.
217. Li, X.; Zhang, S.; Kulinich, S. A.; Liu, Y.; Zeng, H., Engineering surface states of carbon dots to achieve controllable luminescence for solid-luminescent composites and sensitive Be²⁺ detection. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 4976.
218. Divya, S.; Narayan, S.; Ainarapu, S. R. K.; Khushalani, D., Insight into the Excitation-Dependent Fluorescence of Carbon Dots. *ChemPhysChem* **2019**, *20* (7), 984-990.
219. Hu, Q.; Paa, M. C.; Zhang, Y.; Chan, W.; Gong, X.; Zhang, L.; Choi, M. M., Capillary electrophoretic study of amine/carboxylic acid-functionalized carbon nanodots. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1304*, 234-240.

220. Kwon, W.; Lee, G.; Do, S.; Joo, T.; Rhee, S. W., Size-controlled soft-template synthesis of carbon nanodots toward versatile photoactive materials. *Small* **2014**, *10* (3), 506-513.
221. Pappalardo, J. S.; Macairan, J.-R.; Macina, A.; Poulhazan, A.; Quattrocchi, V.; Marcotte, I.; Naccache, R., Effects of polydopamine-passivation on the optical properties of carbon dots and its potential use in vivo. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2020**, *22* (29), 16595-16605.
222. Kang, S.; Jeong, Y. K.; Ryu, J. H.; Son, Y.; Kim, W. R.; Lee, B.; Jung, K. H.; Kim, K. M., Pulsed laser ablation based synthetic route for nitrogen-doped graphene quantum dots using graphite flakes. *Appl. Surf. Sci.* **2020**, *506*, 144998.
223. LeCroy, G. E.; Messina, F.; Sciortino, A.; Bunker, C. E.; Wang, P.; Fernando, K. S.; Sun, Y.-P., Characteristic excitation wavelength dependence of fluorescence emissions in carbon “quantum” dots. *J. Phys. Chem. C* **2017**, *121* (50), 28180-28186.
224. Cheng, K.; Qi, R.; Lan, S.; Wang, H.; Zheng, X.; Liu, C.; Jia, D.; Cao, L.; Wang, D., Tunable excitation-dependent-fluorescence of carbon dots: Fingerprint curves for super anti-counterfeiting. *Dyes Pigm.* **2020**, *174*, 108106.
225. Sun, X.; James, T. D.; Anslyn, E. V., Arresting “Loose Bolt” internal conversion from B (OH) 2 groups is the mechanism for emission turn-on in ortho-aminomethylphenylboronic acid-based saccharide sensors. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (6), 2348-2354.
226. Bourlinos, A. B.; Trivizas, G.; Karakassides, M. A.; Baikousi, M.; Kouloumpis, A.; Gournis, D.; Bakandritsos, A.; Hola, K.; Kozak, O.; Zboril, R., Green and simple route toward boron doped carbon dots with significantly enhanced non-linear optical properties. *Carbon* **2015**, *83*, 173-179.
227. Shen, P.; Xia, Y., Synthesis-modification integration: one-step fabrication of boronic acid functionalized carbon dots for fluorescent blood sugar sensing. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (11), 5323-5329.
228. Zou, W.-S.; Ye, C.-H.; Wang, Y.-Q.; Li, W.-H.; Huang, X.-H., A hybrid ratiometric probe for glucose detection based on synchronous responses to fluorescence quenching and resonance light scattering enhancement of boronic acid functionalized carbon dots. *Sens. Actuators B Chem.* **2018**, *271*, 54-63.
229. Xu, S.; Che, S.; Ma, P.; Zhang, F.; Xu, L.; Liu, X.; Wang, X.; Song, D.; Sun, Y., One-step fabrication of boronic-acid-functionalized carbon dots for the detection of sialic acid. *Talanta* **2019**, *197*, 548-552.

230. Zhang, X.; Chai, L.; Nie, S.; Lv, C.; Wang, Q.; Li, Z., Facile synthesis of boronic acid-decorated carbon nanodots as optical nanoprobe for glycoprotein sensing. *Analyst* **2019**, *144* (6), 1975-1981.
231. Krishna, A. S.; Nair, P. A.; Radhakumary, C.; Sreenivasan, K., Carbon dot based non enzymatic approach for the detection and estimation of glucose in blood serum. *Mater. Res. Express* **2016**, *3* (5), 055001.
232. Qu, Z.-b.; Zhou, X.; Gu, L.; Lan, R.; Sun, D.; Yu, D.; Shi, G., Boronic acid functionalized graphene quantum dots as a fluorescent probe for selective and sensitive glucose determination in microdialysate. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (84), 9830-9832.
233. Fang, G.; Wang, H.; Bian, Z.; Sun, J.; Liu, A.; Fang, H.; Liu, B.; Yao, Q.; Wu, Z., Recent development of boronic acid-based fluorescent sensors. *RSC Adv.* **2018**, *8* (51), 29400-29427.
234. Havrdova, M.; Hola, K.; Skopalik, J.; Tomankova, K.; Petr, M.; Cepe, K.; Polakova, K.; Tucek, J.; Bourlinos, A. B.; Zboril, R., Toxicity of carbon dots—Effect of surface functionalization on the cell viability, reactive oxygen species generation and cell cycle. *Carbon* **2016**, *99*, 238-248.
235. Wang, B.; Wang, Y.; Wu, H.; Song, X.; Guo, X.; Zhang, D.; Ma, X.; Tan, M., A mitochondria-targeted fluorescent probe based on TPP-conjugated carbon dots for both one- and two-photon fluorescence cell imaging. *RSC Adv.* **2014**, *4* (91), 49960-49963.
236. Du, F.; Min, Y.; Zeng, F.; Yu, C.; Wu, S., A targeted and FRET-based ratiometric fluorescent nanoprobe for imaging mitochondrial hydrogen peroxide in living cells. *Small* **2014**, *10* (5), 964-972.
237. Hua, X.-W.; Bao, Y.-W.; Chen, Z.; Wu, F.-G., Carbon quantum dots with intrinsic mitochondrial targeting ability for mitochondria-based theranostics. *Nanoscale* **2017**, *9* (30), 10948-10960.
238. Zielonka, J.; Joseph, J.; Sikora, A.; Hardy, M.; Ouari, O.; Vasquez-Vivar, J.; Cheng, G.; Lopez, M.; Kalyanaraman, B., Mitochondria-targeted triphenylphosphonium-based compounds: syntheses, mechanisms of action, and therapeutic and diagnostic applications. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (15), 10043-10120.
239. Zhang, Y.; Shen, Y.; Teng, X.; Yan, M.; Bi, H.; Morais, P. C., Mitochondria-Targeting Nanoplatfrom with Fluorescent Carbon Dots for Long Time Imaging and Magnetic Field-Enhanced Cellular Uptake. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (19), 10201-10212.

240. Salinas-Jazmín, N.; De La Fuente, M.; Jaimez, R.; Pérez-Tapia, M.; Pérez-Torres, A.; Velasco-Velázquez, M. A., Antimetastatic, antineoplastic, and toxic effects of 4-hydroxycoumarin in a preclinical mouse melanoma model. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2010**, *65* (5), 931-940.
241. Long, Y.; Lu, Z.; Mei, L.; Li, M.; Ren, K.; Wang, X.; Tang, J.; Zhang, Z.; He, Q., Enhanced Melanoma-Targeted Therapy by “Fru-Blocked” Phenyboronic Acid-Modified Multiphase Antimetastatic Micellar Nanoparticles. *Adv. Sci.* **2018**, *5* (11), 1800229.
242. Liu, H.; Li, Y.; Sun, K.; Fan, J.; Zhang, P.; Meng, J.; Wang, S.; Jiang, L., Dual-responsive surfaces modified with phenylboronic acid-containing polymer brush to reversibly capture and release cancer cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (20), 7603-7609.
243. Otsuka, H.; Uchimura, E.; Koshino, H.; Okano, T.; Kataoka, K., Anomalous binding profile of phenylboronic acid with N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) in aqueous solution with varying pH. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (12), 3493-3502.
244. Licciardello, N.; Hunoldt, S.; Bergmann, R.; Singh, G.; Mamat, C.; Faramus, A.; Ddungu, J. L.; Silvestrini, S.; Maggini, M.; De Cola, L., Biodistribution studies of ultrasmall silicon nanoparticles and carbon dots in experimental rats and tumor mice. *Nanoscale* **2018**, *10* (21), 9880-9891.
245. Wang, L.; Shen, Y.; Song, R.; Sun, Y.; Xu, J.; Xu, Q., An anticancer effect of curcumin mediated by down-regulating phosphatase of regenerating liver-3 expression on highly metastatic melanoma cells. *Mol. Pharmacol.* **2009**, *76* (6), 1238-1245.
246. Crane, G. M.; Liu, Y.-C.; Chadburn, A. In Spleen: Development, anatomy and reactive lymphoid proliferations, *Semin Diagn Pathol.* **2020**, *38* (2), 112-124.
247. Martínez Conesa, C.; Vicente Ortega, V.; Yáñez Gascón, M. J.; Alcaraz Baños, M.; Canteras Jordana, M.; Benavente-García, O.; Castillo, J., Treatment of metastatic melanoma B16F10 by the flavonoids tangeretin, rutin, and diosmin. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (17), 6791-6797.
248. Beack, S.; Kong, W. H.; Jung, H. S.; Do, I. H.; Han, S.; Kim, H.; Kim, K. S.; Yun, S. H.; Hahn, S. K., Photodynamic therapy of melanoma skin cancer using carbon dot–chlorin e6–hyaluronate conjugate. *Acta Biomater.* **2015**, *26*, 295-305.
249. Goldberg, M. S., Immunoengineering: how nanotechnology can enhance cancer immunotherapy. *Cell* **2015**, *161* (2), 201-204.
250. Horst, F. H.; da Silva Rodrigues, C. V.; Carvalho, P. H. P. R.; Leite, A. M.; Azevedo, R. B.; Neto, B. A.; Corrêa, J. R.; Garcia, M. P.; Alotaibi, S.; Henini, M., From cow manure

- to bioactive carbon dots: a light-up probe for bioimaging investigations, glucose detection and potential immunotherapy agent for melanoma skin cancer. *RSC Adv.* **2021**, *11* (11), 6346-6352.
251. Hu, M.; Qi, J.; Ruan, J.; Shen, G., Highly Sensitive Detection of Glucose by a. *J. Biomed. Nanotechnol* **2018**, *14* (6), 1117-1124.
252. Stoodley, R.; Wasan, K. M.; Bizzotto, D., Fluorescence of amphotericin B-deoxycholate (Fungizone) monomers and aggregates and the effect of heat-treatment. *Langmuir* **2007**, *23* (17), 8718-8725.
253. Newcomer, V. D.; Sternberg, T. H.; Wright, E. T.; Reisner, R. M.; McNall, E. G.; Sorensen, L. J., The treatment of systemic fungus infections with amphotericin B. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1960**, *89* (1), 221-239.
254. McNamara, C.; Crawford, J.; Hickman, B.; Norwood, T.; Rawlings, B., Biosynthesis of amphotericin B. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1998**, (1), 83-88.
255. Brajtburg, J.; Bolard, J., Carrier effects on biological activity of amphotericin B. *Clin. Microbiol. Rev.* **1996**, *9* (4), 512-531.
256. Alsina-Gibert, M.; López-Lerma, I.; Martinez-Chamorro, E.; Herrero-Mateu, C., Cutaneous manifestations of visceral leishmaniasis resistant to liposomal amphotericin B in an HIV-positive patient. *Arch. Dermatol.* **2006**, *142* (6), 781-798.
257. Grace, E.; Asbill, S.; Virga, K., Naegleria fowleri: pathogenesis, diagnosis, and treatment options. *Antimicrob Agents Chemother* **2015**, *59* (11), 6677-6681.
258. Lemke, A.; Kiderlen, A. F.; Petri, B.; Kayser, O., Delivery of amphotericin B nanosuspensions to the brain and determination of activity against Balamuthia mandrillaris amebas. *Nanomed.: Nanotechnol. Biol. Med.* **2010**, *6* (4), 597-603.
259. AL-Khikani, F. H. O., Amphotericin B as antiviral drug: Possible efficacy against COVID-19. *Ann. Thorac. Med.* **2020**, *15* (3), 118.
260. Rath, S.; Trivelin, L. A.; Imbrunito, T. R.; Tomazela, D. M.; Jesús, M. N. d.; Marzal, P. C.; Andrade Junior, H. F. d.; Tempone, A. G., Antimonials employed in the treatment of leishmaniasis: the state of the art. *Quim Nova* **2003**, *26* (4), 550-555.
261. Tutaj, K.; Szlajak, R.; Starzyk, J.; Wasko, P.; Grudzinski, W.; Gruszecki, W. I.; Luchowski, R., The orientation of the transition dipole moments of a polyene antibiotic Amphotericin B under UV-VIS studies. *Journal of Photochem. Photobiol. B: Biology* **2015**, *151*, 83-88.
262. Saúde, M. d., Manual de Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar Americana. Saúde, S. d. V. e., Ed. **2010**.

263. Kintali, S.; Kishor Varshney, G.; Das, K., Interaction of Amphotericin B with Ergosterol/Cholesterol-Containing POPG Liposomes Studied by Absorption, Fluorescence and Second Harmonic Spectroscopy. *ChemistrySelect* **2018**, *3* (38), 10559-10565.
264. Wasko, P.; Luchowski, R.; Tutaj, K.; Grudzinski, W.; Adamkiewicz, P.; Gruszecki, W. I., Toward understanding of toxic side effects of a polyene antibiotic amphotericin B: fluorescence spectroscopy reveals widespread formation of the specific supramolecular structures of the drug. *Mol. Pharm* **2012**, *9* (5), 1511-1520.
265. Yu, B.; Okano, T.; Kataoka, K.; Kwon, G., Polymeric micelles for drug delivery: solubilization and haemolytic activity of amphotericin B. *J. Control. Release* **1998**, *53* (1-3), 131-136.
266. Starzyk, J.; Gruszecki, M.; Tutaj, K.; Luchowski, R.; Szlajak, R.; Wasko, P.; Grudzinski, W.; Czub, J.; Gruszecki, W. I., Self-association of amphotericin B: spontaneous formation of molecular structures responsible for the toxic side effects of the antibiotic. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118* (48), 13821-13832.
267. Barwicz, J.; Christian, S.; Gruda, I., Effects of the aggregation state of amphotericin B on its toxicity to mice. *Antimicrob Agents Chemother* **1992**, *36* (10), 2310-2315.
268. Matsumori, N.; Eiraku, N.; Matsuoka, S.; Oishi, T.; Murata, M.; Aoki, T.; Ide, T., An amphotericin B-ergosterol covalent conjugate with powerful membrane permeabilizing activity. *Chem. Biol* **2004**, *11* (5), 673-679.
269. Zager, R. A., Polyene antibiotics: relative degrees of in vitro cytotoxicity and potential effects on tubule phospholipid and ceramide content. *Am. J. Kidney Dis.* **2000**, *36* (2), 238-249.
270. Gintjee, T. J.; Donnelley, M. A.; Thompson, G. R., Aspiring Antifungals: Review of Current Antifungal Pipeline Developments. *J. Fungi* **2020**, *6* (1), 28.
271. Wijnant, G.-J.; Van Bocxlaer, K.; Yardley, V.; Harris, A.; Alavijeh, M.; Silva-Pedrosa, R.; Antunes, S.; Mauricio, I.; Murdan, S.; Croft, S. L., Comparative efficacy, toxicity and biodistribution of the liposomal amphotericin B formulations Fungisome® and AmBisome® in murine cutaneous leishmaniasis. *Int. J. Parasitol.: Drugs Drug Resist.* **2018**, *8* (2), 223-228.
272. Perkins, W. R.; Minchey, S. R.; Boni, L. T.; Swenson, C. E.; Popescu, M. C.; Pasternack, R. F.; Janoff, A. S., Amphotericin B-phospholipid interactions responsible for reduced mammalian cell toxicity. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1992**, *1107* (2), 271-282.

273. Cuddihy, G.; Wasan, E. K.; Di, Y.; Wasan, K. M., The development of oral amphotericin B to treat systemic fungal and parasitic infections: has the myth been finally realized? *Pharmaceutics* **2019**, *11* (3), 99.
274. Medicamentos, C. d. R. d. M. d., Preços Máximos de Medicamentos por Princípio Ativo. Executiva, S., Ed. **2021**.
275. Jafari, M.; Abolmaali, S. S.; Tamaddon, A. M.; Zomorodian, K.; Shahriarirad, B., Nanotechnology approaches for delivery and targeting of Amphotericin B in fungal and parasitic diseases. *Nanomed. J.* **2021**, *16* (10), 857-877.
276. Wang, Y.; Ke, X.; Voo, Z. X.; Yap, S. S. L.; Yang, C.; Gao, S.; Liu, S.; Venkataraman, S.; Obuobi, S. A. O.; Khara, J. S., Biodegradable functional polycarbonate micelles for controlled release of amphotericin B. *Acta Biomater.* **2016**, *46*, 211-220.
277. Saldanha, C. A.; Garcia, M. P.; Iocca, D. C.; Rebelo, L. G.; Souza, A. C. O.; Bocca, A. L.; Almeida Santos, M. d. F. M.; Morais, P. C.; Azevedo, R. B., Antifungal activity of amphotericin B conjugated to nanosized magnetite in the treatment of paracoccidioidomycosis. *PLOS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10* (6), e0004754.
278. Wu, W.; Wieckowski, S.; Pastorin, G.; Benincasa, M.; Klumpp, C.; Briand, J. P.; Gennaro, R.; Prato, M.; Bianco, A., Targeted delivery of amphotericin B to cells by using functionalized carbon nanotubes. *Angew. Chem.* **2005**, *117* (39), 6516-6520.
279. Benincasa, M.; Pacor, S.; Wu, W.; Prato, M.; Bianco, A.; Gennaro, R., Antifungal activity of amphotericin B conjugated to carbon nanotubes. *ACS nano* **2011**, *5* (1), 199-208.
280. Santos, D. O.; Coutinho, C. E.; Madeira, M. F.; Bottino, C. G.; Vieira, R. T.; Nascimento, S. B.; Bernardino, A.; Bourguignon, S. C.; Corte-Real, S.; Pinho, R. T., Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review. *Parasitol. Res.* **2008**, *103* (1), 1-10.
281. Berman, J., Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin. Infect. Dis.* **1997**, *24* (4), 684-703.
282. Cunha, H.; Martins, F. d. A. P.; Peterka, C. R. L., Comportamento Epidemiológico das Leishmanioses no Distrito Federal, até a Semana Epidemiológica n53, 2020. Saúde, S. d. V. à., Ed. Secretaria de Saúde do Distrito Federal: Distrito Federal, **2020**.
283. Cunha, H., Comportamento Epidemiológico das Leishmanioses no Distrito Federal, até a Semana Epidemiológica n13, 2021. Saúde, S. d. V. à., Ed. **2021**.
284. de Medeiros, A. C.; Cruz, L. M., Doenças Tropicais Negligenciadas. Saúde, M. d., Ed. **2021**.

285. Alexander, J.; Russell, D. G., The interaction of Leishmania species with macrophages. *Adv. Parasitol.* **1992**, *31*, 175-254.
286. Téllez, J.; Romero, I.; Soares, M. J.; Steindel, M.; Romanha, A. J., Knockdown of host antioxidant defense genes enhances the effect of glucantime on intracellular Leishmania braziliensis in human macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* **2017**, *61* (7).
287. de Almeida, M. E.; Koru, O.; Steurer, F.; Herwaldt, B. L.; da Silva, A. J., Detection and differentiation of Leishmania spp. in clinical specimens by use of a SYBR green-based real-time PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* **2017**, *55* (1), 281-290.
288. Iovannisci, D. M.; PAUL PLESTED, C.; Moe, G. R., Evidence for rosettes as an unrecognized stage in the life cycle of Leishmania parasites. *J. Eukaryot. Microbiol.* **2010**, *57* (5), 405-414.
289. Alexander, J.; Satoskar, A. R.; Russell, D. G., Leishmania species: models of intracellular parasitism. *J. Cell Sci.* **1999**, *112* (18), 2993-3002.
290. Gluenz, E.; Ginger, M. L.; McKean, P. G., Flagellum assembly and function during the Leishmania life cycle. *Curr. Opin. Microbiol.* **2010**, *13* (4), 473-479.
291. Handman, E., Cell biology of Leishmania. *Adv. Parasitol.* **1999**, *44*, 1-39.
292. Mougneau, E.; Bihl, F.; Glaichenhaus, N., Cell biology and immunology of Leishmania. *Immunol. Rev.* **2011**, *240* (1), 286-296.
293. Santoro, P.; Vellusi, A., Different Patterns of Fluorescence in the Quantisation of anti-Leishmania Infantum Antibodies by Indirect Immuno-Fluorescent Antibody Test (IFAT) in the Serological Diagnosis of Canine Leishmaniasis. *Open J. Vet. Med.* **2017**, *7* (3), 23-30.
294. Riaz, U.; Jadoun, S.; Kumar, P.; Arish, M.; Rub, A.; Ashraf, S., Influence of Luminol Doping of Poly (o-phenylenediamine) on the Spectral, Morphological, and Fluorescent properties: A Potential Fluorescent Marker for Early detection and Diagnosis of Leishmania donovani. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (38), 33159-33168.
295. Jain, S.; Santana, W.; Dolabella, S. S.; Santos, A. L.; Souto, E. B.; Severino, P., Are Nanobiosensors an Improved Solution for Diagnosis of Leishmania? *Pharmaceutics* **2021**, *13* (4), 491.
296. Li, S.; Amat, D.; Peng, Z.; Vanni, S.; Raskin, S.; De Angulo, G.; Othman, A. M.; Graham, R. M.; Leblanc, R. M., Transferrin conjugated nontoxic carbon dots for doxorubicin delivery to target pediatric brain tumor cells. *Nanoscale* **2016**, *8* (37), 16662-16669.

297. Fahmi, M. Z.; Chen, J.-K.; Huang, C.-C.; Ling, Y.-C.; Chang, J.-Y., Phenylboronic acid-modified magnetic nanoparticles as a platform for carbon dot conjugation and doxorubicin delivery. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3* (27), 5532-5543.
298. Misra, S. K.; Ohoka, A.; Kolmodin, N. J.; Pan, D., Next generation carbon nanoparticles for efficient gene therapy. *Mol. Pharm* **2015**, *12* (2), 375-385.
299. Dekaliuk, M.; Pyrshev, K.; Demchenko, A., Visualization and detection of live and apoptotic cells with fluorescent carbon nanoparticles. *J. Nanobiotechnology* **2015**, *13* (1), 86.
300. Du, F.; Ming, Y.; Zeng, F.; Yu, C.; Wu, S., A low cytotoxic and ratiometric fluorescent nanosensor based on carbon-dots for intracellular pH sensing and mapping. *Nanotechnology* **2013**, *24* (36), 365101.
301. Thoo, L.; Fahmi, M. Z.; Zulkipli, I. N.; Keasberry, N.; Idris, A., Interaction and cellular uptake of surface-modified carbon dot nanoparticles by J774. 1 macrophages. *Cent.-Eur. J. Immunol.* **2017**, *42* (3), 324.
302. Wang, K.; Gao, Z.; Gao, G.; Wo, Y.; Wang, Y.; Shen, G.; Cui, D., Systematic safety evaluation on photoluminescent carbon dots. *Nanoscale Res. Lett.* **2013**, *8* (1), 122.
303. Tao, H.; Yang, K.; Ma, Z.; Wan, J.; Zhang, Y.; Kang, Z.; Liu, Z., In vivo NIR fluorescence imaging, biodistribution, and toxicology of photoluminescent carbon dots produced from carbon nanotubes and graphite. *Small* **2012**, *8* (2), 281-290.
304. Jiang, C.; Wu, H.; Song, X.; Ma, X.; Wang, J.; Tan, M., Presence of photoluminescent carbon dots in Nescafe® original instant coffee: applications to bioimaging. *Talanta* **2014**, *127*, 68-74.
305. Wang, Z.; Liao, H.; Wu, H.; Wang, B.; Zhao, H.; Tan, M., Fluorescent carbon dots from beer for breast cancer cell imaging and drug delivery. *Anal. Methods* **2015**, *7* (20), 8911-8917.
306. Sk, M. P.; Jaiswal, A.; Paul, A.; Ghosh, S. S.; Chattopadhyay, A., Presence of amorphous carbon nanoparticles in food caramels. *Sci. Rep.* **2012**, *2* (1), 1-5.
307. Teradal, N. L.; Jelinek, R., Carbon nanomaterials in biological studies and biomedicine. *Adv. Healthc. Mater.* **2017**, *6* (17), 1700574.
308. Pardo, J.; Peng, Z.; Leblanc, R. M., Cancer targeting and drug delivery using carbon-based quantum dots and nanotubes. *Molecules* **2018**, *23* (2), 378.
309. Wang, B.; Wang, S.; Wang, Y.; Lv, Y.; Wu, H.; Ma, X.; Tan, M., Highly fluorescent carbon dots for visible sensing of doxorubicin release based on efficient nanosurface energy transfer. *Biotechnol. Lett.* **2016**, *38* (1), 191-201.

310. Pei, M.; Li, G.; Liu, P., Tumor-specific fluorescent Cdots-based nanotheranostics by acid-labile conjugation of doxorubicin onto reduction-cleavable Cdots-based nanoclusters. *Mater. Sci. Eng. C* **2020**, *110*, 110719.
311. Yang, T.; Huang, J. L.; Wang, Y. T.; Zheng, A. Q.; Shu, Y.; Wang, J. H., β -Cyclodextrin-Decorated carbon dots serve as nanocarriers for targeted drug delivery and controlled release. *ChemNanoMat* **2019**, *5* (4), 479-487.
312. Khan, M. S.; Pandey, S.; Talib, A.; Bhisare, M. L.; Wu, H.-F., Controlled delivery of dopamine hydrochloride using surface modified carbon dots for neuro diseases. *Colloids Surf. B* **2015**, *134*, 140-146.
313. Wang, Z.-X.; Yu, X.-H.; Li, F.; Kong, F.-Y.; Lv, W.-X.; Fan, D.-H.; Wang, W., Preparation of boron-doped carbon dots for fluorometric determination of Pb (II), Cu (II) and pyrophosphate ions. *Microchim. Acta* **2017**, *184* (12), 4775-4783.
314. Albanese, A.; Tang, P. S.; Chan, W. C., The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2012**, *14*, 1-16.
315. Zhou, J.; Zhou, H.; Tang, J.; Deng, S.; Yan, F.; Li, W.; Qu, M., Carbon dots doped with heteroatoms for fluorescent bioimaging: a review. *Microchim. Acta* **2017**, *184* (2), 343-368.
316. Shan, X.; Chai, L.; Ma, J.; Qian, Z.; Chen, J.; Feng, H., B-doped carbon quantum dots as a sensitive fluorescence probe for hydrogen peroxide and glucose detection. *Analyst* **2014**, *139* (10), 2322-2325.
317. Tian, T.; He, Y.; Ge, Y.; Song, G., One-pot synthesis of boron and nitrogen co-doped carbon dots as the fluorescence probe for dopamine based on the redox reaction between Cr (VI) and dopamine. *Sens. Actuators B Chem.* **2017**, *240*, 1265-1271.
318. Barras, A.; Pagneux, Q.; Sane, F.; Wang, Q.; Boukherroub, R.; Hober, D.; Szunerits, S., High efficiency of functional carbon nanodots as entry inhibitors of herpes simplex virus type 1. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (14), 9004-9013.
319. Qiao, S.; Li, H.; Li, H.; Liu, J.; Kong, W.; Hu, Q.; Huang, H.; Liu, Y.; Kang, Z., Label-free carbon quantum dots as photoluminescence probes for ultrasensitive detection of glucose. *RSC Adv.* **2015**, *5* (84), 69042-69046.
320. Bian, W.; Wang, X.; Wang, Y.; Yang, H.; Huang, J.; Cai, Z.; Choi, M. M., Boron and nitrogen co-doped carbon dots as a sensitive fluorescent probe for the detection of curcumin. *Luminescence* **2018**, *33* (1), 174-180.

321. Long, Y.; Wang, X.; Shen, D.; Zheng, H., Detection of glucose based on the peroxidase-like activity of reduced state carbon dots. *Talanta* **2016**, *159*, 122-126.
322. Menéndez, M.; Martínez, M.; Comín, F. A., A comparative study of the effect of pH and inorganic carbon resources on the photosynthesis of three floating macroalgae species of a Mediterranean coastal lagoon. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* **2001**, *256* (1), 123-136.
323. Yang, C.; Thomsen, R. P.; Ogaki, R.; Kjems, J.; Teo, B. M., Ultrastable green fluorescence carbon dots with a high quantum yield for bioimaging and use as theranostic carriers. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3* (22), 4577-4584.
324. Liu, W.; Li, C.; Ren, Y.; Sun, X.; Pan, W.; Li, Y.; Wang, J.; Wang, W., Carbon dots: surface engineering and applications. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4* (35), 5772-5788.
325. Van de Ven, H.; Paulussen, C.; Feijens, P.; Matheussen, A.; Rombaut, P.; Kayaert, P.; Van den Mooter, G.; Weyenberg, W.; Cos, P.; Maes, L., PLGA nanoparticles and nanosuspensions with amphotericin B: potent in vitro and in vivo alternatives to Fungizone and AmBisome. *J. Control. Release* **2012**, *161* (3), 795-803.
326. Xu, Y.; Wu, M.; Feng, X. Z.; Yin, X. B.; He, X. W.; Zhang, Y. K., Reduced carbon dots versus oxidized carbon dots: photo-and electrochemiluminescence investigations for selected applications. *Chem.-Eur. J* **2013**, *19*, 6282-6288.
327. Selvam, S.; Mishra, A. K., Disaggregation of amphotericin B by sodium deoxycholate micellar aggregates. *Journal of Photochem. Photobiol. B: Biology* **2008**, *93* (2), 66-70.
328. Yu, D.; Wang, L.; Zhou, H.; Zhang, X.; Wang, L.; Qiao, N., Fluorimetric detection of candida albicans using cornstalk N-carbon quantum dots modified with amphotericin B. *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30* (3), 966-973.
329. Egito, E. S. T.; Araújo, I. B.; Damasceno, B. P.; Price, J. C., Amphotericin B/emulsion admixture interactions: an approach concerning the reduction of amphotericin B toxicity. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91* (11), 2354-2366.
330. Brown, M.; Noursadeghi, M.; Boyle, J.; Davidson, R., Successful liposomal amphotericin B treatment of Leishmania braziliensis cutaneous leishmaniasis. *Br. J. Dermatol.* **2005**, *153* (1), 203-205.
331. de Carvalho, R. F.; Ribeiro, I. F.; Miranda-Vilela, A. L.; de Souza Filho, J.; Martins, O. P.; e Silva, D. d. O. C.; Tedesco, A. C.; Lacava, Z. G. M.; Bão, S. N.; Sampaio, R. N. R., Leishmanicidal activity of amphotericin B encapsulated in PLGA–DMSA nanoparticles to treat cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice. *Exp. Parasitol.* **2013**, *135* (2), 217-222.

332. Thakur, C.; Pandey, A.; Sinha, G.; Roy, S.; Behbehani, K.; Oliaro, P., Comparison of three treatment regimens with liposomal amphotericin B (AmBisome®) for visceral leishmaniasis in India: a randomized dose-finding study. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1996**, *90* (3), 319-322.
333. Wortmann, G.; Zapor, M.; Ressler, R.; Fraser, S.; Hartzell, J.; Pierson, J.; Weintrob, A.; Magill, A., Liposomal amphotericin B for treatment of cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2010**, *83* (5), 1028-1033.
334. Walton, B. C.; Shaw, J. J.; Lainson, R., Observations on the in vitro cultivation of *Leishmania braziliensis*. **1977**.
335. Nair, A. B.; Jacob, S., A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm.* **2016**, *7* (2), 27.
336. Anvisa, B., Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. *Anvisa, Brasília. ALP, H* **2013**, 970-975.
337. Guideline, I. H. T. In *Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals M3 (R2)*, International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, **2009**.
338. Coelho, A. C.; Oliveira, J. C.; Espada, C. R.; Reimao, J. Q.; Trinconi, C. T.; Uliana, S. R., A luciferase-expressing *Leishmania braziliensis* line that leads to sustained skin lesions in BALB/c mice and allows monitoring of miltefosine treatment outcome. *PLOS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10* (5), e0004660.
339. de Oliveira, C. I.; Teixeira, M. J.; Teixeira, C. R.; de Jesus, J. R.; Rosato, A. B.; Santa da Silva, J.; Brodskyn, C.; Barral-Netto, M.; Barral, A., *Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice. *Microb Infect* **2004**, *6* (11), 977-984.
340. Ribeiro, J. B. P.; Miranda-Vilela, A. L.; Graziani, D.; de Aguiar Gomes, M. R.; Amorim, A. A. S.; Garcia, R. D.; de Souza Filho, J.; Tedesco, A. C.; Primo, F. L.; Moreira, J. R., Evaluation of the efficacy of systemic miltefosine associated with photodynamic therapy with liposomal chloroaluminium phthalocyanine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) amazonensis* in C57BL/6 mice. *Photodiagnosis Photodyn. Ther* **2016**, *13*, 282-290.

341. Salman, S. M.; Rubeiz, N. G.; Kibbi, A.-G., Cutaneous leishmaniasis: clinical features and diagnosis. *Clin. Dermatol.* **1999**, *17* (3), 291-296.
342. Hepburn, N., Cutaneous leishmaniasis: Clinical dermatology• Review article. *Clin. Exp. Dermatol* **2000**, *25* (5), 363-370.
343. Ghotloo, S.; Mollahoseini, M. H.; Najafi, A.; Yeganeh, F., Comparison of parasite burden using real-time polymerase chain reaction assay and limiting dilution assay in *Leishmania major* infected mouse. *Iran. J. Parasitol.* **2015**, *10* (4), 571.
344. Kling, J. C.; Mack, M.; Körner, H., The absence of CCR7 results in dysregulated monocyte migration and immunosuppression facilitating chronic cutaneous leishmaniasis. *PLoS One* **2013**, *8* (10), e79098.
345. Kling, J.; Darby, J.; Körner, H., CCR 7 facilitates the pro-inflammatory function of dendritic cells in experimental leishmaniasis. *Parasite Immunol.* **2014**, *36* (4), 177-185.
346. Giannini, E. G.; Testa, R.; Savarino, V., Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *Cmaj* **2005**, *172* (3), 367-379.
347. Spinelli, M.; Cruz, R.; Godoy, C.; Motta, M., Comparação dos parâmetros bioquímicos de camundongos criados em diferentes condições sanitárias. *Scientia Plena* **2012**, *8* (2).
348. Almeida, A. S.; Faleiros, A. C. G.; Teixeira, D. N. S.; Cota, U. A.; Chica, J. E. L., Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. *J Bras Patol Med Lab* **2008**, *44* (6), 429-432.
349. Fernandes, D. P.; Pimentel, M. M.; Santos, F. A.; Praxedes, É. A.; Brito, P. D.; Lima, M. A.; Lelis, I. C.; Macedo, M. F.; Bezerra, M. B., Hematological and biochemical profile of BALB/c nude and C57BL/6 SCID female mice after ovarian xenograft. *An Acad Bras Cienc.* **2018**, *90* (4), 3941-3948.
350. Jiang, W.; Zhao, H.; Zhang, L.; Wu, B.; Zha, Z., Maintenance of mitochondrial function by astaxanthin protects against bisphenol A-induced kidney toxicity in rats. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *121*, 109629.
351. Chakroun, S.; Ezzi, L.; Grissa, I.; Kerkeni, E.; Neffati, F.; Bhourri, R.; Najjar, M. F.; Hassine, M.; Mehdi, M.; Haouas, Z., Hematological, biochemical, and toxicopathic effects of subchronic acetamiprid toxicity in Wistar rats. *Environ Sci Pollut Res* **2016**, *23* (24), 25191-25199.
352. Doumas, B. T.; Peters Jr, T., Serum and urine albumin: a progress report on their measurement and clinical significance. *Clin. Chim. Acta* **1997**, *258* (1), 3-20.

353. Ludwig, D. B.; de Camargo, L. E. A.; Khalil, N. M.; Auler, M. E.; Mainardes, R. M., Antifungal activity of chitosan-coated poly (lactic-co-glycolic) acid nanoparticles containing amphotericin B. *Mycopathologia* **2018**, *183* (4), 659-668.
354. Riancho-Zarrabeitia, L.; García-Unzueta, M.; Tenorio, J. A.; Gómez-Gerique, J. A.; Pérez, V. L. R.; Heath, K. E.; Lapunzina, P.; Riancho, J. A., Clinical, biochemical and genetic spectrum of low alkaline phosphatase levels in adults. *Eur. J. Intern. Med.* **2016**, *29*, 40-45.
355. Corathers, S. D., The alkaline phosphatase level: nuances of a familiar test. *Pediatr Rev* **2006**, *27*, 382.

Anexos

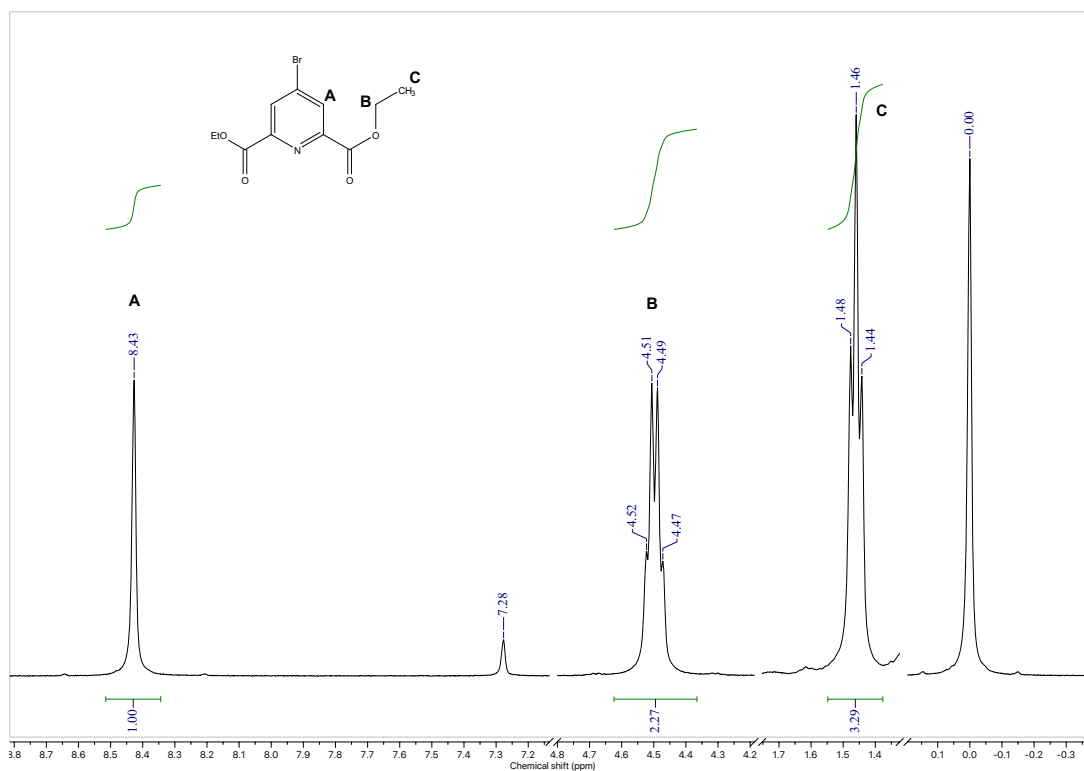


Figura A 1. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) de 4-bromo piridina-2,6-dicarboxilato de dimetila (1).

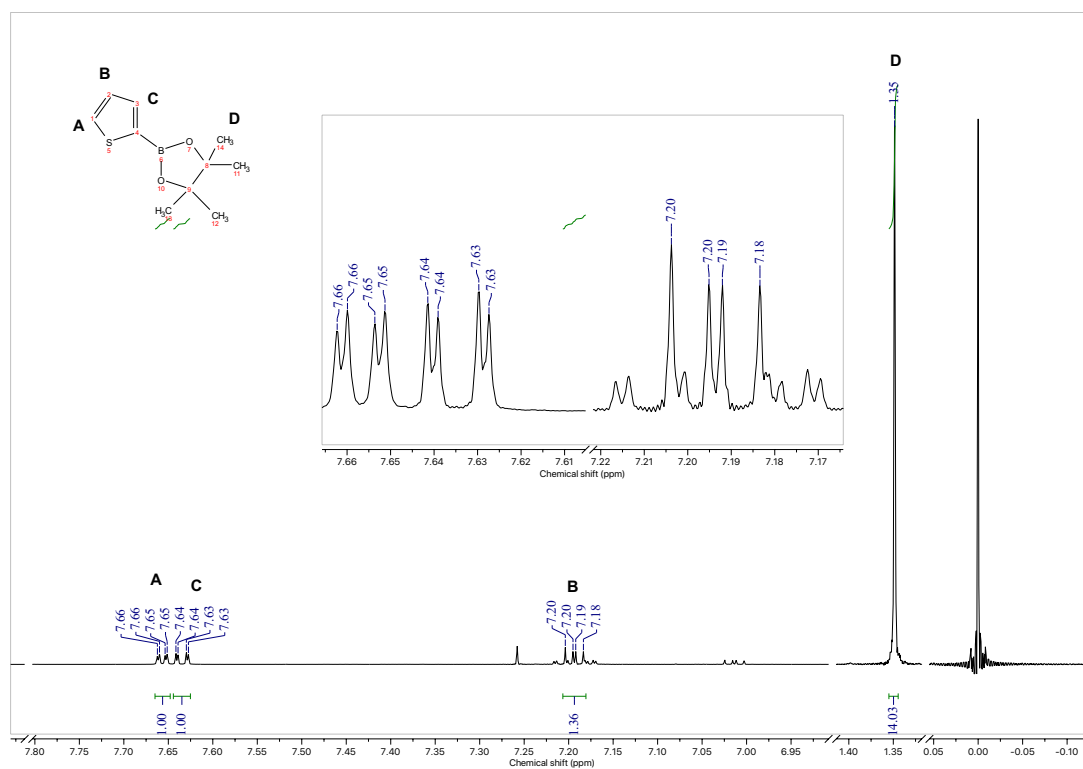


Figura A2. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) de 4,4,5,5-tetrametil-2-(tiofen-2-il)-1,3,2-dioxaborolano (2).

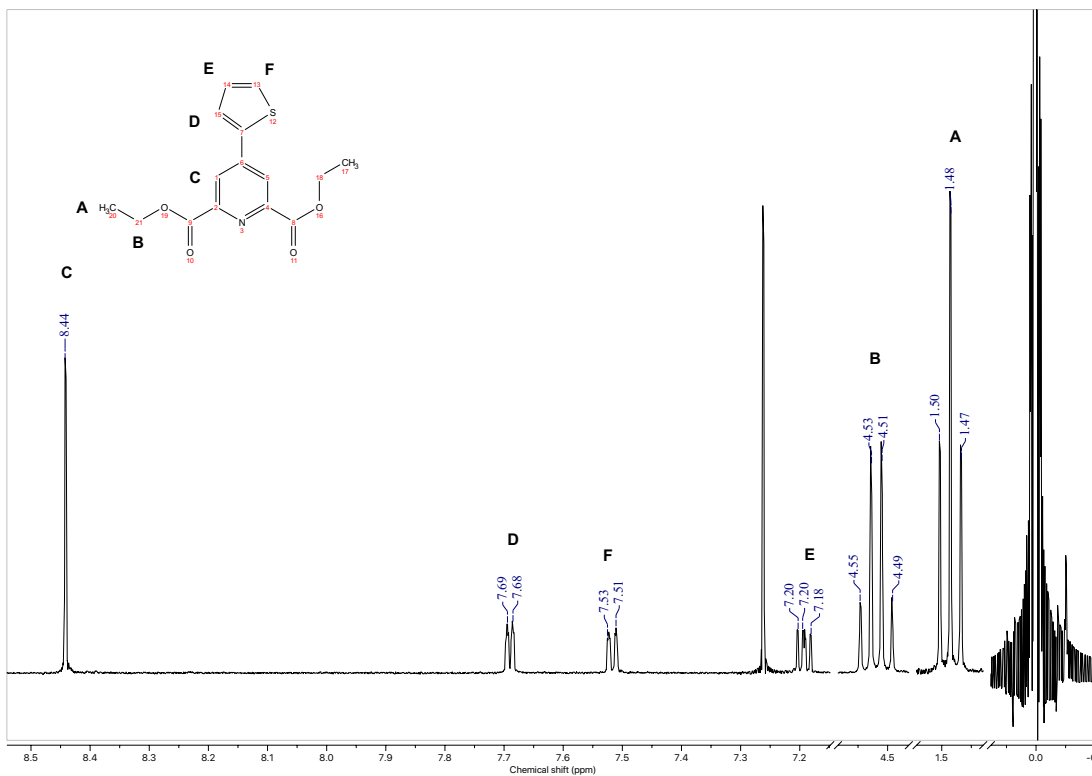


Figura A3. ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) de 4-(tiofeno-2-il) piridina-2,6-dicarboxylato de dietila (**3**).

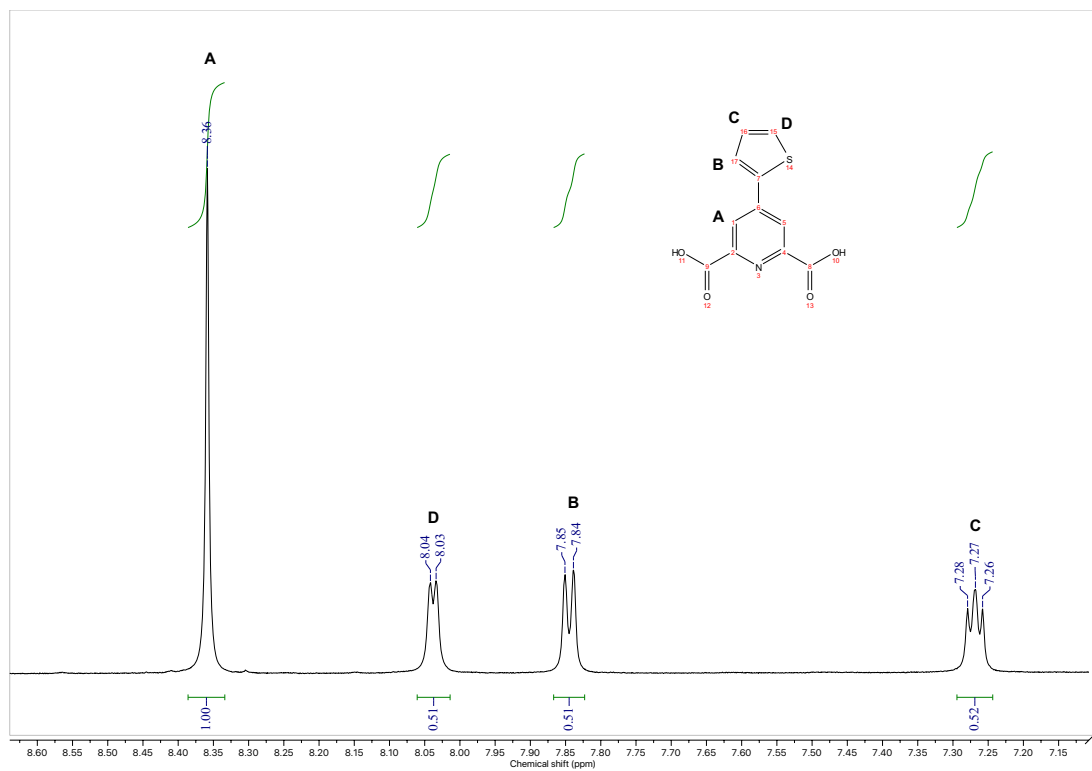


Figura A4. ^1H -RMN (400 MHz, DMSO_{d6}) de ácido 4-(tiofeno-2-il)piridina-2,6-dicarboxílico (**H2TdpA**).

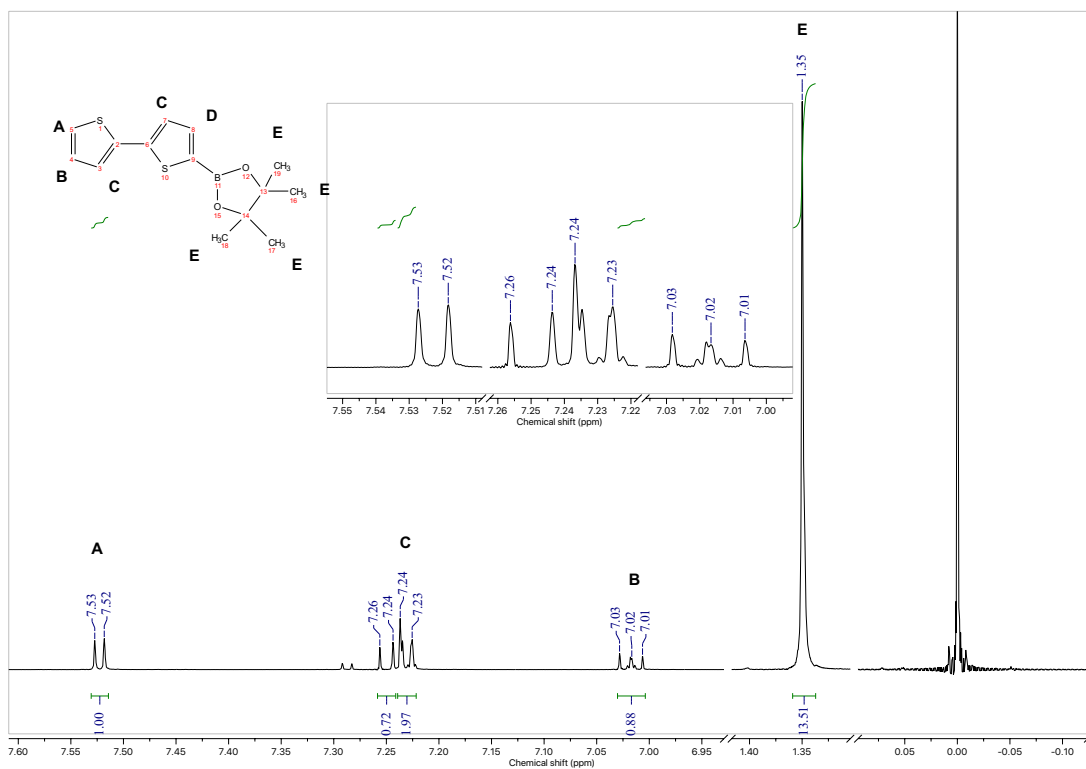


Figura A5. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) de 2-(2,2'-bitiofen-5-il)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano (4).

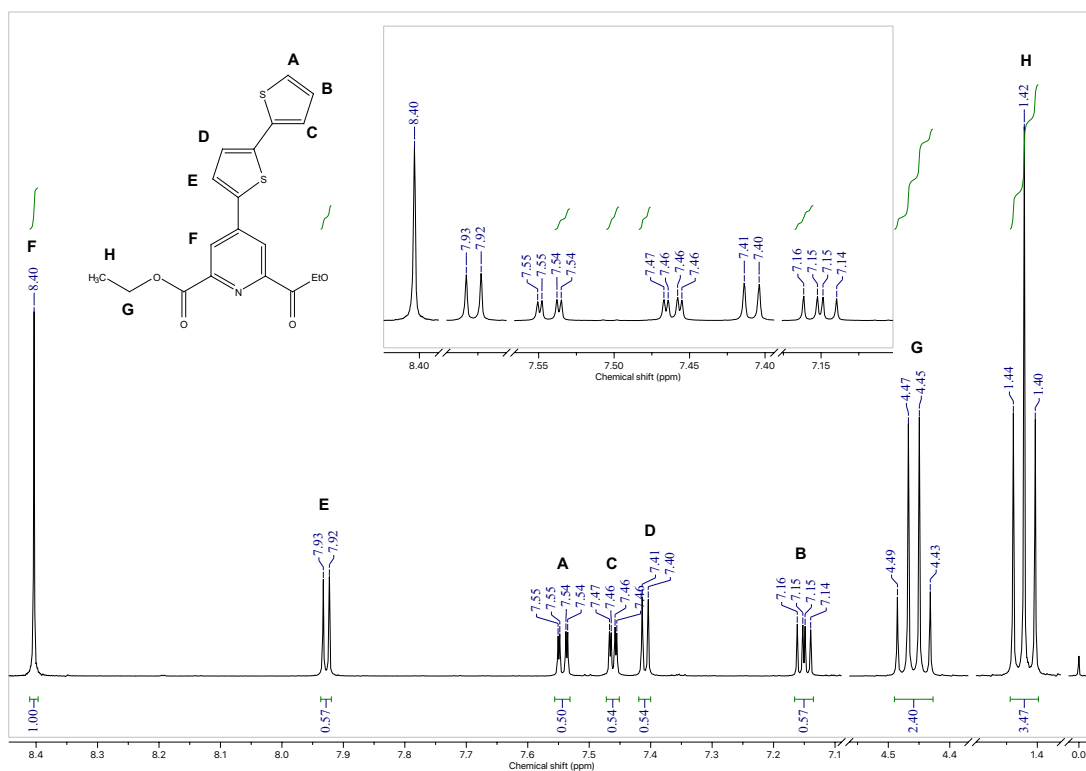


Figura A6. ¹H-RMN (400 MHz, acetona d₆) de 4-(2,2'-bitiofen-5-il)piridina-2,6-dicarboxilato de dietila (5).

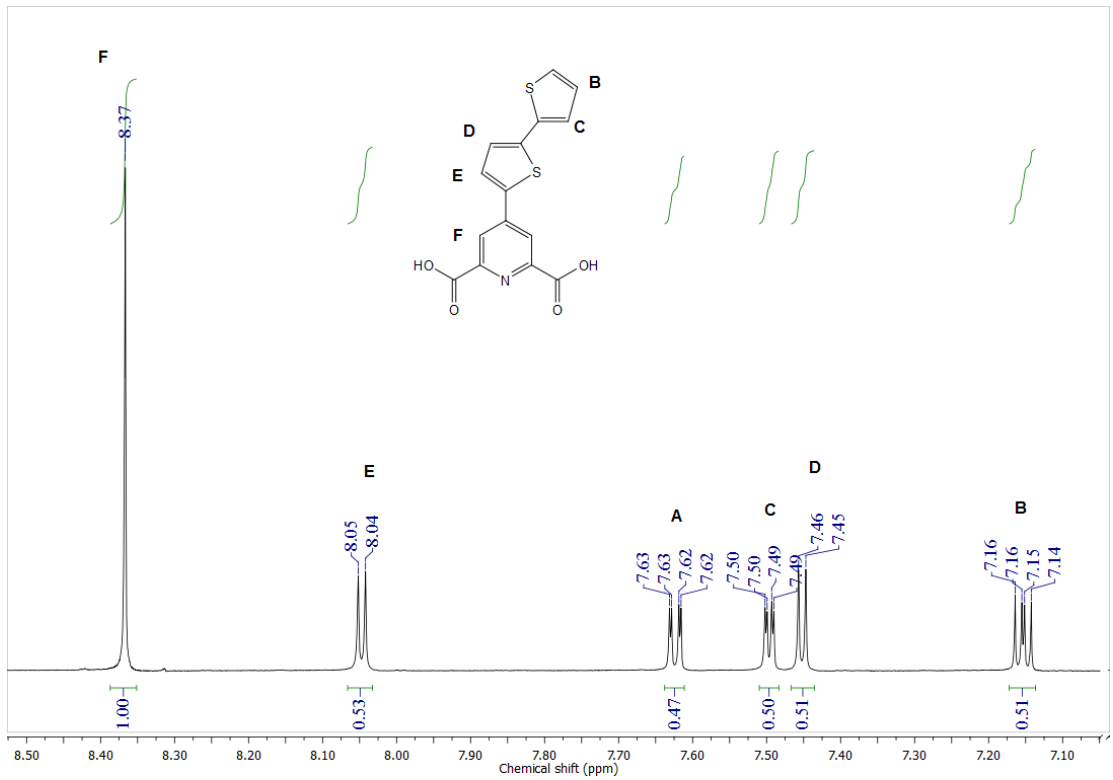


Figura A7. 1H -RMN (400 MHz, $DMSO_{d6}$) de ácido 4-(2,2'-bitiofeno) piridina-2,6-dicarboxílico (H_2Tdpa).

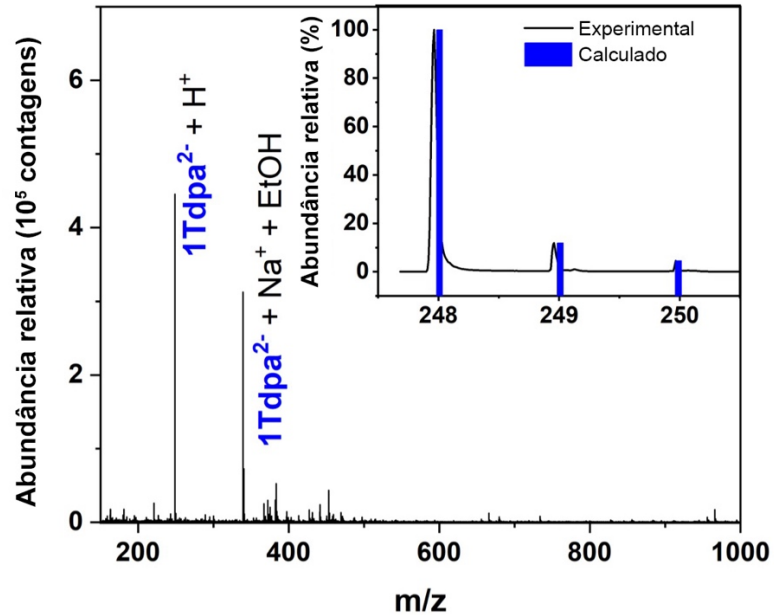


Figura A8. Espectro de massas de H_2Tdpa . As inserções mostram os padrões isotópicos calculado e experimental.

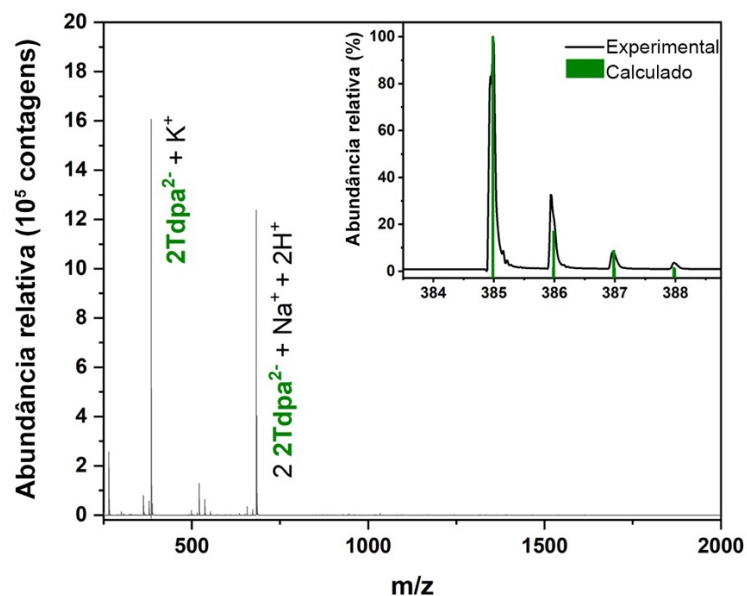


Figura A9. Espectro de massas de H_2Tdpa . As inserções mostram os padrões isotópicos calculado e experimental.

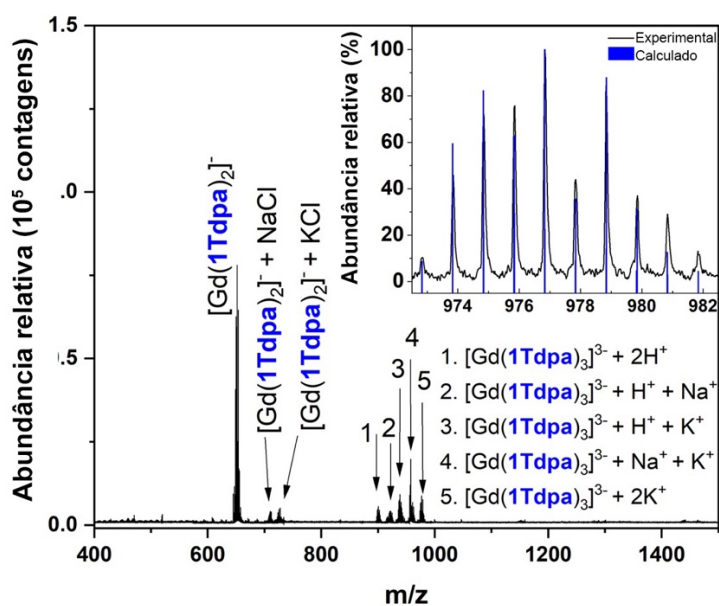


Figura A10. Espectro de massas de $\text{K}_3[\text{Gd}(\text{1Tdpa})_3]$. As inserções mostram os padrões isotópicos calculado e experimental.

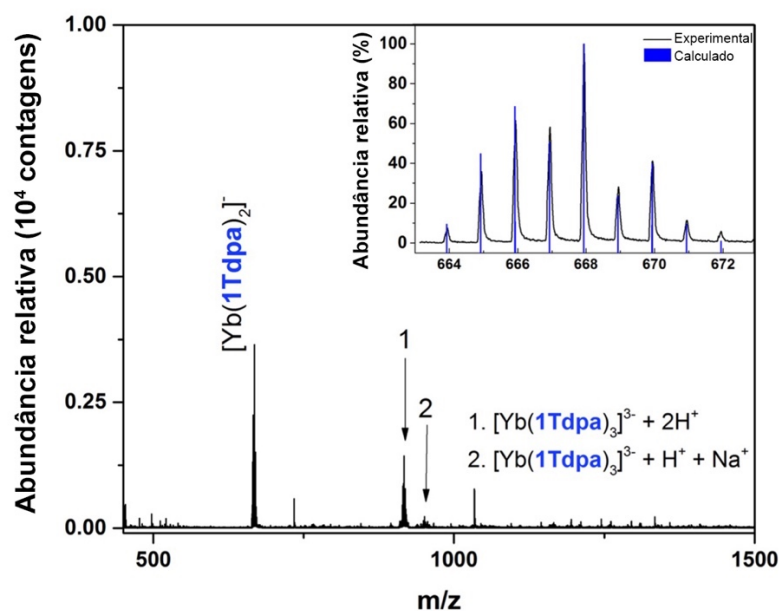


Figura A11. Espectro de massas de $\text{K}_3[\text{Yb}(\text{1Tdpa})_3]$. As inserções mostram os padrões isotópicos calculado e experimental.

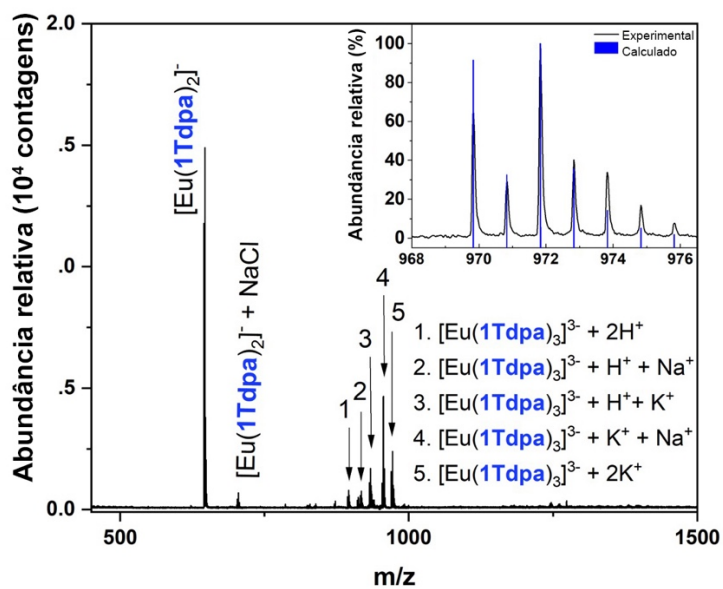


Figura A12. Espectro de massas de $\text{K}_3[\text{Eu}(\text{1Tdpa})_3]$. As inserções mostram os padrões isotópicos calculado e experimental.

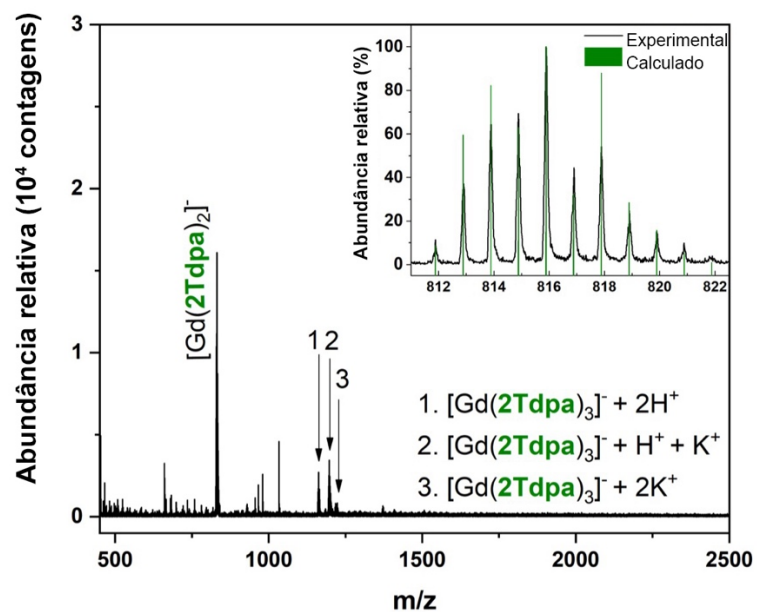


Figura A13. Espectro de massas de $K_3[Gd(2Tdpa)_3]$. As inserções mostram os padrões isotópicos calculado e experimental.

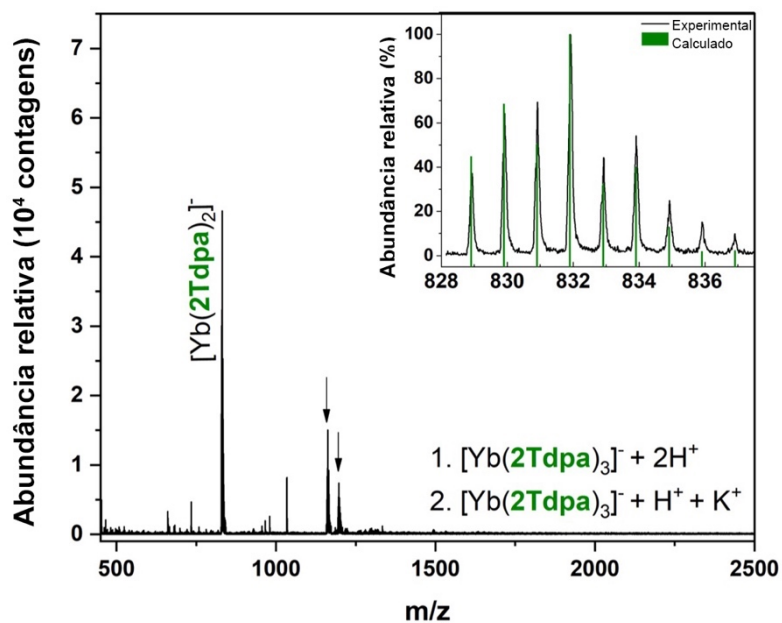


Figura A14. Espectro de massas de $K_3[Yb(2Tdpa)_3]$. As inserções mostram os padrões isotópicos calculado e experimental.

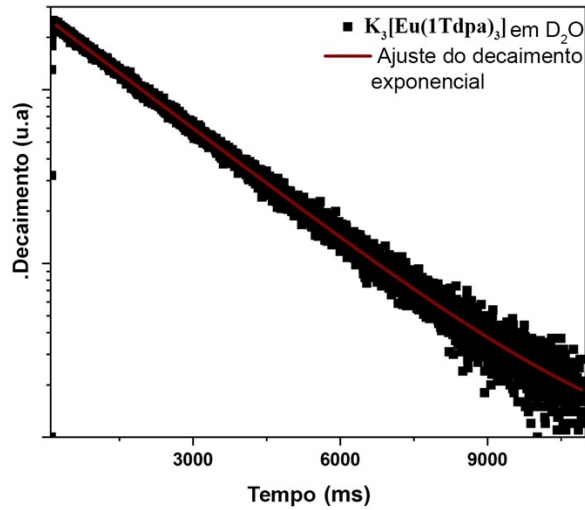


Figura A 15. Gráfico de decaimento da emissão de $K_3[Eu(1Tdpa)_3]$ em 616 nm, em água deuterada a $25,0 \pm 0,1$ °C ($\lambda_{exc} = 320$ nm); $[K_3[Eu(1Tdpa)_3]] = 100 \mu M$.

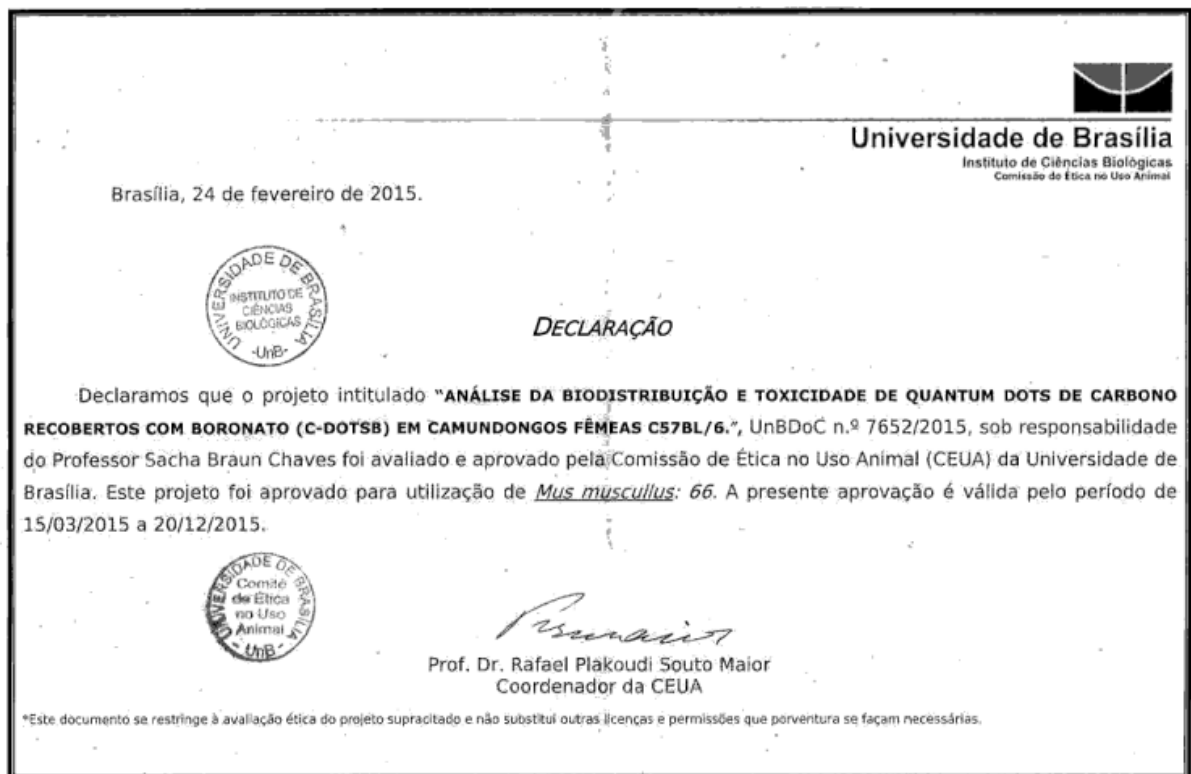


Figura A16. Declaração de aprovação do experimento em vivo “Avaliação da toxicidade de PBAC-Dots” pelo Comitê de Ética no uso Animal da UnB.



Brasília, 07 de agosto de 2017.

DECLARAÇÃO – PRORROGAÇÃO DE PRAZO

Declaramos que o projeto intitulado “AVALIAÇÃO DA NANOFORMULAÇÃO COMPOSTA POR C-DOTS E ANFOTERICINA B (ANFOB@C-DOT) NO TRATAMENTO CONTRA LEISHMANIOSE”, Protocolo n.º 8480/2016, sob responsabilidade do Professor Marcelo Oliveira Rodrigues foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: Camundongo BALB/C(36). A presente aprovação é válida pelo período de: 15/04/2016 a 31/08/2019.



Paula

Profa. Dra. Paula Diniz Galera
Coordenadora da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

Figura A17. Declaração de aprovação do experimento em vivo “Avaliação da eficácia e toxicidade da **AnB@C-Dots** contra Leishmania” pelo Comitê de Ética no uso Animal da UnB.

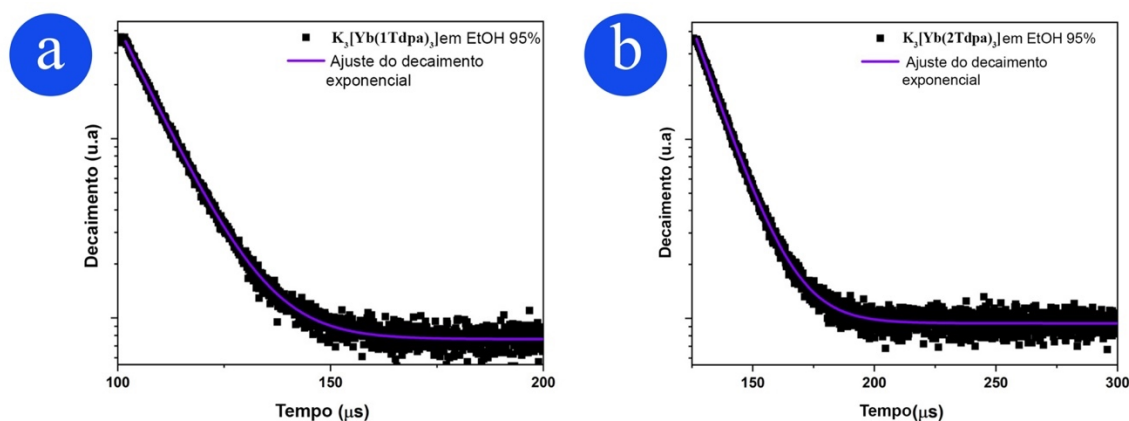


Figura A 18. Gráficos de decaimento da emissão de (a) $K_3[Yb(1Tdpa)_3]$ e (b) $K_3[Yb(2Tdpa)_3]$ em 978 nm, em etanol a 95%, a $25,0 \pm 0,1$ °C ($\lambda_{exc} = 320$ nm); $[K_3[Yb(nTdpa)_3]] = 100$ μM .

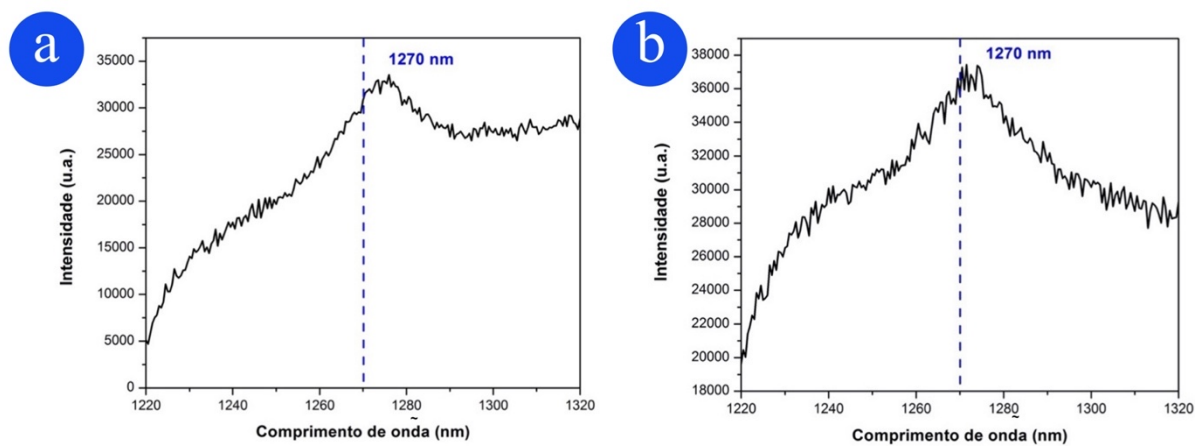


Figura A19. Espectros de fosforescência de $^1\text{O}_2$ presente em solução aquosa de (a) K_2Tdpa e (b) K_2nTdpa , adquiridos a $25 \pm 0,1$ °C. $[\text{K}_2\text{nTdpa}] = 500 \mu\text{M}$.

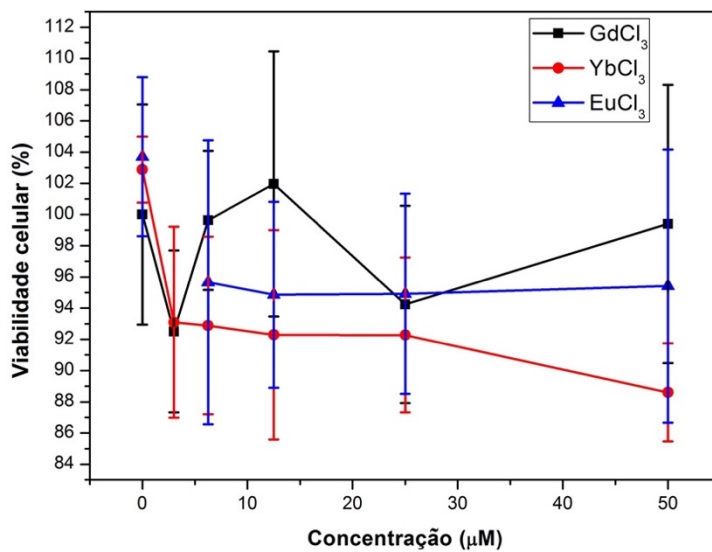
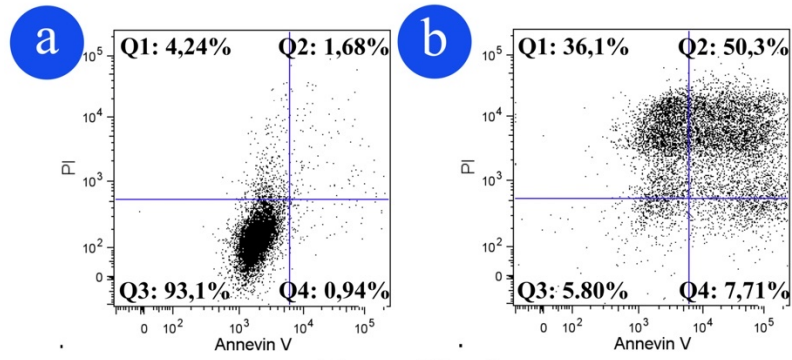


Figura A20. Citotoxicidade de GdCl_3 , YbCl_3 e EuCl_3 em ensaios de MTT com células HeLa.

Escuro



Irradiado

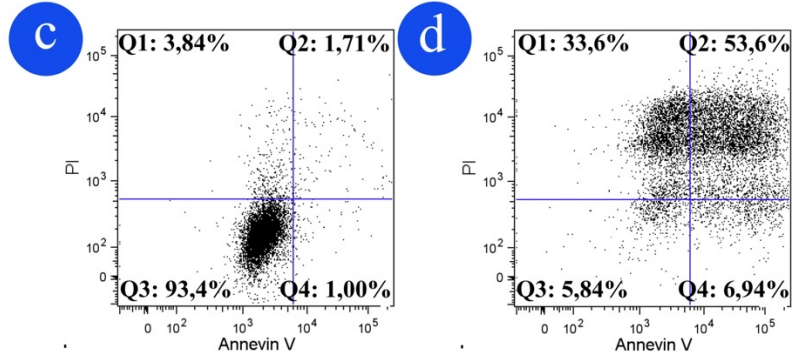


Figura A21. Ensaios de citometria de fluxo com células HeLa marcadas com AnV-FITC e PI, 12 h após a incubação com PBS e estaurosporina em condições de escuro em (a) e (b), e após irradiação com luz 365 nm em (c) e (d), respectivamente.

DECLARAÇÃO DE ORIGINALIDADE DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO OU
TESE DE DOUTORADO

Declaro que a presente dissertação/tese é original, elaborada especialmente para este fim, não tendo sido apresentada para obtenção de qualquer título e que identifico e cito devidamente todas as autoras e todos os autores que contribuíram para o trabalho, bem como as contribuições oriundas de outras publicações de minha autoria.

Declaro estar ciente de que a cópia ou o plágio podem gerar responsabilidade civil, criminal e disciplinar, consistindo em grave violação à ética acadêmica.

Brasília, 11 de agosto de 2021.

Assinatura do/a discente: Carime Vitória da S. Rodrigues

Programa: Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade de Brasília
(PPGQ-UnB)

Nome completo: Carime Vitória da Silva Rodrigues

Título do Trabalho: Tecnologias de Novos Materiais Fotoluminescentes: Sínteses e
Aplicações Biológicas

Nível: () Mestrado (X) Doutorado

Orientador/a: Marcelo Oliveira Rodrigues