

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ELAINE SÁ MENEZES CUTRIM

**SISTEMA NANOESTRUTURADO A BASE DE NANOPONTOS DE CARBONO
PARA O TRANSPORTE E LIBERAÇÃO DO QUIMIOTERÁPICO 5-
FLUOROURACIL**

SÃO LUÍS

2019

ELAINE SÁ MENEZES CUTRIM

**SISTEMA NANOESTRUTURADO A BASE DE NANOPONTO DE CARBONO
PARA O TRANSPORTE E LIBERAÇÃO DO QUIMIOTERÁPICO 5-
FLUOROURACIL**

Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Mestre em Química Analítica
pelo Programa de Pós-graduação em Química da
Universidade Federal do Maranhão

Orientadora: Prof.^a. Dr. Ana Clécia Santos de
Alcântara

Co-orientadora: Ana Paula Silva de Azevedo
dos Santos

SÃO LUÍS
2019

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Sá Menezes Cutrim, Elaine.

Sistema nanoestruturado a base de nanopontos de carbono para o transporte e liberação do quimioterápico 5-Fluorouracil / Elaine Sá Menezes Cutrim. - 2019.
78 f.

Coorientador(a): Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos.

Orientador(a): Ana Clécia Santos de Alcântara.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Química/ccet, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

1. 5-Fluorouracil. 2. Aplicações biomédicas. 3. Materiais híbridos. 4. Pontos quânticos de carbono. 5. Sistema de transporte e liberação de fármacos. I. Santos de Alcântara, Ana Clécia. II. Silva de Azevedo dos Santos, Ana Paula. III. Título.

ELAINE SÁ MENEZES CUTRIM

**SISTEMA NANOESTRUTURADO A BASE DE NANOPONTOS DE CARBONO
PARA O TRANSPORTE E LIBERAÇÃO DO QUIMIOTERÁPICO 5-
FLUOROURACIL**

Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Mestre em Química Analítica
pelo Programa de Pós-graduação em Química da
Universidade Federal do Maranhão

São Luís, 16 de agosto de 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr. Ana Clécia Santos de Alcântara (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão – Departamento de Química

Prof.Dr. Roberto Batista Lima
Universidade Federal do Maranhão – Departamento de Química

Prof.^a Dr. Luciana Magalhães Rebelo Alencar
Universidade Federal do Maranhão – Departamento de Física

À minha mãe pelo apoio e amor incondicionais

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr. Ana Alcântara por todo apoio, orientação e confiança para a realização deste trabalho. A senhora me inspira todos os dias a ser uma pesquisadora e pessoa melhor. Obrigada por tudo, espero aprender muito mais com você!

À Prof.^a Dr. Ana Paula Azevedo por acreditar no potencial deste trabalho e por sempre manter as portas do seu laboratório abertas. Obrigada pela confiança!

Ao Prof.^o Dr. Hernane Barud pelo apoio para a realização deste trabalho. Agradeço, em especial, o auxílio com algumas das técnicas de caracterizações utilizados neste trabalho.

Ao Laboratório de Imunologia Aplicada ao Câncer (LIAC) pela realização dos ensaios de viabilidade celular. Em especial, agradeço a Sulayne e ao André pelo conhecimento transferido e paciência ao me introduzirem nessa nova área de estudo.

Ao Centro de Ciência Exatas e Tecnologia – UFMA pela infraestrutura oferecida que proporcionou o desenvolvimento desta pesquisa. Em especial, a Central Analítica e a Central de Materiais.

Ao Thaylan Pinheiro, pelas medidas de fluorescência.

À Universidade Federal do Maranhão pela minha formação e por me receber novamente, me proporcionando mais uma oportunidade de aprendizado e crescimento profissional e pessoal.

Ao Programa de Pós-graduação em Química da UFMA.

À capes pela bolsa concedida.

Ao CNPq e FAPEMA pelo apoio financeiro.

À minha mãe por todo apoio que permitiu que eu seguisse meu sonho de permanecer na carreira acadêmica. Você é meu porto seguro e minha família. Amo você.

À Eduardo Kayk, por todo amor, amizade, cuidado e companheirismo. Obrigada por todos os momentos compartilhados e por me permitir caminhar ao seu lado. Te amo.

Aos amigos que fiz no Bionanos. Bárbara, Elizaura, Gabriel, Hiza, Jeovan, Mayara, Welton e Rodrigo, meu muito obrigada. Que possamos dividir muitas e muitas outras tardes de café com bolo!

Aos meus amigos do Cativoiro da Sia, Juliana, Lucas e Wemerson. Obrigada por sempre estarem presentes na minha vida. Amo vocês!

*“And I will say that we should take a day to break
away from all the pain our brain has made, the
game is no played alone
And I will say that we should take a moment and
hold it and keep it frozen and know the life has a
hopeful undertone”*

(Migraine – Twenty One Pilots)

*“Insanity laughs, under pressure we’re breaking
Can't we give ourselves one more chance?
Why can't we give love that one more chance?
Why can't we give love?
[...]
'Cause love's such an old fashioned word
And love dares you to care for
The people on the edge of the night
And loves dares you to change our way of
Caring about ourselves
This is our last dance
This is our last dance
This is ourselves
Under pressure”*

(Under Pressure – Queen e David Bowie)

RESUMO

A quimioterapia é uma das abordagens mais convencionais para o tratamento do câncer, no entanto, a utilização dos antineoplásicos apresenta inúmeras desvantagens, tais como baixa eficiência terapêutica, distribuição da droga de forma não efetiva e efeitos colaterais indesejáveis ao paciente. A nanotecnologia vem mostrando notável avanço nessa área ao utilizar nanopartículas para o transporte e liberação de fármacos, sendo capaz de direcionar o fármaco a um alvo biológico específico, reduzir a toxicidade e manter a concentração em nível terapêutico por tempo prolongado. Recentemente, a aplicação dos pontos quânticos de carbono (CQDs) para fins biomédicos têm ganhado bastante destaque devido a sua biocompatibilidade, superfície funcionalizada e propriedades de fotoluminescência. Diversos estudos vêm demonstrando que sua associação com fármacos é benéfica, aumentando a eficácia terapêutica. O 5-Fluoruracil (5-FU) é um quimioterápico amplamente empregado no tratamento de tumores sólidos (colorretal, mama, estômago etc.), que apresenta baixa especificidade e elevada toxicidade. Dessa forma, o principal objetivo deste estudo foi a obter um nanodispositivo para transporte e liberação do 5-FU com intuito de melhorar sua eficiência terapêutica utilizando como estratégia a formação de um material híbrido a partir do ancoramento do fármaco na superfície dos CQDs. Os pontos quânticos de carbono foram sintetizados a partir do tratamento solvotérmico do ácido cítrico e ureia, enquanto que o material híbrido 5-FU-CQD foi preparado a partir do contato da solução do fármaco com os CQDs por meio de *self-assembly*. Diversas técnicas de caracterização foram empregadas para obtenção de informações a respeito da morfologia, estrutura e propriedades ópticas dos materiais. Os resultados indicam que o ancoramento do fármaco na superfície dos CQDs ocorreu por meio de interações eletrostáticas e/ou pontes de hidrogênio entre os grupos funcionais dos CQDs e do 5-FU. O pH ácido favoreceu a liberação do fármaco durante as 12 h primeiras horas de experimento, indicando uma maior tendência do 5-FU em ser liberado no microambiente tumoral. A citotoxicidade dos CQD e do material híbrido 5-FU-CQD foi avaliada frente linhagem de fibroblastos normais (GM07492) e de adenocarcinoma mamário (MCF-7). Os CQDs não apresentaram toxicidade na faixa 12,5 a 800 mg.L⁻¹, indicando que esses materiais são de fato biocompatíveis e podem ser empregados no transporte e liberação do 5-FU em sistemas biológicos. Para o híbrido 5-FU-CQD, observou-se uma redução na toxicidade frente as células normais quando comparado ao 5-FU puro, sugerindo que o ancoramento do fármaco nos CQDs reduziu a toxicidade associada ao fármaco. Para as células cancerígenas o material híbrido 5-FU-CQD exibiu um efeito antitumoral equivalente ao fármaco puro, sugerindo a manutenção da ação antitumoral do fármaco com redução da toxicidade para as células saudáveis.

Palavras-chave: Pontos quânticos de carbono; 5-Fluorouracil; materiais híbridos; sistema de transporte e liberação de fármacos; aplicações biomédicas.

ABSTRACT

Chemotherapy is one of the most conventional approaches to cancer treatment. Nevertheless, the use of chemotherapeutic has numerous disadvantages such as low therapeutic efficiency, high non-productive drug distribution and undesirable side effects to the patient. Nanotechnology has shown remarkable progress in this area using nanoparticles in drug delivery systems. These systems are able to direct the drug to a specific biological target, reduce toxicity and maintain therapeutic concentration levels for a long time. Recently, the application of carbon quantum dots (CQDs) for biomedical purposes has gained much attention due to their biocompatibility, easy surface functionalization and photoluminescence properties. 5-Fluorouracil (5-FU) is an antineoplastic widely used in the treatment of solid tumors (colorectal, breast, stomach, etc.), which has low specificity and high toxicity. Thus, the aim of this study was to obtain a nanodevice for transport and release of 5-FU in order to improve its therapeutic efficiency using as strategy the fabrication of a hybrid material by drug anchorage on the surface of CQDs. Carbon quantum dots were synthesized by the solvothermal treatment of citric acid and urea, while the 5-FU-CQD hybrid material was prepared by self-assembly adding the CQDs into drug solution. Several characterization techniques were employed to obtain information about the morphology, structure and optical properties of the materials. The results indicated that the drug anchorage on CQDs' surface occurred through electrostatic interactions and/or hydrogen bond between the CQDs and 5-FU functional groups. Acid pH favored drug release during the first 12 hours of experiment, indicating a tendency for 5-FU to be released into the tumor microenvironment. The cytotoxicity of CQD and 5-FU-CQD hybrid material was evaluated against normal fibroblast (GM07492) and mammary adenocarcinoma (MCF-7) line cells. The CQDs were non-toxic in the range of 12.5 to 800 mg.L⁻¹, indicating that these materials are indeed biocompatible and can be used as nanocarrier for 5-FU in biological systems. For the 5-FU-CQD hybrid, a reduction in toxicity to normal cells were observed compared to pure 5-FU, suggesting that drug anchoring in CQDs reduced the drug-associated toxicity. Regarding cancer cells, or tumor cells the 5-FU-CQD hybrid material exhibited an antitumor effect equivalent to pure drug, suggesting maintenance of the antitumor action of the drug with reduced toxicity to healthy cells.

Keywords: Carbon quantum dots; 5-Fluorouracil; hybrid materials; drug delivery systems; biomedical applications.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema ilustrativo da comparação de diferentes estruturas com a escala nanométrica	20
Figura 2 - Esquema representativo do aumento da área superficial de partículas a partir da redução de seu volume inicial. A esfera representada a esquerda possui um volume de 1 m^3 com área superficial de $4,836 \text{ m}^2$. O volume total e área de superfície total das esferas a direita são de 1 nm^3 e 4.836 km^2 , respectivamente, representando um aumento de um bilhão de vezes..	22
Figura 3 - Esquema ilustrativo dos principais conceitos relacionados a aplicação da nanotecnologia e seus respectivos exemplos.....	24
Figura 4 - Esquema ilustrativo dos tipos de pontos de carbono: pontos quânticos de grafeno, nanopontos de carbono e pontos poliméricos.....	25
Figura 5 – Solução aquosa dos pontos de carbono passivados com $\text{PEG}_{1500\text{N}}$ (A) excitados em 400 nm e fotografado através de filtros de diferentes comprimentos de onda conforme indicado, e (B) excitados diretamente nos comprimentos de onda indicados. Em C esquema da passivação de superfície dos pontos de carbono com $\text{PEG}_{1500\text{N}}$	26
Figura 6 - Representação esquemática da estrutura dos CQDs.....	27
Figura 7 - Representação esquemática da (A) molécula do 5-Fluorouracil e do (B) Uracil ...	28
Figura 8 - Esquema ilustrativo do procedimento de liberação do 5-FU a partir do material híbrido 5-FU-CQD. A quantidade do fármaco liberada foi determinada por espectroscopia na região do UV-Vis no comprimento de 266 nm	36
Figura 9 - Esquema ilustrativo da reação de conversão de MTT em Formazam pela ação de enzimas oxidorreduases.....	37
Figura 10 - (A) Mistura reacional após a síntese dos CQDs e em (B) solução aquosa dos CQDs na concentração de 20 mg.L^{-1} após processo de purificação e liofilização	40
Figura 11 - (A) Espectros de absorção na região do UV-Vísivel do ácido cítrico, ureia e dos (B) CQDs na faixa de concentração de 5 a 25 mg.L^{-1} . Em (C) observa-se o aumento na intensidade de coloração da solução aquosa dos CQDs conforme aumenta-se a concentração de 5 a 25 mg.L^{-1}	41
Figura 12 - Isoterma de adsorção do 5-Fluorouracil pelos CQDs em solução aquosa a 23°C . Quantidades adsorvidas do 5-FU foram determinadas espectrofotometricamente no comprimento de onda de 266 nm	43
Figura 13 - Espectro de absorção na região do UV-Vis do material híbrido 5-FU-CQD em solução aquosa.....	44

Figura 14 - Padrões de difração dos (A) CND, 5-Fluorouracil puro, do material híbrido 5-FU-CQD e da (B) mistura mecânica entre CQD e 5-Fluorouracil	46
Figura 15 – (A) Espectros Raman dos CQDs, material híbrido 5-FU-CQD e do 5-Fluorouracil obtidos sob linha de excitação em 1064 nm e (B) esquema ilustrativo dos modos vibracionais que originam as bandas D e G no espectro Raman dos materiais	47
Figura 16 - Esquema ilustrativo com átomos numerados da estrutura química do 5-Fluorouracil	48
Figura 17 - Espectroscopia na região do Infravermelho dos CQD, 5-FU e do material híbrido 5-FU-CQD. Análise realizada com resolução espectral de 2 cm^{-1} e as amostras foram preparadas como pastilhas de KBr.....	51
Figura 18 - Potencial zeta da solução dos CQDs e dos materiais híbridos 5-FU-CQD nas proporções de 0,8:1,0 e 1:1 na concentração de $0,1\text{ mg.L}^{-1}$	52
Figura 19 - (A) Solução aquosa dos CQDs excitados por radiação UV (365 nm) e espectros de emissão dos (B) CQDs e do (C) material híbrido 5-FU-CQD em solução excitados na faixa de 400 a 600 nm com incrementos de 20 nm	54
Figura 20 – (A, B) Imagens de TEM dos CQDs e (C) histograma com a distribuição dos tamanhos das partículas com ajuste ao modelo Gaussiano	55
Figura 21 – Curvas TGA e DTA dos (A) CQD, (B) 5-Fluorouracil e do (C) material híbrido 5-FU-CQD. As análises foram realizadas em atmosfera dinâmica de nitrogênio com razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C.min}^{-1}$	57
Figura 22 - Curvas DSC dos (A) CQD, (B) 5-Fluorouracil e do (C) material híbrido 5-FU-CQD. Realizou-se as análises em atmosfera dinâmica de nitrogênio com razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C.min}^{-1}$	58
Figura 23 – Perfil de liberação in vitro do fármaco 5-Fluorouracil a partir do material híbrido 5-FU-CQD em tampão fosfato (pH 7,4) e acetato (pH 5,0) e em detalhe, as curvas até 8 h de liberação em ambos os valores de pH	59
Figura 24 - Viabilidade celular (%) da linhagem GM07492 (fibroblastos humanos normais) tratada com CQDs na faixa de concentração $12,5\text{-}800\text{ mg.L}^{-1}$ nos tempos de incubação de 24, 48 e 72 h. Os resultados são expressos como medida $\pm$ desvio padrão de experimentos independentes. A significância estatística entre os grupos foi denotada por * ($p<0,05$), ** ($p<0,005$) e *** ($p<0,001$).....	60
Figura 25 - Viabilidade celular (%) da linhagem GM07492 (fibroblastos humanos normais) tratada com 5-FU e 5-FU-CQD na faixa de concentração de $0,25\text{-}16\text{ mg.L}^{-1}$ nos tempos de incubação de (A) 24, (B) 48 e (C) 72 h. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio	

padrão de experimentos independentes. A significância estatística entre os grupos foi denotada por * ($p<0,05$), ** ($p<0,005$) e *** ($p<0,001$) 62

Figura 26 - Valores de IC_{50} para o 5-FU frente a linhagem GM07492 nos tempos de incubação de 24, 48 e 72 h..... 63

Figura 27 - Viabilidade celular (%) da linhagem MCF-7 (adenocarcinoma mamário) tratada com 5-FU e 5-FU-CQD na faixa de concentração de 0,25-16 $mg.L^{-1}$ nos tempos de incubação de (A) 24, (B) 48 e (C) 72 h. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão de experimentos independentes. A significância estatística entre os grupos foi denotada por * ($p<0,05$), ** ($p<0,005$) e *** ($p<0,001$). “ns” representa diferença estatística não significativa 65

Figura 28 - Valores de IC_{50} para o 5-FU e o material híbrido 5-FU-CQD frente a linhagem MCF-7 nos tempos de incubação de 24, 48 e 72 h. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão de experimentos independentes. A significância estatística entre os grupos foi denotada por * ($p<0,05$), ** ($p<0,005$) e *** ($p<0,001$). “ns” representa diferença estatística não significativa..... 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de eficiência de ancoramento do 5-Fluorouracil nos materiais híbridos 5-FU-CQD obtidos a partir de diferentes concentrações iniciais do fármaco	44
Tabela 2 - Valores de área superficial e volume total de poros para os CQD e o material híbrido 5-FU-CQD obtidos a partir de isoterma de adsorção-dessorção de N ₂ a -196°C.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-Fluorouracil
5-FU-CQD	Material híbrido a base dos pontos quânticos de carbono e do 5-FU
CQD	<i>Carbon Quantum Dot</i>
DMEN	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
IC ₅₀	<i>Half maximal inhibitory concentration</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) - 2,5-difenil-2H-tetrazólio
MWCO	<i>Molecular Weight Cut-off</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
TEM	<i>Trasmission Electron Microscope</i>
TGA	<i>Thermogravimetric analysis</i>
DRX	Difração de raios-X
DSC	<i>Differential Scanning Calorimeter</i>
DTA	<i>Differential Thermal Analysis</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 Nanotecnologia e nanomateriais.....	20
2.2 Pontos de carbono.....	24
2.3.1 Pontos quânticos de carbono	25
2.3 5-Fluorouracil	28
3 OBJETIVOS.....	30
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos específicos.....	30
4 METODOLOGIA.....	31
4.1 Materiais e reagentes	31
4.2 Obtenção dos pontos quânticos de carbono.....	31
4.3 Preparação de materiais híbridos a base de pontos quânticos de carbono e 5-Fluorouracil	31
4.4 Eficiência de ancoramento do 5-Fluorouracil	32
4.5 Caracterização dos materiais	32
4.5.1 Espectroscopia na região do UV-Vísivel	32
4.5.2 Difração de Raios-X.....	33
4.5.3 Espectroscopia Raman	33
4.5.4 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier	33
4.5.5 Potencial zeta	34
4.5.6 Espectroscopia de Fluorescência.....	34
4.5.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	34
4.5.8 Isotermas de Adsorção-Dessorção de Nitrogênio.....	34
4.5.9 Análises térmicas	35
4.6 Liberação <i>in vitro</i> do fármaco	35

4.7 Ensaaios biológicos	36
4.7.1 <i>Cultura celular</i>	36
4.7.2 <i>Ensaio MTT</i>	37
4.7.3 <i>Análise estatística</i>	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 Considerações gerais	39
5.2 Caracterização dos materiais	39
5.2.1 <i>Caracterização estrutural</i>	45
5.2.1 <i>Propriedades de fotoluminescência</i>	52
5.2.2 <i>Análises térmicas</i>	55
5.3 Liberação <i>in vitro</i> do 5-Fluorouracil	58
5.4 Viabilidade celular.....	59
6 CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS	70
APÊNDICE A – Curva de calibração e espectros de absorção do 5-Fluorouracil em água	75
APÊNDICE B – Curva de calibração e espectros de absorção do 5-Fluorouracil em tampão acetato 0,1 M (pH 5,0).....	76
APÊNDICE C – Curva de calibração e espectros de absorção do 5-Fluorouracil em tampão fosfato salino 0,1 M (pH 7,4)	77
APÊNDICE D – Representação do teste colorimétrico de viabilidade MTT utilizando o 5-Fluorouracil frente linhagem MCF-7	78

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um dos maiores problemas de saúde pública em todo mundo, sendo a segunda principal causa de morte em nível global (OPAS, 2018). Segundo relatório divulgado pela *International Agency for Research on Cancer – IARC*, estima-se o surgimento de 29,5 milhões de casos de câncer até 2040, resultando em aproximadamente 16,4 milhões de mortes. Quando comparado a previsão realizada para 2018, observou-se um aumento de 69,1% (18,1 milhões) na incidência de câncer e de 71,1% (9,5 milhões) nos casos de morte (IARC, 2019). O tratamento desta doença depende de terapias convencionais, como a intervenção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia, ou a combinação entre estes, onde a principal estratégia consiste em remover as células doentes em uma velocidade maior do que as células saudáveis. Atualmente, a quimioterapia é a principal abordagem utilizada, porém, apesar do notável progresso feito na área, existem algumas desvantagens na sua aplicação. Dentre estas, pode-se citar a baixa eficiência terapêutica, a distribuição de drogas de forma não efetiva, o que resulta na aplicação de doses progressivamente mais elevadas para alcançar os efeitos terapêuticos adequados, acarretando efeitos colaterais tóxicos (RAJ et al., 2016; RIEHEMANN et al., 2009).

O 5-Fluorouracil (5-FU) tem sido extensivamente utilizado nos últimos 70 anos no tratamento de diversos tipos de cânceres, incluindo o colorretal, de mama, cabeça e pescoço (LONGLEY et al., 2003). No entanto, o 5-FU é absorvido de forma irregular e incompleta, o que pode ser atribuído ao curto tempo de meia-vida da molécula (entre 5 a 20 min), resultando em um breve período de exposição das células tumorais ao princípio ativo. Dessa forma, a manutenção de concentrações terapeuticamente efetivas do quimioterápico requer administração contínua de doses elevadas, o que, conseqüentemente, provoca diversos efeitos colaterais. Mielotoxicidade (distúrbio da medula óssea), distúrbios do trato gastrointestinal, estomatite, neuro e cardiotoxicidades, náuseas, vômitos, alopecia e dermatite são os principais efeitos tóxicos associados ao 5-FU (MALET-MARTINO e MARTINO, 2002).

Nos últimos anos, a nanotecnologia tem ganhado notável reconhecimento devido aos seus esforços que beneficiaram todos as áreas da medicina, mas em especial a oncologia. Inicialmente, a aplicação mais usual da nanomedicina relacionava-se com o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e técnicas de obtenção de imagem, no entanto, com o desenvolvimento da nanotecnologia, suas aplicações estenderam-se além desses usos iniciais (ALEXIS et al., 2008). Há aproximadamente 40 anos, ocorreu o desenvolvimento do primeiro nanocarreador descrito como um lipossoma, no entanto, no decorrer desse tempo, foram desenvolvidos diversos sistemas nanocarreadores com propriedades físicas e químicas distintas,

sendo alguns deles os dendrímeros, micelas, partículas magnéticas, nanopartículas poliméricas, nanotubos de carbono dentre outros (BANGHAN et al., 1965; CUENCA et al., 2016). De forma geral, os nanocarreadores atuam melhorando a eficácia do fármaco, diminuindo sua toxicidade e mantendo a concentração do fármaco em nível terapêutico por tempo prolongado. Além disso, podem melhorar a solubilidade e a estabilidade do fármaco, bem como facilitar o desenvolvimento de nanoplataforma multifuncionais para aplicação na terapia e no diagnóstico, simultaneamente (ALEXIS et al., 2008).

Os pontos quânticos de carbono (do inglês, *Carbon quantum dots* – CQD) têm atraído bastante atenção devido suas propriedades com enorme potencial de aplicação. Esses materiais apresentam elevada solubilidade em água, excelente biocompatibilidade, baixa toxicidade e elevada estabilidade ao fotobranqueamento. Essas características dão suporte para aplicação dos CQDs em bioimagem, biosensores, fotocatalise, sistema de transporte e liberação de fármacos (LI et al., 2012; MIAO et al., 2015; NANDARI et al., 2017). Diversos estudos vêm sendo publicados utilizando os pontos quânticos de carbono como nanocarreadores, comprovando seu potencial em sistemas de transporte e liberação de fármaco, no entanto trabalhos utilizando o quimioterápico 5-Fluorouracil são escassos. Wang et al., (2013) realizaram estudo com pontos de carbono poroso (HCD) para o transporte da doxorrubicina (DOX) e obtiveram um sistema com rápida absorção celular, liberação controlada pelo pH, sendo a fotoluminescência do sistema HCD-DOX explorada para obtenção de imagem celular. Já Beack et al., (2015) utilizando pontos de carbono conjugados com clorina e6 para o tratamento de câncer de pele melanoma, obtiveram um efeito antitumoral favorável em um modelo *in vivo*.

Sabe-se que a exposição das células normais a concentrações terapeuticamente efetivas do 5-FU é o principal fator limitante para seu uso devido a sua citotoxicidade elevada. Além disso, a absorção deste composto no organismo ocorre de forma irregular e incompleta, principalmente, em razão do curto tempo de meia-vida da molécula. No sentido de minimizar os efeitos colaterais tóxicos, um sistema de transporte e liberação adequado do fármaco faz-se necessário. Dessa forma, o principal objetivo deste estudo foi desenvolver um nanodispositivos utilizando os CQDs como nanocarreador para o transporte e liberação do antineoplásico 5-Fluorouracil como estratégia de melhoramento da eficiência terapêutica dessa droga.

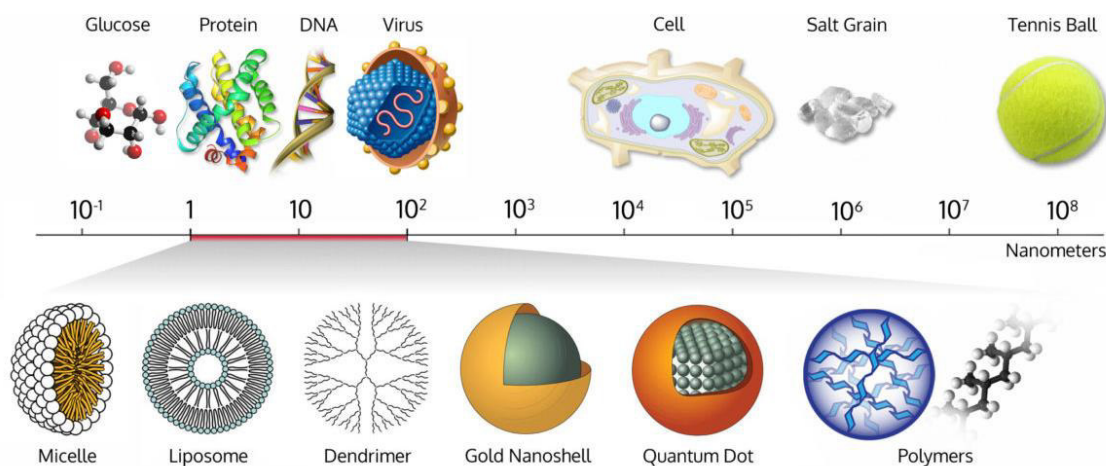
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Nanotecnologia e nanomateriais

A nanotecnologia pode ser definida de forma simples como “tecnologia aplicada em nanoescala” ou “engenharia com precisão atômica”, no entanto, tais definições não abrangem a obtenção de novas estruturas com propriedades únicas e funcionalidades avançadas tão características da nanociência. Estes aspectos foram bem abordados por Ramsden (2016), onde define que a essência da nanotecnologia reside na habilidade de trabalhar em nível molecular, átomo por átomo, para criar estruturas com organização molecular fundamentalmente novas que exibem propriedades físicas, químicas e biológicas novas e significativamente superior devido as interações em nanoescala. Em todas as possíveis definições da nanotecnologia, há o significado implícito de que, como para qualquer tecnologia, o resultado final deve ser a aplicação prática.

O prefixo grego “nano” é derivado da palavra “anão” e refere-se a uma redução no tamanho da ordem de 10^{-9} , sendo este valor mil vezes menor que um micron. Os nanomateriais apresentam uma ou mais dimensões em escala nanométrica, variando de 1 a 100 nm, onde cada unidade corresponde entre 3 a 10 átomos, a depender da sua natureza. Como comparação, o fio de cabelo humano possui de 50.000 a 100.000 nm de espessura, as hemácias apresentam aproximadamente 5.000 nm de diâmetro e as mais simples moléculas orgânicas tem dimensões que variam entre 0,5 a 5 nm (HORNYAK e RAO, 2016). A Figura 1 apresenta a escala nanométrica, associando-a a diversos tipos de materiais (micelas, dendrímeros, *quantum dots*) e estruturas biológicas (proteína, vírus, célula).

Figura 1 - Esquema ilustrativo da comparação de diferentes estruturas com a escala nanométrica



Fonte: National Institute for Occupational Health¹

¹ Disponível em: <<http://www.nioh.ac.za/topics/nanotechnology/>>. Acesso em: 27/07/2019.

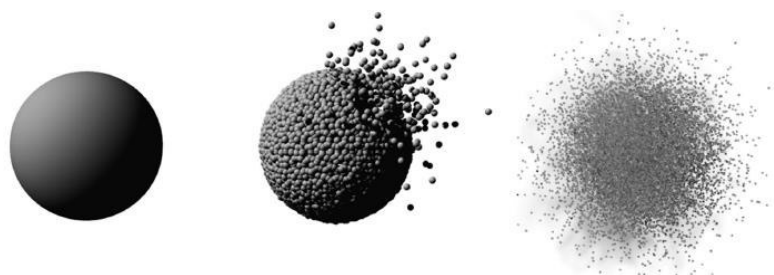
O interesse pelo desenvolvimento de nanomateriais é bastante recente, no entanto, pode-se afirmar que estas estruturas existem há bilhões de anos, desde que os átomos e moléculas começaram a se organizar em estruturas mais complexas que deram origem a vida. Um ótimo exemplo desse fato é a fotossíntese, processo no qual as folhas transformam a luz do sol em energia bioquímica utilizável pelas plantas. Os cloroplastos, responsáveis pela coloração verde das plantas, possuem centenas de tilacóides em seu interior que armazenam pigmentos. Esses pigmentos são moléculas em nanoescala que ao absorverem, energia luminosa (fótons), passam ao estado excitado, atuando como agentes redutores. Assim, estabelece-se um fluxo de elétrons que desencadeia a reação na qual oxigênio e glicose são sintetizados a partir da água e dióxido de carbono (ASHBY et al., 2009). Além dos processos presentes na natureza, pode-se considerar também que o homem pratica a nanotecnologia de forma empírica há milênios. A tinta nanquim, por exemplo, desenvolvida pelos chineses há mais de 2 mil anos, é constituída de nanopartículas de carvão suspensas em uma solução aquosa. Sabe-se que as nanopartículas tendem a se agregar em solução, porém, os chineses antigos descobriram que era possível estabilizar a tinta nanquim pela mistura de uma cola (goma arábica) na solução com pó de carvão e água. Hoje é possível entender que, ao se ligarem a superfície das nanopartículas de carvão, as moléculas de cola impedem sua agregação e, portanto, permitem sua dispersão em solução (PIMENTA e MELO, 2007). Assim, além dos inúmeros processos em escala nanométrica associados a sistemas biológicos, também há diversos sistemas nanocompósitos empiricamente desenvolvidos pelo homem desde os primórdios da civilização.

Historicamente, o interesse explícito pelo estudo e desenvolvimento da nanotecnologia costuma ter seu marco inicial associado à palestra ministrada em 1959 pelo físico americano Richard Feynman intitulada “Há muito espaço lá em baixo” (do inglês, *There's plenty of room at the bottom*). Nesta palestra, Feynman sugeriu que o homem conseguiria manipular objetos de dimensões atômicas e assim construir estruturas de dimensões nanométricas (PIMENTA e MELO, 2007). O conceito descrito por este pesquisador só se tornou realidade em 1982 quando Gerd Binnig e Heinrich Rohrer desenvolveram o Microscópio de Varredura por Tunelamento, na Suíça (BINNIG e ROHRER, 1982). Além de produzir imagens em escala atômica, este equipamento permitiu a manipulação de átomos individuais, ou seja, mover de forma controlada átomos de uma espécie depositando-os na superfície de outro material. Assim, a visão de Feynman sobre a construção de estruturas nanométricas, átomo a átomo, começou a tornar-se concreta.

O grande potencial apresentado pela nanotecnologia reside no fato de que as propriedades dos materiais em nanoescala podem ser bem diferentes das de seus precursores.

Quando as dimensões de um material são reduzidas a valores abaixo de 100 nm, novas propriedades podem começar a emergir, sendo este um efeito direto das mudanças na morfologia, distribuição de tamanho das partículas, fenômenos interfaciais e ao efeito de confinamento quântico (NASROLLAHZADEH et al., 2019). Como exemplo, pode-se citar o efeito da área superficial considerando uma esfera de um material com volume de 1 m^3 (Figura 2). Ao dividir esse material em 1027 esferas individuais menores, cada uma com volume de 1 nm^3 , a área superficial total será igual a 4.836 km^2 , ou seja, uma magnificação de um bilhão de vezes em relação a área superficial da esfera inicial. Esse fato atua modificando ou aprimorando as reações de superfície, uma vez que o aumento da proporção área superficial/volume do material leva a uma maior proximidade dos átomos da superfície que então reagem de forma mais efetiva. Em termos do efeito de confinamento quântico pode-se citar como exemplo os *quantum dots* (partículas menores que 10 nm) que exibem propriedades de fluorescência dependentes do tamanho da partícula. De forma semelhante, as nanopartículas de ouro (cerca de 20 nm) apresentam uma coloração vermelho-escuro em solução. Sob uma redução menor de suas dimensões, o ouro se transforma em um material reativo, com excelentes propriedades catalíticas que não são apresentadas pelo ouro metálico (HORNYAK e RAO, 2016).

Figura 2 - Esquema representativo do aumento da área superficial de partículas a partir da redução de seu volume inicial. A esfera representada a esquerda possui um volume de 1 m^3 com área superficial de $4,836 \text{ m}^2$. O volume total e área de superfície total das esferas a direita são de 1 nm^3 e 4.836 km^2 , respectivamente, representando um aumento de um bilhão de vezes



Fonte: Hornyak e Rao (2016)

Os nanomateriais podem ser desenvolvidos de maneira controlada de modo que sejam criadas propriedades inovadoras e desempenho superior. Existem diversas razões pelas quais a nanotecnologia se tornou importante para o desenvolvimento da ciência e tecnologia. Algumas destas razões são indicadas resumidamente abaixo (NASROLLAHZADEH et al., 2019):

- Em nanoescala, os materiais apresentam uma relação entre área de superfície e o volume elevada, fornecendo grande vantagem para aplicação em catálise e em reações interfaciais;

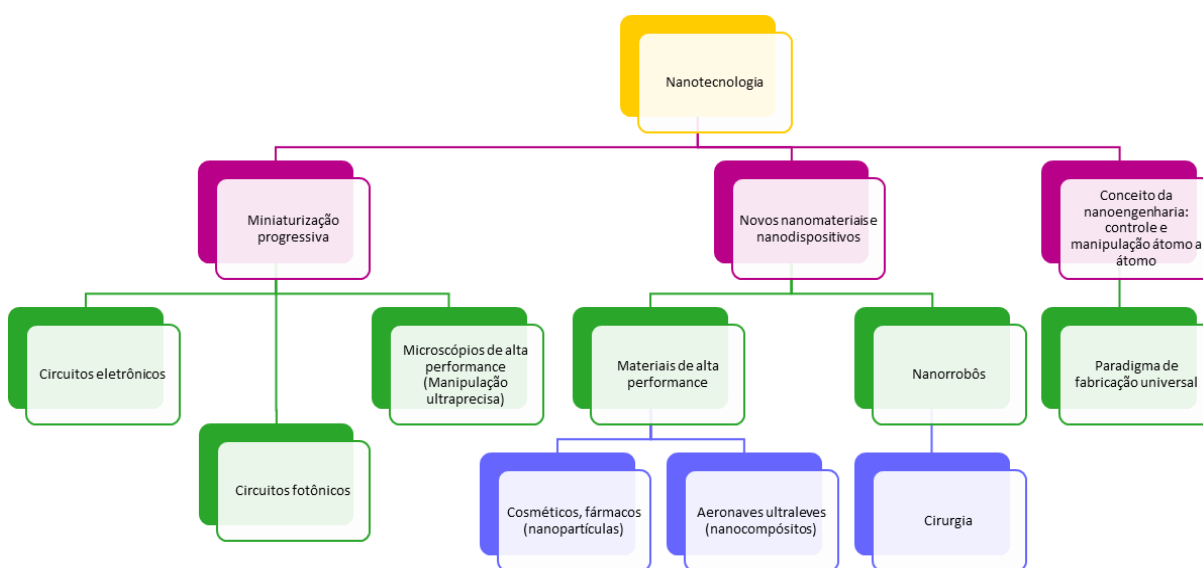
- Os materiais em nanoescala têm elevado potencial para atuação na área ambiental, em termos de procedimentos industriais mais limpos e obtenção de produtos ambientalmente “corretos”. Esses materiais são bastante promissores no enfrentamento de desafios tecnológicos e ambientais na área da catálise, conversão de energia solar e tratamento de água;
- Os nanomateriais vêm permitindo o maior entendimento dos sistemas biológicos, uma vez que suas estruturas moleculares se organizam de forma sistemática em nanoescala. A partir do desenvolvimento da nanotecnologia, já é possível acessar células utilizando esses materiais;
- Estruturas que sofrem reforços dos nanomateriais apresentam melhora em suas propriedades, sejam elas mecânicas, como resistência, dureza, compressão e maleabilidade, ou eletrônicas, possuindo funções mais sofisticadas, circuito menores e mais rápidos, que podem atuar reduzindo significativamente o consumo de energia, por exemplo.

Dentro das razões mencionadas acima, existem alguns conceitos implícitos que se relacionam a forma como a nanotecnologia atua no desenvolvimento de novas estruturas, portanto devem ser discutidos de forma mais clara. O primeiro destes refere-se à miniaturização progressiva das tecnologias já existentes, o que permite o surgimento de novas áreas de aplicação. A história do telefone celular é um bom exemplo de como ocorre esse processo. Baseado em válvulas termiônicas (tubos de vácuo), o circuito de um telefone celular ocuparia a princípio o volume de um edifício de vários andares. O conceito do celular, que data da década de 1950, só se tornou possível quando os circuitos e seus componentes ficaram pequenos o suficiente para caber em um aparelho. O tamanho reduzido dos componentes de um circuito permite que sistemas com maior complexidade e eficiência sejam realizados, além de levar a uma economia de energia (RAMSDEN, 2005). Assim, a redução dos materiais a nanoescala, representa por si só, uma forma de tecnologia.

Além da miniaturização, a nanotecnologia também fornece novos materiais, como as nanopartículas ou os *nanorobots*. Como já discutido anteriormente, essas estruturas podem trazer novas funcionalidades ou o aprimoramento das já existentes. Todavia, as propriedades apresentadas pelos nanomateriais não podem ser previstas a partir do comportamento do material precursor. Assim, a habilidade de controlar e manipular as características dessas nanoestruturas faz-se necessário para explorar o total potencial dos nanomateriais. O terceiro conceito se refere ao fato de que a nanotecnologia representa um novo patamar para a realização

da pesquisa. A partir da nanociência é possível estudar os processos que ocorrem nos mais variados sistemas em escala manométrica, considerando as interações de cada átomo da matéria de forma individual. Dessa forma, esse tipo de investigação pode promover o entendimento de muito fenômenos que até então, não são completamente elucidados (RAMSDEN, 2005). A Figura 3 demonstra estes conceitos e seus respectivos exemplos em termos de aplicação prática.

Figura 3 - Esquema ilustrativo dos principais conceitos relacionados a aplicação da nanotecnologia e seus respectivos exemplos



Autor: Adaptado de Ramsden (2005)

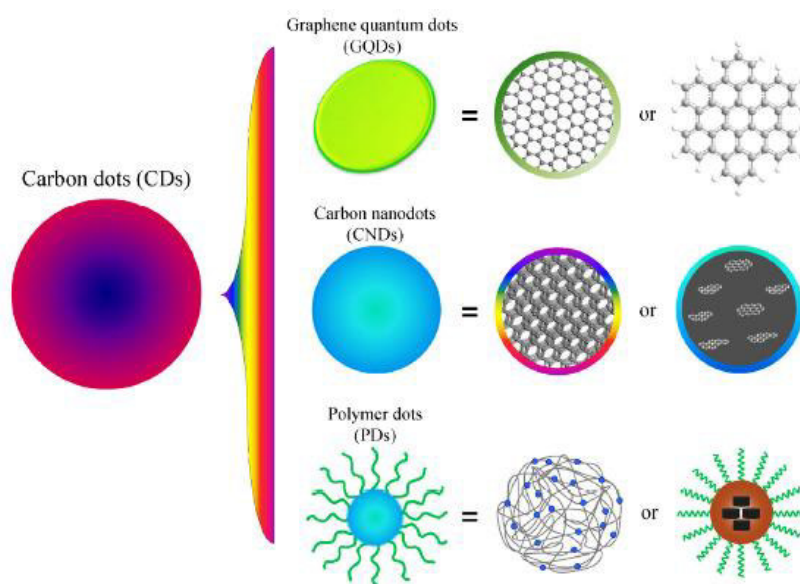
O desenvolvimento desta área está intimamente ligado ao progresso instrumental recente que possibilitou não somente a visualização, como também a manipulação controlada de átomos individuais. O potencial de aplicação das nanotecnologias representa uma nova fronteira do conhecimento em que os limites entre a química, física e biologia são reduzidos à medida que há uma convergência de interesses. Portanto, é uma área de desenvolvimento que possui enorme potencial científico, tecnológico e econômico. O campo nanotecnológico vem gerando impactos em diversas áreas, tais como agricultura, energia, meio ambiente, ciência dos materiais e medicina. Ademais, com mão de obra adequada e financiamento contínuo, espera-se que as contribuições da nanotecnologia para sociedade sejam ainda maiores (PIMENTA e MELO, 2007).

2.2 Pontos de carbono

Os pontos de carbono (CD, do inglês *carbon dots*.) são uma classe de nanomateriais a base de carbono que possuem, necessariamente, pelo menos uma dimensão menor que 10 nm

e apresentam a fluorescência como uma de suas propriedades intrínsecas. A estrutura destes materiais consiste em carbono sp^2/sp^3 e oxigênio/nitrogênio ou agregações poliméricas. Como demonstrado na Figura 4, os CDs incluem os chamados pontos quânticos de grafeno (*Graphene quantum Dots* - GQD), nanopontos de carbono (*Carbon nanodots* - CND) e os pontos poliméricos (*Polymer dots* - PD). Os GQDs possuem uma única ou algumas camadas de grafeno com grupos contendo oxigênio/nitrogênio em suas extremidades. Eles possuem propriedades anisotrópicas e apresentam dimensões laterais maiores que sua altura (TAO et al., 2017). Enquanto isso, os CNDs apresentam morfologia esférica e podem ser divididos em nanopartículas de carbono (do inglês, *Carbon nanoparticles* – CNP), que não possuem uma estrutura cristalina organizada, e pontos quânticos de carbono que possuem uma estrutura cristalina com certo nível de organização. Devido a esta diferença na organização estrutural, as propriedades de fotoluminescência dos CNDs podem ser bem diferentes. Por fim, os pontos poliméricos são agregados ou reticulados obtidos a partir de polímeros lineares ou monômeros. Além disso, o centro aromático e cadeias poliméricas podem se automontar (*self-assembly*) para formar os PDs (ZHU et al., 2015).

Figura 4 - Esquema ilustrativo dos tipos de pontos de carbono: pontos quânticos de grafeno, nanopontos de carbono e pontos poliméricos



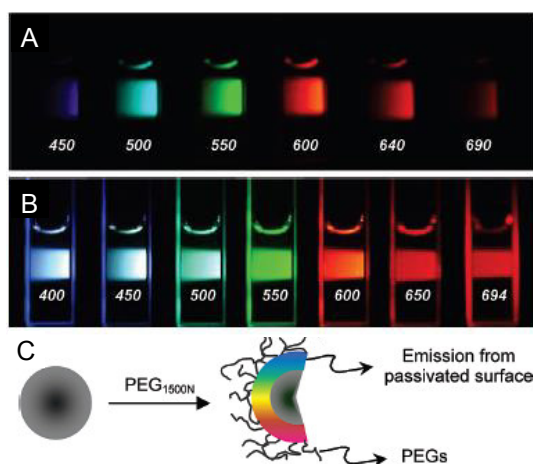
Fonte: Zhu et al., (2015)

2.3.1 Pontos quânticos de carbono

Os pontos quânticos de carbono foram obtidos pela primeira vez acidentalmente durante a purificação de nanotubos de carbono de parede simples (SWNTs) sintetizados por meio de eletroforese em 2004 (XU et al., 2004), no entanto, sua descoberta só despertou interesse dois

anos depois com o estudo realizado por Sun et al., (2006). Neste estudo, os autores obtiveram partículas com intensa fotoluminescência, cobrindo toda a região do visível até o infravermelho próximo (Figura 5A e 5B), a partir da passivação de superfície dos pontos de carbono com polietilenoglicol (PEG_{1500N}). Além dessa molécula, também foi utilizado o poli(propioniletilenoimina-*co*-etilenimina) (PPEI-EI) para reação de superfície, obtendo-se resultados semelhantes. Tais moléculas, além de biocompatíveis, podem facilitar a conjugação dos pontos de carbono com anticorpos ou com outras espécies bioativas. Nesse trabalho, os autores destacaram a utilização dos pontos de carbono passivados para a obtenção de imagens de sistemas biológicos, gerando a possibilidade de aplicação deste material nas áreas da medicina e biologia. Desde então, inúmeros estudos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de obter uma melhor compreensão sobre as origens do seu comportamento fotoluminescente, alcançar melhores rotas sintéticas e desenvolver novas aplicações para essa classe de nanomateriais.

Figura 5 – Solução aquosa dos pontos de carbono passivados com PEG_{1500N} (A) excitados em 400 nm e fotografado através de filtros de diferentes comprimentos de onda conforme indicado, e (B) excitados diretamente nos comprimentos de onda indicados. Em C esquema da passivação de superfície dos pontos de carbono com PEG_{1500N}



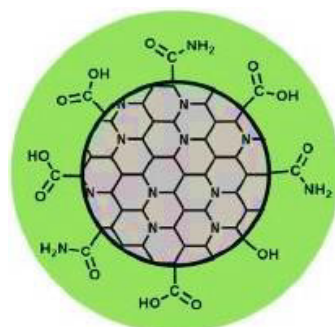
Fonte: Sun et al., (2016)

Os CQDs são tipicamente partículas esféricas com diâmetros menores que 10 nm em todas as três dimensões, cujo centro é constituído majoritariamente de carbono sp², indicando a existência de um sistema conjugado (MIAO et al., 2012). Em contrapartida, a superfície destes materiais depende das fontes de carbono e do método empregado na síntese. Desde a descoberta dos CDQs, foram desenvolvidas diversas rotas de obtenção que visam alcançar metodologias simples, de baixo custo que produzam CQDs de alta qualidade e em larga escala. A partir do precursor escolhido, os métodos podem ser divididos em duas classes: *top-down* e *bottom-up*. A primeira destas estratégias envolve a quebra de estruturas relativamente macroscópicas tais

como nanodiamantes, nanotubos de carbono, grafite etc. Os métodos eletroquímicos, descarga por arco e irradiação por laser são os mais utilizados dentro dessa classe. Esse tipo de síntese possui como desvantagens o elevado consumo de energia e a necessidade de materiais e/ou instrumentos caros. Na segunda classe de síntese, do tipo *bottom-up*, fontes orgânicas são requeridas para a obtenção dos CQDs. Neste caso, a modificação estrutural ocorre sob determinadas condições geradas, principalmente, pelo efeito da temperatura (tratamento térmico) ou pelo tratamento por microondas ou ultrassom. Há uma ampla gama de fontes de carbono que podem ser escolhidas, tais como ácido cítrico, citrato de amônio, quitosana, lisina, leite, suco de laranja, dentre outros. Esse tipo de abordagem envolve a transformação dos precursores através de processos de desidratação, polimerização, carbonização e passivação (HOLA et al., 2014; ROY et al., 2015).

Estes materiais apresentam diversos grupos funcionais em sua superfície (Figura 6), tais como, amino, carbonila, hidroxila e epóxi que garantem elevada solubilidade em água e facilidade para funcionalização com moléculas ou espécies biológicas. Além disso, os CQDs podem ter suas estruturas dopados ou superfície passivada com pequenas moléculas orgânicas ou polímeros, tendo como principal objetivo melhorar a propriedade de fotoluminescência e aumentar a solubilidade dos CQDs em um determinado solvente (WANG et al., 2011). Os pontos quânticos de carbono obtidos pela técnica *top-down*, requerem uma etapa a parte para a funcionalização da superfície, enquanto que na estratégia do tipo *bottom-up* a síntese e a funcionalização ou dopamento podem ser feitas em uma única etapa (PENG et al., 2017).

Figura 6 - Representação esquemática da estrutura dos CQDs



Autor: Adaptado de Qu et al. (2016)

Os CQDs apresentam propriedades de fotoluminescência bastante interessantes que dependem de seu tamanho, ligantes da superfície (agentes passivação e/ou grupos funcionais) e de defeitos estruturais. A emissão dependente do comprimento de excitação é característica da maioria dos CQDs, abrangendo desde a região do UV até regiões do infravermelho próximo. Por outro lado, propriedades de emissão independentes do comprimento de excitação são relatadas em CQDs que apresentam

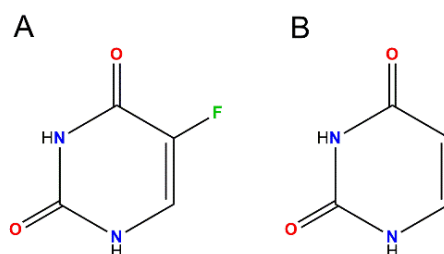
distribuições de morfológicas bastante homogêneas. Além disso, a fotoluminescência apresentada pelos pontos quânticos de carbono exibe, geralmente, alta fotoestabilidade, resistindo ao fotobranqueamento – referindo-se a perda da fluorescência - o que é muito importante para aplicações que requerem emissões por longos períodos, tornando este tipo de material bastante interessante em bioimagem, por exemplo (ROY et al., 2015; WEI et al., 2014).

Assim, devido à suas propriedades de fotoluminescência, elevada superfície para funcionalização e solubilidade em água, biocompatibilidade, facilidade de síntese, e baixa toxicidade, os pontos quânticos de carbono têm encontrado grande potencial de aplicação em bioimagem (DAS et al., 2017; PARVIN e MANDAL, 2017; WANG et al., 2017), biosensores (BANO et al., 2018; BHARATHI et al., 2019; LOO et al., 2016) e sistema de transporte e liberação de fármacos (FENG et al., 2016; YUAN et al., 2017; YANG et al., 2016).

2.3 5-Fluorouracil

O 5-Fluorouracil (Figura 7A) foi sintetizado pela primeira vez em 1957 por Heidelberger et al., (1957) sendo uma molécula análoga ao uracil (Figura 7B) – uma das quatro bases nitrogenadas encontradas no ácido ribonucleico (RNA) – com uma substituição do hidrogênio na posição C-5 pelo átomo de flúor. As fluoropirimidinas como o 5-FU foram desenvolvidas na década de 1950 após observações de que células cancerígenas de hepatomas (tumores no fígado) de roedores incorporavam com maior rapidez a pirimidina uracil quando comparado aos tecidos normais, indicando que o metabolismo do uracil possuía potencial para ser utilizado na quimioterapia (RUTMAN et al., 1954).

Figura 7 - Representação esquemática da (A) molécula do 5-Fluorouracil e do (B) Uracil



Fonte: Autor (2019)

Além de ser classificado como uma fluoropirimidina, o 5-FU também faz parte do grupo de quimioterápicos antimetabólitos. Os fármacos assim designados, atuam inibindo processos biossintéticos essenciais ao funcionamento da célula ou incorporando-se a macromoléculas, como DNA e RNA comprometendo sua função inicial. O mecanismo de citotoxicidade do 5-FU está associado a estes dois processos, que ocorrem devido a incorporação de

fluoronucleotídeos no DNA ou RNA que desencadeiam o processo de apoptose, e a inibição da enzima timidilato síntase (LONGLEY et al., 2003).

Segundo lista divulgada em 2019 pela Organização Mundial de Saúde, o 5-FU configura como um dos medicamentos essenciais, o que só comprova o fato deste ser um fármaco consagrado na terapia do câncer (WHO, 2019). Este composto é um dos mais efetivos no tratamento de tumores sólidos, incluindo câncer colorretal, de mama, cabeça, pescoço e do trato aerodigestivo (LONGLEY et al., 2003). No entanto, quando administrado por via oral o 5-FU é absorvido de forma irregular e incompleta, o que pode ser atribuído ao curto tempo de meia-vida da molécula (entre 5 a 20 min) resultando em um breve período de exposição das células tumorais ao quimioterápico (LEE et al., 2016). Dessa forma, a manutenção de concentrações terapeuticamente efetivas do quimioterápico requer administração contínua de doses elevadas, o que, consequentemente, provoca diversos efeitos colaterais. Mielotoxicidade (distúrbio da medula óssea), síndrome mão-pé (eritrodisestesia palmo-palmar) distúrbios do trato gastrointestinal, neuro e cardiotoxicidades, alopecia e dermatite são os principais efeitos tóxicos associados ao 5-FU (MALET-MARTINO e MARTINO, 2002). Dessa forma, faz-se necessário o estudo de potenciais sistemas para o transporte do 5-FU com o intuito de melhorar sua eficiência terapêutica e reduzir os efeitos colaterais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver um nanodispositivo a base de pontos quânticos de carbono para o transporte e liberação do quimioterápico 5-Fluorouracil visando o melhoramento da eficiência terapêutica associada a esta droga para uma futura administração intravenosa.

3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar os pontos quânticos de carbono a partir do ácido cítrico e ureia utilizando o tratamento térmico como estratégia;
- Preparar o material híbrido a base de pontos quânticos de carbono e 5-Fluorouracil e avaliar a eficiência associado ao processo;
- Obter perfil de liberação *in vitro* do 5-Fluorouracil a partir do material híbrido em diferentes meios simulando fluídos biológicos;
- Caracterizar as diversas etapas do processo utilizando técnicas físico-químicas (UV-Visível, FT-IR, DRX, Espectroscopia Raman etc);
- Determinar a citotoxicidade *in vitro* associada aos diversos materiais frente linhagem de célula saudável e cancerígena.

4 METODOLOGIA

4.1 Materiais e reagentes

O ácido cítrico e a ureia utilizados na síntese dos CQDs foram comprados da Dinâmica. Dimetilformamida foi adquirida da Exôdo Científica e NaOH em pastilha foi comprado pela Carlo Erba. O fármaco 5-FU (pureza>99%) e membrana de diálise (MWCO = 2000 Da) foram adquiridos pela Sigma-Aldrich. Soluções tampões que mimetizaram o ambiente fisiológico e o microambiente tumoral foram preparados com reagentes de pureza analítica: Na_2HPO_4 (>99%, Dinâmica), KH_2PO_4 (<99%, Dinâmica), NaCl (>99%, Isofar), ácido acético e acetato de sódio (>99%, Isofar). Água deionizada com resistividade de 18.2 M Ω .cm, obtida a partir do sistema de purificação DIRECT-Q®, Merck Millipore.

4.2 Obtenção dos pontos quânticos de carbono

A síntese dos pontos quânticos de carbono foi realizada a partir do tratamento solvotérmico do ácido cítrico e da ureia segundo metodologia descrita por Qu et al., (2016). Inicialmente, 1g de ácido cítrico e 2g de ureia foram solubilizados em 10 mL de dimetilformamida com o auxílio do banho ultrassônico. A solução foi transferida para uma autoclave de aço inoxidável revestido de teflon com capacidade de 15 mL e aquecida a 160°C durante 6h. Decorrido o tempo de reação, a autoclave foi retirada da estufa onde resfriou naturalmente até atingir a temperatura ambiente, e ao seu conteúdo foi adicionado 20mL de uma solução de hidróxido de sódio 50 g.L⁻¹. A mistura foi agitada durante 1 min e então centrifugada a 15000 RPM por 30 min. O sobrenadante foi descartado e o sólido resultante foi dissolvido em água destilada e centrifugado duas vezes nas condições supracitadas para a remoção de possíveis sais e álcali residual. Por fim, o sólido resultante das lavagens foi disperso em um pequeno volume de água destilada, congelado e liofilizado por um período de 72h a -35°C. O material resultante da liofilização foi mantido em dessecador até posterior utilização.

4.3 Preparação de materiais híbridos a base de pontos quânticos de carbono e 5-Fluorouracil

Os materiais híbridos a base de pontos quânticos de carbono e 5-Fluorouracil foram obtidos a partir da adição de 20 mL da solução do fármaco a 10 mg da matriz carbonácea. Nesse processo, foram utilizadas concentrações do fármaco que variaram de 100 a 800 mg.L⁻¹ de modo que obteve-se materiais híbridos finais nas proporções 0.2:1.0, 0.4:1.0, 0.6:1.0, 0.8:1.0,

1:1, 1.2:1, 1.4:1.0 e 1.6:1.0 de 5-FU em relação a massa fixa dos CQDs, sendo todos os experimentos realizados em triplicata. A solução resultante foi mantida em agitação moderada (300 RPM) durante 24h na ausência de luz. Após o período de reação, o sistema foi dialisado utilizando-se membrana de diálise (MWCO = 2000 Da) contra 500 mL de água destilada durante 2h para a remoção de moléculas não adsorvidas de 5-Fluorouracil (YUAN et al., 2017). A solução do híbrido 5-FU-CQD purificada foi liofilizada por 72h a -35°C e o pó obtido foi mantido em dessecador e sob abrigo de luz até experimentos posteriores.

4.4 Eficiência de ancoramento do 5-Fluorouracil

A porcentagem de eficiência de ancoramento (EA%) e a quantidade adsorvida (QA - mg.g⁻¹) do fármaco pelos CQDs foi determinada com base na quantidade de 5-Fluorouracil dialisada em água durante a síntese do híbrido 5-FU-CQD. Este valor foi medido espectrofotometricamente (Shimadzu UV-1800) no comprimento de onda de 266 nm e calculado utilizando a curva do fármaco previamente obtida (APÊNDICE A) a partir da Lei de Lambert-Beer. Para tais cálculos usou-se as equações que se seguem:

$$EA(\%) = \frac{m_{5-FU} - m_{LIVRE}}{m_{5-FU}} \times 100 \quad (1)$$

$$QA \text{ (mg.g}^{-1}\text{)} = \frac{m_{5-FU} - m_{LIVRE}}{m_{CQD}} \quad (2)$$

onde M_{5-FU} refere-se a massa inicial utilizada do fármaco, M_{LIVRE} denota a massa do fármaco que foi dialisada, ou seja, não adsorvida, e M_{CQDs} representa a massa fixa de CQDs utilizada no encapsulamento do fármaco. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

4.5 Caracterização dos materiais

4.5.1 Espectroscopia na região do UV-Visível

Os espectros de absorção na região do UV-Visível do 5-Fluorouracil, dos CQDs e do material híbrido 5-FU-CQD foram obtidos utilizando-se espectrômetro Shimadzu UV-1800 de duplo feixe operando com resolução de 1 nm. No registro dos espectros, usou-se uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm. Para o fármaco, a varredura foi realizada de 400 a 200 nm e para os CQDs e o material híbrido 5-FU-CQD, na faixa de 900 a 200 nm. Na determinação da concentração do fármaco no híbrido, desconsiderou-se a contribuição dos CQDs obtendo-se

uma solução de mesma concentração de CQDs do que a presente no híbrido, que funcionou como branco; assim, obteve-se na leitura apenas a contribuição respectiva ao fármaco presente no híbrido.

4.5.2 Difração de Raios-X

O padrão de difração de raios-X dos CQDs, 5-Fluorouracil e do híbrido 5-FU-CQD foram obtidos em um difratômetro Bruker modelo D8-ADVANCE, equipado com uma fonte de cobre (radiação $\text{CuK}\alpha$, $\lambda = 0.15418 \text{ nm}$), operando a 40 kV e 35 mA, com ângulos 2θ variando de 2 a 70° . As análises foram realizadas por passos de $0,02^\circ$ com um tempo de aquisição de 1,5s por passo.

4.5.3 Espectroscopia Raman

Nas análises de materiais fotoluminescentes, como os CQDs, é comum que ocorra a sobreposição das bandas Raman pelo fundo de fotoluminescência gerado; esse inconveniente pode ser contornado utilizando-se equipamentos com radiação de comprimento de onda de excitação no infravermelho próximo (NIR). Nas análises dos materiais estudados, utilizou-se o FT-Raman Bruker RFS 100/S dotado com detector de germânio (Ge) resfriado com nitrogênio líquido e linha de excitação em 1064 nm, empregando laser de Nd:YAG. A potência do laser deste equipamento é de no máximo 500 mW, podendo ser ajustada de acordo com o tipo de amostra a ser estudada. Neste trabalho, a potência de saída do equipamento foi configurada em 50 mW para que o sinal Raman obtido fosse o mais intenso possível sem ocasionar o aquecimento ou degradação das amostras. As medidas foram feitas com resolução de 4 cm^{-1} , número de varreduras de 512 e abertura do feixe de luz espelhada de 7 mm.

4.5.4 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier

Os grupos presentes na superfície dos CQDs, 5-Fluorouracil e do híbrido 5-FU-CQD foram identificados através dos espectros obtidos na região do infravermelho. Na análise, utilizou-se um espectrômetro de FTIR Shimadzu modelo IR-Prestige-21 sendo todas amostras analisadas em pastilha de KBr e sob os seguintes parâmetros: faixa de varredura de 400 a 4000 cm^{-1} , número de varreduras igual a 45 e resolução de 2 cm^{-1} . O sinal obtido a partir do KBr puro foi subtraído como branco.

4.5.5 Potencial zeta

Para as medidas de potencial zeta, as soluções aquosas dos CQDs e do material híbrido 5-FU-CQD foram preparadas na concentração de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$. Utilizou-se o equipamento Zetasizer Nano ZS Malvern e célula DTS1070 com capacidade de 1 mL. Considerou-se o índice de refração da água como 1,330.

4.5.6 Espectroscopia de Fluorescência

Os espectros de emissão dos CQDs e do material híbrido 5-FU-CQD foram registrados de 400 a 700 nm utilizando um espectrofotômetro de fluorescência Varian modelo Cary Eclipse. Para as medidas, uma solução aquosa dos materiais na concentração de 50 mg.L^{-1} foi preparada e então excitada com incrementos progressivos de 20 nm.

4.5.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Para a obtenção das imagens utilizou-se o microscópio JEM-2100 da marca JEOL operando a 200 kV. As amostras de CQD e do material híbrido 5-FU-CQD foram preparadas na concentração de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ e então gotejadas ($4 \mu\text{L}$) em uma grade cobre. As grades foram alocadas no dissecador por 72 para eliminação da água antes das análises.

4.5.8 Isotermas de Adsorção-Dessorção de Nitrogênio

As propriedades texturais do CQD e do material híbrido 5-FU-CQD foram determinadas em um microporosímetro ASAP 2020 (Accelerated Surface Area and Porosimetry) da Micromeritics utilizando-se o método de adsorção/dessorção de nitrogênio a $-195,8^\circ\text{C}$ (77 K). Para a remoção de umidade e gases que ainda poderiam estar presentes no interior da estrutura porosa dos materiais, as amostras foram submetidas a degaseificação a 100°C por 3 h. As medidas de área superficial foram calculadas a partir do método BET (Brunauer, Emmett and Teller) e a distribuição do diâmetro dos poros foi obtida aplicando-se o método BJH (Barret, Joyner and Halenda).

4.5.9 Análises térmicas

4.5.9.1 Análise termogravimétrica (TGA) e análise térmica diferencial (DTA)

As curvas TGA/DTA foram obtidas em uma termobalança Shimadzu DTG-60 sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL.min⁻¹. Os experimentos foram conduzidos no intervalo de temperatura de 30 a 1000°C com uma razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹ em cadinho de platina. Foram utilizados entre 5-10 mg de cada amostra nas análises.

4.5.9.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As curvas DSC foram obtidas em um equipamento Shimadzu DSC-60 sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL.min⁻¹. As análises foram realizadas em cadinho de alumina no intervalo de temperatura de 30 a 550°C com razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹. Foram utilizados entre 5-10 mg de cada amostra nos ensaios.

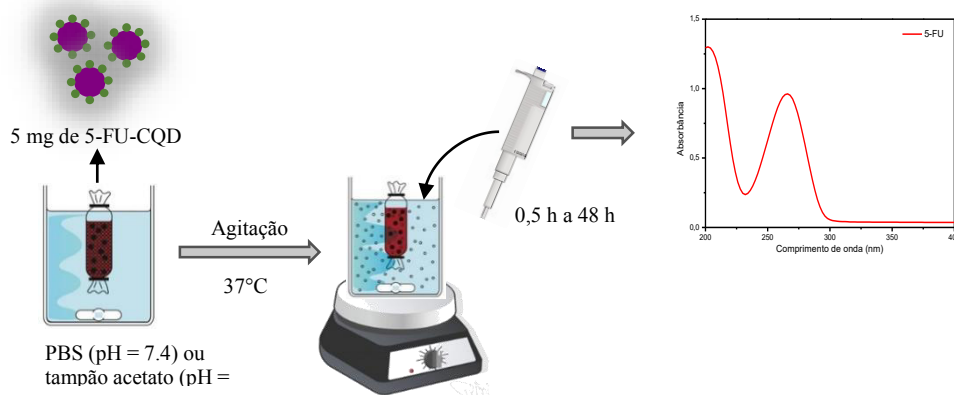
4.6 Liberação *in vitro* do fármaco

Para a obtenção do perfil de liberação *in vitro* do 5-Fluorouracil a partir do sistema 5-FU-CQD, 5 mg do híbrido liofilizado foram suspensos em 10 mL de tampão fosfato salino (PBS) ou tampão acetato e dialisado utilizando-se membrana de diálise (MCWO = 2000 Da) contra 300 mL da respectiva solução. O tampão PBS (pH = 7,4) e o tampão acetato (pH = 5,0) utilizados nesse experimento tiveram como função mimetizar o ambiente fisiológico do organismo humano e o microambiente tumoral, respectivamente (YUAN et al., 2017). As soluções mencionadas foram preparadas da seguinte forma:

- Tampão PBS (pH 7,4): 2,38 g fosfato de sódio dibásico, 0,19 g de fosfato de potássio monobásico e 8,0 g de cloreto de sódio;
- Tampão acetato (pH 5,0): 5,772 g de acetato de sódio e 1,778 g de ácido acético.

O sistema foi mantido em agitação moderada (300 RPM) a 37°C e sob o abrigo de luz durante todo experimento. Aliquotas da solução tampão foram coletadas após sucessivos intervalos de tempo de 0,5, 1, 2, 4, 8, 12 e 24 h e a absorbância do 5-Fluorouracil liberado foi medida no comprimento de 266 nm, como demonstrado na Figura 8.

Figura 8 - Esquema ilustrativo do procedimento de liberação do 5-FU a partir do material híbrido 5-FU-CQD. A quantidade do fármaco liberada foi determinada por espectroscopia na região do UV-Vis no comprimento de 266 nm



Fonte: Autor (2019)

A concentração do fármaco liberada em cada tempo mencionado foi determinada a partir da curva de calibração do 5-Fluorouracil previamente obtida em cada tampão utilizado (ver APÊNDICE A e B). A porcentagem liberada do fármaco foi calculada usando a equação que se segue:

$$\text{Fármaco liberado (\%)} = \frac{\text{Massa do 5-FU liberada}}{\text{Massa do 5-FU no híbrido 5-FU-CQD}} \quad (3)$$

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

4.7 Ensaios biológicos

Os ensaios *in vitro* deste estudo foram realizados no Laboratório de Imunologia Aplicada ao Câncer (LIAC) da Universidade Federal do Maranhão – UFMA.

4.7.1 Cultura celular

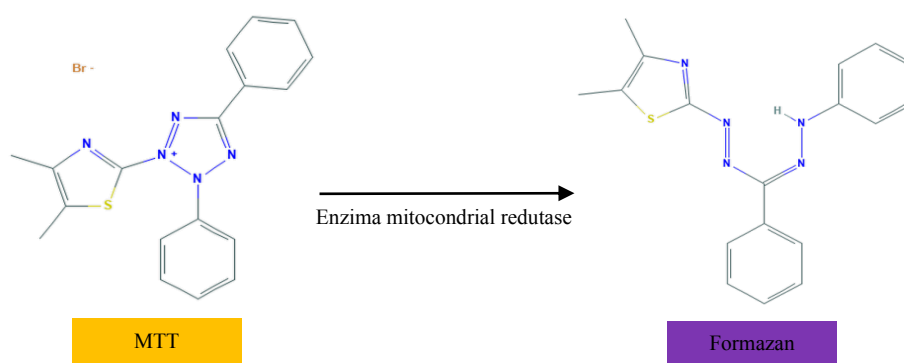
As linhagens utilizadas neste estudo foram as de fibroblastos humanos normais (GM07492) e de adenocarcinoma mamário (MCF-7), sendo obtidas da *American Type Culture Collection* – ATCC. Para a realização dos experimentos, as células foram cultivadas em monocamada, em garrafas de 75 cm² com 10 mL de meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal, e mantidas em estufa de cultivo celular

à temperatura de 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias e, ao atingirem confluência de 80%, as células foram tripsinizadas (0,005% de tripsina) para serem desprendidas dos frascos de cultura. Essa mistura foi centrifugada, as células ressuspensas em meio de cultura e a concentração foi então ajustada em câmara de Neubauer para a posterior utilização.

4.7.2 Ensaio MTT

O ensaio MTT [brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio] consiste em um teste colorimétrico que permite avaliar de forma quantitativa a atividade metabólica de células *in vitro* através da ação de enzimas oxidorreduzases presentes nesses sistemas. Estas proteínas tem a capacidade de reduzir o corante MTT, que se apresenta como um sal amarelo, solúvel e permeável a membrana celular em cristais de formazan azuis/violetas (Figura 9). Estes por sua vez, são insolúveis e não permeáveis a membrana celular, necessitando ser dissolvido para obtenção da absorbância da solução, detectada por um espectrofotômetro na região do visível, que por sua vez ira refletir a viabilidade celular. Este ensaio, embora simples, permite quantificar espectrofotometricamente o crescimento celular, a viabilidade, podendo ser utilizado inclusive como um indicador direto de citotoxicidade (MOSMANN, 1983).

Figura 9 - Esquema ilustrativo da reação de conversão de MTT em Formazan pela ação de enzimas oxidorreduzase



Fonte: Autor (2019)

Para a realização deste ensaio, as células GM07492 foram primeiramente semeadas em placas de 96 poços com densidade ajustada de 10⁵ células/poço e incubadas por 24 h para que as células aderissem aos poços. Em seguida, os respectivos compostos testes foram adicionados e as placas foram então incubadas nos tempos de 24, 48 e 72 h. A citotoxicidade dos CQDs foram determinadas nas concentrações de 800, 400, 200, 100, 50, 25 e 12,5 mg.L⁻¹, enquanto que para o 5-FU e o material híbrido 5-FU-CQD (em concentração equivalente ao fármaco

puro) as concentrações testadas foram de 0,25, 0,50, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0 e 16,0 mg.L⁻¹. Após o tempo de incubação, o meio de cultura foi aspirado dos poços e as células lavadas com PBS para remoção de qualquer partícula residual. Para a reação, 10 µL da solução do MTT na concentração de 5 mg.mL⁻¹ foi adicionado em cada poço e então incubado por 3h para a formação dos cristais formazan. Após esse período, o meio foi cuidadosamente aspirado e DMSO (dimetilsulfóxido) foi adicionado para dissolução dos cristais. A absorbância dos cristais roxos de formazan (540 nm) em cada poço foi quantificado utilizando-se um leitor de microplaca. Para os cálculos, o controle negativo (células tratadas apenas com DMEM) foi considerada como 100%. A porcentagem de viabilidade celular foi estimada utilizando a equação abaixo:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Absorbância teste}}{\text{Absorbância do controle}} \times 100 \quad (4)$$

A partir dos valores de viabilidade celular foi possível calcular a concentração inibitória mínima (IC₅₀, do inglês *half maximal inhibitory concentration*) dos materiais testados, sendo este valor um indicativo da toxicidade do material. A porcentagem de viabilidade celular e as IC₅₀ foram obtidos utilizando o programa Graph-Pad Prism 5.0.

4.7.3 Análise estatística

Os dados dos ensaios biológicos foram expressos como média ± desvio padrão de experimentos independentes. A análise estatística foi realizada através do método ANOVA *two-way* utilizando o programa Graph-Pad Prism 5.0. Valores com diferença estatística significativa foram representados por *(p < 0,05), **(p < 0,001) e ***(p < 0,001), enquanto que ns (p > 0,05) indica valores com diferença estatística não significativa

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Considerações gerais

Neste trabalho, objetivou-se aplicar os CQDs como nanocarreador em um sistema de liberação de fármaco com o intuito de promover uma liberação mais controlada, reduzir a toxicidade associada ao fármaco, e, conseqüentemente, diminuir os efeitos colaterais tão indesejados ao paciente em uma futura administração, seja por via intravenosa ou oral. Para isso, os CQDs foram obtidos em uma única etapa por meio do tratamento térmico do ácido cítrico e ureia. O fármaco escolhido foi o 5-Fluorouracil devido ao seu amplo espectro de ação antitumoral e aplicação já bem consolidada no âmbito da quimioterapia. Esta molécula foi espontaneamente adsorvida (*self-assembly*) na superfície dos CQDs a partir de uma solução aquosa, dando origem ao material híbrido 5-FU-CQD. Foram utilizadas diversas técnicas físico-químicas na obtenção de informações sobre a morfologia, estrutura, propriedades ópticas e térmicas dos materiais estudados. A formação do material híbrido 5-FU-CQD, bem como as possíveis interações fármaco-nanocarreador foram inferidas a partir das modificações nos perfis do 5-FU e dos CQDs puros em comparação ao material híbrido. Para avaliar o perfil de liberação *in vitro* do fármaco, o 5-FU foi liberado a partir do material híbrido 5-FU-CQD em diferentes meios que simularam o ambiente fisiológico e o microambiente tumoral. Como pretende-se aplicar os CQDs em sistemas biológicos, a avaliação da citotoxicidade desse material faz-se essencial. Avaliou-se também a ação antitumoral do material híbrido 5-FU-CQD em comparação ao fármaco puro frente células de adenocarcinoma mamário. Dessa forma, esta dissertação descreve desde a síntese dos CQDs e a preparação do material híbrido 5-FU-CQD, contemplando suas caracterizações utilizando diversas técnicas físico-químicas, até sua aplicação em sistemas *in vitro* com a avaliação da toxicidade do nanocarreador frente células saudáveis e comparação da ação antitumoral do fármaco com o material híbrido 5-FU-CQD desenvolvido neste estudo.

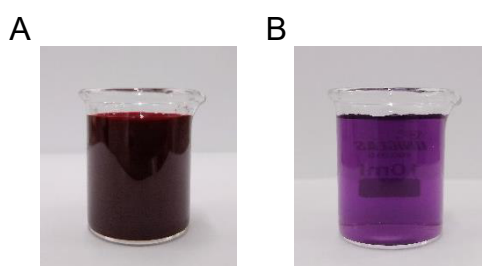
5.2 Caracterização dos materiais

Para a obtenção dos CQDs, empregou-se como estratégia de síntese o tratamento solvotérmico utilizando-se o ácido cítrico como fonte de carbono e a ureia como agente de dopamento. O ácido cítrico é um precursor bastante favorável para a síntese dos CQDs devido a presença de grupos funcionais em sua estrutura (-COOH e -OH). Enquanto isso, o dopamento com a nitrogênio pode gerar diferentes estados de superfície que atuam melhorando as

propriedades físicas, químicas e principalmente ópticas, fornecendo CQDs com elevados rendimentos quânticos e excelente estabilidade óptica (LIU et al., 2017).

Inicialmente, a mistura reacional era incolor, no entanto, ao final do tratamento solvotérmico a solução adquiriu uma intensa coloração marrom avermelhada, como demonstrado na Figura 10A, indicando a formação dos CQDs. Após o processo de purificação e liofilização, o material resultante foi um pó de coloração esverdeada que em solução aquosa apresentou coloração roxa (Figura 10B).

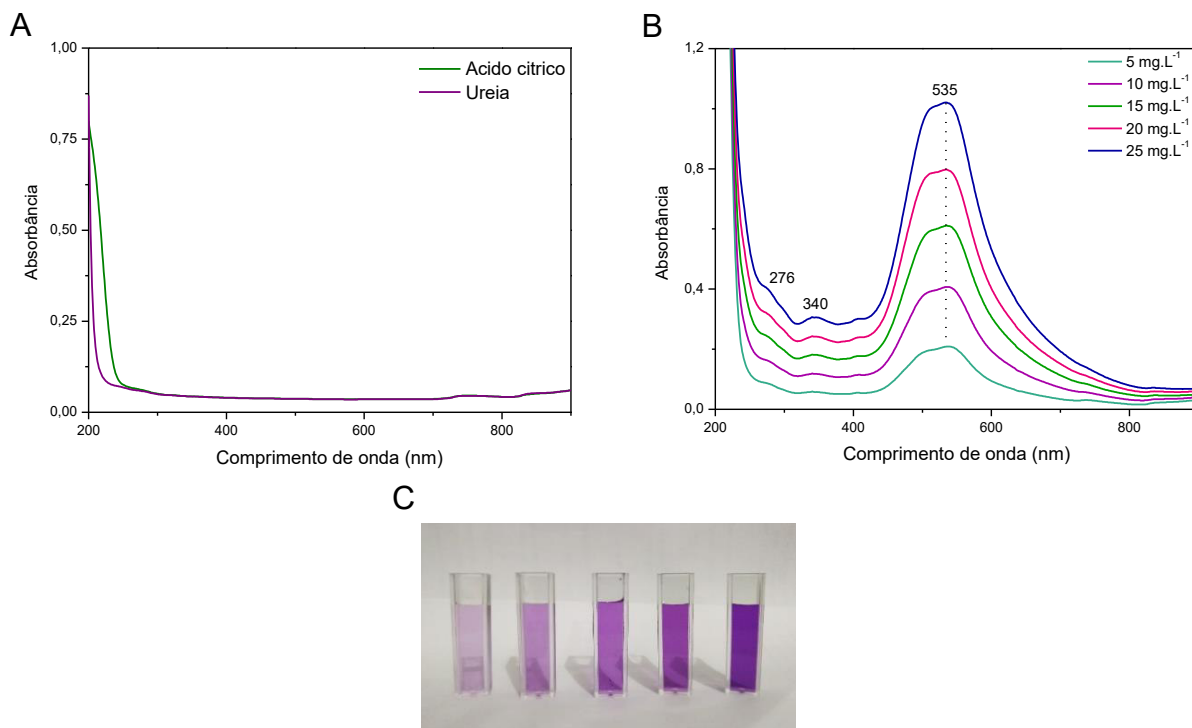
Figura 10 - (A) Mistura reacional após a síntese dos CQDs e em (B) solução aquosa dos CQDs na concentração de 20 mg.L⁻¹ após processo de purificação e liofilização



Fonte: Autor (2019)

Outro indicativo de formação dos pontos quânticos de carbono foi obtido a partir da comparação dos espectros de absorção na região do UV-Vísível do ácido cítrico e da ureia com o do material sintetizado. Como demonstrado na Figura 11A, os espectros precursores não exibiram nenhuma banda de absorção na região analisada, todavia, os CQDs apresentaram um ombro em 276 nm e bandas em 340 e 535 nm (Figura 11B), implicando na formação de uma nova estrutura. O ombro observado em 276 nm pode ser atribuído as transições $\pi-\pi^*$ das ligações C=C presentes no centro aromático dos CQDs. De forma simplificada, o mecanismo de formação dos CQDs envolve a desidratação entre os grupos hidroxilas, carboxílico e amino do ácido cítrico e ureia e, subsequente processo de polimerização carbonização/aromatização e passivação (DE e KARAK, 2013). As bandas em 340 e 535 nm estão associadas, de forma geral, ao estado de superfície dos CQDs; a primeira destas é resultante das transições $n-\pi^*$ dos grupos carbonila e a segunda, refere-se a outros grupos funcionais presentes na superfície dos CQDs (WEN et al., 2015). Na Figura 9B, é possível observar curvas com diferentes concentrações dos CQDs, e sua respectiva coloração na Figura 11C. Nos espectros dos CQDs, nota-se um ombro a esquerda da banda em 535 nm, podendo indicar distintos estados de superfície nos CQDs (QU et al., 2016).

Figura 11 - (A) Espectros de absorção na região do UV-Vísivel do ácido cítrico, ureia e dos (B) CQDs na faixa de concentração de 5 a 25 mg.L⁻¹. Em (C) observa-se o aumento na intensidade de coloração da solução aquosa dos CQDs conforme aumenta-se a concentração de 5 a 25 mg.L⁻¹



Fonte: Autor (2019)

A banda dos CQDs que se encontra na região do visível é um dos indicativos de sua superfície funcionalizada, sendo estas uma de suas características mais importantes, permitindo, por exemplo, o ancoramento de espécies biologicamente ativas como o 5-Fluorouracil. No subitem 4.3, é descrito a preparação dos materiais híbridos utilizando-se diferentes concentrações iniciais da solução do fármaco o que resultou em materiais finais com distintas proporções de 5-FU. A partir da quantidade adsorvida de fármaco nos diferentes materiais híbridos foi possível construir a isoterma de adsorção que está representada na Figura 12. A isoterma de adsorção foi classificada de acordo com Giles et al., (1960) como sendo do tipo Langmuir e seu respectivo ajuste ao modelo foi calculado utilizando-se a equação abaixo:

$$Q_e = \frac{Q_m \cdot K_L \cdot C_e}{1 + K_L \cdot C_e} \quad (5)$$

onde Q_e representa a quantidade adsorvida de 5-FU por massa de CQD, C_e refere-se a concentração de 5-FU no equilíbrio, Q_m é quantidade máxima de 5-FU adsorvido e K_L corresponde a constante de afinidade entre o 5-FU e o CQD. O ajuste ao modelo Langmuir ($R^2 = 0,95176$) representa um bom indicativo da afinidade ($K_L = 0,07854 \text{ L.mg}^{-1}$) entre o adsorbato

(5-FU) e o adsorvente (CQD). Além disso, a energia de Gibbs do processo adsorptivo pode ser calculada com o auxílio de K_L utilizando-se a equação que se segue:

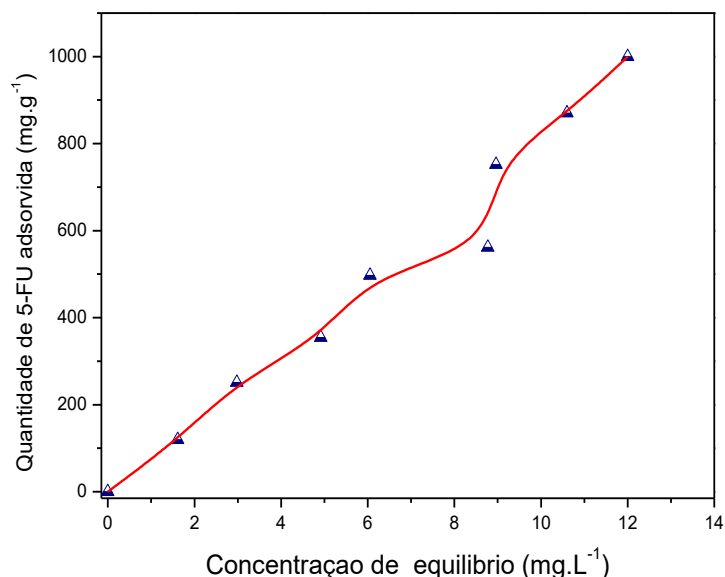
$$\Delta G_{ads} = -RT \ln K \quad (6)$$

onde R é a constante universal, T é temperatura em que a adsorção ocorreu e K , para espécies iônicas, corresponde a $(K_L \rho / 4)^2$, onde ρ é a razão entre a densidade solvente e seu peso molecular ($\rho \approx 1000/18$) (MILLER et al., 2002). Assim, a energia de Gibbs calculada foi de -58,42 kJ.mol⁻¹, indicando uma elevada tendência de o 5-FU ser adsorvido espontaneamente na superfície dos CQDs (REBITSKI et al., 2018).

Na isoterma de adsorção (Figura 10) cada ponto observado representa materiais híbridos 5-FU-CQD diferentes, seguindo as proporções descritas no subitem 4.3. Como esperado de uma isoterma do tipo L, à medida que os sítios ativos do CQD foram sendo preenchidos, tornou-se mais difícil para moléculas de 5-FU livres encontrarem um sítio disponível, o que resultou visualmente na formação do platô. Neste caso, o platô observado é bem discreto, porém sugere a saturação da superfície dos CQDs. O início dessa porção linear representa a formação de uma monocamada completa, condição na qual todos os sítios ativos da superfície original encontram-se ocupados, e, a adsorção de novas moléculas só poderá ocorrer a partir de “novas superfícies”. No entanto, segundo Giles et al., (1960), a formação da monocamada não necessariamente implica na disposição de moléculas isoladas (5-FU) ao redor da superfície do adsorvente (CQD). Esta monocamada pode conter moléculas do solvente ou ainda *clusters* formados por moléculas do adsorbato.

A inflexão observada na isoterma seguida por um elevado aumento na quantidade adsorvida pode ser atribuída a formação de uma nova superfície disponível para adsorção de moléculas de 5-FU. Esta nova superfície pode ter sido formada devido: i) a reorientação das moléculas de 5-FU que se organizam preferencialmente em posição horizontal na monocamada; ii) a própria camada do fármaco formada durante o desenvolvimento da monocamada ou iii) regiões da superfície original, no caso dos CQDs, que se tornaram exposta. Neste caso, também é possível relacionar este fato ao platô. O platô discreto pode significar que as moléculas de 5-FU adsorvidas dão origem a uma superfície com quase a mesma afinidade por mais moléculas de 5-FU do que a superfície original dos CQDs (GILES et al., 1960).

Figura 12 - Isoterma de adsorção do 5-Fluorouracil pelos CQDs em solução aquosa a 23°C. Quantidades adsorvidas do 5-FU foram determinadas espectrofotometricamente no comprimento de onda de 266 nm



Além da isoterma de adsorção foi possível determinar a eficiência associada ao processo de ancoramento do fármaco utilizando-se a Equação 1. A quantidade de 5-FU não adsorvida pelos CQDs foi medida por meio da espectroscopia na região UV-Vis no comprimento de 266 nm e calculada a partir de uma curva de calibração previamente obtida (Apêndice A). Os resultados de EA% foram sumarizados na Tabela 1. Pode-se notar que todos os materiais híbridos obtidos apresentaram elevados valores de eficiência de ancoramento, todos próximos a 60%. É válido destacar que, até o momento, não há reportes na literatura sobre a obtenção de híbridos a base de pontos quânticos de carbono e 5-FU, o que torna os valores de eficiência de ancoramento obtidos bastante relevantes.

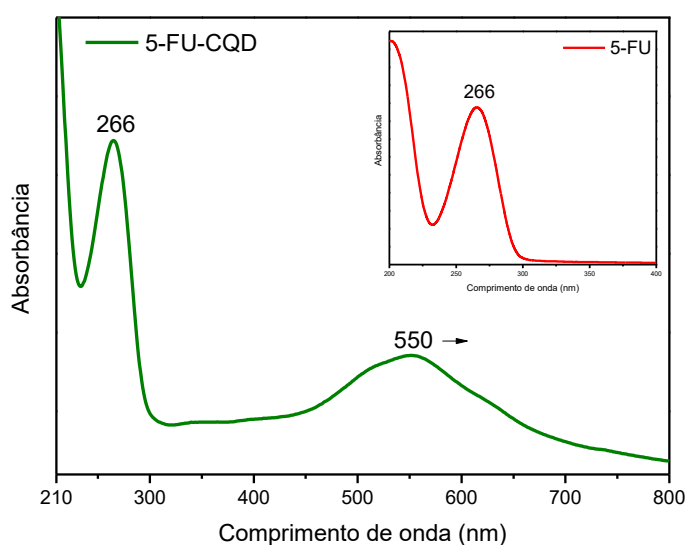
Para a realização dos experimentos seguintes fez-se necessário determinar o material híbrido mais apropriado. A eficiência de ancoramento pode ser considerada um bom parâmetro para isto. O material híbrido 5-FU-CQD 1,2:1,0 foi o que possuiu eficiência de ancoramento mais elevada, no entanto, como foi possível inferir a partir da isoterma, nesta proporção ocorre a formação de uma segunda camada do fármaco. O híbrido 0,4:1,0 é o que apresenta segunda EA% mais elevada, no entanto devido à baixa quantidade de fármaco utilizado inicialmente, optou-se para os experimentos seguintes o material híbrido 5-FU-CQD 0,8:1,0.

Tabela 1 - Valores de eficiência de ancoramento do 5-Fluorouracil nos materiais híbridos 5-FU-CQD obtidos a partir de diferentes concentrações iniciais do fármaco

Proporção 5-FU:CQD	Concentração inicial do 5-FU (mg.L ⁻¹)	Eficiência de ancoramento (%)
0,2:1,0	100	59,72 ± 3,03
0,4:1,0	200	62,77 ± 1,82
0,6:1,0	300	59,03 ± 1,68
0,8:1,0	400	62,17 ± 7,38
1,0:1,0	500	56,16 ± 4,67
1,2:1,0	600	62,67 ± 2,19
1,4:1,0	700	62,15 ± 3,44
1,6:1,0	800	62,49 ± 3,51

Na Figura 13 é exibido o espectro de absorção do conjugado 5-FU-CND na região do Uv-vísivel, e, em detalhe do 5-Fluorouracil puro. O material híbrido exibiu duas bandas com máximos em 266 nm e 550 nm. A primeira dessas bandas é característica do fármaco e sua presença no perfil de absorção do híbrido sugere o ancoramento do fármaco pelos CQDs. Além disso, a banda relacionada ao estado de superfície pontos quânticos de carbono com absorbância em 535 nm foi deslocada em cerca de 15 nm para comprimentos de ondas maiores, sugerindo que a formação do híbrido ocorre a partir de interações do 5-FU com os grupos funcionais dos CQDs.

Figura 13 - Espectro de absorção na região do UV-Vis do material híbrido 5-FU-CQD em solução aquosa



5.2.1 Caracterização estrutural

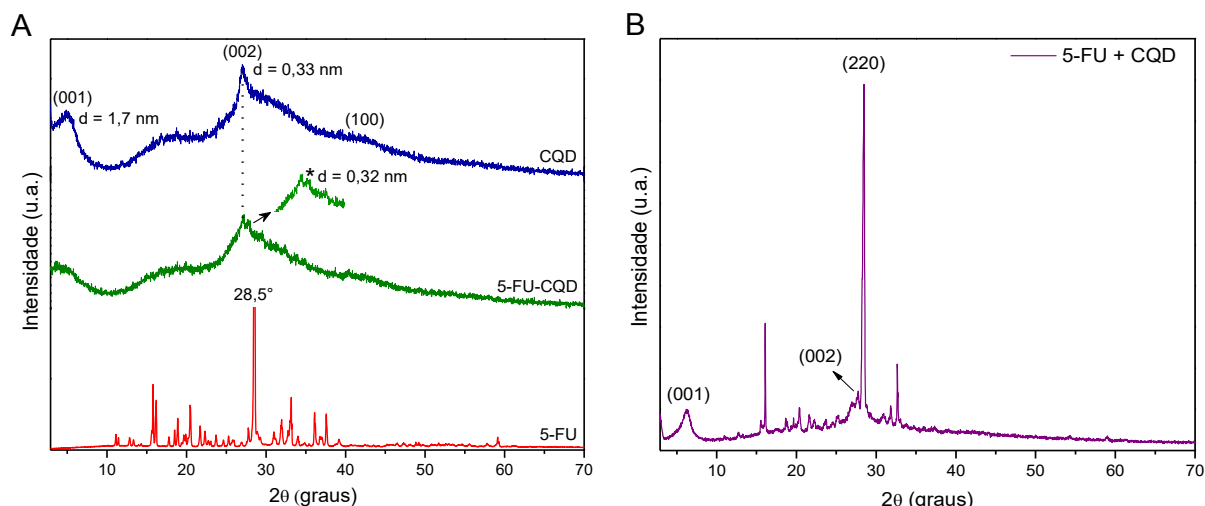
As propriedades estruturais dos CQDs e do material híbrido 5-FU-CQD foram investigadas utilizando a técnica de DRX. Como demonstrado na Figura 14A, os CQDs exibiram dois planos de reflexão em $27,1^\circ$ e $42,4^\circ$ em 2θ que correspondem aos planos (002) e (100) da estrutura grafítica. Comparando a grafite ordenada ($2\theta = 26,5^\circ$; $d_{002} = 0,34$ nm), o deslocamento para ângulos 2θ maiores ($2\theta = 27,1^\circ$; $d_{002} = 0,33$ nm) pode ser justificado pela formação de carbonos desordenados (sp^3) durante o processo de síntese. De forma semelhante, a primeira reflexão dos CQDs em $2\theta = 5,1^\circ$ ($d_{001} = 1,7$ nm) é similar ao principal pico do óxido de grafite ($2\theta = 10,6^\circ$; $d_{001} = 0,84$ nm), sendo este deslocamento para ângulos 2θ menores uma consequência do aumento do espaço interplanar. Durante o processo solvotérmico, diversos grupos funcionais, tais como hidroxila, carbonila, íon carboxilato e grupos amino foram formados nos limites dos planos basais, induzindo o aumento no espaço interplanar mencionado acima. Além disso, a base larga dos picos pode ser um indicativo da presença de carbono amorfo na estrutura dos CQDs. Estes resultados indicam que os pontos quânticos obtidos neste estudo apresentam baixa cristalinidade e uma estrutura heterogênea, o que é consistente com outros CQDs reportados na literatura (DU et al., 2014; ZHANG et al., 2015).

No caso do fármaco puro, é possível observar picos estreitos ao longo de todo o intervalo analisado, o que evidencia sua natureza cristalina. O sinal mais intenso do 5-FU refere-se ao plano de reflexão (220) observado em $2\theta = 28,5^\circ$ ($d_{220} = 0,31$ nm) (LUCENA et al., 2013). O material híbrido 5-FU-CQD apresentou um padrão de difração bem semelhante ao do CQD, sendo observadas quatro reflexões em $4,2^\circ$, $27,1^\circ$, $27,8^\circ$ e $42,4^\circ$. A presença do pico adicional em $2\theta = 27,8^\circ$ ($d = 0,32$ nm), que pode ser observado em detalhe na Figura 12A, indica a imobilização bem sucedida do 5-FU pelos CQDs. Contudo, é possível perceber que o pico referente ao fármaco se tornou menos intenso e mais largo, sugerindo uma perda na cristalinidade do 5-FU após o processo de conjugação com o nanocarreador. Além disso, também foi observado um deslocamento referente ao plano de reflexão (001) para ângulos 2θ menores ($2\theta = 27,1^\circ$; $d_{002} = 0,33$ nm) quando comparados aos CQDs puros, o que pode ter ocorrido em decorrência das interações entre o 5-FU e os grupos funcionais presentes nas extremidades dos planos basais dos CQDs.

No sentido de comprovar a formação de uma nova estrutura a partir do processo de adsorção do 5-FU pelos CQDs, realizou-se um simples procedimento de mistura mecânica entre esses dois materiais puros que foram então analisados. No padrão de difração desta mistura (Figura 14B) é possível perceber que as reflexões dos materiais puros se apresentam quase que

inalteradas, dando destaque para os picos intensos associados ao 5-FU. Dessa forma, apenas com a mistura mecânica não se observam as mesmas mudanças no padrão de difração quando comparados ao material híbrido 5-FU-CQD, comprovando que de fato a imobilização do fármaco pelos CQDs resultou em um material híbrido com diferentes propriedades.

Figura 14 - Padrões de difração dos (A) CND, 5-Fluorouracil puro, do material híbrido 5-FU-CQD e da (B) mistura mecânica entre CQD e 5-Fluorouracil

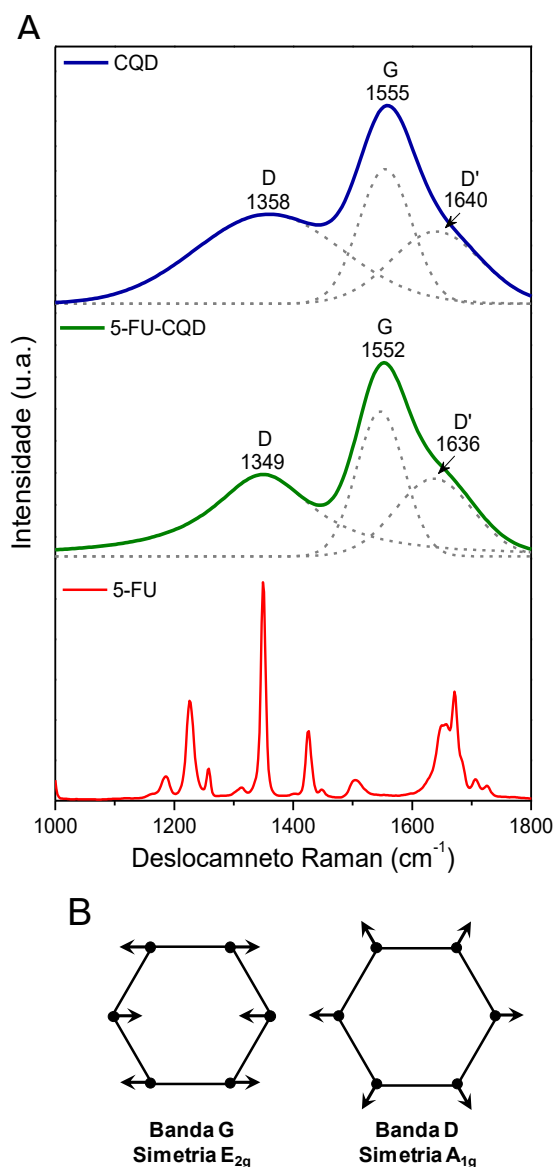


Além da técnica de DRX, utilizou-se também a espectroscopia Raman para análise dos sistemas, visto que esta é uma técnica muito sensível a partir do qual é possível obter informações sobre os estados de hibridização e desordens presentes na estrutura do material. Para os materiais carbonáceos, as principais características podem ser observadas no intervalo de 1000 a 1800 cm^{-1} . No espectro Raman dos CQDs (Figura 15A) é possível observar a presença de duas bandas com máximos em 1358 e 1555 cm^{-1} e um ombro em 1640 cm^{-1} que correspondem as bandas D, G e D', respectivamente. A banda G (simetria E_{2g}) está associada aos modos de estiramento dos átomos de carbono com hibridização sp^2 , tanto nos anéis como em cadeias. Em contrapartida, a banda D (simetria A_{1g}) está relacionada aos modos de respiração dos anéis aromáticos, que são induzidos pela presença de qualquer tipo de defeito na estrutura do material (Figura 15B). Essas desordens surgem, em sua maioria, a partir de uma descontinuidade nos limites (*edge*) das lamelas da estrutura gráfica, dando origem a carbonos com hibridização sp^3 . A banda D', assim como a banda D, relaciona-se com a introdução de defeitos na estrutura do material (PIMENTA et al., 2007; VAUTARD et al., 2007). A partir dessas informações, é possível inferir que os CQDs sintetizados possuem uma estrutura gráfica imperfeita com regiões ricas em defeitos estruturais. No entanto, é importante destacar que defeitos estruturais em materiais a base de carbono são extremamente importantes para

aplicações práticas. No caso dos CNDs, durante seu processo de formação inúmeros defeitos estruturais foram formados, tais como grupos oxigenados e amino ($-O-H$, $O=C-O^-$, NH_2), nos sítios de carbono sp^2 dando origem há vacâncias que possibilitaram o aparecimento de carbonos sp^3 (MING et al., 2012).

Figura 15 – (A) Espectros Raman dos CQDs, material híbrido 5-FU-CQD e do 5-Fluorouracil obtidos sob linha de excitação em 1064 nm e (B) esquema ilustrativo dos modos vibracionais que originam as bandas D e G no espectro Raman dos materiais

Fonte: Autor (2019)

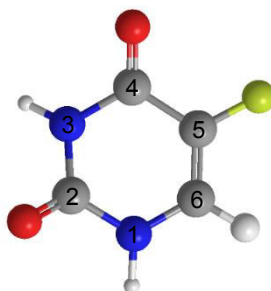


Além disso, outro parâmetro que pode ser obtido a partir do espectro Raman dos CQDs é a razão da intensidade da banda D e G (I_D/I_G) que fornece informações sobre o nível de desordem no sistema, bem como a proporção de carbonos sp^3/sp^2 nas partículas. Neste trabalho, a razão I_D/I_G foi igual a 0,70, mostrando que a proporção de carbonos sp^3 nos CQDs é elevada,

porém não superior à de carbonos sp^2 . Como comparação, pode-se citar o trabalho realizado por Jasim et al., (2016) no qual óxido de grafeno foi obtido utilizando-se diferentes fontes de carbono para aplicações biológicas; previamente, foram caracterizados os materiais precursores por espectroscopia Raman, onde obteve-se uma razão I_D/I_G de 0,19 e 0,13 para grafite em pó e em flocos, respectivamente. Os baixos valores dessas razões indicam que ambas as formas de grafite possuíam uma estrutura bem ordenada, com poucos defeitos, enquanto que os CQDs, apesar de apresentarem uma estrutura grafítica já comprovada, exibem uma enorme contribuição de carbono amorfo.

Considerando o espectro Raman do 5-Fluorouracil puro, as bandas observadas em 1186 e em 1258 cm^{-1} são originadas pela deformação no plano da ligação C6-H, no entanto, cada banda possui contribuições diferentes de outros grupos. Além da ligação já mencionada, a absorção observada no primeiro destes picos pode ser atribuída a deformação no plano da ligação N3-H e do anel; já no segundo, as contribuições são relacionadas ao estiramento do anel e a deformação no plano da ligação N1-H. Nos números de onda 1655, 1426 e 1225 cm^{-1} ocorrem as vibrações de estiramento da ligação C=C, do anel aromático e da ligação C-F na molécula do 5-FU. Em 1671 cm^{-1} observa-se o estiramento da ligação C4=O, enquanto que as bandas em 1707 e 1725 cm^{-1} ocorrem devido a ressonância Fermi entre o estiramento da ligação C2=O e a combinação dos modos de deformação no plano e fora do plano do anel e da ligação N3-H. Os picos em 1348 e 1507 cm^{-1} podem ser atribuídos a deformação no plano das ligações N3-H e N1-H, respectivamente. Em 1314 e 1148 cm^{-1} observa-se bandas fracas que correspondem a modos de combinação; a primeira destas está associada aos modos de deformação no plano e fora do plano do anel aromático e da ligação C4=O, respectivamente, e a segunda banda ocorre devido à combinação dos modos de deformação no plano da ligação N3-H e C2=O (RASTOGI et al., 200; RASTOGI e PALAFOX, 2011). Na Figura 16, observa-se um esquema da molécula do 5-FU com seus átomos numerados com o intuito de facilitar a identificação das ligações mencionadas acima.

Figura 16 - Esquema ilustrativo com átomos numerados da estrutura química do 5-Fluorouracil



Fonte: Autor (2019)

No que se refere ao material híbrido 5-FU-CQD, observa-se um espectro bem semelhante ao da matriz carbonácea, sem nenhuma característica adicional do fármaco. Contudo, observou-se uma mudança no valor da razão I_D/I_G do híbrido quando comparado ao do CQD; a matriz possuiu um valor de 0,70 e o material híbrido, um valor de 0,60. Considerando que a razão I_D/I_G é inversamente proporcional a quantidade de carbono sp^2 , a diminuição desta razão indica um aumento na proporção de carbonos ordenados na estrutura do material. Este fato pode ser justificado pela presença do 5-FU no material híbrido, uma vez que este material tem elevada cristalinidade, o que contribui na intensidade do sinal da banda G. Observou-se também, pequenos deslocamentos das bandas D, G e D'. No híbrido, os máximos das bandas ocorreram em 1349, 1552 e 1636 cm^{-1} , respectivamente. Estes deslocamentos podem indicar possíveis interações fármaco-nanocarreador no material híbrido.

Com o intuito de investigar estas possíveis interações, conduziu-se análises dos materiais estudados utilizando a espectroscopia na região do Infravermelho. Para os CQDs puros (Figura 17), as bandas observadas em 3549, 3476 e 3414 cm^{-1} podem ser atribuídas as vibrações de estiramento do grupo $-OH$, o que implica na presença de inúmeras hidroxilas na superfície do material. Outras bandas características de grupos oxigenados também foram observadas em 1616 e 1394 cm^{-1} , que podem ser atribuídas ao estiramento antissimétrico e simétrico do grupo carboxilato (COO^-), respectivamente. Em torno de 1676 cm^{-1} observa-se um ombro que pode ser atribuído ao estiramento do grupo $C=O$; a intensidade dessa banda foi, provavelmente reduzida devido a sobreposição de bandas adjacentes. Em 1026 cm^{-1} ocorre o estiramento da ligação $C-O$ (XU *et al*, 2013; WANG *et al.*, 2013). Enquanto isso, a banda em 1637 cm^{-1} pode ser associada ao estiramento da ligação $C=C$ presente em anéis aromáticos, o que comprova a formação de uma estrutura conjugada, característica dos CQDs. Em 2812 cm^{-1} observa-se o estiramento da ligação $C-H$, indicando a presença de ligações saturadas nos CQDs. Estas ligações estão provavelmente relacionadas aos defeitos estruturais dessa partícula material, reafirmando as discussões obtidas a partir do DRX e da espectroscopia Raman. A banda em 3231 cm^{-1} corresponde ao estiramento do grupo $-NH_2$, enquanto que em 1352 cm^{-1} observa-se a vibração de estiramento da ligação $C-N$, o que comprova o dopamento por nitrogênio durante o processo de síntese da estrutura dos CQDs. De forma geral, o espectro dos pontos quânticos de carbono demonstra a obtenção de uma estrutura aromática dopada com nitrogênio co-funcionalizadas tanto por grupo aminos, como por grupos oxigenados.

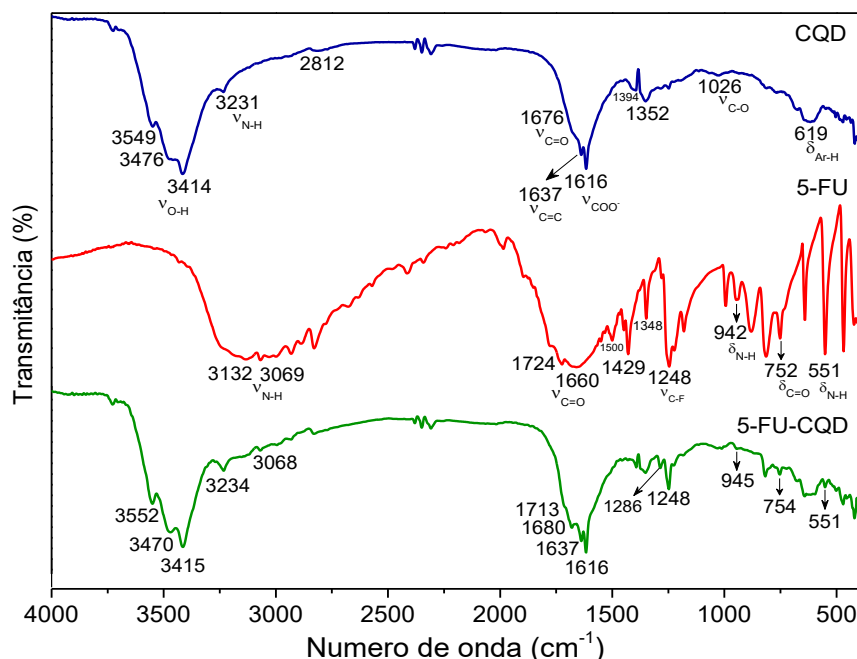
No espectro do 5-Fluorouracil puro, observou-se bandas respectivas ao estiramento dos grupos $N1-H$ e $N3-H$ (Figura 17) em 3134 e 3069 cm^{-1} , respectivamente. Em 3028 cm^{-1} observa-se o estiramento da ligação $C6-H$, enquanto que as bandas em 2931, 2887 e 2829 cm^{-1}

correspondem a modos de combinação. As vibrações em 1724 e 1660 cm^{-1} correspondem, respectivamente, ao estiramento das carbonilas (C2=O e C4=O) presentes no grupo imida (CO-NH-CO) do fármaco. A banda associada ao estiramento do grupo C5=C6 deveria ser observada em torno de 1650 cm^{-1} , o que não ocorre, muito provavelmente, devido a intensidade banda adjacente (C4=O); dessa forma, acredita-se que a banda observada em 1660 cm^{-1} é resultado do estiramento da carbonila e da ligação C5=C6 . Corroborando esta afirmação, observa-se em 993 cm^{-1} a banda referente a deformação fora do plano do grupo C5=C6 . As deformações no plano das ligações N1-H e N3-H ocorrem em 1500 e 1347 cm^{-1} , respectivamente, enquanto que em 551 e 942 cm^{-1} observa-se as bandas associadas as deformações fora do plano dos grupos N1-H e N3-H . A banda em 1429 cm^{-1} corresponde ao estiramento do anel, enquanto que a banda em 814 cm^{-1} está relacionada com a sua deformação no plano. Vale ressaltar que, todas as vibrações observadas abaixo de 1500 cm^{-1} têm contribuições significativas dos modos de vibração do anel. Em 1248 cm^{-1} observa-se uma banda intensa correspondente ao estiramento do grupo C-F , e, em 469 cm^{-1} ocorre a deformação no plano desse grupamento. As bandas em 1180 e 881 cm^{-1} correspondem as deformações no plano e fora do plano da ligação C6-H . Em 752 e 731 cm^{-1} ocorrem as deformações fora do plano das carbonilas (com maior contribuição da C2=O) e da ligação (C-N3-H), respectivamente (RASTOGI et al., 2000; RASTOGI e PALAFOX, 2011).

No que se refere ao híbrido 5-FU-CQD, observa-se um espectro bem similar ao do CQD, no entanto com características adicionais do fármaco. As bandas referentes as vibrações dos grupos N-H (3069, 945 e 551 cm^{-1}), C=O (754 cm^{-1}), C-F (1248 e 471 cm^{-1}) e ao anel (1430 e 818 cm^{-1}), podem indicar o ancoramento do 5-FU nos CQDs. Além disso, pequenos deslocamentos foram observados para a ligação N-H , cuja banda foi deslocada de 942 para 945 cm^{-1} , e para a vibração do anel, que foi deslocada de 814 para 818 cm^{-1} . De forma semelhante, notou-se modificações discretas nos grupos relacionados aos CQDs. As bandas em 3549, 3570 ($-\text{O-H}$) e em 3231 ($-\text{N-H}$) cm^{-1} foram deslocadas para números de ondas maiores em 3552 e 3576 e 3234 cm^{-1} , respectivamente. Tais modificações observadas no espectro do híbrido 5-FU-CQD sugerem interações entre o fármaco e os CQDs que, provavelmente são de natureza física (interações eletrostáticas), e/ou pontes de hidrogênio. Ademais, não se deve descartar possíveis interações envolvendo as carbonilas, tanto dos CQDs (1676 cm^{-1}) como do 5-Fluorouracil (1724 e 1660 cm^{-1}), uma vez que as vibrações deste grupo no material híbrido 5-FU-CQD ocorrem em 1713 e 1680 cm^{-1} e, neste caso, podem ter contribuições tanto do fármaco como dos CQDs. Dessa forma, torna-se difícil avaliar interações envolvendo esse grupo unicamente por meio dos deslocamentos das bandas. Também é válido mencionar, o surgimento

da banda em 1286 cm^{-1} no espectro do híbrido, que pode ser resultante de interações fármaco-nanocarreador.

Figura 17 - Espectroscopia na região do Infravermelho dos CQD, 5-FU e do material híbrido 5-FU-CQD. Análise realizada com resolução espectral de 2 cm^{-1} e as amostras foram preparadas como pastilhas de KBr

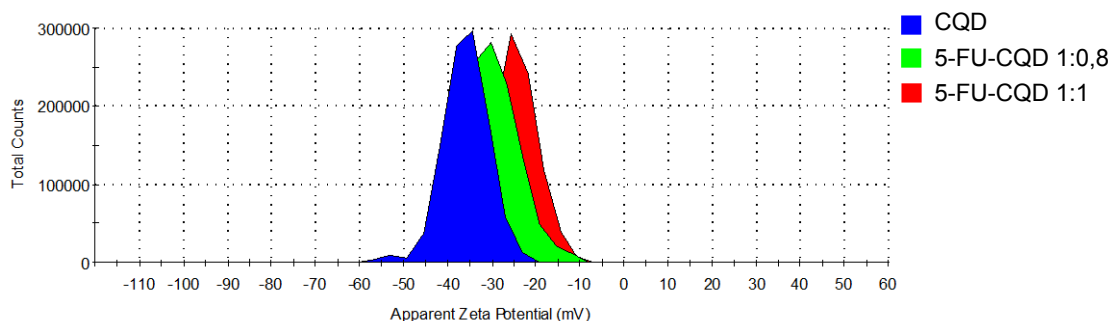


Além da espectroscopia na região do infravermelho, utilizou-se também o potencial zeta para obtenção de informações a respeito da superfície dos materiais. Ao entrarem em contato com solventes, as partículas adquirem uma carga elétrica em sua superfície, o que pode dar indícios da sua estrutura e estabilidade em suspensão. No caso dos CQDs, obteve-se um potencial zeta em solução de $\xi = -32,7 \pm 5,7\text{ mV}$ que é bastante característico dos CQDs. O potencial negativo apresentado por estes materiais pode ser atribuído a presença dos grupos funcionais oxigenados (COO^- , C=O , -OH) em sua superfície o que contribui na elevada solubilidade em água CQDs (WANG et al., 2013). Em geral, materiais que apresentam potenciais zeta superiores a 30 mV (em módulo), como os CQDs estudados, formam suspensões estáveis devido a repulsão das partículas umas às outras, o que supera a tendência natural a agregação (LI et al., 2008).

Para os materiais híbridos 5-FU-CQD nas proporções de 0,8:1,0 e 1,0:1,0, observou-se um potencial de $\xi = -28,8 \pm 2,9\text{ mV}$ e $\xi = -24,1 \pm 1,5\text{ mV}$, respectivamente, indicando uma diminuição na carga superficial, em termos de módulo, após o ancoramento do 5-Fluorouracil. Resultados semelhantes foram reportados por Sen et al., (2019) e Udofot et al., (2015). Apesar da natureza aniônica do 5-FU, as cargas residuais dos materiais híbridos 5-FU-CQD

aumentaram o que pode indicar possíveis interações entre os grupos de cargas opostas, como entre grupo carboxilato e $-NH_2$, ou entre $C=O$ e $-NH_2$, por exemplo, que atuam neutralizando os grupos de carga negativa. Com o aumento da quantidade incorporada nos materiais híbridos observou-se que o potencial se tornou ainda mais positivo (Figura 18), corroborando o que foi discutido anteriormente. Além disso, é válido ressaltar que apenas uma pequena redução no potencial zeta (em módulo) foi observada nos materiais híbridos quando comparado aos CQDs puros, sugerindo que o ancoramento do fármaco não teve grande influência na estabilidade em suspensão do material final.

Figura 18 - Potencial zeta da solução dos CQDs e dos materiais híbridos 5-FU-CQD nas proporções de 0,8:1,0 e 1:1 na concentração de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$



5.2.1 Propriedades de fotoluminescência

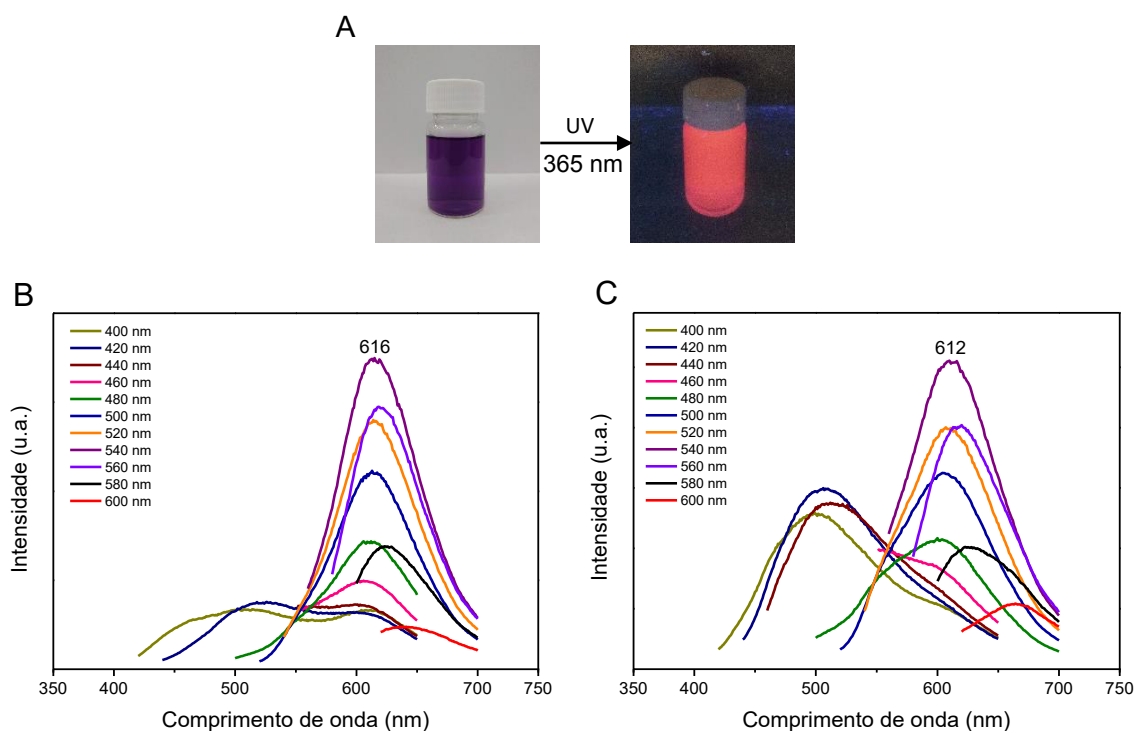
Ao excitar a solução aquosa dos CQDs utilizando radiação UV (365 nm), foi observada uma intensa fotoluminescência na região do vermelho, como pode ser observada na Figura 19A. A origem da fotoluminescência dos pontos quânticos de carbono ainda não é completamente elucidada, no entanto, é possível afirmar que a emissão dos CQDs se origina dos centros aromáticos (sp^2) e do estado de superfície, que pode ser excitada de forma direta ou por transferência de carga. Dessa forma, é possível controlar o perfil de emissão dos CQDs modificando os grupos funcionais presentes na superfície dessa partícula e/ou controlando o tamanho do centro aromático. Emissões na região laranja/vermelho, como a obtida neste estudo, estão relacionadas a CQDs com dimensões maiores (quando comparados a partícula que emitem na região azul/verde) e com maior nível de grupos oxigenados na superfície (DING et al., 2016; YANG et al., 2018). Além disso, estes tipos de CQDs apresentam potencial promissor em termos de aplicações biológicas devido a elevada capacidade de penetração tecidual e autofluorescência diminuída (DING et al., 2019).

Os espectros de fluorescência dos CQDs foram registrados excitando-se uma solução aquosa na faixa de 400 a 600 nm com incrementos de 20 nm. Na Figura 19B, observa-se que a

maior intensidade de emissão foi exibida em 616 nm quando os CQDs foram excitados em 540 nm. A fotoluminescência dos CQDs aumentou gradativamente conforme foram excitados de 400 a 540 nm, e em comprimentos de excitação maiores que este, passaram a decrescer. Pode-se notar que nos comprimentos de excitação de 400 e 420 nm observa-se a presença de duas bandas de emissão com máximos próximos de 500 e 600 nm. Comportamento semelhante foi observado por Dhenadhayalan et al., (2015), sendo possível inferir que a emissão dessas bandas está relacionada ao estado de superfície e ao centro aromático, respectivamente. Assim, para os CQDs preparados neste estudo, o processo emissivo do centro aromático supera o da superfície. Além disso, à medida que os CQDs foram excitados, ocorreu um deslocamento da emissão para comprimentos maiores (*red-shifted*). Este comportamento de emissão dependente do de excitação é característico dos CQDs, refletindo propriedades de fotoluminescência bastante interessantes, uma vez que é possível ajustar a emissão a partir do comprimento de excitação. É reportado na literatura que esse comportamento é consequência dos diferentes tamanhos e estados de superfície dos CQDs que geram diferentes níveis energéticos (LIU et al., 2017).

Como observado na Figura 19C, o material híbrido 5-FU-CQD manteve a dependência entre excitação e emissão apresentado pelos CQDs puros. A banda com maior intensidade de emissão foi observada com máximo em 612 nm quando excitada em 540 nm, havendo então um deslocamento de 4 nm para comprimentos de onda menores quando comparado com os CQDs. Essa modificação pode ter ocorrido devido ao efeito de transferência de carga entre os grupos funcionais do CQD e do 5-FU (SACHDEV et al., 2016). Pode-se observar que as bandas em ~500 nm que aparecem nos CQDs de forma discreta, tornam-se bastante intensas no material híbrido com máximo de emissão em 512 nm quando excitada em 440 nm. Esse fato sugere que no material híbrido 5-FU-CQD o estado de superfície tem grande contribuição no processo emissivo das partículas, bem superior quando comparado ao CQD puro. A mudança no processo de emissão dos materiais híbridos 5-FU-CQD é, muito provavelmente, consequência das interações entre os grupos funcionais do 5-FU e do CQD, gerando um estado de superfície distinta do que nos CQDs.

Figura 19 - (A) Solução aquosa dos CQDs excitados por radiação UV (365 nm) e espectros de emissão dos (B) CQDS e do (C) material híbrido 5-FU-CQD em solução excitados na faixa de 400 a 600 nm com incrementos de 20 nm



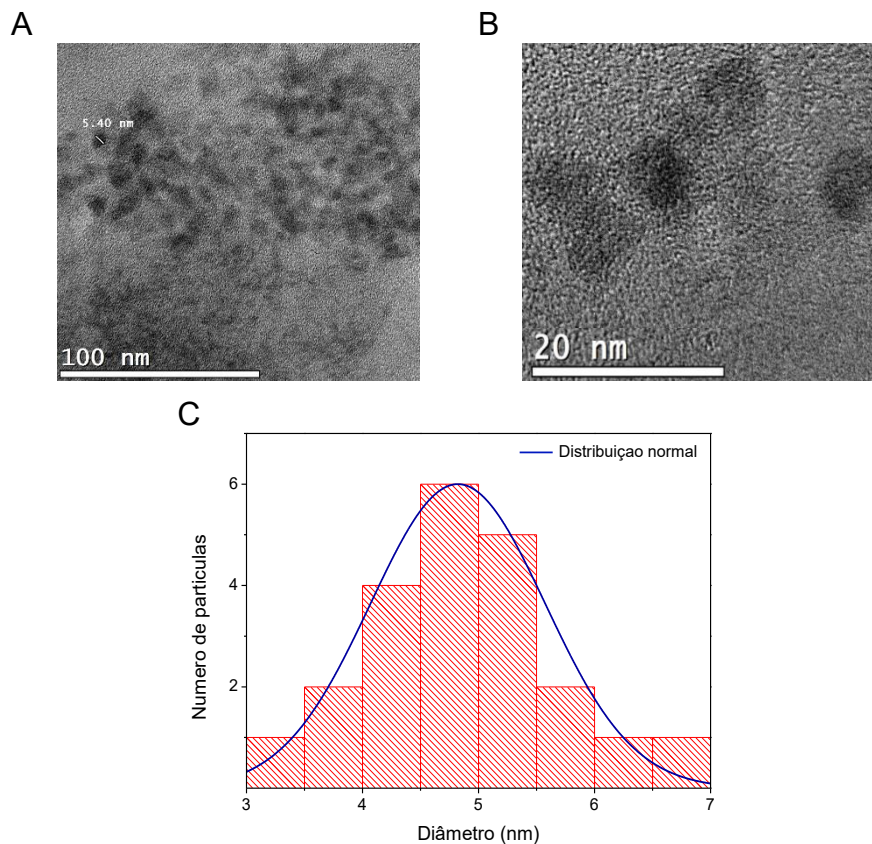
Fonte: Autor (2019)

5.2.1 Propriedades morfológicas e texturais

As propriedades morfológicas dos pontos quânticos de carbono sintetizados neste estudo foram avaliadas utilizando a Microscopia Eletrônica de Transmissão. As imagens de TEM (Figura 20A e 20B) revelaram que os CQDs apresentaram morfologia esférica com diâmetros de partículas médias de $4,82 \pm 0,75$ nm, comprovando sua natureza nanométrica inferior a 10 nm. Como representado no histograma (Figura 20C), as partículas exibiram um intervalo estreito de distribuição, com tamanhos variando de 3,40 a 6,53 nm.

Além disso, as características texturais do CQD e do material híbrido 5-FU-CQD foram investigadas a partir da isoterma de adsorção-dessorção de N_2 a -196°C . Para o CQD puro (Tabela 2) obteve-se uma área superficial de $12,80 \text{ m}^2/\text{g}$, o que é similar ao reportado na literatura. Wang et al., (2013) obtiveram um valor de área superficial de $16,4 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ para pontos de carbono porosos (*hollow carbon dots*) com diâmetro médio de 6.8 nm observado a partir de imagens de HRTEM. Enquanto isso, o híbrido 5-FU-CQD apresentou uma área superfície de $26,54 \text{ m}^2/\text{g}$, indicando que o ancoramento do fármaco resultou em um aumento de mais de duas vezes na área superficial quando comparado ao nanocarreador puro.

Figura 20 – (A, B) Imagens de TEM dos CQDs e (C) histograma com a distribuição dos tamanhos das partículas com ajuste ao modelo Gaussiano



Seguindo a mesma tendência, o volume total de poros do material híbrido 5-FU-CQD também foi superior, indicando um significativo aumento na porosidade do material. Esta característica pode ser vantajosa em termos de aplicações biológicas, já que é reportado na literatura que o aumento da área de superfície e da porosidade leva a uma maior interação entre a superfície do material à base de carbono e as células (BAILÓN-GARCÍA et al., 2019).

Tabela 2 - Valores de área superficial e volume total de poros para os CQD e o material híbrido 5-FU-CQD obtidos a partir de isoterma de adsorção-dessorção de N₂ a -196°C

Amostra	Área superficial (m ² /g)	Volume total de poros (cm ³ /g)
CQD	12,80	0,16
5-FU-CQD	26,54	0,21

5.2.2 Análises térmicas

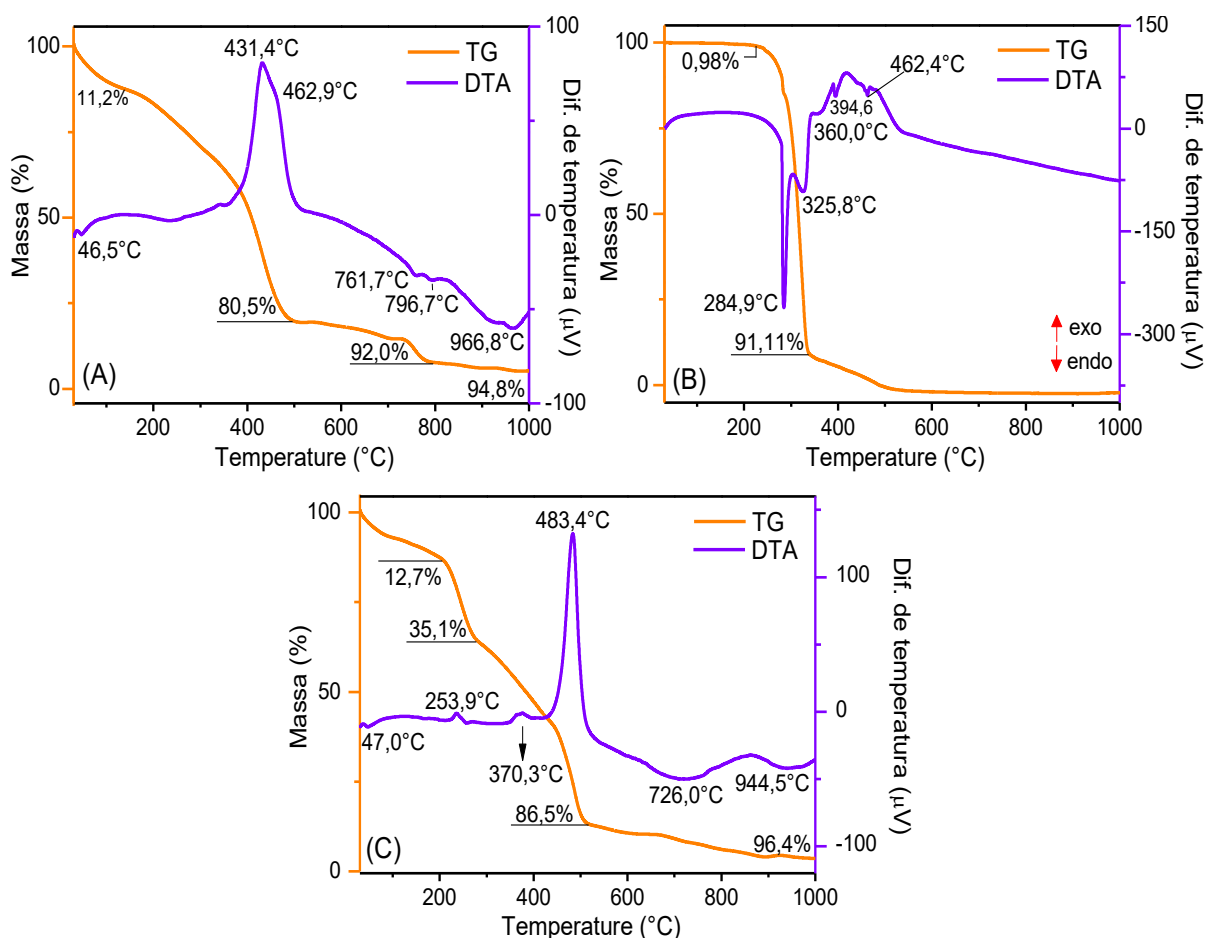
Com o intuito de avaliar a estabilidade térmica dos materiais estudados, análises térmicas foram conduzidas em atmosfera dinâmica de nitrogênio. A Figura 21 demonstra o comportamento térmico dos CQDs, 5-FU e do material híbrido 5-FU-CQD. Os CQDs puros

(Figura 21A) sofreram um processo de degradação em três etapas. Da temperatura ambiente até cerca de 110°C, o material perdeu 11,2% em massa. Essa etapa está associada ao evento endotérmico em 46,5°C na curva DTA e ocorre devido a eliminação de água fisicamente adsorvida. Acima dessa temperatura, observa-se uma perda de massa gradual de 69,3% em correspondência ao intenso evento exotérmico em 431,4°C e ao ombro em 462,9°C na curva DTA. Esses eventos estão relacionados a remoção de grupos funcionais da superfície dos CQDs (hidroxilas, carbonila e íon carboxilato) podendo haver produção de gases como H₂O, CO e CO₂ durante esse processo (EL-KHODARY et al., 2014). A etapa seguinte está associada a três eventos discretos na curva DTA entre 700-900°C que podem ser atribuídos a decomposição do centro aromático (*skeleton*) dos CQDs (VÁZQUEZ-NAKAGAWA, 2016). Ao final desse processo, observa-se um resíduo gerado pelos CQDs de aproximadamente 5,2%.

O 5-Fluorouracil (Figura 21B) permanece estável da temperatura ambiente até cerca de 220°C, perdendo apenas 0,98% em massa em decorrência da eliminação de moléculas de água fisicamente adsorvidas. No entanto, no intervalo de 220-335°C, o fármaco perde aproximadamente 90% de sua massa em uma única etapa que está relacionada aos eventos endotérmicos em 284,9°C e 325,8°C. Em correspondência a terceira etapa (335-530°C), a curva DTA mostra uma sequência de eventos endotérmicos que são indicativos do processo de degradação do 5-FU (TAN et al., 2017).

Considerando o material híbrido 5-FU-CQD (Figura 21C), observa-se um comportamento térmico bem similar aos CQDs puros. Até cerca de 200°C, os materiais não apresentam nenhuma diferença apreciável no perfil de degradação. Assim, primeira perda de massa do material de híbrido de 12,7% está associada a eliminação de moléculas de fissoresbida e corresponde ao evento endotérmico em 47,0°C na curva DTA. Pode-se notar também, que nenhum dos eventos característicos do fármaco puro estão presentes no material híbrido, no entanto eventos adicionais na curva DTA em 253,9°C e 370,3°C são observados. Estes eventos, além de indicar a presença do fármaco, podem também sugerir interações entre 5-FU e os CQDs. Além disso, o intenso evento dos CQDs em 431,4°C associado decomposição dos grupos funcionais foi deslocado para 483,4°C no 5-FU-CQD, o que indica que o processo de ancoramento do 5-FU nos CQDs melhorou suas propriedades térmicas.

Figura 21 – Curvas TGA e DTA dos (A) CQD, (B) 5-Fluorouracil e do (C) material híbrido 5-FU-CQD. As análises foram realizadas em atmosfera dinâmica de nitrogênio com razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$

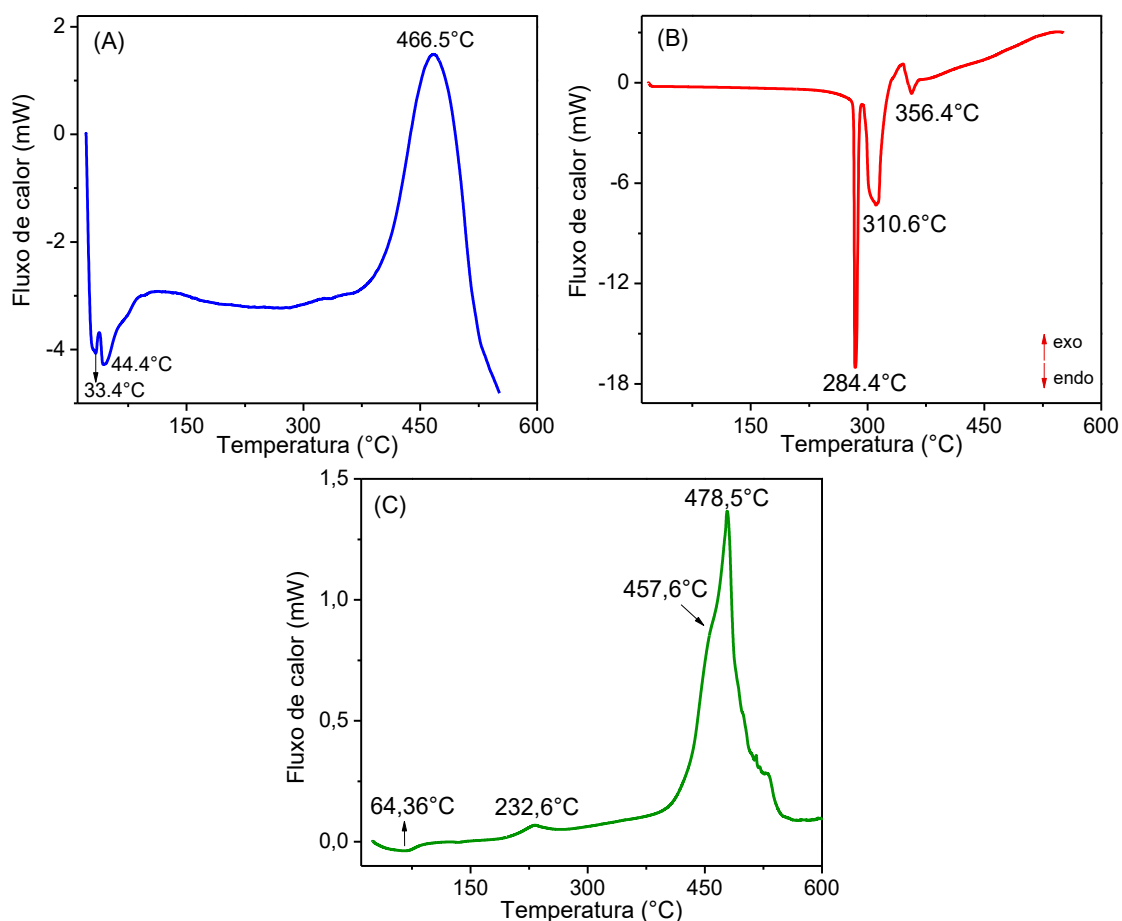


Além das técnicas TGA/DTA, os materiais também foram analisados mediante varredura exploratória diferencial (DSC) (Figura 22). No termograma DSC dos pontos quânticos de carbono (Figura 22A) os eventos endotérmicos observados em 33,4 e 44,4°C podem ser atribuídos a perda de água fisicamente adsorvida na superfície dos CQDs. Já o intenso evento exotérmico em 467,80°C refere-se à decomposição dos grupos funcionais como hidroxilas, carbonila e íon carboxilato presentes na superfície dos CQDs (EL-KHODARY et al., 2014).

A curva DSC do 5-Fluorouracil (Figura 22B) apresentou um intenso evento endotérmico em 284,6°C que pode ser atribuído a fusão do fármaco. Acima dessa temperatura, observa-se dois eventos endotérmicos consecutivos em 310,6 e 356,4°C que estão associados com a decomposição térmica do fármaco (TAN et al., 2017). Segundo Mohamed e coautores, o mecanismo de decomposição térmica do 5-FU mais provável é através da ruptura hemolítica da ligação N1-H seguido da cisão do anel (MOHAMED et al., 2017).

No termograma do material híbrido 5-FU-CQD (Figura 22C), observa-se um evento endotérmico em 64,36°C que se refere a perda de água fisicamente adsorvida na superfície do híbrido. Em 232,6°C observa-se um evento discreto que, provavelmente, está associado a presença do fármaco. Como esse evento não foi observado nos termogramas dos materiais puros, infere-se que ele ocorre como resultado da interação dos CQDs e do 5-FU. Em seguida, nota-se um ombro em 457,6° e um intenso evento exotérmico em 478,5°C que está associado a decomposição dos grupos funcionais presentes na superfície dos CQDs. No material híbrido, esta decomposição ocorre 12°C acima do que no material puro e, além disso, o evento tomou-se mais estreito, indicando que a degradação se iniciou em uma temperatura maior. Dessa forma, é possível inferir que o ancoramento do fármaco na superfície dos CQDs garantiu maior estabilidade ao nanocarreador.

Figura 22 - Curvas DSC dos (A) CQD, (B) 5-Fluorouracil e do (C) material híbrido 5-FU-CQD. Realizou-se as análises em atmosfera dinâmica de nitrogênio com razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹



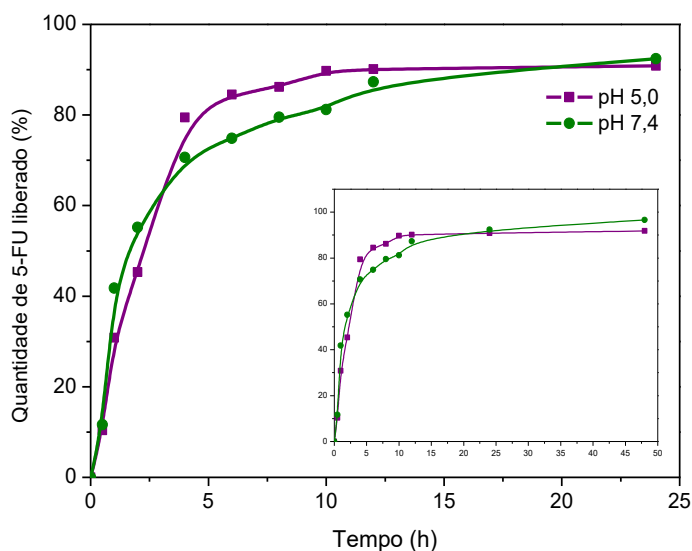
5.3 Liberação *in vitro* do 5-Fluorouracil

O perfil de liberação *in vitro* do fármaco foi realizado utilizando-se o material híbrido 5-FU-CQD liofilizado em dois valores distintos de pH a temperatura de 37°C. O pH 7,4 e 5,0

foram usados com o intuito de simular o ambiente fisiológico (sangue) e o microambiente tumoral, respectivamente. A porcentagem de 5-FU liberada no experimento foi determinada espectrofotometricamente e calculado de acordo com a Equação 3.

A partir da Figura 23, observa-se que o pH 5,0 promoveu uma maior liberação do fármaco até as 12 h de experimento, o que indica que o híbrido 5-FU-CQD apresentou a capacidade de liberar o 5-FU de forma seletiva em pH ácido (microambiente tumoral) neste intervalo. Este efeito pode estar relacionado com a protonação dos grupos carboxílicos dos CQDs que resultam no aumento da quantidade de fármaco liberada quando comparado ao meio básico. Esta propriedade apresentada pelo 5-FU-CQD é bastante interessante em termos de aumento da eficiência na terapia do câncer, uma vez que direciona o a molécula ativa a um alvo biológico específico. Além disso, a partir do gráfico em detalhe na figura abaixo, observa-se que o sistema 5-FU-CQD libera o fármaco continuamente até 48 h atingindo porcentagens de 91,80% e 96,57% para os sistemas em tampão pH 5,0 e 7,4, respectivamente.

Figura 23 – Perfil de liberação *in vitro* do fármaco 5-Fluorouracil a partir do material híbrido 5-FU-CQD em tampão fosfato (pH 7,4) e acetato (pH 5,0) e em detalhe, as curvas até 8 h de liberação em ambos os valores de pH



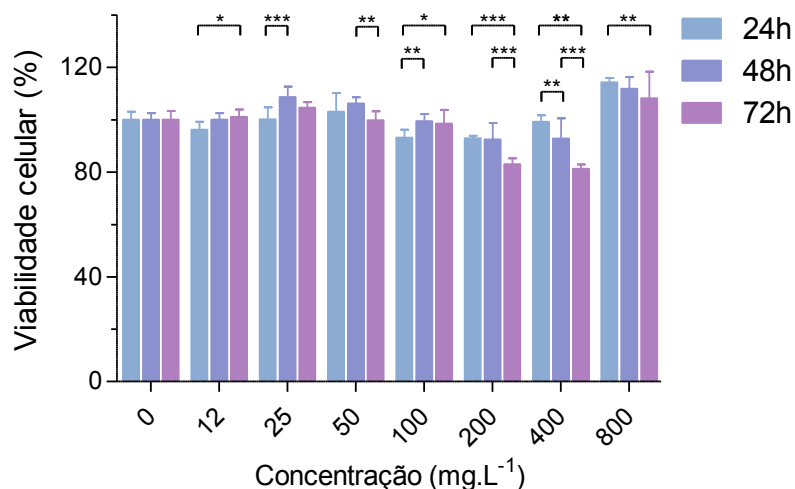
5.4 Viabilidade celular

Neste estudo, os CQDs foram avaliados como potencial nanocarreador para o transporte e liberação do quimioterápico 5-Fluorouracil. Visando tais aplicações biomédicas, a boa compatibilidade do material é essencial. Dessa forma, avaliou-se a citotoxicidade dos CQDs frente linhagem de fibroblastos humanos normais (GM07492) utilizando o ensaio MTT. As células foram expostas a concentrações dos CQDs que variaram de 12,5 a 800 mg.L⁻¹ nos

tempos de incubação de 24, 48 e 72 h. Como observado na Figura 24, quase nenhuma redução na viabilidade celular foi observada, mesmo nas concentrações mais elevadas de CQDs. Apenas uma pequena redução nas taxas de sobrevivência ocorreu no tempo de 72 h nas concentrações de 200 e 400 mg.L⁻¹, cujas taxas foram próximas de 80%. Em todos os outros grupos, a viabilidade das células GM07492 foi superior a 90%. É importante mencionar que a concentração de CQDs utilizada na preparação do material híbrido 5-FU-CQD (400 mg.L⁻¹) está incluída na faixa testada, portanto pode-se afirmar que os pontos quânticos de carbono são de fato biocompatíveis, sendo materiais adequados para aplicação em sistemas biológicos.

Curiosamente, em algumas concentrações (12,5-50 e 800 mg.L⁻¹) a taxa de sobrevivência das células GM07492 expostas aos CQDs foram significativamente superior ao grupo controle, indicando que estes materiais podem atuar promovendo a proliferação celular. Resultados semelhantes utilizando nanomateriais a base de carbono são reportados na literatura (BAILÓN-GARCÍA et al., 2019; YUAN et al., 2017). Nestes casos, foi reportado que os nanomateriais estimulam o crescimento celular agindo como *scaffolds* mimetizando o ambiente *in vivo* (GONG et al., 2015).

Figura 24 - Viabilidade celular (%) da linhagem GM07492 (fibroblastos humanos normais) tratada com CQDs na faixa de concentração 12,5-800 mg.L⁻¹ nos tempos de incubação de 24, 48 e 72 h. Os resultados são expressos como medida $\pm$ desvio padrão de experimentos independentes. A significância estatística entre os grupos foi denotada por * (p<0,05), ** (p<0,005) e *** (p<0,001)



Da mesma forma, a citotoxicidade do 5-FU puro e do material híbrido 5-FU-CQD (em concentrações equivalentes a droga pura) foram avaliados frente as células normais. A partir da Figura 24 é observado que, de forma geral, a porcentagem de viabilidade celular é reduzida progressivamente com o aumento da concentração do tratamento. No tempo de 24 h (Figura 25A) apenas na concentração de 0,25 mg.L⁻¹ é notado uma taxa de sobrevivência maior no grupo do 5-FU. Entretanto, essa diferença não foi maior que 1,5%, sendo estatisticamente

insignificante. Na faixa de concentração de 0,50 a 16,0 mg.L⁻¹, a viabilidade das células expostas ao material híbrido 5-FU-CQD foi superior quando comparada ao fármaco puro, observando-se médias de sobrevivência superiores a 90% em todos os casos. Nas concentrações de 8,0 e 16,0 mg.L⁻¹, a viabilidade do híbrido foi de 90,12% e 91,83%, atingindo-se uma diferença de viabilidade em relação ao 5-FU de 10,51% e 30,45%, respectivamente.

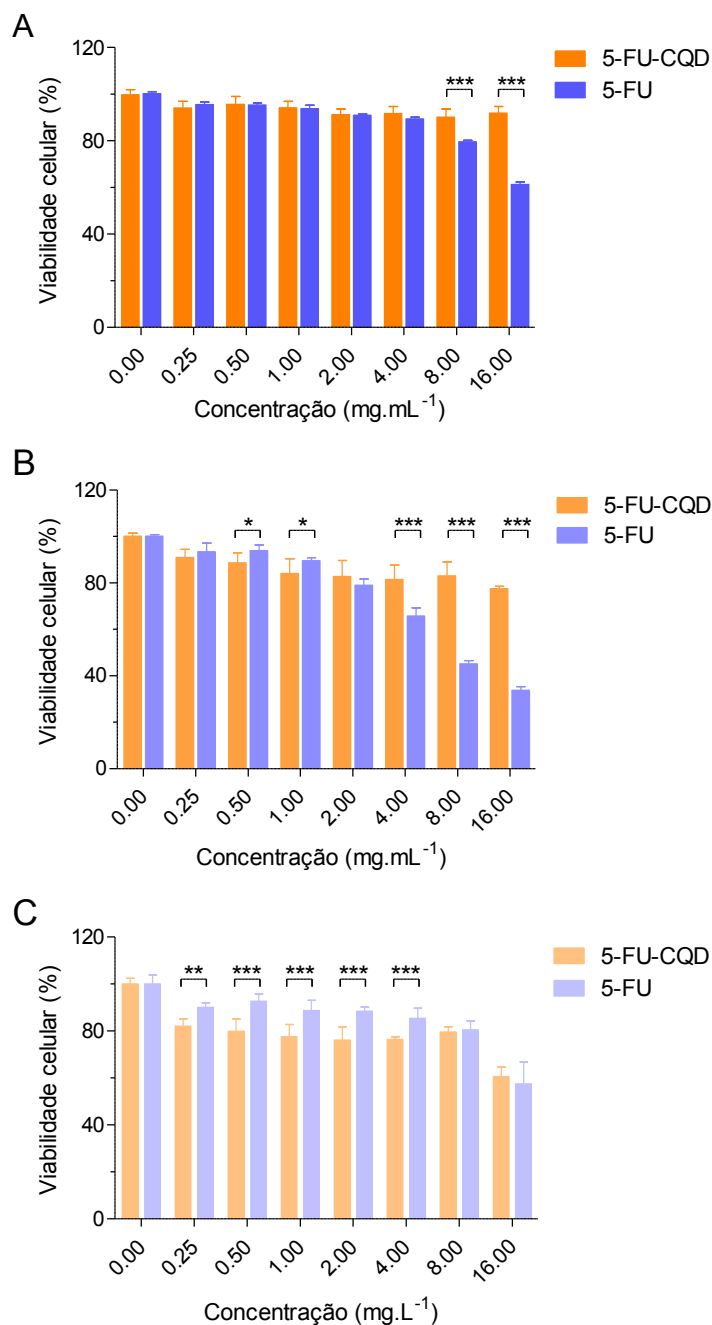
Após 48 h de incubação (Figura 25B), notou-se um comportamento semelhante, com o grupo do 5-FU apresentando taxas de sobrevivências superiores ao grupo tratado com o material híbrido nas concentrações de 0,25, 0,50 e 1,0 mg.L⁻¹; essa diferença, no entanto, não alcançou 6%. Cabe ressaltar que, no tempo de 48 h, o 5-FU exibiu citotoxicidade a doses menores do que em 24 h, podendo estar relacionado a um efeito tempo-dependente. Na faixa de concentração de 2,0 a 16,0 mg.L⁻¹, o híbrido 5-FU-CQD apresentou menor toxicidade as células normais do que o fármaco puro, alcançando-se uma diferença na viabilidade de 37,84% e 43,87% nas concentrações de 8,0 e 16,0 mg.L⁻¹, respectivamente. Para o grupo tratado com o 5-FU puro, as porcentagens de viabilidade nas concentrações citadas anteriormente foram de 45,19% e 33,07%, enquanto que para o 5-FU-CQD foram de 83,03% e 77,57%, respectivamente.

No tempo de incubação de 72 h (Figura 23C), observou-se um comportamento distinto dos demais. O grupo tratado com o 5-FU não apresentou uma redução na taxa de sobrevivência tão evidente como nos tempos de 24 e 48 h. Na concentração de 16,0 mg.L⁻¹, por exemplo, as viabilidades foram de 61,38%, 33,70% e 57,40% para os tempos de 24, 48 e 72 h, respectivamente. Geralmente, com o aumento da incubação é esperado uma redução na viabilidade celular, o que não aconteceu nesse caso. Como possível efeito desse fato, apenas na concentração de 16,0 mg.L⁻¹ foi observada uma maior taxa de sobrevivência no grupo tratado com o 5-FU-CQD. Para o material híbrido, observa-se um comportamento mais consistente, onde a viabilidade celular é reduzida com efeito do tempo de incubação e da concentração. Na dose mais elevada testada, por exemplo, observa-se valores médios de viabilidade de 91,83%, 77,57% e 60,59% nos tempos de 24, 48 e 72 h, respectivamente. De forma geral, o 5-FU-CQD apresenta um aumento na citotoxicidade em função do tempo de incubação.

As porcentagens de viabilidade celular superiores observadas para as células tratadas com 5-FU-CQD quando comparado ao fármaco puro podem indicar que o material híbrido é capaz de reduzir a citotoxicidade associada ao quimioterápico 5-FU. Este fato pode ser atribuído a uma liberação mais lenta do fármaco a partir dos CQDs (YANG *et al*, 2016; WANG *et al.*, 2015), no entanto, a capacidade dos CQDs de promover proliferação celular também pode estar associada a redução da toxicidade do material híbrido. Na literatura, são reportados resultados semelhantes onde a associação de pontos de carbono com fármacos atuou reduzindo a

toxicidade associada ao quimioterápico frente células normais (SACHDEV et al., 2016; YUAN et al., 2017). Todavia, até o momento, não se tem conhecimento do efeito da conjugação direta com os CQDs e o 5-FU, o que torna os resultados obtidos neste estudo bastante expressivos.

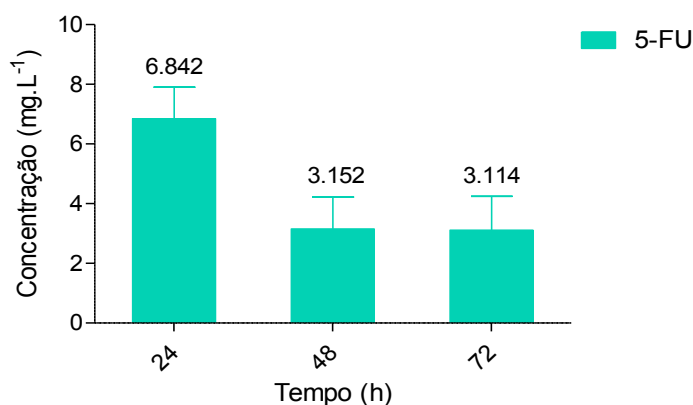
Figura 25 - Viabilidade celular (%) da linhagem GM07492 (fibroblastos humanos normais) tratada com 5-FU e 5-FU-CQD na faixa de concentração de 0,25-16 mg.L⁻¹ nos tempos de incubação de (A) 24, (B) 48 e (C) 72 h. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de experimentos independentes. A significância estatística entre os grupos foi denotada por * (p<0,05), ** (p<0,005) e *** (p<0,001)



Os valores de IC₅₀ representados na Figura 26 indicam a concentração em que se observa uma redução de 50% na viabilidade das células GM07492. Dessa forma, quanto maior o valor de IC₅₀, menor citotoxicidade o composto apresenta. As IC₅₀ foram obtidas a partir da

normalização dos dados de viabilidade e seguinte adequação a função logarítmica. O 5-FU puro apresentou valores de IC_{50} que diminuíram em função do tempo de incubação, indicando aumento de sua citotoxicidade. Como discutido anteriormente, no tempo de 72 h o fármaco apresentou uma viabilidade maior do que em 48 h, no entanto, como efeito da normalização, onde o menor valor de viabilidade do experimento é considerado como 0%, o valor de IC_{50} foi menor no tempo de 72 h. Em contrapartida, o 5-FU-CQD não apresentou boa adequação para os cálculos de IC_{50} devido aos elevados valores de viabilidade celular observado em todos os tempos e doses, comprovando a menor citotoxicidade do material híbrido em relação ao fármaco puro.

Figura 26 - Valores de IC_{50} para o 5-FU frente a linhagem GM07492 nos tempos de incubação de 24, 48 e 72 h



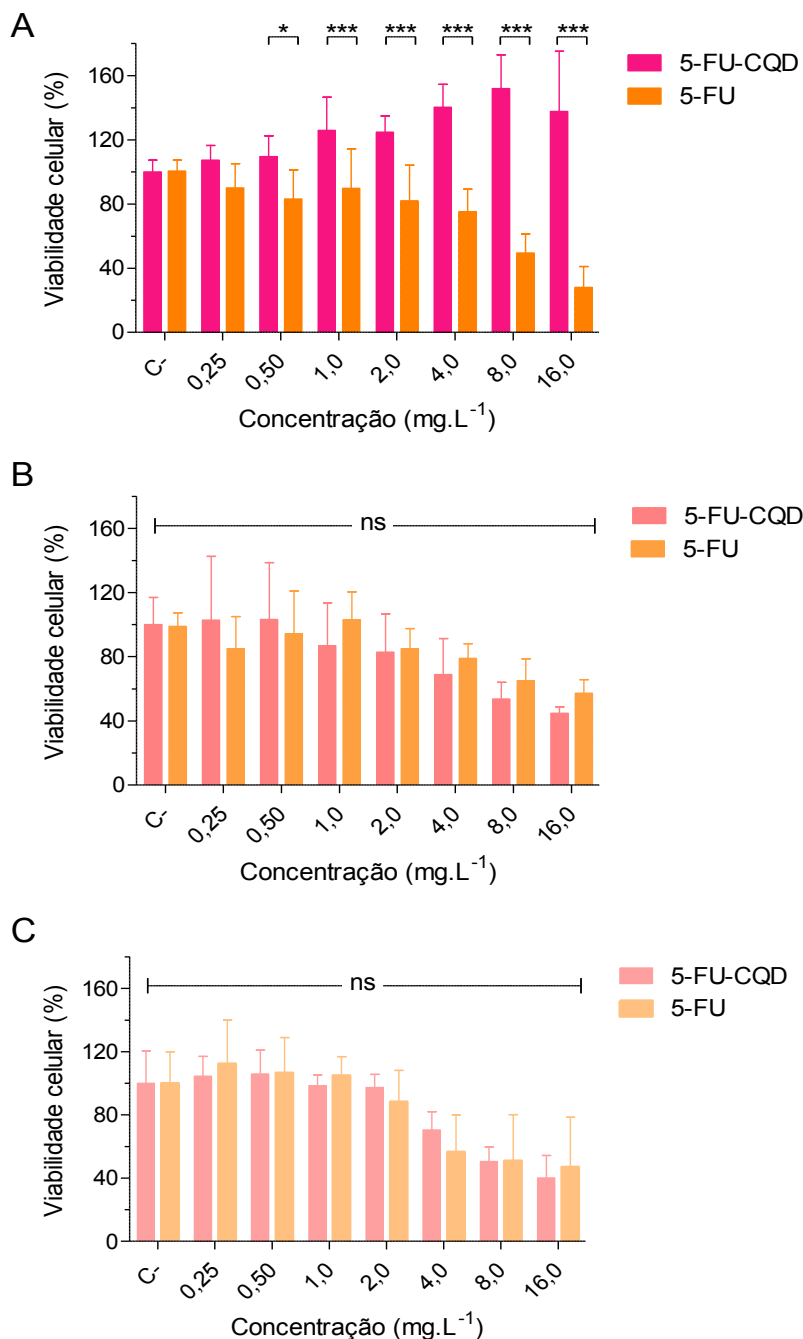
A citotoxicidade do 5-FU puro e do material híbrido 5-FU-CQD também foram avaliadas frente a linhagem MCF-7 (adenocarcinoma mamário). A partir da Figura 27 observa-se que, para o fármaco puro, a viabilidade celular é reduzida com o incremento da concentração (ver Apêndice D). No entanto, a viabilidade celular não é reduzida de forma gradativa com o aumento do tempo de incubação. Neste estudo, o 5-FU apresentou maior toxicidade as células tumorais no tempo de 24 h. Enquanto isso, o material híbrido 5-FU-CQD demonstrou uma redução na viabilidade celular com o aumento da concentração e tempo de incubação. No tempo de 24 h (Figura 27A), entretanto, é notado um aumento de viabilidade celular em todas as concentrações utilizadas. Dessa forma, o 5-FU foi mais tóxico as células do que o material híbrido 5-FU-CQD.

No tempo de 48 h, entretanto, observou-se um comportamento bem distinto ao de 24 h. Nas concentrações de 0,25 e 0,50 $mg.L^{-1}$, o 5-Fluorouracil foi mais tóxico as células cancerígenas do que o 5-FU-CQD, no entanto, acima desta concentração o material híbrido exibiu maior efeito antitumoral frente a MCF-7. As diferenças de viabilidade foram em torno

de 10%, não sendo tão elevadas, e estatisticamente, os valores de viabilidade não apresentaram diferença significativa.

Após 72h de incubação, notou-se um perfil semelhante ao de 48 h. Nesse caso, o 5-FU apresentou maior redução na viabilidade nas concentrações de 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹, porém nas concentrações de 0,25 a 1,0, 8,0 e 16,0 mg.L⁻¹ o material híbrido 5-FU-CQD foi mais tóxico as células cancerígenas. A maior diferença na viabilidade foi de aproximadamente 16% na concentração de 4,0 mg.L⁻¹, no entanto, de forma geral, não houve diferença entre as viabilidades para os grupos tratados com o fármaco ou com o material híbrido. Apesar disso, os resultados do tempo de incubação de 48 e 72 h dão um indicativo de que o material híbrido 5-FU-CQD apresentou um efeito antitumoral similar ao 5-Fluorouracil puro, o que é bastante relevante.

Figura 27 - Viabilidade celular (%) da linhagem MCF-7 (adenocarcinoma mamário) tratada com 5-FU e 5-FU-CQD na faixa de concentração de 0,25-16 mg.L⁻¹ nos tempos de incubação de (A) 24, (B) 48 e (C) 72 h. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de experimentos independentes. A significância estatística entre os grupos foi denotada por * (p<0,05), ** (p<0,005) e *** (p<0,001). “ns” representa diferença estatística não significativa

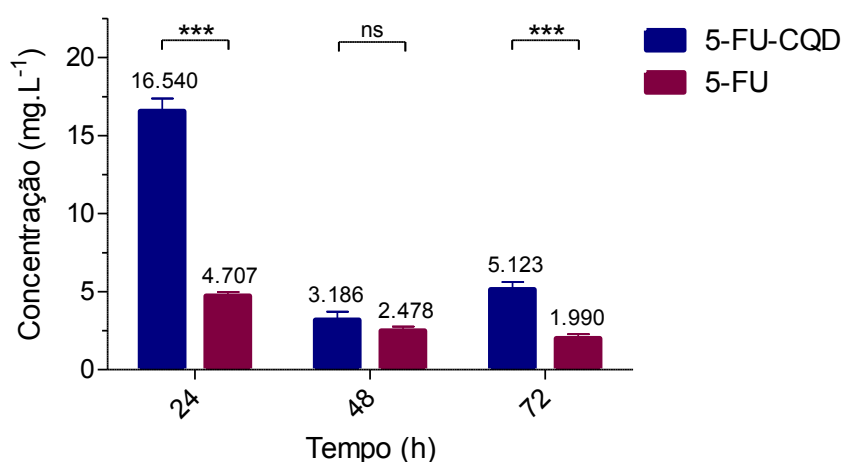


Na Figura 28 estão representados os valores de IC₅₀ do 5-FU e do material híbrido 5-FU-CQD frente a linhagem MCF-7. Inicialmente, é válido considerar as diferenças nos valores de IC₅₀ para o 5-FU frente as células normais (Figura 26) e cancerígenas. No tempo de 24 h, por exemplo, o fármaco apresenta IC₅₀ de 6.842 mg.L⁻¹ frente GM07492 e 4.707 frente MCF-7. Considerando que a toxicidade do composto é inversamente proporcional ao valor de IC₅₀, é possível afirmar que o 5-FU exibiu maior

efeito tóxico as células cancerígenas do que as normais. Em todos os tempos é observado esta mesma tendência, comprovando que de fato o fármaco apresenta certa seletividade as células cancerígenas.

Considerando somente a linhagem MCF-7, observou-se que em todos os tempos de incubação o material híbrido 5-FU-CQD apresentou valores de IC_{50} superiores ao 5-FU, indicado uma redução na citotoxicidade do material. Esse efeito tem sido descrito em diversos trabalhos e pode ser atribuído a uma liberação mais lenta do fármaco a partir do material híbrido 5-FU-CQD (LI et al, 2014; SACHDEV *et al*, 2016; YANG et al., 2016; WANG et al, 2015).

Figura 28 - Valores de IC_{50} para o 5-FU e o material híbrido 5-FU-CQD frente a linhagem MCF-7 nos tempos de incubação de 24, 48 e 72 h. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão de experimentos independentes. A significância estatística entre os grupos foi denotada por * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,005$) e *** ($p < 0,001$). “ns” representa diferença estatística não significativa



No tempo de 48 h, é observado o melhor resultado onde o valor da IC_{50} para o 5-FU e o material híbrido 5-FU-CQD são bem próximos, não apresentando diferença estatística. Esses resultados indicam que o material híbrido 5-FU-CQD apresentou efeito antitumoral análoga ao 5-FU puro, sugerindo que o ancoramento do fármaco na superfície dos CQDs não interferiu na sua atividade biológica. Ademais, o híbrido exibiu menor citotoxicidade a linhagem de célula normal testada, o que é bastante promissor considerando sistemas *in vivo*, visto que há a possibilidade da redução dos efeitos colaterais associados ao 5-Fluorouracil que são extremamente desconfortáveis aos pacientes.

Como perspectiva para futuros trabalhos, sugere-se a realização de testes que avaliem a internalização celular do material híbrido 5-FU-CQD em relação ao 5-FU e o mecanismo associado a morte celular ocasionada pelos dois sistemas. Além disso, valendo-se das excelentes propriedades de fotoluminescência e biocompatibilidade dos CQDs, pode-se utilizar o material híbrido 5-FU-CQD em aplicações de bioimagem. É suportado na literatura que os CQDs se acumulam em regiões tumorais, sendo assim possível o emprego do 5-FU-CQD como

nanoplateforma para o tratamento e diagnóstico do câncer (sistema teranóstico) (YUANG et al., 2018).

Quando preparado como suspensão, o híbrido 5-FU-CQD torna-se um produto adequado na terapia do câncer por administração via intravenosa - essa é a forma mais utilizada para o 5-FU atualmente – podendo assim ter sua eficiência terapêutica avaliada por meio de ensaios *in vivo*. Por fim, existe a possibilidade de destinar o 5-FU-CQD para um sistema de administração oral. Nesse caso, o híbrido preparado neste estudo não se encontra na forma mais adequada, sendo necessário um encapsulamento ou revestimento dessa estrutura com outros materiais que garantam a passagem do fármaco de forma intacta pelo trato gastrointestinal para que seja absorvido de forma completa no local alvo.

6 CONCLUSÃO

Os resultados reportados nesta dissertação demonstram o desenvolvimento bem-sucedido de um material híbrido a base pontos quânticos de carbono e 5-Fluorouracil. A seguir são sumarizadas as principais conclusões obtidas neste estudo em termos de obtenção dos materiais, caracterização e aplicação em sistemas biológicos.

- Os CQDs obtidos a partir do tratamento solvotérmico do ácido cítrico e ureia apresentaram estrutura cristalina pouco ordenada e heterogênea com grande contribuição de defeitos estruturais originados a partir dos diversos grupos funcionais em sua superfície. Hidroxilas, carbonilas, íons carboxilato e grupos amino estão presentes na superfície destes materiais, garantindo elevada solubilidade em água e estabilidade. A partir dos espectros de fluorescência, inferiu-se que a contribuição do centro aromático supera a do estado de superfície nos CQDs;

- A partir das diferenças observadas entre o perfil dos CQDs e do 5-FU-CQD nas diversas caracterizações utilizadas, foi possível confirmar a formação do material híbrido. O ancoramento do fármaco na superfície dos CQDs ocorreu a partir de interações eletrostáticas e/ou pontes de hidrogênio entre os grupos funcionais do fármaco e dos CQDs. Em termos de fluorescência, observou-se uma maior contribuição do estado de superfície quando comprado ao CQD, sugerindo que as interações no material híbrido geraram novos níveis energéticos. Todavia, faz-se necessário outras caracterizações acerca da fotoluminescência, como determinação do rendimento quântico e tempo de vida que indicarão os efeitos do ancoramento do 5-FU nas propriedades de fotoluminescência dos CQDs;

- O pH ácido promoveu uma maior liberação do fármaco nas primeiras 12 h de experimento, indicando que o material híbrido 5-FU-CQD possuiu a capacidade de seletivamente liberar uma maior quantidade de 5-FU no microambiente tumoral quando comparado ao pH fisiológico nesse intervalo;

- Os CQDs não apresentaram toxicidade nas concentrações testadas a linhagem de célula normal (GM07492), indicado que eles são de fato biocompatíveis e ideais para as aplicações biomédicas;

- O material híbrido 5-FU-CQD apresentou menor toxicidade as células normais (GM07492) quando comparado ao fármaco puro nas concentrações testadas. Em relação a linhagem de adenocarcinoma mamário (MCF-7), o híbrido exibiu efeito antitumoral similar ao 5-Fluorouracil puro nos tempos de incubação de 48 e 72 h. Estes resultados indicam que o ancoramento do 5-FU nos CQDs manteve seu efeito antitumoral, além de reduzir a toxicidade

as células normais, possibilitando a redução dos efeitos colaterais que são bastante desconfortáveis aos pacientes, mas mantendo a eficiência terapêutica associada 5-Fluorouracil;

- A combinação da redução da citotoxicidade as células normais e a liberação seletiva ao microambiente tumoral nas primeiras 12h de experimento dão indicativos de que a aplicação do material híbrido 5-FU-CQD pode aumentar a eficiência na terapia do câncer, reduzindo os efeitos colaterais associados ao 5-Fluorouracil puro causados devido aos danos as células saudáveis, liberando o fármaco no alvo biológico e mantendo o efeito antitumoral do quimioterápico puro.

REFERÊNCIAS

- ALEXIS, F. et al. New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.*, v.26, p.74, 2008.
- ASHBY, M.F.; FERREIRA, P.J.; SCHODEK, D.L. Nanomaterials and Nanotechnologies: An Overview. In: _____. *Nanomaterials, Nanotechnologies and Design*. Elsevier, 2009, p.1-16.
- BAILÓN-GARCÍA, E. et al. The use of functionalized carbon xerogels in cells growth. *Mater. Sci. Eng. C.*, v.100, p.598-607, 2019.
- BANO, D. et al. Green synthesis of fluorescent carbon quantum dots for the detection of mercury (II) and glutathione. *New J. Chem.*, v. 42, p. 5814-5821, 2018.
- BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.*, v.13, 1965.
- BHARATHI, D. et al. Green and Cost Effective Synthesis of Fluorescent Carbon Quantum Dots for Dopamine Detection. *J. Fluoresc.*, v. 28, p. 573-579, 2018.
- BEACK, S. et al. Photodynamic therapy of melanoma skin cancer using carbon dot - Chlorin e6 - Hyaluronate conjugate. *Acta Biomater.*, v.26, p.295, 2015.
- BINNIG, G.; ROHRER, H. Scanning tunneling microscopy. *Helv. Phys. Acta*, v.55, p.726-735, 1982.
- CUENCA, A. G. ET al. Emerging implications of nanotechnology on cancer diagnostics and therapeutics. *Cancer*, v. 107, p.459, 2006.
- DAS, P. et al. Green approach to photoluminescent carbon dots for imaging of gram-negative bacteria *Escherichia coli*. *Nanotechnology*, v. 28, p.195501-195512, 2017.
- DE, B.; KARAK, N. A green and facile approach for the synthesis of water soluble fluorescent carbon dots from banana juice. *RSC Advances*, n.3, p.8286-8290, 2013.
- DHENADHAYALAN, N. et al. Unraveling the Multiple Emissive States in Citric Acid-Derived Carbon dots. *J. Phys. Chem. C*, v.120, p.1252-1261, 2016.
- DING, H. et al. Highly fluorescent near-infrared emitting carbon dots derived from lemon juice and its bioimaging application. *J. Lumin.*, v.211, p.298-304, 2019.
- DING, H. et al. Full-Color Light-Emitting Carbon Dots with a Surface-State-Controlled Luminescence Mechanism. *ACS Nano*, v.10, p.484-491, 2016.
- DU, F. et al. Nitrogen-doped carbon dots with heterogeneous multi-layered structures. *RSC Adv.*, v. 4, p.37536-37541, 2014.
- EL-KHODARY, S. A. et al. Preparation and Characterization of Microwave Reduced Graphite Oxide for High-Performance Supercapacitors. *Electrochim. Acta*, v. 150, p.269-278, 2014.

FENG, T. et al. Correction to Charge-Convertible Carbon Dots for Imaging-Guided Drug Delivery with Enhanced *in vivo* Cancer Therapeutic Efficiency. *ACS Nano*, v.10, p. 4410-4420, 2016.

GILES, C.H. et al. Studies in Adsorption. Part XI. A System of Classification of Solution Adsorption Isotherms, and its Use in Diagnosis of Adsorption Mechanisms and in Measurement of Specific Surface Areas of Solids. *J. Chem. Soc.*, v.247, p.193-199, 1960.

GONG, T. et al. Nanomaterials and bone regeneration. *Bone Res.*, v.3, p.1529-1535, 2015.

HEIDELBERGER, C. et al., Fluorinated pyrimidines, a new class of tumor-inhibitory compounds. *Nature*, v.179, p.663-666, 1957.

HOLA, K. et al. Carbon dots – Emerging light emitters for bioimaging, cancer therapy and optoelectronics. *Nano Today*, v.9, p.590-603, 2014.

HORNYAK, G.L.; RAO, A.K. Fundamentals of Nanoscience and Nanotechnology. In: HAMBLIN, M.R.; AVCI, P.; PROW, T.W. *Nanoscience in Dermatology*. Elsevier, 2016, p.15-29.

JASIM, D.A.; LOZANO, N.; KOSTARELOS, K. Synthesis of few-layered, high-purity graphene oxide sheets from different graphite sources for biology. *2D Mater.*, v.3, p.1-17, 2016.

INTERNATIONAL AGENCY FOR CANCER. *Cancer tomorrow*, 2019. Disponível em: <<http://gco.iarc.fr/>>, acessado em 13 de fev. de 2019.

LEE, J.; BEUMER, J.H. CHU, E. Therapeutic drug monitoring of 5-Fluorouracil. *Cancer Chemoth. Pharm.*, v.78, p. 447-464, 2016.

LI, D. et al. Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets. *Nat. Nanotechnol.*, v. 3, p. 101-105, 2008.

LI, H. et al. Carbon nanodots: Synthesis, properties and applications. *J. Mater. Chem.*, v.22, p.24230, 2012.

LI, M. et al. Cisplatin crosslinked pH-sensitive nanoparticles for efficient delivery of doxorubicin. *Biomaterials*, v. 35, p. 3851–3864, 2014.

LIU, Y. et al. Highly fluorescent nitrogen-doped carbon dots with excellent thermal and photo stability applied as invisible ink for loading important information and anti-counterfeiting. *Nanoscale*, v.9, p.491-496, 2017.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer*, v.3, p.330, 2003.

LOO, A. et al. Carboxylic Carbon Quantum Dots as a Fluorescent Sensing Platform for DNA Detection. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, v. 8, p.1951-1957, 2016.

LUCENA, S. et al. Induction of cancer cell death by apoptosis and slow release of 5-fluoracil from metal-organic frameworks Cu-BTC. *Biomed Pharmacother.*, v. 67, p.707-713, 2013.

MALET-MARTINO, M.; MARTINO, R. Clinical Studies of Three Oral Prodrugs of 5-Fluorouracil. *The Oncologist*, v.7. p. 288-323, 2002.

MIAO, P. et al. Recent advances in carbon nanodots: synthesis, properties and biomedical applications. *Nanoscale*, v.7, p.1586-1595, 2015.

MILLER, R.; FAINERMAN, V.B.; MÖHWALD, H. Adsorption behavior of oxyethylated surfactants at the air/water interface. *J. Colloid Interface Sci.*, v. 247, p. 193–199, 2002.

MING, H. et al. Large scale electrochemical synthesis of high quality carbon nanodots and their photocatalytic property. *Dalt. Trans.*, v.41, p.9526–9531, 2012.

MOHAMED, H.S.; DAHY, A.R.A.; MAHFOUZ, R.M. Isoconversional approach for non-isothermal decomposition of un-irradiated and photon-irradiated 5-Fluorouracil. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v.145, p.509-516, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, v. 65, p.55-63, 1983.

NAMDARI, P.; NEGAHDARI, B.; EATEMADI, A. Synthesis, properties and biomedical applications of carbon-based quantum dots: An updated review. *Biomed. Pharmacother.*, v.87, p.209, 2017.

NASROLLAHZADEH, M. et al. An introduction to Nanotechnology. In: _____. *An introduction do Green Nanotechnology*. Elsevier, v.28, p.1-27, 2019.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. *Folha informativa – Câncer*, 2018. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094>, acessado em 27 de setembro de 2019.

PARVAL, N. e MANDAL, T. K. Dually emissive P, N-co-doped carbon dots for fluorescent and photoacoustic tissue imaging in living mice. *Microchim. Acta*, v.184, p. 1117-1125, 2017.

PENG, Z. et al. Carbon dots: Biomacromolecule interaction, bioimaging and nanomedicine. *Coordination Chemistry Reviews*, v.343, p.256-277, 2017.

PIMENTA, M. A. A.; MELO, C. P. Nanociências e Nanotecnologia. *Ciência e Natura*, [S.l.], p.9-20, 2007.

PIMENTA, M.A. et al. Studying disorder in graphite-based systems by Raman spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, v. 9, p.1276–1291, 2007.

QU, S. et al. Toward Efficient Orange Emissive Carbon Nanodots through Conjugated sp²-Domain Controlling and Surface Charges Engineering. *Adv. Mater.*, v.28, p.3516-3521, 2016.

RAMSDEN, J.J. What is nanotechnology? *Nanotechnology Perceptions*, v.1, p.3-17, 2005.

RAMSDEN, J.J. What is nanotechnology? In: _____. *Nanotechnology: An Introduction*. Elsevier, 2016, p.1-14.

RAJ, R. et al. Nanocarriers Based Anticancer Drugs: Current Scenario and Future Perceptions. *Curr. Drug Targets*, v. 17, p.206, 2016.

RASTOGI, V.K. et al. Fourier transform Raman spectrum and ab initio and density functional computations of the vibrational spectrum, molecular geometry, atomic charges and some molecular properties of the anticarcinogenic drug 5-fluorouracil. *J. Raman Spectrosc.*, v.31, p.595-603, 2000.

RASTOGI, V.K.; PALAFOX, M.A. Vibrational spectra, tautomerism and thermodynamics of anticarcinogenic drug: 5-Fluorouracil. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, v.79, p.970-977, 2011.

REBITSKI, E.P. et al. Intercalation of metformin into montmorillonite. *Dalt. Trans*, v. 47, p. 3185-3192, 2018.

RIEHMANN, K. et al. Nanomedicine - Challenge and perspectives. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, v.48, p.872, 2009.

ROY, P. et al. Photoluminescent carbon nanodots: synthesis, physicochemical properties and analytical applications. *Mater. Today*, v.18, p.447-458, 2015.

RUTMAN, R.J.; CANTAROW, A. PASCHKIS, K.E. Studies in 2-Acetylaminofluorene Carcinogenesis III. The Utilization of Uracil-2-C¹⁴ by Preneoplastic Rat Liver and Rat Hepatoma. *Cancer Res.*, v.14, p. 119-123, 1954.

QU, S. et al. Toward Efficient Orange Emissive Carbon Nanodots through Conjugated sp²-Domain Controlling and Surface Charges Engineering. *Adv. Mater.*, v.28, p. 3516-3521, 2016.

SACHDEV, A. et al. Carbon dots incorporated polymeric hydrogels as multifunctional platform for imaging and incubation of apoptosis in lung cancer cells. *Colloids Surf. B.*, v.141, p.242-252, 2016.

SEN, K.; BANERJEE, S.; MANDAL, M. Dual drug loaded liposome bearing apigenin and 5-Fluorouracil for synergistic therapeutic efficacy in colorectal cancer. *Colloids Surf. B.*, v.180, p.9-22, 2019.

SUN, Y. et al. Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 128, p.7756-7757, 2006.

TAN, D. et al. Selective loading of 5- fluorouracil in the interlayer space of methoxy-modified kaolinite for controlled release. *Appl. Clay Sci.*, v.159, p.102-106, 2017.

TAO, S. et al. The polymeric characteristics and photoluminescence mechanism in polymer carbon dots: A review. *Mater. Today Chem.*, v.6, p.13-25, 2017.

UDOFOT, O. et al. Cytotoxicity of 5-Fluorouracil-loaded pH-sensitive liposomal nanoparticles in colorectal cancer cell lines. *Integr. Cancer Sci. Therap.*, v. 2, p. 245-252, 2015.

VAUTARD, F. et al. Influence of the carbon fiber surface microstructure on the surface chemistry generated by a thermo-chemical surface treatment. *Appl. Surf. Sci.*, v. 261, p. 473-480, 2012.

VÁZQUEZ-NAKAGAWA, M. et al. Chirality transfer from graphene quantum dots. *Chem. Commun.*, v.52, p.665-668, 2016.

WANG, H. et al. Synthesis of an acid-labile polymeric prodrug DOX-*acetal*-PEG-*acetal*-DOX with high drug loading content for pH-triggered intracellular drug release. *Polym.Chem.*, v.6, p.4809-4818, 2015.

WANG, J. et al. Synthesis, characterization and cells and tissues imaging of carbon quantum dots. *Opt. Mat.*, v. 72, p.15-19, 2017.

WANG, Q. et al. Hollow luminescent carbon dots for drug delivery. *Carbon*, v.59, p.192-199, 2013.

WANG, X. H. et al. Microwave assisted one-step green synthesis of cell-permeable multicolor photoluminescent carbon dots without surface passivation reagents. *J. Mater. Chem.*, v.21, p.2445-2450, 2011.

WEI, W. et al. Non-Enzymatic-Browning- Reaction: A Versatile Route for Production of Nitrogen-Doped Carbon Dots with Tunable Multicolor Luminescent Display. *Scientific Reports*, v. 4, 2014.

WEN, X. et al. Green synthesis of carbon nanodots from cotton for multicolor imaging, patterning, and sensing. *Sensors Actuators, B Chem.*, v. 221, p.769-776, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *WHO Model List of Essential Medicines*, 21st List (2019). Disponível em: <https://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>, acessado em 19 de agosto de 2019.

XU, X. et al. Electrophoretic Analysis and Purification of Fluorescent Single-Walled Carbon Nanotube Fragments. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 126, p.12736-12737, 2004.

XU, Y. et al. Nitrogen-doped carbon dots: A facile and general preparation method, photoluminescence investigation, and imaging applications. *Chem. Eur. J.*, v.19, p.2276-2283, 2013.

YANG, L. et al. Doxorubicin conjugated functionalizable carbon dots for nucleus targeted delivery and enhanced therapeutic efficacy. *Nanoscale*, v. 8, p.6801-6809, 2016.

YANG, W. et al. Carbon dots with red-shifted photoluminescence by fluorine doping for optical bio-imaging. *Carbon*, v.128, p.78-85, 2018.

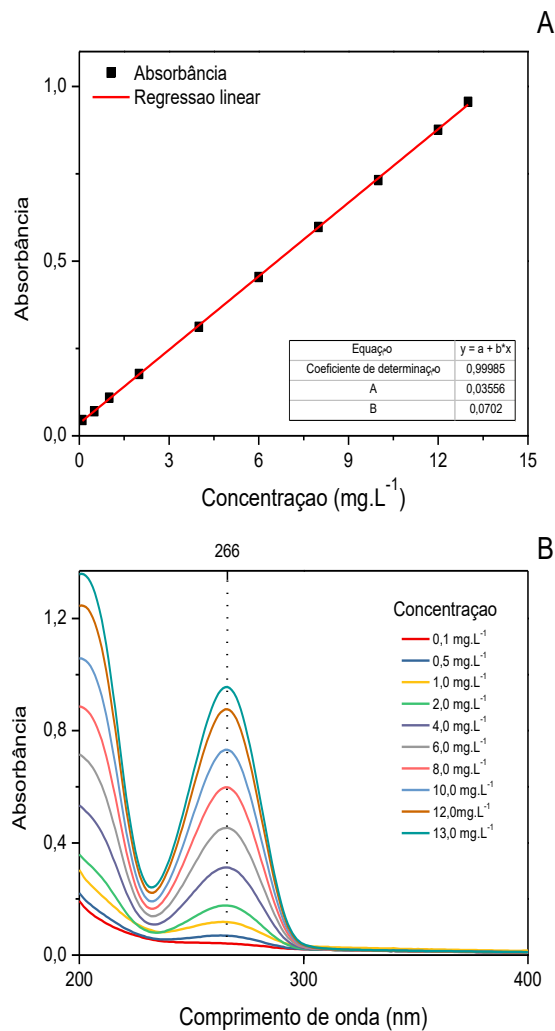
YUAN, Y. et al. Doxorubicin-loaded environmentally friendly carbon dots as a novel drug delivery system for nucleus targeted cancer therapy. *Colloids Surf. B.*, v.159, p.349-359, 2017.

ZHANG, M. et al. Engineering iodine-doped carbon dots as dual-modal probes for fluorescence and X-ray CT imaging. *Int. J. Nanomedicine*, v. 10, p. 6943-6953, 2015.

ZHU, S. et al. The photoluminescence mechanism in carbon dots (graphene quantum dots, carbon nanodots, and polymer dots): Current state and future perspective. *Nano Res.*, v.8, p.355-381, 2015.

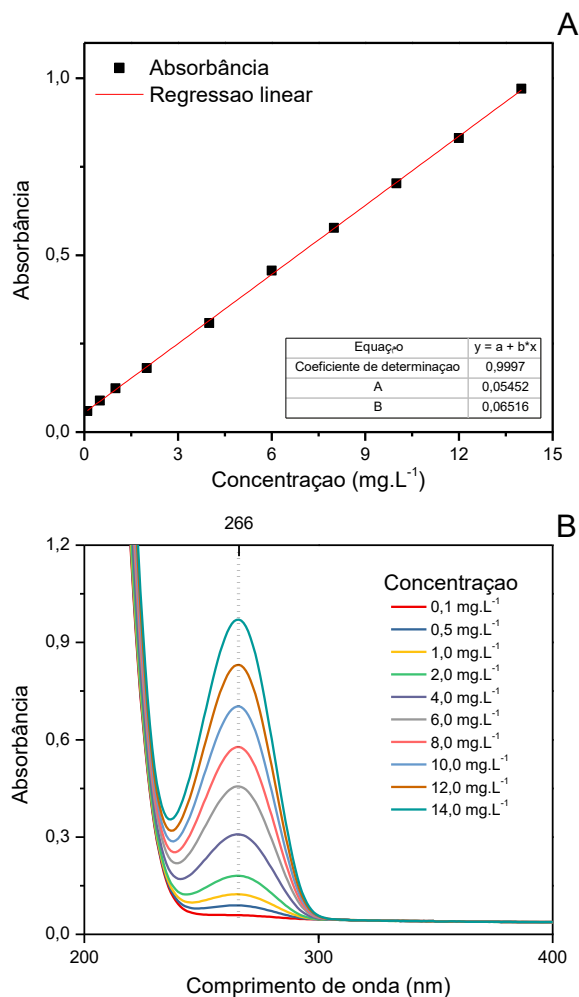
APÊNDICE A – Curva de calibração e espectros de absorção do 5-Fluorouracil em água

Figura A1 – (A) Curva de calibração do 5-Fluorouracil em água na faixa de concentração de 0,1 a 13 mg.L⁻¹ e (B) espectros de absorção do fármaco nas respectivas concentrações da curva



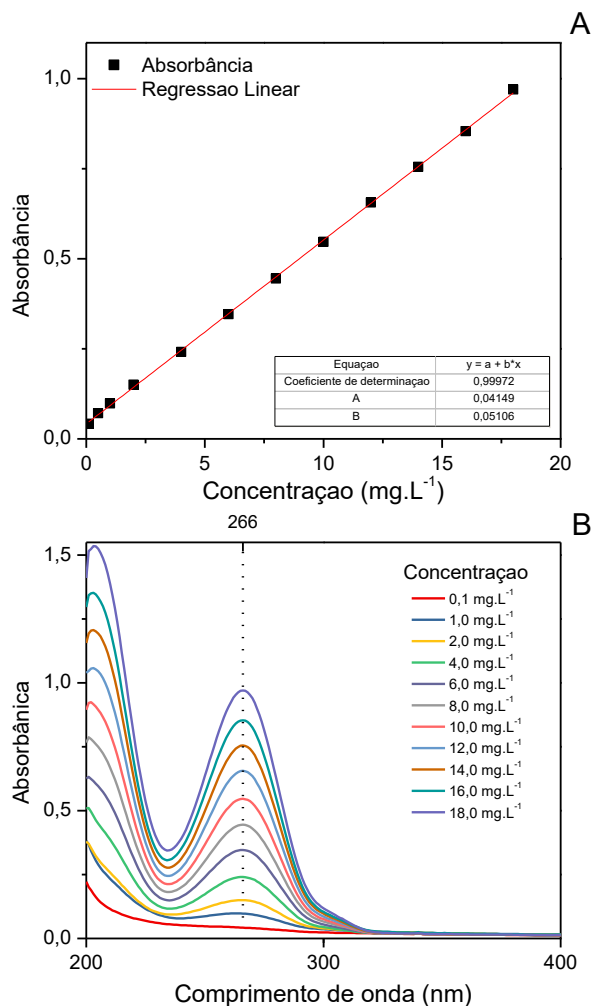
**APÊNDICE B – Curva de calibração e espectros de absorção do 5-Fluorouracil em
tampão acetato 0,1 M (pH 5,0)**

Figura B1 – (A) Curva de calibração do 5-Fluorouracil em tampão acetato na faixa de concentração de 0,1 a 14 mg.L⁻¹ e (B) espectros de absorção do fármaco nas respectivas concentrações da curva



**APÊNDICE C – Curva de calibração e espectros de absorção do 5-Fluorouracil em
tampão fosfato salino 0,1 M (pH 7,4)**

Figura C1 – (A) Curva de calibração do 5-Fluorouracil em tampão fosfato na faixa de concentração de 0,1 a 16 mg.L⁻¹ e (B) espectros de absorção do fármaco nas respectivas concentrações da curva



APÊNDICE D – Representação do teste colorimétrico de viabilidade MTT utilizando o 5-Fluorouracil frente linhagem MCF-7

Figura D1 - Representação do ensaio de viabilidade MTT após a dissolução dos cristais de formazan pela adição de DMSO. Utilizou-se como tratamento o 5-Fluorouracil puro frente a linhagem MCF-7 em concentrações que variaram de 16 a 0,25 mg.L⁻¹ (coluna 2 a 8). A coluna 9 se refere ao controle positivo, enquanto que as colunas 11 e 12 são respectivas ao controle negativo

