



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E MORFOLOGIA
PÓS - GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E
NANOBIOTECNOLOGIA

TERAPIA FOTODINÂMICA COM O USO DE NANOPARTICULAS DE
NITRETO DE CARBONO E CONJUGADOS: UM ESTUDO IN VITRO

BRASILIA

2018

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E MORFOLOGIA
PÓS - GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

MARIA DE SOUSA BRITO NETA

**TERAPIA FOTODINÂMICA COM O USO DE NANOPARTICULAS DE
NITRETO DE CARBONO E CONJUGADOS: UM ESTUDO IN VITRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Sacha Braun Chaves

BRASILIA

2018

MARIA DE SOUSA BRITO NETA

**TERAPIA FOTODINÂMICA COM O USO DE NANOPARTICULAS DE
NITRETO DE CARBONO E CONJUGADOS : UM ESTUDO IN VITRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Sacha Braun Chaves.
Universidade de Brasília, UnB.

Membro Titular: Prof^ª. Dr^ª. Luzirlane dos Santos Barbosa Braun.
Centro Universitário Euroamericano, UNIEURO

Membro Titular: Prof^ª. Dr^ª. Maria de Fátima Meneses Almeida Santos.
Universidade de Brasília, UnB

Membro Suplente: Prof^ª. Dr^ª. Graziella Anselmo Joannette.
Universidade de Brasília, UnB

Local: Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
UnB – *Campus* Darcy Ribeiro

“Não poderia deixar de
dedicar este trabalho aos meus
pais e ao meu irmão, pelo apoio nos momentos
bons e difíceis que passamos no
decorrer dessa trajetória, não nos
permitindo desistir dos nossos
objetivos, bem como a todos os amigos e parentes
que perdi durante toda a vida por conta
da patologia em estudo CÂNCER.
AMO VOCÊS
MAIS DO QUE TUDO!”

“Só fazemos melhor aquilo que repetidamente insistimos em melhorar. A busca da excelência não deve ser um objetivo, e sim um hábito”.

Aristóteles

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.”

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, nosso ponto de apoio e o grande responsável por nos impulsionar a seguir em frente nos momentos de dificuldade, bem como nos momentos como este: realizar uma pós-graduação em uma das Universidades mais renomadas do Brasil, com o intuito de melhorar a qualidade de vida de pessoas com a patologia em estudo “Câncer”.

À Universidade de Brasília-UnB, na pessoa da Prof Dra Márcia Abrahão Moura, reitora desta instituição, por me proporcionar a oportunidade singular de usufruir da estrutura técnico-científica indispensável para realização desta pesquisa.

Ao Coordenador do Programa de Pós Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia Prof. Dr. João Paulo Longo, pela continuidade na condução do curso com bravura e dignidade, mesmo com todos os obstáculos financeiros que a Ciência no Brasil vem enfrentando.

Meus sinceros agradecimentos ao apoio e incentivo na busca de resposta ao mundo chamado **Ciência** por parte de todos os professores do programa, em especial: Graziella Anselmo Joanitti (Amiga e Professora), Paulo Eduardo Narciso de Sousa e sua esposa Fabiane Hiratsuza (Grandes profissionais), Osmindo Júnior (Conterrâneo e amigo), Sebastião William da Silva, Ricardo Bentes (Biomédico de respeito), Marcelo Oliveira Rodrigues (Ídolo Profissional e Pessoal) e Sacha Braun (Pai Científico).

Um agradecimento muito especial ao meu **Orientador** Sacha Braun, que foi responsável para que este sonho se tornasse realidade e que me inseriu no mundo científico como sempre desejei. Ao Senhor o meu carinho e meu obrigado, pois se não fui à filha científica que sonhou o senhor foi o Pai científico que escolhi.

Um agradecimento especial ao meu **Coorientador** Marcelo Oliveira, também responsável pela realização deste meu sonho ser real como também me ensinou que com garra e dedicação podemos chegar longe. Através de sua historia de vida me sinto orgulhosa em ser sua aluna. O Senhor me ensinou mais do que conhecimento científico, me mostrou o caminho para me tornar uma verdadeira cientista, sem esquecer que a humildade está acima de tudo. Obrigada por tudo e sei que não tenho apenas um Pai Científico, mas um irmão e amigo enviado por Deus.

A todos os funcionários desta instituição, pela convivência que tivemos durante todo esse período, sempre dispostos a nos ajudar e auxiliar nas variadas atividades que

ali desenvolvemos, em especial à minha linda e querida **VOVOZONA Dona Zélia** por todo amor, orientação e carinho que me dedicou e dedica.

A todos os colegas, pelo entendimento de que as diferenças expressas nas atitudes de cada um nos fazem crescer como pessoa e profissionais que vamos nos tornar. Sou grata pela convivência diária, pelas experiências trocadas e pelo apoio um no outro que nos fazia persistir no nosso sonho. Sou mais feliz por ter vocês em minha vida, principalmente por fazerem com que a saudade de casa fosse suportável, em especial por momentos ímpares vividos com Fred e Sara (meu casal querido de todos os momentos e para a vida), Dany (amiga tímida), Raquel (minha Huck inesquecível), Rayane (Barbie da minha coleção), Marcella e Isabela (amigas queridas), Vanessa (mineira arretada), Amanda e Thayde (casal do meu agrado), Victors (minha dupla amada), Wille (baiano do meu coração), Khellida (conselheira e amiga), Thamara (irmã, amiga e companheira de luta do MTT), Marina (caçula), Carime e Nara (amigas e companheiras da Família LIMA do IQ), Alícia (amiga que me proporcionou grandes e lindos momentos da sua vida com a chegada da querida Princesinha Julie, e que está comigo desde o início e com fé em Deus por toda a vida), Ludmilla (minha loira guerreira e símbolo de amizade), Nicolas (amigo e companheiro de todos os dias na luta de laboratório), Patrícia Costa (conterrânea paraibana que adoro) e a todos os outros que direta ou indiretamente contribuíram para que tudo fosse possível durante este trabalho.

Faço aqui um agradecimento especial aos meus pais: **JOÃO BOSCO DE BRITO** e **ANA ROSA DE LIMA**, que me acompanharam por toda essa longa jornada, abrindo mão muitas vezes dos seus próprios sonhos para tornar os meus uma prioridade. Registro aqui o incentivo de meu Pai que mesmo não conseguindo estudar, devido aos obstáculos de uma vida sofrida, não mediu esforços para que seus filhos pudessem ter o maior de todos os bens que é o **CONHECIMENTO**. Muito obrigada meu Pai, você é o **AR** que **RESPIRO** e este título é para o Senhor.

Ao meu irmão George, padrinhos, familiares e grandes amigos da vida por acreditarem em meu potencial, me apoiando sempre que necessário.

Às irmãs Maria Coelho, Dina e Aldina que me acolheram e apoiaram no início desta jornada, a vocês meu muito obrigado.

Ao irmão de leite do meu Pai e tio muito especial Raimundo Carvalho (Nem) e família, por todo o carinho e apoio de sempre em todos os momentos. A vocês, a minha eterna admiração.

As minhas tias Ivaneide Furtado, Francisca Furtado e Irineide Furtado o meu amor e agradecimento pelo apoio e carinho de sempre em todos os momentos vividos longe de casa.

Não poderia deixar de lembrar dos meus GRANDES E VERDADEIROS MESTRES do departamento de Química da Universidade Federal do Piauí- UFPI e Centro Universitário Uninovafapi por sempre acreditarem em mim e me apoiarem durante a vida acadêmica. A vocês que foram minha base intelectual, mesmo com todas as dificuldades vividas no nosso NORDESTE (Piauí, na cidade de Teresina e Maranhão na cidade de Paraibano, minha terra Natal) dedico todo o conhecimento adquirido até o momento.

Aos amigos da EMBRAPA AGROENERGIA em especial Talita, Eveline, Ana Elisa, Paula, Cibele e todos os outros que iniciaram comigo esta trajetória científica em Brasília.

Agradeço a Instituição CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado que me ajudou a crescer profissional e pessoalmente.

RESUMO

A evolução da ciência médica criou uma demanda de ferramentas mais sensíveis e seletivas, e a nanomedicina oferece possibilidades de aplicações de nanomateriais em detecção, diagnóstico e, eventualmente, terapia de patologias. Para o tratamento de câncer, os nanomateriais de carbono têm sido considerados como um dos mais promissores devido à baixa toxicidade, biocompatibilidade, elevada solubilidade em soluções aquosas e propriedades espectroscópicas. As nanopartículas de Nitreto de Carbono (NP g-C₃N₄) apresentam propriedades fotocatalíticas como, quebra da molécula de água e produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), que as tornam interessantes para aplicações em Terapia Fotodinâmica (TFD). Nos últimos anos a TFD tem sido bastante utilizada para o tratamento do câncer por ser menos invasiva que os tratamentos convencionais. Neste estudo, avaliou-se *in vitro* o uso das NP g-C₃N₄ associadas a íons de metais, como agentes sensibilizadores para TFD em linhagens de células. Inicialmente, foi realizada uma triagem por meio do ensaio de viabilidade celular utilizando 9 materiais: 4 nanopartículas de C₃N₄ associadas a metais (Ferro, Prata, Manganês e Cobre), 1 de nano pura (C₃N₄) e 4 de metais livres. Entre os ensaios de MTT, o que apresentou melhor resultado foi utilizado para os testes com TFD, com luz ambiente e radiação e luz e radiação, como também foi realizado ensaios de incorporação e tempo de irradiação. Para caracterização da partícula realizou microscopia de RAMAN. Os resultados de MTT mostram que a viabilidade celular para a linhagem B16F10 foi significativamente reduzida quando tratadas com 0,25mg/ml de NP g-C₃N₄ com Cu²⁺ sob irradiação de luz azul por 10 minutos. Em células normais, Hacat e NIH3T3, o tratamento de TFD com as NPs e irradiação com luz azul não mostraram toxicidade significativa. Esses resultados indicam que os NPs g-C₃N₄ contendo Cu²⁺ podem ser estudados para futuras aplicações como agentes sensibilizadores de TFD seletivos para o tratamento do câncer.

Palavras chaves: Tratamento de Câncer; Nitreto de Carbono; Espécies Reativas de Oxigênio (ERO); Terapia Fotodinâmica.

ABSTRACT

The evolution of medical science has created a demand for more sensitive and selective tools, and nanomedicine offers possibilities of applications of nanomaterials in detection, diagnosis and eventually therapy of pathologies. For cancer treatment, carbon nanomaterials have been considered as promising because their low toxicity, biocompatibility, high solubility in aqueous solutions and spectroscopic properties. Nanoparticles of Carbon Nitride (NP g-C₃N₄) have photocatalytic properties such as water molecule breakdown and Reactive Oxygen Species (ROS), which make them interesting for applications in Photodynamic Therapy (PDT). In recent years, PDT has been widely used for cancer treatment because it is less invasive than conventional treatments. In this study, use of metal ion-associated NP g-C₃N₄ as sensitizing agents for PDT in cell lines was evaluated in vitro. Initially, a cell viability assay was performed using 9 materials: 4 nanoparticles (C₃N₄) associated with metals (Iron, Silver, Manganese and Copper); 1 of nano pure (C₃N₄) and 4 of free metals. In MTT assay, the one that presented the best result was used for tests with PDT, with ambient light and radiation and light and radiation, as well as incorporation and irradiation time. For particle characterization, it was performed a RAMAN microscopy. MTT results show that cell viability for the B16F10 lineage was significantly reduced when treated with 0.25mg / ml NP g-C₃N₄ with Cu²⁺ + under blue light irradiation for 10 minutes. In normal cells, HacaT and NIH3T3, treatment of PDT with NPs and blue light irradiation showed no significant toxicity. These results indicate that Cu²⁺ + - containing g-C₃N₄ NPs can be studied for future applications as selective PDT sensitizing agents for the treatment of cancer.

KEYWORDS: Câncer Treatment, Carbon-nitride, Reactive Oxygen Species (ROS), Photodynamic Therapy.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 01: Estágios de desenvolvimento do câncer. | 22 |
| FIGURA 02: Esquema da distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes, no Brasil, estimados para 2018 por sexo (exceto pele não melanoma). | 26 |
| FIGURA 03: Nanomateriais de carbono. | 30 |
| FIGURA 04: Estrutura de g-C ₃ N ₄ e da unidade tri-s- triazina | 33 |
| FIGURA 05: Terapia fotodinâmica, evidenciando a formação de ROS e morte celular. | 36 |
| FIGURA 06: Etapas do planejamento experimental estudo desenvolvido. | 40 |
| FIGURA 07: Ensaio de viabilidade celular com a triagem das amostras para a 1 etapa do experimento. | 40 |
| FIGURA 08: Ensaio de viabilidade celular da amostra 3 da 1 etapa associada a metais, metais puro e nano pura, para ensaios da 2 etapa do estudo. | 41 |
| FIGURA 09: Ensaio de caracterização, microscopia eletrônica de transmissão, Raman, tempo de incorporação e irradiação, viabilidade celular da nano 4, metal e nano pura que compõem a etapa final do estudo. | 42 |
| FIGURA 10: Equipamento de fonte luminosa LED. | 44 |
| FIGURA 11: Preparo das amostras com luz vermelha para ensaio com TFD. | 49 |
| FIGURA 12: Tratamento com LED. | 50 |
| FIGURA 13: Cabine com luz vermelha para preparo das amostras e cabine com LED para o tratamento das mesmas. | 51 |

FIGURA 14: Micrografia eletrônica evidenciando nanopartículas de g-C₃N₄(setas).

52

FIGURA 15: Análise de RAMAN. Os espectros são característicos de uma suposta ligação da nano de Nitreto ao Cobre (linha em vermelho), Nitreto (linha em preto), enfatizando as regiões onde ocorreu o deslocamento.

53

FIGURA 16: Avaliação da atividade citotóxica das amostras 1, 2 e 3 em células de carcinoma mamário murino 4T1 Luciferase após 24h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. *p < 0,5; **p <0,01; *** p< 0,001; ****p<0,0001.

54

FIGURA 17: Avaliação da atividade citotóxica das amostras 1, 2 e 3 em células de carcinoma mamário murino 4T1 Luciferase após 48h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. *p < 0,5; **p <0,01; *** p< 0,001; ****p<0,0001.

55

FIGURA 18: Avaliação da atividade citotóxica das amostras 1, 2 e 3 em células de carcinoma mamário murino 4T1 Luciferase após 72h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. *p < 0,5; **p <0,01; *** p< 0,001; ****p<0,0001.

56

FIGURA 19: Avaliação da atividade citotóxica das amostras 1, 2 e 3 em células de melanoma murino B16F10 após 24h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml.*p < 0,5; **p <0,01; *** p< 0,001; ****p<0,0001.

57

FIGURA 20: Avaliação da atividade citotóxica das amostras 1, 2 e 3 em células de melanoma murino B16F10 após 48h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. *p < 0,5; **p <0,01; *** p< 0,001; ****p<0,0001.

57

FIGURA 21: Avaliação da atividade citotóxica das amostras 1, 2 e 3 em células de melanoma murino B16F10 após 72h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml.*p < 0,5; **p <0,01; *** p< 0,001; ****p<0,0001.

58

FIGURA 22: Avaliação da atividade citotóxica das amostras 1, 2 e 3 em células de fibroblasto embrionário murinas NIH/3T3 após 24h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. *p < 0,5; **p <0,01; *** p< 0,001; ****p<0,0001. 58

FIGURA 23: Avaliação da atividade citotóxica das amostras 1, 2 e 3 em células de fibroblasto embrionário murinas NIH/3T3 após 48h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. *p < 0,5; **p <0,01; *** p< 0,001; ****p<0,0001. 60

FIGURA 24: Avaliação da atividade citotóxica das amostras 1, 2 e 3 em células de fibroblasto embrionário murinas NIH/3T3 após 72h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. *p < 0,5; **p <0,01; *** p< 0,001; ****p<0,0001. 60

FIGURA 25: Avaliação da atividade citotóxica das nanos 1, 2, 3 associada a metal, metais 1,2 e 3 puro e nano pura em células de carcinoma mamário murino 4T1 Luciferase após 24h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. *p < 0,5; **p <0,01; *** p< 0,001; ****p<0,0001. 62

FIGURA 26: Avaliação da atividade citotóxica das nanos 1, 2 3 associada a metal, metais 1,2 e 3 puro e nano pura em células de carcinoma mamário murino 4T1 Luciferase após 48h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. *p < 0,5; **p <0,01; *** p< 0,001; ****p<0,0001. 63

FIGURA 27: Avaliação da atividade citotóxica das nanos 1, 2 3 associada a metal, metais 1,2 e 3 puro e nano pura em células de carcinoma mamário murino 4T1 Luciferase após 72h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. *p < 0,5; **p <0,01; *** p< 0,001; ****p<0,0001. 64

FIGURA 28: Avaliação da atividade citotóxica das nanos 1, 2 3 associada a metal, metais 1,2 e 3 puro e nano pura em células de melanoma murino B16F10 após 24h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. *p < 0,5; **p <0,01; *** p< 0,001; ****p<0,0001. 65

FIGURA 29: Avaliação da atividade citotóxica das nanos 1, 2 3 associada a metal, metais 1,2 e 3 puro e nano pura em células de melanoma murino B16F10 após 48h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. *p < 0,5; **p <0,01; *** p< 0,001; ****p<0,0001. 66

FIGURA 30: Avaliação da atividade citotóxica das nanos 1, 2 3 associada a metal, metais 1,2 e 3 puro e nano pura em células de melanoma murino B16F10 após 72h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. *p < 0,5; **p <0,01; *** p< 0,001; ****p<0,0001. 67

FIGURA 31: Avaliação da atividade citotóxica das nanos 1, 2 3 associada a metal, metais 1,2 e 3 puro e nano pura em células de carcinoma cervical humano HELA após 24h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. *p < 0,5; **p <0,01; *** p< 0,001; ****p<0,0001. 68

FIGURA 32: Avaliação da atividade citotóxica das nanos 1, 2 3 associada a metal, metais 1,2 e 3 puro e nano pura em células de carcinoma cervical humano HELA após 48h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. *p < 0,5; **p <0,01; *** p< 0,001; ****p<0,0001. 69

FIGURA 33: Avaliação da atividade citotóxica das nanos 1, 2 3 associada a metal, metais 1,2 e 3 puro e nano pura em células de carcinoma cervical humano HELA após 72h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. *p < 0,5; **p <0,01; *** p< 0,001; ****p<0,0001. 70

FIGURA 34: Avaliação da atividade citotóxica das nanos 1, 2 3 associada a metal, metais 1,2 e 3 puro e nano pura em células de fibroblasto embrionário murinas NIH/3T3 após 24h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. *p < 0,5; **p <0,01; *** p< 0,001; ****p<0,0001. 71

FIGURA 35: Avaliação da atividade citotóxica das nanos 1, 2 3 associada a metal, metais 1,2 e 3 puro e nano pura em células de fibroblasto embrionário murinas

NIH/3T3 após 48h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. *p < 0,5; **p <0,01; *** p< 0,001; ****p<0,0001. 72

FIGURA 36: Avaliação da atividade citotóxica das nanos 1, 2 3 associada a metal, metais 1,2 e 3 puro e nano pura em células de fibroblasto embrionário murinas NIH/3T3 após 72h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. *p < 0,5; **p <0,01; *** p< 0,001; ****p<0,0001. 73

FIGURA 37: Gráficos das concentrações de tempo de incorporação das nano associadas a metal, metal puro e nano pura para determinar o melhor tempo com o pico mais expressivo de fluorescência das amostras analisadas. 77

FIGURA 38: Análise do tempo de irradiação de LED na linhagem B16F10 para as nanos em estudo. 79

FIGURA 39: Avaliação da atividade citotóxica da NP, NM em células melanoma murino B16F10 após 15, 30 minutos e 24h de exposição nas concentrações de 0,1- 0,25 e 0,5mg/ml, com exposição de 10 minutos no tratamento luz ambiente. *p < 0,5; **p <0,01; *** p< 0,001; ****p<0,0001. 81

FIGURA 40: Avaliação da atividade citotóxica da NP, NM em células melanoma murino B16F10 após 15, 30 minutos e 24h de exposição nas concentrações de 0,1- 0,25 e 0,5mg/ml, com exposição de 10 minutos no tratamento LED. *p < 0,5; **p <0,01; *** p< 0,001; ****p<0,0001. 82

FIGURA 41: Avaliação da atividade citotóxica da NP, NM e Metal em células de carcinoma mamário murino 4T1 Luciferase após 24h de exposição nas concentrações de 0,1- 0,25 e 0,5mg/ml, com exposição de 10 minutos no tratamento de com radiação e sem radiação. As letras a,b,c e d são < 0,05. 85

FIGURA 42: Avaliação da atividade citotóxica da NP, NM e Metal em células melanoma murino B16F10 após 24h de exposição nas concentrações de 0,1- 0,25 e

0,5mg/ml, com exposição de 10 minutos no tratamento no tratamento de com radiação e sem radiação. As letras a, b, c e d são $< 0,05$. 86

FIGURA 43: Avaliação da atividade citotóxica da NP, NM e Metal em células de carcinoma cervical humano HELA após 24h de exposição nas concentrações de 0,1- 0,25 e 0,5mg/ml, com exposição de 10 minutos no tratamento no tratamento de com radiação e sem radiação. As letras a, b,c e d são $< 0,05$. 87

FIGURA 44: Avaliação da atividade citotóxica da NP, NM e Metal em células de fibroblasto embrionário murinas NIH/3T3 após 24h de exposição nas concentrações de 0,1- 0,25 e 0,5mg/ml, com exposição de 10 minutos no tratamento no tratamento de com radiação e sem radiação. As letras a, b, c e d são $< 0,05$. 88

FIGURA 45: Avaliação da atividade citotóxica da NP, NM e Metal em células queratinócitos humanos HaCat após 24h de exposição nas concentrações de 0,1- 0,25 e 0,5mg/ml, com exposição de 10 minutos no tratamento no tratamento de com radiação e sem radiação. As letras a, b,c e d são $< 0,05$. 88

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 01: Previsão de casos de câncer para 2018 no Brasil. | 25 |
| TABELA 02: Relação de tempo <i>versus</i> fluência para a linhagem de B16F10. | 47 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACS - American Câncer Society
- Bottom-Up - De baixo para cima
- C_3N_4 - Nitreto de Carbono
- CDO - Comprimento de Onda
- C-Dots - Carbon Dots
- C-DotsB - Carbon Dots com boronato
- CNPs - Nanopartículas de carbono (do inglês, Carbon Nanoparticles)
- CQDs - Pontos quânticos de carbono
- DMEM - Dulbecco Modified Eagle Medium (Invitrogen)
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- DST - Doença Sexualmente Transmissível
- EROs - Espécies reativas de oxigênio
- FBS - Soro Fetal Bovino
- FS - Fotosensibilizador
- g- C_3N_4 - Nitretos de carbono grafítico
- GSH - Glutathione
- H₂ - Hidrogênio
- HeLa - Linhagem de células de carcinoma cervical humano
- INCA - Instituto Nacional do Câncer
- LabMic - Laboratorio Multiusuario de Microscopia de alta Resolução
- LED - Diodo emissor de luz (sigla em inglês Light Emitting Diode)
- LIMA - Laboratório de Inorgânica e Materiais
- MET - Microscopia eletrônica de transmissão
- MTT - Brometo de 3(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio
- NM - Nano com metal
- NP - Nano pura
- NPM - Nanopartícula com Metal
- NPs - Nanopartículas
- NTCM - Nanotubos de carbono multicamadas
- PBS - Tampão Fosfato Salina

QDs - Pontos quânticos (do inglês *Quantum Dots*)

RAMAN - Espectroscopia Raman Amplificada por superfície (sigla em inglês, *SERS*)

ROS - Espécies reativas de oxigênio

SWNTs - Nanotubos de carbono de parede única

TFD - Terapia Fotodinâmica

Top-Down - De cima para baixo

UV - Ultravioleta

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 22 |
| 1.1 Câncer | 22 |
| 1.2 Nanotecnologia | 26 |
| 1.3 Nanomedicina | 27 |
| 1.4 Nanomateriais de Carbono..... | 29 |
| 1.5 Nitreto de Carbono..... | 33 |
| 1.6 Terapia Fotodinâmica TFD..... | 35 |
| 2 JUSTIFICATIVA | 37 |
| 3 OBJETIVOS | 39 |
| 3.1 Objetivo Geral..... | 39 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 39 |
| 4 METODOLOGIA..... | 40 |
| 4.1 Desenho do Experimento | 40 |
| 4.2 Amostra..... | 43 |
| 4.3 Produção, síntese e caracterização | 43 |
| 4.4 Análise Morfológica da Nanopartícula | 43 |
| 4.5 Análise física..... | 43 |
| 4.5.1 Equipamento de fonte luminosa para TFD..... | 43 |
| 4.5.2 Espectroscopia Raman intensificada por superfície | 44 |
| 4.6 Ensaio <i>in vitro</i> | 45 |
| 4.7 Análise do perfil de tempo de incorporação das nanos..... | 46 |
| 4.8 Avaliação do tempo de irradiação do LED nas nanos | 47 |
| 4.9 Testes com Terapia Fotodinâmica TFD..... | 48 |
| 4.10 Estatística | 51 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 52 |
| 5.1 Análise morfológica da partícula | 52 |
| 5.2 Espectroscopia RAMAN intensificada por superfície | 53 |
| 5.3 Ensaio <i>in vitro</i> | 54 |
| 5.3.1 Viabilidade Celular..... | 54 |
| 5.3.2 Análise do perfil de tempo de incorporação das nanos | 76 |
| 5.3.3 Avaliação do tempo de irradiação do LED nas nanos..... | 78 |

| | |
|---|------------|
| 5.3.4 Ensaio de viabilidade celular com TFD da nano com metal, nano sem metal e metal pelo ensaio de MTT utilizando luz branca no ambiente | 79 |
| 5.3.5 Ensaio de viabilidade celular com TFD da nano com metal, nano sem metal e metal pelo ensaio de MTT utilizando luz vermelha no ambiente..... | 82 |
| 6 CONCLUSÃO..... | .93 |
| REFERÊNCIAS | .94 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

Com base nos em sistemas complexos para o desenvolvimento do câncer, que podem mesmo levar décadas para atingir seu estágio mais avançado, pode-se pontuar algumas características necessárias para que a doença se desenvolva, tais como: a proliferação descontrolado (divisão descontrolada), invasão de tecidos adjacentes, metástase (disseminação para outros locais no corpo) e imortalidade (proteção contra a morte celular programada), ou seja, normal, iniciação, promoção e progressão como mostra a figura 01 (BARRETO, 2011).

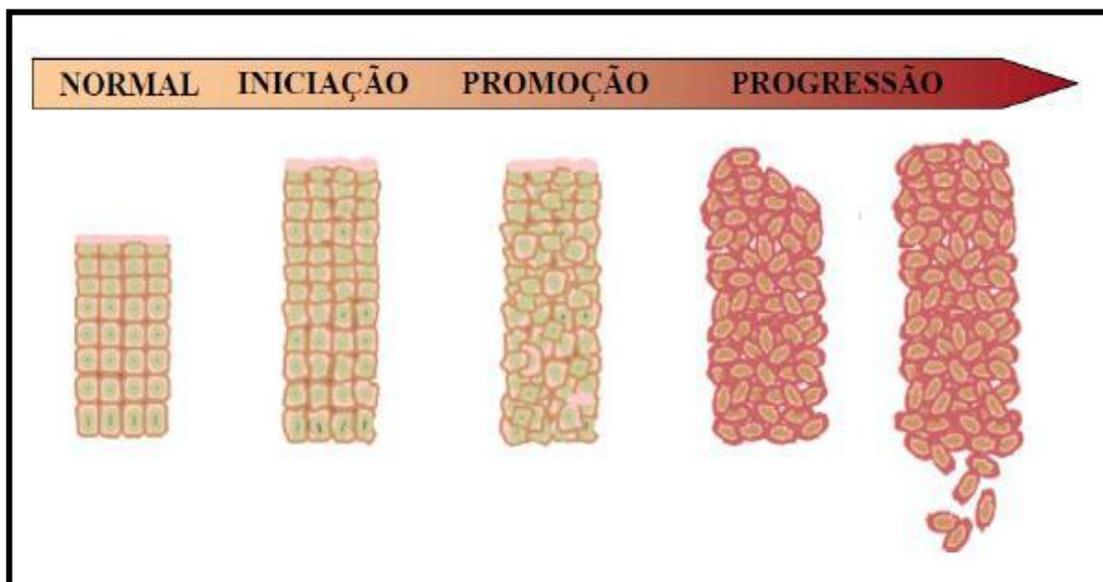


FIGURA 01: Estágios de desenvolvimento do câncer. Fonte (OMBREDANE, 2016).

Pode-se determinar que o desenvolvimento celular do câncer está relacionado a fatores descritos na literatura que causam dano celular como intrínsecos e extrínsecos. Os extrínsecos, por exemplo, são os relacionados ao meio em que se encontra, podendo-se citar a luz ultravioleta do sol, tabagismo e álcool, e os intrínsecos são aqueles nos quais o organismo se defende dos fatores externos que causam pré-disposição ao desenvolvimento do câncer. Outro fator importante que caracteriza o câncer é o desenvolvimento de células que venham a se proliferar de forma descontrolada, quando o meio proporciona condições para isso, podendo ocorrer a

metástase, responsável pelos elevados índices de mortalidade desta patologia (HANAHAN, 2011).

A variação de câncer se relaciona aos diversos tipos de células presente no corpo, como por exemplo, a diferença observada no câncer de pele, órgão constituído por mais de um tipo de tecido (epitélio e conjuntivo). Quando surge em tecido epitelial, a nomenclatura para este local de desenvolvimento é o carcinoma, porém quando a localização se origina no tecido conjuntivo (e derivados) e muscular, a nomenclatura utilizada é o sarcoma (INCAa, 2018).

O desenvolvimento de um tumor funciona com base no agrupamento de células a uma taxa que depende da difusão de oxigênio e nutrientes, responsáveis pela sua formação (BARRETO, 2011). Dado que a literatura reporta que células consideradas cancerígenas tenham a possibilidade de acumular diversas alterações genéticas, somente aquelas que possuem fatores de crescimento seletivo, como os receptores específicos, podem gerar mutação com desenvolvimento tumoral (KITAMURA, 2015). A metástase, por sua vez, é considerada um processo de proliferação das células cancerígenas a partir de um tumor primário, que leva à formação do secundário em locais considerados distantes do primeiro, o que a torna uma via complexa no tratamento atual da patologia (SCHROEDER, 2012).

O desenvolvimento de um tumor denominado como benigno se dá quando uma determinada massa de células possui um processo de formação lento e sua multiplicação se assemelha o tecido original, onde a probabilidade para risco de vida é baixa (INCAa, 2018).

Sendo o diagnóstico de câncer considerado um campo emergente em nanotecnologia, a detecção desta patologia por forma não invasiva traz benefícios ao paciente, como: obtenção não invasiva de imagens que possam substituir a biópsia, por meio de técnicas não invasivas de imagiologia para o câncer, contendo uma elevada sensibilidade, bem como alto alcance do alvo, devido a propriedades inerentes da nanopartícula magnética utilizada, a qual, quando modificada, poderá abranger uma maior área terapêutica, podendo, assim, combinar diagnóstico inicial e posteriormente, após atingir a célula alvo, e, então, conduzir o fármaco (YIGIT, 2012; CHEN et al. 2011).

Grupos de pesquisadores vêm se dedicando a detectar de maneira eficiente um impacto mais significativo nas taxas de mortalidade com diagnóstico mais precoce que

tenha, como consequência, menos danos físicos, psicológicos e sociais devido a terapias consideradas agressivas, como a quimioterapia, processos cirúrgicos e radioterapia (OSHIRO et al., 2014).

O número de casos de câncer vem aumentando consideravelmente em todo o mundo, mesmo diante de todas as pesquisas para determinar diagnóstico precoce e tratamentos mais eficazes, e com base nos dados da Agência Internacional para pesquisa de Câncer (IARC, do inglês *International Agency for Research on Cancer*), em países que se encontram em desenvolvimento a estimativa para os próximos 10 anos é de um aumento de 80% dos casos de 20 milhões de novos cânceres até o ano de 2025 (IARC, 2018).

Com base em dados do Instituto Nacional do Câncer (INCAb, 2018), no Brasil a estimativa é de que o país registre para o biênio 2018/2019 cerca de 600 mil novos casos de câncer: 180 mil novos casos de câncer de pele não melanoma e 420 mil casos novos de câncer. Diante destes dados, pode-se assemelhar este perfil epidemiológico ao da América Latina e Caribe, que apresentam para os mesmos tipos os valores de 61 mil casos de câncer de próstata e 58 mil de mama, estes os mais frequentes. Baseado nestes dados, o câncer de pele não melanoma se apresenta com a maior incidência no Brasil (INCAc, 2018).

A tabela 01 apresenta os dados com a estimativa para os tipos de câncer no Brasil para o ano de 2018 com suas taxas consideradas brutas e seus ajustes de incidência por 100 mil habitantes com número de novos casos, com prevalência de sexo e localização primária (INCAc, 2018).

TABELA 01: Previsão de casos de câncer para 2018 no Brasil

| Localização Primária Neoplasia Maligna | Estimativa dos Casos Novos | | | | | | | | | | | |
|---|----------------------------|------------|---------------|----------|------------|---------------|----------|------------|---------------|----------|------------|---------------|
| | Homens | | | | | | Mulheres | | | | | |
| | Estados | | | Capitais | | | Estados | | | Capitais | | |
| | Casos | Taxa Bruta | Taxa Ajustada | Casos | Taxa Bruta | Taxa Ajustada | Casos | Taxa Bruta | Taxa Ajustada | Casos | Taxa Bruta | Taxa Ajustada |
| Próstata | 68.220 | 66,12 | 67,82 | 15.720 | 70,76 | 66,31 | - | - | - | - | - | - |
| Mama Feminina | - | - | - | - | - | - | 59.700 | 56,33 | 51,29 | 19.920 | 80,33 | 63,98 |
| Colo do Útero | - | - | - | - | - | - | 16.370 | 15,43 | 17,11 | 4.620 | 18,66 | 17,58 |
| Traqueia, Brônquio e Pulmão | 18.740 | 18,16 | 16,97 | 4.520 | 20,33 | 21,05 | 12.530 | 11,81 | 9,22 | 3.710 | 15,06 | 11,44 |
| Cólon e Reto | 17.380 | 16,83 | 20,03 | 5.630 | 25,34 | 25,16 | 18.980 | 17,90 | 18,40 | 6.820 | 27,49 | 20,84 |
| Estômago | 13.540 | 13,11 | 14,98 | 3.240 | 14,55 | 10,95 | 7.750 | 7,32 | 5,96 | 2.210 | 8,92 | 5,34 |
| Cavidade Oral | 11.200 | 10,86 | 11,22 | 2.770 | 12,38 | 12,03 | 3.500 | 3,28 | 2,86 | 1.010 | 3,89 | 2,80 |
| Laringe | 6.390 | 6,17 | 6,31 | 1.540 | 6,86 | 8,44 | 1.280 | 1,20 | 0,96 | 420 | 1,30 | 0,92 |
| Bexiga | 6.690 | 6,43 | 7,79 | 1.920 | 8,59 | 9,20 | 2.790 | 2,63 | 2,21 | 890 | 3,42 | 2,61 |
| Esôfago | 8.240 | 7,99 | 6,73 | 1.450 | 6,46 | 7,04 | 2.550 | 2,38 | 1,67 | 540 | 1,85 | 1,38 |
| Ovário | - | - | - | - | - | - | 6.150 | 5,79 | 4,80 | 2.140 | 8,46 | 6,54 |
| Linfoma de Hodgkin | 1.480 | 1,43 | 1,14 | 550 | 2,19 | 1,93 | 1.050 | 0,96 | 0,92 | 400 | 1,33 | 1,19 |
| Linfoma não Hodgkin | 5.370 | 5,19 | 5,42 | 1.480 | 6,59 | 6,81 | 4.810 | 4,55 | 4,19 | 1.520 | 6,10 | 5,44 |
| Glândula Tireoide | 1.570 | 1,49 | 1,50 | 500 | 1,87 | 1,76 | 8.040 | 7,57 | 5,88 | 2.490 | 10,01 | 7,02 |
| Sistema Nervoso Central | 5.810 | 5,62 | 5,49 | 1.340 | 6,10 | 6,55 | 5.510 | 5,17 | 5,17 | 1.400 | 5,63 | 4,70 |
| Leucemias | 5.940 | 5,75 | 5,51 | 1.480 | 6,69 | 6,58 | 4.860 | 4,56 | 4,29 | 1.190 | 4,72 | 4,59 |
| Corpo do Útero | - | - | - | - | - | - | 6.600 | 6,22 | 5,44 | 2.370 | 9,46 | 7,46 |
| Pele Melanoma | 2.920 | 2,82 | 2,69 | 800 | 3,34 | 3,31 | 3.340 | 3,16 | 2,15 | 880 | 3,42 | 2,74 |
| Outras Localizações | 41.480 | 40,17 | 35,26 | 9.470 | 42,62 | 43,45 | 36.230 | 34,17 | 29,04 | 8.920 | 36,00 | 28,39 |
| Todas as Neoplasias, exceto Pele não Melanoma | 214.970 | 208,32 | 217,27 | 52.410 | 235,91 | 226,91 | 202.040 | 190,61 | 191,78 | 61.450 | 247,95 | 199,05 |
| Pele não Melanoma | 85.170 | 82,53 | - | 17.020 | 76,60 | - | 80.410 | 75,84 | - | 17.230 | 69,60 | - |
| Todas as Neoplasias Malignas | 300.140 | 290,86 | - | 69.430 | 312,52 | - | 282.450 | 266,47 | - | 78.680 | 317,47 | - |
| Todas as Neoplasias Malignas Corrigidas para Sub-Registro | 324.580 | 314,55 | - | - | - | - | 310.300 | 292,74 | - | - | - | - |

* População padrão mundial (1960). / *Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: Estimativa câncer, 2018. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Adaptado de < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>>. Acesso em 08 de março 2018.

Para os homens, a estimativa dos mais comuns é: próstata, com 31,7%; pulmão, com 8,7%; cólon e reto 8,1%, estômago 6,3% e cavidade oral 5,2%, em contrapartida, para as mulheres, tem-se: mama, 29,5%, cólon e reto 9,4%, colo do útero 8,1%, pulmão 6,2% e glândula tireoide 4,0%. Todos estes dados estão presentes na figura 02.

| Localização Primária | Casos | % | | | Localização Primária | Casos | % |
|-----------------------------|--------|-------|---|-----------------------------|----------------------|-------|---|
| | | | Homens | Mulheres | | | |
| Próstata | 68.220 | 31,7% |  | Mama Feminina | 59.700 | 29,5% | |
| Traqueia, Brônquio e Pulmão | 18.740 | 8,7% | | Cólon e Reto | 18.980 | 9,4% | |
| Cólon e Reto | 17.380 | 8,1% | | Colo do Útero | 16.370 | 8,1% | |
| Estômago | 13.540 | 6,3% | | Traqueia, Brônquio e Pulmão | 12.530 | 6,2% | |
| Cavidade Oral | 11.200 | 5,2% | | Glândula Tireoide | 8.040 | 4,0% | |
| Esófago | 8.240 | 3,8% | | Estômago | 7.750 | 3,8% | |
| Bexiga | 6.690 | 3,1% | | Corpo do Útero | 6.600 | 3,3% | |
| Laringe | 6.390 | 3,0% | | Ovário | 6.150 | 3,0% | |
| Leucemias | 5.940 | 2,8% | | Sistema Nervoso Central | 5.510 | 2,7% | |
| Sistema Nervoso Central | 5.810 | 2,7% | | Leucemias | 4.860 | 2,4% | |

*Números arredondados para múltiplos de 10.

FIGURA 02: Esquema da distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes, no Brasil, estimados para 2018 por sexo (exceto pele não melanoma).

Fonte: Instituto Nacional do Câncer (INCA). Adaptado de <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>>. Acesso em 08 de março 2018.

1.2 NANOTECNOLOGIA

A Nanotecnologia é um dos setores da ciência mais importantes e um dos que mais se desenvolvem atualmente. A razão para isso está nos maciços investimentos oriundos de agências governamentais e de diversos setores privados (MICHELSON, 2008). De fato, a nanotecnologia tem sido considerada por muitos especialistas como a nova revolução industrial, pois materiais em escala nanométrica têm sido explorados em diversas áreas como: Eletrônica, Biologia, Medicina, Física, Química, Alimentos, Cosméticos, Agricultura, Materiais e Engenharias (TIGINYANU, 2012; RUIZ-HITZKY, 2013).

A nanotecnologia é considerada um campo emergente e dinâmico. Estudiosos na área argumentam que ela possui chances de ter um impacto horizontal no setor industrial, com o desenvolvimento de pesquisas mais atuantes numa visão de multidisciplinaridade e economia que venha solucionar problemas atuais, bem como prevenir os danos futuros em setores da saúde, meio ambiente e sustentabilidade (HUANG, 2011).

Segundo Karkare (2008), a nanotecnologia é uma área multidisciplinar e que pode ter aplicação relacionada à engenharia responsável pelo *design* e manuseio de componentes e sistema considerados muito pequenos (de até 100 nm). Levando em conta esse nicho, foi criada, nos Estados Unidos da América, a Iniciativa Nacional de

Nanotecnologia, com o objetivo de financiar este tipo de tecnologia, que, por definição, inclui qualquer elemento inferior a 100 nanômetros com propriedades novas (RAMSDEN, 2011).

Existem em nanotecnologia duas abordagens principais que são “top-down” que significa de cima para baixo. Nessa abordagem, as estruturas maiores são reduzidas em tamanho à nanoescala, porém, suas propriedades originais permanecem sem controle de nível atômico ou ocorre uma desconstrução de estruturas maiores em menores. Na segunda, “bottom-up”, de baixo para cima, trabalha-se com nanotecnologia molecular ou manufatura molecular para criar nanoestruturas (SANCHEZ, 2010).

1.3 NANOMEDICINA

A exploração da nanotecnologia em saúde, denominada de nanomedicina, oferece inúmeras possibilidades e aplicações de nanomateriais como ferramentas na detecção, diagnóstico e, eventualmente, terapia de doenças. Estima-se que, em 2015 o mercado global desse setor alcançará valores na ordem de US\$ 160 bilhões de dólares (SHI, 2010). Nesse contexto, sondas ópticas para imageamento seletivo de organelas celulares se tornaram ferramentas poderosas para investigar processos como respiração, apoptose, degradação de substratos, desintoxicação, mitose, transporte intracelular, resistência a drogas, entre outros. Informações dessa natureza são essenciais para as ciências médicas entenderem funções e mecanismos relevantes para vida e, atualmente, são responsáveis por significativos avanços no diagnóstico e terapêutico.

Os nanomateriais podem ser manipulados para serem utilizados em contraste de agentes existentes (por exemplo, Tomografia Computadorizada e Ressonância Magnética) e *in vivo* são destinados à área de imagem emergentes (por exemplo Tomografia e Fluorescência Molecular), sendo estes utilizados para detecção precoce de câncer com metastase (HAHN et al. 2011). Autores afirmam que os nanomateriais são produzidos para serem utilizados na detecção de agentes anti-câncer ou como veículos de distribuição de drogas (MANTHE et al. 2010, WANG, 2012). Os Nanomateriais podem ser alterados para que suas propriedades multifuncionais venham a auxiliar simultaneamente como agentes anti-câncer e como imagem de

contraste (SHARMA et al. 2010). Aplicações *in vivo* que utilizam nanotecnologias para câncer apontam, como um requisito fundamental no diagnóstico ou terapia, os nanomateriais especificamente utilizados para detectar câncer (CUENCA et al. 2006).

Com a possibilidade de ter um veículo de entrega de medicamento no alvo desejado, associou-se a esta possibilidade a ideia de diagnóstico, ou seja, a entrega do ativo para um tratamento considerado pontual vem avançando a cada dia (LIU, 2011; PASZKO 2011).

Com o uso de nanomateriais na medicina, foi possível obter melhorias em instrumentação, que vão desde um bisturi mais eficiente no processo cirúrgico, até as metodologias de técnicas utilizadas para o diagnóstico, por meio do uso de nanopartículas que possuem uma alta sensibilidade para diagnosticar patologia como o câncer (VENDITTO, 2013). Estudos vêm sendo intensificados nesta área, visando ao desenvolvimento mais eficaz das técnicas que possam obter conjugados multifuncionais que venham atender a necessidade de atingir determinado alvo através de rastreamento, como um agente de imagem, um veículo de entrega de droga numa localização específica, com uso de nanopartículas (TINKLE, 2014).

A literatura retrata que nanopartículas em sistemas ideais são capazes de formar arranjos uni, bi e tridimensionais, quando as estruturas encontram-se aglomeradas e possuem propriedades físicas e químicas diferentes das nanopartículas isoladas (COUTO, 2006), podendo considerar que os nanomateriais constituídos de nanopartículas entre 1 a 1000 nm possuem, em sua estrutura, átomos ou moléculas, e estes, quando reduzido o tamanho, sua caracterização é considerada complexa por técnicas convencionais utilizadas (ZANCHET, 2000; BULTE e KRAITCHMAN, 2004).

Por se tratar de uma área que vem demonstrando resultados promissores, as nanopartículas têm sido alvo de diversos estudos, principalmente no que se refere à escala já mencionada, por possuir propriedades como: confinamento quântico em semicondutores e superparamagnetismo nos materiais magnéticos (ROACH et al. 2007). As nanopartículas apresentam, então, propriedades exclusivas em mecânica, óptica, eletrônica, química e bioquímica em escala nanométrica utilizada para concepção das nanoestruturas desejadas (CHAVES, 2010).

Como já dito, a nanotecnologia vem despontando uma gama de possibilidades para área médica em patologias como o câncer, destacando-se o diagnóstico com a localização dessa técnica (CHINEN et al. 2015).

1.4 NANOMATERIAIS DE CARBONO

Para os nanomateriais de carbono que possuem ligações sp^2 , as propriedades mecânicas, eletrônicas, óticas e químicas mostraram-se eficientes em muitas aplicações (LIU, 2011). Entre estes materiais, pode-se citar os nanotubos de carbono (nanoestruturas 1D de carbono na forma de um tubo) e os grafenos (folhas de carbono 2D). São eles os que mais têm chamado atenção, e estudos recentes têm mostrado o elevado potencial deles para aplicações em medicina (CANCINO, 2014).

As propriedades únicas dos nanomateriais carbônicos, tais como: fulerenos, nanotubos de carbono, folhas de grafeno e nanopartículas fluorescentes de carbono ou pontos quânticos de carbono (CQDs) vêm sendo investigadas por grupos de cientistas, pois apresentam elevado potencial para uma extensa variedade de aplicações técnicas, onde características eletrônicas e físico-químicas de CQDs, por exemplo, características em suas propriedades óticas e emissões de fluorescência de interesse para o diagnóstico mais satisfatório, e com isso estão sendo desenvolvidos CQDs para substituir os pontos quânticos semicondutores, pois estes a toxicidade é baixa, biocompatibilidade satisfatória, bem como o baixo custo e inércia química, visto que também possuía propriedades de fluorescência similares a quantum dots (LIM, 2015).

A família dos nanocarbonos é constituída pelos fulerenos, nanotubos de carbono, nanofibras de carbono, nanodiamantes, grafeno (figura 03) e, mais recentemente, pelas CNPs (MIRANDA, 2014). As Nanopartículas de carbono (CNPs) são as mais recentes classes de nanopartículas (NPs) fluorescentes, as quais geraram um grande interesse devido à afinidade de suas propriedades óticas com as dos *Quantum Dots* (QDs), possuindo a vantagem de anular a toxicidade dos metais pesados (MIRANDA, 2014).

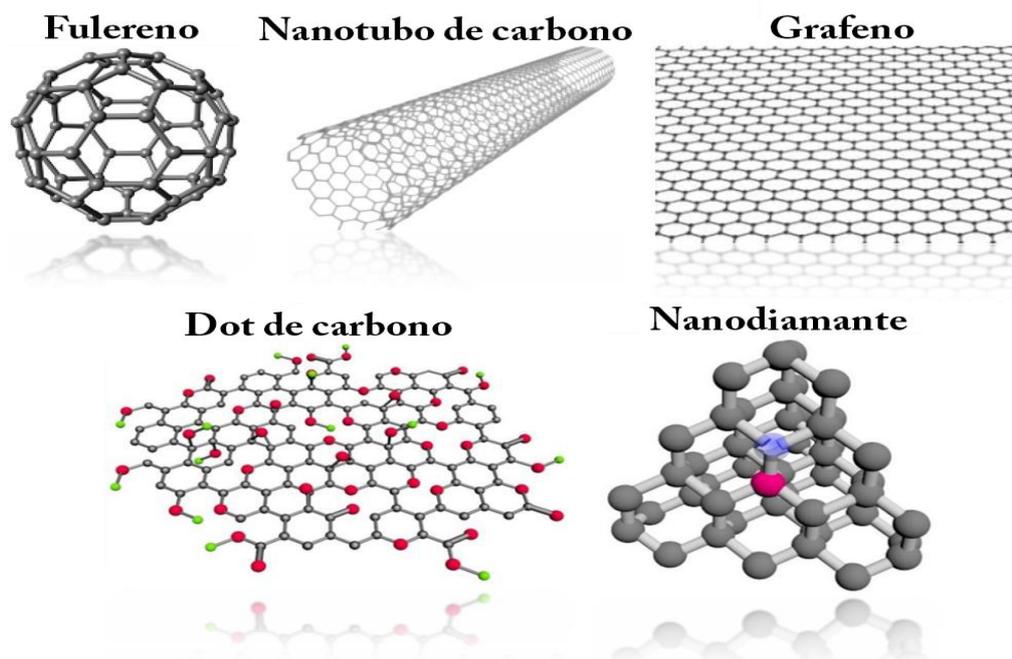


FIGURA 03: Nanomateriais de carbono. Fonte: Adaptado de HONG, 2015.

O grafeno é considerado da família de nanotubos de carbono e vem sendo pesquisado na área biomédica desde 2004, despontando em aplicações propícias para biossensores, entrega de drogas e imagiologia voltada para tratamento de câncer (LIU, 2011a; ZHANG, 2011a).

A família dos nanocarbonos é constituída pelos fulerenos, nanotubos de carbono, nanofibras de carbono, nanodiamantes, grafeno (figura 03) e, mais recentemente, pelas CNPs (MIRANDA, 2014). As Nanopartículas de carbono (CNPs) são as mais recentes classes de nanopartículas (NPs) fluorescentes, as quais geraram um grande interesse devido à afinidade de suas propriedades ópticas com as dos *Quantum Dots* (QDs), possuindo a vantagem de anular a toxicidade dos metais pesados (MIRANDA, 2014).

Em estudos recentes, uma nova classe de partículas fluorescentes emergiu como promissora para reagir com uma molécula única e partícula de rastreamento em células e organismos vivos de pontos quânticos semicondutores (PIEROBON, 2012).

Sendo considerado um grupo de recém-emergidas fluorescentes nanomateriais de Carbon Dots (CQDs) vem mostrando grande potencial como nanomateriais versáteis utilizados em uma série de aplicações, desde detecção química, biosensoriamento, bioimagem, entrega de drogas, terapia fotodinâmica (TFD), fotocatalise e eletrocatalise, quando comparado com pontos quânticos semicondutores,

onde os atributos únicos de CQDs é a composição química benigna onde a solubilidade confere-lhes a oportunidade de aplicação em meio fisiológico (MIRANDA, 2014), fluorescência sintonizável emissões, funcionalização fácil e físico-química excelente bem como a estabilidade fotoquímica (ou não fotobranqueamento), tornando assim mais viável para aplicações técnica bem como o baixo custo e sua facilidade de síntese (YE et al. 2013).

Estas características fazem CQDs muito desejável como alternativas para pontos quânticos semicondutores em visualização biológica de sistemas tanto *in vitro* como *in vivo* (MEHTA et al.2014). Com efeito, estas NPs apresentam-se como marcadores biocompatíveis de elevada solubilidade em meio aquoso, e uma possibilidade de utilização de métodos de síntese simples e moléculas precursoras de baixo custo na produção destas NPs pode torná-las candidatas ideais para a marcação celular e para aplicações biossensoriais (MIRANDA, 2014). Pode-se ainda reportar que o efeito de confinamento quântico dos QDs cobre todo o espectro visível e graças a este é possível controlar o comprimento de onda de emissão através da manipulação dos parâmetros de síntese de forma a controlar o tamanho dos QDs (MIRANDA, 2014).

Os CQDs também estão sendo utilizados em biosensoriamento com base no uso de anticorpos e fragmentos de genes recombinante. Sendo assim, os CQDs estão sendo aplicados principalmente em imunoenaios como marcadores fluorescentes (LIM , 2015). Em geral, os núcleos de carbono de CQDs não são considerados tóxicos e alguma citotoxicidade destes elementos é principalmente causado por agentes passivadores na superfície do CQD (WANG et al., 2011). Em estudos anteriores foi demonstrado que agentes passivadores na superfície, com baixa toxicidade, podem ser usados com segurança em altas concentrações para imagiologia *in vivo* (LIM, 2015).

Os Carbon Dots (C-Dots) apresentam várias aplicações, porém o destaque principal é a formação de bioimagens, onde C-Dots recobertos com o corante ZW800 apresentaram uma capacidade de serem capturados por tumores em animais, gerando imagens fluorescentes precisas do local que se encontrava o tumor (HUANG et al. 2013). C-Dots sem nenhuma cobertura não apresentaram registro de imagens fluorescentes *in vivo* e *ex vivo* de gliomas (RUAN et al.2014). Através de experimentos e diante dos resultados destes, foi possível detectar que C-Dots sensíveis

ao pH podem ser utilizados para gerar imagens fluorescentes de fungos que infectam plantas (JIN et al. 2015).

Podendo também ser recoberto como qualquer outra nanopartícula, C-Dots podem utilizar diferentes moléculas, uma que pode ser utilizada para recobrir C-Dots é o boronato, pois essas moléculas de boronato podem se ligar às moléculas de glicose, e relatos na literatura demonstraram que C-Dots recobertos com boronato (C-DotsB) podem ser utilizados como sensores para açúcar no sangue, podendo detectar sinais de *diabetes mellitus*, e como as moléculas de boronato são capazes de se ligar a glicose, mais de um C-DotB pode se ligar a mesma glicose, gerando um sinal de fluorescência mais forte (SHEN, 2014).

Através de pesquisas já realizadas, sabe-se que o desenvolvimento de células cancerígenas pode se dar em parte por uma elevada quantidade de moléculas de glicose que as mesmas tendem a absorver, e isso é possível, devido principalmente pelo acréscimo da expressão de moléculas de transporte de glicose (SZABLEWSKI, 2013). C-Dots podem apresentar tamanhos pequenos, em torno de 5 a 10 nanômetros, e por apresentarem esse pequeno tamanho, células tumorais acabam por captar C-Dots (HUANG et al. 2013).

Os C-Dots apresentam baixa toxicidade tanto para células como para animais, como reportado na literatura, onde demonstraram que C-Dots produzidos a partir de polietileno glicol não apresentaram citotoxicidade mesmo em concentrações de $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ (FAN et al. 2014). Com isso, relatos da literatura demonstrar que C-Dots recobertos com o antibiótico ciprofloxacino não apresentaram citotoxicidade em concentrações de até 80 mg mL^{-1} (THAKUR et al. 2014), outro grupo de cientistas mostraram que C-Dots solúveis em água não apresentaram toxicidade para o peixe zebrafish (SHI et al. 2014). Contudo, dependendo de sua cobertura, *Carbon Dots* podem apresentar maior ou menor toxicidade, e quando *Carbon Dots* forem recobertos com PEI apresentaram maior toxicidade do que *Carbon Dots* recobertos com PPEI-EI (WANG et al. 2011). Quando recobertos com PEG, *Carbon Dots* apresentaram menor toxicidade do que PEG sozinho (YANG et al. 2009).

1.5 NITRETO DE CARBONO

Nitreto de carbono grafítico ($g\text{-C}_3\text{N}_4$) são uma classe de materiais carbonáceos constituídos por unidades tri-s- triazina cujas vantagens incluem alta estabilidade térmica e química. A figura 04 ilustra a estrutura de uma camada de $g\text{-C}_3\text{N}_4$. Na mesma camada as ligações são covalentes e a interação entre elas é por forças de Van der Waals (LIU et al. 2016). Esses materiais são produzidos por meio da condensação de moléculas ricas em nitrogênio como ureia, guanidina e tiureia. Após esta etapa os chamados $g\text{-C}_3\text{N}_4$ bulky, que possuem pequena área superficial e baixa solubilidade em água, são obtidos. A partir do $g\text{-C}_3\text{N}_4$ bulky materiais com menor tamanho e alta solubilidade aquosa podem ser sintetizados após um tratamento oxidativo (JU et al, 2016).

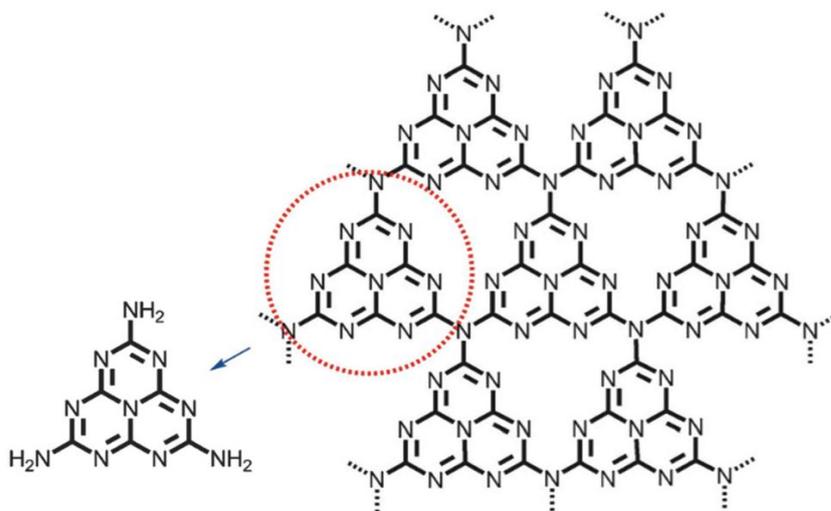


FIGURA 04: Estrutura de $g\text{-C}_3\text{N}_4$ e da unidade tri-s- triazina (LIU et al. 2016).

Dados da literatura relatam que o semiconductor orgânico $g\text{-C}_3\text{N}_4$ pode ser associado a um sistema de quebra da água movido na natureza, sob irradiação UV e luz visível (MARTIN 2014), visto que este procedimento é semelhante ao que ocorre na fotossíntese, onde a hidrólise é impulsionada pela luz, gerando O_2 com alta eficiência (FERREIRA, 2004). Uma vez que este procedimento ainda não é muito utilizado para fins biomédico de materiais que induzem a quebra da água, estudos despontam que nanopartículas de Nitreto de Carbono ($g\text{-C}_3\text{N}_4$) são capazes de quebrar H_2O em O_2 e de Hidrogênio (H_2) (FERREIRA, 2004), quando este evento ocorre a

nível celular, aumenta o nível de oxigênio intratumoral, que supera a hipóxia e possibilita uma maior eficiência da TFD. Deste modo a técnica mostrou-se propícia para terapêutica tumoral, devido às suas características não invasivas e por apresentar alta eficiência e precisão ideal (ZHENG, 2016).

Sendo as nanopartículas de Nitreto de Carbono ($g-C_3N_4$) capazes de quebrar moléculas de água (H_2O), isso faz com que a TFD seja mais eficiente em tumores que sofrem de hipóxia, pois elas conseguem aumentar o nível de O_2 intracelular. Além de quebrar H_2O , o C_3N_4 também consegue diferenciar células cancerígenas de células normais (MICHALET et al, 2005), emitindo fluorescência nas células tumorais, baseado em experimentos desenvolvidos, percebeu-se que associação dos $g-C_3N_4$ à TFD tem especial especificidade, pois não afeta os tecidos vizinhos, apenas o tecido tumoral, isso ocorre por causa da fotossensibilização a qual os tecidos neoplásicos são submetidos (ZHENG, 2016).

A literatura reporta que quando a $g-C_3N_4$ estiver associada a um metal, esta possui a capacidade de intensificar a eficiência da TFD por meio do uso de um metal-inorgânico, como o cobre, por exemplo, quando acoplado ao fotossensibilizador $g-C_3N_4$, que reduz os níveis intracelulares de glutathione, aumentando a geração de espécies reativas de oxigênio ERO. O emprego de íons metálicos na medicina têm tido um grande destaque devido suas cargas positivas e suas propriedades estereoeletrônicas, o que os permite alterar a estrutura e função de alvos biológicos específicos (JU et al, 2016).

A literatura reporta que estudos atuais vêm demonstrando o nitreto de carbono ($g-C_3N_4$) como um novo fotocatalisador no tratamento de câncer (LIN et al, 2014), pois baseado nos resultados pode-se observar uma capacidade para produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em iluminação visível (BING et al, 2015).

Pesquisadores identificaram que a superexpressão de glutathione era uma barreira que deveria ser ultrapassada, pois esta prejudicaria a geração de ROS, limitando assim a sua geração e eficácia para a terapia antes mesmo de sua chegada ao alvo desejado (JIANG et al., 2003).

A glutathione (GSH) age em diversos processos biológicos, como a síntese proteica ou o metabolismo e proteção celular (ROVER et al., 2001). Através de pesquisas envolvendo a GSH constatou-se que, quando não ocorre sua síntese de maneira correta, surgem diversas patologias, onde os níveis da GSH e de enzimas

presentes no seu metabolismo são expressivos em diagnósticos de determinados patologias que são relacionadas ao estresse oxidativo, inclusive alguns tipos de câncer (ROVER et al., 2001; NAVARRO et al., 1999)

Estudos demonstraram que a geração de ROS do nitreto é considerada limitada, sendo preciso associar a este composto outro componente que possa potencializar o efeito de gerar ROS, com isso grupos de pesquisa determinaram que quando metais nobres são associados a este composto, sendo formada uma nanopartícula (NP) com metal ocorre um aumento de conversão da fotoenergia semicondutor, que promove formação de pares de elétrons para absorção gerando uma produção de ROS (ATWATAER, 2010; MUBEEN et al., 2013), com base nos dados da literatura foi possível determinar que atividade fotocatalítica é potencializada quando associada a um metal nobre (ZHOU et al., 2014).

1.6 TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD)

A terapia fotodinâmica (TFD) é conhecida como uma combinação de irradiação com elementos como luz, oxigênio e fármacos fotoativos ou fotosensibilizadores (FS) (PAIVA, 2017).

Os fotossensibilizadores são responsáveis por gerar apoptose celular no tecido tumoral e este mecanismo ocorre quando incide-se luz no FS que é o ponto central da TFD em que o Fs absorve energia luminosa e converte em energia química em um determinado comprimento de onda cujo valor de absorção é variado, e todo este mecanismo produz espécies de oxigênio reativo, cuja presença oxida organelas celulares e subcelulares, membrana plasmática, mitocôndrias, lisossomos e membrana nuclear que gera danos irreversíveis em células tumorais (SHIBU et al., 2013; MACDONALD, 2001).

Quando a luz é absorvida, esta produz a transição do fotossensibilizador para um estado mais excitado, este mecanismo gera diversas transições eletrônicas, onde ocorre a formação de um estado dito tripleto com um intervalo de duração considerado pequeno, onde ocorre a reação com oxigênio gerando ROS (espécies reativas de oxigênio) responsável pela formação de estresse oxidativo em células patológicas ocorrendo a necrose e apoptose destas, como ilustrado na figura 05 (WALLAT et al., 2017).

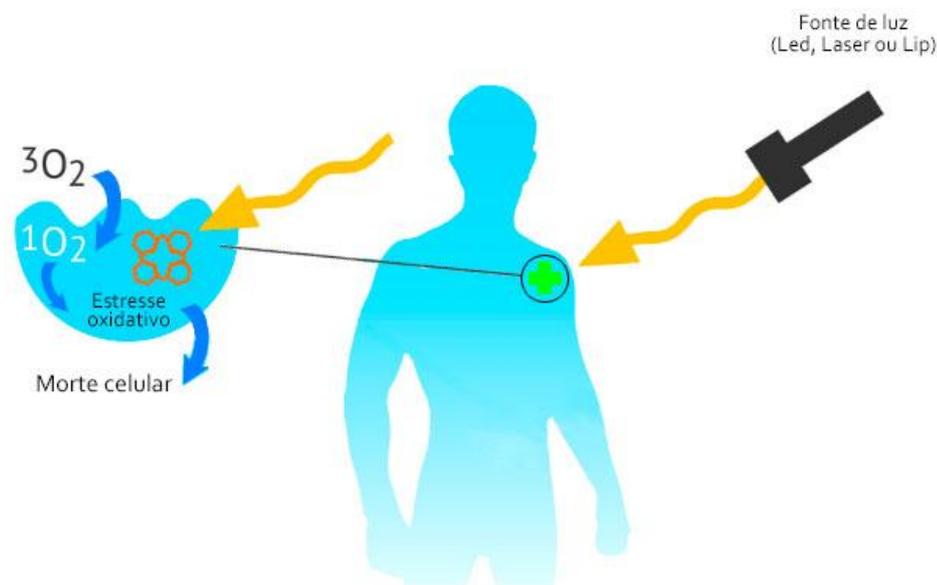


FIGURA 05: Terapia fotodinâmica, evidenciando a formação de ROS e morte celular. Fonte: (<http://clinicalegerportoalegre.com.br/terapia-fotodinamica.htm> Acesso em 04/02/2018).

Com base em dados da literatura foi possível identificar que a terapia fotodinâmica além de danificar o tumor limitando a quantidade de oxigênio para sua nutrição (WANG, 2012) pode originar resposta imune inflamatória (FIRCZUK, 2011).

Estudos apontam que a metástase do câncer é considerada uma das principais causas de morte em pacientes, visto que a hipóxia é um dos principais fatores de indução da metástase tumoral, responsável também por causar uma restrição na eficiência da terapia fotodinâmica (TFD) (FERREIRA, 2012; ZHENG et al 2016).

Sendo a TFD uma das técnicas bastante utilizada para o tratamento do câncer, por apresentar característica como alta eficiência e pouco menos invasiva, esta utiliza moléculas de O₂ para formar Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) (SIMÕES, 2014), que levam a morte celular dos tecidos por necrose ou por apoptose celular, usando fotossensibilizadores, que, em determinados comprimentos de onda, geram ERO (LIN, 2014).

2. JUSTIFICATIVA

A evolução da sociedade tem evidenciado uma série de problemas que, na maioria dos casos, necessita de soluções específicas. Conseqüentemente, a exploração de novas tecnologias que atendam a essas necessidades constitui um dos nichos de pesquisa estrategicamente importante. Essa crescente demanda tem fomentado o desenvolvimento de novos materiais com elevada especificidade e funcionalidade, sendo a nanotecnologia um dos setores responsáveis por grande parte desses avanços. Embora o progresso em pesquisas básicas tenha resultado em melhor compreensão da biologia tumoral que desencadeou no desenvolvimento de novas gerações de drogas direcionadas, recentes ensaios clínicos para câncer, com algumas exceções, foram capazes de detectar pequenas diferenças nos resultados do tratamento. Dessa forma, abordagens baseadas na nanotecnologia emergem como alternativas que possibilitam melhorar o atendimento ao paciente com câncer. Devido a propriedades físico-químicas singulares relacionadas ao tamanho, forma e química da superfície, as nanopartículas são plataformas importantes para o diagnóstico e terapêutica do câncer.

Em geral, o tratamento do câncer envolve uma série de procedimentos invasivos que ocasionam desgastes físico e emocional aos pacientes. Desenvolver alternativas de tratamento, com base em nanotecnologia, que contribuam para um aumento da qualidade de vida dos pacientes, vem sendo amplamente propostas. Dentre os diversos métodos, a Terapia Fotodinâmica (TFD) tem mostrado resultados relevantes para alguns tratamentos de cânceres do trato digestivo, do esôfago, do pulmão, de pele não-melanoma, de carcinoma basocelular, etc (MUEHLMANN et al. 2015). Atualmente, a maioria dos trabalhos de TDF utiliza, como sensibilizadores, derivados do tetrapirrol, que possuem estruturas similares a porfirinas. Esses sensibilizadores apresentam uma janela terapêutica entre 600 e 800 nm que tem grande capacidade de penetração no tecido, porém, queimaduras e dor têm sido as principais reações adversas.

O Nitreto de Carbono, com base em dados na literatura, vem como fonte alternativa e eficaz para este tipo de tratamento, tendo em vista que os mesmo possui capacidade de produção de ROS considerável. A literatura reporta que, quando íons metálicos são possuidores de carga positiva, suas propriedades estereoeletrônicas

promovem alteração na estrutura e função para alcançar alvos biológicos (JU et al. 2016).

Um dos metais que levantou interesse entre pesquisadores foi o Cobre, por possuir atividade redox (SANTINI et al. 2014; WANG et al. 2015). Dados da literatura evidenciam que uma quantidade significativa de Cobre associado à glutationa (GSH) pode originar efeito pró-oxidante na redução da ação no metal, gerando espécies reativas de oxigênio que catalizam redução de oxigênio para superóxido e a redução de peróxido de hidrogênio ao radical hidroxila (SPEISKY et al. 2008). Estudos atuais têm demonstrado que Cu^{2+} , quando ligado à Amina em lipídios de fosfatidiletanolamina, reage com H_2O_2 , aumentando, assim, a eficácia de ROS (POYTON et al, 2016). Com base nisso, é possível que o ajuste de íons metálicos redox ativos e um fotossensibilizador promovam diminuição dos níveis de GSH, contribuindo, conseqüentemente, para geração de ROS mais acentuada, evidenciando avanço significativo para terapias destinadas a patologias como o câncer.

Este estudo visa determinar um ensaio para tratamento de câncer utilizando uma nanopartícula de Nitreto de Carbono associada a íons metálicos, dentre os quais, foi escolhido para este fim o Cobre, que será testado nas seguintes linhagens celulares: B16F10, 4T1 Luciferase, Hela, Fibroblasto e HaCat, pois as linhagens patológicas citadas anteriormente possuem um elevado índice de mortalidade.

Diante do índice cada vez mais elevado de câncer, mesmo com as intensas campanhas de saúde pública, as pesquisas estão sendo acentuadas para que se possam obter técnicas mais precisas em diagnósticos e terapias menos tóxicas ao organismo. Este trabalho possui, assim, uma proposta para o tratamento de tipos de câncer por meio de Terapia Fotodinâmica, haja vista ser uma técnica menos invasiva que atinge apenas o tecido lesionado e considerando a capacidade dos Nitretos de carbono gerarem ROS quando excitados em luz azul para o tratamento de câncer utilizando TFD (menos invasiva).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da Terapia Fotodinâmica, utilizando como fotossensibilizador a nanopartícula de Nitreto associada ao metal de Cobre (Cu^{2+} -g- C_3N_4) nas seguintes linhagens: câncer (B16F10, 4T1 Luciferase, e HeLa) e fibroblasto (NIH/3T3).

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a viabilidade e citotoxicidade *in vitro* em células de fibroblasto murino (NIH/3T3) e tumorais de adenocarcinoma mamário e melanoma murino (B16F10, 4T1 Luciferase), de C-dots ligados a elementos químicos, em diferentes concentrações e tempos de 24, 48 e 72h;
- Analisar a viabilidade e citotoxicidade *in vitro* em células de fibroblasto murino (NIH/3T3) e tumorais de adenocarcinoma mamário e melanoma murino (B16F10, 4T1 Luciferase), bem como câncer cervical humano (HeLa), submetidas à exposição de (Cu^{2+} -g- C_3N_4) com diferentes metais, em diferentes concentrações e tempos de 24, 48 e 72h;
- Investigar a morfologia das nanopartículas através de microscopia;
- Analisar a interação química do metal por meio do método de espectroscopia Raman Amplificada por superfície (sigla em inglês, *SERS*) RAMAN das nanos associadas a metais;
- Avaliar a incorporação em diferentes tempos e concentrações das nanos associadas a metais;
- Analisar a influência de irradiação do LED em diferentes tempos;
- Verificar a eficácia dos tratamentos utilizando a terapia fotodinâmica *in vitro* em diferentes concentrações e linhagens celulares patológicas e não patológicas das nanos associada a metais;

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho do Experimento

O experimento foi realizado em três etapas:

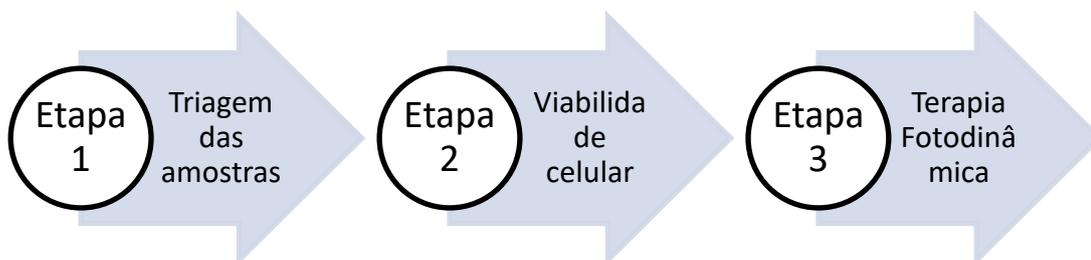


FIGURA 06: Etapas do planejamento experimental estudo desenvolvido.

A 1 etapa consistiu em uma triagem com três nanopartículas que será testada sua viabilidade, visto que será escolhida para etapas posteriores do estudo a que apresentar uma viabilidade celular mais significativa para compor os ensaios da 2 etapa.

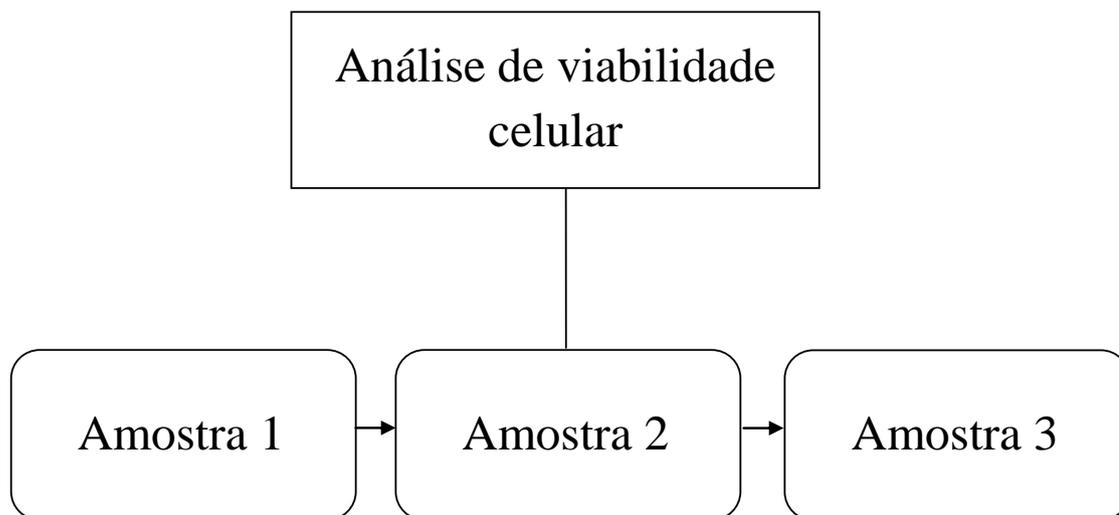


FIGURA 07: Ensaio de viabilidade celular com a triagem das amostras para a 1 etapa do experimento.

Nesta etapa as amostras são nomeadas como:

Amostra 1= c-Dots;

Amostra 2= C-dots Boro;

Amostra 3= Nitreto.

Para a etapa 2 foram analisados 9 nanopartículas que foram mensuradas sua viabilidade celular para selecionar a que tiver o resultado mais significativo pra as etapa posteriores do estudo.

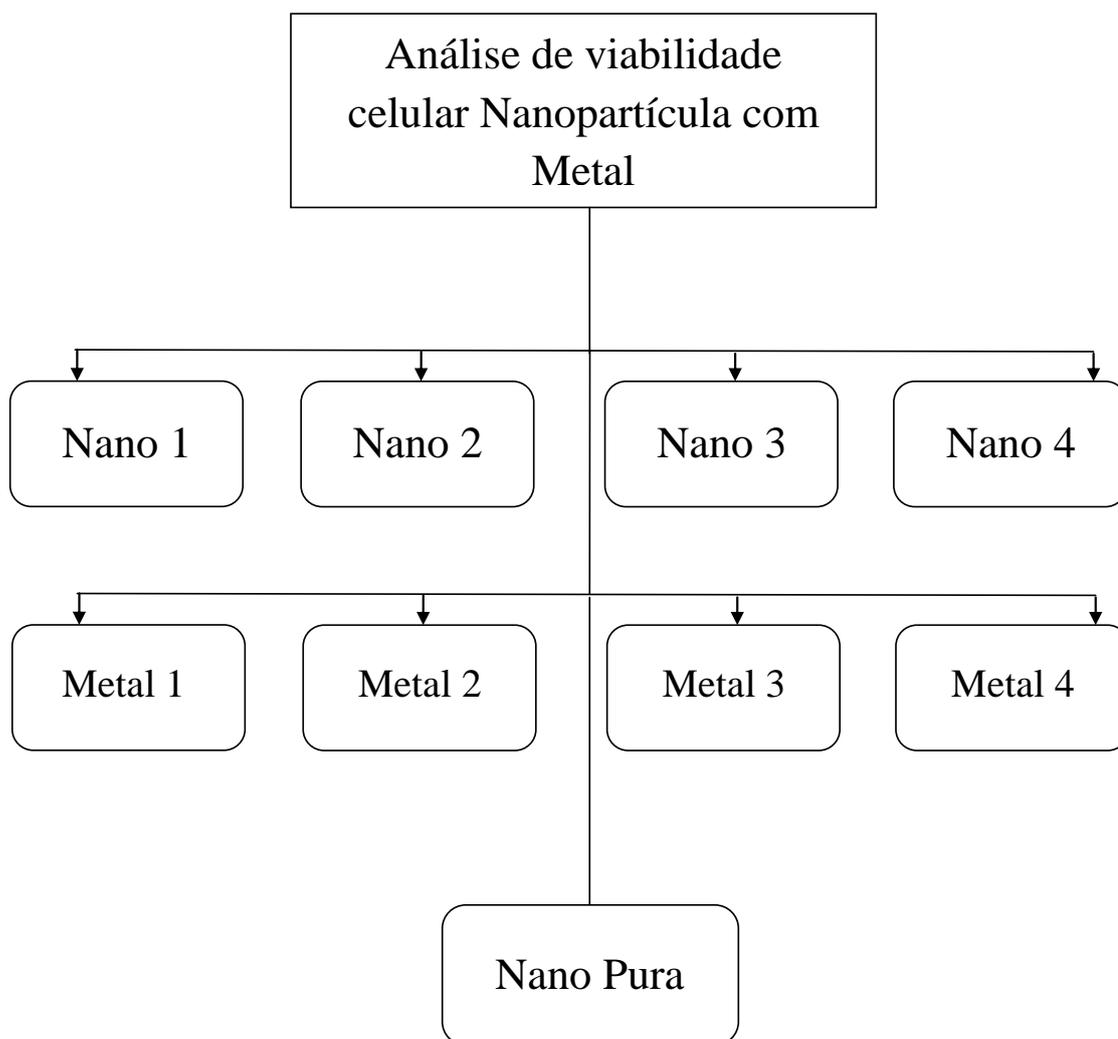


FIGURA 08: Ensaio de viabilidade celular da amostra 3 da 1 etapa associada a metais, metais puro e nano pura, para ensaios da 2 etapa do estudo.

A nomenclatura das amostras segue com a sequência abaixo:

Nano 1= Ag-C₃N₄;

Nano 2= Fe-C₃N₄;

Nano 3= Mn-C₃N₄;

Nano 4= Cu-C₃N₄.

Metal 1= Ag;

Metal 2= Fe;

Metal 3= Mn;

Metal 4= Cu.

Nano Pura= C₃N₄.

Para a última etapa, utilizou o esquema abaixo para ilustrar todo o processo de análise. A amostra a ser analisada foi nomeada como:

Nano 4= Cu-C₃N₄ (NM)

Metal 4= Cu. (Metal)

Nano Pura= C₃N₄.(NP)

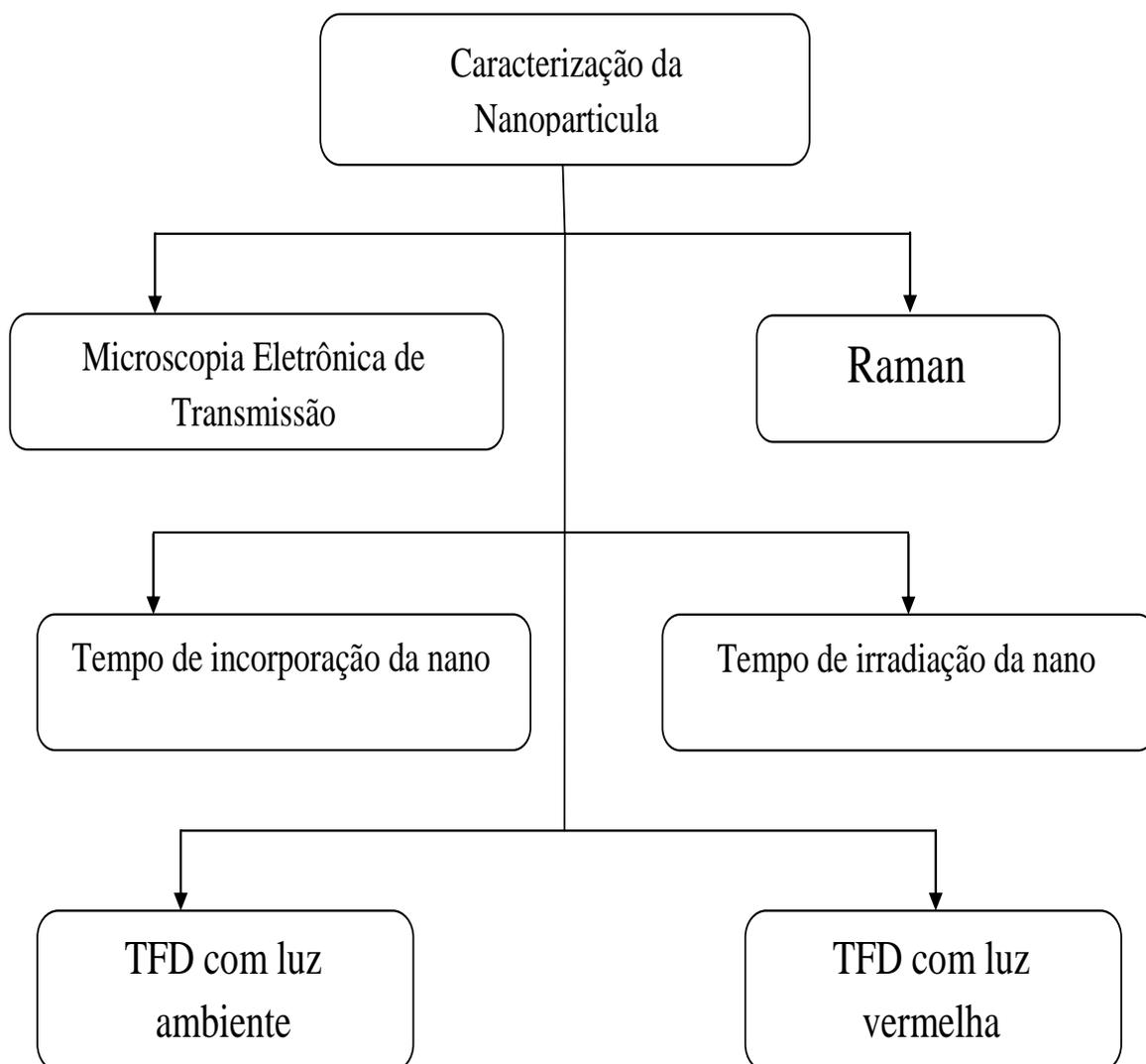


FIGURA 09: Ensaio de caracterização, microscopia eletrônica de transmissão,

Raman, tempo de incorporação e irradiação, viabilidade celular da nano 4, metal e nano pura que compõem a etapa final do estudo.

4.2 Amostra

As partículas foram produzidas no Laboratório LIMA pela equipe do Professor Dr. Marcelo Oliveira, que gentilmente ofertou para que fossem realizados todos os testes deste trabalho.

4.3 Produção, síntese e caracterização

Foram produzidas e sintetizadas todas as 12 nanopartículas (citadas anteriormente no desenho experimental), investigadas neste trabalho, porém como se trata de um trabalho em conjunto com a Tese de Doutorado da aluna Carime, orientanda do Professor Marcelo, os dados de síntese e caracterização encontram-se na tese da autora citada anteriormente.

4.4 Análise morfológica da Nanopartícula

Após a síntese e caracterização das partículas, a análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), foi realizada no Laboratório Multiusuário de Microscopia de alta resolução (LabMic) pela Dr^a Tatiane Oliveira dos Santos no Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás, na cidade de Goiânia e foram cedidas imagens que comprovam o tamanho da partícula em estudo. O equipamento utilizado para a realização deste ensaio foi o microscopio eletrônico JEOL JEM 2010 operando a uma voltagem de aceleração de 200 kV. As soluções aquosas dos materiais foram colocadas numa tela de cobre revestida com carbono de 400 malhas (Ted Pella Inc- USA) e em seguida foram secadas em temperatura ambiente.

4.5 Análise física

4.5.1 Equipamento de fonte luminosa para TFD

Para a realização dos ensaios *in vitro* com o LED, utilizando a técnica de terapia fotodinâmica (TFD), foi utilizado um equipamento de LED desenvolvido pelo Prof. Dr. Paulo Eduardo Narciso de Sousa e colaboradores do Laboratório de *Softwares* e instrumentação do Instituto de Física da Universidade de Brasília, DF, Figura 10. Foram realizados testes para detectar o melhor tempo, distância para serem realizados nos experimentos. Este equipamento possui comprimento de onda específico de 420nm no azul.

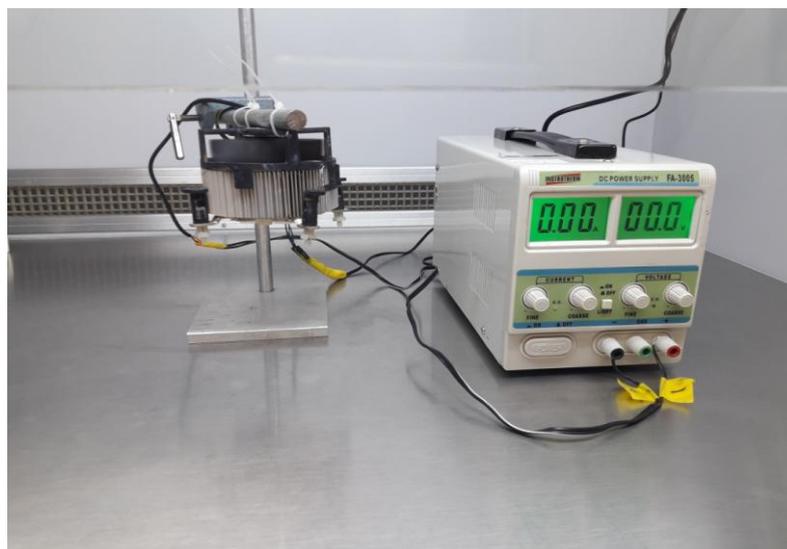


FIGURA 10: Equipamento de fonte luminosa LED.

4.5.2 Espectroscopia Raman intensificada por superfície

O ensaio para obtenção do espectroscopia Raman, foi realizado pelo Prof. Dr. Sebastião William da Silva no laboratório de Núcleo de Física Aplicada do Instituto de Física da Universidade de Brasília, DF. A espectroscopia Raman Amplificada por superfície (sigla em inglês, *SERS*) também foi realizada para caracterizar a interação das amostras das nanopartículas com o metal. Amostras isoladas de nanopartícula (NP) e nanopartícula com metal (NPM) foram preparadas e analisadas.

Para obtenção dos espectros de SERS foi utilizado um espectrômetro triplo (Jobin Yvon, modelo T64000, Tripla Raman Spectrometer, Horiba, Japão). O feixe do laser de íon argônio foi focalizado na amostra por meio de uma lente cilíndrica, para evitar aquecimento das amostras e garantir a reprodutibilidade dos espectros de SERS, a qual forneceu uma densidade de potência de 0,1 W/cm². A linha 21 utilizada foi de

514,5 nm do laser de íon argônio com potência óptica na amostra de 200 mW. A luz espalhada foi coletada na configuração de macro-Raman.

4.6. Ensaio *in vitro*

Os ensaios *in vitro*, foram utilizadas as linhagens tumorais murinas de carcinoma mamário (4T1, ATCCR CRL–2539TM) transfectadas com a enzima luciferase (4T1-luciferase ou 4T1-luc), B16F10 E HELA, também foram utilizadas células de fibroblasto embrionário murinas (NIH/3T3, ATCCR CRL–1658TM), queratinócitos humanos HaCat. As linhagens foram obtidas por meio do banco de células do Rio de Janeiro e mantidas em cultura no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília, UnB.

Manutenção das células e modo de preparação das células para os testes *In vitro*

As linhagens celulares de B16F10 e NIH/3T3 foram cultivadas em meio DMEM (*Eagle Modificado por Dulbecco*). Ambas foram tamponadas com bicarbonato de sódio e suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e antibiótico (100 UI/mL penicilina e 100 µg/mL streptomicina) a 1%, pH 7,2. As células foram mantidas em frascos de cultura celular em uma incubadora à temperatura de 37°C, em atmosfera de 95% de ar umidificado e CO₂ a 5%. Os experimentos foram realizados com a célula na fase logarítmica de crescimento.

Para a quantificação de células viáveis, 40µL de solução do corante Azul Trypan foram adicionadas em dez microlitros da suspensão celular. Este reagente é um corante incapaz de penetrar em célula com a membrana plasmática intacta, o que possibilita a distinção das células viáveis pelo princípio de exclusão de Azul Trypan. Por conseguinte, 10µL desta suspensão foram adicionadas em hemocítmetro de Neubauer. A concentração de células foi determinada segundo a contagem dos quadrantes laterais e por meio da equação:

$$\frac{\text{Número de células contatadas}}{\text{células/mL}} \times \text{Fator de diluição} \times 1 \times 10^4 = \text{Número de células/mL}$$

Número de quadrantes contados

Para a execução dos experimentos após a quantificação, as células eram transferidas para microplacas de cultura de acordo com o experimento a ser executado.

O ensaio de viabilidade celular visa analisar a morte celular das células (B16F10, 4T1 Luciferase e NIH/3T3) para as três primeiras partículas (nomes citados no desenho experimental) em tempos de 24, 48 e 72h nas concentrações de 0,01 mg/mL, 0,05 mg/mL e 0,1 mg/mL e, com base nestes resultados, direcionar o experimento para outras 9 nanos (identificadas no desenho experimental) que também realizou os ensaios nas mesmas condições citadas anteriormente, sem a realização da Terapia Fotodinâmica.

Tal procedimento tem a finalidade de mensurar se a Cu^{2+} -g- C_3N_4 é prejudicial às células na ausência da TFD.

Para realizar a primeira etapa deste ensaio com as 3 primeiras nanos, as linhagens celulares (B16F10, 4T1 Luciferase e NIH/3T3) foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 2×10^3 , 3×10^3 e 5×10^5 de células por poço com meio DMEM. Após 24 horas, o meio de cultura inicial foi substituído por 200 μL de meio de cultura contendo diferentes nanos nas concentrações (0,01 mg/mL; 0,05 mg/mL e 0,1 mg/mL). A determinação da viabilidade celular foi realizada por meio do método colorimétrico redutor de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio), MTT. A quantificação foi realizada por espectrofotometria, utilizando o comprimento de onda de 595 nm. Os resultados foram obtidos com uma média de três experimentos independentes em triplicatas.

Após a realização destes testes de viabilidade celular, foram selecionadas as melhores concentrações e o melhor tempo, com base naquelas que apresentaram menor toxicidade celular para a realização dos testes com a aplicação da terapia fotodinâmica.

4.7. Análise do perfil de tempo de incorporação das nanos.

No ensaio que define o perfil de incorporação das nanos associadas ao metal para as linhagens em estudo, foi escolhida apenas a linhagem B16F10 e com base nestes resultados, foi realizado o experimento com os melhores tempos e concentrações obtidos. As células de B16F10 foram incubadas por diferentes tempos em placas de 96 poços, as quais foram plaqueadas 2×10^3 células da linhagem B16F10. Após 24h, foram incubadas em meio completo, as formulações de cada nano com metal na concentração de 0,01mg/mL; 0,05 mg/mL e 0,1 mg/mL em triplicatas. As células foram expostas por 5, 10, 15, 20 e 30 minutos e 1, 2 e 24h de incubação com as nanos, sob as mesmas concentrações. Após o término do tempo estabelecido, cada poço foi lavado duas vezes com PBS e foi acrescentado 200 μ l de DMSO a cada poço para lise das células e liberação da nano associada. Em seguida, foi realizada a leitura da fluorescência no comprimento de onda, excitando em 380nm e lendo na faixa de 400 a 500nm.

4.8. Avaliação do tempo de irradiação do LED nas nanos.

Para este ensaio que visou detectar o melhor tempo de irradiação do LED, continuou utilizando a linhagem B16F10 nas mesmas condições de plaqueamento com as concentrações 0,1 μ m para o metal presente na nano e ele puro, e para as nanos Nano 4= Cu-C3N4 (NM) e Nano Pura= C3N4.(NP) nas concentrações de 0,03 e 0,01mg/mL. Tendo como variável o tempo *versus* fluência, sendo utilizado uma placa para cada tempo e triplicata de concentrações. A fluência do LED utilizado é de 34,5 J Cm² e, para determinar os valores analisados, os cálculos e resultados encontram-se na tabela 02:

TABELA 02: Relação de tempo *versus* fluência para a linhagem de B16F10.

| Cálculo de min X s | Cálculo de s X fluência | Resultado em J Cm ² |
|--------------------|-------------------------|--------------------------------|
| 10 X 60 = 600 | 600 X 34,5 = 20,7 | 20,7 |
| 12,5 X 60 = 750 | 750 X 34,5 = 25,87 | 25,87 |
| 15 X 60 = 900 | 900 X 34,5 = 31,05 | 31,05 |
| 20 X 60 = 1200 | 1200 X 34,5 = 41,40 | 41,40 |
| 25 X 60 = 1500 | 1500 X 34,5 = 51,75 | 51,75 |

| | | |
|----------------|---------------------|-------|
| 30 X 60 = 1800 | 1800 X 34,5 = 62,10 | 62,10 |
| 35 X 60 = 2100 | 2100 X 34,5 = 72,45 | 72,45 |
| 40 X 60 = 2400 | 2400 X 34,5 = 82,80 | 82,80 |

Com base nos resultados, escolheu-se o melhor tempo de irradiação para os tratamentos com LED das linhagens tumorais murinas de adenocarcinoma mamário (4T1, ATCCR CRL-2539TM) transfectadas com a enzima luciferase (4T1-luciferase ou 4T1-luc), B16F10 E HELA, também foram utilizadas células de fibroblasto embrionário murinas (NIH/3T3, ATCCR CRL-1658TM), queratinócitos humanos HaCat.

4.9. Testes de Terapia Fotodinâmica (TFD)

Ensaios de viabilidade celular (sem TFD) nano com metal, nano sem metal e metal pelo ensaio de MTT utilizando luz ambiente.

Sendo o ensaio de MTT (brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio), o método de avaliar a citotoxicidade por um método colorimétrico no qual se quantifica a redução do reagente MTT em um composto conhecido como formazan, cuja mudança é decorrência da ação de desidrogenases mitocondriais, tendo em vista que a presença de desidrogenases ativas é um indicativo de viabilidade celular. Assim, este experimento tendeu a avaliar a viabilidade celular das células em estudo, quais sejam: 4T1-luciferase, B16F10, NIH/3T3, HELA e HaCat, que foram incubadas com as nanos sem a presença de luz.

Para o ensaio realizado com a linhagem de B16F10 foi utilizada placa de 96 poços. As células foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 2×10^3 , de células por poço com meio DMEM. Após 24 horas, o meio de cultura inicial foi substituído por 200 μ L de meio de cultura contendo diferentes nanos nas concentrações (0,1mg/mL; 0,25mg/mL e 0,5mg/mL), visto que as concentrações anteriores não apresentaram bons resultados, e os tempos utilizados foram de 15 e 30min e 24h de incubação. Após decorrido o tempo em estudo, as nanos foram removidas e os poços lavados com PBS, permanecendo por 10 minutos, sendo, em seguida, retirado e adicionado meio de cultura por mais 24h. Após esta última etapa, foi adicionada

solução de MTT (5 mg/mL, Invitrogen, EUA) e meio de cultura na proporção de 1:10. As células foram incubadas à 37°C por duas horas. Em seguida, a solução contendo MTT foi removida e então, foram adicionados 200 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich, EUA) para a solubilização dos cristais de formazan. A análise de viabilidade em cada poço foi realizada por meio da leitura de absorbância em comprimento de onda de 595 nm no espectrofotômetro. Os dados foram analisados e plotados em gráfico de coluna pelo teste estatístico One-ANOVA, com pós-teste Bonferroni no *software* GraphPad Prism 5.0.

Ensaio de viabilidade celular (sem TFD) nano com metal, nano sem metal e metal pelo ensaio de MTT utilizando luz vermelha no ambiente.

Realizou-se todo o procedimento anterior descrito, com mudança na luz do ambiente, que passou a ser vermelha como mostra a figura 11, bem como o tempo que foi apenas de 24h de incorporação da nano.

As linhagens que foram utilizadas para este experimento são das linhagens tumorais murinas de adenocarcinoma mamário (4T1, ATCCR CRL–2539TM) transfectadas com a enzima luciferase (4T1-luciferase ou 4T1-luc), B16F10 E HELA, também foram utilizadas células de fibroblasto embrionário murinas (NIH/3T3, ATCCR CRL–1658TM), queratinócitos humanos HaCat.

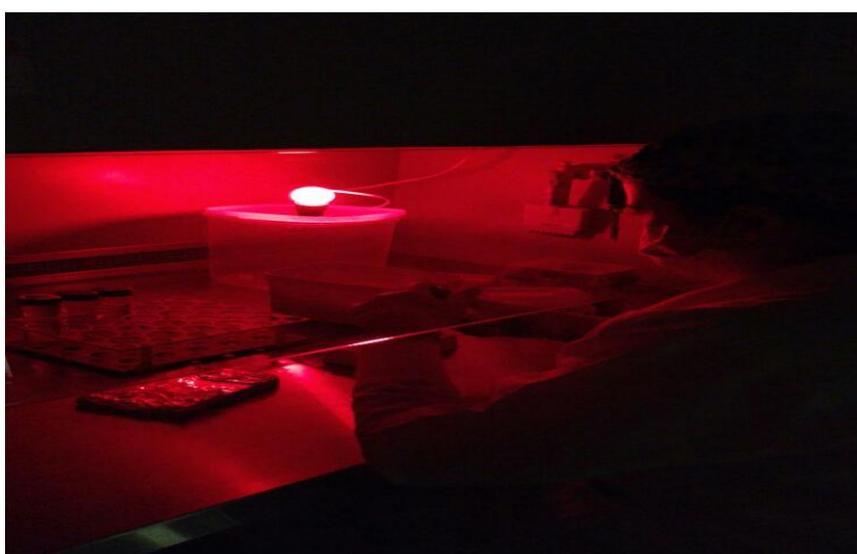


FIGURA 11: Preparo das amostras com luz vermelha para ensaio com TFD.

Ensaio de viabilidade celular com aplicação de TFD da nano com metal, nano sem metal e metal pelo ensaio de MTT utilizando luz vermelha no ambiente.

As células foram plaqueadas e incubadas nas mesmas condições do experimento do escuro citado anteriormente na figura 13, e, após as 24h de incorporação com a nano, foi realizado o processo de tratamento. Após decorrido o tempo em estudo, as nanos foram removidas e os poços lavados com PBS, permanecendo por 10 minutos com irradiação do LED numa altura de 10cm entre a placa e o LED figura 12, sendo, em seguida, retirado e adicionado meio de cultura por mais 24h. Após esta última etapa adicionou solução de MTT (5 mg/mL, Invitrogen, EUA) e meio de cultura na proporção de 1:10. As células foram incubadas à 37°C por duas horas. Em seguida, a solução contendo MTT foi removida e, então, foram adicionados 200 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich, EUA) para a solubilização dos cristais de formazan. A análise de viabilidade em cada poço foi realizada por meio da leitura de absorbância em comprimento de onda de 595 nm no espectrofotômetro. Os dados foram analisados e plotados em gráfico de coluna pelo teste estatístico One-ANOVA, com pós-teste Bonferroni no *software* GraphPad Prism 5.0.

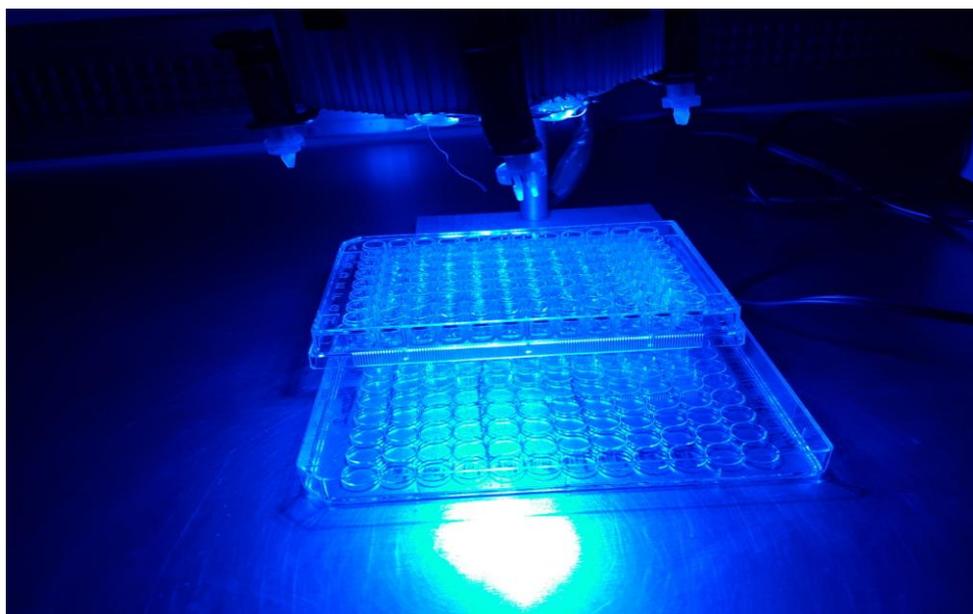


FIGURA 12: Tratamento com LED.

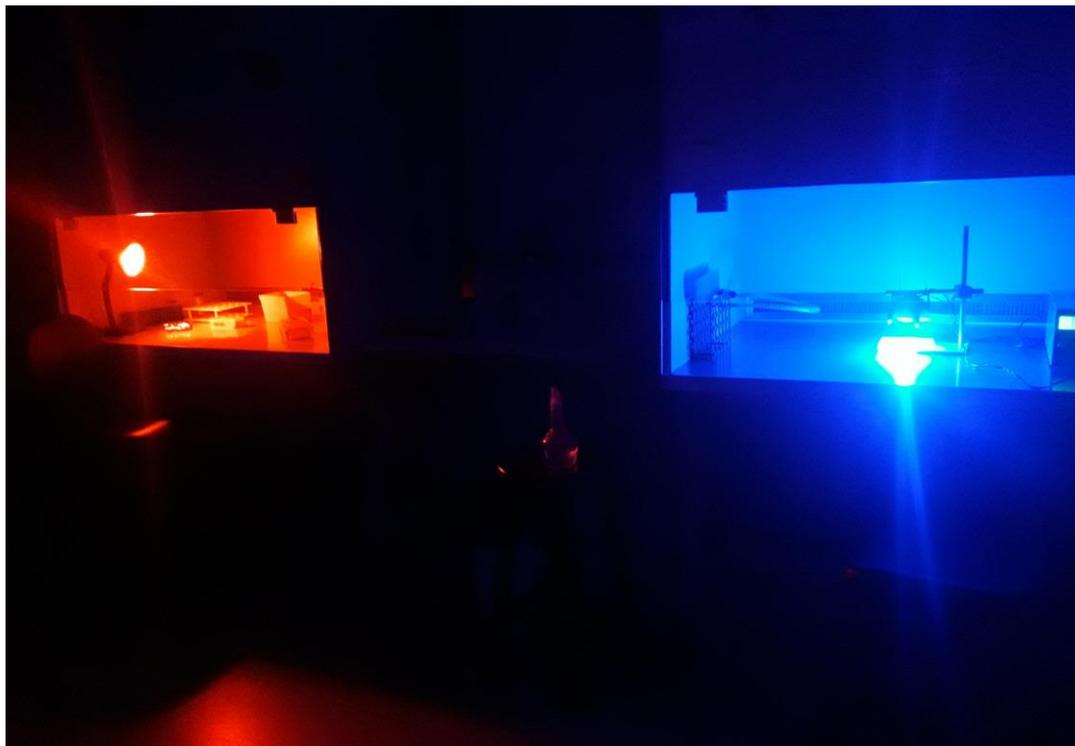


FIGURA 13: Cabine com luz vermelha para preparo das amostras e cabine com LED para o tratamento das mesmas.

4.10. Estatística

Após o termino das análises dos ensaios físicos e biológicos da nanopartículas que foram realizados em triplicatas obtendo média e desvio padrão das médias, os dados foram coletados e tratados, cuja análise estatística foi realizada pelo *software* Prism 5, em que a significância considerada foi de $<0,05$, e a avaliação para as possíveis diferenças significativas foi realizada através de testes paramétricos; para de variância utilizada, por sua vez, foi ANOVA, seguido por teste estatístico de Tukey para todos os experimentos . Os dados foram apresentados com recursos gráficos

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise morfológica da partícula

O procedimento de Microscopia eletrônica de transmissão (MET) é utilizado para determinar tamanho, formato e diâmetro de nanoestruturas. Para este ensaio, foram obtidas as imagens como mostra a figura 14 abaixo:

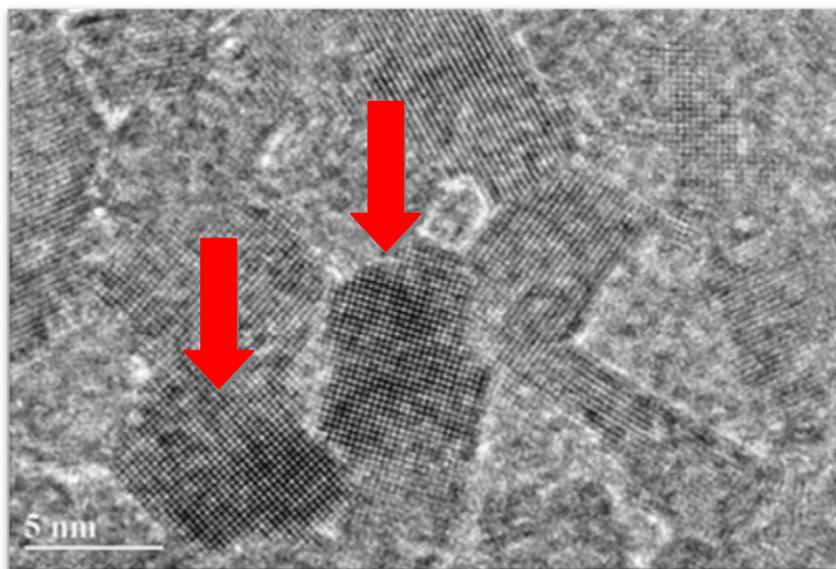


FIGURA 14: Micrografia eletrônica evidenciando nanopartículas de $g\text{-C}_3\text{N}_4$ (setas).

A figura 14 indica que o tamanho da partícula é por volta de 5nm e que seu formato é aproximadamente esférico.

A análise morfológica da partícula evidenciou um tamanho de aproximadamente 5nm, o que está de acordo com a literatura retrata. A estrutura morfológica obtida mostra indícios de arranjo próximo ao hexagonal, compatível com a estrutura formada por anéis tri-s-triazina, sendo possível visualizar características de material gráfitico (THOMAS et al. 2008).

Dados da literatura também condizem com os achados morfológicos. Com base nestes, pode-se afirmar que o Nitreto de Carbono é considerado um composto gráfitico em pilhas, cujos pontos com menor densidade de elétrons possuem uma ordem hexagonal, os quais se encontram em camadas (LOTSCH, 2006). Estes dados indicam que a estrutura morfológica é de nitreto de carbono (LOTSCH et al. 2007).

5.2 Espectroscopia RAMAN intensificada por superfície

Com os espectros de RAMAN foi possível supor que ocorreu a ligação do g- C_3N_4 com o metal cobre, devido ao deslocamento do pico centrado em 1043 cm^{-1} , do espectro do g- C_3N_4 , para 1069 cm^{-1} , após a adição de cobre, como ilustrado na figura 15:

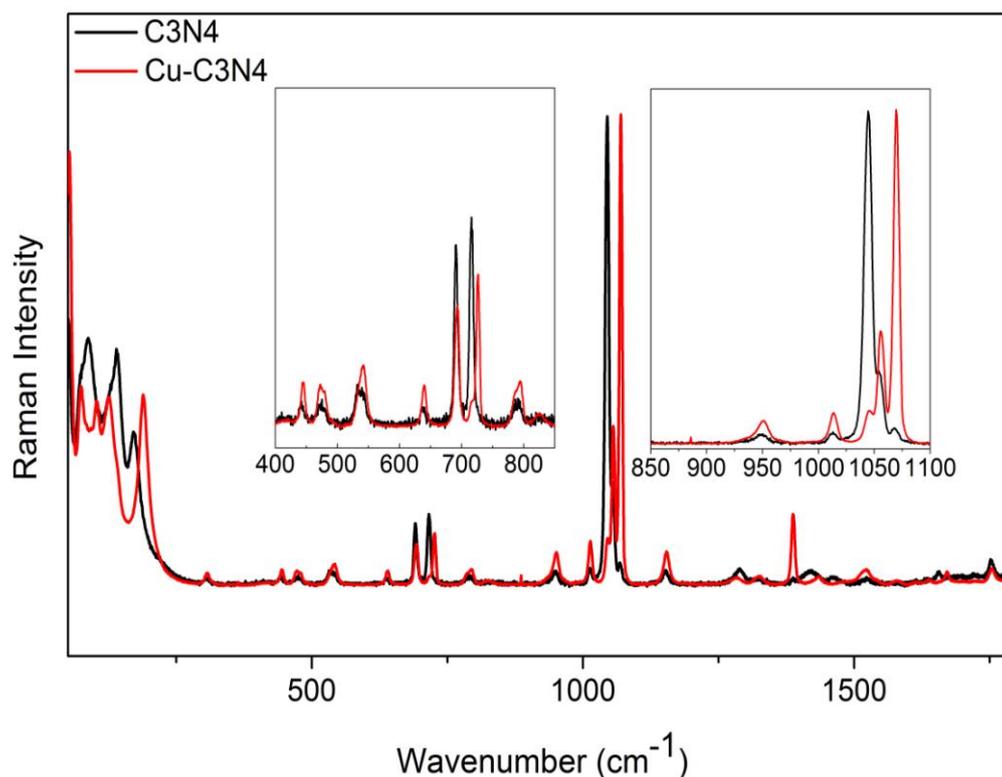


FIGURA 15: Análise de RAMAN. Os espectros são característicos de uma suposta ligação da nano de Nitreto ao Cobre (linha em vermelho), Nitreto (linha em preto), enfatizando as regiões onde ocorreu o deslocamento.

Os espectros de RAMAN das nanopartículas, associados aos demais metais, mostraram perfil idêntico ao dos g- C_3N_4 , o que supõe que não ocorreu a ligação do metal na estrutura da nanopartícula. Com base nestes dados, foi possível determinar a nano para o tratamento de TFD.

O espectro de RAMAN apresentado nos resultados indica uma ligação do metal Cobre na Nano de Nitreto. Com base nisso, essa foi a nano escolhida, tendo em vista que a literatura reporta que, quando o Nitreto encontra-se associado a um metal, este potencializa o efeito do tratamento com TFD. O deslocamento do pico, antes

centrado em 1043 cm^{-1} , para 1069 cm^{-1} , é característico de uma suposta ligação do metal com a nano. Até o momento, não foram registrados na literatura estudos de espectroscopia RAMAN de g- C_3N_4 análogos ao discutidos nesta pesquisa.

5.3 Ensaio *in vitro*

5.3.1 Viabilidade Celular

Determinação da viabilidade celular para linhagens tumorais murinas de adenocarcinoma mamário (4T1, ATCCR CRL–2539TM), transfectadas com a enzima luciferase (4T1-luciferase ou 4T1-luc), B16F10 e células de fibroblasto embrionário murinas (NIH/3T3, ATCCR CRL–1658TM) para as amostras 1, 2 e 3 de nanopartículas. Com base no melhor resultado destas, selecionou-se a amostra para a etapa seguinte do trabalho.

Foram testados três tempos de tratamento (24, 48 e 72h para as linhagens citadas anteriormente) e as concentrações de 0,01, 0,05 e 0,1mg/mL em triplicatas, bem como triplicata do experimento independente, uma vez que o controle utilizado para comparação dos resultados foi com água ultrapura, representando 100% de viabilidade celular para cada linhagem como mostram as figuras abaixo:

Para o tempo de 24h, pode-se observar que nenhuma das amostras apresentou citotoxicidade (figura 16).

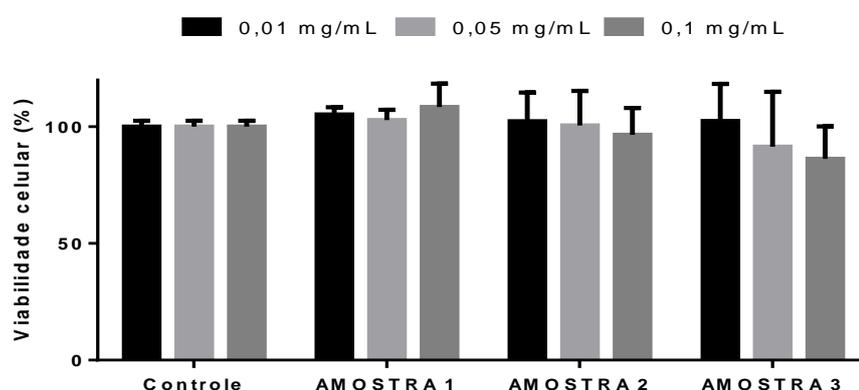


FIGURA 16: Avaliação da atividade citotóxica das amostras 1, 2 e 3 em células de carcinoma mamário murino 4T1 Luciferase após 24h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml.. * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

No tempo de 48h, observa-se que apenas a amostra 1, na concentração de 0,1mg/mL, apresentou uma diminuição significativa da viabilidade em cerca de 20% e as demais não apresentaram citotoxicidade neste ensaio, como se constata pela figura 17.

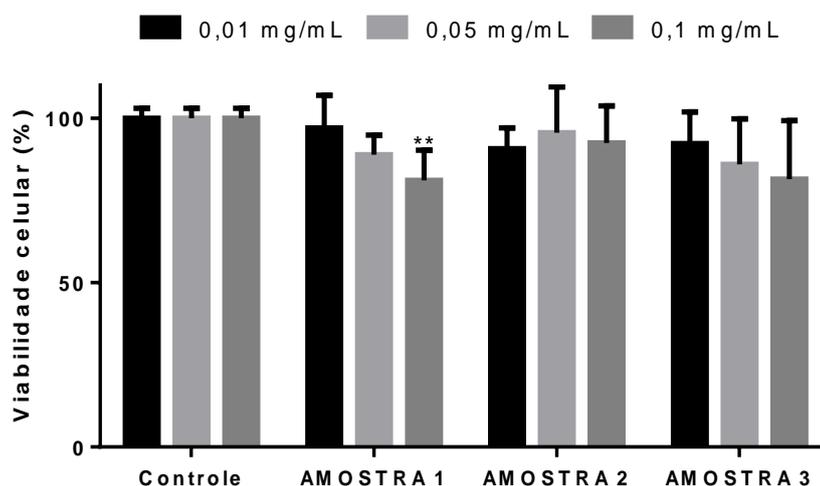


FIGURA 17: Avaliação da atividade citotóxica das amostras 1, 2 e 3 em células de carcinoma mamário murino 4T1 Luciferase após 48h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. *p < 0,5; **p < 0,01; *** p < 0,001; ****p < 0,0001.

Na realização dos primeiros ensaios de viabilidade celular, com a linhagem de 4T1 Luciferase, os resultados apresentados demonstraram uma citotoxicidade para o tempo de tratamento de 48h na amostra 1, na concentração de 0,1mg/mL. Estudos demonstram que a citotoxicidade desta amostra apresenta toxicidade relativamente baixa, podendo ser internalizadas nas células para imagens (LI et al. 2012; HOLA et al. 2014). Os efeitos de citotoxicidade, como viabilidade, mortalidade e proliferação desta amostra já foram testados em outras linhagens celulares e em outras concentrações com coberturas diferentes na superfície (HAVRDOVA et al. 2016), demonstrando, assim, que a citotoxicidade apresentada é considerada irrelevante para viabilidade celular nas concentrações de 10-100 µg.mL (NIE et al 2014; RAY et al. 2009).

Para o tratamento de 72 h, os dados obtidos demonstram que todas as amostras, com exceção da amostra 1, na menor concentração, apresentaram uma diminuição significativa da viabilidade em torno de até 20%. Biologicamente, a diminuição de 20% da viabilidade celular não é relevante e esta ilustrada na figura 18.

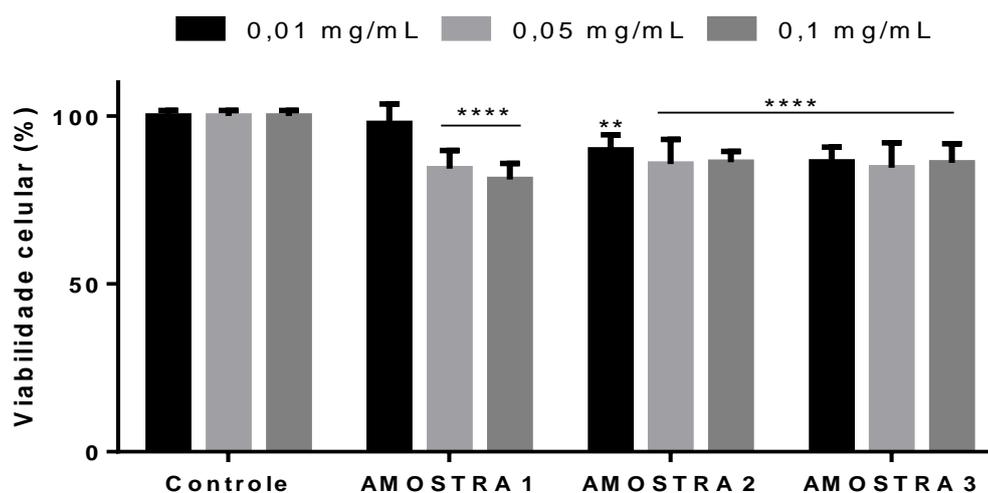


FIGURA 18: Avaliação da atividade citotóxica das amostras 1, 2 e 3 em células de carcinoma mamário murino 4T1 Luciferase após 72h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

No tempo de 72h, ocorreu citotoxicidade em todas as concentrações da amostra 2 e 3 e na concentração 0,05 mg/mL da amostra 1. O resultado da amostra 1 foi, pois, condizente com os dados da literatura expostos anteriormente.

Para amostra 2, a literatura indica que grupos de pesquisa vêm evidenciando estudos nos efeitos da composição química dos materiais, como o Boro, quando associado a comportamentos de fotoluminescência dos CDs, sendo a aplicabilidade em material conversos de LED e reagentes de imagem de célula viva, onde resultados obtidos em experimentos reportados na literatura cita que quando CDs encontra-se dopado com Boro a citotoxicidade existente é considerada extremamente baixa com viabilidade celular de 80% em concentrações de 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (SHEN et al. 2015).

A amostra 3 vem sendo apresentada na literatura como foco de pesquisa por se apresentar através de estudos com uma baixa toxicidade, e está sendo aplicada em sistemas biológicos por possuir propriedades físicas e químicas atrativas para este fim. Com isso um dos itens mais avaliados é a toxicidade, bem como sua biocompatibilidade para os sistemas biológicos, haja vista que estudos realizados em células de câncer, mesmo em concentrações elevadas de até 600 $\mu\text{g} / \text{mL}$, não foram considerados tóxicos (ZHANG et al. 2012).

Para a linhagem de B16F10, foram realizados os mesmos ensaios como se pode ver pelas figuras na sequência 19 a 21.

Pode-se observar que, para todas as amostras no tempo de 24h, ocorreu uma diminuição significativa da viabilidade entre 20 e 50%. Este resultado é a representação de 3 experimentos independentes, cujo desvio elevado pode representar uma não reprodutibilidade para esta linhagem neste tempo.

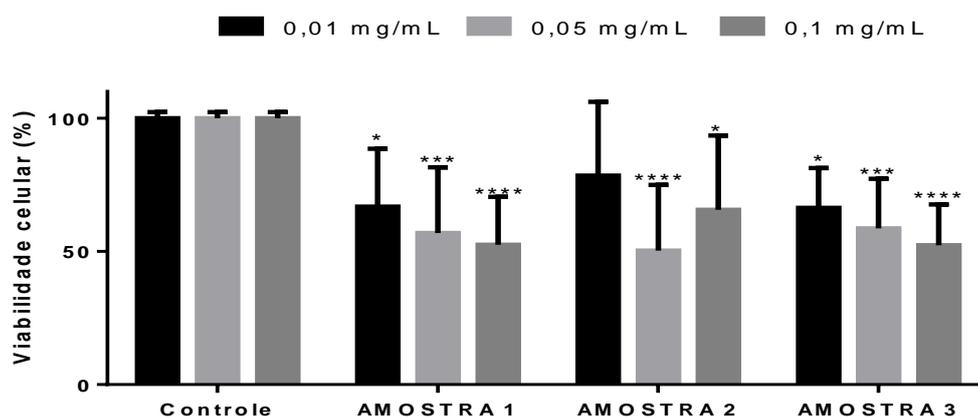


FIGURA 19: Avaliação da atividade citotóxica das amostras 1, 2 e 3 em células de melanoma murino B16F10 após 24h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. *p < 0,5; **p < 0,01; *** p < 0,001; ****p < 0,0001.

Com o tempo de 48h, foi possível observar que ocorreu uma diminuição significativa estatisticamente apenas na amostra 3 para a menor e maior concentração.

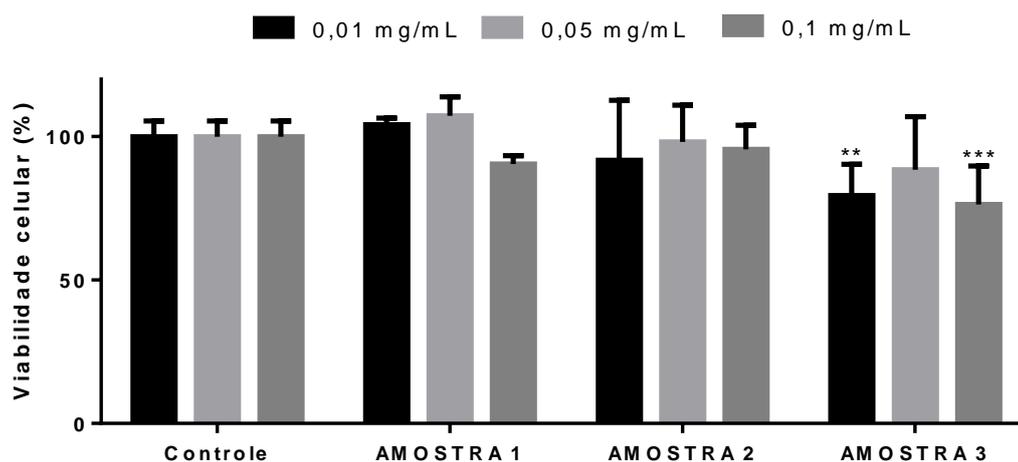


FIGURA 20: Avaliação da atividade citotóxica das amostras 1, 2 e 3 em células de melanoma murino B16F10 após 48h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. *p < 0,5; **p < 0,01; *** p < 0,001; ****p < 0,0001.

No ensaio de 72h, obteve-se uma diminuição da viabilidade significativa apenas nas amostras 1 e 2 na maior concentração.

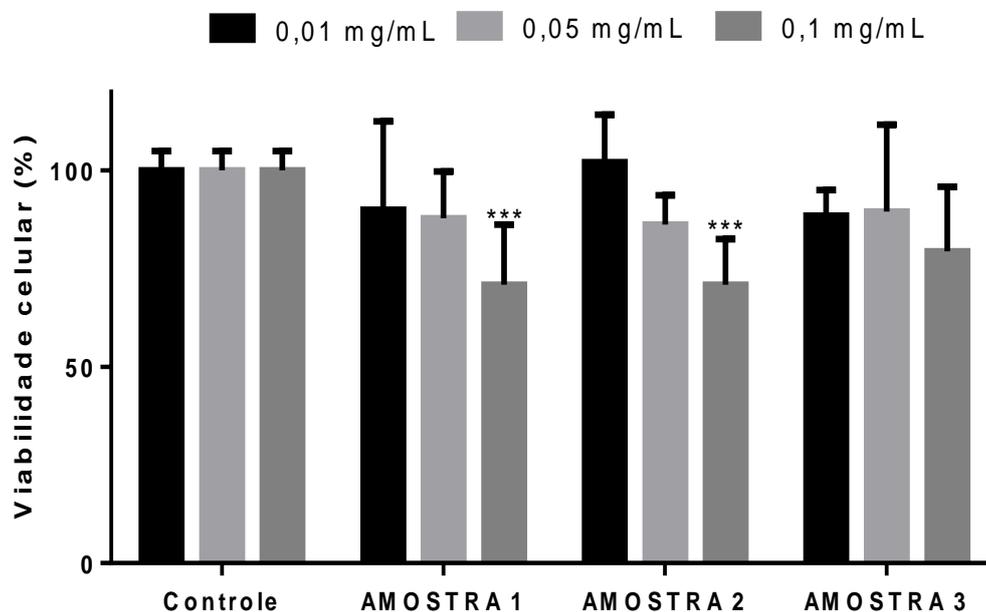


FIGURA 21: Avaliação da atividade citotóxica das amostras 1, 2 e 3 em células de melanoma murino B16F10 após 72h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/mL.*p < 0,5; **p <0,01; *** p< 0,001; ****p<0,0001.

Para a linhagem da B16F10, pode-se observar que a diminuição de viabilidade ocorreu em todas as amostras no tratamento de 24h, cerca de 20 a 50% respectivamente. No cenário para o tratamento de 48h, apenas a amostra 3, nas concentrações de 0,01 e 0,1mg/mL, apresentou diferença significativa, no entanto, pode-se observar que, no ensaio do tratamento de 72h, só ocorreu uma diferença estatística considerada apenas na concentração 0,1mg/mL para as amostras 1 e 2.

Dado que já foi citado anteriormente que a composição das amostras 1, 2 e 3, em concentrações e linhagens de células diferentes, não apresentaram citotoxicidade, os resultados obtidos desta linhagem encontram-se condizentes com os dados na literatura. Grupos de pesquisadores realizaram testes *in vitro* com o material da amostra 1 e 3 e detectaram que, mesmo em concentrações elevadas de 0,5 mg/mL, não foram considerados tóxicas em sua viabilidade celular (TAO et. al, 2012; HORST, 2016). O uso do material da amostra 1 e 2 para tratamento de câncer melanoma foi relatado com a técnica de terapia fotodinâmica, até o momento não encontrado na

literatura uma terapia que não tenha associação com nenhuma outra para uso desta amostra com esta finalidade (BEACK et al. 2015; HORST, 2016).

Foram realizados ensaios com células não patológicas de fibroblasto embrionário murinas (NIH/3T3, ATCCR CRL-1658TM), no intuito de avaliar a especificidade da atividade de células tumorais, avaliando se nas não-tumorais a diferença de citotoxicidade foi igual, superior ou se não houve alteração com os mesmos tratamentos, tempos e concentrações de amostras utilizadas para as células tumorais citadas anteriormente.

Para o tempo de 24h de exposição ao tratamento com a célula de fibroblasto embrionário murinas (NIH/3T3, ATCCR CRL-1658TM), observou-se que, na amostra 1, na maior concentração, ocorreu uma redução de apenas 10% na viabilidade, o que não é biologicamente significativo, e, na amostra 3, nas concentrações intermediária e na maior ocorreu uma diminuição de menos de 10% em ambas, como se pode ver na figura 22.

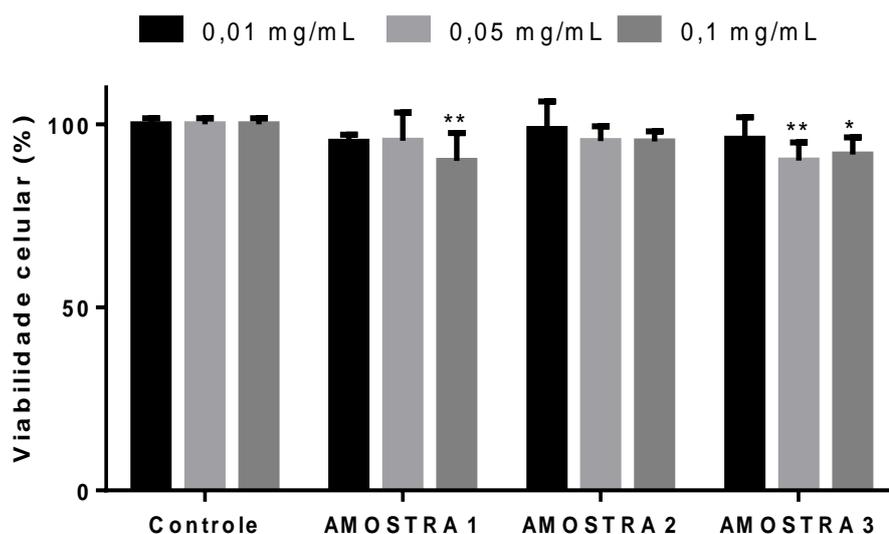


FIGURA 22: Avaliação da atividade citotóxica das amostras 1, 2 e 3 em células de fibroblasto embrionário murinas NIH/3T3 após 24h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. *p < 0,5; **p < 0,01; *** p < 0,001; ****p < 0,0001.

O ensaio de 48h detectou que, para amostra 1, houve uma diminuição de 20 a 30% da viabilidade da menor para a maior concentração. Na amostra 3, ocorreu uma citotoxicidade apenas para a concentração de 0,05 e 0,1mg/mL, como expresso na figura 23.

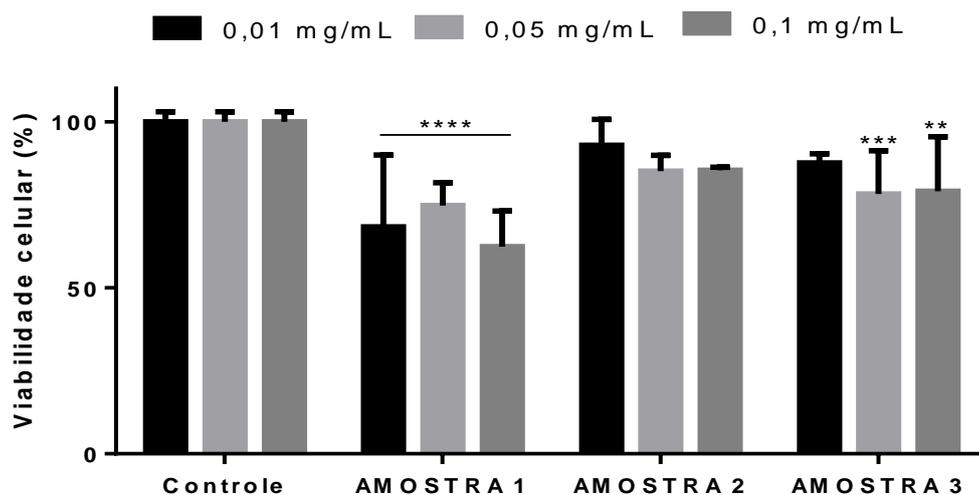


FIGURA 23: Avaliação da atividade citotóxica das amostras 1, 2 e 3 em células de fibroblasto embrionário murinas NIH/3T3 após 48h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

O tempo de 72h demonstrou uma diminuição significativa para todas as amostras neste intervalo de tempo, tendo a amostra 1 uma redução em torno de 20 a 40% entre as concentrações testadas. Para a amostra 2, a redução foi de 10% para as três concentrações e para amostra 3 apenas a concentração inicial e a intermediária apresentaram cerca de 10%.

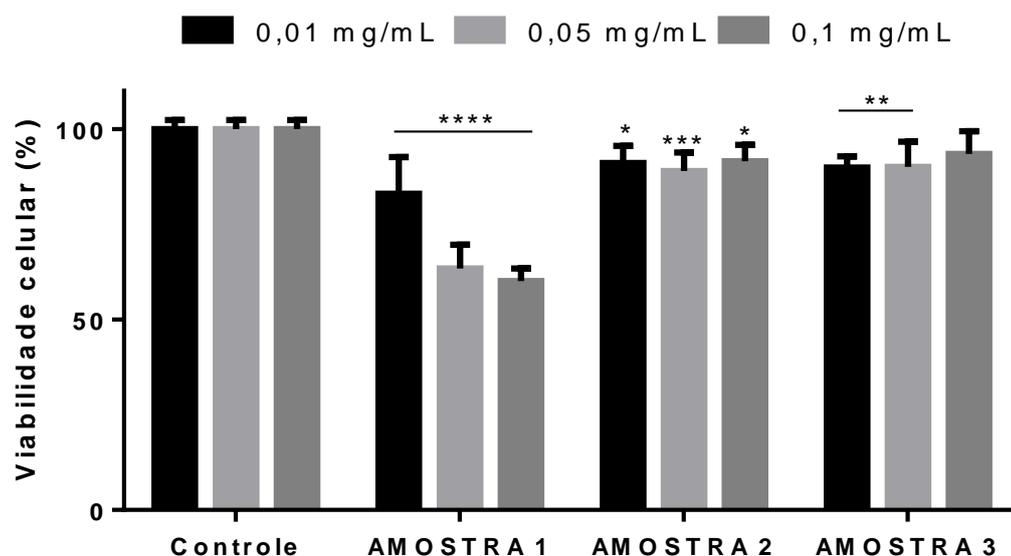


FIGURA 24: Avaliação da atividade citotóxica das amostras 1, 2 e 3 em células de fibroblasto embrionário murinas NIH/3T3 após 72h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Para a linhagem de NIH3T3, foi relatado que no tratamento de 24h a amostra 1 na maior concentração 0,1mg/mL apresentou 10% de redução, sendo este dado considerado não significativo biologicamente, e na amostra 3 também ocorreu a mesma porcentagem de diminuição para as concentrações 0,05 e 0,1mg/mL, no entanto os resultados não se mantiveram no tempo de 48h, que apresentou para amostra 1 uma diminuição de 20 a 30% da menor para maior concentração, e na amostra 3 a citotoxicidade apresentada foi observada nas concentrações de 0,05 e 0,1mg/mL. O tratamento de 72h mostrou que ocorreu uma redução significativa para todas as concentrações da amostra 1 entre 20 a 40%, 10% para todas da amostra 2 e na amostra 3 apenas 10% nas concentrações 0,01 e 0,05mg/mL.

Dados da literatura retratam que células de fibroblasto são responsáveis por produzir uma matriz extracelular em grande quantidade, estimulando assim a formação de uma barreira contra agentes quimioterápicos (JEONG, et al. 2016; SALEH et al. 2017).

VIABILIDADE CELULAR PARA AMOSTRA 3 NANO ASSOCIADA A METAL

Após obter os resultados das 3 amostras citadas anteriormente, foi definida a segunda etapa para realização dos ensaios de viabilidade celular com a amostra 3, associada a metais diferentes para serem testadas nas linhagens tumorais murinas de adenocarcinoma mamário (4T1, ATCCR CRL-2539TM) transfectadas com a enzima luciferase (4T1-luciferase ou 4T1-luc), B16F10, células de fibroblasto embrionário murinas (NIH/3T3, ATCCR CRL-1658TM), bem como células de câncer cervical humano HELA para as nanos 1, 2, 3 e 4 e seus respectivos metais 1, 2 e 3, para as quais a nano 4 é a nano pura e cujos respectivos nomes constam no desenho experimental citados anteriormente no texto. Após os ensaios, a que apresentou resultado significativos foi a escolhida para a 3 etapa do trabalho.

Foram testados quatro nanos e três metais puros associados a cada nano correspondente. Os tempos de tratamento escolhidos foram 24, 48 e 72h para as linhagens citadas anteriormente, cujas concentrações são 0,01, 0,05 e 0,1mg/mL em triplicatas, bem como foi realizada a triplicata do experimento independente, haja vista que o controle utilizado para comparação dos resultados foi com água ultrapura,

representando 100% de viabilidade celular para cada linhagem como mostram as figuras abaixo.

A linhagem 4T1-luciferase apresentou os seguintes resultados para o tempo de 24h. Pode-se observar que os resultados foram significativos para nano 2 nas concentrações iniciais de 20% da viabilidade e nano 3 com a variação entre 20 a 30% nas três concentrações, sendo que as demais nano não apresentaram nenhuma alteração. Apenas com o metal 3 ocorreu uma diminuição da viabilidade de 15 a 20% para as concentrações analisadas, como mostra a figura 25.

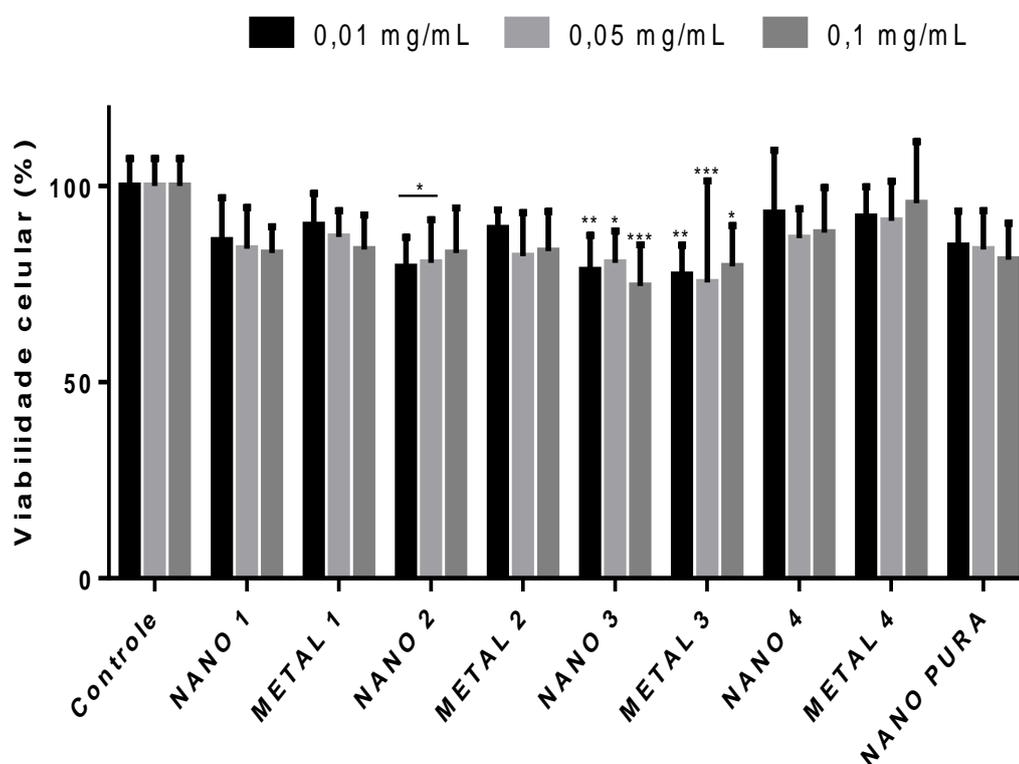


FIGURA 25: Avaliação da atividade citotóxica das nanos 1, 2, 3 associada a metal, metais 1,2 e 3 puro e nano pura em células de carcinoma mamário murino 4T1 Luciferase após 24h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. *p < 0,5; **p <0,01; *** p< 0,001; ****p<0,0001.

Com o tratamento no tempo de 48h na figura 26, foi observado que apenas com a nano 3, na concentração intermediária, ocorreu uma diminuição da viabilidade celular de quase 40%. Para os metais 2 e 3, na maior concentração, a redução foi de 30%. As demais amostras não apresentaram redução significativa.

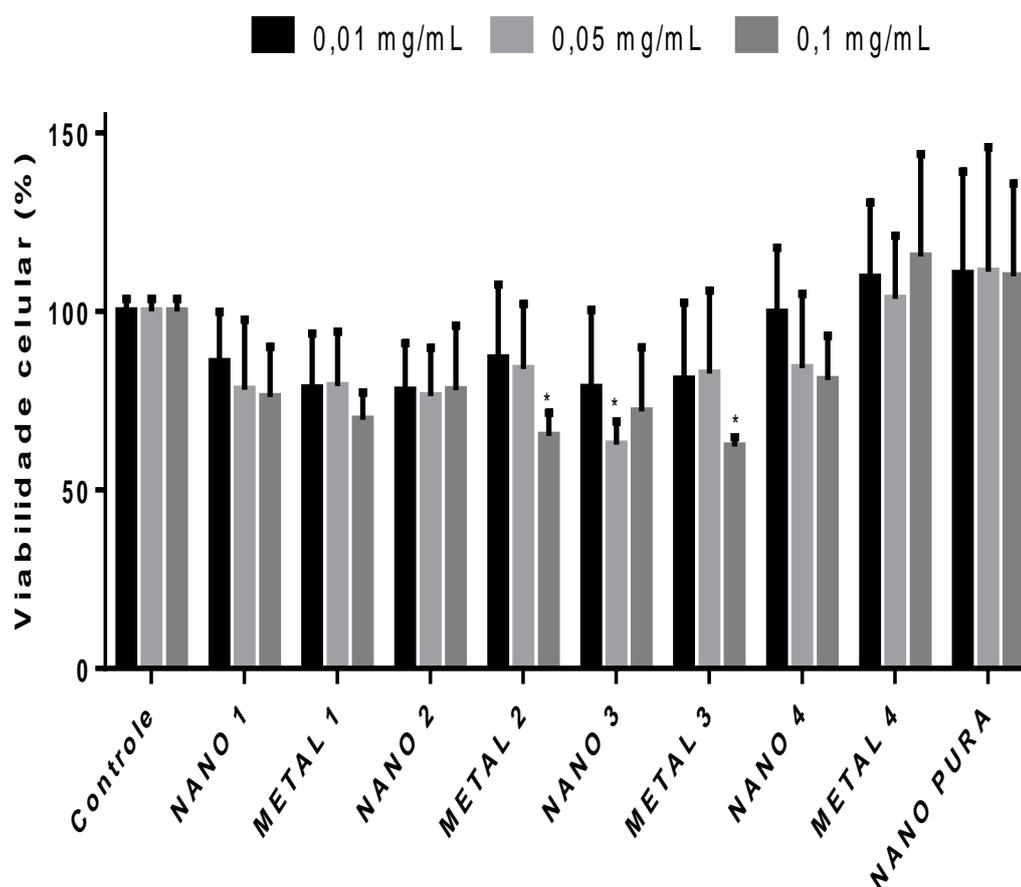


FIGURA 26: Avaliação da atividade citotóxica das nanos 1, 2 3 associada a metal, metais 1,2 e 3 puro e nano pura em células de carcinoma mamário murino 4T1 Luciferase após 48h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Para o ensaio de 72h figura 27, observou-se que a nano 2 nas concentrações de 0,05 e 0,1 mg/mL foram significativas e sua redução na viabilidade foi igual, em torno de 25%. Para nano 3, a redução foi de 30% para as três concentrações e, para a nano 4, apenas a concentração final foi significativa com cerca de 30% da viabilidade. O metal 2 apresentou viabilidade na maior concentração; para o metal 3, o percentual foi igual a quase 30% para as duas concentrações iniciais e o metal 4, apenas na maior concentração, apresentou resultado significativo de 30%.

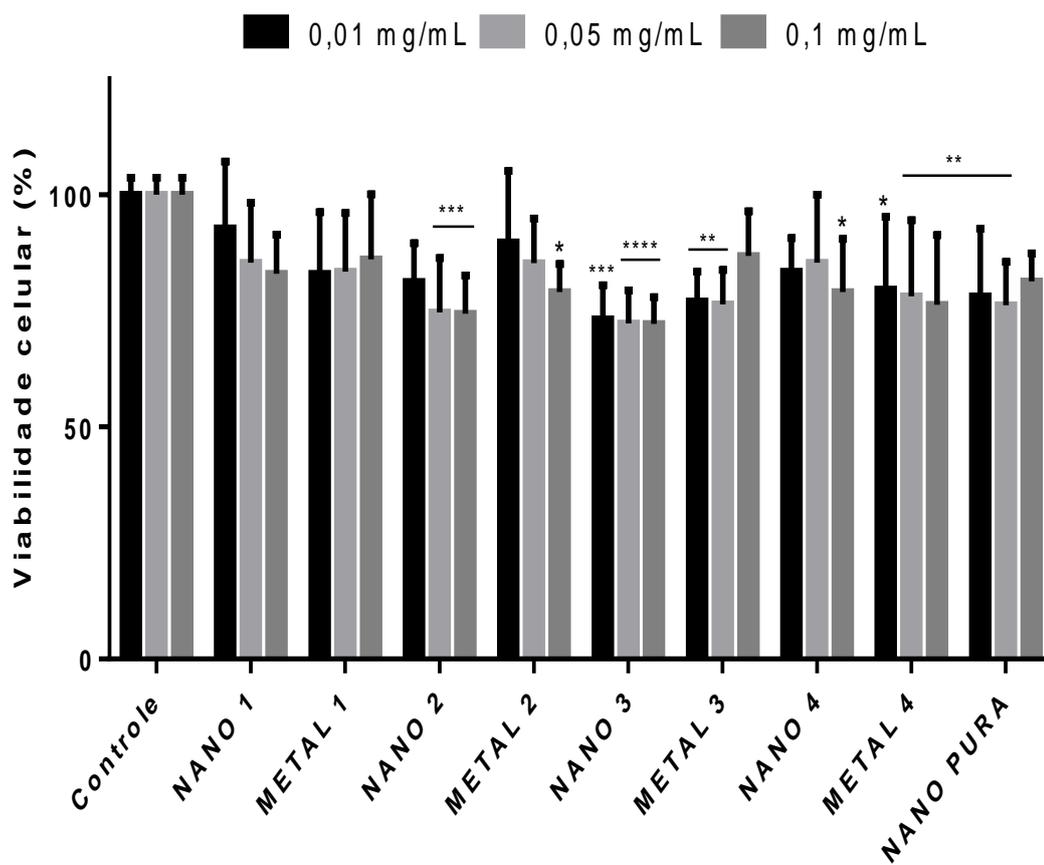


FIGURA 27: Avaliação da atividade citotóxica das nanos 1, 2 3 associada a metal, metais 1,2 e 3 puro e nano pura em células de carcinoma mamário murino 4T1 Luciferase após 72h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Resultados obtidos para a segunda linhagem celular estudada neste trabalho (melanoma de murino B16F10) estão descritos abaixo com seus respectivos gráficos.

No tempo de 24h de tratamento figura 28, obteve-se, como resultado, que para a nano 1, na concentração intermediária, ocorreu uma redução de 25% da viabilidade, o mesmo pode-se observar para a nano 2 na menor concentração e para a nano 3 na maior concentração. Nos metais, apenas o metal 1, na maior concentração, a redução foi de 20%.

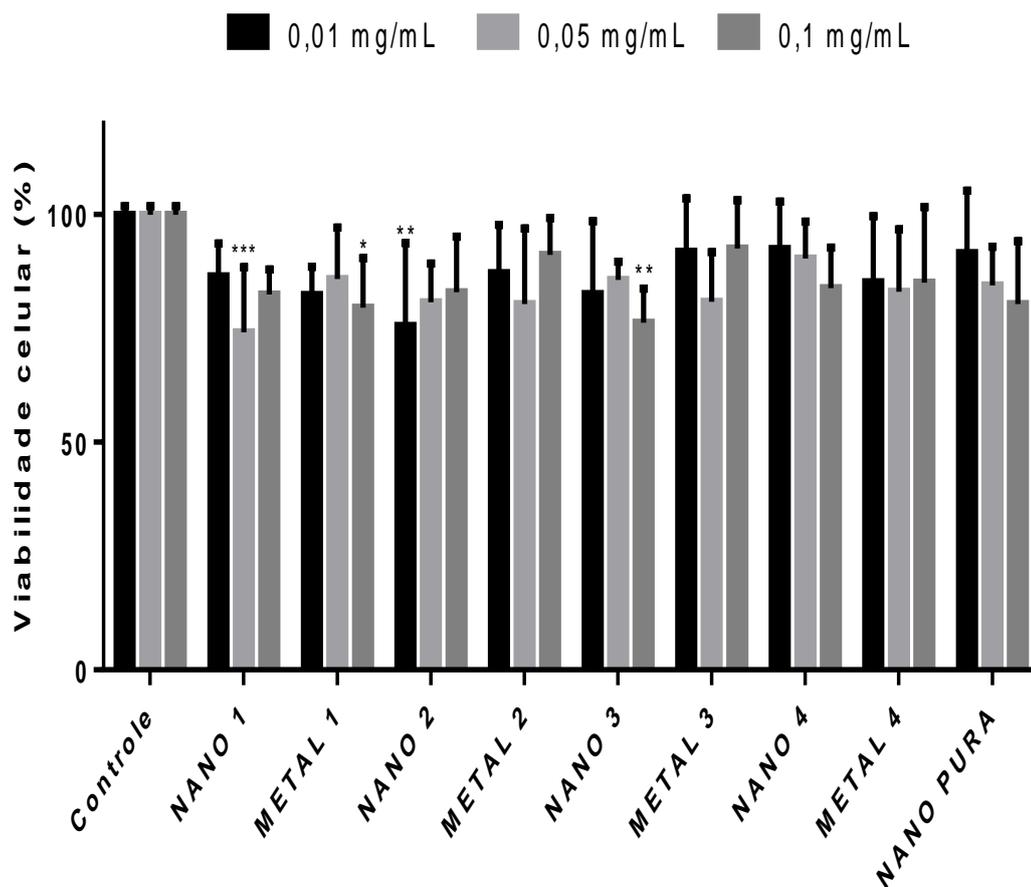


FIGURA 28: Avaliação da atividade citotóxica das nanos 1, 2 e 3 associada a metal, metais 1, 2 e 3 puro e nano pura em células de melanoma murino B16F10 após 24h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

No tempo de 48h como mostra a figura 29, pode-se observar que o metal 2, na menor concentração, teve redução de 20%; o metal 3, na menor e maior concentração, a redução foi de 20%. Apenas as nano 3 e nano pura tiveram uma viabilidade significativa com 25% para a menor e maior concentração da nano 3 e 20% na menor concentração da nano pura e 25% na maior concentração da mesma.

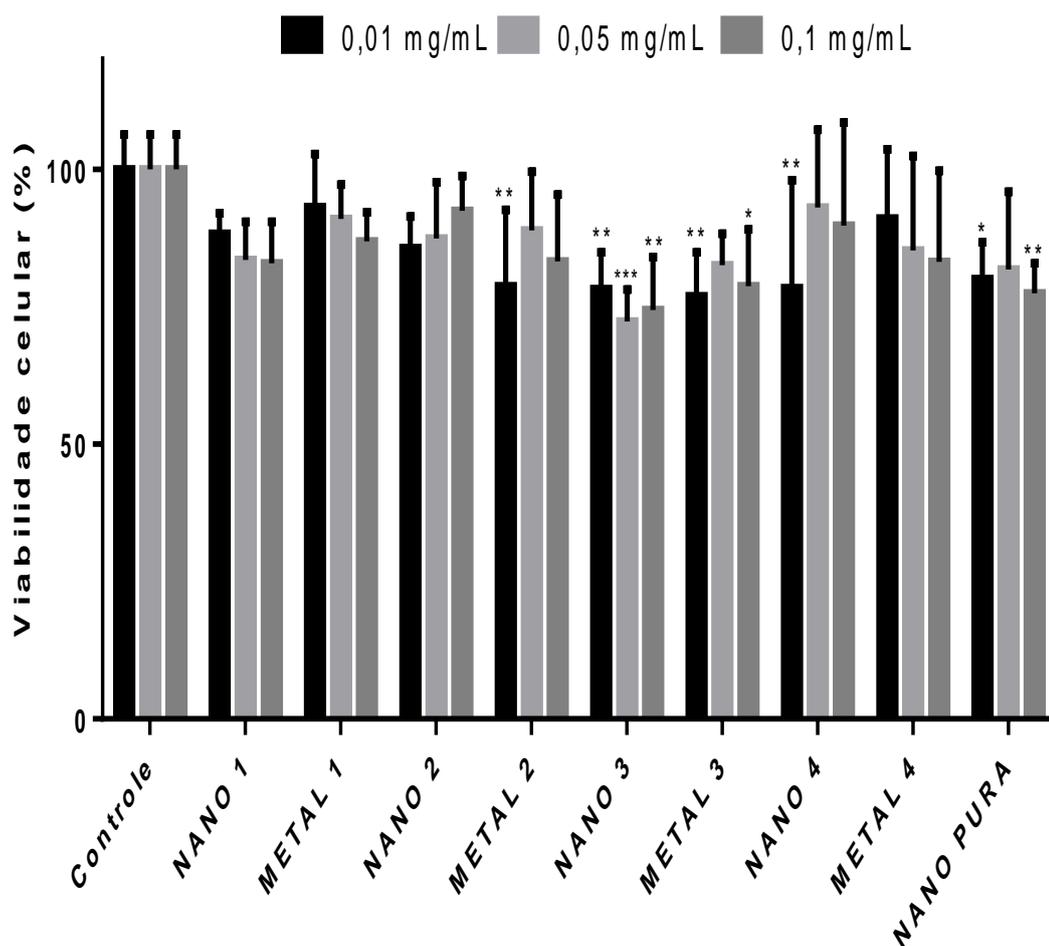


FIGURA 29: Avaliação da atividade citotóxica das nanos 1, 2 3 associada a metal, metais 1,2 e 3 puro e nano pura em células de melanoma murino B16F10 após 48h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

O ensaio para 72h ilustrado na figura 30, revelou, como resultado, que, no maior tempo de exposição das nanos, ocorreu diminuição significativa apenas na nano 3 na concentração de 0,05 mg/mL. As demais nanos e metais não apresentaram resultados significativos estatisticamente.

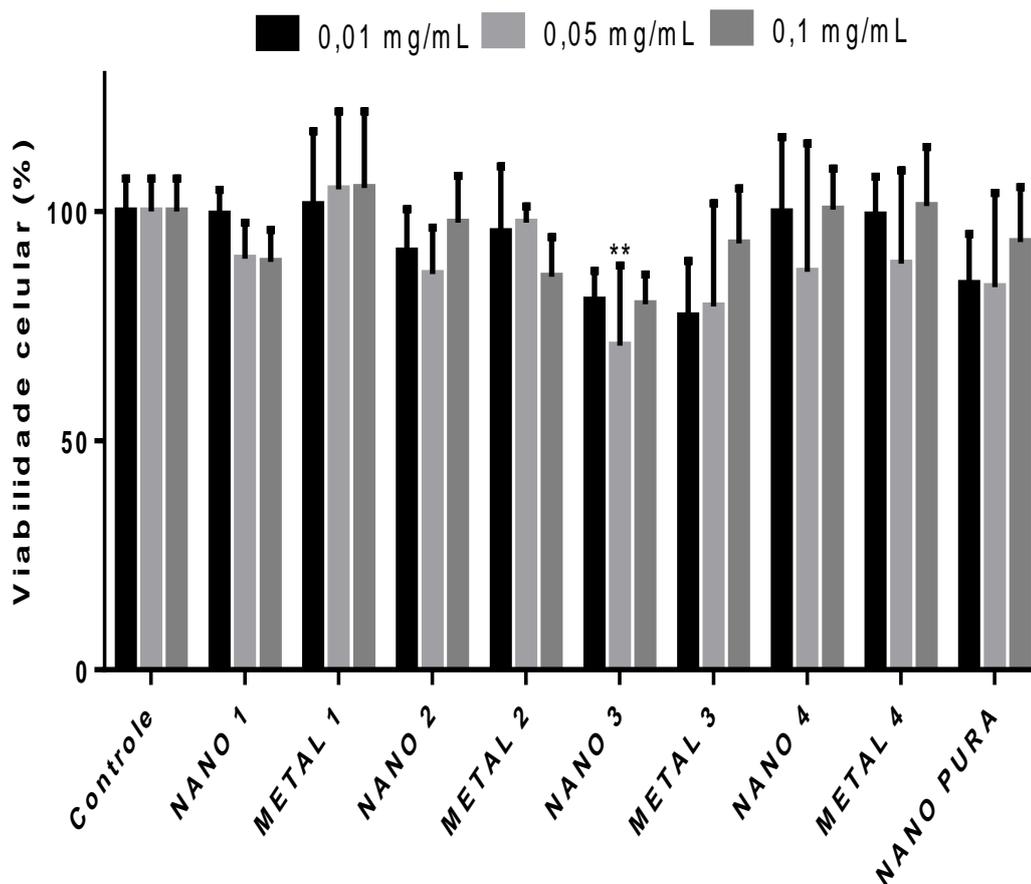


FIGURA 30: Avaliação da atividade citotóxica das nanos 1, 2 3 associada a metal, metais 1,2 e 3 puro e nano pura em células de melanoma murino B16F10 após 72h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Para ultima linhagem patológica utilizada neste experimento, que foi a de câncer cervical humano HELA, o procedimento utilizado foi o mesmo das anteriores e seus resultados encontram-se nas sequências de gráficos ilustrados abaixo nas figuras 31 a 33.

O primeiro tempo a ser analisado foi o de 24h, com o qual se constatou que não ocorreu nenhuma alteração estatística significativa para este ensaio.

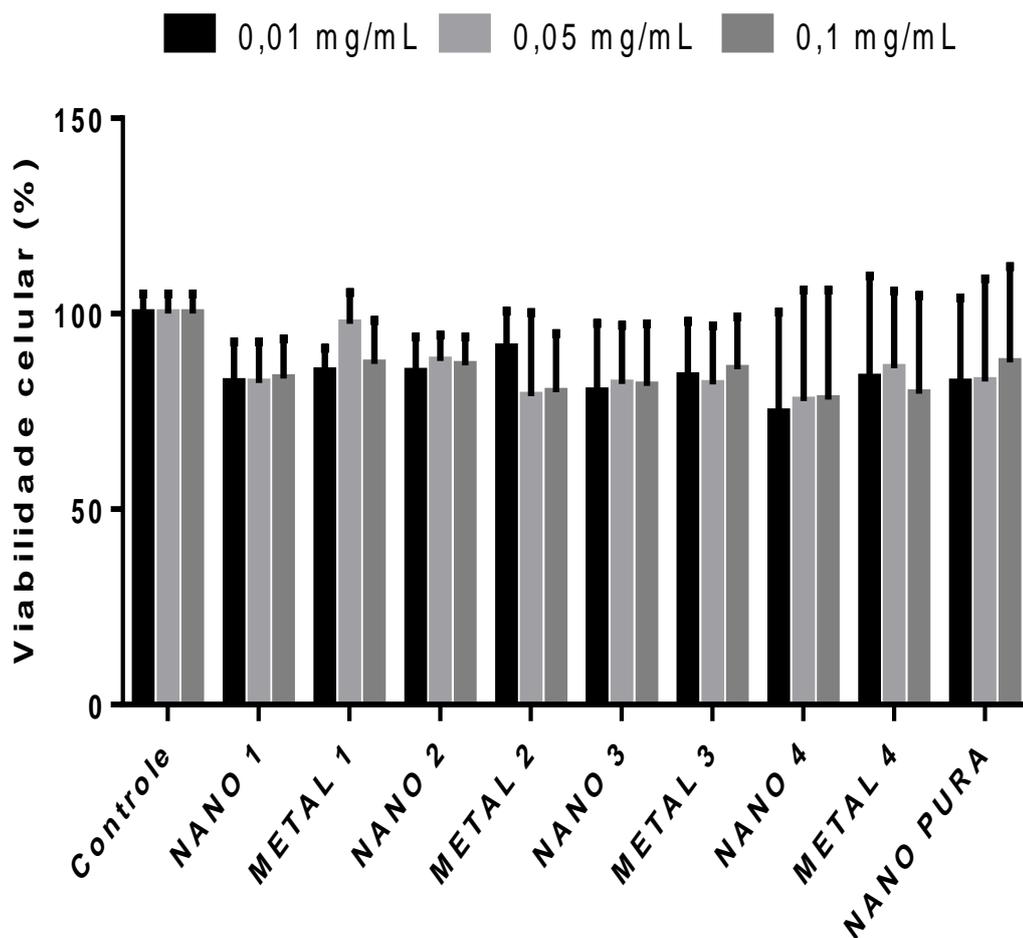


FIGURA 31: Avaliação da atividade citotóxica das nanos 1, 2 e 3 associada a metais 1, 2 e 3 puros e nano pura em células de carcinoma cervical humano HELA após 24h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Para o tempo de 48h, constatou-se que, na nano 1, a viabilidade foi de 20% para as concentrações 0,05 e 0,1mg/mL; o mesmo ocorreu para nano 2 apenas na concentração inicial; na nano 3 variou de 20 a 30% nas três concentrações testadas e para as demais nanos não se obteve alteração. Os metais apresentaram um quadro no qual o metal 1 a viabilidade foi de 25% para as duas primeiras concentrações; para o metal 2 foi de 30 a 20% em ordem decrescente; o metal 3 teve uma viabilidade de 20% para as concentrações iniciais e 10% para a maior concentração e o metal 4 apresentou em torno de 15% apenas para a menor concentração, permanecendo as demais sem alterações.

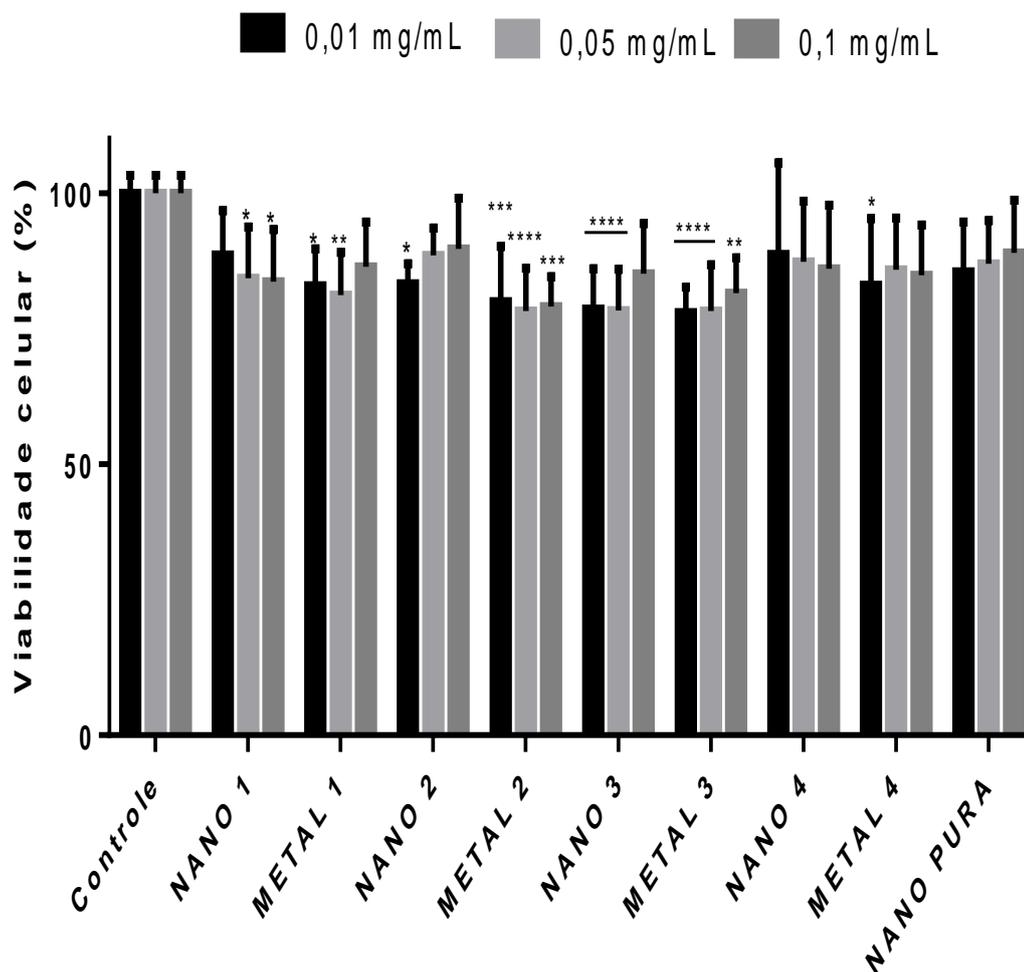


FIGURA 32: Avaliação da atividade citotóxica das nanos 1, 2 3 associada a metal, metais 1,2 e 3 puro e nano pura em células de carcinoma cervical humano HELA após 48h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. *p < 0,5; **p <0,01; *** p< 0,001; ****p<0,0001.

O ensaio de 72h desta linhagem apresentou como resultado que não ocorreu nenhuma alteração estatística significativa para nenhuma amostra analisada neste tempo de tratamento.

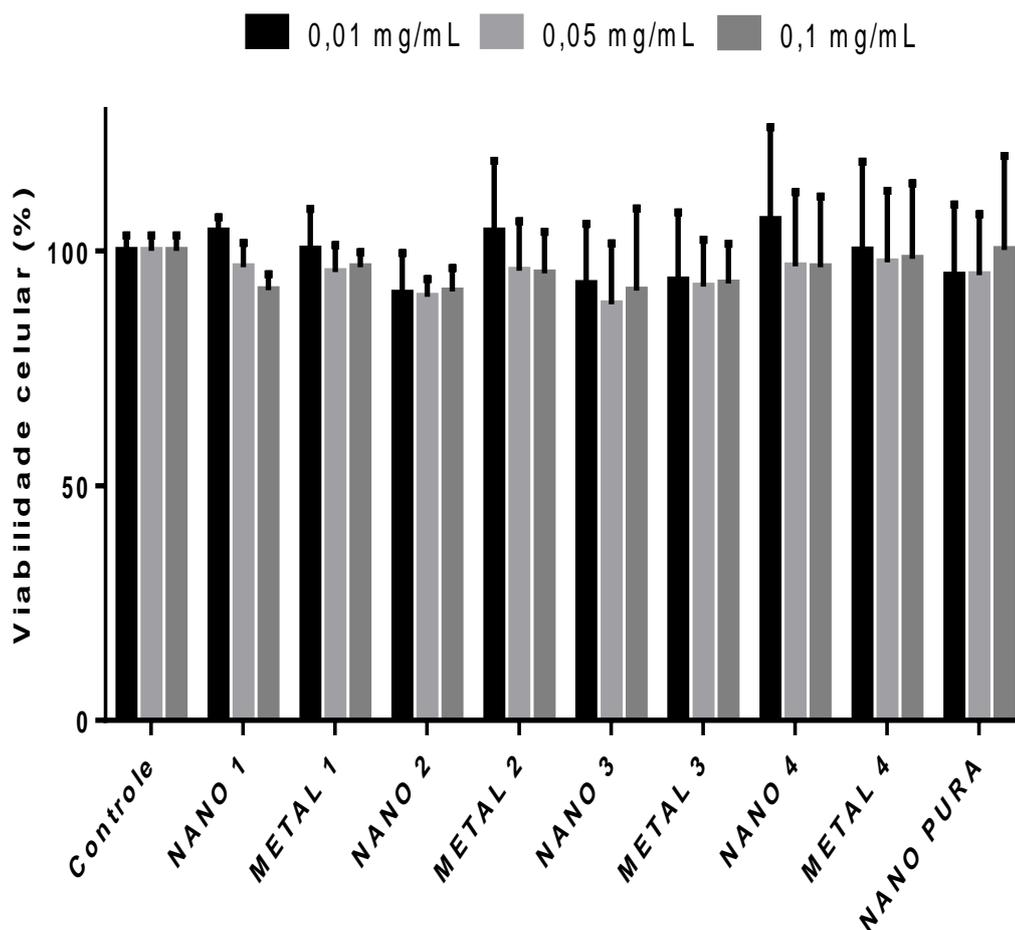


FIGURA 33: Avaliação da atividade citotóxica das nanos 1, 2 3 associada a metal, metais 1,2 e 3 puro e nano pura em células de carcinoma cervical humano HELA após 72h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. *p < 0,5; **p <0,01; *** p< 0,001; ****p<0,0001.

Visando avaliar os efeitos para que se possa realizar análise comparativa dos dados das células patológicas citadas anteriormente, foram realizados ensaios com a linhagem não-patológica de fibroblasto embrionário murinas (NIH/3T3, ATCCR CRL-1658TM), para um controle de toxicidade da viabilidade celular estudada para as nanos e metais em questões os resultados apresentam-se em forma de gráficos na sequência de figuras que são a 34 a 36.

Para o fibroblasto embrionário murinas (NIH/3T3, ATCCR CRL-1658TM), foi realizada a triplicata do experimento, nas mesmas concentrações e tempo de tratamento utilizado para as linhagens patológicas apresentadas anteriormente.

No tempo de 24h para o NIH/3T3, pode-se observar que não ocorreu nenhuma alteração significativa com base na estatística para este tempo de tratamento em nenhuma das amostras e concentrações analisadas.

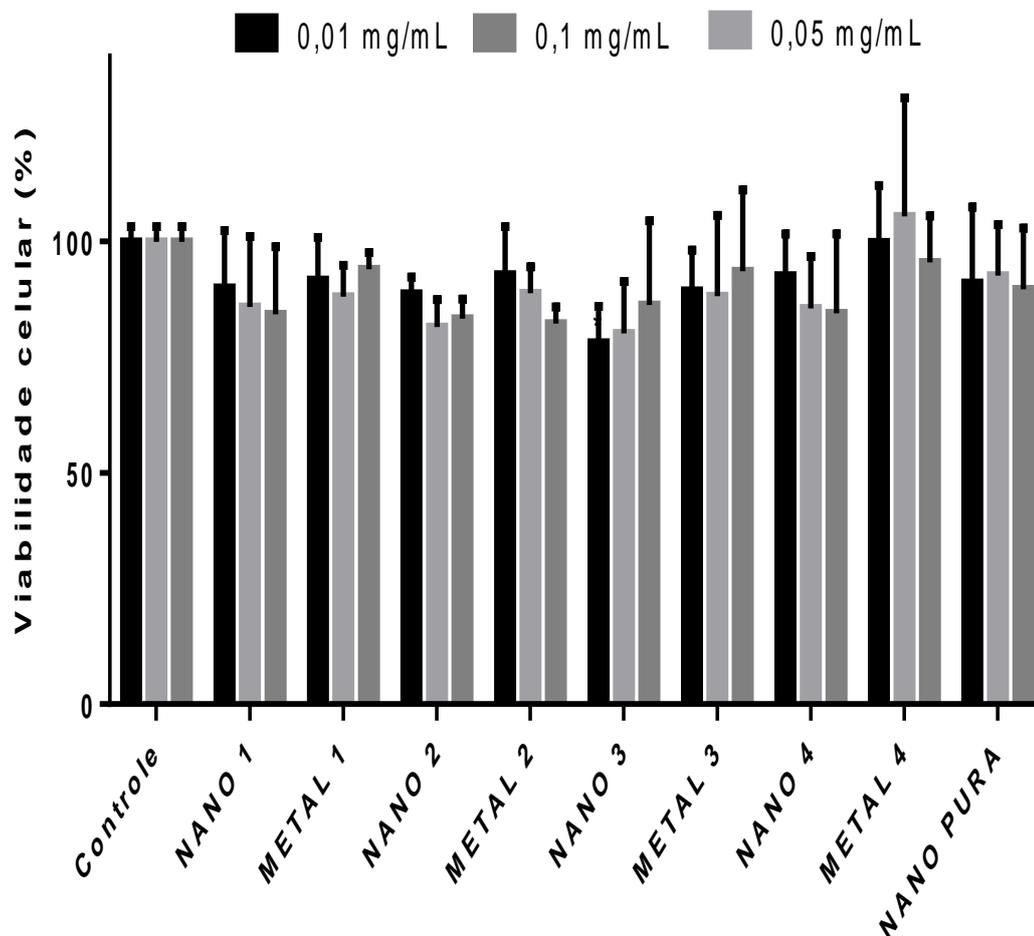


FIGURA 34: Avaliação da atividade citotóxica das nanos 1, 2 3 associada a metal, metais 1,2 e 3 puro e nano pura em células de fibroblasto embrionário murinas NIH/3T3 após 24h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. *p < 0,5; **p <0,01; *** p < 0,001; ****p<0,0001.

No ensaio de 48h, apenas a nano 1, na sua concentração intermediária, apresentou uma viabilidade celular apenas de 10%. As demais amostras permaneceram sem alteração.

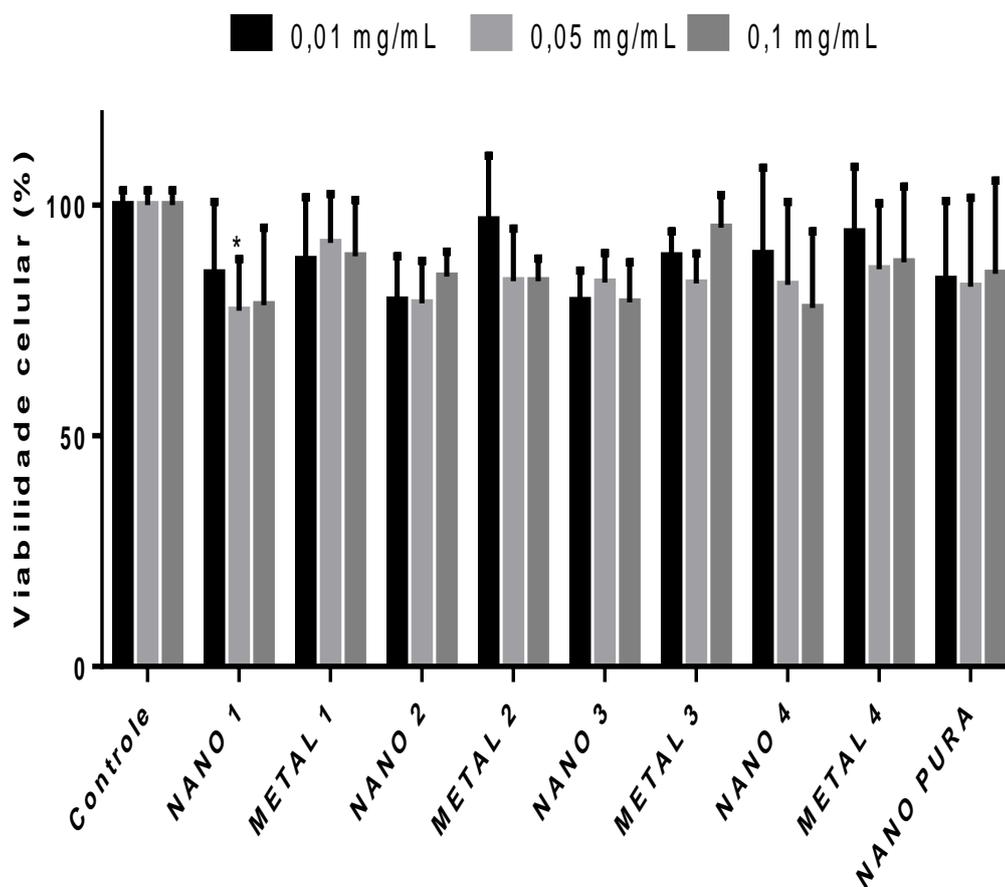


FIGURA 35: Avaliação da atividade citotóxica das nanos 1, 2 3 associada a metal, metais 1,2 e 3 puro e nano pura em células de fibroblasto embrionário murinas NIH/3T3 após 48h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Para o tratamento de 72h, a nano 1, nas duas últimas concentrações, apresentou uma viabilidade de 25% para ambas; na nano 2 esta viabilidade variou de 40 a 30% na sequência das concentrações analisadas; a nano 3 obteve 25% para a menor e maior concentração e a nano 4 teve 25% de viabilidade para as duas últimas concentrações. No caso dos metais, o metal 1 teve 25% de viabilidade na menor concentração e o metal 3 apresentou o mesmo percentual na concentração 0,05 mg/mL. As demais concentrações não registraram alterações.

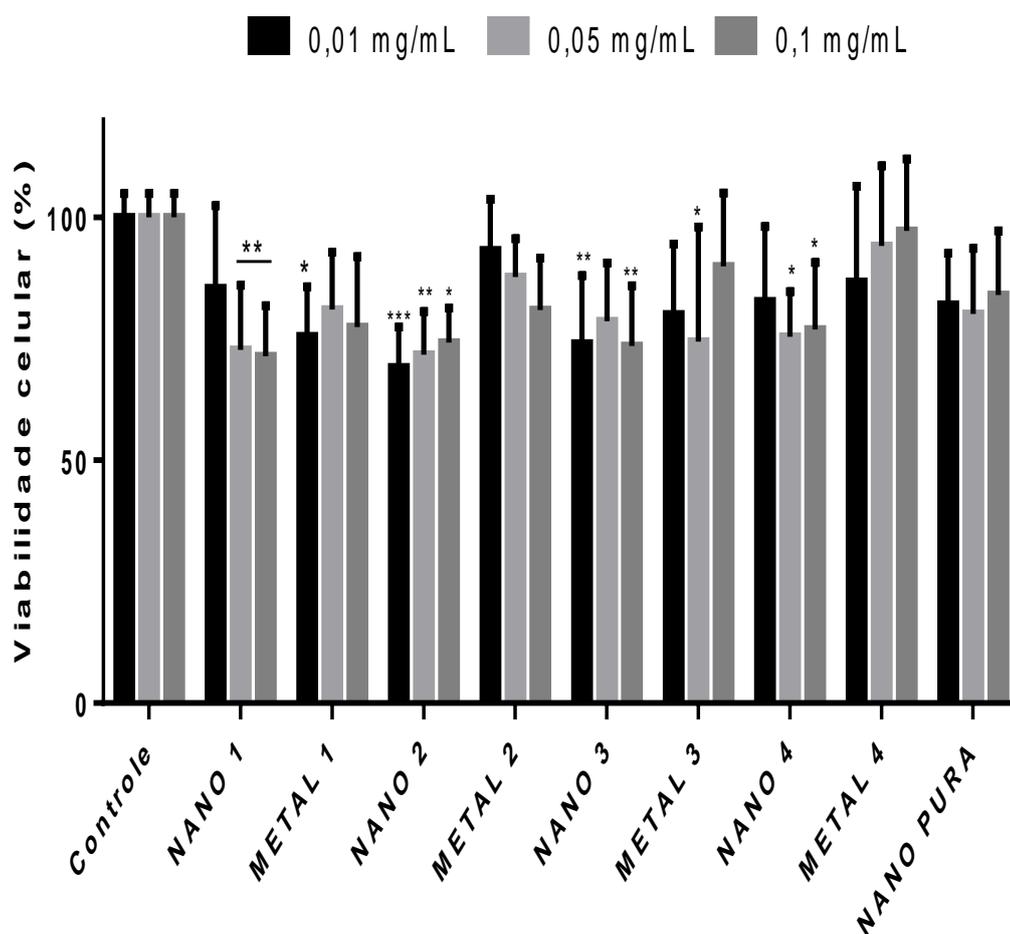


FIGURA 36: Avaliação da atividade citotóxica das nanos 1, 2 3 associada a metal, metais 1,2 e 3 puro e nano pura em células de fibroblasto embrionário murinas NIH/3T3 após 72h de exposição nas concentrações de 0,01- 0,05 e 0,1mg/ml. * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Para a segunda etapa deste trabalho foram analisadas nanos associada a metais e nano pura, bem como metal puro com o intuito de avaliar a toxicidade destes materiais e suas propriedades para que fosse possível selecionar a partícula com mais particularidades na eficiência de tratamento aliando a terapia fotodinâmica para as linhagens estudadas até o momento.

No tempo de 24h de exposição com o tratamento, foi possível detectar que na linhagem de 4T1 Luciferase os resultados foram significativos para Nano 2 nas concentrações de 0,01 e 0,05mg/mL cerca de 20% de viabilidade, a Nano 3 apresentou uma variação de 20 a 30% nas três concentrações analisadas respectivamente. Apenas o metal 3 ocorreu uma diminuição de 15 a 20% nas concentrações testadas. Neste mesmo tratamento para a linhagem B16F10 a Nano 1 reduziu 25% na concentra

0,05mg/mL, a mesma percentagem para Nano 2 na concentração 0,01mg/mL e Nano 3 com concentração de 0,1mg/mL. Os metais na B16F10 apresentaram o seguinte perfil, onde apenas o Metal 1 na concentração 0,1mg/mL a redução estatística significativa foi de 20% . Nas linhagens de HELA e NIH3T3 não foi observada nenhuma alteração.

A literatura reporta que o composto da nano 1 bem como o metal associado a mesma e aqui identificado como o metal 1 tem aplicações diversas na nanomedicina, pois são consideradas partícula antimicrobina segundo ZHOU e colaboradores bem como antitumoral com base nos dados do grupo de pesquisa de alguns cientistas (AMORIM et al. 2016), o uso de metais se dá pelas suas propriedades que facilitam ligação de biomoléculas e fármacos (DANTAS, 2017).

Grupos de pesquisadores observaram que quando ocorre uma redução da viabilidade celular com componentes da Nano 1 e seu metal, isso ocorre especificamente a células patológicas de câncer atribuindo a geração de espécies reativas de oxigênio no tipo de célula tumoral (LI et al. 2015). Com relação aos dados obtidos da nano 2, a literatura reporta que o componente metal desta nano é considerado tóxico, a NP mostra que ocorre uma diminuição significativa no que se refere a viabilidade celular e que em estudos com linfócitos humanos este índice de toxicidade foi registrado como elevado (SHARMA, 2014).

A nano 3 bem como o metal 3 apresentaram valores condizentes com a literatura, onde registro de estudos avaliaram que quando nanofolhas de $g\text{-C}_3\text{N}_4$ e nano composto $g\text{-C}_3\text{N}_4\text{-MnO}_2$ por exemplo não ocorreu perda significativa de viabilidade celular para a linhagem de HELA após 24h de exposição em concentrações abaixo de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, sugerindo que estes compostos possuem baixa citotoxicidade bem como uma excelente biocompatibilidade (ZHANG et al. 2014).

Com o tratamento de 48h, observou-se que para a linhagem de 4T1 Luciferase apenas Nano 3 na concentração 0,05mg/mL diminuiu a viabilidade quase 40% e os metais 2 e 3 na concentração 0,1 mg/mL a redução foi de 30%. Para a B16F10 o metal 2 na concentração 0,01mg/mL reduziu 20%, o metal 3 na concentração 0,01 e 0,1mg/mL a redução também foi de 20%. Para esta linhagem apenas a nano 3 e nano pura a viabilidade foi significativa 25% na menor e maior da nano 3 e cerca de 20% e 25% na nano pura para a menor e maior concentração respectivamente. Para as células de HELA a nano 1 teve 20% viabilidade para 0,05 e 0,1mg/mL, o mesmo para nano 2 na concentração 0,01mg/mL e para a nano 3 a variação foi em torno de 20 a 30% nas

três concentrações. O metal apresentou para esta linhagem uma diferença significativa de 30 a 20% do metal 2 e o metal 3 uma viabilidade de 20% para a concentração 0,01 e 0,05 mg/mL e cerca de 10% para concentração 0,1mg/mL, já o metal 4 na concentração 0,01mg/mL a viabilidade foi de 15%. A linhagem de NIH3T3 so teve uma viabilidade siginificativa estatisticamente na Nano 1 em torno de 15% na concentração 0,01mg/mL.

Os resultados obtidos já foram citados na literatura como descritos no tratamento de 24h, visto que neste novo tratamento de 48h o que apresentou resultados diferentes foi a nano pura (NP), onde a grupos de pesquisadores relatam que elementos compostos na amostra NP corroboram uma citotoxicidade não evidente para uma linhagem celular C6 de Glioma que manteve 86% de sua viabilidade mesmo que a concentração a ser analisada fosse superior a 300 µg / mL (GUAN et al. 2014).

O metal 2, bem como o 4, apresentaram resultados condizentes com a literatura, vez que dados da mesma relatam que, para cada linhagem estudada, poderá obter resultados diferentes, e, em algumas já observada, como a VERO (rim de macaco) sua viabilidade diminui significativamente nas concentrações superiores a 100 µg/ml, porém, para as linhagens MDCK (rim de cachorro) e NIH3T3 (fibroblasto de embrião de camundongos), concentrações de ate 200 µg/ml não foram consideradas tóxicas (SILVA et al. 2015).

Para o tratamento com 72h os resultados apresentados para linhagem de 4T1 Luciferase foram que a nano 2 teve uma redução na viabilidade de 25% nas concentrações 0,05 e 0,1mg/mL, na nano 3 a redução foi de 30% nas três concentrações, nano 4 30% apenas na concentração 0,1mg/mL. Os metais desta linhagem expressaram os seguintes dados: metal 2 a viabilidade mais acentuada foi em 0,1mg/mL, o metal 3 teve 30% de viabilidade nas concentrações 0,01 e 0,05mg/mL e o metal 4 apenas na concentração de 0,1mg/ml teve 30%. A linhagem de B16F10 ocorreu uma diminuição apenas na Nano 3 na concentração 0,05mg/mL. A ultima linhagem patológica testada para este tempo que foi a HELA não apresentou alteração em nenhuma das amostras. A linhagem não patológica utilizada neste estudo que foi a NIH3T3 teve para a nano 1 uma viabilidade de 25% nas concentrações 0,05 e 0,1mg/mL, onde a nano 2 vario de 40 a 30% na sequencia das concentrações analisadas, nano 3 apresentou 25% de viabilidade em 0,01 e 0,1mg/mL. No que diz respeito aos metais para esta linhagem apenas o metal 1 na concentração 0,01mg/mL

teve 25% de viabilidade e o metal 3 também apresentou esta mesma porcentagem só que na concentração de 0,05mg/mL.

Todos os dados obtidos, condizem com dados na literatura já citados neste texto, tendo como o composto da nano 4 e seus respectivo metal uma particularidade, visto que quando o metal tem um acúmulo excessivo (1g/L), ocorre uma diminuição da atividade da superóxido dismutase, tendo como consequência uma elevação nos níveis da Glutathione (GSH), consequentemente aumentando a concentração de malondialdeído (MDA) em tecidos cerebrais de animais já estudados (OZCELIK e UZUN, 2009; PINTO, 2016).

Uma exposição intensa deste metal traz danos as células e órgãos expostos, pois seus íons e compostos formam espécies reativas de oxigênio e danificam biomoléculas como proteínas, lipídeos e DNA (ABDEL-KHALEK et al. 2015; FEDELI, CARLONI, FALCIONI, 2010; PINTO, 2016).

5.3.2 Análise do perfil de tempo de incorporação das nanos.

Para dar prosseguimento, foram iniciados os testes de tempo de incorporação da nano. Com base neste dado será aplicado para os testes que consta na 3 etapa deste trabalho que vem a ser o tratamento de terapia fotodinâmica da nano partícula associada com metal que teve o melhor resultado de todas as análises feitas anteriormente.

Neste ensaio, foram realizadas leituras no espectrofotômetro, sendo a excitação realizada em comprimento de onda de 380nm e lendo na faixa de 400 a 500nm, para a leitura em fluorescência.

A linhagem utilizada para esta análise foi a melanoma murino B16F10 nos tempos de 5 min a 24h como descrito na figura abaixo.

Tendo como controle em 100% através dos gráficos na figura 37, observou-se que, para as analisadas (0,01, 0,05 e 0,1 mg/mL), o tempo cujo pico apresentou maior expressão de fluorescência foi de 2h com a nano.

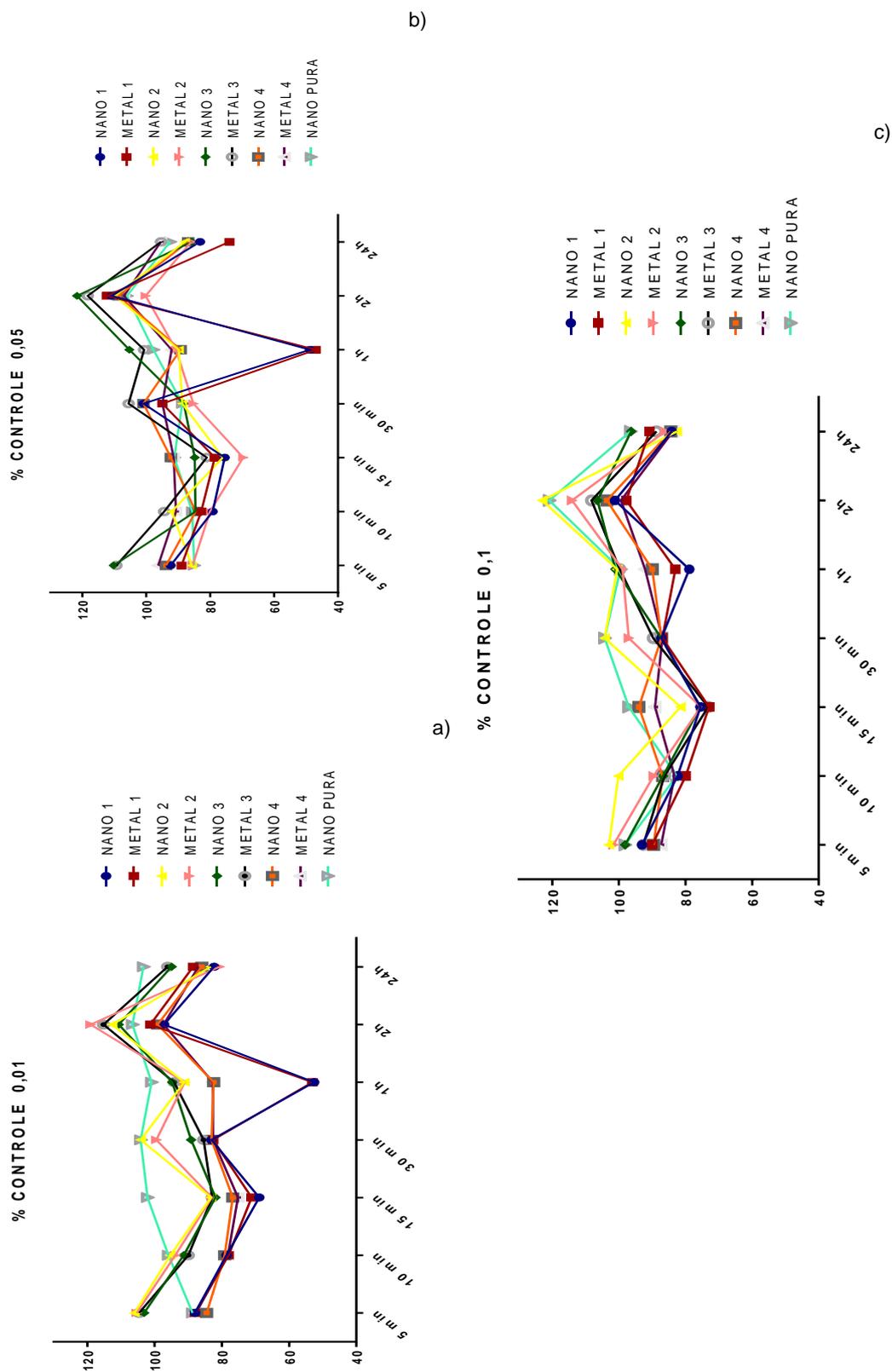


FIGURA 37: Gráficos das concentrações de tempo de incorporação das nano associadas a metal, metal puro e nano pura para determinar o melhor tempo com o pico mais expressivo de fluorescência das amostras analisadas.

Este trabalho avaliou diferentes linhagens com todas as nanos e metais especificados, podendo obter respostas através do ensaio de MTT no que remete a citotoxicidade relacionando assim diferenças na morfologia e estrutura de cada linhagem, bem como suas propriedades particulares para reagir com o material a qual foram expostas nos diferentes tempos de tratamento.

Com base nos dados descritos até o momento, fez-se necessário realizar o tempo de incorporação da Nano utilizando a linhagem B16F10 nas concentrações de 0,01-0,05 e 0,1mg/mL. O resultado mostrou que dos tempos estudados que foram de 5,10,15 e 30 minutos, 1,2,24 e 48h sendo a excitação realizada em comprimento de onda de 380nm e lendo na faixa de 400 a 500nm, para a leitura em fluorescência, o melhor tempo com o pico mais característico como mostra os gráficos foi de 2h.

A literatura relata que a partícula quando em contato com a célula, ao entrar na mesma pode ocorrer ligação das moléculas de DNA podendo ter alteração na estrutura helicoidal por reticulação dentro e entre as cadeias de ácidos nucleicos (REYES et al. 2016). Pode-se também determinar que a incorporação da nano pode provocar degradação, corrosão no ambiente ácido dos lisossomos (pH 5,5) ou protease, fazendo assim a reação de conversão de metais a íons, bem como a produção de substâncias tóxicas, visto que na liberação intercelular de íons livre ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio em mitocôndrias, bem como podendo levar a um funcionamento inadequado de organelas (SABELLA et al. 2014) e com base nestes dados e os resultados obtidos no ensaio, é possível direcionar o protocolo mais adequado para a nano com o uso de terapia fotodinâmica.

5.3.3 Avaliação do tempo de irradiação do LED nas nanos

Diante dos dados obtidos com o melhor tempo de irradiação e, uma vez que é preciso determinar o melhor tempo de irradiação do LED para que possa obter resultados satisfatórios para a etapa de tratamento com TFD, será observado qual foi o tempo em que o controle não foi afetado, visto que este parâmetro possui a resposta para análise.

A literatura reportar que para o LED em estudo o tempo de irradiação é de 10 a 15 minutos, este ensaio utilizou a linhagem celular B16F10 para determinar o melhor tempo como mostra a figura 38.

Diante dos resultados obtidos até o momento, foram escolhidas a nano 4 , metal 4 e nano pura para realizar a ultima etapa do trabalho. Estas nanos foram nomeadas a titulo de didática para facilitar o entendimento do leitor como descritos a seguir: nano 4 (NM) nano com metal, metal 4 (M) metal e (NP) nano pura.

Com base nos resultados obtidos das concentrações analisadas, onde estas concentrações são as que possuem a quantidade exata de metal e que apresentaram resultados condizentes com a literatura, confirmando que o melhor tempo de irradiação onde o controle não foi afetado é o de 10 minutos.

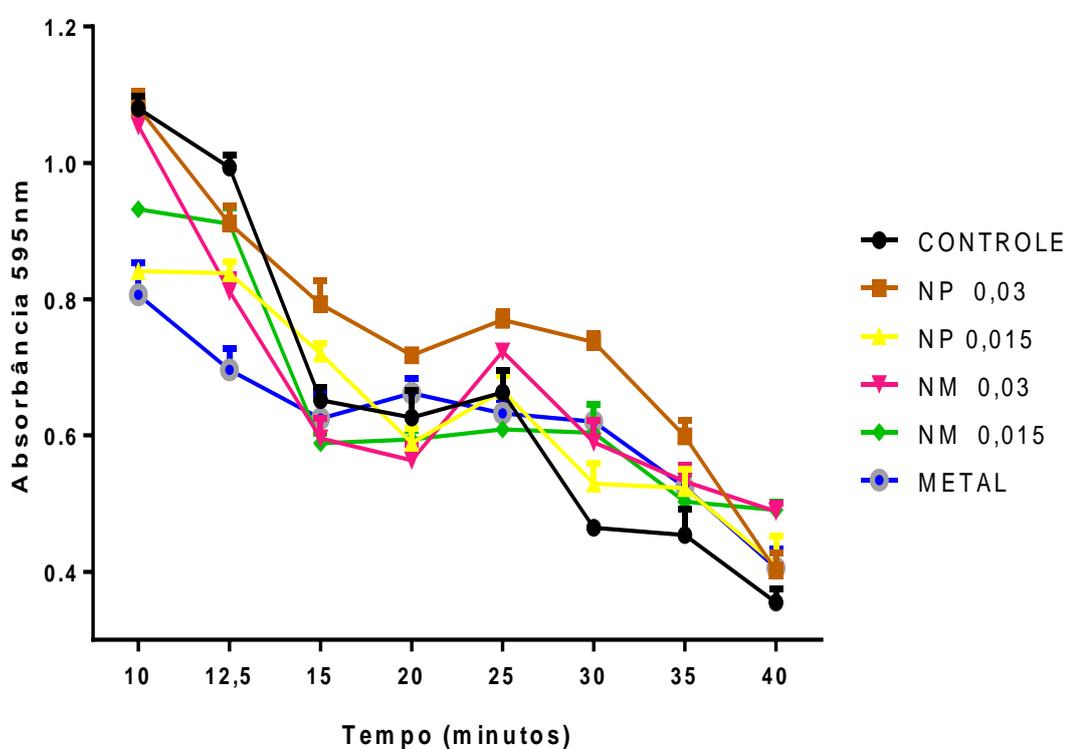


FIGURA 38: Análise do tempo de irradiação de LED na linhagem B16F10 para as nanos em estudo.

5.3.4 Ensaios de viabilidade celular com TFD da nano com metal, nano sem metal e metal pelo ensaio de MTT utilizando luz ambiente.

Por se tratar de terapia fotodinamica é necessario o tempo ideal de irradiação do LED levando em consideração o controle não sofrer alterações. Neste ensaio realizado, observou que o melhor tempo foi de 10 minutos , visto que a medida que o

tempo de irradiação aumentava, o controle diminuía e as nanos associada ao metal não tinha uma variação tão significativa. As concentrações escolhidas foram as que possuíam a mesma quantidade de metal, visto que o metal sozinho a concentração era de $16\mu\text{M}$ e o mesmo estava presentes na NM e NP que era de 1mg/mL .

Pesquisas confirma que o melhor tempo é de 10 minutos como mostra literatura, que em testes com 15 min de irradiação de luz, a solução dispersa mostrou uma concentração de oxigênio de 1,86 vezes maior que a solução dispersa em C_3N_4 (ZHENG et al. 2016). Pesquisas realizadas com linhagem patológica de células mostraram que foi utilizado tempo de irradiação de 10 minutos e o resultado foi satisfatório (FENG et al. 2016).

Diante dos resultados obtidos pelos ensaios de viabilidade celular com as amostras associadas a metal, bem como tempo de incorporação e tempo de irradiação de LED nas nanos, realizou o experimento com tempos intermediários dos testes já realizados anteriormente, bem como novas concentrações de apenas duas nanos, visto que foram estas que se apresentaram com as condições mais específicas para a etapa final do trabalho com Terapia Fotodinâmica (TFD).

As amostras foram trabalhadas com um pouco de luz ambiente sendo apenas a cabine do fluxo e a linha de luz próxima a este que permaneceram apagadas. As figuras 39 e 40 abaixo demonstram os resultados da triplicata do experimento realizado para a linhagem B16F10 em diferentes tempos de incorporação da nano com o tratamento de LED e luz ambiente.

O ensaio mostra que ocorreu uma diferença significativa estatisticamente apenas na NM na concentração intermediária de $0,25\text{ mg/mL}$ em torno de 60% da atividade citotóxica deste material para esta linhagem.

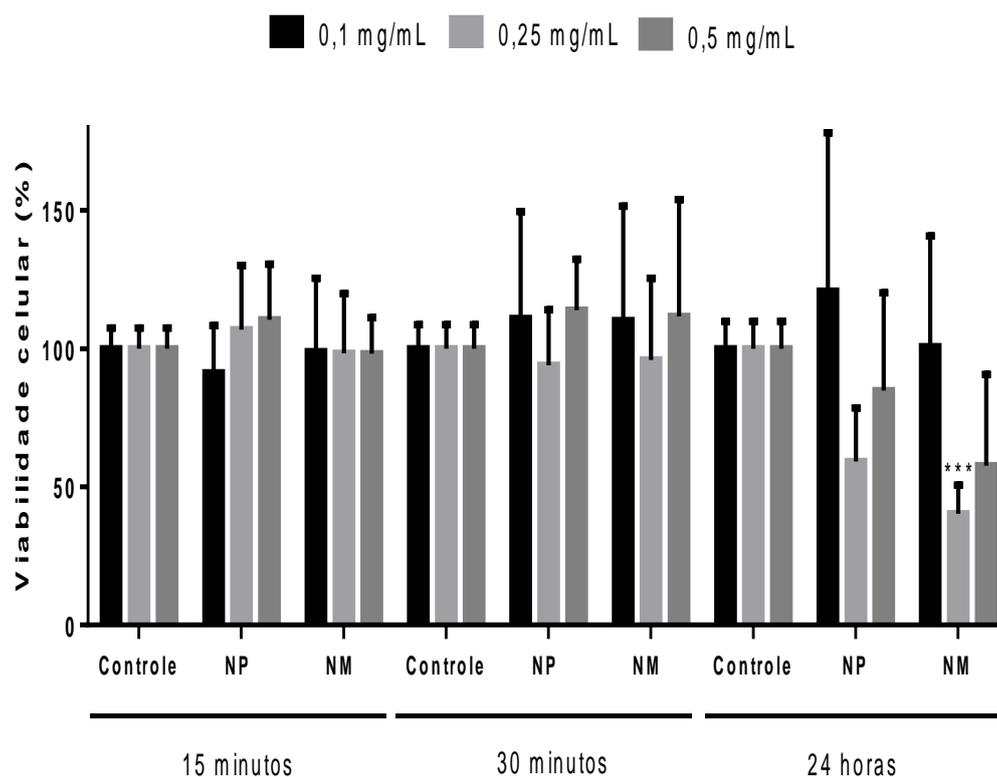


FIGURA 39: Avaliação da atividade citotóxica da NP, NM em células melanoma murino B16F10 após 15, 30 minutos e 24h de exposição nas concentrações de 0,1-0,25 e 0,5mg/ml, com exposição de 10 minutos no tratamento luz ambiente. * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Com base nestes dados foram realizados ensaios com o LED, em diferentes concentrações das testadas até o momento e com tempos intermediários de incorporação tendo como fonte o ensaio realizado anteriormente neste estudo, e o tempo de irradiação escolhido foi o de 10 minutos, visto que este apresentou o melhor resultado e confirmou o encontrado na literatura.

O ensaio de TFD foi realizado com as amostras sendo trabalhadas com um pouco de luz branca no ambiente sendo apenas a cabine do fluxo e a linha de luz próxima a este que permaneceram apagadas. As figuras demonstram os resultados da triplicata do experimento realizado para a linhagem B16F10 em diferentes tempos de incorporação da nano com o tratamento de LED e luz ambiente

Para os testes na luz ambiente os resultados apresentaram diferença significativa estatisticamente apenas na NM na concentração intermediária de 0,25 mg/mL em torno de 60% da atividade citotóxica deste material para esta linhagem, e o

tempo de incorporação para estes resultados foi o de 24h, posto que os tempos de 15 e 30 minutos não apresentaram nenhuma alteração.

No ensaio utilizando o LED foi possível detectar que para a NP nas concentrações 0,25 e 0,5mg/mL ocorreu uma viabilidade celular significativa, visto que a diminuição foi em torno de 50 a 40% respectivamente. Ao comparar com o resultado da NM, esta apresentou uma diferença significativa nas mesmas concentrações da NP, porém o valor variou de 30 a 40% respectivamente, demonstrando a influencia do metal associado a Nano, porém o valor apresentado não foi tão significativo da redução quando comparado entre a NP.

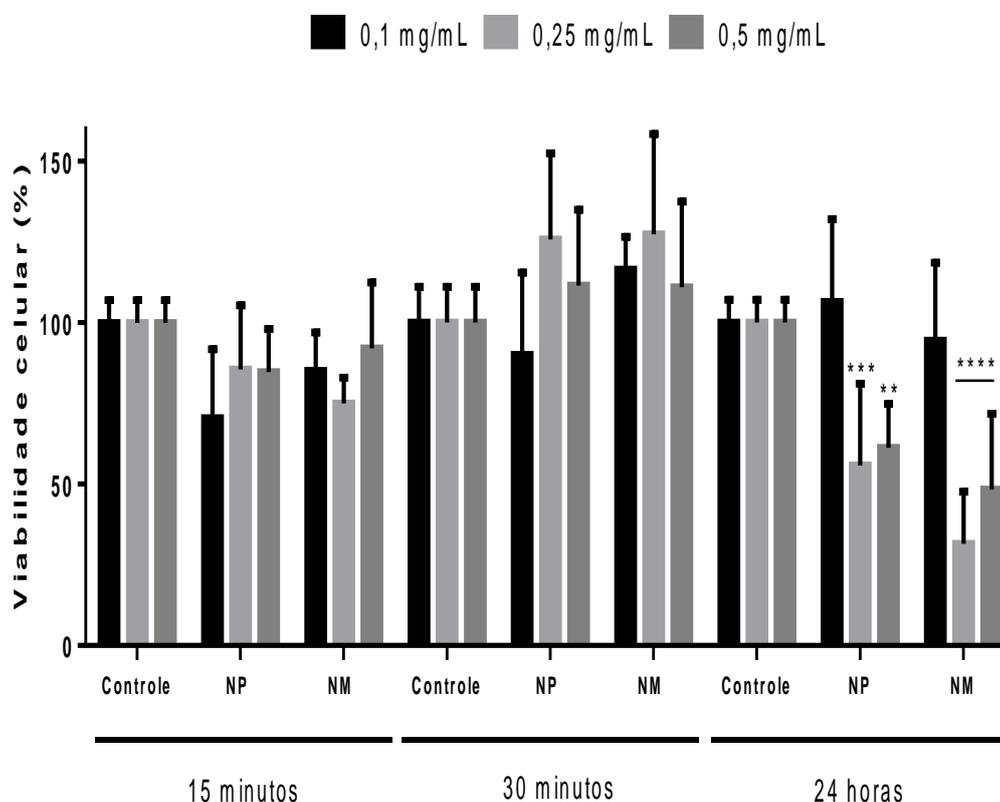


FIGURA 40: Avaliação da atividade citotóxica da NP, NM em células melanoma murino B16F10 após 15, 30 minutos e 24h de exposição nas concentrações de 0,1-0,25 e 0,5mg/ml, com exposição de 10 minutos no tratamento LED. * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

5.3.5 Ensaio de viabilidade celular com TFD da nano com metal, nano sem metal e metal pelo ensaio de MTT utilizando luz vermelha no ambiente.

O ensaio do procedimento de luz ambiente agora com o diferencial de aplicação do LED, foi possível detectar que para a NP nas concentrações 0,25 e 0,5mg/mL ocorreu uma viabilidade celular significativa, visto que a diminuição foi em torno de 50 a 40% respectivamente. Ao comparar com o resultado da NM, esta apresentou uma diferença significativa nas mesmas concentrações da NP, porém o valor variou de 30 a 40% respectivamente, demonstrando a influencia do metal associado a Nano, porém o valor apresentado não foi tão significativo da redução quando comparado entre a NP, e novamente foi possível observar que o tempo de incorporação que se manifestou a reação foi o de 24h como ocorreu no tratamento sem radiação.

Ao realizar o tratamento de LED e luz ambiente, o esperado segundo dados da literatura é que no de luz ambiente não ocorra redução significativa, visto que o destinado é que a junção da nano quando exposta ao LED, este tenha prioridade de gerar ROS e conseqüentemente ocorra uma morte celular, porém o que foi observado é que tanto o tratamento do LED quanto sem radiação tiveram esta resposta, sendo o LED um pouco mais, porém nem tanto significativa para o experimento.

Com base em dados de grupos de pesquisa foi possível detectar estes resultados, pois a literatura reporta que nitreto de carbono grafico polimérico (g-C₃N₄) pode ser utilizado como um fotocatalisador de luz visível sem metal (WANG et al. 2009 (a); DONG et al. 2014.), este tipo de aplicação trouxe interesse para a sociedade científica pois, gera aplicações satisfatórias em conversão de solar, ambiental em síntese orgânica seletiva (WANG et al. 2009(b); WANG, BLECHERT, ANTONIETTI 2012).

Pesquisas foram realizadas e constataram que g-C₃N₄ possui um índice elevado de remoção de NO de 77,1% quando exposto a iluminação interior de uma lâmpada de emergência, e estes dados foram tratados com base na reação de eletrodos de 5,5'-dimetil-1-pirrolina-N-óxido Ressonância (DMPO ESR) spin trapping, com isso demonstrou ser um processo considerado simples, economico para purificação de NO tendo a irradiação interna podendo assim promover aplicações em campos como prática ambiental de fotocatalisador em número elevado na terra (DONG et al. 2014.).

Por possuir diversas formas alotrópicas o nitreto de carbono como α -C₃N₄, β -C₃N₄, gráfico-C₃N₄, C₃N₄ cúbico e pseudo-cúbico-C₃N₄, a forma g-C₃N₄ é a

considerada mais estável quando submetida a condições ambientais (WANG et al. 2009 (c)).

A forma estrutural dos átomos de g-C₃N₄ são organizadas como favos de mel possuem ligação característica de Van Der Waals, demonstram que a borda VB de g-C₃N₄ é composta de N 2p e na borda CB a hibridação se encontra no estado N 2p e C 2p (WANG et al. 2014). Com isso evidencia-se que segundo XU et al carbono livre de metal são eletrocatalisadores e fotocatalisadores no que diz respeito a divisão de água abrangendo assim g-C₃N₄, grafenos e polímeros microporosos, bem como carboneto de boro (XU et al. 2016).

Por se tratar de um nanomaterial novo, grupos de pesquisa vêm divulgando com detalhes por meio de discussão sobre diferentes sínteses, caracterização, morfologia e propriedades ópticas e eletrônicas, bem como a dopagem do g-C₃N₄ para utilização deste como produção de hidrogênio fotocatalítico (PATNAIK, MARTHA, PARIDA, 2016).

O metal tem papel fundamental na junção desta partícula, pois o metal segundo dados na literatura atua como captura de elétrons aumentando assim a taxa de migração de carga interfacial utilizada para separação na atividade fotocatalítica (OH et al. 2016; CAO et al. 2017). Diante do que esta sendo explanado pode-se ainda citar que quando um componente metálico se liga a matriz de nitreto de carbono forma-se híbridos orgânicos metálicos (NASERI et al. 2017) e quando g-C₃N₄ esta introduzido em metal de transição, sua capacidade é satisfatória para fotoabsorção, pois a baixa absorção de energia torna-os eficiente para realizar atividade fotocatalítica (GHOSH, et al. 2014).

Os ensaios citados anteriormente mostraram que a luz ambiente mesmo em feixes discretos interferiu no teste com TFD. Diante desta descoberta no experimento, o protocolo foi alterado, tendo a manipulação das amostras realizada todas com luz vermelha para que os resultados fossem satisfatórios para este modelo *in vitro*.

Nesta nova etapa do experimento foi realizado ensaio de 24h de incubação com a nano, 10 minutos de tratamento no escuro e irradiação com LED cujas linhagens testadas foram: B16F10, 4T1 luciferase, Hela, NIH3T3 e HACAT.

Os gráficos abaixo 41 a 45 mostram os resultados dos ensaios em luz ambiente e com TFD para todas as linhagens citadas anteriormente.

Como pode ser observado na figura 41, para o tratamento sem radiação a NM (nano com metal) na concentração 0,5 mg/mL apresentou diferença significativa comparando com controle e o metal aumentou a viabilidade celular para todas as concentrações.

Quando tratadas com LED nas mesmas condições do tratamento sem radiação a NP (nano Pura) apresentou diferença significativa estatisticamente comparando com o controle, este valor é ilustrado pela letra c no gráfico e comparando com a NM (nano ligada ao metal) na maior concentração no escuro e LED.

Com isso mostra que o LED não apresentou diferença significativa para NM comparando com escuro para esta linhagem. Pode-se concluir que tanto a NM e NP não foram significativas com o tratamento do LED.

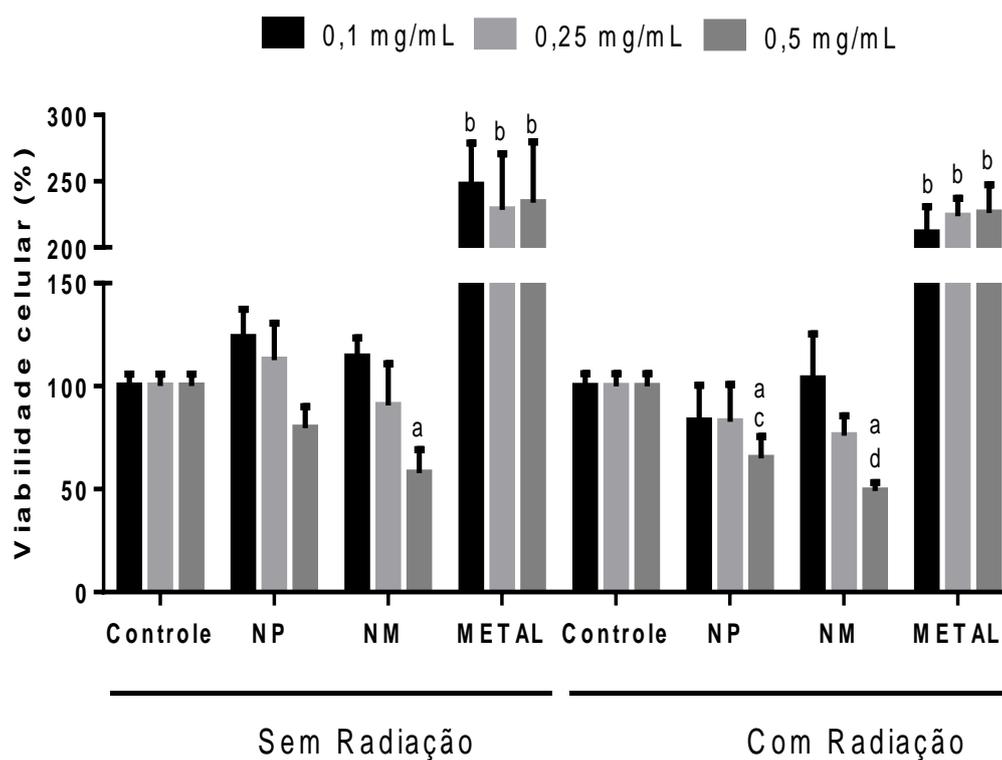


FIGURA 41: Avaliação da atividade citotóxica da NP, NM e Metal em células de carcinoma mamário murino 4T1 Luciferase após 24h de exposição nas concentrações de 0,1- 0,25 e 0,5mg/ml, com exposição de 10 minutos no tratamento de com radiação e sem radiação. As letras a,b,c e d são $< 0,05$.

A figura 42 mostra que no escuro não observou atividade citotóxica da NP (Nano pura) com NM (nano com metal) quando comparada com controle. Os

resultados do tratamento do LED a NP não teve citotoxicidade assim como NM na menor e maior concentração, porém a NM na concentração de 0,25 mg/mL teve uma diminuição significativa em torno de 70%. Para os metais no escuro e LED apresentaram um aumento significativo como na linhagem de 4T1 Luciferase.

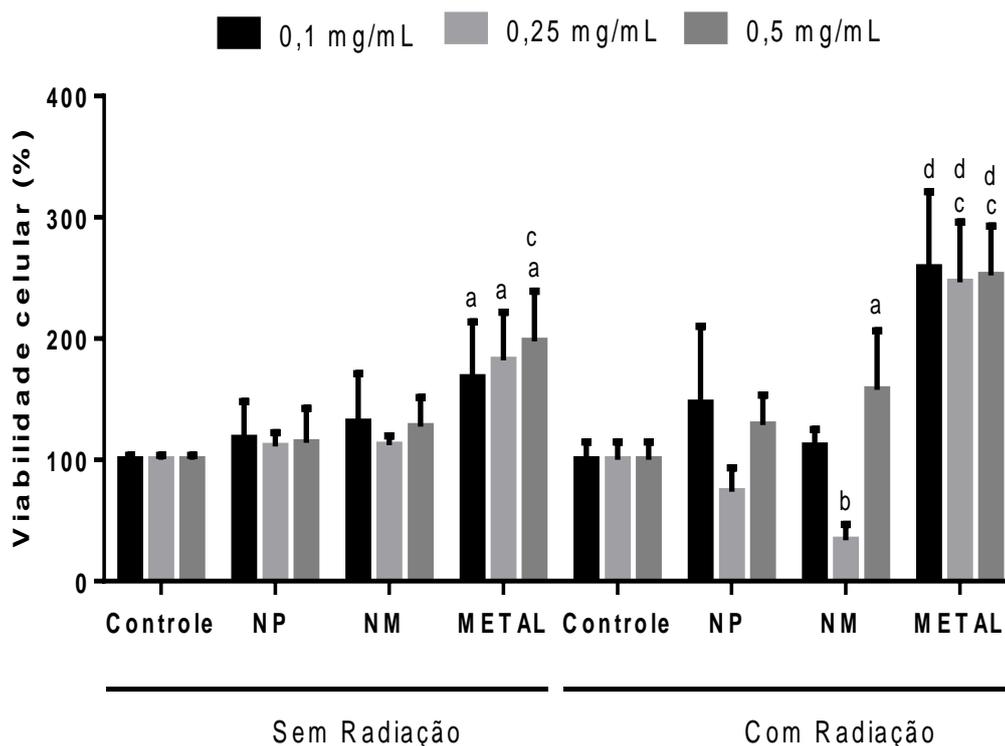


FIGURA 42: Avaliação da atividade citotóxica da NP, NM e Metal em células melanoma murino B16F10 após 24h de exposição nas concentrações de 0,1- 0,25 e 0,5mg/ml, com exposição de 10 minutos no tratamento no tratamento de com radiação e sem radiação. As letras a, b, c e d são $< 0,05$.

Para os resultados de HELA, observou-se que no tratamento do escuro ocorreu um aumento significativo estatístico na exposição da NM na menor concentração bem como do metal na concentração 0,1 mg/mL. O tratamento com LED apresentou uma diminuição significativa da NP e NM na maior concentração, entretanto entre NP e NM não ocorreu diferença significativa.

O tratamento de LED teve uma diferença de 20% entre NP e NM nas mesmas concentrações de 0,5 mg/mL, como demonstra a figura 43.

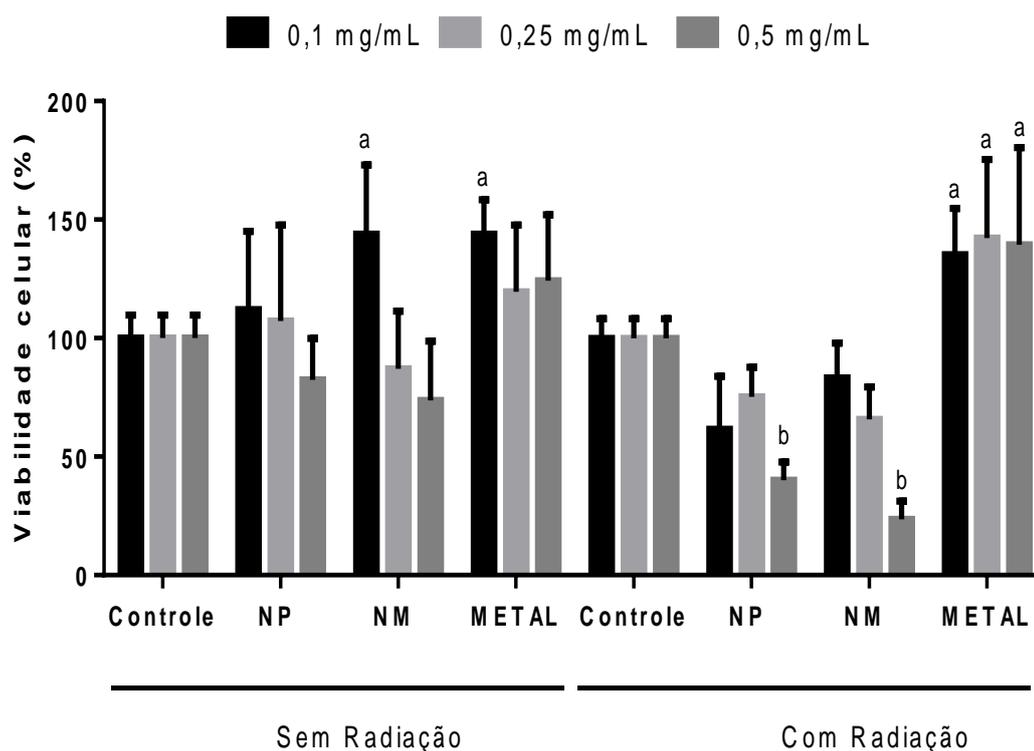


FIGURA 43: Avaliação da atividade citotóxica da NP, NM e Metal em células de carcinoma cervical humano HELA após 24h de exposição nas concentrações de 0,1-0,25 e 0,5mg/ml, com exposição de 10 minutos no tratamento no tratamento de com radiação e sem radiação. As letras a, b,c e d são $< 0,05$.

Após o tratamento do escuro a NP e a NM na concentração 0,5mg/mL apresentou uma diminuição significativa de 30% na viabilidade celular, e o metal sozinho apresentou aumento significativo nas três concentrações. Ao avaliar os resultados do tratamento com LED, foi possível identificar que a NP ocorreu uma diminuição nas concentrações 0,25 e 0,5mg/mL em torno de 15 a 45% respectivamente. Porém para a NM as três concentrações apresentaram uma diminuição significativa, onde na maior concentração foi de 50%, porém, nesta mesma concentração não houve diferença significativa estatisticamente quando comparado com a NP.

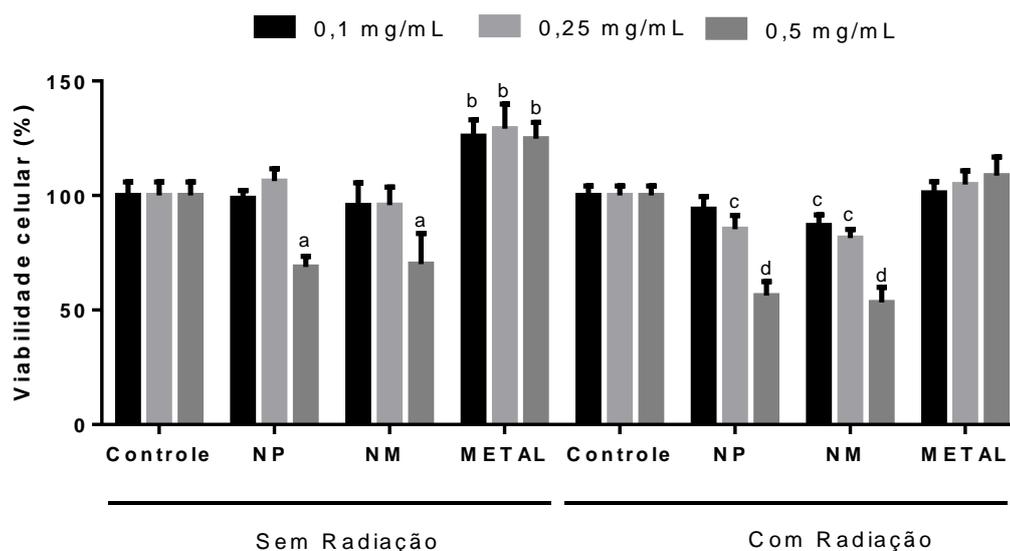


FIGURA 44: Avaliação da atividade citotóxica da NP, NM e Metal em células de fibroblasto embrionário murinas NIH/3T3 após 24h de exposição nas concentrações de 0,1- 0,25 e 0,5mg/ml, com exposição de 10 minutos no tratamento no tratamento de com radiação e sem radiação. As letras a, b, c e d são $< 0,05$.

Para esta linhagem ocorreu um aumento significativo apenas na concentração 0,1mg/mL do metal somente no tratamento com LED, comprovando assim a não toxicidade dos tratamentos para este tipo de linhagem celular.

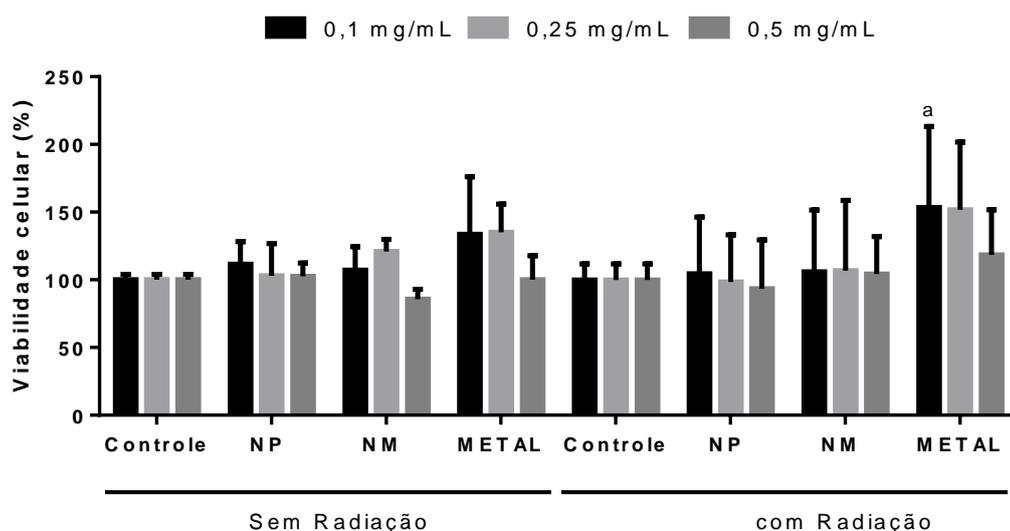


FIGURA 45: Avaliação da atividade citotóxica da NP, NM e Metal em células queratinócitos humanos HaCat após 24h de exposição nas concentrações de 0,1- 0,25 e 0,5mg/ml, com exposição de 10 minutos no tratamento no tratamento de com radiação e sem radiação. As letras a, b, c e d são $< 0,05$.

Diante deste novo quadro com os resultados, foi realizado mudanças no experimento, onde a primeira delas foi manipular as nanos com luz vermelha para que o vies da presença de luz ambiente não interfira na ativação destas. Continuou com o tempo de incorporação de 24h pois foi o que se apresentou com melhores resultados, bem como o tempo de irradiação de 10 minutos, cuja justificativa já foi citada anteriormente no corpo deste texto.

Para este tratamento com TFD utilizo as seguintes linhagens: B16F10, 4T1 luciferase, Hela, NIH3T3 e HACAT. A HACAT foi mais uma inserida neste trabalho, para ter um comparativo melhor com a linhagem de melanoma B16F10.

Iniciando a análise dos dados com as linhagens patológicas, pode-se observar que na 4T1 Luciferase o tratamento com luz ambiente a NM (nano com metal) na concentração 0,5 mg/mL apresentou diferença significativa comparando com controle e o metal aumentou a viabilidade celular para todas as concentrações.

Quando a linhagem 4T1 Luciferase foi tratada com LED nas mesmas condições de luz ambiente a NP (nano Pura) apresentou diferença significativa estatisticamente comparando com o controle, este valor é ilustrado pela letra c no gráfico e comparando com a NM (nano ligada ao metal) na maior concentração no tratamento de luz ambiente e LED.

Com isso mostra que o LED não apresentou diferença significativa para NM comparando com tratamento de luz ambiente para esta linhagem. Pode-se concluir que tanto a NM e NP não foram significativas com o tratamento do LED.

Estudos mostram que a toxicidade em escuro é considerada um problema que esta ligada a complexos metálicos que possuem centros de metal redox ativos, um deste mais citado por pesquisadores é o cobre, que apresenta uma toxicidade indesejada nas células (MAHESWARI, 2008; LOGANATHAN et al. 2012), uma reação bem conhecida é a dos tióis celulares que facilmente pode reduzir cobre (II) em cobre (I), e a geração de radicais comprometem a célula fazendo com que apresente limitações para a TFD (GOSWAMI et al. 2014). Além disso, a literatura demonstra que diante de uma estrutura ternaria obtem-se esteroides complexos de cobre (II), que são restritos para converter em (I) reduzindo a toxicidade dos complexos em escuro, mantendo fototoxicidade nas células cancerígenas e sendo fluorescente permitindo localizar complexos nas células patológicas (GOSWAMI et al. 2014).

A segunda linhagem a receber o tratamento com TFD e sem TFD foi a B16F10 que no escuro não observou atividade citotóxica da NP (Nano pura) com NM (nano com metal) quando comparada com controle, para os resultados com o tratamento do LED a NP não teve citotoxicidade assim como NM na menor e maior concentração, porém a NM na concentração de 0,25 mg/mL teve uma diminuição significativa em torno de 70%. Para os metais no escuro e LED apresentaram um aumento significativo como na linhagem de 4T1 Luciferase. Isso demonstra que o metal quando associado a nano, potencializa o efeito do LED dependendo da linhagem celular que esta sendo tratada.

Pesquisas vêm sendo desenvolvida sobre o metal cobre e suas aplicação em nanomateriais, visto que este metal é considerado toxico e no inicio de seu estudo, pesquisadores voltaram sua função mais para a atividade antibacteriana como íons ou nanopartículas (BHAISARE et al. 2017). Baseado nestes estudos e em mecanismo conhecidos como Cavalo de Troia (PARK et al. 2010) é que estas nano de cobre possui uma variedade de resposta biológica (MISRA et al. 2014), onde o oxido cuproso levam a célula tumorais a apoptose (WANG et al. 2012), e também a natureza química e a morfologia podem determinar efeitos tóxicos (CHANDA, REJ, HUANG, 2013, SAISON et al. 2010).

Podemos ainda relatar que sendo a TFD uma das técnicas bastante utilizada para o tratamento do câncer, por apresentar característica como alta eficiência e pouco menos invasiva, esta utiliza moléculas de O_2 para formar Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (SIMÕES, 2014), que levam a morte celular dos tecidos por necrose ou por apoptose celular, usando fotossensibilizadores, que, em determinados comprimentos de onda, geram espécies reativas de oxigênio (EROs) (LIN, 2014).

Dados da literatura relatam que o semiconductor orgânico g- C_3N_4 (nitreto de carbono) pode ser associado a um sistema de quebra da água movido na natureza, sob irradiação UV e luz visível (MARTIN, 2014), visto que este procedimento é semelhante ao que ocorre na fotossíntese, onde a quebra da molécula H_2O é impulsionada pela luz, gerando O_2 com alta eficiência (FERREIRA, 2004). Uma vez que este procedimento ainda não é muito utilizado para fins biomédicos de materiais que induzem a quebra da água, estudos despontam que nanopartículas de nitreto de carbono (C_3N_4) são capazes de quebrar H_2O em O_2 e de Hidrogênio (H_2), semelhante ao que ocorre na natureza, com processo da fotossíntese, onde a quebra da molécula

H₂O é impulsionada pela luz, gerando O₂ com alta eficiência (FERREIRA, 2004), quando este evento ocorre a nível celular, aumenta o nível de oxigênio intratumoral, que supera a hipóxia e possibilita uma maior eficiência da TFD, contudo, a técnica mostrou-se propícia na terapêutica tumoral, devido às suas características não invasivas e por apresentar alta eficiência e precisão ideal (ZHENG, 2016).

Sendo as nanopartículas de Nitreto de Carbono (g-C₃N₄) capaz de quebrar moléculas de água (H₂O), isso faz com que a TFD seja mais eficiente em tumores que sofrem de hipóxia, pois elas conseguem aumentar os níveis de O₂ intracelulares. Além de quebrar H₂O, o C₃N₄ também consegue diferenciar células cancerígenas de células normais (MICHALET et al, 2005), emitindo fluorescência nas células tumorais, baseado em experimentos desenvolvidos, percebeu-se que associação dos C₃N₄ à TFD tem especial especificidade, pois não afeta os tecidos vizinhos, apenas o tecido tumoral, isso ocorre por causa da fotossensibilização a qual os tecidos neoplásicos são submetidos (ZHENG, 2016).

Baseado em relatos científicos na literatura, reportando que quando a C₃N₄ estiver associada a um metal, esta possui a capacidade de intensificar a eficiência da TFD por meio do uso de um metal-inorgânico, como o cobre, por exemplo, quando acoplado ao fotossensibilizador g-C₃N₄, que reduz os níveis intracelulares de glutathiona, aumentando a geração de EROs. O emprego de íons metálicos na medicina tem tido um grande destaque devido suas cargas positivas e suas propriedades estereoelétricas, o que os permite alterar a estrutura e função de alvos biológicos específicos (JU et al, 2016).

Ao utilizar o tratamento com as células de HELA, observou-se que no escuro ocorreu um aumento significativo estatístico na exposição da NM na menor concentração bem como do metal na concentração 0,1 mg/mL. O tratamento com LED apresentou uma diminuição significativa da NP e NM na maior concentração, entretanto entre NP e NM não ocorreu diferença significativa. O tratamento de LED teve uma diferença de 20% entre NP e NM nas mesmas concentrações de 0,5 mg/mL.

Os resultados obtidos para esta linhagem condizem com os determinado na literatura para a mesma que reporta não ter havido citotoxicidade significativa nas células tratadas com PBS, g-C₃N₄ ou Cu²⁺ + -g-C₃N₄, porém após a irradiação com luz, uma quantidade significativa de células mortas foram observadas nas células

tratado com g-C₃N₄ e Cu²⁺-g-C₃N₄ e esse resultado foi atribuído à citotoxicidade dos ROS gerados sob estas condições (JU et al, 2016).

Posto que se faz necessário realizar ensaio para células não-patológicas para que tenha uma conclusão de que não houve danos significativos nos tecidos envolta da célula patológica, para este trabalho, foi utilizada a linhagem NIH3T3 e HACAT.

Com a linhagem de NIH3T3 o tratamento do escuro a NP e a NM na concentração 0,5mg/mL apresentou uma diminuição significativa de 30% na viabilidade celular, e o metal sozinho apresentou aumento significativo nas três concentrações. Ao avaliar os resultados do tratamento com LED, foi possível identificar que a NP ocorreu uma diminuição nas concentrações 0,25 e 0,5mg/mL em torno de 15 a 45% respectivamente. Porém para a NM as três concentrações apresentaram uma diminuição significativa, onde na maior concentração foi de 50%, porém nesta mesma concentração não houve diferença significativa estatisticamente quando comparado com a NP.

Mesmo não sendo células patológicas, o NIH3T3 quando exposto ao tratamento apresentou alterações e isso esta explicito na literatura quando retrata que os efeitos da TFD têm como concludente a geração de ROS como já explicito no corpo do texto anteriormente, e esta geração quando em concentrações consideradas elevadas traz como consequência o comprometimento da estrutura de lipídios, proteínas e DNA, disfunção mitocondrial, desregulamento do balanço iônico, e lesão de integridade da membrana (WANG et al. 2015; MOURA, 2017).

A outra célula não patológica utilizada neste trabalho foi a HACAT e os resultados obtidos foram, um aumento significativo apenas na concentração 0,1mg/mL do metal somente no tratamento com LED, comprovando assim a não toxicidade dos tratamentos para este tipo de linhagem celular.

Baseado neste resultado para HACAT, dados da literatura corroboram para que esta nano seja utilizada em carcinoma de pele, visto que estudos mostram que para a área médica de dermatologia, a TFD é usada sobretudo em terapêutica de lesões malignas como queratose actínica, carcinomas de células escamosas e superficiais e metástases da pele (AYALA et al. 2008). Com isso a TFD tem aprovação regulamentada na terapêutica de câncer em muitos países, bem como uma atividade citotóxica aceitável no tratamento com determinadas bactérias, fungos, protozoários (AYALA et al. 2008) e até mesmo vírus.

6. CONCLUSÃO

Para as amostras iniciais as linhagens analisadas, tanto as patológicas quanto as não patológicas, os níveis de toxicidade detectados foram condizentes com os encontrados na literatura, inferindo com isso baixo efeito sistêmico ao organismo. Na segunda etapa do trabalho, foi apresentada a importância de o metal estar associado à partícula. O metal em questão foi utilizado para potencializar seu efeito com o uso de terapia fotodinâmica, como reportado na literatura.

Uma vez que alguns metais são considerados tóxicos, aquele que foi escolhido para uso com TFD não apresentou uma toxicidade expressiva no tratamento com as linhagens testadas, visto ser um membro importante para a formação de espécies reativas de oxigênio, que é o foco principal da TFD para que a mesma possa obter resultados satisfatórios, e os resultados obtidos com a avaliação da nano, associada ao metal, estão condizentes com a literatura.

Os ensaios realizados para determinar o tempo de incorporação, bem como o de irradiação, foram satisfatórios e estão de acordo com os descritos na literatura, facilitando, assim, a elaboração de um protocolo com todas as variáveis estudadas, visando resultados aceitáveis para tratamento com TFD.

O uso de LED (manipulado com luz vermelha) mostrou-se significativo, principalmente, quando se trata de células não patológicas pois demonstrou que não houve morte para esse tipo de célula, o que só veio a ocorrer com as linhagens patológicas aqui pesquisadas.

Com os resultados desta pesquisa, sugere-se a realização de novos estudos para que se possa ter uma avaliação mais aprofundada acerca da forma de funcionamento da partícula, a partir, por exemplo, de testes em animais com as análises histológica, bioquímica, hematológica e imunológica, uma vez que não houve toxicidade para célula Hacat, podendo direcionar esse achado para tratamento de câncer de pele. Para as demais patologias relacionadas a células de fibroblastos, mostra-se também satisfatório para tratamento com TFD. Neste último caso, é importante frisar que, até presente o momento, só foi possível concluir a parte *in vitro*.

É possível concluir, a partir dos resultados desta pesquisa, que há a indicação do desenvolvimento de um método eficiente para tratamento de câncer com TFD, com uma partícula associada a metal.

REFERÊNCIAS

ABDEL-KHALEK, Amr A. et al. Comparative toxicity of copper oxide bulk and nano particles in Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*: biochemical and oxidative stress. **The Journal of Basic & Applied Zoology**, v. 72, p. 43-57, 2015.

ACS – American College Society. What is breast câncer? 2018. Acessado em 02/02/2018. Disponível em:< www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/what-is-breast-cancer>.

AMANCIO VALENTE, Carolina et al. Conhecimento de mulheres sobre o exame de Papanicolaou. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 43, n. 2, 2009.

AMORIM, Monica Oliveira Rocha et al. Fucan-coated silver nanoparticles synthesized by a green method induce human renal adenocarcinoma cell death. **International journal of biological macromolecules**, v. 93, p. 57-65, 2016.

APALLA, Z. et al. Skin Cancer: Epidemiology, Disease Burden, Pathophysiology, Diagnosis, and Therapeutic Approaches. **Dermatology and Therapy**, v. 7, n. S1, p. 5–19, 1 jan. 2017.

ATWATAER, Harry A.; POLMAN, Albert. Plasmonics for improved photovoltaic devices. *Nature materials*, v9, n.3, p.205,2010.

ÁVALOS FÚNEZ, Alicia et al. In vitro evaluation of silver nanoparticles on human tumoral and normal cells. **Toxicology mechanisms and methods**, v. 23, n. 3, p. 153-160, 2013.

AYALA, Fabrizio et al. 5-Aminolaevulinic acid and photodynamic therapy reduce HSV-1 replication in HaCat cells through an apoptosis-independent mechanism. **Photodermatology, photoimmunology & photomedicine**, v. 24, n. 5, p. 237-243, 2008.

BADR, Gamal et al. Walterinnesia aegyptia venom combined with silica nanoparticles enhances the functioning of normal lymphocytes through PI3K/AKT, NFκB and ERK signaling. **Lipids in health and disease**, v. 11, n. 1, p. 27, 2012.

BAKER, Sheila N.; BAKER, Gary A. Luminescent carbon nanodots: emergent nanolights. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 38, p. 6726-6744, 2010.

BARRETO, José A. et al. Nanomaterials: applications in cancer imaging and therapy. **Advanced Materials**, v. 23, n. 12, 2011.

BEACK, Songeun et al. Photodynamic therapy of melanoma skin cancer using carbon dot-chlorin e6-hyaluronate conjugate. **Acta biomaterialia**, v. 26, p. 295-305, 2015.

BHAISARE, Mukesh Lavkush et al. Shape-oriented photodynamic therapy of cuprous oxide (Cu₂O) nanocrystals for cancer treatment. **RSC Advances**, v. 7, n. 38, p. 23607-23614, 2017.

BING, Wei et al. Visible-light-driven enhanced antibacterial and biofilm elimination activity of graphitic carbon nitride by embedded Ag nanoparticles. **Nano Research**, v. 8, n. 5, p. 1648-1658, 2015.

BLANCO, Elvin et al. Nanomedicine in cancer therapy: innovative trends and prospects. **Cancer science**, v. 102, n. 7, p. 1247-1252, 2011.

BRUCE, A. et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4 ed. Garland Science, 2002.

BULTE, Jeff WM; KRAITCHMAN, Dara L. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. **NMR in Biomedicine**, v. 17, n. 7, p. 484-499, 2004.

CANCINO, Juliana; MARANGONI, Valéria S.; ZUCOLOTTO, Valtencir. Nanotechnology in medicine: concepts and concerns. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 521-526, 2014.

CAO, Shaowen et al. Trace-level phosphorus and sodium co-doping of gC 3 N 4 for enhanced photocatalytic H 2 production. **Journal of Power Sources**, v. 351, p. 151-159, 2017.

CHANDA, Kaushik; REJ, Sourav; HUANG, Michael H. Investigation of facet effects on the catalytic activity of Cu 2 O nanocrystals for efficient regioselective synthesis of 3, 5-disubstituted isoxazoles. **Nanoscale**, v. 5, n. 24, p. 12494-12501, 2013.

CHAUDHRY, Qasim; CASTLE, Laurence. Food applications of nanotechnologies: an overview of opportunities and challenges for developing countries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 11, p. 595-603, 2011.

CHAVES, Sacha Braun. Efeitos biológicos de nanopartículas magnéticas recobertas por bicamada de ácido láurico: estudos in vitro e in vivo. 2010.

CHEN, Xiaoyue et al. Inflamed leukocyte-mimetic nanoparticles for molecular imaging of inflammation. **Biomaterials**, v. 32, n. 30, p. 7651-7661, 2011.

CHINEN, Alyssa B. et al. Nanoparticle probes for the detection of cancer biomarkers, cells, and tissues by fluorescence. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 19, p. 10530-10574, 2015.

CLIFFORD, Gary et al. HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. **Vaccine**, v. 24, p. S26-S34, 2006.

COUTO, Giselle Giovanna do. Nanopartículas de níquel: síntese, caracterização, propriedades e estudo de sua utilização como catalisadores na obtenção de nanotubos de carbono. 2006.

CUENCA, Alex G. et al. Emerging implications of nanotechnology on cancer diagnostics and therapeutics. **Cancer**, v. 107, n. 3, p. 459-466, 2006.

DA SILVA, Joaquim CG Esteves; GONÇALVES, Helena MR. Analytical and bioanalytical applications of carbon dots. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 8, p. 1327-1336, 2011.

DANTAS, Larisse Araújo. **Síntese verde de nanopartículas contendo prata e uma fração da Alga *Spatoglossum schröederi* composta por ácido algínico e fucana A: caracterização físico-química e avaliação da atividade antiproliferativa frente às células de melanoma (B16F10)**. 2017. Dissertação de Mestrado. Brasil.

DAVIDS, L. M.; KLEEMANN, B. The menace of melanoma: a photodynamic approach to adjunctive cancer therapy. In: **Melanoma-From Early Detection to Treatment**. InTech, 2013.

DE SOUSA Barbosa, Brenna, et al. "Histórico do desenvolvimento do cultivo de células animais. Uma Revisão." *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal* 9.2 (2015): 334-347.

DESANTIS, Carol et al. Breast cancer statistics, 2013. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 64, n. 1, p. 52-62, 2014.

DONG, Fan et al. Immobilization of polymeric g-C₃N₄ on structured ceramic foam for efficient visible light photocatalytic air purification with real indoor illumination. **Environmental science & technology**, v. 48, n. 17, p. 10345-10353, 2014.

D'ORAZIO, John et al. UV radiation and the skin. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 6, p. 12222-12248, 2013.

EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP et al. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10 801 women in 17 randomised trials. **The Lancet**, v. 378, n. 9804, p. 1707-1716, 2011.

FAN, Rui-Jun et al. Photoluminescent carbon dots directly derived from polyethylene glycol and their application for cellular imaging. **Carbon**, v. 71, p. 87-93, 2014.

FEDELI, Donatella; CARLONI, Manuel; FALCIONI, Giancarlo. Oxidative damage in trout erythrocyte in response to “in vitro” copper exposure. **Marine environmental research**, v. 69, n. 3, p. 172-177, 2010.

FENG, Liangzhu; LIU, Zhuang. Graphene in biomedicine: opportunities and challenges. **Nanomedicine**, v. 6, n. 2, p. 317-324, 2011

FENG, Lili et al. NIR-driven graphitic-phase carbon nitride nanosheets for efficient bioimaging and photodynamic therapy. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4, n. 48, p. 8000-8008, 2016.

FERREIRA, Daniela Maranhão. Estudos de sistemas nanocarreadores para o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) e seu éster derivado (8-ALA) aplicados na Eletroquimioterapia e Terapia Fotodinâmica contra o câncer de pele. Diss. Universidade de São Paulo, 2012.

FERREIRA, Kristina N. et al. Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. **Science**, v. 303, n. 5665, p. 1831-1838, 2004

FIGUEIRA, Tiago N. et al. Challenging metastatic breast cancer with the natural defensin PvD1. **Nanoscale**, v. 9, n. 43, p. 16887-16899, 2017.

FIGUEIRAS, Ana Rita Ramalho; COIMBRA, André Brito; VEIGA, Francisco José Baptista. Nanotecnologia na saúde: aplicações e perspectivas. **Boletim Informativo Geum**, v. 5, n. 2, p. 14, 2014.

FIRCZUK, Małgorzata; NOWIS, Dominika; GOŁĄB, Jakub. PDT-induced inflammatory and host responses. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 10, n. 5, p. 653-663, 2011.

FOLDBJERG, Rasmus; DANG, Duy Anh; AUTRUP, Herman. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. **Archives of toxicology**, v. 85, n. 7, p. 743-750, 2011.

FREGA A, Sopracordevole F, Scirpa P et al: The re-infection rate of high-risk HPV and the recurrence rate of vulvar intraepithelial neoplasia (VIN) usual type after surgical treatment. *Med Sci Monit*, 2011.

GHOSH, Dibyajyoti et al. Computational studies on magnetism and the optical properties of transition metal embedded graphitic carbon nitride sheets. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 2, n. 37, p. 7943-7951, 2014.

GIANIZELI, Mateus Candeia. Eficácia da Alumínio-Cloro-Ftalocianina associada a nanopartículas de magnetita na Terapia Fotodinâmica: um estudo in vitro. 2016.

GOLDIE, Sue J. et al. Cost-effectiveness of cervical-cancer screening in five developing countries. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 20, p. 2158-2168, 2005.

GOLDIE, Sue J. Health economics and cervical cancer prevention: a global perspective. **Virus research**, v. 89, n. 2, p. 301-309, 2002.

GOSWAMI, Tridib K. et al. Ferrocenyl-L-amino acid copper (II) complexes showing remarkable photo-induced anticancer activity in visible light. **Dalton Transactions**, v. 43, n. 31, p. 11988-11999, 2014.

GREEN, A. C.; OLSEN, C. M. Cutaneous squamous cell carcinoma: an epidemiological review. **British Journal of Dermatology**, p. 1–9, fev. 2017.

GUAN, Weiwei et al. Microwave-assisted polyol synthesis of carbon nitride dots from folic acid for cell imaging. **International journal of nanomedicine**, v. 9, p. 5071, 2014.

HAHN, Megan A. et al. Nanoparticles as contrast agents for in-vivo bioimaging: current status and future perspectives. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 399, n. 1, p. 3-27, 2011.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HAO, Yufeng et al. Probing Layer Number and Stacking Order of Few-Layer Graphene by Raman Spectroscopy. **small**, v. 6, n. 2, p. 195-200, 2010.

HAVRDOVA, Marketa et al. Toxicity of carbon dots—Effect of surface functionalization on the cell viability, reactive oxygen species generation and cell cycle. **Carbon**, v. 99, p. 238-248, 2016.

HAYASHI, Yasuhiko; OKUYAMA, Fumio. Neues verfahren zum nachweis von brustkrebs auf der basis der röntgen-fluoreszenz-analyse. **GMS German Medical Science**, v. 8, 2010.

HE, D. W. et al. Synthesis of carbon nitride crystals at high pressures and temperatures. **Journal of materials research**, v. 13, n. 12, p. 3458-3462, 1998.

HOLA, Katerina et al. Photoluminescence effects of graphitic core size and surface functional groups in carbon dots: COO induced red-shift emission. **Carbon**, v. 70, p. 279-286, 2014.

HONG, Guosong et al. Carbon nanomaterials for biological imaging and nanomedicinal therapy. **Chemical reviews**, v. 115, n. 19, p. 10816-10906, 2015.

HORST, Frederico Hillesheim. Toxicidade in vitro e in vivo de quantum dots de carbono recobertos com boronato. 2016.

HUANG, Can; NOTTEN, Ad; RASTERS, Nico. Nanoscience and technology publications and patents: a review of social science studies and search strategies. **The Journal of Technology Transfer**, v. 36, n. 2, p. 145-172, 2011

HUANG, Xinglu et al. Effect of injection routes on the biodistribution, clearance, and tumor uptake of carbon dots. **ACS nano**, v. 7, n. 7, p. 5684-5693, 2013.

IARC(International Agency for Research on Cancer). **All Cancers (excluding non melanoma skin câncer) Estimated Incidence Mortality and Prevalence Worldwide in 2012**. France 2018. Disponível em: < http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>. Acesso em 02 de março 2018.

INCA- Instituto Nacional de Câncer; Ministério da Saúde. Diretrizes para a detecção precoce do Câncer de mama no Brasil. Rio de Janeiro (Brasil): INCA, 2015.

INCA. Síntese de resultados e comentários. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/tabelaestados.asp?UF=BR>>. Acesso em 18 junho 2017.

INCAa (Instituto Nacional Câncer do Brasil). **O que é o câncer?** Rio de janeiro, 2018. Disponível em: < http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em 08 de março 2018.

INCAb (Instituto Nacional Câncer do Brasil). **INCA estima cerca de 600 mil casos novos de câncer para 2018**. Rio de janeiro, 2018. Disponível em: < <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2018/inca-estima-cerca-600-mil-casos-novos-cancer-para-2018>>. Acesso em 08 de março 2018.

INCAc (Instituto Nacional Câncer do Brasil). **Estimativa 2018- Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de janeiro, 2018. Disponível em: < <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/estimativa-2018.pdf>>. Acesso em 08 de março 2018.

JEMAL A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E and Forman D: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 61:69–90. 2011.

JEONG, Su-Yeong et al. Co-culture of tumor spheroids and fibroblasts in a collagen matrix-incorporated microfluidic chip mimics reciprocal activation in solid tumor microenvironment. ***PloS one***, v. 11, n. 7, p. e0159013, 2016.

JHAPPAN, Chamelli; NOONAN, Frances P.; MERLINO, Glenn. Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. ***Oncogene***, v. 22, n. 20, p. 3099, 2003.

JIANG, F. et al. Photodynamic therapy with photofrin in combination with Buthionine Sulfoximine (BSO) of human glioma in the nude rat. ***Lasers in medical science***, v. 18, n. 3, p. 128-133, 2003.

JIN, Xiaozhe et al. pH-sensitive carbon dots for the visualization of regulation of intracellular pH inside living pathogenic fungal cells. ***Carbon***, v. 81, p. 388-395, 2015.

JU, Enguo et al. Copper (II)–Graphitic Carbon Nitride Triggered Synergy: Improved ROS Generation and Reduced Glutathione Levels for Enhanced Photodynamic Therapy. ***Angewandte Chemie***, v. 128, n. 38, p. 11639-11643, 2016.

KAMANGAR, Farin; DORES, Graça M.; ANDERSON, William F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. ***Journal of clinical oncology***, v. 24, n. 14, p. 2137-2150, 2006.

KARKARE, Manasi. ***Nanotechnology: Fundamentals and Applications***. IK International Pvt Ltd, 2008.

KITAMURA, T.; Qian, B.; Pollard, J. Immune cell promotion of metastasis. *Nat Rev Immunol*, v. 15, n. 2, p. 73-86, 2015.

KOCH, Susan E.; LANGE, Julie R. Amelanotic melanoma: the great masquerader. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 42, n. 5, p. 731-734, 2000.

KODAMA J, Seki N, Masahiro S, et al: Prognostic factors in stage IB–IIB cervical adenocarcinoma patients treated with radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy. *J Surg Oncol.* 101:413–417. 2010.

LANGSFELD, Erika; LAIMINS, Laimonis A. Human papillomaviruses: research priorities for the next decade. **Trends in cancer**, v. 2, n. 5, p. 234-240, 2016.

LETO, Maria das Graças Pereira et al. Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 86, n. 2, p. 306-317, 2011.

LI, Dan et al. Green synthesis of gallic acid-coated silver nanoparticles with high antimicrobial activity and low cytotoxicity to normal cells. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 3, p. 357-366, 2015.

LI, Haitao et al. Carbon nanodots: synthesis, properties and applications. **Journal of materials chemistry**, v. 22, n. 46, p. 24230-24253, 2012.

LI, Nan et al. Biodistribution study of carbogenic dots in cells and in vivo for optical imaging. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 10, p. 1177, 2012.

LIM, Shi Ying; SHEN, Wei; GAO, Zhiqiang. Carbon quantum dots and their applications. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 1, p. 362-381, 2015.

LIN, L. S.; Cong, Z. X.; Li, J.; Ke, K. M.; Guo, S. S.; Yang, H. H.; Chen, G. N. Graphitic-phase C₃N₄nanosheets as efficient photosensitizers and pH-responsive drug nanocarriers for cancer imaging and therapy. *J. Mater.Chem. B.*, 2, 1031-1037, 2014

LIN, Li-Sen et al. Graphitic-phase C₃N₄ nanosheets as efficient photosensitizers and pH-responsive drug nanocarriers for cancer imaging and therapy. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 8, p.1031-1037, 2014.

LIU, Jian; WANG, Hongqiang; ANTONIETTI, Markus. Graphitic carbon nitride “reloaded”: emerging applications beyond (photo) catalysis. **Chemical Society Reviews**, v. 45, n. 8, p. 2308-2326, 2016.

LIU, Xin; SUN, Jiao. Endothelial cells dysfunction induced by silica nanoparticles through oxidative stress via JNK/P53 and NF- κ B pathways. **Biomaterials**, v. 31, n. 32, p. 8198-8209, 2010.

LIU, Zhuang et al. Carbon materials for drug delivery & cancer therapy. **Materials today**, v. 14, n. 7, p. 316-323, 2011.

LIU, Zhuang; YANG, Kai; LEE, Shuit-Tong. Single-walled carbon nanotubes in biomedical imaging. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 3, p. 586-598, 2011.

LOGANATHAN, Rangasamy et al. Mixed ligand copper (II) complexes of N, N-bis (benzimidazol-2-ylmethyl) amine (BBA) with diimine co-ligands: efficient chemical nuclease and protease activities and cytotoxicity. **Inorganic chemistry**, v. 51, n. 10, p. 5512-5532, 2012.

LOTSCH, Bettina V. et al. Unmasking Melon by a Complementary Approach Employing Electron Diffraction, Solid-State NMR Spectroscopy, and Theoretical Calculations—Structural Characterization of a Carbon Nitride Polymer. **Chemistry a European Journal**, v. 13, n. 17, p. 4969-4980, 2007.

LOTSCH, Bettina V.; SCHNICK, Wolfgang. From triazines to heptazines: novel nonmetal tricyanomelaminates as precursors for graphitic carbon nitride materials. **Chemistry of materials**, v. 18, n. 7, p. 1891-1900, 2006.

LOWTHER, J. E. Relative stability of some possible phases of graphitic carbon nitride. **Physical Review B**, v. 59, n. 18, p. 11683, 1999.

LV, Qiang et al. Formation of crystalline carbon nitride powder by a mild solvothermal method. **Journal of Materials Chemistry**, v. 13, n. 6, p. 1241-1243, 2003.

MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, v. 5, p. 105-129, 2001

MAHESWARI, Palanisamy Uma et al. Structure, cytotoxicity, and dna-cleavage properties of the complex [CuII (pbt) Br₂]. **Inorganic chemistry**, v. 47, n. 9, p. 3719-3727, 2008.

MAHMOUDI, Morteza et al. Assessing the in vitro and in vivo toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Chemical reviews**, v. 112, n. 4, p. 2323-2338, 2011.

MANTHE, Rachel L. et al. Tumor ablation and nanotechnology. **Molecular pharmaceutics**, v. 7, n. 6, p. 1880-1898, 2010.

MARQUÉS, M. et al. Pressure effects on the structure and vibrations of β - and γ -C₃N₄. **Physical Review B**, v. 70, n. 10, p. 104114, 2004.

MARTIN, David James et al. Visible Light-Driven Pure Water Splitting by a Nature-Inspired Organic Semiconductor-Based System. **Journal Of The American Chemical Society**, v. 136, n. 36, p. 12568-12571, 2014.

MATTESINI, Maurizio; MATAR, Samir F. Density-functional theory investigation of hardness, stability, and electron-energy-loss spectra of carbon nitrides with C₁₁N₄ stoichiometry. **Physical Review B**, v. 65, n. 7, p. 075110, 2002.

MEHTA, Vaibhavkumar N. et al. Preparation of multicolor emitting carbon dots for HeLa cell imaging. **New Journal of Chemistry**, v. 38, n. 12, p. 6152-6160, 2014.

MELO, Simone Cristina Castanho Sabaini de et al. Citopathological alterations and risk factors for uterine cervical neoplasm. **Revista gaucha de enfermagem**, v. 30, n. 4, p. 602-608, 2009.

MICHALET, X., et al. "Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics." *science* 307.5709 538-544, 2005.

MICHELSON, E. S. **Globalization at the nano frontier: The future of nanotechnology policy in the United States, China, and India** *Technology in Society*, 30, 405-410, 2008.

MIRANDA, João Diogo Encarnação Bastos de. **Carbon dots: nanopartículas de carbono fluorescentes para marcação e visualização de células**. Tese de Doutorado. 2014.

MISRA, Superb K. et al. Comparative study using spheres, rods and spindle-shaped nanoplatelets on dispersion stability, dissolution and toxicity of CuO nanomaterials. **Nanotoxicology**, v. 8, n. 4, p. 422-432, 2014.

MONGE-FUENTES, Victoria. *Terapia fotodinâmica mediada por nanoemulsão à base de óleo de açaí (euterpe oleracea martius) para o tratamento de melanoma in vitro e in vivo*. 2014.

MORI-SÁNCHEZ, P. et al. Origin of the low compressibility in hard nitride spinels. **Physical Review B**, v. 68, n. 6, p. 064115, 2003.

MORSLED, Ramin A. et al. Cell-penetrating peptide-modified gold nanoparticles for the delivery of doxorubicin to brain metastatic breast cancer. **Molecular pharmaceuticals**, v. 13, n. 6, p. 1843-1854, 2016.

MOURA, Ludmilla David de. Tratamento de câncer de mama utilizando terapia fotodinâmica com nanoemulsões de Ftalocianina de cloro alumínio. 2017.

MUBEEN, Syed et al. An autonomous photosynthetic device in which all charge carriers derive from surface plasmons. **Nature nanotechnology**, v. 8, n. 4, p. 247-251, 2013.

MUEHLMANN, L. et al. Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: Development and in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 13, n. 1, 2015.

MUTHUSAMY, Viswanathan et al. Epigenetic silencing of novel tumor suppressors in malignant melanoma. **Cancer research**, v. 66, n. 23, p. 11187-11193, 2006.

NASERI, Amene et al. Graphitic carbon nitride (gC₃N₄)-based photocatalysts for solar hydrogen generation: recent advances and future development directions. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 5, n. 45, p. 23406-23433, 2017.

NAVARRO, Jose et al. Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumour growth in vivo. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 3, p. 410-418, 1999.

NIE, Hui et al. Carbon dots with continuously tunable full-color emission and their application in ratiometric pH sensing. **Chemistry of Materials**, v. 26, n. 10, p. 3104-3112, 2014.

NÚÑEZ, Cristina et al. An overview of the effective combination therapies for the treatment of breast cancer. **Biomaterials**, v. 97, p. 34-50, 2016.

OH, Youngtak et al. Divalent Fe Atom Coordination in Two-Dimensional Microporous Graphitic Carbon Nitride. **ACS applied materials & interfaces**, v. 8, n. 38, p. 25438-25443, 2016.

OMBREDANE, Alicia Simalie. Síntese verde de nanopartículas de prata a partir de extrato aquoso do tubérculo de *Curcuma longa* associadas à quitosana e avaliação da atividade antitumoral in vitro em câncer de pele não melanoma (linhagem A431). 2016.

OSHIRO ML, Bergmann A, Silva RG, Costa KC, Travaim IEB, Silva GB et al. Câncer de Mama Avançado como Evento Sentinela para Avaliação do Programa de Detecção Precoce do Câncer de Mama no Centro-Oeste do Brasil. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 60 (1): 15-23 2014.

OZCELIK, Dervis; UZUN, Hafize. Copper intoxication; antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain. **Biological trace element research**, v. 127, n. 1, p. 45-52, 2009.

PAIVA, Juliana Moreno de, Nanoestruturas de óxido de grafeno magnético: modificação e funcionalização de superfície para terapia fotodinâmica e fototérmica. 2017 76 f. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Rodrigo Fernando Costa Marques, Araraquara -São Paulo

PARK, Eun-Jung et al. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 3, p. 872-878, 2010.

PASZKO, Edyta et al. Nanodrug applications in photodynamic therapy. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 8, n. 1, p. 14-29, 2011.

PATNAIK, Sulagna; MARTHA, Satyabadi; PARIDA, K. M. An overview of the structural, textural and morphological modulations of gC 3 N 4 towards photocatalytic hydrogen production. **RSC Advances**, v. 6, n. 52, p. 46929-46951, 2016.

PATTANI, Varun P. et al. Role of apoptosis and necrosis in cell death induced by nanoparticle-mediated photothermal therapy. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 17, n. 1, p. 20, 2015.

PIEROBON, Paolo; CAPPELLO, Giovanni. Quantum dots to tail single bio-molecules inside living cells. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, n. 2, p. 167-178, 2012.

PINTO, Yoel Rodríguez. **Ecotoxicidade do cobre e possíveis biomarcadores no reservatório Guarapiranga**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2016.

POWELL ME: Modern radiotherapy and cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 2010.

POYTON, Matthew F. et al. Cu²⁺ Binds to Phosphatidylethanolamine and Increases Oxidation in Lipid Membranes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 138, n. 5, p. 1584-1590, 2016.

QIU, L. et al. A Cell-Targeted, Size-Photocontrollable, Nuclear-Uptake Nanodrug Delivery System for Drug-Resistant Cancer Therapy. *Nano Letters*, v. 15, n. 1, p. 457-463, dez. 2014.

RAJIV, S. et al. Comparative cytotoxicity and genotoxicity of cobalt (II, III) oxide, iron (III) oxide, silicon dioxide, and aluminum oxide nanoparticles on human lymphocytes in vitro. **Human & experimental toxicology**, v. 35, n. 2, p. 170-183, 2016.

RAMSDEN, Jeremy. **Nanotechnology: an introduction**. William Andrew, 2011.

RAY, S. C. et al. Fluorescent carbon nanoparticles: synthesis, characterization, and bioimaging application. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 43, p. 18546-18551, 2009.

REYES, Mario Felipe Gutiérrez et al. EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE EM UM SISTEMA ADESIVO CONVENCIONAL NAS PROPRIEDADES MICROBIOLÓGICAS, MECÂNICAS E ADESIVAS À DENTINA. 2016.

RIGNANESE, G.-M.; CHARLIER, J.-C.; GONZE, Xavier. First-principles study of vibrational and dielectric properties of C₃N₄ polymorphs. **Physical Review B**, v. 66, n. 20, p. 205416, 2002.

ROACH, Paul et al. Modern biomaterials: a review bulk properties and implications of surface modifications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n. 7, p. 1263-1277, 2007

RODRIGUEZ, Natalia M. et al. A fully integrated paperfluidic molecular diagnostic chip for the extraction, amplification, and detection of nucleic acids from clinical samples. **Lab on a Chip**, v. 16, n. 4, p. 753-763, 2016.

ROGERS L, Siu SS, Luesley D et al: Radiotherapy and chemoradiation after surgery for early cervical cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, 2012.

ROVER JÚNIOR, Laércio et al. Antioxidant system involving the glutathione metabolic cycle associated to electroanalytical methods in the oxidative stress evaluation. **Quimica Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

RUAN, Shaobo et al. A simple one-step method to prepare fluorescent carbon dots and their potential application in non-invasive glioma imaging. **Nanoscale**, v. 6, n. 17, p. 10040-10047, 2014.

RUIZ-HITZKY, E.; Aranda, P. **The Progress on the Recent Patents on Nanotechnology Contributions** *Recent Patents on Nanotechnology*, 7, 1-1, 2013.

SABELLA, Stefania et al. A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. **Nanoscale**, v. 6, n. 12, p. 7052-7061, 2014.

SAISON, Cyril et al. Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. **Aquatic toxicology**, v. 96, n. 2, p. 109-114, 2010.

SALEH, Najla Adel et al. Cultura celular tridimensional: desenvolvimento de um modelo para avaliação da relação entre o microambiente tumoral e a ação de novos agentes antitumorais. 2017.

SAMAVAT, H.; KURZER, M. S. Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer Letters*, v. 356, n. 2, p. 231-243, abr. 2014.

SAMPAIO, Marina Carvalho. Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões à base de óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) para avaliação de efeitos biológicos em células de câncer de mama in vitro. 2017. xv, 72 f., il. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia)—Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

SANCHEZ, Florence; SOBOLEV, Konstantin. Nanotechnology in concrete a review. **Construction and Building Materials**, v. 24, n. 11, p. 2060-2071, 2010.

SANTINI, Carlo et al. Advances in copper complexes as anticancer agents. **Chemical reviews**, v. 114, n. 1, p. 815-862, 2014.

SCHROEDER, Avi et al. Treating metastatic cancer with nanotechnology. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 1, p. 39-50, 2012.

SHARMA, Gaurav et al. Iron oxide nanoparticle agglomeration influences dose rates and modulates oxidative stress-mediated dose response profiles in vitro. **Nanotoxicology**, v. 8, n. 6, p. 663-675, 2014.

SHARMA, Parvesh et al. Multimodal nanoparticulate bioimaging contrast agents. **Cancer nanotechnology: Methods and protocols**, p. 67-81, 2010.

SHEN, Chen et al. Facile access to B-doped solid-state fluorescent carbon dots toward light emitting devices and cell imaging agents. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 3, n. 26, p. 6668-6675, 2015.

SHEN, Pengfei; XIA, Yunsheng. Synthesis-modification integration: one-step fabrication of boronic acid functionalized carbon dots for fluorescent blood sugar sensing. **Analytical chemistry**, v. 86, n. 11, p. 5323-5329, 2014.

SHI, J.; Votruba, A. R.; Farokhzad, O. C.; Langer, R. **Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications** Nano Letters, 10, 3223-3230, 2010.

SHI, Qian-Qian et al. High-yield and high-solubility nitrogen-doped carbon dots: formation, fluorescence mechanism and imaging application. **RSC Advances**, v. 4, n. 4, p. 1563-1566, 2014.

SHIBU A, E. S. et al. Nanomaterials formulations for photothermal and photodynamic therapy of cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, v. 15 , p. 53-72, 2013

SILVA, Adny Henrique et al. Avaliação toxicológica de nanopartículas compostas de dióxido de titânio, superparamagnéticas de óxido de ferro e de poliuretano in vitro, in vivo, ex vivo e in silico. 2015.

SIMÕES, M. C.; SOUSA, J. J.; PAIS, A. A. Skin cancer and new treatment perspectives: a review. **Cancer letters**, v. 357, n. 1, p. 8-42, 2015.

SIMÕES, Mateus Batista. "Estudo da síntese de carbon dots via carbonização hidrotérmica e avaliação frente à biosistemas." Diss. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de química, 2014.

SPEISKY, Hernán et al. Cu (I)-Glutathione complex: A potential source of superoxide radicals generation. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 16, n. 13, p. 6568-6574, 2008.

SZABLEWSKI, Leszek. Expression of glucose transporters in cancers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1835, n. 2, p. 164-169, 2013.

TAO, Huiquan et al. In vivo NIR fluorescence imaging, biodistribution, and toxicology of photoluminescent carbon dots produced from carbon nanotubes and graphite. **Small**, v. 8, n. 2, p. 281-290, 2012.

THAKARE, Vivek S. et al. Carbon nanotubes in cancer theragnosis. **Nanomedicine**, v. 5, n. 8, p. 1277-1301, 2010.

THAKUR, Mukeshchand et al. Antibiotic conjugated fluorescent carbon dots as a theranostic agent for controlled drug release, bioimaging, and enhanced antimicrobial activity. **Journal of drug delivery**, v. 2014, 2014.

THOMAS, Arne et al. Graphitic carbon nitride materials: variation of structure and morphology and their use as metal-free catalysts. **Journal of Materials Chemistry**, v. 18, n. 41, p. 4893-4908, 2008.

TIAN, Jingqi et al. Ultrathin graphitic carbon nitride nanosheet: a highly efficient fluorosensor for rapid, ultrasensitive detection of Cu²⁺. **Analytical chemistry**, v. 85, n. 11, p. 5595-5599, 2013.

TIGINYANU, I. **A Special Issue on Nanotechnologies and Nanomaterials for Electronic, Phononic and Photonic Applications** Journal of Nanoelectronics and Optoelectronics **2012**, 7, 637-639.

TINKLE, Sally et al. Nanomedicines: addressing the scientific and regulatory gap. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1313, n. 1, p. 35-56, 2014.

TRINEI, Mirella et al. A p53-p66Shc signalling pathway controls intracellular redox status, levels of oxidation-damaged DNA and oxidative stress-induced apoptosis. **Oncogene**, v. 21, n. 24, p. 3872, 2002.

VENDITTO, Vincent J.; SZOKA, Francis C. Cancer nanomedicines: so many papers and so few drugs!. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 1, p. 80-88, 2013.

VYAS, Amber et al. Recent nanoparticulate approaches of drug delivery for skin cancer. **Trends in Applied Sciences Research**, v. 7, n. 8, p. 620, 2012.

WAGGONER SE: Cervical cancer. *Lancet*, 361(9376): 2217–25 2003.

WALLAT, Jaqueline D. et al. Fluorinated polymer–photosensitizer conjugates enable improved generation of ROS for anticancer photodynamic therapy. **Polymer Chemistry**, v. 8, n. 20, p. 3195-3202, 2017.

WANG, Andrew Z.; LANGER, Robert; FAROKHZAD, Omid C. Nanoparticle delivery of cancer drugs. **Annual review of medicine**, v. 63, p. 185-198, 2012.

WANG, Jing et al. Inhibition of human copper trafficking by a small molecule significantly attenuates cancer cell proliferation. **Nature chemistry**, v. 7, n. 12, p. 968-979, 2015.

WANG, Pei-Nan et al. Raman spectroscopy on the β -C₃N₄ structure formed by low-energy nitrogen ion implantation into a diamond surface. **Physical Review B**, v. 59, n. 20, p. 13347, 1999.

WANG, Shaomang et al. Synthesis and characterization of gC₃N₄/Ag₃VO₄ composites with significantly enhanced visible-light photocatalytic activity for triphenylmethane dye degradation. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 144, p. 885-892, 2014.

WANG, W.; MORIYAMA, Lilian Tan; BAGNATO, Vanderlei Salvador. Photodynamic therapy induced vascular damage: an overview of experimental PDT. **Laser Physics Letters**, v. 10, n. 2, p. 023001, 2012.

WANG, Weida et al. Squaraine-based colorimetric and fluorescent sensors for Cu²⁺-specific detection and fluorescence imaging in living cells. **Tetrahedron**, v. 66, n. 21, p. 3695-3701, 2010.

WANG, Xiaobing et al. Analysis of the in vivo and in vitro effects of photodynamic therapy on breast cancer by using a sensitizer, sinoporphyrin sodium. **Theranostics**, v. 5, n. 7, p. 772, 2015.

WANG, Xinchun et al. A metal-free polymeric photocatalyst for hydrogen production from water under visible light. **Nature materials**, v. 8, n. 1, p. 76-80, 2009 (a).

WANG, Xinchun et al. Polymer semiconductors for artificial photosynthesis: hydrogen evolution by mesoporous graphitic carbon nitride with visible light. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 5, p. 1680-1681, 2009 (b).

WANG, Xinchun; BLECHERT, Siegfried; ANTONIETTI, Markus. Polymeric graphitic carbon nitride for heterogeneous photocatalysis. **ACS Catalysis**, v. 2, n. 8, p. 1596-1606, 2012.

WANG, Yanli et al. Carbon dots of different composition and surface functionalization: cytotoxicity issues relevant to fluorescence cell imaging. **Experimental Biology and Medicine**, v. 236, n. 11, p. 1231-1238, 2011

WANG, Ye et al. Cuprous oxide nanoparticles selectively induce apoptosis of tumor cells. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 2641, 2012.

XU, Pengjuan et al. Nano copper induced apoptosis in podocytes via increasing oxidative stress. **Journal of hazardous materials**, v. 241, p. 279-286, 2012.

XU, You; KRAFT, Markus; XU, Rong. Metal-free carbonaceous electrocatalysts and photocatalysts for water splitting. **Chemical Society Reviews**, v. 45, n. 11, p. 3039-3052, 2016.

YANG, Kai et al. Graphene in mice: ultrahigh in vivo tumor uptake and efficient photothermal therapy. **Nano letters**, v. 10, n. 9, p. 3318-3323, 2010.

YANG, Sheng-Tao et al. Carbon dots as nontoxic and high-performance fluorescence imaging agents. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 42, p. 18110-18114, 2009.

YE, Ruquan et al. Coal as an abundant source of graphene quantum dots. **Nature communications**, v. 4, 2013.

YIGIT, Mehmet V.; MOORE, Anna; MEDAROVA, Zdravka. Magnetic nanoparticles for cancer diagnosis and therapy. **Pharmaceutical research**, v. 29, n. 5, p. 1180-1188, 2012.

YING, Hong et al. High-risk HPV nucleic acid detection kit—the careHPV test—a new detection method for screening. **Scientific reports**, v. 4, p. 4704, 2014.

ZAMBONI, William C. et al. Best practices in cancer nanotechnology: perspective from NCI nanotechnology alliance. **Clinical cancer research**, v. 18, n. 12, p. 3229-3241, 2012.

ZANCHET, D.; HALL, B. D.; UGARTE, D. Structure population in thiol-passivated gold nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 47, p. 11013-11018, 2000.

ZHANG, Jin et al. Silica nanoparticles induce start inhibition of meiosis and cell cycle arrest via down-regulating meiotic relevant factors. **Toxicology Research**, v. 5, n. 5, p. 1453-1464, 2016.

ZHANG, Wuxu; ZHANG, Zhenzhong; ZHANG, Yingge. The application of carbon nanotubes in target drug delivery systems for cancer therapies. **Nanoscale research letters**, v. 6, n. 1, p. 1-22, 2011

ZHANG, Xiaodong et al. Enhanced photoresponsive ultrathin graphitic-phase C₃N₄ nanosheets for bioimaging. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 1, p. 18-21, 2012.

ZHANG, Xiao-Long et al. Turn-on fluorescence sensor for intracellular imaging of glutathione using g-C₃N₄ nanosheet–MnO₂ sandwich nanocomposite. **Analytical chemistry**, v. 86, n. 7, p. 3426-3434, 2014.

ZHAO, Jing et al. Research progresses on the functional polypeptides in the detection and imaging of breast cancer. **Journal of Materials Chemistry B**, 2018.

ZHENG, Di-Wei et al. Carbon-Dot-Decorated Carbon Nitride Nanoparticles for Enhanced Photodynamic Therapy against Hypoxic Tumor via Water Splitting. **ACS nano**, v. 10, n. 9, p. 8715-8722, 2016.

ZHENG, Di-Wei, et al. Carbon-Dot-Decorated Carbon Nitride Nanoparticles for Enhanced Photodynamic Therapy against Hypoxic Tumor via Water Splitting. **Acs Nano**, v. 10, n. 9, p. 8715-8722, 2016

ZHOU, Wei et al. Composites of small Ag clusters confined in the channels of well-ordered mesoporous anatase TiO₂ and their excellent solar-light-driven photocatalytic performance. **Nano Research**, v. 7, n. 5, p. 731, 2014.

ZHOU, Yan et al. Antibacterial activities of gold and silver nanoparticles against Escherichia coli and bacillus Calmette-Guérin. **Journal of nanobiotechnology**, v. 10, n. 1, p. 19, 2012.