



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**Toxicidade *in vitro* e *in vivo* de *quantum dots* de carbono
recobertos com boronato**

Brasília - DF
2016

Frederico Hillesheim Horst

Toxicidade *in vitro* e *in vivo* de *quantum dots* de carbono recobertos com boronato

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Biologia Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Pereira Garcia

Brasília, 2016

Dedico este trabalho aos meus amados pais

e irmã, e aos meus queridos amigos.

Agradecimentos

A Deus, por mais uma experiência de vivência e por poder ter amigos para poder compartilhar as aventuras dessa vida.

À Universidade de Brasília e seus professores.

Ao Capes e INCT, pelo apoio financeiro.

Ao Professor Dr. Ricardo Bentes de Azevedo pela oportunidade e por todo suporte laboratorial.

A Professora Dra. Mônica Pereira Garca, por ter me aceitado nesta árdua tarefa que é fazer um mestrado.

Ao Professor Dr. Sacha Braun Chaves, por ter sempre me ajudado com ideias quando todos os projetos anteriores estavam dando errado e por ter acompanhado esse projeto de perto, sempre me ajudando quando eu solicitava.

Ao Professor Dr. Marcelo Oliveira Rodrigues por ter gentilmente cedido o material de estudo deste trabalho.

A dona Zélia, por sempre fazer todo o possível e impossível para que nosso laboratório e nossas pesquisas não parem de funcionar e por sempre cuidar de todos nós como uma grande família.

Ao Professor Dr. João Paulo Longo, agradeço pela disponibilidade de tempo para instruções e auxílios com o Lumina.

Ao meu querido amigo Mosar, por ter me ajudado a pensar em como melhorar os meus experimentos e por todos os cafés que fomos tomar para simplesmente dar uma pausa e jogar papo fora.

As minhas queridas amigas ChaPulin e Maria Luiza, por todas as risadas do dia a dia, debates e trabalhos que vocês queriam me passar.

A Ray, Luiza e Lud, muito obrigado pela ajuda de vocês para que este projeto fosse adiante e por todas as conversas.

Ao Chris, por compartilhar de todos os problemas que um projeto de mestrado pode

dar, por todas nossas conversas sobre a vida, além de toda ajuda sempre que era necessária.

Ao pessoal do laboratório, que de uma forma ou outra contribuíram para o desenvolvimento do meu conhecimento.

Aos meus pais e minha irmã. Vocês foram fundamentais para a conclusão desse projeto de mestrado. Agradeço por terem feito com que eu não desistisse por mais tenebroso que fosse o caminho que estava a minha frente. E é claro, obrigado por todo carinho e todo amor de vocês.

A todos os professores que eu tive a honra de ter aula, indo desde a creche até o ensino superior. Foi graças à vontade de vocês de passarem conhecimento e terem me ajudado a me tornar a pessoa que sou hoje que me fez chegar aqui.

Aos meus amigos de graduação, por sempre conseguirem me relaxar e me dar ideias novas quando eu não conseguia encontrar uma saída.

A minha namorada, que me acompanhou desde o início desse trabalho e sabe por tudo que eu passe. Muito obrigado mesmo Sarah, não sei até onde teria ido se não fosse pela sua compreensão, seus *insights* para o projeto, por todo amor e carinho que você tem me dado e principalmente pela sua paciência comigo.

Ao Flaveolo, Fabian e Maisinha, por todos os dias que vocês conseguiram me sequestrar dessa rotina de pós-graduando e por terem me mostrado que existem outras coisas além do mundo acadêmico.

Resumo

O melanoma é um tipo de câncer de pele que tem origem nos melanócitos. Apesar de somente 0,96% dos novos casos de câncer no Brasil para 2016 serem de melanoma, ele é extremamente agressivo, sendo que possui alto potencial metastático o que leva muitos pacientes a óbito. Uma forma de evitar essa alta mortalidade é a realização de um diagnóstico precoce. Estudos propõem a utilização de substâncias ou partículas fluorescentes para identificar focos de câncer, e entre essas partículas *carbon dots* tem apresentado um grande potencial de marcação de células cancerosas por apresentarem fluorescência. Tendo em vista essa propriedade de *carbon dots*, este estudo teve o objetivo de realizar a caracterização fotofísica e avaliar a toxicidade *in vitro* e *in vivo* de *carbon dots* recobertos com boronato (C-DotB) em camundongos com ou sem melanoma. C-DotB apresentaram absorvância na faixa do ultravioleta (abaixo de 400 nm) e quando excitadas a 360 nm apresentaram pico de emissão em 460 nm. Os testes de toxicidade *in vitro* foram realizados com as linhagens celulares NIH/3T3 (fibroblasto murino) e B16F10 (melanoma murino). Somente a exposição a 0,1 mg/mL de C-DotB ocasionou morte celular significativa de 60 e 70% de fibroblastos e melanoma, respectivamente. Nos experimentos *in vivo* foram utilizados 66 camundongos C57BL/6. Nas avaliações do peso corporal, da ração consumida e da ingestão de água por animais sem tumor e com a aplicação de C-DotB não mostraram diferenças significativas quando comparados com animais que não receberam o nanomaterial, em um período de 30 dias. Os exames hematológicos realizados após 2 e 30 dias da aplicação de C-DotB, mostraram que C-DotB causou um leve aumento na quantidade de células do sistema imune dos animais que receberam C-DotB na concentração de 0,31 mg/mL e que foram monitorados por 30 dias. Os exames bioquímicos mostraram que só ocorreu aumento significativo na fosfatase alcalina dos animais que receberam C-DotB na concentração de 0,16 mg/mL e monitorados por 30 dias, o qual pode estar relacionado com algum problema ósseo. As imagens obtidas das lâminas coradas com hematoxilina e eosina mostraram modificações em alguns órgãos, principalmente no pulmão onde é possível ver focos de fibrose e alvéolos coalescidos. No fígado foram encontrados focos de necrose e de inflamação. A única alteração encontrada no baço foi hiperplasia da polpa branca. Tanto no cérebro quanto nos rins não foram encontradas anormalidades. Nos tumores foi possível observado necrose e focos inflamatórios. Para observar a deposição de C-DotB nos tecidos analisados, as lâminas histológicas foram analisadas em microscopia de fluorescência. Contudo, não foi possível observar nenhuma fluorescência de C-DotB, provavelmente por não ter mais partícula no animal no momento da coleta do órgão (2 e 30 dias). Com base nesses dados, C-DotB pode ser utilizado na biomedicina por ser biocompatível, possuir baixa toxicidade e ser eliminado rapidamente pelo organismo.

Palavras chave: *carbon dots*, glicose, células B16F10, toxicidade, melanoma, nanobiotecnologia.

Abstract

Melanoma is a skin cancer, which has its origins in melanocytes. Even though melanoma represents only 0.96% of new cancer cases for 2016 in Brazil, it is extremely aggressive, and because it has a high metastatic potential, it leads many patients to death. One way to avoid this high mortality is achieving an early diagnosis. Studies suggest the use of substances or fluorescent particles to identify cancer foci. Within these particles, *carbon dots* have shown a great potential for targeting cancer cells because of their fluorescence. Owing to this property of carbon dots, this study has the purpose to perform photophysical characterization, evaluate *in vitro* toxicity and biodistribution of *carbon dots* covered with boronate (C-DotB) in mice with or without melanoma. C-DotB has absorbance in the ultraviolet range (above 400 nm) and emission at 460 nm when excited at 360 nm. *In vitro* toxicity assays were done with cell lines NIH/3T3 (murine fibroblast) and B16F10 (murine melanoma). Only exposure of 0.1 mg/mL of C-DotB resulted in significant cell death of 40 and 30% of fibroblast and melanoma. For *in vivo* experiments, it was used 66 female mice C57BL/6. Body weight, food and water intake evaluations by tumor-free mice and those that have been applied C-DotB, did not show significant differences with mice that did not receive nanomaterial by a period of 30 days. Hematologic exams show that C-DotB induce a slight increase in white blood cells for animals that received C-DotB (0.31 mg/mL) and monitored for 30 days. Biochemistry assays show a slight increase only in alkaline phosphatase of animals that received C-DotB (0.16 mg/mL) and monitored for 30 days, which can be correlated with bone disturbance. Images obtained from histological slices stained by hematoxylin and eosin show alterations in some organs, mainly in lungs where it is possible to see fibrosis foci and coalesced alveoli. Inflammatory and necrosis foci could be found at liver. The only alteration found in spleen was white pulp hyperplasia. There were no abnormalities in both brain and kidney. Necrosis and inflammatory foci were found at tumor slices. To confirm C-DotB deposition at the analyzed tissues, histological slices were analyzed by fluorescence microscopy. However, it was not possible to observe C-DotB fluorescence, probably because there were no more particles in the animals at the time of organ collection (2 and 30 days). Based on this data, C-DotB can be used in biomedicine to be biocompatible, have low toxicity and be cleared rapidly by the body.

Keywords: *carbon dots*, glucose, B16F10 cells, toxicity, melanoma, nanobiotechnology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016, por sexo, exceto câncer de pele não melanoma. **2**
- Figura 2.** Delineamento experimental dos grupos C-DotB/h e C-DotB/l 2 dias, C-DotB/h e C-DotB/l 30 dias e controle **17**
- Figura 3.** Delineamento experimental dos grupos C-DotB/h e C-DotB/l tumor-4d, C-DotB/h e C-DotB/l tumor-8d e C-DotB/h e C-DotB/l tumor-14d **19**
- Figura 4.** Espectros absorvância e emissão de fluorescência (excitação em 360 e 420 nm) de C-DotB após a sua preparação. **25**
- Figura 5.** Viabilidade de fibroblastos murino-NIH/3T3 e células de melanoma murino-B16F10 após 24 horas de exposição a três concentrações de C-DotB: 0,01; 0,05 e 0,01 mg/mL avaliada pelo método MTT. **27**
- Figura 6.** Análise do índice celular de fibroblastos murino-NIH/3T3 e células de melanoma murino-B16F10 ao longo de 168 horas de exposição a três concentrações de C-DotB: 0,01; 0,05 e 0,01 mg/mL avaliado pelo software RTCA. **29**
- Figura 7.** Variação do peso corporal (A), consumo de ração (B) e ingestão de água (C) por camundongos C57BL/6 após terem recebido a injeção de C-DotB na concentração de 0,16 mg/mL ou 0,31 mg/mL ou não (controle) ao longo de 30 dias após a injeção do nanomaterial. **31**
- Figura 8.** Hemograma de camundongos C57BL/6 após dois e 30 dias da aplicação endovenosa de C-DotB nas concentrações 0,16 e 0,31 mg/mL. **34**
- Figura 9.** Linfograma de camundongos C57BL/6 após dois e 30 dias da aplicação endovenosa de C-DotB nas concentrações 0,16 e 0,31 mg/mL. **35**
- Figura 10.** Níveis séricos de ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase) em camundongos C57BL/6 após dois e 30 dias da aplicação endovenosa de C-DotB nas concentrações 0,16 e 0,31 mg/mL. **37**
- Figura 11.** Níveis séricos de creatinina e LDH (desidrogenase láctica) em camundongos C57BL/6 após dois e 30 dias da aplicação endovenosa de C-DotB nas concentrações 0,16 e 0,31 mg/mL. **38**
- Figura 12.** Níveis séricos de fosfatase alcalina e ureia em camundongos C57BL/6 após dois e 30 dias da aplicação endovenosa de C-DotB nas concentrações 0,16 e 0,31 mg/mL. **39**
- Figura 13.** Fotomicrografias de cérebro de camundongos C57BL6 do grupo controle, do grupo C-DotB/h 2 dias, do grupo C-DotB/l tumor-8d. **43**
- Figura 14.** Fotomicrografias de fígado de camundongos C57BL/6 do grupo controle, do grupo C-DotB/l 2 dias, do grupo C-DotB/l tumor-14d. **44**

- Figura 15.** Fotomicrografias de pulmão do grupo controle (A), do grupo C-DotB/l 30 dias (B), do grupo C-DotB/h tumor-14d (C). **45**
- Figura 16.** Fotomicrografias de fluorescência de cérebro, pulmão, fígado, baço e rim de animais do grupo C-DotB/h 2 dias e do grupo controle, onde a fluorescência observada nas imagens é autofluorescência dos tecidos. **47**
- Figura 17.** Fotomicrografia fluorescente de cérebro, pulmão, fígado, baço, rim e tumor de animais do grupo C-DotB/h tumor-4d e do grupo controle (exceto tumor), onde a fluorescência observada nas imagens é autofluorescência dos tecidos. **48**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estimativas para o ano 2016 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária.	2
Tabela 2. Protocolo para coloração das lâminas com hematoxilina e eosina.	23
Tabela 3. Valor médio do volume tumoral (mm ³) obtido nos dias da aplicação de C-DotB.	41

SIGLAS E ABREVIATURAS

Sigla/Abreviatura	Significado
[]	Concentração
<	Menor
>	Maior
µm	Micrometro
µL	Microlitros
AST	Aspartato aminotransferase
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
ATCC®	American Type Culture Collection
B16F10	Melanoma murino
C-Dots	<i>Carbon dots</i>
C-DotB	<i>Carbon dots</i> recobertos com boronato
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CdS	<i>Quantum dot</i> de sulfeto de cádmio
CdSe	<i>Quantum dot</i> de seleneto de cádmio
CdTe	<i>Quantum dot</i> de telureto de cádmio
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribunucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FDA	Food and Drug Administration
G	Gravidade
HCT	Hematócrito
HGB	Hemoglobina
HGM	Hemoglobina globular média
IC ₅₀	Concentração inibitória 50%
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LDH	Desidrogenase láctica
mL	Mililitros
Mg	Miligramas
MTT	Brometo de 3(4,5 dimetiliazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio
Nm	Nanometros
NIH/3T3	Fibroblasto murino
PBS	Cloreto de sódio tamponado com fosfato
pH	Potencial de hidrogênio

PL	Porcentagem de linfócitos
PM	Porcentagem de monócitos
PN	Porcentagem de neutrófilos
PLT	Plaquetas
RTCA	<i>Real Time Cell Analyser</i>
rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro Fetal Bovino
TCB	Número total de células brancas
TCV	Número total de células vermelhas
VGM	Volume globular médio

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 Câncer	1
1.2 Nanociência e Nanotecnologia	3
1.3 Quantum Dots	4
1.4. Quantum Dots de Carbono	5
1.5. Quantum dots de carbono recobertos com boronato	6
1.6 Testes biológicos	7
2. Justificativa	9
3. Objetivos	10
4. Material e Métodos	11
4.1 Obtenção da formulação de C-DotB	11
4.2 Caracterização fotofísica de C-DotsB	11
4.3 Ensaio de toxicidade de C-DotB in vitro	12
4.3.1 Linhagens celulares	12
4.3.2 Manutenção das Linhagens Celulares em Monocamada	12
4.3.3 Determinação da viabilidade celular pelo método de MTT	13
4.3.4 Dinâmica de Proliferação Celular	14
4.4 Ensaio de toxicidade de C-DotB in vivo	15
4.4.1 Animais	15
4.4.2 Delineamentos Experimentais	15
4.4.4 Análise dos parâmetros clínicos	21
4.4.5 Indução de tumores subcutâneos	21
4.4.6 Análises hematológicas e bioquímicas	21
4.4.7 Análise da toxicidade e deposição de C-DotB por meio de microscopia de luz e de fluorescência	22
4.4.8 Coloração das Lâminas	23
4.4.9 Análise estatística	23
5. Resultados	25
5.1 Caracterização fotofísica de C-DotB	25
5.2 Ensaio de toxicidade de C-DotB em fibroblastos e células de melanoma em cultivo	27

5.2.1 Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos e de células de melanoma após a exposição a C-DotB	27
5.2.2 Perfil de proliferação de fibroblastos e de células de melanoma após a exposição a C-DotB.	29
5.3 Ensaio de toxicidade de C-DotB em camundongos	31
5.3.1 Análise dos parâmetros clínicos	66
5.3.2 Análises hematológicas	68
5.3.3 Análises bioquímicas	72
5.3.4 Avaliação da toxicidade de C-DotB, por meio de análise histopatológica em microscopia de luz	76
5.3.4.1 Análise histopatológica de órgãos de camundongos sem indução tumoral	76
5.3.4.2 Análise histopatológica de órgãos de camundongos com indução tumoral	77
5.3.5 Análise da bidistribuição de C-DotB nos órgãos por meio de microscopia de fluorescência	82
6. Discussão	85
6.1 Caracterização fotofísica de C-DotB	85
6.2 Citotoxicidade de C-DotB	86
6.3 Dinâmica de proliferação celular	87
6.4 Análise dos parâmetros clínicos	87
6.5 Análises hematológicas e bioquímicas	90
6.6 Análise dos órgãos por microscopia de luz	91
6.7 Análise dos órgãos com microscopia de fluorescência	93
7. Conclusões	94
8. Referências	96
9. Anexo 1	108

1. Introdução

1.1 Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças diferentes que apresentam em comum, entre outros fatores, o crescimento desenfreado das células, que ocorre quando os mecanismos de controle de proliferação celular não estão mais em funcionamento. Essa proliferação pode estar relacionada com fatores intrínsecos e extrínsecos ao organismo, estando os dois relacionados. Os fatores intrínsecos, que representam de 5 a 10% de todos os cânceres (USA, 2013), estão relacionados ao modo como o organismo consegue se defender dos fatores externos, assim como se já existe uma pré-disposição da pessoa desenvolver o câncer, ou seja, se existe alguma mutação danosa no DNA que possa aumentar as chances de o câncer se desenvolver, entre outros. Os fatores extrínsecos são aqueles que estão relacionados ao meio ambiente e que podem acarretar em mutações no DNA, propiciando o desenvolvimento do câncer. Por exemplo, alta exposição à luz ultravioleta do sol, tabagismo, alcoolismo, uso excessivo de medicamentos, entre outros. Outro fator que caracteriza o câncer é a habilidade das células cancerosas invadirem outros tecidos, a chamada metástase, que é um dos motivos pela alta taxa de mortalidade dessas doenças (Hanahan & Weinberg, 2011; Brasil, 2016).

Na maioria dos casos o desenvolvimento do câncer é lento em razão de que são necessárias diversas alterações no DNA das células para que se dê o início dele. Contudo, existem cânceres com desenvolvimento extremamente rápido, os chamados agressivos, sendo esses tipos os mais difíceis de serem tratados. Esse elevado desenvolvimento está relacionado com a taxa de proliferação celular. Para que as células cancerígenas consigam proliferar em grandes quantidades e em um período de tempo pequeno é necessário um grande aporte de energia. Essa energia provem da grande quantidade de moléculas de glicose que as células cancerígenas consomem (Hamanaka & Chandel, 2012). Devido a essa grande proliferação, células cancerígenas podem apresentar uma maior propensão a invadir outros tecidos, caso sejam tumores malignos, causando focos de metástase (Hanahan & Weinberg, 2011).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), são esperados 596 mil casos novos para o Brasil para o biênio 2016/2017. Dentre os diferentes tipos de

câncer, o que apresentará maior quantidade de novos casos será o de pele não melanoma (29,49%), seguidos do de próstata (10,26%) e mama feminino (9,72%) (Tabela 1) (Brasil, 2016).

Para os casos de pele não melanoma, a estimativa é de aproximadamente 420 mil novos casos. Os mais incidentes para o sexo masculino são próstata, traqueia, brônquio e pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral. Para o sexo feminino, os mais incidentes serão mama feminina, cólon e reto, colo do útero, traqueia, brônquio e pulmão e estômago (Figura 1).

Tabela 1. Estimativas para o ano de 2016 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária.

Localização Primária da Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	61.200	61,82	13.940	64,93	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	57.960	56,20	18.990	79,37
Colo do Útero	-	-	-	-	16.340	15,85	4.550	19,07
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	17,49	4.430	20,59	10.890	10,54	3.230	13,49
Cólon e Reto	16.660	16,84	5.560	25,80	17.620	17,10	6.210	25,95
Estômago	12.920	13,04	3.130	14,54	7.600	7,37	2.180	9,07
Cavidade Oral	11.140	11,27	2.780	12,95	4.350	4,21	1.230	5,04
Laringe	6.360	6,43	1.600	7,50	990	0,94	320	0,97
Bexiga	7.200	7,26	2.110	9,79	2.470	2,39	830	3,21
Esôfago	7.950	8,04	1.460	6,75	2.860	2,76	610	2,27
Ovário	-	-	-	-	6.150	5,95	2.170	8,92
Linfoma de Hodgkin	1.460	1,46	450	1,74	1.010	0,93	400	1,33
Linfoma não Hodgkin	5.210	5,27	1.550	7,15	5.030	4,88	1.670	7,02
Glândula Tireoide	1.090	1,08	350	1,27	5.870	5,70	1.800	7,46
Sistema Nervoso Central	5.440	5,50	1.290	5,86	4.830	4,68	1.250	5,20
Leucemias	5.540	5,63	1.370	6,38	4.530	4,38	1.180	4,88
Corpo do Útero	-	-	-	-	6.950	6,74	2.530	10,47
Pele Melanoma	3.000	3,03	840	3,86	2.670	2,59	740	2,96
Outras Localizações	51.850	52,38	11.890	55,45	47.840	46,36	11.820	49,33
Subtotal	214.350	216,48	52.750	245,63	205.960	199,57	61.710	257,55
Pele não Melanoma	80.850	81,66	17.370	80,90	94.910	91,98	21.910	91,65
Todas as Neoplasias	295.200	298,13	70.120	326,51	300.870	291,54	83.620	348,99

*Números arredondados para múltiplos de 10. Fonte: Brasil, 2016.

Localização primária	casos novos	%			Localização primária	casos novos	%
Próstata	61.200	28,6%	Homens	Mulheres	Mama Feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do Útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do Útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016, por sexo, exceto câncer de pele não melanoma. Fonte: Brasil, 2016.

Dentre os diferentes tipos de câncer destaca-se o de pele melanoma. Apesar de representar 0,96% dos novos casos de câncer, o melanoma é considerado uma das formas mais agressivas do câncer de pele, devido ao fato de ser extremamente metastático e a sua elevada taxa de mortalidade (Y. Huang et al., 2014).

O melanoma tem sua origem nos melanócitos, células epiteliais que produzem melanina, que dependendo da sua quantidade, a pessoa apresentará pele mais clara ou mais escura. Devido às alterações que possam ocorrer no DNA dos melanócitos, como mutações nos genes das moléculas p16 e CDK4 que ajudam a regular a divisão celular (American Cancer Society, 2016), é possível que sejam formadas células de melanoma. Melanomas detectados no início de sua formação tem um bom prognóstico, sendo que 80% dos casos descobertos na sua forma inicial são curados com ressecamento cirúrgico. Contudo, quando o melanoma é descoberto em estágios avançados o prognóstico não é dos melhores. Por ser um tipo de câncer extremamente agressivo, podem ser encontrados diversos focos de metástase. Esses focos são de difícil tratamento, sendo que pacientes que apresentem metástase têm taxa de sobrevivência de 5% (Gray-Schopfer, Wellbrock, & Marais, 2007).

Devido ao prognóstico ruim dos pacientes que apresentam melanoma em estágios mais avançados e de difícil tratamento, uma possibilidade para se evitar esse prognóstico é a detecção antecipada do câncer. Uma forma para se detectar melanomas em estágios iniciais é a utilização de fármacos ou partículas que possam se direcionar ao tumor, mesmo que em estágios iniciais, e lá se acumulem de modo a gerar um sinal de calor ou luminescência que pode ser detectado por equipamentos especiais. Assim, o diagnóstico precoce permite um início do tratamento ainda nos primeiros estágios da doença. A nanotecnologia desponta como uma das possibilidades a ser usada para a localização de câncer (Chinen et al., 2015).

1.2 Nanociência e Nanotecnologia

A nanociência estuda materiais que apresentam propriedades especiais dependentes de tamanho na escala nanométrica quando comparadas com materiais na escala macroscópicas, como alterações em seus comportamentos elétrico, óptico e catalítico (Eustis & el-Sayed, 2006). Por exemplo, ouro macroscópico apresenta

coloração dourada, já nanopartículas de ouro de diferentes colorações podem ser obtidas dependendo do seu tamanho e forma (Alkilany & Murphy, 2010). Estas alterações podem ser explicadas pelas interações mais fortes na escala macroscópica e na escala nanoscópica, pois na escala macroscópica as interações mais fortes são a gravidade, pontes de hidrogênio e forças eletrostáticas, na escala nanoscópica uma das interações mais fortes é a de Van der Waals.

A nanotecnologia é a aplicação da nanociência de forma técnica, prática e, preferencialmente, que apresente viabilidade econômica. Existem diversas aplicações para os nanomateriais, abrangendo áreas como engenharias, física, química, nutrição, medicina, biologia, entre outras. Dentre os componentes da nanotecnologia que vêm sendo mais estudados estão as nanopartículas, que são consideradas uma classe de nanomateriais que possuem pelo menos uma de suas dimensões na nanoescala, tipicamente, mas não exclusivamente, até 100 nm (Buzea, Pacheco, & Robbie, 2007; ISO TC 299), podendo ter outras dimensões na escala macrométrica, como os nanotubos de carbono (Paredes & Burghard, 2004). A produção de nanopartículas pode ser dada de forma espontânea na natureza, como nanopartículas de carbono negro, geradas a partir da vegetação e da combustão incompleta de combustíveis fósseis (Nowack & Bucheli, 2007), ou podem ser geradas de forma intencional. Dentre as nanopartículas geradas de forma intencional podemos citar, entre outras, os *quantum dots*.

1.3 Quantum Dots

Quantum dots, ou pontos quânticos, têm sido utilizados desde a década de 1980 sendo que um dos trabalhos pioneiros foi o de Rossetti e colaboradores (1983), no qual eles produziram *quantum dots* coloidais de cádmio.

Dentre as propriedades dos *quantum dots* está a sua capacidade de emitir fluorescência, devido ao chamado efeito do confinamento quântico. Esse efeito consiste na diminuição dos níveis de energia de determinado material a valores bem discretos resultantes da redução do tamanho de cristais para poucos nanômetros (Geszke-Moritz & Moritz, 2013).

A fluorescência emitida pelos *quantum* pode ir desde a faixa do ultravioleta até o infravermelho próximo, além de apresentarem notável fotoestabilidade (Tortiglione et al., 2007). Essa variação de fluorescência pode ser explicada pela sua

composição química ou pelo ajuste de seu diâmetro. *Quantum dots* de calcogênios de cádmio como CdS (sulfeto de cádmio) e CdSe (seleneto de cádmio) emitem fluorescência na faixa da luz visível, enquanto CdTe (telureto de cádmio) emite no ultravioleta (Hild, Breunig, & Goepferich, 2008).

As propriedades ópticas, magnéticas, eletrônicas e biológicas dos *quantum dots* permitem que eles possam ter aplicações em diversos campos, como visualizar a captura de certas drogas pelas células (Li et al., 2014), formação de bioimagens e ajuda no tratamento de tumores (H. Zhu et al., 2015), terapia fotodinâmica (Ge et al., 2014), atividade antibacteriana (Patil et al., 2015), entre outros.

Apesar de apresentarem diversas aplicações, *quantum dots* podem apresentar elevada toxicidade por serem constituídos de íons de metais pesados como o cádmio. *Quantum dots* de cádmio inibem o crescimento celular, modificam a expressão de genes em células, se acumulam na região perinuclear das células (Chen et al., 2012) e induzem a produção da proteína HSP70B', aumentando a citotoxicidade (Migita et al., 2014).

1.4. Quantum Dots de Carbono

Quantum dots de carbono, ou *carbon dots* (C-Dots), aparecem como uma boa alternativa dentre os *quantum dots* por apresentarem menor toxicidade e ainda emitirem fluorescência (Luo et al., 2013). Já foram desenvolvidos diversos métodos para a síntese de C-Dots desde a primeira vez que foram registrados (Xu et al., 2004).

C-Dots podem ser sintetizados por dois métodos muito utilizados para nanopartículas comuns: *top-down* e *bottom-up* (Song, Zhu, & Yang, 2014). Para o método de *top-down*, compostos como folhas de grafite, óxido de grafeno, carbono orgânico e nanotubos de carbono são reduzidos a C-Dots por meio de ablação por laser, oxidação eletroquímica, calcinação entre outros. Já o método *bottom-up* consiste na formação de C-Dots a partir de moléculas menores, como sacarídeos e ácido cítrico, por meio de desidratação e carbonização (Song et al., 2014). Existem outros processos para produção de C-Dots, como aquecimento de ácido cítrico e ureia em água por meio de micro-ondas (Stefanakis et al., 2014) ou fazendo o refluxo de uma membrana carbonizada de β -ciclodextrina em ácido nítrico (Zhu et al., 2014). Também podem ser sintetizados por meio da síntese verde, como a produção

de *carbon dots* a partir da mistura de mel e água ultrapura e aquecendo a solução à 100 °C (X. Yang et al., 2014).

C-Dots apresentam baixa toxicidade tanto para células como para animais. Fan e colaboradores (2014) demonstraram que C-Dots produzidos a partir de polietileno glicol não apresentaram citotoxicidade para a linhagem de células de câncer hepático humano (Hep G2) mesmo em concentrações de 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Da mesma forma, Thakur e colaboradores (2014) demonstraram que C-Dots recobertos com o antibiótico ciprofloxacino não apresentaram citotoxicidade para células de rim de macaco (linhagem Vero) em concentrações de até 80 mg mL^{-1} . Já Shi e colaboradores (2014) mostraram que C-Dots solúveis em água não apresentaram toxicidade para o peixe paulistinha (*Danio rerio*). Contudo, dependendo de sua cobertura, *carbon dots* podem apresentar maior ou menor toxicidade. *Carbon dots* recobertos com PEI (polietilenoimina) apresentaram maior toxicidade do que *carbon dots* recobertos com PPEI-EI (propionil etilenoimina-co-etilenoimina) em células de câncer de mama humano (MCF7) (Wang et al., 2011). Quando recobertos com PEG (polietilenoglicol), *carbon dots* apresentaram menor toxicidade do que PEG isolado em células de câncer de mama humano (MCF7) (S. T. Yang et al., 2009).

C-Dots apresentam diversas aplicações, mas a principal é a formação de bioimagens. C-Dots recobertos com o corante ZW800 foram capazes de serem capturados por tumores em animais, gerando imagens fluorescentes do local onde o tumor estava (Huang et al., 2013). C-Dots sem nenhuma cobertura foram capazes de gerar imagens fluorescentes *in vivo* e *ex vivo* de animais com gliomas (Ruan et al., 2014). C-Dots sensíveis ao pH podem ser utilizados para gerar imagens fluorescentes de fungos que infectam plantas (Jin et al., 2015).

1.5. Quantum dots de carbono recobertos com boronato

Como qualquer outra nanopartícula, C-Dots podem ser recobertos com diferentes moléculas. Uma molécula que pode ser utilizada para recobrir C-Dots é o boronato. Moléculas de boronato podem se ligar a moléculas de glicose. Shen e Xia (2014) demonstraram que C-Dots recobertos com boronato (C-DotB) podem ser utilizados como sensores para açúcar no sangue, podendo detectar indícios de diabetes *melitus*. 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.

Já se sabe que o crescimento de células cancerígenas se dá em parte pela grande quantidade de moléculas de glicose que elas absorvem, devido principalmente pelo aumento da expressão de proteínas transportadoras de glicose (Szablewski, 2013). C-Dots podem apresentar tamanhos em torno de 5 a 10 nanômetros, e por apresentarem esse pequeno tamanho, podem se direcionar com maior facilidade para células tumorais (Huang et al., 2013). Com a cobertura de boronato, C-DotB apresentam outra característica para serem mais ainda captados por células tumorais, a sua ligação a moléculas de glicose. Portanto, C-DotB podem ser direcionados espontaneamente, quando em elevadas quantidades, para células cancerígenas, e assim serem utilizados como uma eficaz ferramenta na formação de bioimagens de fluorescência da região tumoral, permitindo um diagnóstico, eventualmente, precoce da doença.

1.6 Testes biológicos

A biocompatibilidade é definida como a habilidade de um material gerar uma resposta específica no organismo com o mínimo de reações alérgicas, inflamatórias ou tóxicas. Um composto biocompatível pode participar de vias metabólicas de eliminação e gerar o mínimo de alteração homeostática possível (Williams, 1999).

Assim, a utilização de um novo fármaco, substância ou partícula na biomedicina exige a realização de testes toxicológicos com o objetivo de analisar possíveis danos que essa nova substância possa causar. *Carbon dots* recobertos com boronato não fogem a essa regra. Por serem partículas de possível interesse para a saúde humana, deve-se analisar os aspectos toxicológicos que eles possam apresentar.

Dentre os testes toxicológicos estão os ensaios realizados em linhagens celulares imortalizadas, testes *in vitro*, em que o efeito da utilização da partícula, em diferentes concentrações e/ou de exposição, é avaliado pela alteração causada na viabilidade/sobrevivência da célula. Contudo, somente testes *in vitro* não são o suficiente para dizer o quão a partícula pode ser tóxica, pois em um organismo multicelular outros fatores podem interferir na resposta, como por exemplo, o envolvimento do seu sistema imunológico. Assim, ensaios em animais experimentais, testes *in vivo*, também se fazem necessários.

Os testes *in vivo* não só servem para corroborar os resultados *in vitro*, como também podem ser aperfeiçoadas as dosagens utilizadas para a obtenção de uma melhor eficácia terapêutica (Sharifi et al., 2012). Dentre os parâmetros estudados nos testes *in vivo* para avaliação da toxicidade está a análise clínica do animal, como, por exemplo, a variação do peso corporal, do consumo de ração e da ingestão de água (Arami et al., 2015). Ensaio hematológicos e bioquímicos também são importantes parâmetros dos testes *in vivo*. Ambos são capazes de demonstrar possíveis alterações fisiológicas vitais para o bem estar do animal, como por exemplo, uma anemia causada pela diminuição de eritrócitos (Berlot & Pozzato, 2015).

Outra forma de determinar a toxicidade de partículas é por meio das técnicas de Microscopia na análise histológica, onde podemos visualizar evidências de resposta do organismo a um composto exógeno devido a presença de infiltrados de células inflamatórias, formação de processos fibróticos e alterações morfológicas evidentes, como necrose, causadas nos tecidos pelos quais as partículas passaram ou que possam ter sido afetados indiretamente pelas partículas.

2. Justificativa

Considerando os avanços na possibilidade de utilizar *quantum dots* de carbono recobertos com boronato (C-DotB) como ferramenta para a detecção de tumor por bioimagens, a determinação da toxicidade e biocompatibilidade de C-DotB no organismo tornam-se necessárias como estudo prévio para a sua segura aplicação na saúde humana. Além disso, esse trabalho visa avaliar se C-DotB poderão ser visualizados no interior de tumores, devido à alta afinidade do boronato à glicose, e à necessidade de células tumorais por glicose no desenvolvimento do câncer, confirmando a sua utilização no diagnóstico precoce de tumores como o de pele melanoma, e assim viabilizar um melhor prognóstico desta enfermidade.

3. Objetivos

A partir das condições citadas, os objetivos gerais deste estudo foram avaliar as propriedades fotofísicas (espectros de absorbância e de excitação) e a toxicidade de C-DotB *in vitro* e *in vivo*, além do seu possível direcionamento espontâneo ao tecido tumoral. Sendo assim, os seguintes objetivos específicos foram considerados:

- Avaliar a toxicidade em células de fibroblasto murino (NIH/3T3) e de melanoma murino (B16F10) submetidas à exposição de C-DotB em diferentes concentrações por 24 h;
- Avaliar a dinâmica de proliferação celular em células de fibroblasto murino (NIH/3T3) e de melanoma murino (B16F10) submetidas à exposição de C-DotB em diferentes concentrações por 168 h;
- Avaliar parâmetros clínicos de camundongos submetidos a injeção de C-DotB;
- Avaliar possível hepato e nefrotoxicidade causados pela aplicação de C-DotB em camundongos, por meio de exames hematológicos e bioquímicos;
- Analisar a toxicidade e deposição de C-DotB no cérebro, pulmão, fígado, baço, rim e tumor por meio de microscopia de luz e fluorescência.

4. Material e Métodos

4.1 Obtenção da formulação de C-DotB

Quantum dots de carbono recobertos com boronato (C-DotB) foram gentilmente cedidos e desenvolvidos pelo professor Dr. Marcelo Oliveira Rodrigues do Instituto de Química da Universidade de Brasília

Brevemente, para a produção de C-Dots, carbono orgânico foi aquecido a 120 °C, em seguida calcinado a 300 °C em mufla, por 3 h; e então realizado o refluxo do pó resultante com 250 mL de ácido nítrico (5 mol/L), por 72 h. A suspensão resultante foi filtrada e submetida a centrifugação de 6000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante contendo C-Dots foi filtrado em membrana de 0,22 µm. Por fim, a mostra foi seca a 110 °C para obtenção de C-Dots.

Para fazer a ligação com o boronato, C-Dots foram funcionalizados com aminas para o aumento das suas propriedades ópticas. Para isso, C-Dots foram submetidos a um refluxo de cloreto de tionila por duas horas. Foi retirado o excesso de cloreto de tionila e realizado outro refluxo com etilenodiamina por quatro horas. Após a retirada do excesso de etilenodiamina, o sólido foi diluído em água, centrifugado a 6000 rpm por 20 minutos e filtrado em membrana de 0,22 µm. Por fim, a mostra foi seca a 80 °C para obtenção de C-Dots funcionalizados com amina.

Depois de funcionalizadas com amina, as amostras foram ligadas covalentemente ao ácido 4-formilfenilborônico pela reação da base de Schiff. Por fim, as ligações iminas foram reduzidas com borohidreto de sódio para se obter C-DotB.

O tamanho dos C-DotB foi determinado por microscopia eletrônica de transmissão pelo grupo de pesquisa do Dr. Rodrigues, tendo valor entre 6 e 8 nm (comunicação pessoal).

Vale ressaltar que C-DotB foi diluído em soro fisiológico 0,9% e que C-DotB, assim como os demais C-Dots (Baker & Baker, 2010), são extremamente fotoestáveis.

4.2 Caracterização fotofísica de C-DotB

Como parâmetro complementar à caracterização dos C-DotB, os espectros de

absorbância e emissão de fluorescência foram obtidos por espectrometria (SpectraMax M2®, Molecular Devices, EUA). Para tanto, uma alíquota de 200 µL da amostra foram colocadas em microplacas de cultura de 96 poços e então excitadas a um comprimento de onda de 360 a 750 nm. Esta metodologia foi adaptada de NUNES (2004). Foi realizado um experimento em triplicata.

4.3 Ensaios de toxicidade de *C-DotB* in vitro

4.3.1 Linhagens celulares

Os ensaios *in vitro* foram realizados utilizando as linhagens celulares de fibroblasto murino e melanoma murino, denominadas NIH/3T3 e B16F10, respectivamente. As linhagens foram obtidas da ATCC® (American Type Culture Collection – Manassas, VA, EUA; CRL-1658 e CRL-6475, respectivamente) por meio do banco de células do Rio de Janeiro.

4.3.2 Manutenção das Linhagens Celulares em Monocamada

Neste trabalho, ambas as linhagens celulares foram preservadas em criotubos contendo 95% de soro fetal bovino - SFB (Gibco, EUA) e 5% de DMSO (Mallinckrodt Chemicals, EUA), tendo sido devidamente identificadas e armazenadas em tanque de nitrogênio líquido, em Câmara Fria no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília, até serem utilizadas.

Na manutenção de ambos os tipos celulares foi utilizado o meio de cultivo Dulbecco's modified Eagle's medium – DMEM (GIBCO, EUA), suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico PenStrep, composto por penicilina, 100U/ml, e estreptomicina, 100 µg/ml (Gibco, EUA), e tamponado com bicarbonato de sódio (NaHCO₃) (Sigma-Aldrich Co., EUA), sendo o pH 7,3-7,4, ajustado pela adição de HCl.

Para a manutenção das linhagens celulares em monocamada, alíquota dessas células, na concentração de 1×10^6 células/mL, foi retirada do tanque de nitrogênio líquido e descongelada rapidamente. Em fluxo laminar esterilizado, com álcool 70% e luz UV por 15 minutos, a alíquota foi transferida para tubo de centrifugação de 15 mL, foi adicionado 1 mL de meio DMEM e logo após foi

centrifugado a 750 g por três minutos. As células precipitadas foram resuspensas em 1 mL de meio de cultura e transferidas para garrafas de cultivo celular de 25 cm³ e então mantidas em incubadora, cuja atmosfera era de 5% de CO₂ em ar, a umidade saturada e a temperatura de 37 °C. Após 24 horas o meio de cultivo foi substituído por meio novo. O crescimento celular era periodicamente monitorado em microscópio de luz invertido a fim de identificar qualquer alteração morfológica assim como contaminação por bactéria ou fungo.

Quando uma confluência de 75-90% de células era atingida na superfície da garrafa de cultivo, uma quantidade menor de células eram transferidas para uma nova garrafa, ou seja, era contada uma nova passagem celular. Brevemente, o meio de cultivo era removido e a monocamada de células era desprendida do fundo do frasco pelo tratamento com 2 mL de solução Tripsina-EDTA (Gibco, EUA) por três minutos a 37 °C. Em seguida, eram adicionados 2 mL de meio de cultura a fim de inativar a enzima. A suspensão de células era então centrifugada a 175 g (Excelsa baby, Fanem, BRA) por dois minutos. Após a remoção do sobrenadante, as células eram resuspensa em 1 mL de meio de cultivo.

Para determinar o número de células viáveis, 20 µL da suspensão eram adicionados a 180 µL de solução de azul de tripan (0,4%, diluído em PBS). O intuito de utilizar este corante é que ele só é capaz de adentrar nas células que possuem danos na membrana plasmática, ou seja, em células não viáveis. Dessa nova solução, 10 µL eram retirados e transferidos para a câmara Neubauer. As células não coradas presentes nos quatro quadrantes laterais eram contadas e utilizando-se da fórmula abaixo, a concentração das células era definida.

$$\frac{\text{Número de células contadas}}{\text{Número de quadrantes contados}} \times \text{Fator de diluição} \times 10^4 = \text{N}^\circ \text{ de células/mL}$$

Após ter o número de células/mL, a quantidade almejada de células foi posta em uma nova garrafa de cultivo de 25 cm² com 3 mL de meio e levadas novamente à incubadora. O meio de cultivo era renovado a cada 48-72 h para manter o crescimento das células. Para os experimentos *in vitro* foram utilizadas células que se encontravam com 70 a 90% de confluência e entre a quinta e a décima passagem celular.

4.3.3 Determinação da viabilidade celular pelo método de MTT

Um dos métodos utilizados para determinar a viabilidade celular de NIH/3T3 e B16-F10 foi o método de avaliação colorimétrica de brometo 3 (4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT; Invitrogen, EUA), descrita por Mosmann (1983). A solução de MTT interage com as desidrogenases mitocondriais de células viáveis, promovendo a redução do MTT ao composto formazan, o qual possui coloração púrpura. A viabilidade celular é indicada pela quantificação da produção de cristais de formazan.

Para este trabalho foram semeadas 3×10^3 células/poço de NIH/3T3 e 1×10^4 células/poço de B16F10 em placas de poliestireno de 96 poços e mantidas por 24 horas em incubadora conforme descrito no item 4.3.2. Após esse período, o meio de cultivo foi removido e as células expostas, por 24 h, à uma solução de meio de cultivo contendo C-DotB nas concentrações de 0,01; 0,05 e 0,1 mg/mL, nas mesmas condições de incubação anterior. As células do grupo controle receberam somente meio de cultivo (DMEM). Após o período de incubação o meio de cultivo foi substituído por 150 μ L de um novo meio contendo 15 μ L de MTT (5 mg/mL) e 135 μ L de DMEM. As células com o novo meio foram incubadas a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade saturada. Após duas horas, a solução foi removida e 200 μ L de DMSO foram adicionados para a solubilização dos cristais de formazan. Para quantificar a produção de formazan e assim determinar a viabilidade celular, foi realizada a leitura de absorbância a 595 nm em espectrofotômetro. Este experimento foi realizado em três ensaios independentes, cada um em quintuplicata (n=15).

4.3.4 Dinâmica de Proliferação Celular

Outro ensaio importante para avaliar a citotoxicidade de C-DotB é verificar se a capacidade proliferativa das células é mantida ou não na presença das C-DotB utilizando-se o sistema xCELLigence™ (Roche/ACEA, EUA). Esse sistema abrange três estações integradas, um instrumento de RTCA, que é mantido dentro de uma incubadora de cultura de células e que utiliza placas com microelétrodos de ouro para monitorar a proliferação celular em tempo real, por meio da detecção automatizada do índice de biomassa celular determinado pela impedância

eletrônica. Os resultados são apresentados de acordo com o tempo em função do índice de biomassa celular (índice celular) analisado no software RTCA (Roche/ACEA, EUA) de acordo com Ke e colaboradores (2011).

Para esse ensaio, primeiramente foram colocados 50 µL de meio de cultura em placas E-Plate16 (Roche/ACEA, EUA) para obter os valores basais. Uma vez estabilizado o sistema, 1×10^3 células/poço de NIH/3T3 e 3×10^3 células/poço de B16 F10, sem tratamento algum, foram semeadas nas placas que foram mantidas por 30 minutos no fluxo laminar, para a decantação das células. Em seguida, as placas foram colocadas no equipamento de RTCA, o qual já se encontrava a 2 h na incubadora, cuja atmosfera era de 5% de CO₂ em ar, a umidade saturada e a temperatura de 37 °C.

Passadas 24 horas, a proliferação celular sem a exposição aos C-DotB foi analisada. Logo após, o sistema de detecção foi interrompido e adicionados 50 µL de meio contendo ou não C-DotB nas concentrações de 0,04; 0,2 e 0,4 mg/mL para que a concentração final fosse de 0,01; 0,05 e 0,1 mg/mL. Como controle utilizaram-se células sem tratamento e poços sem células, porém com as mesmas concentrações de C-DotB utilizadas junto às células, assim como poço contendo apenas o meio de cultura. As placas foram colocadas novamente no instrumento de RTCA. Ao longo de 168 horas, o valor de impedância na placa era mensurado a cada 30 minutos. Este experimento foi realizado em triplicata (n=3).

4.4 Ensaios de toxicidade de C-DotB in vivo

4.4.1 Animais

Camundongos C57BL/6 fêmeas foram obtidos do Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares (IPEN, São Paulo) e mantidos no biotério do Departamento de Genética e Morfologia (GEM-IB-UnB) com temperatura controlada (aproximadamente 22 °C), ciclo claro/escuro de 12 horas e ração e água *ad libitum*. Todos os protocolos experimentais com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília (CEUA-UnB) (certificado 154445/2014; Anexo 1).

4.4.2 Delineamentos Experimentais

A fim de determinar a toxicidade de C-DotB em animais experimentais, 30 camundongos C57BL/6 fêmeas com 12 semanas de vida foram utilizados (Figura 2). Doze animais receberam 100 μ L de C-DotB, por via endovenosa caudal lateral, na concentração de 0,31 mg/mL em PBS (C-DotB/h) e outros 12 animais receberam o mesmo volume de C-DotB, porém em menor concentração, 0,16 mg/mL (C-DotB/l). Seis camundongos (controle) não receberam qualquer tipo de injeção. Logo após a injeção de C-DotB, tanto na maior quanto menor concentração, metade dos animais (n=6 para cada concentração) foram monitorados até 48 horas. A outra metade (n=6 para cada concentração) teve os parâmetros clínicos de peso corporal, consumo de ração e ingestão de água, até 30 dias, avaliados conforme descrito no item 4.4.3. Os animais controle também foram monitorados quanto aos parâmetros clínicos, como descrito no item 4.4.3.

Os animais que receberam tanto a menor quanto a maior concentração de C-DotB e que foram monitorados até 48 horas, animais denominados C-DotB/l 2 dias e C-DotB/h 2 dias, respectivamente, foram eutanasiados com Provive 1% (Meizler Biopharma S/A, BRA) na concentração de 60 mg/mL logo após completarem 48 horas da injeção de C-DotB. E os animais que receberam tanto a menor quanto a maior concentração de C-DotB e que tiveram os parâmetros clínicos monitorados por 30 dias, os animais denominados C-DotB/l 30 dias e C-DotB/h 30 dias, respectivamente, assim como os animais controle foram eutanasiados também com Provive 1% na concentração de 60 mg/mL logo após completarem 30 dias da injeção de C-DotB.

Cérebro, pulmão, fígado, baço e rim, além de amostra de sangue, foram coletados de todos os animais. As amostras de órgãos foram processadas como descrito no item 4.4.6, para verificar possível toxicidade de C-DotB por análise histológica. Amostras sanguíneas foram processadas como descrito no item 4.4.5 para avaliação hematológica e bioquímica.

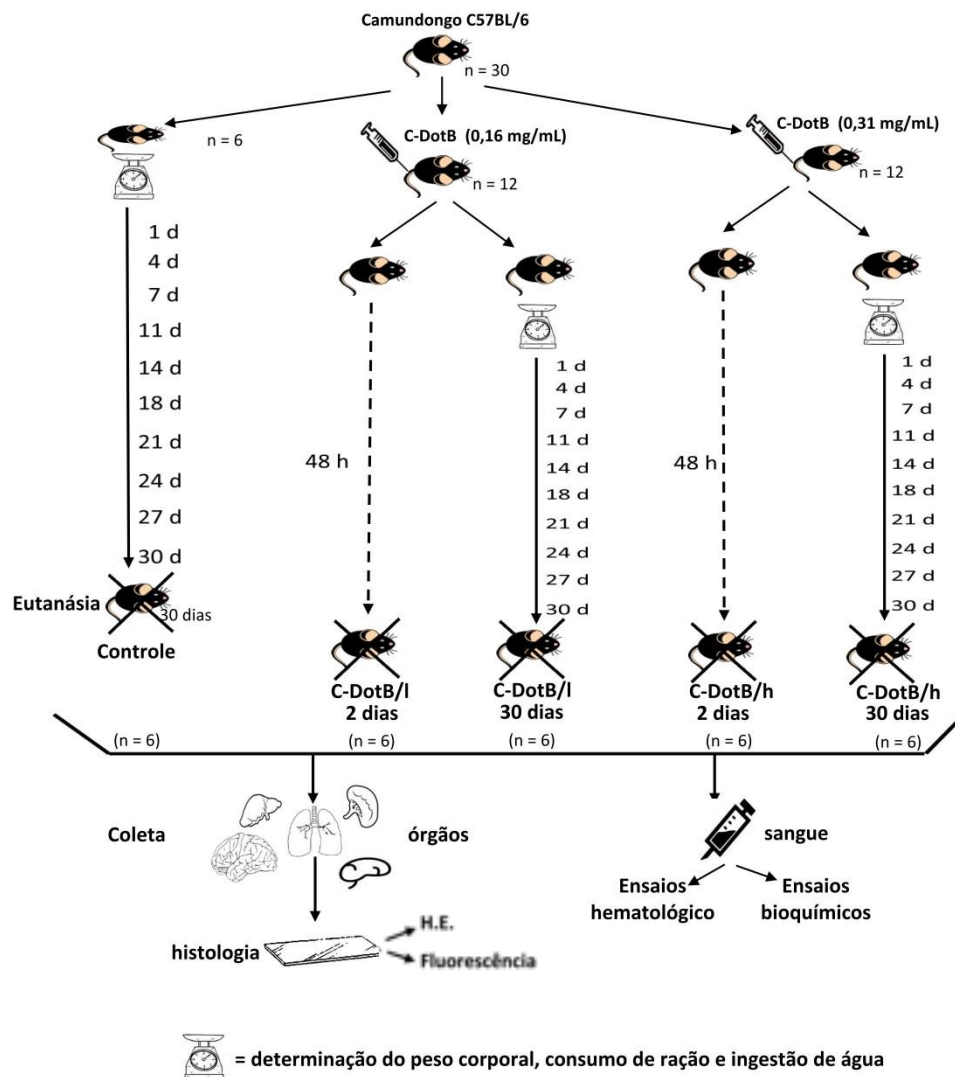


Figura 2. Delineamento experimental dos grupos C-DotB/h e C-DotB/l 2 dias, C-DotB/h e C-DotB/l 30 dias e controle. C-DotB/h e C-DotB/l 2 dias: animais que tiveram a injeção do C-DotB tanto a maior quanto a menor concentração, respectivamente, e eutanasiados após dois dias. C-DotB/h e C-DotB/l 30 dias: animais que tiveram a injeção do C-DotB tanto a maior quanto a menor concentração, respectivamente, e eutanasiados após 30 dias. Controle: animais que não receberam C-DotB.

A fim de avaliar se C-DotB causavam toxicidade em animais com melanoma e se os mesmos poderiam acumular no tumor, 36 camundongos C57BL/6 fêmeas com 12 semanas de vida foram utilizados (Figura 3).

A indução de melanoma foi realizada em todos os 36 animais como descrito no item 4.4.5. Após quatro dias da indução tumoral, seis animais receberam 100 µL de C-DotB, por via endovenosa caudal lateral, na concentração de 0,31 mg/mL em PBS (C-DotB/h) e outros seis animais receberam o mesmo volume de C-DotB, porém em menor concentração, 0,16 mg/mL (C-DotB/l). O mesmo ocorreu após oito

e catorze dias da indução. Logo após a injeção de C-DotB, tanto na maior quanto menor concentração, os animais (n=6 para cada concentração) foram monitorados até 48 horas.

Após 48 horas da injeção de C-DotB, os animais que tiveram a injeção do nanomaterial após quatro dias da indução tumoral e que receberam tanto a menor quanto a maior concentração de C-DotB, os animais denominados C-DotB/l tumor-4d e C-DotB/h tumor-4d, respectivamente, foram eutanasiados com Provive 1% na concentração de 60 mg/mL. O mesmo foi realizado com os animais que tiveram a injeção do *quantum dots* após oito dias da indução tumoral e que receberam tanto a menor quanto a maior concentração de C-DotB, os animais denominados C-DotB/l tumor-8d e C-DotB/h tumor-8d, respectivamente; assim como com os animais que tiveram a injeção da nanopartícula após 14 dias da indução tumoral e que receberam tanto a menor quanto a maior concentração de C-DotB, os animais C-DotB/l tumor-14d e C-DotB/h tumor-14d, respectivamente

Cérebro, pulmão, fígado, baço, rim e o tumor foram coletados de todos os animais. As amostras de órgãos foram processadas como descrito no item 4.4.6, por análise histológica.

Vale ressaltar que as concentrações utilizadas neste trabalho foram baseadas na literatura (Tao et al., 2012).

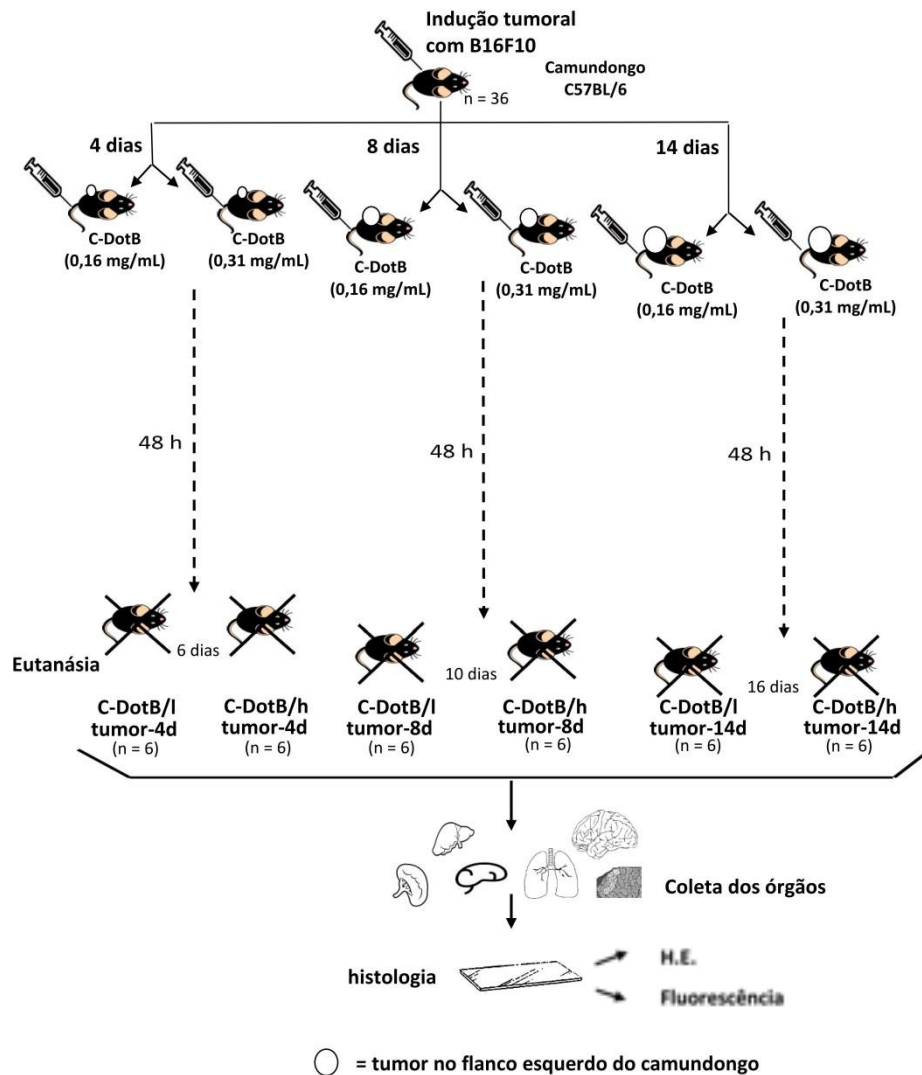


Figura 3. Delineamento experimental dos grupos C-DotB/h e C-DotB/l tumor-4d, C-DotB/h e C-DotB/l tumor-8d e C-DotB/h e C-DotB/l tumor-14d. C-DotB/h e C-DotB/l tumor-4d: animais que tiveram a injeção do C-DotB após quatro dias da indução tumoral e que receberam tanto a maior quanto a menor concentração, respectivamente. C-DotB/h e C-DotB/l tumor-8d: animais que tiveram a injeção do C-DotB após oito dias da indução tumoral e que receberam tanto a maior quanto a menor concentração, respectivamente. C-DotB/h e C-DotB/l tumor-14d: animais que tiveram a injeção do C-DotB após 14 dias da indução tumoral e que receberam tanto a maior quanto a menor concentração, respectivamente.

4.4.3 Análise dos parâmetros clínicos

Visando avaliar o efeito toxicológico de C-DotB no organismo, a variação do peso corporal, do consumo de ração e da ingestão de água pelos animais dos grupos controle e dos que receberam C-DotB nas concentrações de 0,16 e 0,31

mg/mL foram monitorados 1, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 24, 27 e 30 dias após a injeção do nanomaterial. O consumo de ração e a ingestão de água também foram avaliados um dia antes da injeção de C-DotB. O peso corporal foi determinado pela pesagem direta do animal na balança modelo AY220 (Shimadzu Philippines Manufacturing Inc., Filipinas). Nos dias determinados, a ração não consumida, incluindo pequenos fragmentos que se encontravam no interior da gaiola, era pesada e substituída por 360 g de ração nova. O consumo de ração foi determinado pela diferença entre o peso inicial (360 g) de ração e o da ração não consumida. Nos mesmos dias, o volume de água não ingerido era pesado e substituído por cerca de 800 mL de água fresca. Da mesma forma que a ração, a ingestão de água foi determinada pela diferença do peso inicial e o do volume de água não ingerido.

4.4.4 Indução de tumores subcutâneos

Para a indução do melanoma, primeiramente os animais foram submetidos à anestesia de quetamina (União Química Farmacêutica Nacional S/A., Brasil) e xilazina (Syntec do Brasil, Ltda., Brasil) (1 mg/kg e 0,1 mg/kg, respectivamente) via intraperitoneal, com um volume final de 100 µL por animal. Após a anestesia, foram transplantadas, subcutaneamente, $3,25 \times 10^5$ células B16F10 diluídas em 50 µL de meio DMEM, sem soro fetal bovino e sem antibióticos, no flanco esquerdo dos camundongos. O tumor já se torna palpável 5 a 10 dias após a indução e entre o 14º e 21º dia, o tumor atinge o volume de 1 cm³ (Overwijk e Restifo, 2001). Durante esse período os animais foram mantidos nas condições padrão do biotério e avaliados todos os dias para a visualização dos nódulos tumorais.

Nos dias de aplicação de C-DotB nos animais, foi determinado o volume tumoral *in vivo*, com auxílio de um paquímetro digital (King Tools), pela seguinte fórmula (Schuh,2004):

$$\text{Volume tumoral } in \text{ vivo: } (\text{comprimento}) \times (\text{largura})^2 \times 0,5$$

4.4.5 Análises hematológicas e bioquímicas

Com o objetivo de analisar quaisquer danos hepáticos e/ou renais provenientes da administração de C-DotB, foram coletados 1 mL de sangue dos

animais controle, C-DotB/l e C-DotB/h 2 dias, assim como C-DotB/l e C-DotB/h 30 dias, logo após a eutanásia. Estas amostras foram divididas em dois tubos Minicollect® (Greiner Bio-One, AUT) de sangue, um com anticoagulante EDTA para a realização do hemograma, e outro com gel separador para as análises bioquímicas.

Para a obtenção do hemograma, as amostras foram rapidamente levadas ao analisador hematológico veterinário Sysmex pocH-100iV Diff™ (Sysmex, JAP) e os parâmetros analisados foram: número total de células brancas (TCB), número total de células vermelhas (TCV), hematócrito (HCT), hemoglobina (HGB), volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), plaquetas (PLT), porcentagem de linfócitos (PL), monócitos (PM) e neutrófilos (PN).

Para a realização das análises bioquímicas, as amostras recém coletadas foram centrifugadas a 5000 rpm por cinco minutos e então estocadas a -20 °C, até no máximo 30 dias. Em seguida, as amostras foram analisadas no equipamento ChemWell-T (LabTest, BRA) para os seguintes parâmetros: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), creatinina, desidrogenase láctica (LDH), fosfatase alcalina e ureia. Para a análise de tais parâmetros, utilizou-se os seguintes kits (LabTest, BRA): ALT/GTP Liquiform, AST/GOT Liquiform, Creatinina K, LDH Liquiform, Fosfatase Alcalina Liquiform e Ureia UV Liquiform.

4.4.6 Análise da toxicidade por meio de microscopia de luz

A análise histológica consiste na avaliação de secções finas de determinados tecidos com o objetivo de se reconhecer possíveis alterações morfológicas nestes tecidos, tais como infiltrados inflamatórios, necrose ou fibrose, ou para reconhecer possíveis tecidos em que C-DotB possam se acumular.

Após a eutanásia dos animais, os órgãos (cérebro, pulmão, fígado, baço, rim e tumor) foram cuidadosamente coletados com material cirúrgico apropriado, lavados em solução salina 0,9% para retirada do excesso de sangue e rapidamente fixados em paraformaldeído (Sigma-Aldrich, BRA) 4% em PBS por três horas a temperatura ambiente. Em seguida as amostras passaram pelos processos de desidratação, em etanol a diferentes concentrações (70 a 100%), e diafanização, em solução 1:1 de álcool absoluto e xilol, e também em xilol puro, por 60 minutos em cada solução. As amostras foram então incluídas e emblocadas, individualmente, em

parafina (Dinâmica Química Contemporânea LTDA., BRA).

Para obtenção dos cortes com 3 µm de espessura foi utilizado um micrótomo Leica modelo RM2125RT (Leica, Alemanha). Foram realizados cortes semi-seriados a partir da região central do órgão, onde foram desprezados os dez cortes seguintes após a obtenção de uma lâmina com três cortes. No total foram confeccionadas cinco lâminas por órgão, duas lâminas foram utilizadas para a coloração de hematoxilina e eosina (H.E.), duas lâminas foram utilizadas para a microscopia de fluorescência, e uma lâmina mantida como reserva.

4.4.7 Coloração das Lâminas

Para a coloração de H.E., as lâminas selecionadas passaram por um processo de desparafinização, hidratação e desidratação como mostra a Tabela 2.

Depois do último banho de xilol, as lâminas foram recobertas com lamínulas utilizando-se verniz incolor (Acrilex, BRA) e colocadas para secar em temperatura ambiente. Os solventes utilizados (álcool e xilol) foram fabricados pela Dinâmica Química Contemporânea LTDA., Brasil.

Para a análise em microscopia de fluorescência, as lâminas selecionadas passaram por um processo de desparafinização, com um banho em solução de xilol por 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram recobertas com lamínulas utilizando-se verniz incolor (Acrilex, BRA) e colocadas para secar em temperatura ambiente. Estas lâminas e as coradas com H.E. foram analisadas e fotografadas digitalmente no microscópio AxiosKop 2 (Zeiss, EUA), com a câmera AxioCam MRc (Zeiss, EUA) e com o software ZEN 2011.

4.4.8 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pela análise de variância ANOVA one-way com o *post-hoc* de Tukey. Para a análise estatística do item 4.4.3 foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com *post-hoc* Dunn. O programa estatístico utilizado foi GraphPad InStat versão 3.00 (GraphPad software, EUA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas com $p \leq 0,05$.

Tabela 2. Protocolo para coloração das lâminas com hematoxilina e eosina.

Processo	Tempo
Xilol 1	5 minutos
Xilol 2	3 minutos
Xilol 3	2 minutos
Álcool 100% (1)	1 ½ minuto
Álcool 100% (2)	1 ½ minuto
Álcool 90%	1 ½ minuto
Álcool 80%	1 ½ minuto
Álcool 70%	1 ½ minuto
Água corrente	3 imersões
Água destilada	3 imersões
Hematoxilina	4 – 5 minutos
Água corrente	3 imersões
Água destilada	3 imersões
Diferenciação em água acidulada (4 gotas de HCl em 300 mL de água destilada)	1 imersão
Água corrente	2 imersões
Água destilada	2 imersões
Água e amônia (3 gotas de hidróxido de amônia em 350 mL de água destilada)	Imersão até o corte ficar azulado
Água corrente	2 imersões
Água destilada	2 imersões
Eosina	20 – 60 segundos
Água corrente	Até tirar o excesso
Água destilada	3 imersões
Álcool 70%	1 ½ minuto
Álcool 80%	1 ½ minuto
Álcool 90%	1 ½ minuto
Álcool 100% (1)	1 ½ minuto
Álcool 100% (2)	1 ½ minuto
Xilol 1	3 minutos
Xilol 2	2 minutos
Xilol 3	Até a montagem da lâmina

5. Resultados

5.1 Caracterização fotofísica de C-DotB

A caracterização fotofísica por espectrometria mostrou que C-DotB apresenta absorção na região do ultravioleta (abaixo de 400 nm) e de emissão de luz na região do azul (455 até 492 nm). Na Figura 4 observam-se os espectros de absorbância (Figura 4A) e os de emissão de fluorescência de C-DotB (Figura 4B e 4C). Pode ser observado o decaimento da absorbância de C-DotB de 250 nm até estabilizar em 590 nm. Na Figura 4B é possível observar o único pico de emissão de fluorescência em 460 nm (excitação em 360 nm).

Também foi obtido o espectro de emissão de C-DotB com a partícula sendo excitada em 420 nm (Figura 4C). Esse espectro foi realizado em razão do equipamento IVIS Lumina não possuir filtro de detecção de fluorescência emitida a 460 nm, somente a partir de 520 nm. Assim, para a análise da biodistribuição de C-DotB *in vivo* e *ex vivo*, foi preciso utilizar o comprimento de onda de excitação de 420 nm que promove a emissão de um único pico de fluorescência a 520 nm. Vale ressaltar que esta emissão tem uma intensidade bem menor, 1.195 u.a., do que a observada na excitação a 360 nm, que foi de 8.538 u.a.

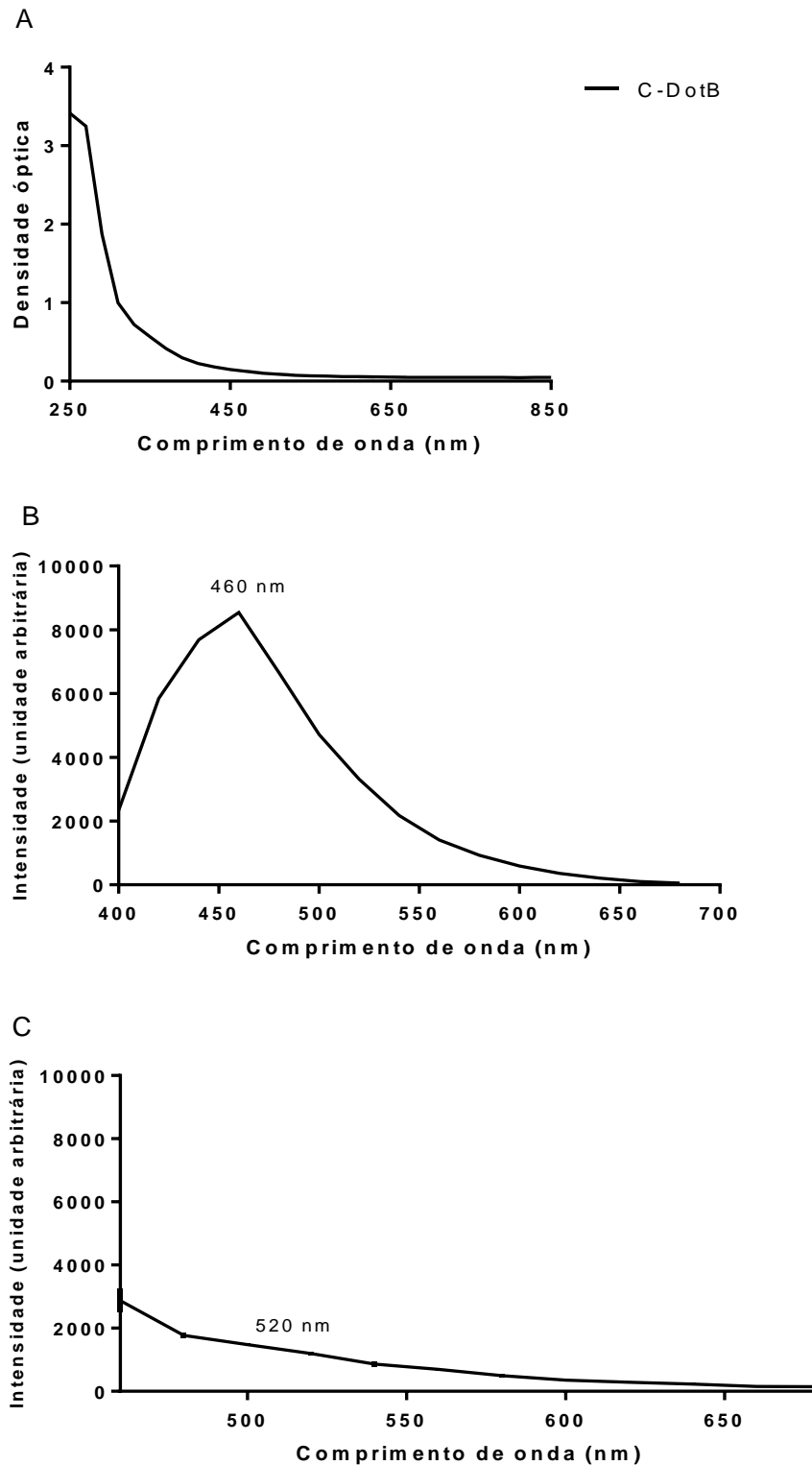


Figura 4. Espectros de absorvância e de emissão de fluorescência (excitação em 360 e 420 nm) de C-DotB após sua preparação. **A** – decaimento da absorção de C-DotB. **B** – pico de emissão de fluorescência de C-DotB a 460 nm, após excitação a 360 nm. **C** – pico de emissão de fluorescência de C-DotB a 520 nm, após excitação em 420 nm. C-DotB: pontos quânticos de carbono recobertos com boronato.

5.2 Ensaio de toxicidade de C-DotB em fibroblastos e células de melanoma em cultivo

5.2.1 Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos e de células de melanoma após a exposição a C-DotB

Na Figura 5 estão representados os resultados obtidos da viabilidade celular de fibroblastos (NIH/3T3) e células de melanoma (B16F10) após 24 horas de exposição a três concentrações de C-DotB (0,01; 0,05 e 0,1 mg/mL). A viabilidade celular foi determinada pelo método MTT e comparado com o controle, o qual não recebeu C-DotB.

A viabilidade celular de NIH/3T3 foi reduzida para 61,87% ($p < 0,001$) quando expostas a concentração de 0,1 mg/mL de C-DotB, como pode ser visualizado na Figura 5A. Contudo, essas células expostas as concentrações de 0,01 e de 0,05 mg/mL apresentaram viabilidade celular de 99,43% e 88,07%, respectivamente, não tendo apresentado diferença significativa quando comparado ao controle ($p > 0,05$). A comparação entre as viabilidades após a exposição a diferentes concentrações mostra que fibroblastos quando expostos a 0,1 mg/mL teve uma redução significativa ($p < 0,001$) em relação as exposições a 0,01 e de 0,05 mg/mL, porém já entre estas não houve diferença significativa ($p > 0,05$).

A viabilidade das células B16F10, quando expostas a concentração de 0,1 mg/mL de C-DotB, foi de 72,60% ($p < 0,01$), como mostra Figura 5B. Quando analisada as exposições às concentrações de 0,01 e 0,05 mg/mL, a viabilidade celular foi de 91,25% e 85,70%, respectivamente, sem ter apresentado diferença significativa com relação ao controle ($p > 0,05$). Ao ser feita a análise entre as exposições, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) na viabilidade quando as células permaneceram em contato com a maior concentração de C-DotB comparada com a exposição a 0,01 mg/mL, mas o mesmo não ocorre em relação a exposição a 0,05 mg/mL ou entre as exposições às menores concentrações ($p > 0,05$).

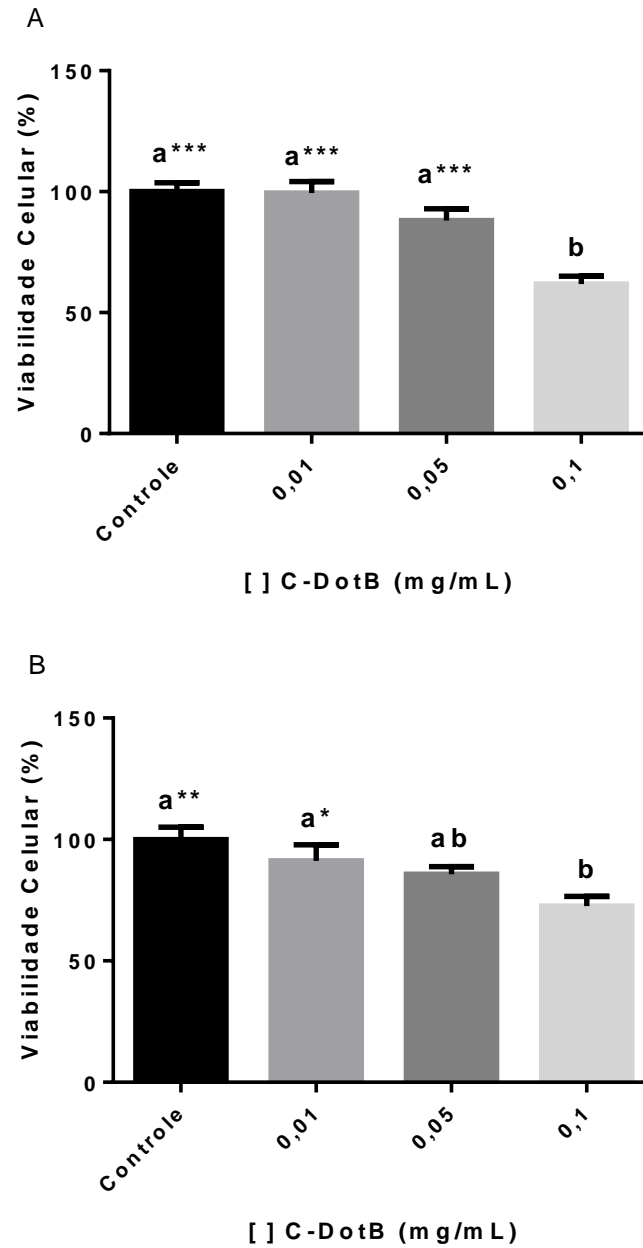


Figura 5. Viabilidade de fibroblastos murino-NIH/3T3 (**A**) e células de melanoma murino-B16F10 (**B**) após 24 horas de exposição a três concentrações de C-DotB: 0,01; 0,05 mg/mL e 0,1 mg/mL, avaliada pelo método MTT. C-DotB: *carbon dots* recobertos com boronato. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. para análise de quinze amostras. Letras diferentes representam diferença estatística significativa. * significa $p < 0,05$; ** significa $p < 0,01$; *** significa $p < 0,005$.

5.2.2 Perfil de proliferação de fibroblastos e de células de melanoma após a exposição a C-DotB

Na Figura 6 estão representados os perfis de proliferação celular de fibroblasto murino (NIH/3T3) e melanoma murino (B16F10) em função do tempo quando expostas a três concentrações de C-DotB (0,01; 0,05 e 0,1 mg/mL). A proliferação celular foi analisada pelo software RTCA e comparada com o controle, o qual não recebeu C-DotB.

Os fibroblastos murino (Figura 6A) apresentaram dinâmicas de proliferação celular semelhantes antes de serem expostas à C-DotB (tempo 0), assim como nas primeiras 24 horas de exposição a qualquer das concentrações quando comparado ao controle. No entanto, a partir desse tempo, fibroblastos expostos às diferentes concentrações de C-DotB tiveram os seus índices celulares significativamente ($p < 0,05$) maiores que o controle. Este aumento do perfil de proliferação celular é significativamente ($p < 0,001$) maior após 72 horas de exposição às duas maiores concentrações, quando comparados ao controle e a exposição a 0,01 mg/mL, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) entre a exposição às maiores concentrações. Vale ressaltar que neste tempo de exposição (72 h), ainda é observada uma maior dinâmica na proliferação dos fibroblastos quando expostos a menor concentração, comparado ao controle. A partir de 96 horas de exposição até o final do tempo experimental, a proliferação das células expostas a menor concentração já não difere significativamente ($p > 0,05$) ao controle, mas as exposições às duas maiores concentrações faz com que os índices celulares continuem significativamente ($p < 0,05$) maiores que o controle, porém sem diferenças ($p > 0,05$) entre eles.

Na Figura 6B é possível observar que as células de melanoma apresentaram dinâmica de proliferação celular semelhantes antes de serem expostas à C-DotB (tempo 0). Após às exposições, essas células tiveram uma diminuição significativa ($p < 0,01$) no índice de proliferação após 24 h de exposição a maior concentração quando comparado ao controle, o que não ocorreu para as demais exposições. Este perfil permanece o mesmo após 48 horas de exposição. A partir de 96 horas e até o final do tempo experimental, as células de melanoma têm os índices celulares significativamente ($p < 0,01$) reduzidos quando expostas às duas maiores concentrações, comparados ao controle e a exposição a 0,01 mg/mL, sem diferença

significativa ($p>0,05$) entre as maiores concentrações. Enquanto que, no mesmo intervalo de tempo, as células expostas à menor concentração mantiveram a sua proliferação de forma significativamente semelhante ao controle.

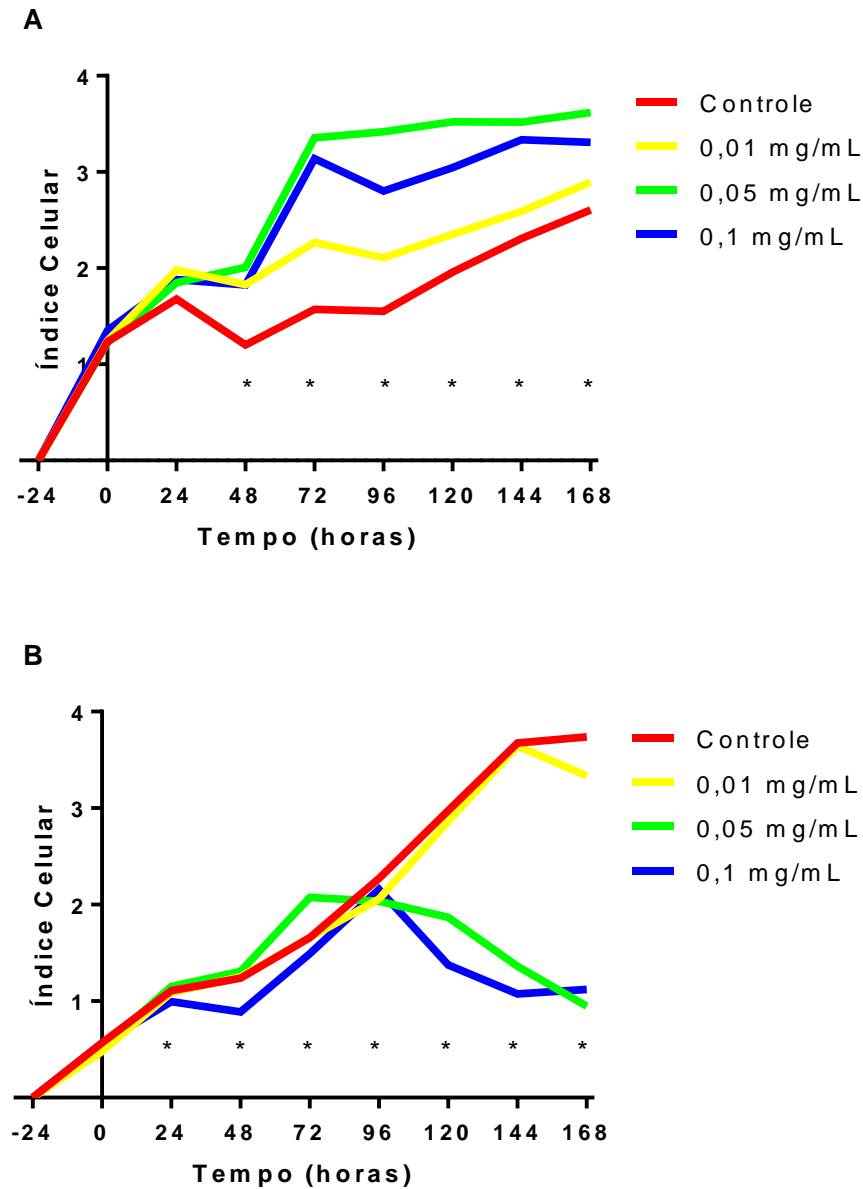


Figura 6. Análise do índice celular de fibroblastos murino-NIH/3T3 (A) e melanoma murino-B16F10 (B) ao longo de 168 horas de exposição a três concentrações de C-DotB: 0,01; 0,05 e 0,1 mg/mL, avaliado pelo software RTCA (Real Time Cell Analyser). Os dados estão representados como média para análise de três amostras. * significa que houve diferença estatística significativa.

5.3 Ensaio de toxicidade de C-DotB em camundongos

5.3.1 Análise dos parâmetros clínicos

Para avaliar o efeito toxicológico de C-DotB no organismo, camundongos receberam a injeção endovenosa de duas diferentes concentrações de C-DotB. Para tanto, as variações do peso corporal (Figura 7A), do consumo de ração (Figura 7B) e da ingestão de água (Figura 7C) foram monitoradas ao longo de 30 dias após a injeção do material (tempo 0). A figura 7A mostra que todos os animais do grupo controle tiveram aumento do peso corporal esperado assim como os animais dos dois grupos tratados, sem diferenças significativas ($p > 0,05$).

A Figura 7B mostra que os padrões de consumo de ração pelos animais que receberam a injeção de com ambas as concentrações de C-DotB foram similares ao observado pelos animais do grupo controle durante os trinta dias, não havendo diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$). O mesmo pode ser observado na ingestão de água (Figura 7C), sem diferenças significativas, ($p > 0,05$) entre os grupos.

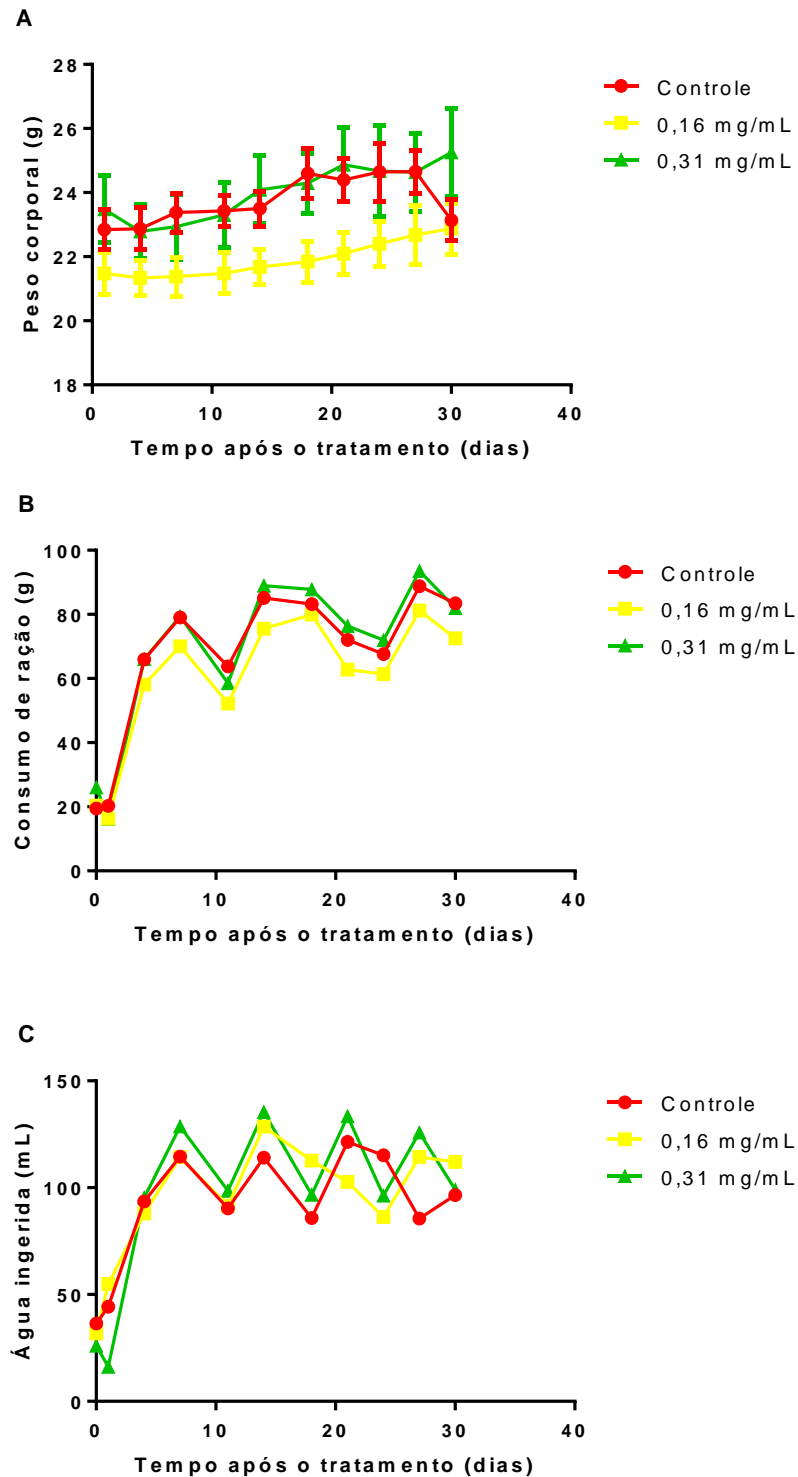


Figura 7. Variação do peso corporal (A), consumo de ração (B) e ingestão de água (C) por camundongos C57BL/6 após terem recebido a injeção de C-DotB na concentração de 0,16 mg/mL (linha amarela) ou 0,31 mg/mL (linha vermelha) ou não (controle – linha amarela) ao longo de 30 dias após a injeção do nanomaterial. Os dados de peso corporal estão apresentados como média \pm E.P.M. para análise de seis animais por grupo.

5.3.2 Análises hematológicas

Visando avaliar o efeito toxicológico de C-DotB no organismo, tendo como foco alterações hematológicas que pudessem indicar a ocorrência de processos inflamatórios e/ou comprometimento do sistema imune dos camundongos que receberam a injeção endovenosa de C-DotB nas concentrações de 0,16 (C-DotB/l) e 0,31 mg/mL (C-DotB/h), foram realizados o hemograma e o linfograma destes animais a partir do sangue coletado após dois e 30 dias da injeção do nanomaterial.

Ao analisar o hemograma (Figura 8), é possível observar um aumento do número de células brancas (TCB; barras escuras na Figura 8A) nos animais cujo sangue foi analisado após 30 dias da aplicação dos C-DotB na concentração de 0,31 mg/mL (C-DotB/h 30 dias). Esse aumento é significativo quando comparado com o controle e com as outras aplicações ($p < 0,001$ e $p < 0,01$). O mesmo pode ser visto para a quantidade de hemoglobina (HGB; barras escuras na Figura 8B), a qual está um pouco mais elevada para o grupo C-DotB/h 30 dias e esse aumento é significativo ($p < 0,05$) quando comparado aos animais que tiveram a análise hematológica realizada após dois dias da injeção dos C-DotB na concentração de 0,16 mg/mL (C-DotB/l 2 dias), mas não é significativo quando comparado ao controle ($p > 0,05$). Também houve um leve aumento na concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM, barras escuras na Figura 8D) do sangue de animais coletado 30 dias após a aplicação dos C-DotB a 0,16 mg/mL (C-DotB/l 30 dias). Esse leve aumento de CHCM é significativo quando comparado ao controle ($p < 0,05$) e ao grupo C-DotB/l 2 dias ($p < 0,05$). Para os parâmetros número de eritrócitos (TCV, barras claras na Figura 8A), hematócrito (HCT, barras claras na Figura 37B), volume globular médio (VGM, barras escuras na Figura 8C), hemoglobina globular média (HGM, barras claras na Figura 8C) e plaquetas (PLT, barras claras na Figura 8D) não houve aumento ou diminuição significativa ($p > 0,05$) desses parâmetros entre os grupos experimentais e o controle.

Quando analisado o linfograma (Figura 9), foi possível observar um aumento na porcentagem de linfócitos (PL; Figura 9A) nos animais cujo sangue foi coletado após dois dias da aplicação de C-DotB na concentração de 0,31 mg/mL, assim como dos animais cujo sangue foi coletado 30 dias após a aplicação de 0,16 mg/mL, sendo esses aumentos significativos quando comparados com o controle ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente). Também é observada diferença significativa quando

comparado C-DotB/l 30 dias com os grupos C-DotB/ l 2 dias ($p<0,01$) e C-DotB/ h 30 dias ($p<0,05$). É possível visualizar aumento na porcentagem de neutrófilos (PN; Figura 9C) no grupo C-DotB/h 30 dias, o qual foi significativo quando comparado com o controle e os demais grupos experimentais ($p<0,01$). Ao contrário do que foi observado nos parâmetros de porcentagem de linfócitos e de neutrófilos, ocorreu uma diminuição nos valores do parâmetro de porcentagem de monócito (PM; Figura 9B) para todos os grupos experimentais, quando comparado ao controle, sendo essas diminuições somente significativas para os grupos C-DotB/h 2 dias ($p<0,05$), C-DotB/h 30 dias ($p<0,05$) e C-DotB/l 30 dias ($p<0,001$).

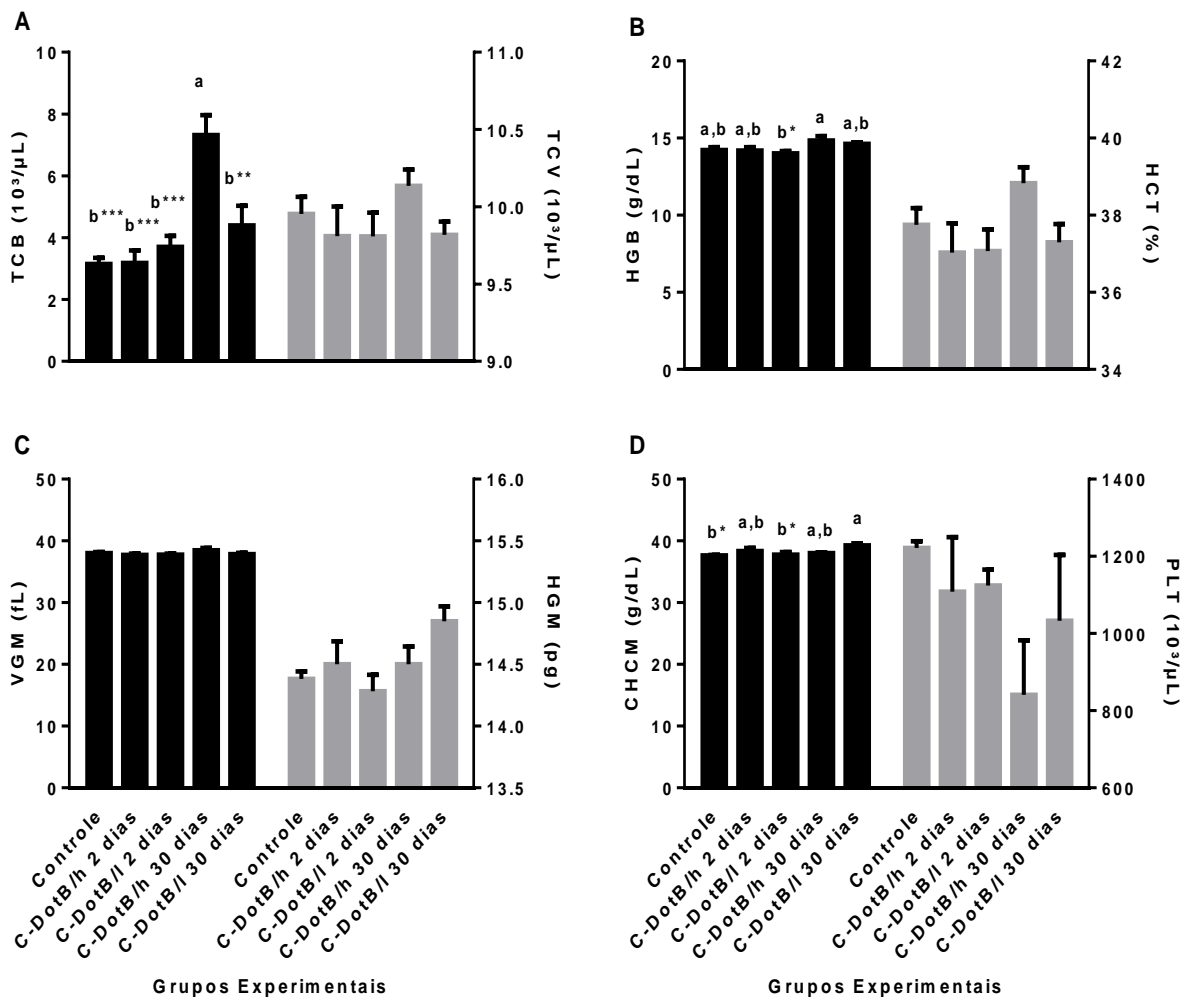


Figura 8. Hemograma de camundongos C57BL/6 após dois e 30 dias da aplicação endovenosa de C-DotB nas concentrações 0,16 e 0,31 mg/mL. Em **A**: número total de células brancas (TCB) e de células vermelhas (TCV). Em **B**: hematócrito (HCT) e hemoglobina (HGB). Em **C**: volume globular médio (VGM) e hemoglobina globular média (HGM). Em **D**: concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e número de plaquetas (PLT). Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. para análise do sangue de seis animais por grupo. Controle: animais que não foram aplicados C-DotB e o sangue coletado aos 30 dias da aplicação de C-DotB nos demais animais. C-DotB/h 2 dias: animais cujo sangue foi coletado 2 dias após a aplicação de C-DotB a 0,31 mg/mL. C-DotB/l 2 dias: animais cujo sangue foi coletado 2 dias após a aplicação de C-DotB a 0,16 mg/mL. C-DotB/h 30 dias: animais cujo sangue foi coletado 30 dias após a aplicação de C-DotB a 0,31 mg/mL. C-DotB/l 30 dias: animais cujo sangue foi coletado 30 dias após a aplicação de C-DotB a 0,16 mg/mL. Letras diferentes significam diferenças estatísticas significativas. * significa $p < 0,05$; ** significa $p < 0,01$; *** significa $p < 0,001$.

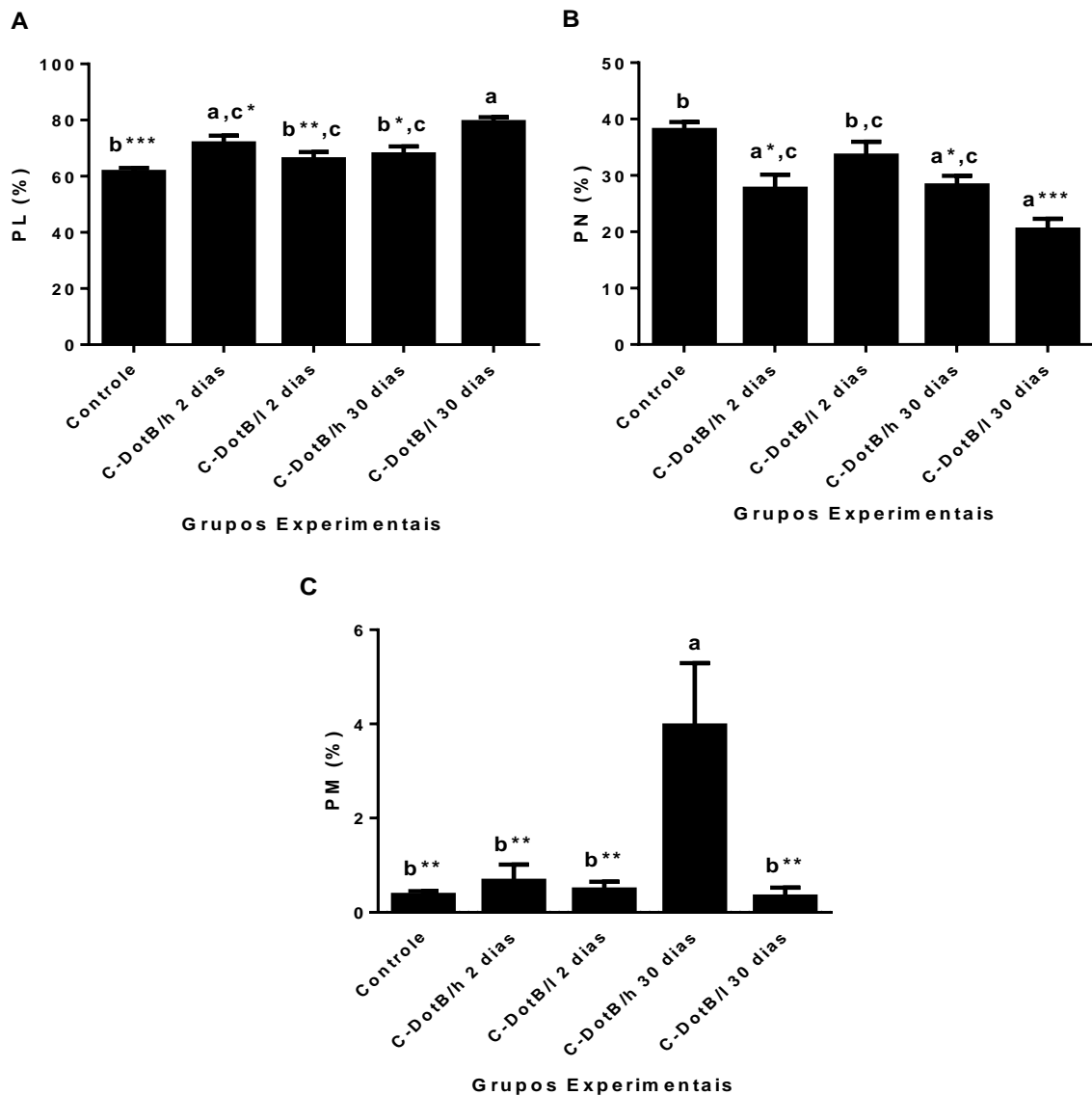


Figura 9. Linfograma de camundongos C57BL/6 após dois e 30 dias da aplicação endovenosa de C-DotB nas concentrações 0,16 e 0,31 mg/mL. Em **A**: porcentagem de linfócitos (PL). Em **B**: porcentagem de neutrófilos (PN). Em **C**: porcentagem de monócitos (PM). Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. para análise do sangue de seis animais por grupo. Controle: animais que não foram aplicados C-DotB e o sangue coletado aos 30 dias da aplicação de C-DotB nos demais animais. C-DotB/h 2 dias: animais cujo sangue foi coletado 2 dias após a aplicação de C-DotB a 0,31 mg/mL. C-DotB/l 2 dias: animais cujo sangue foi coletado 2 dias após a aplicação de C-DotB a 0,16 mg/mL. C-DotB/h 30 dias: animais cujo sangue foi coletado 30 dias após a aplicação de C-DotB a 0,31 mg/mL. C-DotB/l 30 dias: animais cujo sangue foi coletado 30 dias após a aplicação de C-DotB a 0,16 mg/mL. Letras diferentes significam diferenças estatísticas significativas. * significa $p < 0,05$; ** significa $p < 0,01$; *** significa $p < 0,001$.

5.3.3 Análises bioquímicas

Visando avaliar o efeito toxicológico de C-DotB no organismo, tendo como foco alterações bioquímicas que pudessem indicar a ocorrência de danos hepáticos e renais nos camundongos que receberam a injeção endovenosa de C-DotB nas concentrações de 0,16 (C-DotB/l) e 0,31 mg/mL (C-DotB/h), foram analisadas os níveis de alguns indicadores metabólicos do sangue coletado após dois e 30 dias da injeção do nanomaterial nos animais (Figuras 10, 11e 12).

Ao analisar as taxas de alanina aminotransferase (ALT, barras escuras na figura 10), aspartato aminotransferase (AST, barras claras na figura 10), creatinina (barras escuras na figura 11), desidrogenase láctica (LDH, barras claras na figura 11) e ureia (barras claras na figura 12) do sangue coletado dos animais de todos os grupos, após dois e 30 dias da aplicação de C-DotB nas duas concentrações, é possível observar que não houve aumento ou diminuição significativa ($p > 0,05$) dos valores quando comparados ao controle e entre eles (Figuras 10, 11e 12).

É possível observar um aumento na quantidade da enzima fosfatase alcalina (barras escuras na figura 12) no sangue coletado dos animais após 30 dias da aplicação de C-DotB nas duas concentrações (0,16 e 0,31 mg/mL). Esse aumento foi significativo quando os animais que receberam a concentração de 0,16 mg/mL (C-DotB/l 30 dias) foram comparados com o controle ($p < 0,05$) e com os animais que tiveram o sangue coletado dois dias após a aplicação tanto da menor ($p < 0,01$) quanto maior ($p < 0,001$) concentrações de C-DotB. Já para os animais que receberam a concentração de 0,31 mg/mL (C-DotB/h 30 dias), esse aumento foi significativo quando comparado com o valor obtido do sangue coletado dos animais após dois dias da aplicação de 0,31 mg/mL de C-DotB ($p < 0,01$).

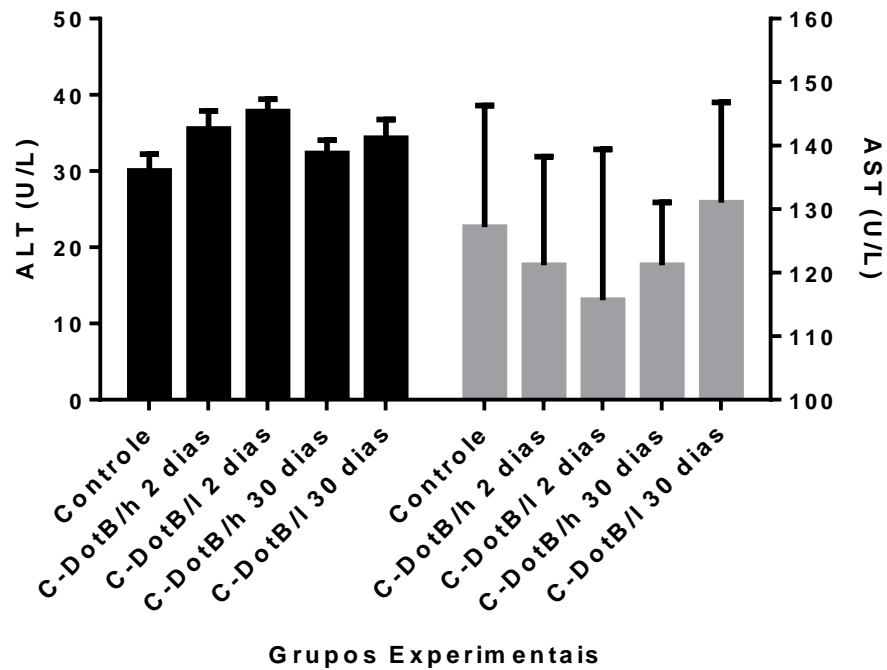


Figura 10. Níveis séricos de ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase) em camundongos C57BL/6 após dois e 30 dias da aplicação endovenosa de C-DotB nas concentrações 0,16 e 0,31 mg/mL. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. para análise do sangue de seis animais por grupo. Controle: animais que não foram aplicados C-DotB e o sangue coletado após 30 dias da aplicação de C-DotB nos demais animais. C-DotB/h 2 dias: animais cujo sangue foi coletado 2 dias após a aplicação de C-DotB a 0,31 mg/mL. C-DotB/l 2 dias: animais cujo sangue foi coletado 2 dias após a aplicação de C-DotB a 0,16 mg/mL. C-DotB/h 30 dias: animais cujo sangue foi coletado 30 dias após a aplicação de C-DotB a 0,31 mg/mL. C-DotB/l 30 dias: animais cujo sangue foi coletado 30 dias após a aplicação de C-DotB a 0,16 mg/mL.

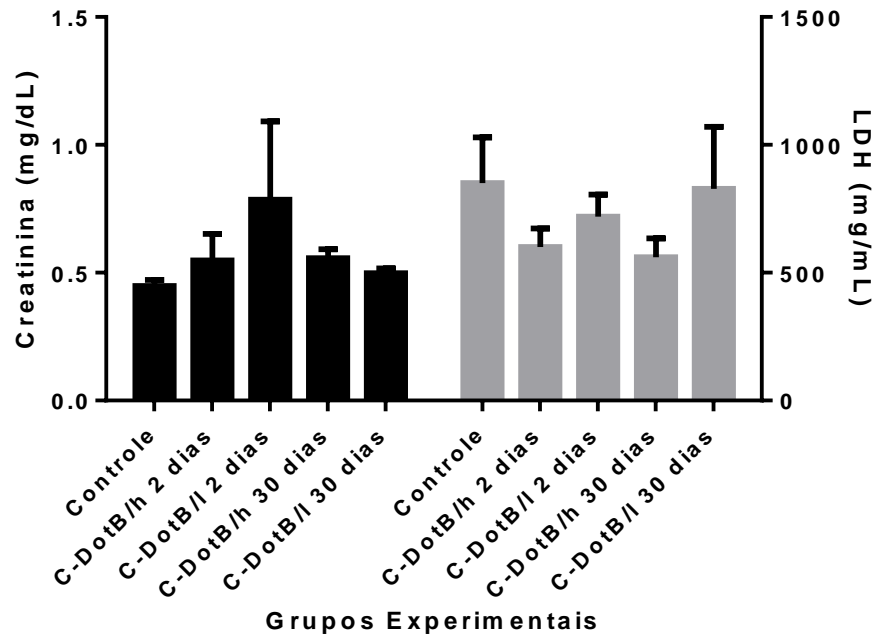


Figura 11. Níveis séricos de creatinina e LDH (desidrogenase láctica) em camundongos C57BL/6 após dois e 30 dias da aplicação endovenosa de C-DotB nas concentrações 0,16 e 0,31 mg/mL. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. para análise do sangue de seis animais por grupo. Controle: animais que não foram aplicados C-DotB e o sangue coletado após 30 dias da aplicação de C-DotB nos demais animais. C-DotB/h 2 dias: animais cujo sangue foi coletado 2 dias após a aplicação de C-DotB a 0,31 mg/mL. C-DotB/l 2 dias: animais cujo sangue foi coletado 2 dias após a aplicação de C-DotB a 0,16 mg/mL. C-DotB/h 30 dias: animais cujo sangue foi coletado 30 dias após a aplicação de C-DotB a 0,31 mg/mL. C-DotB/l 30 dias: animais cujo sangue foi coletado 30 dias após a aplicação de C-DotB a 0,16 mg/mL.

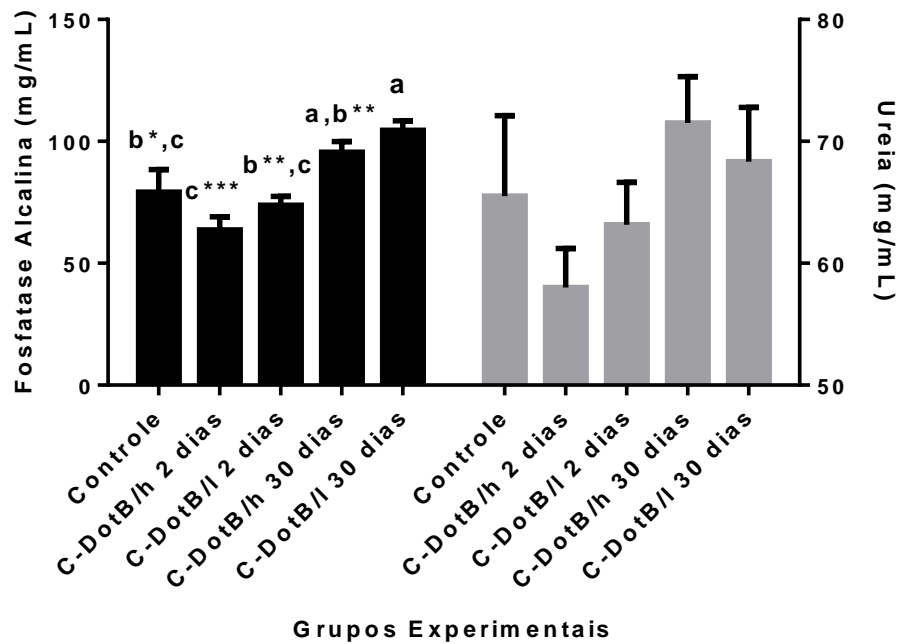


Figura 12. Níveis séricos de fosfatase alcalina e ureia em camundongos C57BL/6 após dois e 30 dias da aplicação endovenosa de C-DotB nas concentrações 0,16 e 0,31 mg/mL. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. para análise do sangue de seis animais por grupo. Controle: animais que não foram aplicados C-DotB e o sangue coletado após 30 dias da aplicação de C-DotB nos demais animais. C-DotB/h 2 dias: animais cujo sangue foi coletado 2 dias após a aplicação de C-DotB a 0,31 mg/mL. C-DotB/l 2 dias: animais cujo sangue foi coletado 2 dias após a aplicação de C-DotB a 0,16 mg/mL. C-DotB/h 30 dias: animais cujo sangue foi coletado 30 dias após a aplicação de C-DotB a 0,31 mg/mL. C-DotB/l 30 dias: animais cujo sangue foi coletado 30 dias após a aplicação de C-DotB a 0,16 mg/mL. Letras diferentes significam diferenças estatísticas significativas. * significa $p < 0,05$; ** significa $p < 0,01$; *** significa $p < 0,001$.

5.3.4 Avaliação da toxicidade de C-DotB, por meio de análise histopatológica em microscopia de luz

5.3.4.1 Análise histopatológica de órgãos de camundongos sem indução tumoral

A fim de detectar possíveis alterações morfológicas, tais como infiltrados inflamatórios, necrose ou fibrose, causadas por C-DotB nos tecidos cerebral, hepático, renal, pulmonar e esplênico de camundongos sem qualquer indução tumoral e coletados após dois e 30 dias da aplicação de 0,16 e 0,31 mg/mL do nanomaterial, a análise de lâminas histológicas, coradas com H.E. foi realizada.

Comparado ao controle, os cérebros dos animais que receberam o nanomaterial, independente dos dias decorridos da aplicação e da concentração, apresentaram morfologia inalterada, não tendo sido presenciados focos de necrose e inflamação (Figura 13). O mesmo pode ser dito em relação à morfologia dos rins, onde foi possível identificar facilmente a cápsula de Bowman e os túbulos contorcidos distal e proximal, e da mesma forma, não foram encontrados focos de necrose, de inflamação ou hemorragia (Figura 13).

Diferentemente, foi possível observar poucos e pequenos focos inflamatórios nos fígados de quatro animais do grupo C-DotB/h 2 dias e em todos animais do grupo C-DotB/l 2 dias. O mesmo ocorreu nos fígados de dois animais do grupo C-DotB/h 30 dias e em um animal do grupo C-DotB/l 30 dias, assim como em dois animais do grupo controle. Apesar de terem sido observados esses focos inflamatórios, a morfologia dos hepatócitos de todos os grupos apresentou-se normal. Capilares sinusoides também não apresentaram danos. Em nenhuma lâmina, foram encontrados focos de necrose (Figura 14).

A morfologia geral do baço se mostrou normal quando comparado o controle com os animais que receberam o nanomaterial, independente dos dias decorridos da aplicação e da concentração. A única ressalva que deve ser feita é a hiperplasia da polpa branca observada em quatro animais do grupo C-DotB/h 30 dias, já que ela não foi observada nos demais grupos experimentais e no controle (Figura 14).

O órgão que apresentou maior quantidade de anormalidades foi o pulmão, tanto para os grupos experimentais como para o controle. Foi possível observar diferentes tamanhos de áreas com fibrose nos pulmões de dois animais do grupo C-DotB/h 2 dias, três animais do grupo C-DotB/l 2 dias, quatro animais dos grupos C-

DotB/h e C-DotB/l 30 dias e três animais do grupo controle. Nesses mesmos animais, foi possível observar que mais de 50% do tecido pulmonar apresenta alvéolos coalescidos. Também puderam ser observados focos inflamatórios em quatro animais do grupo C-DotB/h 30 dias, enquanto que nos grupos C-DotB/l 2 dias e 30 dias foram visualizados em dois animais e nos grupos C-DotB/h 2 dias e controle só foram observados em um animal. No entanto, os pulmões não apresentaram focos de necrose e nem de hemorragia para todos os grupos experimentais e controle (Figura 15).

5.3.4.2 Análise histopatológica de órgãos de camundongos com indução tumoral

A fim de detectar possíveis alterações morfológicas, tais como infiltrados inflamatórios, necrose ou fibrose, causadas por C-DotB nos tecidos cerebral, hepático, renal, pulmonar, esplênico e tumoral de camundongos com melanoma induzido e coletados após dois dias da aplicação de 0,16 e 0,31 mg/mL do nanomaterial, quando os tumores tinham quatro, oito ou 14 dias de crescimento, a análise de lâminas histológicas, coradas com H.E. foi realizada.

Vale ressaltar que o valor médio do volume tumoral obtido nos dias da aplicação de C-DotB pode ser visto na Tabela 3.

Tabela 3. Valor médio do volume tumoral (mm³) obtido nos dias da aplicação de C-DotB.

Grupos experimentais	Média do Volume Tumoral (mm ³)
C-DotB tumor-4d	33,84 ± 7,92
C-DotB tumor-8d	263,36 ± 69,24
C-DotB tumor-14d	1022,58 ± 130,61

Os dados estão apresentados como média ± E.P.M. para análise do volume tumoral de 12 animais por grupo. C-DotB tumor-4d: animais com quatro dias de indução tumoral. C-DotB tumor-8d: animais com oito dias de indução tumoral. C-DotB tumor-14d: animais com 14 dias de indução tumoral.

A morfologia dos cérebros e dos rins dos animais que receberam o nanomaterial, independente dos dias decorridos da indução tumoral e da concentração injetada de C-DotB, mantiveram-se inalteradas, não tendo sido

encontrados focos de necrose, de inflamação ou hemorragia (Figura 13).

Como observado nos fígados dos animais sem indução tumoral, todos os grupos apresentam focos inflamatórios. Os grupos C-DotB/h tumor-8d e C-Dot/l tumor-14d foram os que apresentaram o maior número de animais com focos inflamatórios, 5 e 6, respectivamente. Os demais grupos apresentaram no máximo dois animais. Nos dois grupos supracitados também foi possível observar focos de necrose, o que não foi encontrado nos demais. Somando-se a esses dois fatores, os hepatócitos de quatro animais do grupo C-DotB/h tumor-8d apresentavam citoplasma vacuolizados, o que não foi observado em nenhum outro grupo, com ou sem indução tumoral (Figura 14).

Diferentemente do que foi observado para os animais sem tumor, a morfologia geral do baço foi alterada em muitos animais com tumor induzido. A alteração encontrada foi a hiperplasia da polpa branca, sendo os grupos C-DotB/h tumor-4d e C-DotB/l tumor-8d os que tiveram o menor número de animais com a alteração, três animais em cada grupo. Nos demais grupos esta hiperplasia foi observada em 5 ou 6 animais (Figura 14).

Do mesmo modo que para os grupos sem tumor, o pulmão foi o órgão que apresentou maior quantidade de anormalidades na maioria dos animais com indução tumoral. No mínimo, quatro animais de todos os grupos apresentaram fibrose pulmonar, e, no mínimo, em três animais de cada grupo foi possível observar focos inflamatórios, com exceção para o grupo C-DotB/l tumor-4d, em que nenhum animal apresentou foco inflamatório. Pelo menos, quatro animais de cada grupo apresentaram mais de 50% dos seus alvéolos coalescidos. Não foram encontrados focos de necrose e/ou hemorragia nos pulmões de nenhum animal (Figura 15).

Na histologia dos tumores, puderam ser observar focos de necrose em todos os grupos, sendo que o grupo C-DotB/l tumor-14d foi o que apresentou menos animais com necrose, somente dois. Nos demais grupos os focos de necrose foram observados em quatro a seis animais. Além disso, foi possível visualizar focos de inflamação em todos animais de todos os grupos (Figura 15).

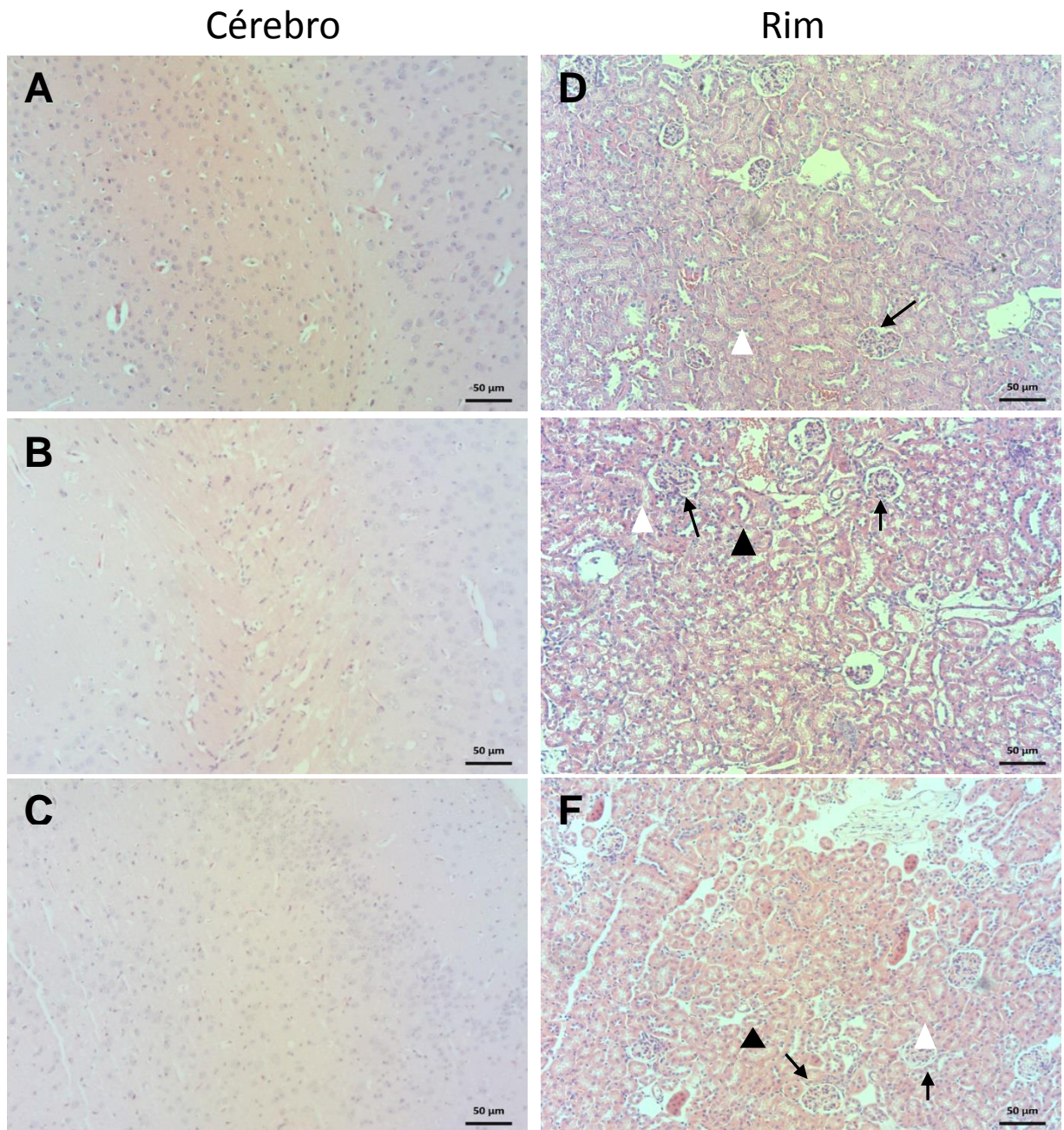


Figura 13. Fotomicrografias de cérebro de camundongos C57BL6 do grupo controle (A), do grupo C-DotB/h 2 dias (B), do grupo C-DotB/l tumor-8d (C). Fotomicrografias de rim de camundongos C57BL/6 do grupo controle (D), do grupo C-DotB/l 30 dias (E) e do grupo C-DotB/h tumor-4d (F). Controle: animais que não foram aplicados C-DotB. C-DotB/l 30 dias: animais nos quais foram injetados C-DotB a 0,16 mg/mL e eutanasiados após 30 dias. C-DotB/h tumor-4d: animais com indução tumoral de 4 dias nos quais foram injetados C-DotB a 0,31 mg/mL e eutanasiados após 2 dias. C-DotB/h 2 dias: animais nos quais foram injetados C-DotB a 0,31 mg/mL e eutanasiados após 2 dias. C-DotB/l tumor-8d: animais com indução tumoral de 8 dias nos quais foram injetados C-DotB a 0,16 mg/mL e eutanasiados após 2 dias. C-DotB: *carbon dot* recoberto com boronato. Setas: cápsula de Bowman. Cabeça de seta branca: túbulo contorcido proximal. Cabeça de seta preta: túbulo contorcido distal. Todas as imagens estão com aumento de 10X.

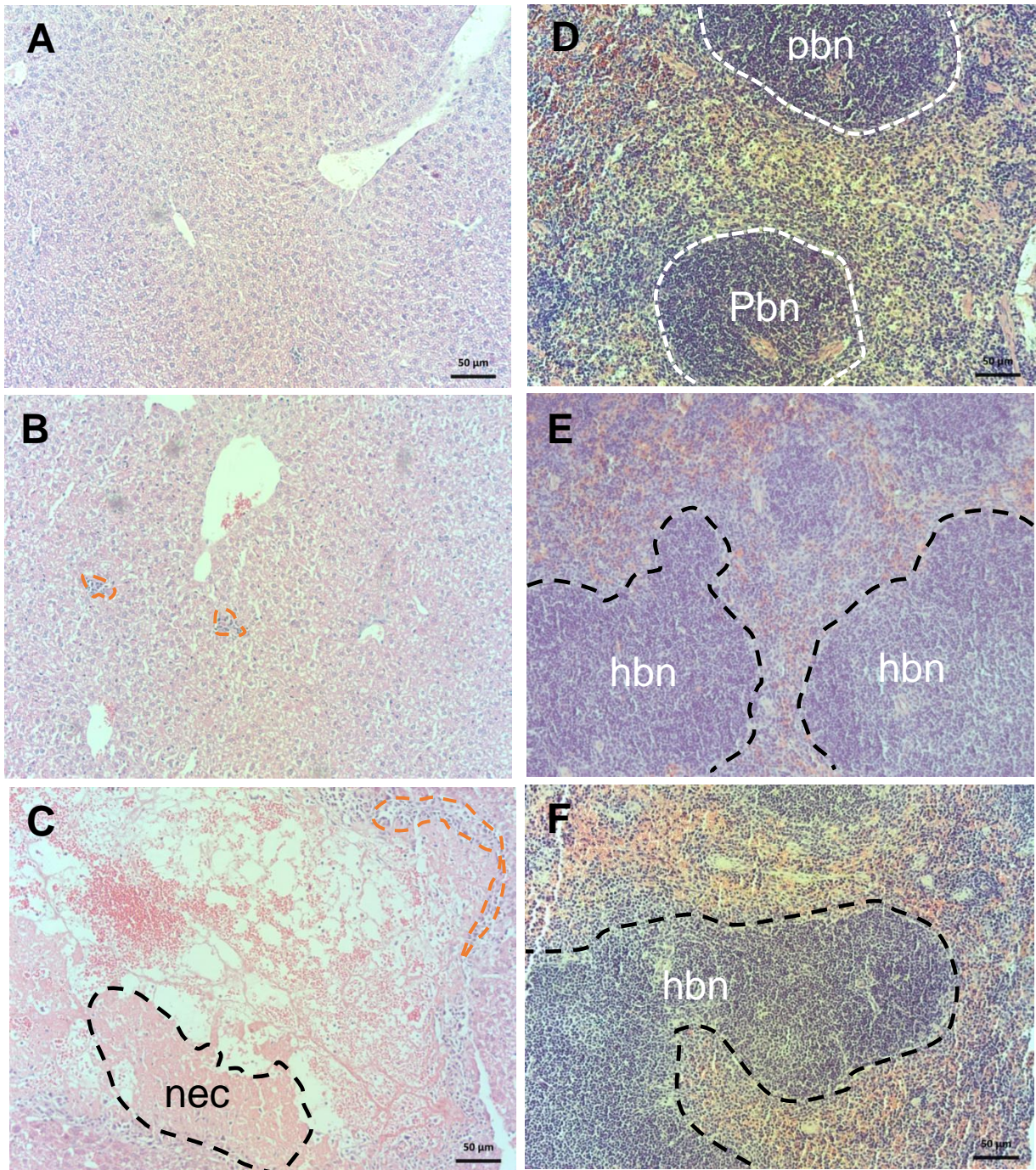


Figura 14. Fotomicrografias de fígado de camundongos C57BL/6 do grupo controle (A), do grupo C-DotB/h 2 dias (B), do grupo C-DotB/h tumor-14d (C). Fotomicrografias de baço do grupo controle (D), do grupo C-DotB/h 30 dias (E) e do grupo C-DotB/h tumor-4d (F). Controle: animais que não foram aplicados C-DotB. C-DotB/h 30 dias: animais nos quais foram injetados C-DotB a 0,31 mg/mL e eutanasiados após 30 dias. C-DotB/h tumor-4d: animais com indução tumoral de 4 dias nos quais foram injetados C-DotB a 0,16 mg/mL e eutanasiados após 2 dias. C-DotB/h 2 dias: animais nos quais foram injetados C-DotB a 0,16 mg/mL e eutanasiados após 2 dias. C-DotB/h tumor-14d: animais com indução tumoral de 14 dias nos quais foram injetados C-DotB a 0,16 mg/mL e eutanasiados após 2 dias. C-DotB: *carbon dot* recoberto com boronato. Tracejado laranja: focos inflamatório. nec: necrose. hpb: hiperplasia da polpa branca. pbn: polpa branca normal. Todas as imagens estão com aumento de 10X.

Pulmão

Tumor

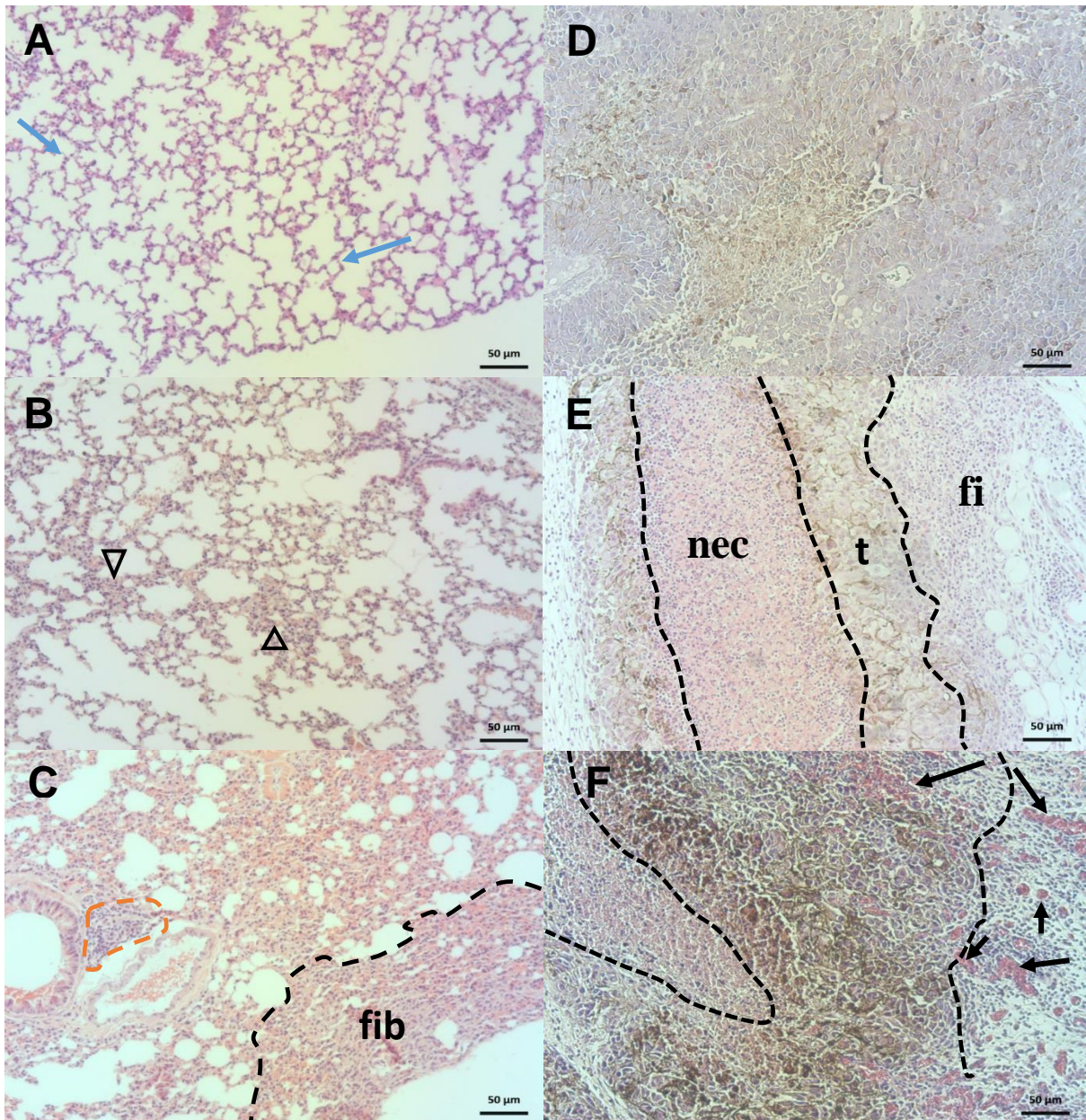


Figura 15. Fotomicrografias de pulmão do grupo controle (A), do grupo C-DotB/l 30 dias (B), do grupo C-DotB/h tumor-14d (C). Fotomicrografias de tumor do grupo C-DotB/l tumor-14d (A), do grupo C-DotB/l tumor-8d (B) e do grupo C-DotB/h tumor-8d (C). C-DotB/l tumor-14d: animais com indução tumoral de 14 dias nos quais foram injetados C-DotB a 0,16 mg/mL e eutanasiados após 2 dias. C-DotB/l tumor-8d: animais com indução tumoral de 8 dias nos quais foram injetados C-DotB a 0,16 mg/mL e eutanasiados após 2 dias. C-DotB/h tumor-8d: animais com indução tumoral de 8 dias nos quais foram injetados C-DotB a 0,31 mg/mL e eutanasiados após 2 dias. Controle: animais que não foram aplicados C-DotB. C-DotB/l 30 dias: animais nos quais foram injetados C-DotB a 0,16 mg/mL e eutanasiados após 30 dias. C-DotB/h tumor-14d: animais com indução tumoral de 14 dias nos quais foram injetados C-DotB a 0,31 mg/mL e eutanasiados após 2 dias. C-DotB: *carbon dot* recoberto com boronato. Tracejado laranja e fi: focos inflamatório. fib: fibrose. Setas azuis: alvéolos normais. Cabeça de seta preta: alvéolos coalescidos. nec: necrose. t: células tumorais. Setas pretas: angiogênese. Todas as imagens estão com aumento de 10X.

5.3.5 Análise da bidistribuição de C-DotB nos órgãos por meio de microscopia de fluorescência

A fim de verificar a presença de C-DotB nos tecidos cerebral, hepático, renal, pulmonar, esplênico e tumoral de camundongos sem e com indução de melanoma e coletados após dois e 30 dias da aplicação de 0,16 e 0,31 mg/mL do nanomaterial no caso de animais sem indução, e após dois dias da aplicação das mesmas concentrações de C-DotB, quando os tumores tinha quatro, oito ou 14 dias de crescimento, a análise de lâminas histológicas preparadas para microscopia de fluorescência foi realizada.

Em todos os órgãos dos animais sem melanoma coletados após dois e 30 dias (dados não mostrados) da aplicação das duas concentrações de nanomaterial não foi observado a presença de C-DotB (Figura 16). O mesmo ocorreu em relação aos órgãos e ao tumor coletados após dois dias da aplicação das duas concentrações de C-DotB quando o tumor tinha quatro, oito e 14 dias de crescimento (Figura 17). Toda fluorescência que pode ser visualizada nas imagens provém da autofluorescência dos tecidos, como pode ser observado nas imagens do controle.

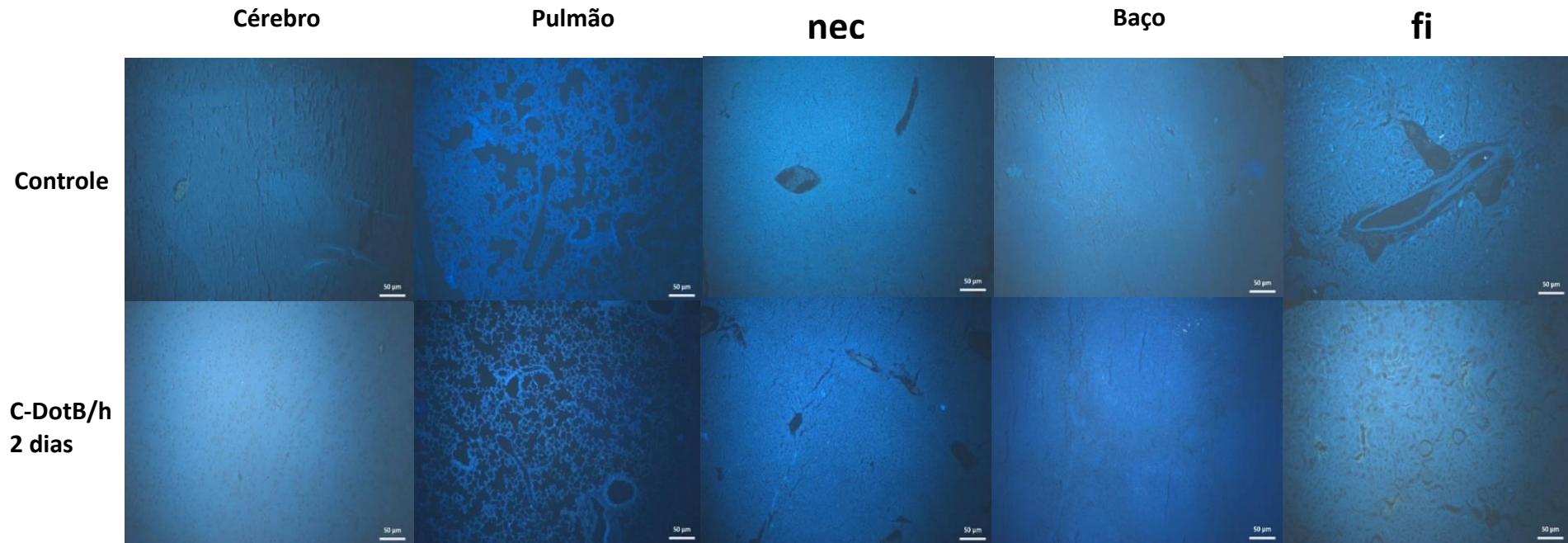


Figura 16. Fotomicrografias de fluorescência de cérebro, pulmão, fígado, baço e rim de animais do grupo C-DotB/h 2 dias e do grupo controle, onde a fluorescência observada nas imagens é autofluorescência dos tecidos. C-DotB/h 2 dias: animais nos quais foram injetados C-DotB na concentração de 0,31 mg/mL e após 2 dias foram coletados os órgãos. Controle: animais que não receberam C-DotB. C-DotB: *carbon dot* recoberto com boronato. Todas as imagens estão no aumento de 10 vezes.

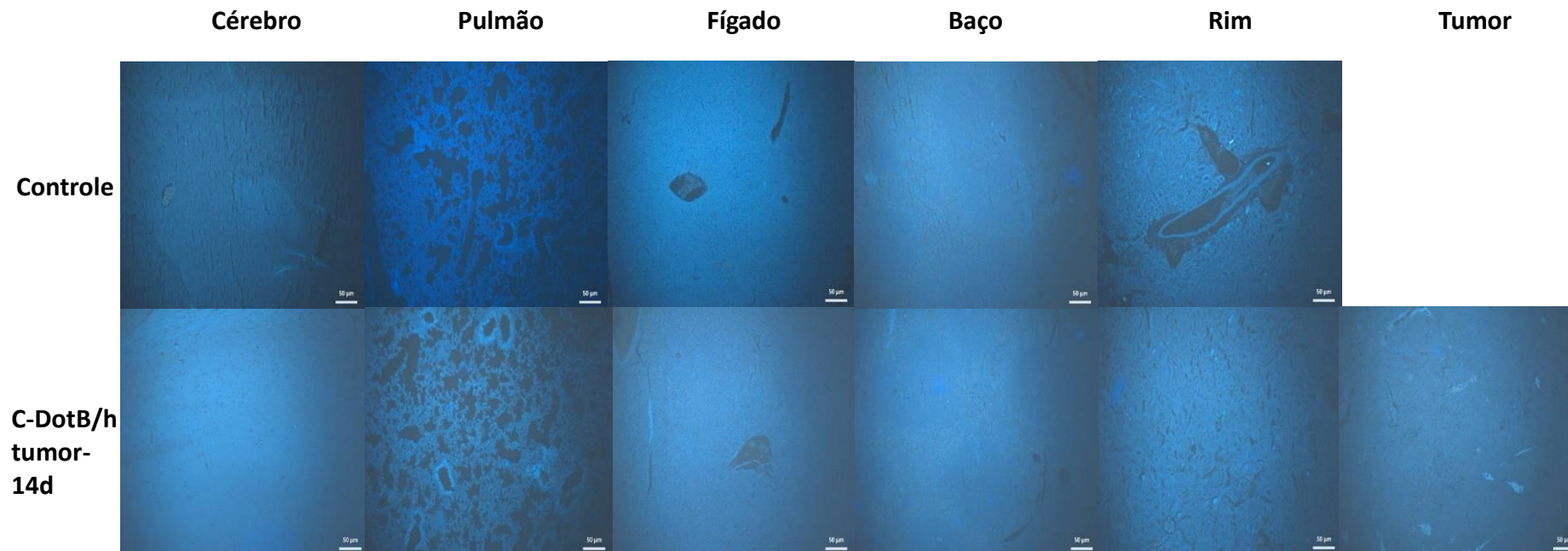


Figura 17. Fotomicrografia fluorescente de cérebro, pulmão, fígado, baço, rim e tumor de animais do grupo C-DotB/h tumor-4d e do grupo controle (exceto tumor), onde a fluorescência observada nas imagens é autofluorescência dos tecidos. C-DotB/h tumor-4d: animais com 4 dias de indução tumoral nos quais foram injetados C-DotB na concentração de 0,31 mg/mL e eutanasiados após 2 dias. Controle: animais que não receberam C-DotB. C-DotB: carbono dot recoberto com boronato. Todas as imagens estão no aumento de 10 vezes.

6. Discussão

A busca por novos agentes capazes de identificar estágios precoces do câncer que fiquem pouco tempo no organismo e que não apresentem efeitos adversos é contínua. Para tanto, estudos pré-clínicos utilizando sistemas *in vitro* e *in vivo* para avaliação de novas substâncias é um passo primordial para a formação de novos protocolos clínicos para o tratamento ou detecção de doenças em humanos (Dobrovolskaia, 2015). Dentre essas substâncias para detecção do câncer *carbon dots* (C-Dots) são ótimos agentes por apresentarem pouco tempo de retenção no organismo e pela sua baixa toxicidade (Huang et al., 2013). Com base nessas informações, este estudo propôs avaliar o efeito da utilização de carbono dots recobertos com boronato (C-DotB) em células de melanoma e de fibroblastos submetidos ao cultivo celular, assim como em camundongos que foram ou não induzidos a desenvolver um melanoma, e neste último caso, a avaliação foi logo após quatro, oito e 14 dias do crescimento tumoral. Além disso, a biodistribuição de C-DotB, nos animais também foi avaliada.

6.1 Caracterização fotofísica de C-DotB

C-DotB apresentaram uma única faixa de excitação, na região do ultravioleta, e de emissão, no azul. Na literatura científica são encontrados relatos de carbon dots com fluorescência em mais de uma região do espectro visível, desde o azul até o vermelho (Tao et al., 2012), e também de C-Dots que apresentam somente uma faixa de fluorescência. Uma das razões para ter essa diferença é o material escolhido para gerar C-Dots e também o método para a síntese, por exemplo uma partícula provinda de ácido cítrico por duas metodologias diferentes apresentou fluorescência na faixa do azul. Já dois materiais diferentes, que passaram pelo processo de pirólise por micro-ondas, produziram C-Dots que tinham fluorescência na faixa do azul, verde e vermelho (Song, Zhu, & Yang, 2014).

6.2 Citotoxicidade de C-DotB

Diante da propriedade de emissão de fluorescência de C-DotB, foram utilizadas diferentes concentrações para avaliar o seu efeito tóxico sobre fibroblasto

e células de melanoma.

Nos dois tipos celulares, C-DotB apresentou toxicidade significativa quando expostas a maior concentração (0,1 mg/mL). Tao e colaboradores (Tao et al., 2012) observaram que *carbon dots* produzidos à partir de diferentes estruturas de carbono (nanotubos de carbono e grafeno) não apresentaram toxicidade para as células de rim embrionário humano (linhagem 293T) na exposição a concentração de 0,5 mg/mL. Contudo, Havrdova e colaboradores (2016) demonstraram que a toxicidade de C-Dots pode estar relacionada com a sua carga e cobertura. Foram testadas três coberturas diferentes, uma negativa, uma neutra e uma positiva. Os resultados que os autores obtiveram mostraram que C-Dots com carga neutra e negativa apresentaram IC₅₀ na concentração de 0,3 mg/mL enquanto que para C-Dots com carga positiva a IC₅₀ foi de 0,05 mg/mL para células de fibroblasto murino (linhagem NIH/3T3).

Sabendo-se que a carga de superfície pode ocasionar maior mortalidade celular, uma possibilidade para C-DotB terem apresentado elevada citotoxicidade na concentração de 0,1 mg/mL pode ser sua cobertura de boronato, que apresenta carga negativa devido a suas duas hidroxilas. Todavia, boronato já possui diversas aplicações biológicas. Ele pode ser usado como um hidrogel para inibir os primeiros passos da proliferação do vírus HIV (Roberts, Hanson, Massey, Karren, & Kiser, 2007), para monitorar a glicose sanguínea (Gamsey, Suri, Wessling, & Singaram, 2006), além de já ter sido aprovado pelo FDA (órgão americano que regulariza o uso de fármacos no país) em 2003 como um inibidor de proteassoma para o tratamento de mielomas múltiplos (Goy & Gilles, 2004).

Como C-DotB não apresentaram danos relevantes aos tecidos analisados e causaram poucas ou nenhuma alterações nos aspectos clínicos e hematológicos/bioquímicos analisados, essa citotoxicidade não representa fielmente o perfil tóxico de C-DotB.

6.3 Dinâmica de proliferação celular

Para avaliar o efeito citotóxico de C-DotB ao longo de uma exposição prolongada, a dinâmica de proliferação celular de fibroblastos e de células de melanoma foi determinada.

As células de melanoma tiveram uma diminuição no seu índice celular após 24 h de exposição a C-DotB na concentração de 0,1 mg/mL. Contudo, com o decorrer do experimento pode ser observado que houve uma elevada diminuição da proliferação celular quando expostas a concentração de 0,1 e 0,05 mg/mL, enquanto que as células expostas a 0,01 mg/mL e o controle continuaram a crescer até o final do experimento.

Diferentemente, as células de fibroblasto, passadas 24 h de exposição a concentração de 0,01 mg/mL não tiveram uma diminuição da proliferação celular. Com o decorrer do experimento, foi observado que todas as células expostas ou não (controle) ao nanomaterial continuaram a proliferar, sendo que as células expostas apresentaram uma maior proliferação celular.

Devido ao fato de C-DotB causar diminuição da proliferação de células de melanoma, mas não causar essa diminuição nos fibroblastos, uma aplicação futura para C-DotB é o combate de melanoma, visto que nas concentrações de 0,1 e 0,05 mg/mL ocorre a diminuição da proliferação destas células ao passo que em fibroblastos ocorreu um aumento da sua proliferação. Na literatura científica são encontrados muitos relatos sobre C-Dots que são utilizados como agentes para marcação de sítios tumorais devido a sua fluorescência (Liu et al., 2014). Entretanto, existem poucos relatos sobre C-Dots sendo utilizados para o tratamento de câncer. Beack e colaboradores (2015) utilizaram C-Dots ligados a cloro e6 e a hialuronato para o tratamento de melanoma por meio de terapia fotodinâmica. Interessantemente, não foram encontrados relatos sobre C-Dots sendo utilizados para o tratamento de câncer sem a combinação com outras terapias, como pode ser o caso de C-DotsB analisado neste estudo.

6.4 Análise dos parâmetros clínicos

Tendo em vista que diversos fatores exógenos podem ser nocivos, foi realizada a análise da variação do peso corporal, do consumo de ração e a ingestão

de água por camundongos que foram ou não injetados endovenosamente com C-DotB. Foi observado que houve uma ascensão do peso corporal médio dos dois grupos experimentais (C-DotB/h e C-DotB/l 30 dias) assim como o controle, além dos animais não terem apresentado alterações clínicas como diarreia, vômito ou hemorragia externa. Este resultado corroborou com o que é visto na literatura científica. Zheng e colaboradores (2015) demonstraram que mesmo diversas aplicações de C-Dots, provindos de ácido cítrico, não causaram alterações no peso corporal médio dos camundongos durante 90 dias de análise.

Quanto ao consumo de ração e ingestão de água pode ser observado que os animais dos grupos experimentais mantiveram consumo parecido com o dos animais do grupo controle, demonstrando que após 30 dias da aplicação de C-DotB não houve alteração na dieta dos camundongos. Os relatos da literatura científica mostram que C-Dots recobertos com polietilenoglicol (PEG_{1500N}) não causam alteração na alimentação dos animais, como foi demonstrado por Meziani e colaboradores (2010a). Este é o primeiro trabalho que relata sobre a quantidade de água ingerida por camundongos após a injeção endovenosa de C-Dots.

Com base nesses dados, é possível afirmar que C-DotB não causam alterações nos padrões clínicos como peso corporal, alimentação e ingestão de água num período de 30 dias após a injeção da nanopartícula.

6.5 Análises hematológicas e bioquímicas

Outro estudo para avaliar a toxicidade de C-DotB é a análise hematológica e bioquímica dos animais sem indução tumoral que foram injetados com C-DotB. Os resultados obtidos do hemograma mostraram que, dentre todos os parâmetros analisados, somente houve diferença significativa no número total de células brancas (TCB), para o grupo C-DotB/h 30 dias quando comparado ao controle, e na concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), para o grupo C-DotB/l 30 dias quando comparado ao controle.

Já o resultado do linfograma, mostrou que houve diferença significativa na porcentagem de linfócitos (PL), nos animais dos grupos C-DotB/h 2 dias e C-DotB/l 30 dias quando comparado ao controle. Do mesmo modo, houve diferença significativa na porcentagem de monócitos (PM), nos animais dos grupos C-DotB/h 2 dias e C-DotB/h e C-DotB/l 30 dias quando comparados ao controle. Também foram

encontradas diferenças significativas na porcentagem de neutrófilos (PN), nos animais do grupo C-DotB/h 30 dias quando comparado ao controle.

É possível observar na literatura científica que C-Dots podem ou não causar diferenças significativas nos parâmetros analisados no presente estudo. Zhou e colaboradores (2015) mostraram que C-Dots conjugados com a toxina B da cólera não causou diferença significativa nos parâmetros de hemoglobina, plaquetas e hematócrito. Outra partícula testada foi C-Dots provindos de nanotubos de carbono por Tao e colaboradores (2012), onde foi possível observar que não houve diferença significativa para os mesmo parâmetros analisados neste estudo. Já Zheng e colaboradores (2015) mostraram que C-Dots provindos de ácido cítrico apresentaram diferenças significativas nos parâmetros de números totais de células vermelhas, números totais de células branca e hemoglobina.

A diferença encontrada em TCB pode ser explicada pelo tamanho de C-DotB. Por possuírem tamanho menor que 10 nm, pode ocorrer a aglomeração dessas nanopartículas, passando a terem tamanho parecido com determinados vírus (Zheng et al., 2015), o que poderia estimular uma maior produção de células do sistema imune. Como a diferença em CHCM não foi observada em outros trabalhos e por ser pouco significativa ($p < 0,05$), talvez ela não represente verdadeiramente alterações biológicas.

Dentre os parâmetros bioquímicos analisados, somente foi encontrado um aumento significativo na fosfatase alcalina, quando comparado o grupo C-DotB/I 30 dias com o controle. Nos trabalhos de Zheng e colaboradores (2015), assim como Tao e colaboradores (2012), não foi encontrada alteração significativa nos parâmetros ALT, AST, ureia, creatinina e fosfatase alcalina para os C-Dots utilizados. O aumento observada da fosfatase alcalina pode estar relacionado com doenças hepáticas ou ósseas (Udristioiu, Iliescu, Cojocar, & Joanta, 2014). Um dos métodos para avaliar se a fosfatase alcalina é hepática ou óssea é realizar exames com outras enzimas do fígado, como ALT ou AST. Ao analisar ALT e AST do grupo que apresentou altos valores de fosfatase alcalina, pode-se observar que os valores de ALT e de AST estão de acordo com os do controle. Com base nisso, pode se dizer que essa fosfatase alcalina é devida a algum dano ósseo. Entretanto, mais estudos devem ser feitos para comprovar a origem dessa fosfatase, como teste dos níveis de gama GT, de fosfato e de cálcio no sangue.

6.6 Análise dos órgãos por microscopia de luz

Para analisar possível toxicidade de C-DotB aos tecidos, foram feitas lâminas histológicas dos órgãos de interesse: cérebro, pulmão, fígado, baço, rim e tumor.

Os relatos na literatura científica mostram que C-Dots em geral não causam danos aos tecidos, principalmente em pulmão, fígado, baço, rim e coração. Meziari e colaboradores (2010) mostraram que C-Dots recobertos com PEG não causaram danos ao fígado, baço e rim após aplicações de C-Dots nos dias 1, 7 e 28. Do mesmo modo, Zheng e colaboradores (2015) mostraram que C-Dots providos de ácido cítrico não causaram danos ao cérebro, fígado, pulmão, rim, baço e coração após 90 dias de tratamento.

Os resultados obtidos mostraram que tanto nos cérebros como nos rins não foram encontrados qualquer dano ao tecido, como também não foram encontrados sinais de necrose ou de inflamação, corroborando o que é encontrado na literatura.

Na análise do pulmão foram encontrados focos inflamatórios e de fibrose, principalmente nos grupos que tinham melanoma. A fibrose e os focos inflamatórios nos pulmões dos animais com melanoma era algo esperado, visto que melanoma causa metástase nos pulmões (Martinez et al., 2005; Monge-Fuentes, 2014), apesar de não ter sido observado focos metastáticos nas lâminas analisadas. Como não era esperado a presença de focos de inflamação, de fibrose e alvéolos coalescidos nos animais sem tumor e que foram injetados com C-DotB, incluindo também os animais controle, provavelmente, algum fator externo pode ser elencado para explicar a causa dessas alterações morfológicas. Entre os fatores externos que devem ser investigados são a maravalha, a ração e/ou os locais onde os animais são acondicionados.

Animais que foram injetados com C-DotsB não apresentaram danos no fígado, como também encontrado na literatura. Contudo, alguns animais que tinham melanoma apresentaram focos inflamatórios, de necrose e hepatócitos com citoplasma vacuolizado. Isso pode ser explicado devido ao melanoma, que pode causar metástase no fígado (L. Wang et al., 2009).

Não foram encontrados danos na análise histopatológica do baço, nem focos de necrose, corroborando o que é encontrado na literatura científica. Um aspecto estudado nesse trabalho foi o tamanho da polpa branca que está relacionado com a quantidade de células do sistema imune que estão no baço (Elmore, 2006). Todos os

grupos que tinham melanoma apresentaram polpa branca alongada por estarem produzindo células do sistema imune, provavelmente devido a presença do melanoma. Os animais do grupo que foram injetados C-DotB na maior concentração (0,31 mg/mL) e monitorados por 30 dias também apresentaram hiperplasia da polpa branca, o que corroborou o resultado encontrado no hemograma para o total de células brancas desse grupo, que estavam em maior quantidade quando comparado com o controle.

Neste estudo foi possível ver diferentes estados de necrose e de focos inflamatórios nos tumores analisados. Monge-Fuentes (2014) mostrou que é comum os tumores de melanoma apresentarem discretos focos de necrose e inflamação. Contudo, neste estudo foi possível observar grandes áreas de necrose e de inflamação, o que pode estar sendo ocasionado pela presença de C-DotB. C-Dots utilizados para o tratamento de melanomas e outros cânceres geralmente estão acoplados com outra substância. Como já dito anteriormente, C-Dots pode ser usados para o tratamento de melanoma por meio de terapia fotodinâmica (Beack et al., 2015). C-Dots também podem ser ligados a nanocristais de ferro para o tratamento fototermal de melanoma (H. Wang et al., 2014). Contudo, não existem relatos na literatura científica de tratamentos com C-Dots sem a ligação a substâncias anticancerígenas que sejam capazes de causar danos ao tumor. Com base nisso, uma possível futura aplicação de C-DotB é o tratamento de melanomas.

6.6 Análise dos órgãos com microscopia de fluorescência

Para que fosse comprovado o local de deposição de C-DotB nos órgãos analisados, lâminas histológicas foram analisados por microscopia de fluorescência. Na literatura científica há relatos de C-Dots em órgãos como fígado e baço após seis horas da aplicação de C-Dots (Meziani et al., 2010a). Tao e colaboradores (2012) observaram C-Dots recobertos com PEG no tumor após duas horas da aplicação de C-Dots. Contudo, já era esperado que não fosse encontrada fluorescência de C-DotB nos grupos acompanhados por 48 horas, pois os resultados obtidos das imagens de fluorescência *in vivo* e *ex vivo* mostraram que havia pouca fluorescência nos animais. Um dos fatores para que não fosse visualizado C-DotB poderia ter sido a metodologia adotada, pois para substâncias fluorescentes, é comum se congelar os órgãos para que a fluorescência seja preservada por mais tempo (Yokoi et al.,

2015). Apesar de C-Dots não perderem a sua fluorescência como outras substâncias fluorescentes, Tao e colaboradores (2012) utilizaram essa metodologia para visualizar a fluorescência de C-Dots no tumor. Contudo, Meziani e colaboradores (2010a) utilizaram a mesma metodologia aplicada neste trabalho: utilizaram o método da histologia clássica, o qual consiste na fixação do material e utilização de parafina para o emblocamento e obtenção de lâminas histológicas, e obtiveram êxito na visualização de C-Dots. Contudo, para comprovar que a metodologia adotada neste trabalho não foi a mais adequada para a visualização de fluorescência de C-DotB, deve ser testado o método de congelamento das amostras no mesmo período (2 e 30 dias) após a aplicação de C-DotB.

7. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, pode-se ter as seguintes conclusões:

- 1) C-DotB apresentou espectro de absorvância e de excitação na região do ultravioleta (abaixo de 400 nm) e de emissão de fluorescência na região do azul (de 420 até 500 nm).
- 2) Ensaio de citotoxicidade mostrou que a maior concentração de C-DotB (0,1 mg/mL) gerou mortalidade celular significativa para NIH/3T3 e B16F10
- 3) Ensaio de proliferação celular mostrou que células NIH/3T3 têm uma maior curva de crescimento celular que o controle quando expostas por 168 horas a C-DotB em diferentes concentrações (0,01; 0,05 e 0,1 mg/mL). Já as células B16F10 apresentaram curvas de crescimento celular menores que o controle quando expostas as concentrações de 0,05 e 0,1 mg/mL.
- 4) C-DotB não ocasionou, em camundongos C57BL/6, perda de peso corporal, ou alteração no consumo de ração e na ingestão de água pelo período de 30 dias após a sua aplicação.
- 5) Ocorreu aumento no número de células brancas de um grupo monitorado por 30 dias, indicando que, a longo prazo, C-DotB pode causar processos inflamatórios.
- 6) Não foram observadas anormalidades nos parâmetros bioquímicos relacionados a danos hepáticos e renais, apesar de ter sido constatado alterados para a fosfatase alcalina que pode indicar problemas ósseos.
- 7) Não foram encontradas alterações morfológicas no cérebro, pulmão, fígado, baço e rim de animais nos quais foram aplicados C-DotB.
- 8) Não foi possível observar fluorescência de C-DotB nas lâminas histológicas de fluorescência após 2 e 30 dias da aplicação do material.
- 9) Possivelmente, C-DotB ocasionou maior recrutamento de células do sistema imune ao sítio tumoral, visto que foram encontrados vários focos de necrose e infiltrados inflamatórios na região tumoral.
- 10) Diante dos resultados dos experimentos *in vitro* e *in vivo*, Carbon dots recobertos com boronato podem ter aplicação biomédica por serem biocompatíveis e apresentarem baixa toxicidade.

8. Referências

- Alkilany, A. M., & Murphy, C. J. (2010). Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: What we have learned so far? *Journal of Nanoparticle Research*, 12(7), 2313–2333. <http://doi.org/10.1007/s11051-010-9911-8>
- American Cancer Society. Do we know what causes melanoma skin cancer? Atlanta (2016).
- Arami, H., Khandhar, A., Liggitt, D., & Krishnan, K. M. (2015). In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.*, 42(12), 4906. <http://doi.org/10.1039/C5CS00541H>
- Beack, S., Kong, W. H., Jung, H. S., Do, I. H., Han, S., Kim, H., ... Hahn, S. K. (2015). Photodynamic therapy of melanoma skin cancer using carbon dot - Chlorin e6 - Hyaluronate conjugate. *Acta Biomaterialia*, 26, 295–305. <http://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.08.027>
- Baker, S. N., & Baker, G. A. (2010). Luminescent carbon nanodots: Emergent nanolights. *Angewandte Chemie - International Edition*, 49(38), 6726–6744. <http://doi.org/10.1002/anie.200906623>
- Berlot, G., & Pozzato, G. (2015). *Hematologic problems in the critically ill. Hematologic Problems in the Critically Ill*. <http://doi.org/10.1007/978-88-470-5301-4>
- Brasil, Ministério da Saúde, Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro (2016).
- Buzea, C., Pacheco, I. I., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), MR17–R71. <http://doi.org/10.1116/1.2815690>
- Cassette, E., Helle, M., Bezdetnaya, L., Marchal, F., Dubertret, B., & Pons, T. (2013). Design of new quantum dot materials for deep tissue infrared imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(5), 719–731. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2012.08.016>

- Chen, N., He, Y., Su, Y., Li, X., Huang, Q., Wang, H., ... Fan, C. (2012). The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots. *Biomaterials*, *33*(5), 1238–1244. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.070>
- Chinen, A. B., Guan, C. M., Ferrer, J. R., Barnaby, S. N., Merkel, T. J., & Mirkin, C. A. (2015). Nanoparticle Probes for the Detection of Cancer Biomarkers, Cells, and Tissues by Fluorescence. *Chemical Reviews*, *115*(19), 10530–10574. <http://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00321>
- Dobrovolskaia, M. A. (2015). Pre-clinical immunotoxicity studies of nanotechnology-formulated drugs: Challenges, considerations and strategy. *Journal of Controlled Release*, *220*, 571–583. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.056>
- Elmore, S. A. (2006). Enhanced histopathology of the thymus. *Toxicologic Pathology*, *34*(5), 656–665. <http://doi.org/10.1080/01926230600978458>
- Eustis, S., & el-Sayed, M. a. (2006). Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chemical Society Reviews*, *35*(3), 209–217. <http://doi.org/10.1039/b514191e>
- Gamsey, S., Suri, J. T., Wessling, R. A., & Singaram, B. (2006). Continuous glucose detection using boronic acid-substituted viologens in fluorescent hydrogels: Linker effects and extension to fiber optics. *Langmuir*, *22*(21), 9067–9074. <http://doi.org/10.1021/la0617053>
- Ge, J., Lan, M., Zhou, B., Liu, W., Guo, L., Wang, H., ... Han, X. (2014). A graphene quantum dot photodynamic therapy agent with high singlet oxygen generation. *Nature Communications*, *5*, 4596. <http://doi.org/10.1038/ncomms5596>
- Geszke-Moritz, M., & Moritz, M. (2013). Quantum dots as versatile probes in medical sciences: Synthesis, modification and properties. *Materials Science and Engineering C*, *33*(3), 1008–1021. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.003>
- Goy, A., & Gilles, F. (2004). Update on the proteasome inhibitor bortezomib in hematologic malignancies. *Clinical Lymphoma*, *4*(4), 230–237. <http://doi.org/10.3816/CLM.2004.n.003>

- Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C., & Marais, R. (2007). Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*, *445*(7130), 851–857. <http://doi.org/10.1038/nature05661>
- Hamanaka, R. B., & Chandel, N. S. (2012). Targeting glucose metabolism for cancer therapy. *The Journal of Experimental Medicine*, *209*(2), 211–5. <http://doi.org/10.1084/jem.20120162>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Havrdova, M., Hola, K., Skopalik, J., Tomankova, K., Petr, M., Cepe, K., ... Zboril, R. (2016). Toxicity of carbon dots – Effect of surface functionalization on the cell viability, reactive oxygen species generation and cell cycle. *Carbon*, *99*, 238–248. <http://doi.org/10.1016/j.carbon.2015.12.027>
- Hild, W. A., Breunig, M., & Goepferich, A. (2008). Quantum dots - Nano-sized probes for the exploration of cellular and intracellular targeting. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *68*(2), 153–168. <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.06.009>
- Huang, X., Zhang, F., Zhu, L., Choi, K. Y., Guo, N., Guo, J., ... Chen, X. (2013). Effect of injection routes on the biodistribution, clearance, and tumor uptake of carbon dots. *ACS Nano*, *7*(7), 5684–5693. <http://doi.org/10.1021/nn401911k>
- Huang, Y., Vecchio, D., Avci, P., Yin, R., Garcia-diaz, M., & Hamblin, M. R. (2014). Melanoma resistance to photodynamic therapy: new insights, *394*(2), 239–250. <http://doi.org/10.1515/hsz-2012-0228>.
- Jin, X., Sun, X., Chen, G., Ding, L., Li, Y., Liu, Z., ... Wang, J. (2015). PH-sensitive carbon dots for the visualization of regulation of intracellular pH inside living pathogenic fungal cells. *Carbon*, *81*(1), 388–395. <http://doi.org/10.1016/j.carbon.2014.09.071>
- Ke, N., Wang, X., Xu, X., & Abassi, Y. A. (2011). Mammalian Cell Viability. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *740*, 33–43. <http://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6>

- Li, J., Liu, F., Shao, Q., Min, Y., Costa, M., Yeow, E. K. L., & Xing, B. (2014). Enzyme-responsive cell-penetrating peptide conjugated mesoporous silica quantum dot nanocarriers for controlled release of nucleus-targeted drug molecules and real-time intracellular fluorescence imaging of tumor cells. *Advanced Healthcare Materials*, 3(8), 1230–1239. <http://doi.org/10.1002/adhm.201300613>
- Liu, Q., Xu, S., Niu, C., Li, M., He, D., Lu, Z., ... Ouyang, J. (2014). Distinguish cancer cells based on targeting turn-on fluorescence imaging by folate functionalized green emitting carbon dots. *Biosensors and Bioelectronics*, 64, 119–125. <http://doi.org/10.1016/j.bios.2014.08.052>
- Luo, P. G., Sahu, S., Yang, S.-T., Sonkar, S. K., Wang, J., Wang, H., ... Sun, Y.-P. (2013). Carbon “quantum” dots for optical bioimaging. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(16), 2116–2127. <http://doi.org/10.1039/c3tb00018d>
- Meziani, M. J., Liu, J., Liu, Y., Chen, M., & Huang, Y. (2010). Carbon Dots as Nontoxic and High-Performance Fluorescence Imaging Agents. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(42), 18110–18114. <http://doi.org/10.1021/jp9085969>.
- Migita, S., Moquin, A., Fujishiro, H., Himeno, S., Maysinger, D., Winnik, F. M., & Taniguchi, A. (2014). Quantum dots induce heat shock-related cytotoxicity at intracellular environment. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 50(4), 367–372. <http://doi.org/10.1007/s11626-013-9693-2>
- Nowack, B., & Bucheli, T. D. (2007). Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution*, 150(1), 5–22. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.06.006>
- Monge-Fuentes, V. *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. 163 pg. Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília. 2014.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55–63. [http://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

- Nunes, S. M. T., Sguilla, F. S., & Tedesco, A. C. (2004). Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(2), 273–284. <http://doi.org/10.1590/S0100-879X2004000200016>
- Overwijk, W. W., & Restifo, N. P. (2001). *B16 as a Mouse Model for Human Melanoma*. <http://doi.org/10.1002/0471142735.im2001s39.B16>
- Paredes, J. I., & Burghard, M. (2004). Dispersions of Individual Single-Walled Carbon Nanotubes of High Length Owing to their unique physical and chemical properties, 1, 2 carbon nanotubes and particularly single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) are very promising for a wide range of app, (35), 5149–5152.
- Patil, R., Gholap, H., Warule, S., Banpurkar, A., Kulkarni, G., & Gade, W. (2015). Quantum dots conjugated zinc oxide nanosheets: Impeder of microbial growth and biofilm. *Applied Surface Science*, 326, 73–81. <http://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.11.113>
- Roberts, M. C., Hanson, M. C., Massey, A. P., Karren, E. A., & Kiser, P. F. (2007). Dynamically restructuring hydrogel networks formed with reversible covalent crosslinks. *Advanced Materials*, 19(18), 2503–2507. <http://doi.org/10.1002/adma.200602649>
- Ruan, S., Qian, J., Shen, S., Zhu, J., Jiang, X., He, Q., & Gao, H. (2014). A simple one-step method to prepare fluorescent carbon dots and their potential application in non-invasive glioma imaging. *Nanoscale*, 6(17), 10040. <http://doi.org/10.1039/C4NR02657H>
- Schuh, J. C. L. (2004). Trials, tribulations, and trends in tumor modeling in mice. *Toxicologic Pathology*, 32 Suppl 1, 53–66. <http://doi.org/10.1080/01926230490424770>
- Song, Y., Zhu, S., & Yang, B. (2014). Bioimaging based on fluorescent carbon dots. *RSC Advances*, 4(52), 27184–27200. <http://doi.org/10.1039/c3ra47994c>
- Sharifi, S., Behzadi, S., Laurent, S., Forrest, M. L., Stroeve, P., Mahmoudi, M., ... Maistriau, A. (2012). Toxicity of nanomaterials. *Chemical Society Reviews*, 41(6),

2323–2343. <http://doi.org/10.1039/c1cs15188f>.

- Stefanakis, D., Philippidis, A., Sygellou, L., Filippidis, G., Ghanotakis, D., & Anglos, D. (2014). Synthesis of fluorescent carbon dots by a microwave heating process: structural characterization and cell imaging applications. *Journal of Nanoparticle Research*, 16(10). <http://doi.org/10.1007/s11051-014-2646-1>
- Szablewski, L. (2013). Expression of glucose transporters in cancers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1835(2), 164–169. <http://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.12.004>
- Tao, H., Yang, K., Ma, Z., Wan, J., Zhang, Y., Kang, Z., & Liu, Z. (2012). In vivo NIR fluorescence imaging, biodistribution, and toxicology of photoluminescent carbon dots produced from carbon nanotubes and graphite. *Small*, 8(2), 281–290. <http://doi.org/10.1002/smll.201101706>
- Tortiglione, C., Quarta, A., Tino, A., Manna, L., Cingolani, R., & Pellegrino, T. (2007). Synthesis and biological assay of GSH functionalized fluorescent quantum dots for staining *Hydra vulgaris*. *Bioconjugate Chemistry*, 18(3), 829–835. <http://doi.org/10.1021/bc060355t>
- Udristioiu, A., Iliescu, R. G., Cojocaru, M., & Joanta, A. (2014). Alkaline Phosphatase Isoenzymes and Leukocyte Alkaline Phosphatase Score in Patients with Acute and Chronic Disease : A Brief Review. *British Journal of Medicine and Medical Research*, 4(1), 340–350.
- United States of America (USA), National Institutes of Health (NIH). Genetic testing for hereditary cancer syndromes (2013).
- Wang, H., Shen, J., Li, Y., Wei, Z., Cao, G., Gai, Z., ... Zhou, S. (2014). Magnetic iron oxide-fluorescent carbon dots integrated nanoparticles for dual-modal imaging, near-infrared light-responsive drug carrier and photothermal therapy. *Biomaterials Science*, 2(6), 915–923. <http://doi.org/10.1039/C3BM60297D>
- Wang, L., Shen, Y., Song, R., Sun, Y., Xu, J., & Xu, Q. (2009). An anticancer effect of curcumin mediated by down-regulating phosphatase of regenerating liver-3 expression on highly metastatic melanoma cells. *Molecular Pharmacology*,

- 76(6), 1238–45. <http://doi.org/10.1124/mol.109.059105>
- Wang, Y., Anilkumar, P., Cao, L., Liu, J.-H., Luo, P. G., Tackett, K. N., ... Sun, Y.-P. (2011). Carbon dots of different composition and surface functionalization: cytotoxicity issues relevant to fluorescence cell imaging. *Experimental Biology and Medicine*, 236(11), 1231–1238. <http://doi.org/10.1258/ebm.2011.011132>
- X. Xu, R. Ray, Y. Gu, H.J. Ploehn, L. Gearheart, K. Raker, W. A. Scrivens. (2004). Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments. *Journal of the American Chemical Society*, 126(40), 12736–12737. <http://doi.org/10.1021/ja040082h>
- Yang, S. T., Wang, X., Wang, H. F., Lu, F. S., Luo, P. J. G., Cao, L., ... Sun, Y. P. (2009). Carbon Dots as Nontoxic and High-Performance Fluorescence Imaging Agents. *Journal of Physical Chemistry C*, 113(42), 18110–18114. <http://doi.org/10.1021/jp9085969>
- Yang, X., Zhuo, Y., Zhu, S., Luo, Y., Feng, Y., & Dou, Y. (2014). Novel and green synthesis of high-fluorescent carbon dots originated from honey for sensing and imaging. *Biosensors and Bioelectronics*, 60, 292–298. <http://doi.org/10.1016/j.bios.2014.04.046>
- Yokoi, K., Chan, D., Kojic, M., Milosevic, M., Engler, D., Matsunami, R., ... Ziemys, A. (2015). Liposomal doxorubicin extravasation controlled by phenotype-specific transport properties of tumor microenvironment and vascular barrier. *Journal of Controlled Release*, 217, 293–299. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.09.044>
- Zheng, M., Ruan, S., Liu, S., Sun, T., Qu, D., Zhao, H., ... Sun, Z. (2015). Self-Targeting Fluorescent Carbon Dots for Diagnosis of Brain Cancer Cells. *ACS Nano*, 9(11), 11455–11461. <http://doi.org/10.1021/acsnano.5b05575>
- Zheng, X., Shao, D., Li, J., Song, Y., Chen, Y., Pan, Y., ... Chen, L. (2015). Single and repeated dose toxicity of citric acid-based carbon dots and a derivative in mice. *RSC Adv.*, 5(111), 91398–91406. <http://doi.org/10.1039/C5RA18391J>
- Zhou, N., Hao, Z., Zhao, X., Maharjan, S., Zhu, S., Song, Y., ... Lu, L. (2015). A novel fluorescent retrograde neural tracer: cholera toxin B conjugated carbon dots.


Nanoscale, 7(38), 15635–15642. <http://doi.org/10.1039/C5NR04361A>

Zhu, H., Zhang, S., Ling, Y., Meng, G., Yang, Y., & Zhang, W. (2015). PH-responsive hybrid quantum dots for targeting hypoxic tumor siRNA delivery. *Journal of Controlled Release*, 220, 529–544. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.11.017>

Zhu, W., Zhang, J., Jiang, Z., Wang, W., & Liu, X. (2014). High-quality carbon dots: synthesis, peroxidase-like activity and their application in the detection of H₂O₂, Ag⁺ and Fe³⁺. *RSC Adv.*, 4(33), 17387–17392. <http://doi.org/10.1039/C3RA47593J>


9. Anexo 1

Declaração do Comitê de Ética no uso Animal (CEUA)




Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 24 de fevereiro de 2015.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"ANÁLISE DA BIODISTRIBUIÇÃO E TOXICIDADE DE QUANTUM DOTS DE CARBONO RECOBERTOS COM BORONATO (C-DOTSB) EM CAMUNDONGOS FÊMEAS C57BL/6."**, UnBDoC n.º 7652/2015, sob responsabilidade do Professor Sacha Braun Chaves foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de *Mus musculus*: 66. A presente aprovação é válida pelo período de 15/03/2015 a 20/12/2015.



Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior
Coordenador da CEUA

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