



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Osnir de Sá Viana

Tese de Doutorado

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS À BASE DE
QUANTUM DOTS LIVRES E ASSOCIADOS À PORFIRINAS PARA APLICAÇÃO
EM TERAPIA FOTODINÂMICA**

RECIFE, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

OSNIR DE SÁ VIANA*

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS À BASE DE
QUANTUM DOTS LIVRES E ASSOCIADOS À PORFIRINAS PARA APLICAÇÃO
EM TERAPIA FOTODINÂMICA**

**Tese de doutorado submetida ao Programa de
Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas
(PPGCF) do Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
como parte dos requisitos necessários para
obtenção do título de Doutor em Ciências
Farmacêuticas**

**Área de concentração: Controle e produção de
medicamentos**

Orientadora: Dra Beate Saegesser Santos-UFPE
Coorientadores: Dra Adriana Fontes-UFPE
Dr. Júlio S. Rebouças-UFPB

*Bolsista FACEPE

RECIFE, 2015

Catálogo na Publicação (CIP)
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

V614d Viana, Osnir de Sá.
Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados à base de quantum dots livres e associados à porfirinas para aplicação em terapia fotodinâmica / Osnir de Sá Viana. – 2015.
124 f. il.; tab.; quadr.; 30 cm.

Orientadora: Beate Saegesser Santos.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2015.
Inclui referências e apêndices.

1. Pontos quânticos. 2. Porphirinas. 3. Terapia fotodinâmica. I. Santos, Beate Saegesser (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2016-071)

OSNIR DE SÁ VIANA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS À
BASE DE *QUANTUM DOTS* LIVRES E ASSOCIADOS À PORFIRINAS
PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA**

Tese de doutorado submetida ao Programa de
Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas
(PPGCF) do Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
como parte dos requisitos necessários para
obtenção do título de Doutor em Ciências
Farmacêuticas

Aprovada em 16/03/2015

Banca examinadora:

Prof.^a Dra. Beate Saegesser Satnos (Presidente e orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Giovannia Araújo de Lima Pereira (Examinadora externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Rosa Amália Firemann Dutra (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Maria Goreti Carvalho Pereira (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^o Dr.^o Fernando Rallwas (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Reitor

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Vice-Reitor

Silvio Romero de Barros Marques

Pró-Reitor para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação

Francisco de Sousa Ramos

Diretor do Centro de Ciências da Saúde

Nicodemos Teles de Pontes Filho

Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Antonio Rodolfo de Faria

Vice-Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Dalci José Brondani

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Almir Gonçalves Wanderley

Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Ana Cristina Lima Leite

Dedico todo este trabalho a Deus por tudo que tem feito em minha vida, do jeito que ela é (perfeita assim). Á minha família, em especial à minha amada esposa e aos meus filhos adorados, à minha mãe querida, pai, irmãos e amigos de longa jornada. Á minha orientadora pelo exemplo de pessoa e de vida, aos meus coorientadores pelo apoio e carinho e aos professores colaboradores deste trabalho. A todos os amigos do laboratório de Biofísica-química-UFPE, do Centro de Lasers e aplicações do IPEN-USP e do Departamento de Química-UFPB

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF-UFPE)

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE)

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de fotônica – INCT-fotônica – Info

Ao Centro de Lasers Aplicados do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) – São Paulo.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

“Todas as ações e todas as imaginações humanas tem em vista satisfazer as necessidades dos homens e trazer lenitivo a suas dores. Recusar esta evidência é não compreender a essência da vida e seu progresso. Porque experimentar e desejar constituem os impulsos primários do ser...”

(Albert Einstein)

“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora de um processo contínuo de procura”

(Paulo Freire)

RESUMO

Nas três últimas décadas nanocristais de materiais semicondutores em regime de confinamento quântico - pontos quânticos (do inglês *quantum dots*) - vem atraindo o interesse em diversas áreas científicas. Suas propriedades ópticas e elétricas únicas possibilitam ampla aplicação em novas tecnologias tais como dispositivos eletrônicos e em novos protocolos diagnósticos biomédicos. Na área da saúde os pontos quânticos (PQs) vêm ganhando destaque em diagnóstico por imagem nas duas últimas décadas, mas recentemente vem sendo testados também em ensaios de terapia fotodinâmica (TFD) livres ou associados a outros compostos. Neste trabalho utilizamos PQs de CdTe como fotosensibilizadores (FS) em culturas de células de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Leishmania amazonensis*, comparando o efeito fotodinâmico dos sistemas livres e conjugados à zincoporfirina catiônica [Zn(II)tetraetil-2-piridilporfirina, aqui designada ZnP]. Os PQs de CdTe foram sintetizados através de precipitação em sistema coloidal aquoso na presença de dois diferentes agentes estabilizantes (ácido mercaptosuccínico-MSA, ou cisteamina-CYS) sendo caracterizados por difração de raios-X e microscopia eletrônica de transmissão. Todos os sistemas foram caracterizados opticamente por espectroscopia de absorção, emissão e excitação eletrônica. A análise espectroscópica mostra que ocorre supressão da fluorescência dos PQs após adição de quantidades crescentes de ZnP, mas não confirma transferência de energia efetiva dos PQs para a ZnP. O potencial zeta dos bioconjugados foi determinado em função da razão PQ:ZnP. A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por PQs, porfirinas e PQ-ZnP foi avaliada através de técnicas de detecção indireta, que indicou que todos os sistemas estudados produzem EROs. A citotoxicidade dos sistemas foi testada via ensaio fotodinâmico em fibroblastos e tanto os PQs quanto a ZnP não apresentaram toxicidade no escuro, mas apresentaram boa atividade fotodinâmica após irradiação, o que foi potencializado quando utilizou-se o conjugado PQ-ZnP. Os ensaios de TFD utilizando-se LED (150 mW.cm^{-2}) (excitando somente PQs) mostraram que os PQs produziram uma inibição da *C. albicans* $\sim 1 \log_{10}$, ZnP reduziu $\sim 3 \log_{10}$ enquanto que o conjugado reduziu apenas $\sim 1 \log_{10}$. Sugere-se que a menor eficiência de TFD apresentada para os PQs e para os conjugados deve-se à dificuldade de incorporação dos sistemas nas células de *C. albicans* devido à baixa taxa de endocitose destas células e que os PQs não foram eficientes FS para a ZnP. Os ensaios de TFD para *S. aureus* evidenciaram $\sim 8 \log_{10}$ de inibição bacteriana (30s de irradiação) utilizando-se a ZnP, enquanto que observou-se $\sim 2 \log_{10}$ para os PQs (9 min de irradiação). Na TFD de *L. amazonensis*, a redução de viabilidade celular deste parasito foi de $\sim 35\%$ para os PQs e de $\sim 70\%$ utilizando-se ZnP. Os resultados evidenciam que existe um potencial para uso dos PQs em TFD, entretanto a eficiência de geração de ROS precisa ser otimizada. Por outro lado, a ZnP apresentou-se bastante promissora para uso em TFD antimicrobiana.

Palavras-chave: Pontos quânticos. Porfirinas. Terapia fotodinâmica

ABSTRACT

In the last decade semiconductor nanocrystals in the quantum confinement region (also known as quantum dots) have attracted great interest in different research areas. Their unique optical and electrical properties promoted a vast use in most diverse technological fields, ranging from electronics to biomedical applications. In health sciences quantum dots (QDs) applied as fluorescent labels showed a great potential in the development of image diagnostics, but more recently they are also being tested as photosensitizers (PS) in Photodynamic Therapy (PDT) free or conjugated to diverse molecules. In the present study we used CdTe QDs as PS for PDT upon cultures of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Leishmania amazonensis*, comparing the photodynamic effect in the free systems and the QDs conjugated to a cationic zincporphyrin [Zn(II)tetraetil-2-piridilporfirina, ZnP]. CdTe QDs were obtained by controlled precipitation in aqueous media in the presence of two different stabilizers (mercaptosuccinic acid – MSA; cysteamine – CYS) and characterized by X-ray diffractometry and transmission electronic microscopy. The optical characterization of all the systems was performed by absorption, excitation and emission spectroscopy. The zeta potential of the bioconjugates was determined as a function of the QD:ZnP ratio. The spectroscopic analysis suggest that the expected energy transfer from the QDs to the ZnP is not effective, although a fluorescence quenching of the QDs is observed with increasing amounts of ZnP. The production of reactive oxygen species (ROS) induced by QDs, porphyrines and the conjugates was evaluated by indirect detection protocols. All the systems produced ROS but at different levels. The cytotoxicity of the systems was tested under PDT irradiation in a fibroblast culture and none of the systems presented dark toxicity, but presented good photodynamic activity after irradiation which was increased in the QDs-ZnP conjugates. The TFD assays on *C. albicans* using LED (150 mW.cm^{-2}) (exciting QDs only) showed that the QDs induced a cell inhibition of $1 \log_{10}$ while $\sim 3 \log_{10}$ for ZnP porphyrin and $< 1 \log_{10}$ for the conjugate. We suggest that the less effective PDT action of the QDs and their conjugates on the *C. albicans* reflect the lower capacity of the cellular uptake of these systems by the cells and that QDs did not act as efficient PS for the ZnP molecules. The essays performed on *S. aureus* cells showed $\sim 8 \log_{10}$ of bacterial inhibition using ZnP (30s irradiation) while $\sim 2 \log_{10}$ for the QDs (9 min irradiation). *L. amazonensis* essays showed a cell inhibition of 35% for the QDs while 70% for ZnP. Under the conditions tested, the QD-ZnP conjugates did not present a good photodynamic inactivation on the tested cells. The overall results evidence that there is a potential application of the QDs as PS in PDT but the experimental conditions of the therapy and of the systems must increase their efficiency in ROS production. On the other hand, the ZnP alone demonstrated to be very efficient in microbicide PDT.

Key-words: Quantum dots. Porphyrins. Photochemotherapy

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

QD	<i>Quantum dot</i>
Å	Angstrom
AMP	Ácido mercaptopropiônico
BC	Banda de condução
BV	Banda de valência
Cd(ClO ₄) ₂	Perclorato de cádmio
CdSe	Seleneto de cádmio
CdTe	Telureto de cádmio
CYS	Cisteamina
DCFH-DA	2,7- Diclorodihidrofluresceína-diacetato
DRX	Difração de raio-X
Eg	<i>Band gap</i>
EPR	<i>Electron paramagnetic Resonance</i> (Ressonância paramagnética de elétrons)
eV	Elétron volts
FRET	Transferência de energia por ressonância de Förster
FWHM	<i>Full width at half maximum</i> (Largura da banda a meia altura)
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MSA	Ácido mercaptosuccínico do inglês <i>mercaptosuccinic acid</i>
NaBH ₄	Boridreto de sódio
NCs	Nanocristais
NIR	<i>Near infrared</i> (Infravermelho próximo)
PDT	<i>Photodynamic therapy</i> (Terapia fotodinâmica)
pKa	Potencial da constante de dissociação (pH no qual a substância encontra-se 50% dissociada)
Porf	Porfirina
Porf BL	Porfirina de Base livre
PQ	Ponto quântico
PS ou FS	Droga fotossensibilizadora (fotossensitizadora)
PQ λ _{emi570}	Ponto quântico com emissão em 570 nm
PQ λ _{emi630}	Ponto quântico com emissão em 630 nm
ROS/EROs	Reactive oxygen species/Espécies reativas de oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
TFD	Terapia Fotodinâmica
ua	Unidades arbitrárias
ZnSe	Seleneto de zinco
ZnP	Zn(II)tetraetil-2-piridilporfirina ou zincoporfirina
λ	Comprimento de onda
λ _{emi}	Comprimento de onda de emissão
λ _{exc}	Comprimento de onda de excitação
UFC	Unidades formadoras de colônias

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Relação do tamanho de partículas semicondutoras dentro do regime de confinamento quântico ($E_g = \text{band gap}$; BC = banda de condução e BV = banda de valência).....	21
Figura 2 - Esquema de formação de um éxciton. h^+ representa o buraco gerado na banda de valência, pela excitação do elétron e^-	21
Figura 3 – Pontos quânticos de CdTe com diferentes tempos de síntese (3, 5, 8, 12, 15, 18h) antes (a) e após (b) excitação à 365nm. Diferentes emissões em função das dimensões das nanopartículas em cada amostra.....	23
Figura 4 - Representação esquemática de ponto quântico de semicondutor, adaptado para biomarcação. .	24
Figura 5 - Exemplo de algumas estratégias de bioconjugação de diferentes PQ's funcionalizados à biomoléculas. a. Adsorção por interação eletrostática; b. Formação de ligação amida entre PQ e proteínas ou peptídeos; c. Conjugação PQ e DNA tiolado.....	30
Figura 6 - (a) Estrutura do anel porfirínico base livre. Carbonos nas posições 5,10,15 e 20 são denominados “carbonos em posições meso” . Os átomos das posições 2, 3, 7, 8,12, 13, 17 e 18 são conhecidos como “carbonos nas posições β -pirrólicas”. (b) Porfirina de primeira geração, (c) segunda geração e (d) Terceira geração.....	31
Figura 7. Espectro de absorção característico de porfirina de base livre em diclorometano, apresentando bandas B (406) e bandas Q (acima de 475 nm).....	33
Figura 8 - Estrutura molecular da metaloporfirina estudada (ZnTE-2-PyPCL_5 ou ZnTE-2-PyP^{5+}) com massa molecular 741,76 e centro de raio 7,2 pm).....	34
Figura 9 - Ilustração esquemática da terapia fotodinâmica com o processo de excitação do FS e formação de EROs.....	36
Figura 10 - (a). Lesão característica da Leishmaniose tegumentar. (b) microscopia de formas infectantes de <i>Leishmania amazonenses</i>	44
Figura 11- Aplicações dos PQs em biomedicina. Aplicações podem ser direcionadas para diagnóstico através da marcação celular com base na fluorescência específica ou não específica e recentemente para estudos de terapia fotodinâmica.....	46
Figura 12-. Caracterização estrutural dos PQs de CdTe. (a) Difratoograma representativo de Raios-X de nanocristais de CdTe. (b) Microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas de CdTe, apresentando dimensões médias entre 2-5 nm (Escala de 5 nm), marcadas na figura.....	54
Figura 13- Caracterização óptica de PQ de CdTe e ZnP. (a) Espectros de absorção e emissão de ZnP; (b) Espectros de absorção de CdTe-CYS e CdTe-MSA; (c) Espectros de emissão de CdTe-CYS e CdTe-MAS.....	55
Figura 14- Redução da densidade óptica do RNO em função da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) por (a) Zincoporfirina, diferentes pontos quânticos de CdTe e b) Decaimento da densidade óptica de diferentes razões molares do conjugado ZnP-PQ (CdTe-MSA) após 10 minutos de irradiação com LED de 420 nm ($\pm$). A análise estatística mostrou que existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,01$). Os dados representam média dos grupos e seus respectivos desvios padrão ($n = 3$).....	57
Figura 15- Detecção indireta de geração de ROS monitorado pelo aumento da densidade óptica (OD) a 580 nm. (a) Geração de ROS após irradiação de ZnP e CdTe-MSA; (b) geração de ROS após irradiação por 10 minutos das mistura contendo diferentes proporções de ZnP e PQ CdTe-MSA. Análise de variância (ANOVA) mostrou que as diferenças entre as várias frações molares do conjugado PQ-ZnP foram significativas ($p < 0,01$).....	58

Figura 16- Viabilidade celular de suspensão de cultura de formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> : a) grupos não irradiados; b) grupos contendo fotossensibilizadores e submetidos à irradiação de LED 460 nm(± 20) e 160 mV por 5 minutos. A análise de variância mostrou que as diferenças entre os grupos com fotossensibilizadores irradiados foram significantes em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). Os dados são expressos como média e desvio padrão ($n=3$).....	60
Figura 17- Microscopia da cultura de <i>Leishmania amazonensis</i> : a) antes do ensaio fotodinâmico utilizando ZnP 10 μ M como fotossensibilizador; b) após ensaio fotodinâmico utilizando zincoporfirina 10 μ M como fotossensibilizador.....	60
Figura 18.- Avaliação da inativação fotodinâmica de cultura de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 por CdTe-CYS em diversos tempos de irradiação. A viabilidade celular é expressa pela redução do Log ₁₀ após adição do QD e irradiação com LED 460 nm (± 20), 150 mW.cm ⁻²	64
Figura 19- Avaliação comparativa da inativação fotodinâmica de cultura de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 por zincoporfirina na concentração de 10 μ M. A viabilidade celular é expressa pela redução do Log ₁₀ , comparando os grupos tratados e não tratados na ausência e na presença de radiação com LED 460 nm (± 20), 150 mW.cm ⁻² por 3, 6 e 9 minutos.	65
Figura 20. Avaliação comparativa da inativação fotodinâmica de cultura de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 por zincoporfirina na concentração de 5 μ M. A viabilidade celular é expressa pela redução do Log ₁₀ , comparando os grupos tratados e não tratados na ausência e presença de radiação com LED 460 nm (± 20), 150 mW.cm ⁻²	66
Figura 21. Avaliação comparativa da inativação fotodinâmica de cultura de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 por ZnP e QDs após 9 minutos de irradiação com LED 460 nm (± 20), 150 mW.cm ⁻² . A viabilidade celular é expressa pela redução do Log ₁₀ após adição do fotossensibilizador (CdTe-MAS ou CdTe-CYS 100 nM; ZnP 10 μ M.). Os resultados são comparados com o grupo controle não irradiado e sem adição de FS.	67

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1- Diferentes tipos celulares, microorganismos, parasitas, moléculas e componentes celulares alvos de marcação por PQs.....	26
Quadro 2- Aplicações não oncológicas da terapia fotodinâmica	37
Quadro 3- Aplicação dos pontos quânticos na terapia fotodinâmica.....	42
Quadro 4- Composição dos grupos utilizados no ensaio de inibição fotodinâmica de formas promastigotas de <i>Leishmania amazonenses</i> usando como fotosensibilizadores ZnP e PQ de CdTe-CYS.	52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	19
3. REVISÃO DA LITERATURA: <i>QUANTUM DOTS</i> , PORFIRINAS E TERAPIA FOTODINÂMICA.....	20
3.1. Pontos quânticos (PQs).	20
3.1.1. Características físico-químicas.....	20
3.1.2. Composição, passivação e fotoativação de PQs.....	23
3.1.3. Pontos quânticos como marcadores fluorescentes.....	24
3.1.4. Absorção e distribuição de PQs em sistema biológico.....	27
3.1.5. Modificação de superfície e bioconjugação de PQs.....	28
3.2. Porfirinas.....	31
3.3. Produção de radicais livres e terapia fotodinâmica.....	35
3.3.1. Terapia fotodinâmica (PDT).....	35
3.3.2. Fotossensibilizadores.....	37
3.3.3. Princípios da utilização de PQs na terapia fotodinâmica.....	38
3.3.4. Inativação fotodinâmica de protozoários e microorganismos patogênicos.....	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
4.1. Síntese dos pontos quânticos e zincoporfirina (ZnP).....	48
4.2. Caracterização óptica e estrutural e Pontos quânticos e zincoporfirina e do conjugado PQ-ZnP.....	49
4.3. Produção de radicais livres por PQs, ZnP e seus conjugados.....	49
4.3.1. Detecção indireta de espécies reativas de oxigênio (ROS) por método RNO.....	49
4.3.2. Detecção indireta de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelo método do Notrotetrazólio azul (NBT).....	50
4.4. Ensaio de atividade fotodinâmica de PQs, ZnP e seus conjugados sobre microorganismos patogênicos.....	50
4.4.1. Avaliação qualitativa e quantitativa da ação fotodinâmica de PQ e ZnP em diferentes concentrações sobre formas promastigotas de <i>Leishmania amazonenses</i>	50
4.4.2. Inativação fotodinâmica de <i>Staphylococcus aureus</i> utilizando ponto quânticos de CdTe e porfirinas como fotossensibilizadores.....	52

5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
5.1.	Caracterização óptica e estrutural de PQs de CdTe e da Zincoporfirina.....	54
5.2.	Produção de radicais livres por PQs, ZnP e seus conjugados.....	56
5.2.1.	Detecção indireta de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelo método de RNO	56
5.2.2.	Detecção indireta de ROS por método de oxidação do NBT.....	57
5.3.	Ensaio de atividade fotodinâmica de PQs, ZnP e seus conjugados sobre microorganismos patogênicos.....	58
5.3.1.	Ensaio de terapia fotodinâmica e interação de nanopartículas luminescentes (ponto quânticos) e zinoporfirina sobre <i>Leishmania amazonenses</i>	58
5.3.2.	Inativação fotodinâmica de <i>Candida albicans</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> por PQ, ZnP e seus conjugados.....	63
6.	CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS.....	68
	REFERÊNCIAS.....	70
	APÊNDICES:.....	85
1.	Artigo publicado no periódico <i>Molecules®</i> : Comparative study on the photodynamic inactivation of <i>Candida albicans</i> using CdTe quantum dots, Zn(II) porphyrin and their conjugates as photosensitizers.....	85
2.	Capítulo de livro que será publicado pela Springer®- Redox-active therapeutics – Quantum dots in photodynamic therapy.....	109

1 INTRODUÇÃO

Os pontos quânticos (PQs) ou *quantum dots* (QDs) são nanocristais de semicondutores que se encontram em regime de confinamento quântico, constituídos de materiais usualmente de composição binária entre elementos de transição com calcogênios e átomos da família do Nitrogênio. Dentre estes, destacam-se os PQs contendo elementos da família IIB e VIA como, por exemplo, CdTe, ZnSe, CdSe e CdS. Por possuírem propriedades elétricas e ópticas peculiares, são bastante utilizados em diversas áreas. Os pontos quânticos começaram a fazer sucesso no meio científico no final da década de oitenta e hoje estão entre os mais promissores nanomateriais fluorescentes emergentes para a imagem e marcação celular. As propriedades fluorescentes características dos PQs são comparáveis aos fluoróforos comerciais baseados em compostos orgânicos (fotoluminescência excepcionalmente estável, com um rendimento quântico elevado) e tem possibilitado seu uso em marcação e tecidual celular específica (FONTES et al, 2012; SILVA et al 2010; WU et al, 2003).

Diversas abordagens envolvendo a obtenção, dispersão em meio aquoso de pontos quânticos e suas aplicações para obtenção de imagens de alta resolução de células, microorganismos, tecidos neoplásicos e outros componentes biológicos tem sido realizadas (ANDRADE et al, 2013; CHOI E MAYSINGER, 2008; HILD et al, 2008; DERFUS et al, 2004). As diversas vantagens dos PQs em especial as propriedades ópticas e a alta resistência à fotodegradação, bem como sua intrínica capacidade de separação de carga tem também incentivado pesquisadores a testá-los como fotosensibilizadores para terapia fotodinâmica (TFD).

A terapia fotodinâmica envolve o uso de corantes ou substâncias fotoestimuláveis chamadas fotosensibilizadores (FS) que combinados com radiação no visível (em comprimento de onda correspondente ao espectro de absorção do FS) podem induzir morte celular por mecanismos de óxido-redução e formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). (DAI et al, 2012, SIMPLICIO 2002, MACHADO et al, 2000) A terapia fotodinâmica tem muitas vantagens sobre as que utilizam radiações ionizantes, quimioterapia e terapia de radiação, por ser uma técnica menos agressiva e mais direcionada ao tecido neoplásico. Entretanto o avanço desta técnica é limitada devido à baixa disponibilidade de fluoróforos fotoestáveis. Entretanto, a geração de PQs biocompatíveis, direcionou novas perspectivas para obtenção de imagem por fluorescência e para os estudos de terapia fotodinâmica (LI et al, 2012; RAKOVICH et al, 2010; BIJU et al, 2010; GAO et al, 2010; TSAY et al, 2007;

CLARKE et al, 2006). Diversos trabalhos relatam a utilização de pontos quânticos conjugados à biomoléculas para melhoria/otimização da marcação celular e para potencialização dos mecanismos envolvidos na utilização destes em terapia fotodinâmica (RISTIC et al, 2014; PASKO et al, 2011; NARBAND et al, 2008; ANAS et al, 2008; BAGALKOT et al, 2007).

Entre as moléculas que podem ser conjugadas ou associadas aos PQs foram testadas as porfirinas e metaloporfirinas sintéticas (FRASCO et al, 2010; JHONSI E RENGANATHAN, 2010). Estas moléculas representam uma importante classe de compostos orgânicos macrocíclicos (FRIEDERMAN, 2005; HAMBRIGHT, 2000). A presença de um íon metálico no centro porfirínico origina as chamadas metaloporfirinas (BEGA, 2008). As porfirinas possuem amplas aplicações biológicas, incluindo algumas com potenciais antioxidantes como as metaloporfirinas de manganês (BARTINIC et al, 2008; FRIEDERMANN, 2005) e outras com potencial para uso em terapia fotodinâmica como as porfirinas de base livre e as metaloporfirinas de zinco (SIMPLICIO et al, 2002). Além disso, as porfirinas sintéticas possuem elevada fotoestabilidade e baixa toxicidade em relação a outros fluoróforos (BEGA, 2008) e em associação a pontos quânticos resulta uma alternativa interessante para aplicação fotodinâmica em sistemas biológicos, sendo o objetivo principal do estudo apresentado nesta Tese.

A Tese está elaborada de forma a apresentar os objetivos específicos deste estudo e uma fundamentação teórica contemplando os assuntos abordados. Logo em seguida são apresentados os materiais e métodos, resultados e discussão, conclusão e perspectivas, e os apêndices, que apresenta um artigo aceito para publicação na revista internacional *Molecules*®.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Sintetizar nanocristais semicondutores (PQs) e associá-los à metaloporfirinas sintéticas, visando terapia fotodinâmica para aplicação em diferentes sistemas biológicos associados à patologias.

2.2. Objetivos Específicos

- Síntese de pontos quânticos de CdTe com diferentes estabilizantes de superfície (tiocompostos);
- Caracterização óptica e estrutural dos pontos quânticos sintetizados;
- Síntese e caracterização de Zinco porfirina (ZnP);
- Caracterizar a associação pontos quântico - Zinco porfirina (PQ-ZnP) através espectroscopia de absorção eletrônica, excitação e emissão e potencial zeta.
- Avaliar produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), por PQs, ZnP e PQ-ZnP,;
- Realizar ensaios de terapia fotodinâmica e toxicidade associada em cultura de fibroblastos por PQ, ZnP e pela associação PQ-ZnP;
- Realizar estudos de Terapia fotodinâmica antimicrobiana através da inativação de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* por PQs e ZnP como fotosensibilizadores;
- Realizar ensaios de inativação fotodinâmica de cultura de *Leishmania amazonensis* por PQs e ZnP como fotosensibilizadores;

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Pontos Quânticos (PQs)

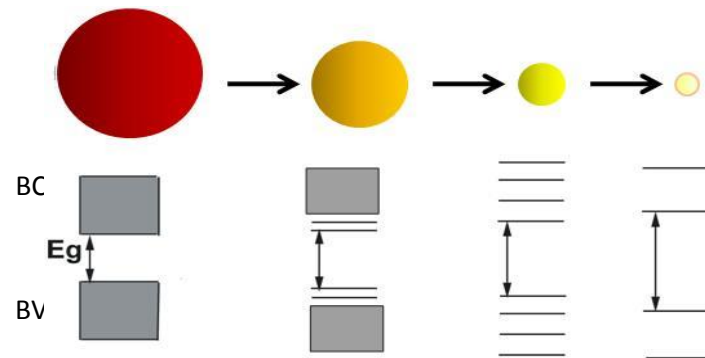
3.1.1. Características físico-químicas

Os pontos quânticos (PQs) ou *quantum dots* (QDs) são nanocristais semicondutores com dimensões dentro do regime de confinamento quântico bastante utilizados em diversas áreas, devido às suas propriedades elétricas e ópticas. Geralmente são o resultado da composição de átomos das família IIB com calcogenetos ou da família III com elementos da família do Nitrogênio. Podem ser compostos binários (CdTe, ZnSe, CdSe, CdS, entre outros), ternários (ZnCdS, HgCdSe, etc) podendo ser dopados com outros elementos, como por exemplo Cu^{2+} e Mn^{2+} . Os pontos quânticos destacados nesse trabalho fazem parte de compostos contendo elementos da família IIB, como o cádmio, e calcogenetos da família VI A, como telureto (FONTES et al 2012; SANTOS et al, 2008; ROGACH, 2008).

As características físico-químicas de um semicondutor variam com a redução do seu tamanho somente quando estes atingem dimensões de alguns nanômetros e encontram-se em regime de confinamento quântico. A partir daí, propriedades como temperatura de transição de fase, condutividade elétrica, absorção eletrônica dentre outras, tornam-se dependentes do tamanho do material. Dessa forma, os grandes fatores responsáveis pela dependência das propriedades com o tamanho dos pontos quânticos são os efeitos termodinâmicos de superfície e efeitos quânticos. A redução do tamanho do ponto quântico resulta numa variação sistemática da densidade de ocupação de níveis de energia eletrônicos (GULLAPALLI e BARRON, 2010).

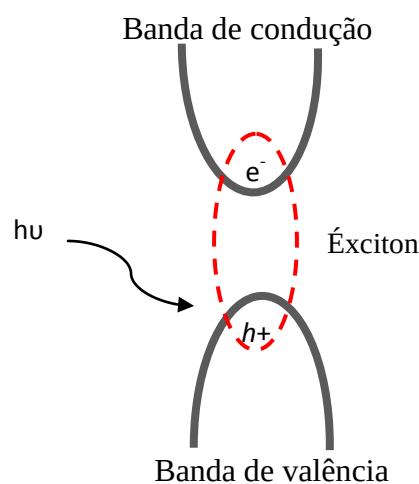
O confinamento quântico descreve a mudança de níveis de energia contínuo para um conjunto de níveis discretos, com a diminuição da dimensão das partículas (BÁNYAI E KOCH, 1993; ALIVISATOS, 1996). Em semicondutores convencionais (macroscópicos ou “*bulk*”), a excitação de elétrons da banda de valência (BV) para a banda de condução (BC), separado pelo *band gap* (energia de banda proibida), resulta em largas bandas no espectro da absorção. O *band gap* (E_g) refere-se ao valor mínimo de energia que se deve fornecer ao elétron situado na BV para que este seja provido para a BC. À medida que as partículas diminuem de tamanho a diferença energética aumenta alterando as propriedades optoeletrônicas do material (Figura 1).

Figura 1. Relação do tamanho de partículas semicondutoras dentro do regime de confinamento quântico ($E_g = \text{band gap}$; BC = banda de condução e BV = banda de valência).



Uma propriedade interessante dos pontos quânticos, e que também ocorre nos metais, é sua interação com a radiação eletromagnética (ROGACH, 2008). Quando um fóton de energia superior ao E_g interage com um elétron na BV do PQ, este elétron migra para a BC, gerando uma vacância, isto é, um buraco virtual na camada de valência. Este buraco (h^+) possui energia igual ao do elétron, mas de sinal oposto. O conjunto elétron-buraco é chamado de éxciton, que possui sua existência vinculada às forças coulômbianas fracas, formando uma espécie “ligada” ou um “estado ligado” (Figura 2).

Figura 2. Esquema de formação de um éxciton. h^+ representa o buraco gerado na banda de valência, pela excitação do elétron e^- .



Ao par elétron-buraco, denomina-se éxciton ligado e este se comporta como uma espécie independente, apresentando um conjunto de níveis de energia distintos do semicondutor que podem ser descritos como uma interação tipo átomo de hidrogênio. Assim

como o átomo de hidrogênio, o éxciton ligado possui um raio associado denominado raio de Bohr do éxciton. O éxciton formado possui uma vida muito curta (nanossegundos) e o processo de decaimento energético para a BV é denominado recombinação excitônica. Duas formas de perda do excesso de energia são possíveis: uma forma radiativa, através da emissão de fótons (com energia menor do que os fótons de excitação), ou por via não radiativa (SCHMID, 2004).

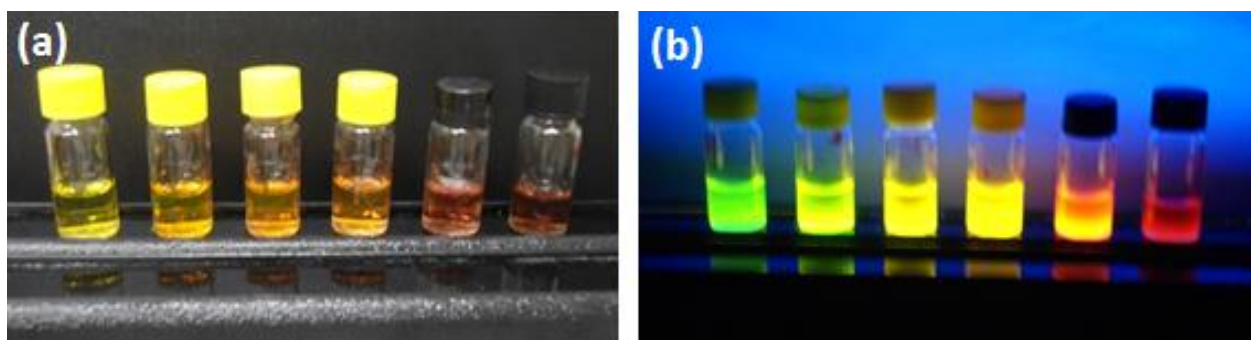
Os pontos quânticos apresentam diâmetros na escala de 1 a 10 nm. Por serem tão pequenos, os elétrons e buracos, sofrem um forte confinamento quântico, modificando as propriedades ópticas desses materiais. Uma nanopartícula de semicondutor encontra-se em regime de confinamento quântico, quando suas dimensões são reduzidas a ponto que a diferença entre os valores de energia entre a banda de valência (BV) e a banda de condução (BC), sejam próximos ou menores do que as dimensões do raio de Bohr do seu éxciton (SANTOS et al, 2008)

O confinamento quântico pode ser interpretado de forma simples utilizando-se o modelo de partícula na caixa. Segundo o modelo, um elétron encontra-se confinado dentro de uma caixa virtual, onde as funções de onda do elétron se restringem ao interior da caixa, não permitindo ao elétron que se desloque para além das limitações de suas paredes. Quanto menor forem as dimensões da caixa, maior a separação energética entre os diferentes níveis (Gapoenko, 1998). Fazendo-se uma analogia ao cristal de um semicondutor e definindo as BVs e BCs por funções de onda apropriadas, quando as dimensões do cristal se reduzem a poucos nanômetros, há um distanciamento energético entre as bandas, que se reflete no aumento do valor energético de seu *band gap* (Eg). Além disso, ocorre uma discretização das BVs e da BC. (WU, GAMBHIR & WEISS, 2005)

A relação direta entre o comprimento de onda de emissão e o tamanho da nanopartícula ocorre devido ao fato de que as diferenças energéticas da BV e da BC (energia do *Band gap*: Eg), variarem de acordo com o tamanho da partícula, para um mesmo material. Assim, quanto menor a partícula de um dado semicondutor, maior a diferença de energia entre os estados da BV e BC, ou seja, maior o *band gap* (Eg). Nesse caso, partículas menores apresentam emissão em regiões próximas ao azul, enquanto que partículas maiores tendem a deslocar e emitir luminescência em regiões mais próximas ao vermelho (SILVA et al, 2010; ROGACH, 2008; BRUCHEZ et al, 1998), o que possibilita obter PQs com propriedades fluorescentes diferentes (Figura 3). Tais propriedades possibilitaram a utilização dos PQs para aplicação como marcadores em sistemas biológicos. Os trabalhos que exploraram as

características dos pontos quânticos para fins de utilização como marcadores biológicos foram publicados pela primeira vez por dois grupos de pesquisadores em 1998 (ALIVISATOS e NIE). Desde então, surgiram vários trabalhos e diversas possibilidades de aplicação biológica, algumas das quais serão posteriormente descritas.

Figura 3. Pontos quânticos de CdTe com diferentes tempos de síntese (3; 5; 8; 12; 15; 18 h) Antes (a) e após (b) excitação à 365 nm. Diferentes emissões em função das dimensões das nanopartículas em cada amostra.



(Fonte: próprio autor)

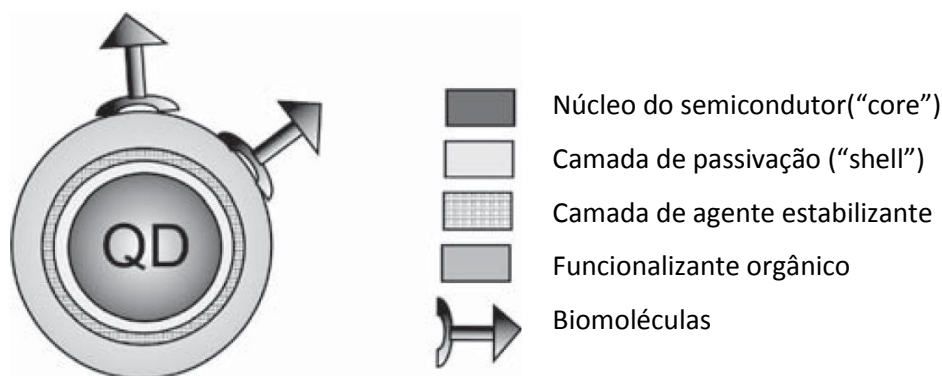
3.1.2. Composição e passivação de superfície de pontos quânticos

Os pontos quânticos de semicondutores são sistemas cristalinos obtidos pelo crescimento controlado ou por ablação de um cristal pré-existente, onde o número de átomos presentes em sua superfície representa uma fração expressiva do total de átomos da partícula. O núcleo do ponto quântico geralmente varia de 1 a 10 nm de diâmetro, e é normalmente composto por átomos das famílias IIB e VIA (por exemplo, CdTe, CdSe). (FONTES et al, 2012)

A redução do volume da partícula resulta num aumento da relação área superficial/volume, aumentando assim a contribuição de defeitos da superfície, resultantes da interrupção da rede cristalina e da maior energia livre dos átomos ali localizados (impurezas, vacâncias, defeitos cristalográficos, etc), os quais podem agir como centros de decaimento não radiativo, resultando no decréscimo do rendimento quântico do PQ (SANTOS, 2002). Este problema pode ser solucionado através da passivação (recobrimento da superfície do PQ com camada de outro semicondutor) e posterior adição de estabilizantes de superfície, conforme esquematizado na Figura 4, que também mostra a presença de uma camada de funcionalizante, destinada a tornar os PQs mais biocompatíveis para aplicação em sistemas

biológicos. Algumas moléculas de superfícies, como imunoglobulinas e outras biomoléculas, podem ainda ser conjugadas na superfície para direcionamento tecidual das nanopartículas.

Figura 4- Representação esquemática de ponto quântico de semiconductor, adaptado para biomarcação



Fonte: adaptado de SANTOS et al, 2008

Na passivação, os núcleos (“core”) dos pontos quânticos podem ser cobertos por uma camada adicional (“shell”) de material geralmente inorgânico para melhorar seu rendimento quântico de emissão, “passivando as ligações químicas não balanceadas” (SANTOS et al, 2008). Com isso, novos estados energéticos podem ser criados, promovendo transições radiativas eficientes. Para passivação com o objetivo de confinar o éxciton no “core”, geralmente, utiliza-se uma camada de semiconductor de *band gap* maior sobre a partícula original, como uma camada (casca) de CdS, que apresenta um *band gap* maior do que o *band gap* do CdTe [$E_{gCdS} = 2,50$ eV e $E_{gCdTe} = 1,47$ eV (VOSSMEYER et al, 1994)], o que aumenta a fotoluminescência do ponto quântico.

3.1.3. Pontos quânticos como marcadores fluorescentes para diagnóstico e exploração intracelular

Os pontos quânticos têm sido bastante estudados em diversas áreas, e na última década vem ganhando destaque na área de saúde para marcação celular. Em relação aos produtos comercialmente disponíveis na nanotecnologia, os nanocristais semicondutores ou pontos quânticos surgem como uma ferramenta muito promissora para imagem celular, e foram relatados primeiramente por dois grupos de cientistas: Alivisatos, 1998; Bruchez e Nie, 1998.

Por apresentarem acentuada fluorescência e dimensões nanométricas, com tamanhos entre 1 e 10 nm, os PQs podem ser aplicados para investigação de absorção celular, distribuição e outros processos a nível intracelular. O controle do tamanho do PQ influencia em sua emissão e possibilita a obtenção marcação de múltiplas organelas celulares (HILD et al, 2008). Quando comparados aos fluoróforos orgânicos tradicionais, os PQs ganham destaque dos pesquisadores da área médica, pois:

- Absorvem em uma ampla faixa de comprimentos de onda, e apresentam espectros de emissão simétricos e estreitos (com largura de banda à meia altura, entre 25 e 40 nm) (SANTOS et al, 2008);
- Quando analisados em conjunto, as fluorescências de PQs de diferentes tamanhos podem ser simultaneamente excitadas por um único comprimento de onda e emitem em cores distintas, permitindo a marcação simultânea de vários componentes celulares (ALIVISATOS, 2005);
- Elevada fotoestabilidade, ou seja, elevada resistência ao fotobranqueamento (1000 vezes maior do que corantes orgânicos convencionais) (SANTOS et al, 2008 CHOI e MAYSINGER, 2008), o que permite que eventos sejam analisados em tempo real por longos períodos;
- Apresentam elevada intensidade de fluorescência, com um alto rendimento quântico (FONTES et al, 2012);

Além das vantagens acima descritas, os pontos quânticos podem ser conjugados com outras moléculas sintéticas ou biomoléculas, sendo utilizados em pesquisas de marcação celular ou tecidual como sondas fluorescentes específicas e não específicas. As marcações inespecíficas envolvem interações eletrostáticas ou hidrofóbicas entre a superfície das partículas e a superfície da membrana celular (LIRA et al., 2012). Entretanto, o processo de interação e a internalização do nanocristal na célula pode ficar comprometida devido ao tipo de carga de superfície. Neste caso a veiculação dos PQs em nanocápsulas ou lipossomas pode ser uma alternativa para disponibilização desses em nível intracelular (LIRA et al, 2013).

O uso de PQs para marcação específica geralmente envolve a conjugação química ou bioconjugação com moléculas específicas, como anticorpos, peptídeos, glicoproteínas entre outros (ANDRADE et al, 2013; JIANG et al, 2010). PQs bioconjugados com concanavalina-A foram recentemente utilizados na marcação de resíduos de glicose/manose em leveduras de *Candida albicans* (KATO et al., 2012). Já ao nível molecular, Dahan e colaboradores (2003) realizaram marcação de receptores de glicina em cultura de medula espinhal de ratos -VIANA, O.S.

utilizando PQs conjugados a anticorpos específicos com afinidade por estes receptores, verificando uma intensidade de luminescência maior quando utilizaram os PQs bioconjugados em relação aos PQs livres ou outro marcador convencional. Em outro exemplo, Bagalkot e colaboradores em 2007 relataram um novo modelo de conjugação utilizando PQ-aptâmero-Doxirrubicina [PQ-Apt-(DOX)] como um sistema para marcação e terapia simultânea de células cancerosas. O Aptâmero de RNA reconhece o antígeno de membrana específico de próstata, e juntamente com doxorrubicina (quimioterápico convencional) formam um sistema multifuncional que pode promover a marcação celular.

Os PQs conjugados podem ser e tem sido utilizados como marcadores celulares e moleculares, podendo auxiliar no acompanhamento, em tempo real, da ação dinâmica de uma determinada molécula biológica (como por exemplo anticorpos e antígenos de superfície celular). O quadro 01 apresenta exemplos de aplicação de PQs para marcação e obtenção de imagens de estruturas e componentes celulares.

Quadro 1 - Diferentes tipos celulares, microorganismos, parasitas, moléculas e componentes celulares alvos de marcação por PQs

ALVO DA MARCAÇÃO COM PQ	EXEMPLOS et al
Organelas e componentes celulares	Núcleo (WU et al, 2003; CLARKE, 2006, BIJU et al, 2010), membrana, lisossomos (CLARKE et al, 2006), mitocôndria* (DERFUS et al, 2004 e CLARKE et al, 2006),
Microorganismos	<i>Candida albicans</i> (KATO et al, 2012)
Hemácias	Marcação inespecífica (LIRA et al, 2012; FARIAS et al 2005)
Receptores de superfície celular	Marcadores para câncer de mama-HER-2* (WU et al, 2003), receptores de glicina* (DAHAN et al, 2003)
Parasitas	<i>Trypanosoma cruzi</i> (CHAVES et al 20008; FEDER et al, 2009)
Células Neoplásicas	Tumor de tecido subcutâneo (Gao et al, 2010); células câncer de mama (WENG et al, 2008 E ZHANG et al 2009); células de câncer pancreático (Yong et al, 2009), câncer de próstata (Bagalkot, 2007), etc.
Outras moléculas	PSA* (antígeno específico prostático)-(GAO et al, 2004), glicoproteínas*(SUKHANOVA et al, 2004; JAISWAL et al, 2003), etc.

*Indica que a marcação foi realizada em células vivas.

-VIANA, O.S.

O desenvolvimento do uso dos PQs em novas tecnologias também expande o potencial para imagem *in vivo*, especificamente de pequenos animais. Importantes avanços neste campo têm sido alcançados com o uso de PQ com emissão no infravermelho próximo (NIR) (BIJU, 2010), visto que a penetração da radiação no infravermelho próximo nos tecidos é significativamente maior que àquela com comprimentos de onda menores, pois a água e os pigmentos biológicos absorvem menos no infravermelho próximo (FRANGIONI, 2003 e BALLOU, 2005).

A marcação celular utilizando compostos com absorção no infravermelho próximo é importante, por exemplo, para superar a autofluorescência de componentes celulares, para facilitar a penetração em regiões de difícil acesso como região craniana e possibilitar imagens por longo período, em tempo real do cérebro (MAYSINGER et al, 2007), sendo também possível a obtenção de imagens em tecidos profundos (SANDROS et al, 2007; JIANG et al, 2010). Entretanto, a investigação do destino de PQs, em nível subcelular, requer diferentes modificações da superfície destas nanopartículas. Entre as manipulações mais comuns estão: a modificação do tamanho e carga, além da conjugação de moléculas na superfície dos PQs. Estes fatores desempenham um papel crucial na distribuição subcelular dos PQs. Como citado anteriormente, os PQs têm sido utilizados conjugados a biomoléculas, para melhoria/otimização da marcação celular (ANAS et al, 2008; BAGALKOT et al, 2007, ANDRADE et al, 2013) assim como para potencialização dos mecanismos envolvidos na utilização destes em terapia fotodinâmica, o que será descrito com detalhes na sequência deste trabalho.

3.1.4. Absorção e distribuição de PQs em sistema biológico

A fim de investigar as interações entre nanopartículas e os sistemas biológicos, partículas bem definidas quanto ao tamanho e a uniformidade são necessárias. Sob condições controladas de síntese, os pontos quânticos podem ter suas dimensões calculadas e ajustadas para diversas aplicações (RIZVI et al, 2014; SILVA et al, 2010). Segundo Owens e Pepas (2006), após a administração de pontos quânticos não conjugados em espécies animais, estas partículas passam por diversos obstáculos antes de atingirem o alvo desejado. Inicialmente, as partículas sofreriam ação do sistema retículo endotelial (SRE), que inclui as células fagocíticas. Estas células são especializadas para rapidamente remover partículas “estranhas” presentes na circulação. Este reconhecimento pelo SRE pode ser reduzido modificando a

superfície das partículas como, por exemplo, pela conjugação à proteínas específicas e moléculas como o polietilenoglicol. Entretanto, quando as nanopartículas conseguem atingir a célula-alvo, o mecanismo de ação intracelular ainda não está totalmente elucidado. (BAKALOVA et al, 2011; BIJU et al, 2010; HILD et al, 2008)

Segundo Rabinow e Chaubal (2006), após captação celular, através de endocitose, as nanopartículas são encapsuladas por endossomos, podendo ser degradadas nos lisossomos ou serem exocitadas. Para a liberação intracelular de PQs, é importante observar que, além da endocitose, outros mecanismos de captação celular podem ocorrer, como o transporte transmembrana, semelhante ao que ocorre com alguns nutrientes e fármacos (HILD et al, 2008).

As nanopartículas convencionais, como as baseadas em polímeros, muitas vezes possuem distribuições de tamanho bastante amplo, que limitam o seu uso para a captação celular e distribuição intracelular. Além disso, a marcação de nanopartículas com corantes fluorescentes convencionais pode alterar significativamente suas propriedades físicas. A busca pelo tamanho ideal de uma partícula para endocitose (OSAKI et al, 2004), a elucidação do mecanismo da captação não-específica de partículas, e quais os receptores que podem mediar a captação específica de colóides, permanece como desafio para os pesquisadores (LIDKE, et al, 2004), e neste contexto os PQs vem ganhando destaque cada vez maior em pesquisa, marcação e diagnóstico envolvendo sistemas biológicos (RIZVI et al, 2014; BAKALOVA et al, 2011). Entretanto, durante o desenvolvimento de PQs, as modificações de superfície, as moléculas incorporadas ou bioconjugadas nestes nanosistemas, devem ser criteriosamente avaliadas para otimizar o processo de entrega tecidual dessas nanopartículas.

3.1.5. Modificação de superfície e bioconjugação de PQs

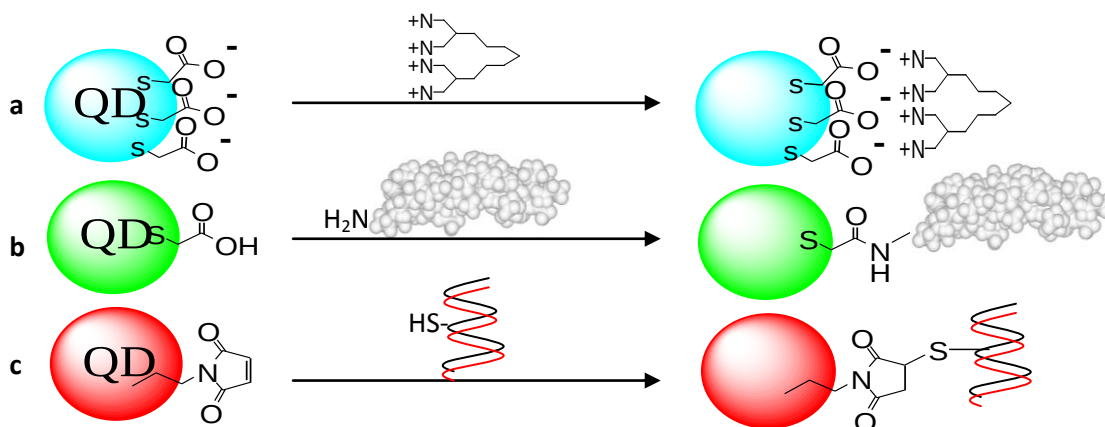
Pontos quânticos não modificados, contendo apenas o núcleo (*core*) da nanopartícula, não são viáveis para estudos celulares, sendo necessário um agente funcionalizante, substância capaz de melhorar a compatibilidade dos PQs em sistemas biológicos. Portanto, para fazer uso de suas propriedades, as partículas têm de ser modificadas em sua superfície. A superfície de PQs pode ser revestida por moléculas hidrofílicas e reativas com grupos funcionais necessários para aplicações biológicas. Isso pode ser obtido pela adição de moléculas anfifílicas, tais como ácidos mercapto, dendrímeros, sílica, polímeros anfifílicos e açúcares na superfície do núcleo do nanocristal de PQs (MEDINTZ et al., 2005). Além disso,

as partículas podem ser conjugadas com biomoléculas célula-específicas como proteínas ou peptídeos, a fim de investigar os mecanismos de absorção específica intracelular.

A extensão da internalização celular e distribuição subcelular de pontos quânticos hidrofílicos e não funcionalizados é largamente dependente do tamanho das nanopartículas e carga de superfície. Choi e colaboradores (2007) mostraram que diferentes cargas em superfícies de nanocristais de CdTe pode regular a extensão da absorção destas nanopartículas de tal forma que quanto mais carregada positivamente (por exemplo, cisteamina como estabilizante de superfície), as nanopartículas são absorvidas mais facilmente por alguns tipos de células. A internalização de PQs também pode ser melhorada por conjugação com fosfolipídios, polímeros sintéticos (ex. PEG), sílica, entre outros (ZHANG et al, 2006). Lovric e colaboradores (2005) mostraram que PQs de CdTe catiônicos, sintetizados com cisteamina como agente estabilizante, são rapidamente internalizados em aproximadamente uma hora de incubação com as células, sugerindo mecanismos de captação envolvendo fagocitose em locais periféricos

Para que os pontos quânticos sejam utilizados para a investigação dos distintos processos celulares de absorção, as partículas têm de ser conjugadas a biomoléculas que podem ter como alvo certas estruturas na superfície da célula, como receptores. Portanto, a superfície do PQ deve fornecer grupos funcionais ou outros sítios reativos que permitam um acoplamento de diferentes biomoléculas. Existem várias possibilidades para a fixação de biomoléculas nos PQs (ver alguns exemplos na Figura 5). Em muitos casos, pequenas ligações covalentes são muitas vezes preferidas, juntamente ao tamanho das partículas do bioconjugado, o que é fundamental para a aplicação. Tais ligações covalentes podem ser formadas por ácidos carboxílicos, fornecidos por exemplo por um recobrimento da nanopartícula por ácido contendo radical mercapto (tiol). Os grupos mercapto podem se ligar à superfície do PQ, enquanto o ácido carboxílico pode formar ligações amidas estáveis com aminas de várias biomoléculas na presença de reagentes de acoplamento, como carbodiimidas e N-hidroxisuccinimidas (CHAN, 1998 e ZHANG et al, 2000). Ligações covalentes estáveis também podem ser formadas entre Maleimidas e tióis, resultando em um tioéter entre PQs e biomoléculas (DUBERTRET et al, 2002).

Figura 5- Exemplo de algumas estratégias de bioconjugação de diferentes PQ's funcionalizados à biomoléculas. **a.** Adsorção por interação eletrostática; **b.** Formação de ligação amida entre PQ e proteínas ou peptídeos; **c.** Conjugação PQ e DNA tiolado.



Desta forma, tanto para finalidade de marcação celular, como para outras aplicações biológicas, a exemplo da terapia fotodinâmica, a vetorização destas nanopartículas em tecidos vivos deve considerar dois aspectos: primeiro, a especificidade celular e segundo, o encontro de uma via adequada para captação celular. Sabe-se, por exemplo, que a funcionalização com aminoácidos podem aumentar a afinidade dos PQs por determinados tecidos. Gao e colaboradores (2010) utilizaram sistema de nanocristais composto por InAs/InP/ZnSe encapsulados com polietilenoglicol (com emissão máxima em 800 nm) funcionalizados com diferentes componentes: polietileno glicol (PQ800-PEG), arginina-glicina-ácido aspártico (PQ-800-RGD) e arginina-alanina-ácido aspártico (PQ800-RAD). No referido trabalho, eles verificaram, com reprodutibilidade, a eficácia na marcação de tumores subcutâneos, constatando que a absorção do PQ800-RGD pelo tumor, foi maior do que os de PQ800-PEG e PQ800-RAD. Como vários fatores influenciam a distribuição tissular e a absorção intracelular, como tamanho e carga da superfície das nanopartículas (PANG et al, 2002), a adição de moléculas de superfície aos nanocristais deve ser bem estudada.

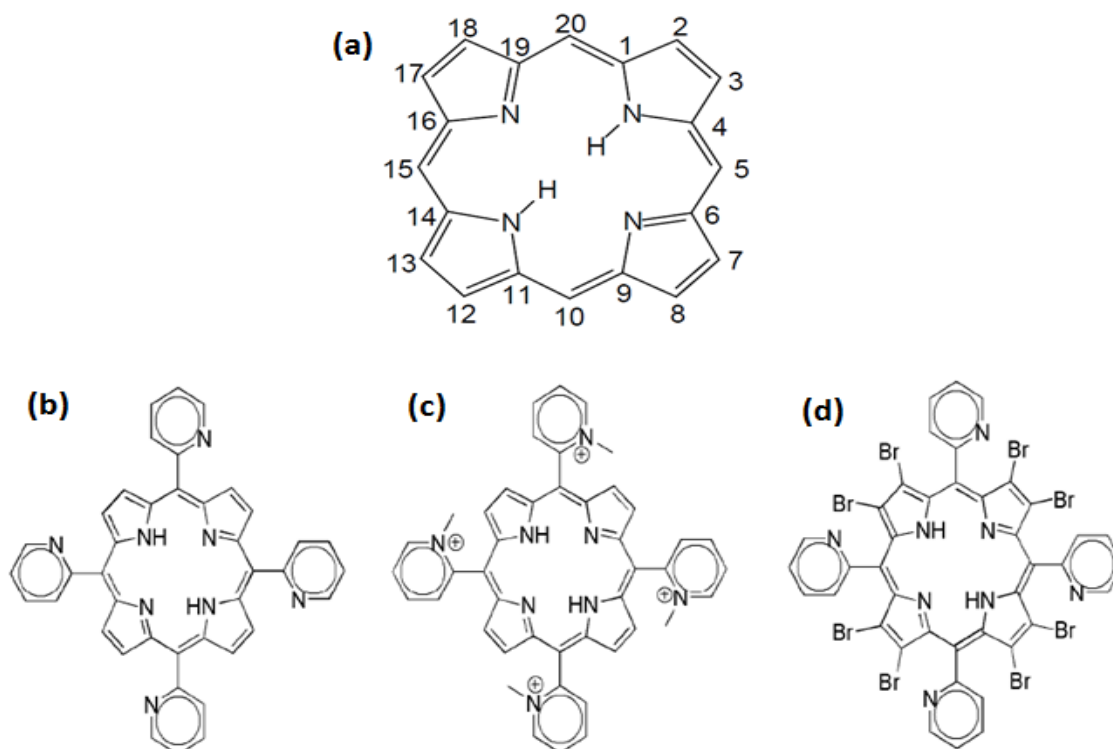
Segundo Nabiev (2007) e Lovric (2005), após internalização, pontos quânticos com dimensões superiores a 5 nm (fluorescência no vermelho) ficam retidos no citoplasma, enquanto PQs menores (fluorescência no verde), com 2 nm de diâmetro, ficam localizadas no núcleo, o que apontam para um papel crítico das propriedades de carga, tamanho e superfície dos PQs para transporte transmembrana. Portanto, a escolha dos ligantes conjugados ou associados à superfície do ponto quântico, deve ser criteriosamente avaliada em função da influência destes nas propriedades de carga e nas dimensões da nanopartícula e na sua ação em sistemas biológicos.

3.2. Porfirinas

Porfirinas são compostos macrocíclicos, aromáticos, altamente conjugados e muitos de seus derivados metálicos estão presentes em várias proteínas. As porfirinas apresentam importante papel em sistemas biológicos, tais como: transporte (hemoglobina) ou armazenamento de oxigênio (mioglobina), transporte de elétrons na cadeia respiratória (citocromo c) e ainda, ação catalítica, como por exemplo no metabolismo de fármacos (monooxigenase, no citocromo P-450) (KAIN, 2007; OTHMAN et al, 2000).

As porfirinas representam uma classe de moléculas orgânicas constituídas por quatro anéis pirrólicos ligados entre si por pontes de CH (metino), formando um macrociclo, conforme esquematizado na Figura 6a. As porfirinas base livre não possuem metais complexados no centro do anel macrocíclico, onde existem dois átomos de hidrogênios ligados aos nitrogênios amínicos. O centro da porfirina possui um raio de aproximadamente 70 pm. As porfirinas base livre não apresentam atividade catalítica em aplicações de oxidação de substratos orgânicos, podendo ser classificadas como primeira, segunda e terceira geração, figuras 6b, c e d, respectivamente (FRIEDRMANN, 2005; MONTANARI, 1994).

Fig. 6- (a) Estrutura do anel porfirínico base livre. Carbonos nas posições 5,10,15 e 20 são denominados “carbonos em posições meso”. Os átomos das posições 2, 3, 7, 8,12, 13, 17 e 18 são conhecidos como “carbonos nas posições β -pirrólicas”. (b) Porfirina de primeira geração, (c) segunda geração e (d) Terceira geração.

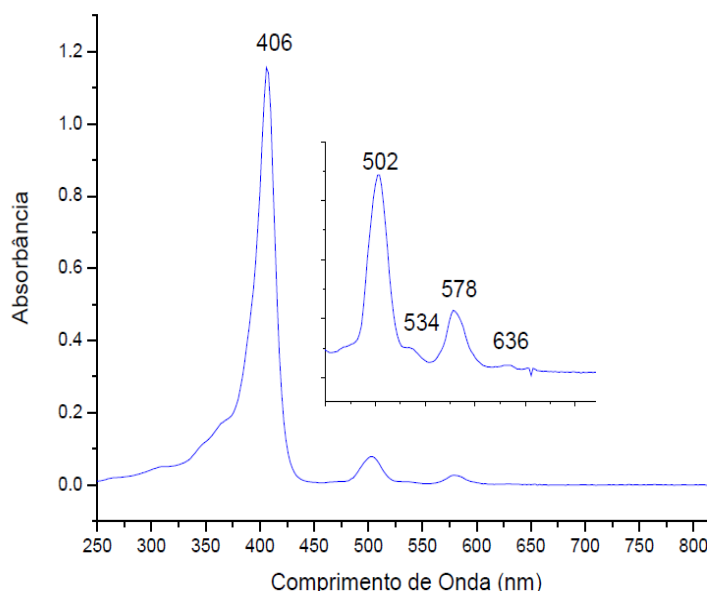


A nomenclatura das porfirinas depende das posições dos grupos substituintes no anel porfirínico. Alquilporfirinas são porfirinas que possuem substituintes alifáticos e as arilporfirinas possuem substituintes aromáticos. Quando os substituintes das posições meso (5, 10, 15 e 20) do anel porfirínico são iguais, usa-se o prefixo *tetrakis*. As porfirinas de primeira geração são comumente derivadas de *mesoarilporfirinas* simples e contêm grupos arilas não-substituídos. Um exemplo típico de porfirina de primeira geração é a *meso-tetraquis(2-piridil)porfirina*. As porfirinas de segunda geração apresentam grupos arilas contendo substituintes (usualmente, alquila ou halogênios) nas posições *orto*, *meta* e/ou *para* do anel, como por exemplo a *meso-tetraquis(N-metilpiridínio-2-il) porfirina*. As porfirinas de terceira geração apresentam substituintes volumosos e/ou retiradores de elétrons, sendo átomos de halogênios os mais comuns, nas posições β -pirrólicas. A *meso-tetraquis(2-piridil)- β -octobromoporfirina*, é um exemplo de porfirina de terceira geração. (PEIXOTO, 2012)

A metaloporfirina é resultante da troca dos dois átomos de hidrogênio centrais do anel da porfirina base livre por um cátion metálico. Durante esse processo de metalação por cátions bivalentes, como o Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} ou Ni^{2+} , ocorre uma mudança significativa na simetria do anel porfirínico. O tamanho do cátion influencia a conformação do anel e, conseqüentemente, a estabilidade da porfirina. Íons como o vanádio (VO^{2+}) e o férrico (Fe^{3+}), por exemplo, que possuem raios de 60 e 65 pm respectivamente, são considerados de tamanho ideal para a coordenação ao centro da porfirina. Metaloporfirinas com esses íons são facilmente encontradas na natureza (KAIN, 2007).

As porfirinas base livre apresentam em seu espectro eletrônico uma banda característica, muito intensa ($\epsilon \sim 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), entre 380 e 430 nm, denominada banda Soret ou banda B, e na região entre 500 e 650 nm apresentam ainda quatro bandas ($\epsilon \sim 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) denominadas bandas Q (BARTINIC et al 2008). O espectro de absorção eletrônica, característico de uma porfirina de base livre, está demonstrado na Figura 7.

Figura 7- Espectro de absorção característico de porfirina de base livre em diclorometano, apresentando bandas B (406) e bandas Q (acima de 475 nm).



Fonte; Adaptado de Firedermann, 2005.

As bandas B e Q são observadas no espectro eletrônico devido a transições entre os orbitais $\pi\pi^*$ do anel porfirínico, e são muito mais intensas que as bandas originadas pelas transições d características nos metais de transição ($\epsilon \sim 10^2 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e da transferência de carga metal-ligante presentes nas metaloporfirinas ($\epsilon \sim 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e que ocorrem próximas a 370 nm.

Quando a porfirina base livre sofre metalação, observa-se um deslocamento na banda Soret para a região de mais alta energia e as bandas Q se reduzem a duas. Tal processo é útil para acompanhar o desenvolvimento da reação de metalação de uma porfirina base livre.

Outra forma de diferenciação das porfirinas base livre das metaloporfirinas são seus espectros de emissão. Quando submetidas à radiação ultravioleta, as porfirinas base livre apresentam intensa fluorescência vermelho-alaranjada, porém essa característica é perdida ou bastante diminuída quando elas são metaladas. As porfirinas base livre, quando complexadas com íons diamagnéticos, mantêm a fluorescência, enquanto que os derivados paramagnéticos perdem esta característica. Isto explica porque em porfirinas de zinco, cádmio, bário, magnésio entre outras, observa-se fluorescência, com intensidade menor e comprimento de onda diferente da porfirina base livre. (FRIEDRMANN, 2005)

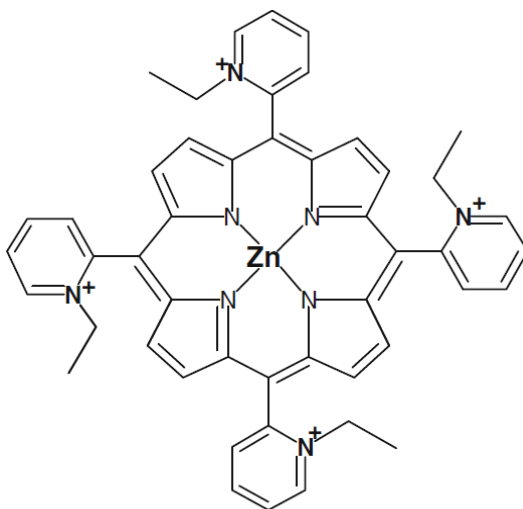
Portanto, após metalada, a estrutura sintetizada pode ser confirmada utilizando, além das técnicas de espectroscopia UV-Vis, outras técnicas como espectroscopia de IV,

Ressonância Magnética de Hidrogênio-1 e Carbono-13 e Ressonância paramagnética de elétrons (RPE).

A metalação das porfirinas com manganês, cobalto, níquel entre outros, e sua utilização em sistemas biomiméticos muitas vezes visa adequar os modelos às funções biológicas a que se propõe mimetizar, e também a aplicações tecnológicas e industriais de interesse (BENOV et al, 2011; BARTINIC et al, 2008; NAIK et al, 2005; LI et al, 2004; BENEDITO et al, 2003;). Assim como as ftalocianinas e tetraazaanulenos, as porfirinas são ligantes macrocíclicos capazes de coordenar metais de transição em diversos estados de oxidação devido principalmente às dimensões internas da cavidade do macrocíclico e do efeito quelato. (BENOV et al, 2011; DOLPHIN et al, 1997)

Entre as diversas aplicações das porfirinas, se destaca sua importância na medicina, por potentes atividades antioxidantes (BENOV et al, 2011; BARTINIC, 2010) e para atividade fotodinâmica, pois possuem alta afinidade por tecidos tumorais. Estas características as tornam drogas eficazes para diagnóstico e tratamento do câncer, em uma nova modalidade de tratamento, chamada de Terapia Fotodinâmica (TFD) (BEGA, 2008; AL-MUTAIRI et al., 2007; COVALAN, 2004). Uma abordagem sobre terapia fotodinâmica (TFD), fundamentos, mecanismo via produção de radicais livres, aplicação desta técnica utilizando nanocristais semicondutores livres e associados para o tratamento de alguns tipos de microorganismos de parasitas será visto na sequência da Tese. A porfirina sintética metalada estudada no presente estudo tem a estrutura molecular representada na Figura 8.

Figura 8- Estrutura molecular da metaloporfirina estudada $\text{ZnTe-2-PyP}^{\text{Cl}_5}$ ou ZnTe-2-PyP^{5+} (com massa molecular 741,76 e centro de raio 72 pm).



A zincoporfirina mostrada na figura 8 tem algumas características importantes: é hidrossolúvel, catiônica e apresenta atividade fotodinâmica descrita para inibição de *Escherichia coli* e na terapia fotodinâmica anticâncer (BENOV et al, 2002, 2011 e 2012). A carga positiva não somente é mais atraente para as células, as quais possuem uma membrana essencialmente negativa, mas também representa uma forte possibilidade de interação com os pontos quânticos negativos, objeto do presente estudo.

3.3. Produção de radicais livres e terapia fotodinâmica

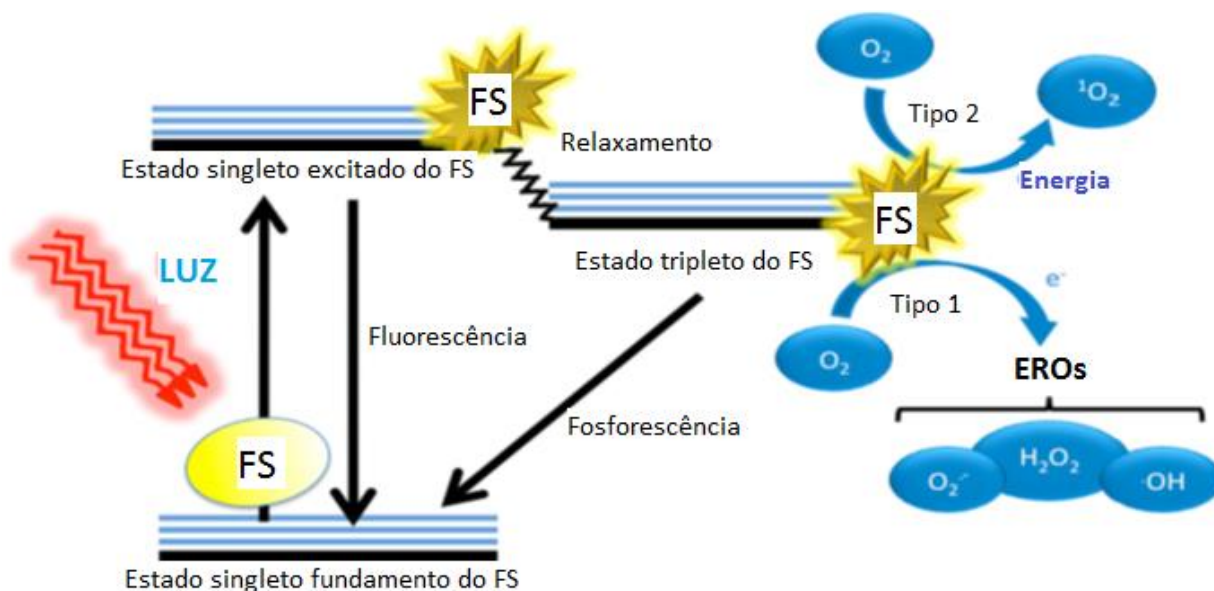
3.3.1. Terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) consiste em uma técnica cada vez mais utilizada para tratar uma série de doenças e distúrbios envolvendo diversos sistemas do organismo e tem sido desenvolvida nas últimas décadas como uma alternativa ao tratamento tradicional de alguns tipos de neoplasias e para alguns tipos de doenças não neoplásicas. A terapia fotodinâmica envolve o uso de corantes ou substâncias fotoestimuláveis chamadas fotosensibilizadores (FS) que combinados com radiação no visível em comprimento de onda correspondente ao espectro de absorção do FS podem induzir morte celular por mecanismos de óxido-redução e formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). (DAI et al, 2012, SIMPLICIO 2002, MACHADO et al, 2000) Após absorção de fótons a droga FS passa ao seu estado excitado que pode promover reação com o oxigênio do meio resultando na formação de EROs. Portanto os três principais componentes da TFD são FS, luz visível e oxigênio.

Muitas substâncias fotosensibilizadoras possuem duplas ligações conjugadas contendo sistema de elétrons deslocalizados. No estado fundamental estes elétrons são “spin pareados” em orbitais de baixa energia. Após excitação por fonte de luz correspondente ao pico de absorção do FS, o elétron no presente no orbital HOMO (*highest occupied molecular orbital*) do FS é excitado para o orbital LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*), excitando o FS para o estado excitado instável e de curta duração. Neste estado vários processos podem ocorrer rapidamente como a formação de EROs. (Figura 9). O mais importante deste processo de TFD é a inversão do spin do elétron excitado, conhecido como transferência intersistema para dar o estado tripleto do FS. Este estado tripleto é menos enérgico do que o estado singleto excitado, mas tem um tempo de vida muito mais longa (microssegundos em

oposição a nanossegundos). O elétron excitado no estado tripleto pode interagir com moléculas abundantes no ambiente.

Figura 9- Ilustração esquemática da terapia fotodinâmica com o processo de excitação do FS e formação de EROs.



Fonte: adaptado de DAI et al, 2012

Em 1970, a TFD foi inicialmente desenvolvida como uma terapia para câncer após descobrirem que as porfirinas ficavam localizadas seletivamente em tecidos tumorais (MITTON e ACKROYD, 2008). Em 1993 uma formulação contendo derivados diméricos e oligoméricos de hematoporfirina (Photofrin®) teve aprovação clínica e vem sendo utilizada em TFD. Desde então a TFD tem sido usada para tratamento de diversas desordens malignas e também para infecções localizadas (DAI et al, 2012; ETHIRAJAN et al, 2011). Algumas fontes de luz utilizadas em TFD podem ser à base de lasers e não-laser. As fontes que não utilizam luzes de laser como xenônio, tubos fluorescentes e diodo emissores de luz (LED), são úteis para o tratamento de grandes áreas da pele. (BASTOS et al, 2012)

As principais aplicações da terapia fotodinâmica estão na oncologia, sendo as mais comuns aquelas contra queratoses actínicas, carcinoma basocelular nodular ou superficial e a doença de Bowen. No entanto, existem outras indicações terapêuticas não oncológicas. Algumas destas estão descritas no Quadro 2.

Quadro 2- Aplicações não oncológicas da terapia fotodinâmica.

Aplicações	Comentários
Vírus papiloma humano (HPV)	Nas verrugas causadas por HPV observa-se recorrência na quimioterapia convencional. (STENDER, 2000)
Acne vulgaris	A eficácia do tratamento de TFD para acne tem sido registradas por dermatologistas, entretanto casos de irritação cutânea tem sido observados (ITOH et al 2009 e WIEGELL e WURF, 2006)
Indicações cosméticas	Tratamento de manchas de pele, rugas e hiperpigmentação tem sido observadas via TFD. (DOVER et al, 2005)
Ação antimicrobiana	A TFD também vem se mostrando eficaz na fotoinativação de bactérias gram-positivas e gram negativas e sobre fungos (FU et al, 2013; ORIEL e NITZAN, 2012; DAI et al, 2012)

Em relação à quimioterapia convencional e a radioterapia, a principal vantagem da TFD é a fotoativação de drogas fotosensibilizadoras em sítios específicos usando a luz visível ou NIR (*near infrared*) direcionada ao alvo, oferecendo terapia seletiva para o câncer e para alguns tipos de infecção, o que representa menor toxicidade e interferência com outros sistemas fisiológicos (imunológico por exemplo) e deixaria intacto tecidos saudáveis (DAI et al, 2012, BIJU et al, 2010, YAGHINI et al, 2009).

3.3.2. Fotossensibilizadores

Na terapia fotodinâmica, existem vários fatores que influenciam a fotodegeneração celular, incluindo a localização do tecido a ser tratado, a disponibilidade do oxigênio, o comprimento de onda de excitação, a irradiância ou densidade de potência (W/cm^2), a fluência ou densidade de energia da radiação (J/cm^2), o tempo de incubação, o tipo e a concentração do fotossensibilizador (SOUKOS, 2011). A qualidade de um fotossensibilizador para terapia fotodinâmica depende de vários fatores, entre eles a ausência de toxicidade no escuro e o uso de comprimento de onda minimamente tóxico e clinicamente útil. A síntese e preparação de um produto fotossensibilizador estável, minimamente alérgico, armazenável, facilmente reconstituído e rentável são critérios essenciais na busca de um composto FS ideal. (ALLISON, 2008)

O uso de um fotossensibilizador em TFD depende ainda de sua eficiência para a transferência de energia e/ou de elétrons ao oxigênio molecular e da subsequente produção de espécies reativas de oxigênio (KOWERKO, 2010). Em comparação com a transferência de elétrons, a transferência de energia é desejável para TFD porque os produtos de transferência de elétrons, como os radicais livres, sofrem transformações químicas irreversíveis, o que evita fotoativação posterior da droga fotossensibilizadora e contínua geração de ROS, mantendo sua durabilidade (BIJU et al, 2010). Entretanto, a dificuldade da obtenção de novos agentes FS estáveis e eficazes tem impedido os pesquisadores de alcançarem resultados e avanços mais significativos.

As desvantagens da utilização dos fotosensibilizadores convencionais atualmente desenvolvidos podem estar relacionadas com alguns dos seguintes problemas: tempo de meia-vida inadequado para TFD, causando dificuldades na otimização no tempo de irradiação; não atinge uma distribuição adequada no tecido alvo; retenção ou absorção imprópria do FS pelo tecido alvo; dificuldade de direcionamento celular em tecidos não-alvo pode ser significativo e preocupante durante e por períodos prolongados após a TFD; energia de ativação de alguns FS requerem tempos prolongados de irradiação. A nanotecnologia pode ser um meio para refinar essas moléculas para melhorar seu uso em TFD (ALLISON et al, 2008). Entre as nanopartículas promissoras para uso em TFD destacam-se os pontos quânticos.

3.3.3. Princípios e fundamentos da utilização de PQs na terapia fotodinâmica

Diversos trabalhos na literatura descrevem avanços na utilização de fármacos para terapia fotodinâmica, como síntese de nova geração de agentes FS, entrega de fármacos específicos, introdução de fontes de luz ajustável e fibra óptica a laser, e aplicação destes para diversos tipos de cânceres, como o de pele, esôfago, câncer brônquico, cabeça e pescoço, câncer de pulmão, câncer de próstata e câncer de bexiga. (SAMIA, 2006; TSAY et al., 2007; BAGALKOT et al., 2007; MA et al, 2008; JUZENAS et al., 2008a e b; YAGHINI et al., 2009).

Nos últimos anos, muito esforço tem sido feito no desenvolvimento de agentes para terapia fotodinâmica. Na busca por novos materiais que superem as desvantagens dos fotossensibilizadores atuais como a pouca solubilidade em água e a sensibilidade cutânea prolongada e a estreita faixa de absorção (600 - 800 nm), os PQs surgem como uma

alternativa para a aplicação em TFD, na forma livre ou conjugada a outros FS. (YAGHINI et al, 2009) A utilização de PQs associados com fármacos fotossensibilizadores convencionais e não-convencionais, tem atraído a atenção de vários pesquisadores (JHONSI e RENGANATHAN, 2010; WEN et al, 2009; TSAY et al, 2007; CLARKE et al, 2006).

Trabalhos recentes têm demonstrado que os pontos quânticos podem atuar potencializando a ação dos fotossensibilizadores clássicos, os quais podem ser excitados através da fluorescência emitida pelas nanopartículas, melhorando assim a eficácia da técnica (LI et al, 2012; NARBAND et al, 2008). A capacidade dos pontos quânticos de atuar como doadores eficientes para os corantes orgânicos via FRET (Transferência de energia via ressonância de Forster) têm estimulado o interesse na combinação de pontos quânticos e fotossensibilizadores para a TFD (QI et al, 2011).

De acordo com o princípio FRET, a eficiência na transferência de energia varia inversamente com a distância entre o doador e o receptor (Lakowicz, 1986). Além disso, os mecanismos indutores de transferência de energia, a distância entre acceptor-doador, o tamanho de PQs, e a constante dielétrica do meio e são fatores que afetam a eficiência para a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Assim, uma distância menor que 10 Å entre FS e PQs é necessária para uma eficiente transferência de energia e uma significativa produção de EROs (MEDINTZ e MATTOUSSI, 2009).

As propriedades ópticas dos pontos quânticos despertam o interesse para sua aplicação na terapia fotodinâmica. Uma vez que os pontos quânticos possuem um largo espectro de absorção, sua utilização em conjunto com um fotossensibilizador proporciona uma maior flexibilidade, ou seja, o uso de uma maior faixa de excitação para a ativação da molécula do fotossensibilizador. Dessa forma, é possível utilizar, para excitar o fotossensibilizador, comprimentos de onda nos quais não haveria absorção caso o mesmo fosse aplicado isoladamente no sistema. Ainda, a superfície dos pontos quânticos pode ser funcionalizada para torná-los biocompatíveis e alvo-específicos (SAMIA et al, 2003).

Além de atuarem como potencializadores da ação dos fotossensibilizadores clássicos, através de FRET, os pontos quânticos podem produzir, diretamente, espécies reativas de oxigênio (EROs). A produção de EROs em alta eficiência é o principal requisito para um FS padrão. Apesar da possibilidade do direcionamento celular dos PQs, por meio da ligação destes com anticorpos específicos e outras biomoléculas, a eficiência dos pontos quânticos na produção de EROs em fotoativação direta é baixa. Alguns trabalhos afirmam que a produção de oxigênio singlete pelos pontos quânticos é considerada ineficiente para aplicação na TFD

uma vez que o seu rendimento é inferior quando comparado aos fotossensibilizadores clássicos como porfirinas e ftalocianinas (SAMIA et al, 2003; TSAY et al, 2007). Porém, há autores que apontam uma produção estatisticamente significativa de EROs pelos pontos quânticos, a qual seria dependente da composição dos PQs (IPE et al, 2005; MOROSINI et al, 2011) e que apesar da baixa eficiência na produção de $^1\text{O}_2$, PQs oferecem fotoativação prolongada devido a contínua produção de EROs ($^1\text{O}_2$ e outros) e elevada fotoestabilidade. Como exemplo, Anas e colaboradores (2008) mostraram que a fotoativação prolongada de um PQ-plasmídeo-DNA conjugado, excitados em 512 nm, resulta na quebra e dano do DNA.

Baseado no alto coeficiente de absorção de luz apresentado pelos pontos quânticos, Samia et al (2003) propuseram a utilização de um modelo de complexo PQ-fotossensibilizador, utilizando ftalocianina conjugada a pontos quânticos de CdSe. Devido à absorção de luz pelo PQ e sua atuação como doador na transferência de energia para a ftalocianina, este conjugado foi capaz de produzir oxigênio singlete através de FRET. Porém, por ser insolúvel em água, este complexo foi considerado inviável para aplicações biológicas.

Após esse marco inicial, diversos grupos investiram na busca de complexos PQ-fotossensibilizador, que pudessem ser aplicados em sistema biológicos. Estudos de interação fotofísica entre PQs-FS têm sido realizados por vários autores. Muitos desses trabalhos descrevem a interação entre porfirinas e diferentes tipos de PQs. Jhonsi (2008) descreveu o estudo de *quenching* da fluorescência do conjugado à base CdS e porfirinas, zincoporfirinas, protoporfirina IX. Wen et al (2009) também avaliaram a ativação de um tipo de porfirina por pontos quânticos de CdTe. Frasco e colaboradores (2010) realizaram estudos com PQs de CdSe funcionalizados com tetrapiridilporfirinas. Jhonsi & Reganathan (2010), por sua vez, realizaram estudo de interação fotoinduzida de CdTe funcionalizado com ácido tioglicólico e algumas porfirinas por espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo. Zhang e colaboradores (2011) estudaram a interação entre determinados tipos de porfirinas e PQs de CdTe, através da avaliação da supressão da luminescência dos PQs de CdTe na presença de quantidades crescentes de porfirina. Rakovich et al (2010) verificaram as propriedades fotodinâmicas de um conjugado formado por pontos quânticos de CdTe e azul de metileno (fotossensibilizador amplamente utilizado na TFD). Através de espectroscopia de absorção e determinação da fotoluminescência e tempo de vida de fluorescência, foi demonstrado que o corante reduz a luminescência das nanopartículas pelo mecanismo de transferência de carga, mas verificaram que o mecanismo de FRET também pode ocorrer. Tanto a transferência de carga quanto a de energia implicam em um aumento da excitação das moléculas do corante, o

que sugere um aumento da capacidade do metileno de produzir espécies reativas de oxigênio, quando este foi associado ao PQ.

Li et al (2012) conjugaram pontos quânticos a ftalocianina de alumínio para aplicação na TFD. O conjugado obtido atingiu 84% de eficiência no processo de FRET em células vivas. Os autores afirmam que o conjugado foi capaz de atingir o interior das células cancerígenas com facilidade e que essas células foram destruídas após a irradiação a 532 nm seguindo um modelo típico de TFD dose-dependente. Pontos quânticos de CdTe-tiol sintetizados em fase aquosa, foram utilizados como doadores de energia para derivados de ftalocianinas (AlPc, GaPc e InPc) por Tekdas et al (2012). O aumento no rendimento quântico da produção de oxigênio singleto pelas ftalocianinas, na presença de pontos quânticos, indica que a terapia fotodinâmica pode ser mais eficaz quando fotossensibilizadores são utilizados em conjunto com pontos quânticos.

Um conjugado formado por pontos quânticos de CdTe e dopamina, sintetizado por Chou et al (2013), mostrou-se promissor para aplicação na TFD. A taxa de oxigênio singleto produzido pelo conjugado foi comparável àquela produzida pelo fotossensibilizador ftalocianina de alumínio sulfonada (AlPcS) utilizando-se a mesma concentração de compostos e condições de irradiação.

Rotamskis et al (2013) demonstraram resultados de estudos espectroscópicos de um conjugado formado por pontos quânticos CdSe/ZnS recobertos com um polímero anfifílico/polietileno glicol e o fotossensibilizador clorina e_6 (Cl_{e6}). O fotossensibilizador conjugado ao ponto quântico foi indiretamente excitado, através de FRET, pelo ponto quântico. Ao ser irradiado pela luz visível, o conjugado foi capaz de produzir oxigênio singleto mais eficientemente que o ponto quântico ou o fotossensibilizador quando utilizados separadamente. O Quadro 3 mostra alguns estudos sobre a aplicação dos pontos quânticos na terapia fotodinâmica.

Quadro 3- Aplicação dos pontos quânticos na terapia fotodinâmica

Ref	PQ	Fotossensibilizador	Geração de Oxigênio Singlete
Samia et al, 2003	CdSe	Ftalocianina	O fotossensibilizador produziu $^1\text{O}_2$ via FRET. O $^1\text{O}_2$ também foi produzido pelos PQs, porém com baixo rendimento.
Tsay et al, 2007	CdSe/CdS/ZnS	Rosa Bengala e Clorina e_6	O fotossensibilizador produziu $^1\text{O}_2$ via FRET com rendimento quântico variando entre 0,1-0,3, a depender das condições de excitação e do fotossensibilizador utilizado.
Ma et al, 2008	CdTe-Tiol	Ftalocianina de alumínio sulfonada	A conjugação dos PQs ao fotossensibilizador aumentou em cerca de 15% o rendimento quântico da produção de $^1\text{O}_2$.
Rakovich et al, 2010	CdTe	Azul de metileno	A adição de PQs ao sistema contribuiu para excitação do fotossensibilizador (via FRET e transferência de cargas) e consequentemente para o aumento da produção de $^1\text{O}_2$.
Qi et al, 2011	CdSe	Porfirina	A geração de $^1\text{O}_2$ pelo conjugado (através de excitação por dois fótons) foi duas vezes maior que aquela gerada pela porfirina não conjugada.
Li et al, 2012	CdSe/CdS/ZnS	Ftalocianina de alumínio sulfonada	O conjugado foi capaz de penetrar em células de carcinoma nasofaríngeal e houve produção de $^1\text{O}_2$ via FRET (eficiência = 84%).
Tekdas et al, 2012	CdTe-Tiol	Derivados de ftalocianinas (AlPc, GaPc e InPc)	A presença dos PQs aumentou o rendimento da produção de $^1\text{O}_2$, que ocorreu via FRET.
Rotomskis et al, 2013	CdSe/ZnS	Clorina e_6	O fotossensibilizador conjugado ao PQ e excitado via FRET produziu $^1\text{O}_2$ de maneira mais eficaz quando comparado à clorina e_6 não conjugada.

Apesar de boa parte do uso da TFD ter como principal aplicação o tratamento de células neoplásicas, outras aplicações, tais como degeneração macular da retina, psoríase, artrite reumatóide sistêmica, micoses fungóides, infecções bacterianas resistentes aos tratamentos tradicionais, remoção de verrugas da laringe, arteriosclerose, desativação do vírus da herpes (herpes simplex, herpes zoster) etc., também podem ser tratadas por esta técnica, pois elas têm em comum o crescimento anormal de tecidos. (Covalan, 2004).

A natureza da interação entre pontos quânticos e moléculas do fotossensibilizador é essencial para a garantia da estabilidade, manutenção das propriedades fotofísicas e efetividade do complexo PQ-fotossensibilizador. Portanto são necessários estudos cuidadosos a respeito desta interação, da estabilidade, produção de oxigênio singlete e compatibilidade em meio biológico desses complexos fotodinâmicos, que a seu turno abre um campo de novas possibilidades de marcação e terapia simultânea, podendo levar a resultados inovadores na área médica e diagnóstica.

3.3.4. Inativação fotodinâmica de protozoários e microorganismos patogênicos

Como visto anteriormente, a terapia fotodinâmica é uma modalidade terapêutica para tratamento de distúrbios neoplásicos e não neoplásicos. A técnica de TFD promove morte em condições controladas morte de células animais e também de células microbianas (bactérias, fungos ou protozoários), e tem sido utilizado com sucesso na eliminação de tumores (ZHOU et al, 2015; HATAKAYAMA et al, 2013; CASTANO et al 2006; ROBERTSON et al, 2009), tratamento de doenças dermatológicas (SILVA et al, 2008) e na eliminação de parasitas como a *Leishmania amazonenses* e microorganismos patogênicos como *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* (RISTIC et al, 2014; DAI et al, 2012; DONNELLY et al, 2008).

Dentre as infecções causadas por protozoários a leishmaniose vem ganhando destaque nos estudos de terapias alternativas ou não convencionais, como é o caso da terapia fotodinâmica (BASTOS et al, 2012). A leishmaniose é uma doença infecciosa zoonótica, amplamente distribuída em todo mundo, que afeta o homem e os animais, com ocorrência na Ásia, Europa, África e Américas, tendo sido relatada, no continente americano, desde a época colonial. (ASTELBAUER & WALOCHNIK, 2011) A leishmaniose é causada por protozoários do gênero *Leishmania* e da família *Trypanosomatidae*, sendo transmitida por diferentes insetos vetores (flebotômíneos) da família *Psychodidae* e da subfamília *Phlebotaminae*. (DESJEUX, 2004; HERWALTD, 1999) O protozoário, em seu ciclo de desenvolvimento, assume duas formas evolutivas: amastigota e promastigota (flagelada e infectante). A primeira se desenvolve no interior dos macrófagos do hospedeiro (homem ou animais). Quando o flebotômíneo se alimenta do sangue de um hospedeiro infectado, ingere amastigotas que, então, se transformam em promastigotas. As promastigotas são inoculadas em novos hospedeiros pela picada do flebotômíneo, voltando a assumir a forma de

amastigotas, dando sequência ao ciclo evolutivo do parasito. (MURRAY et al, 2005; BERMAN, 1998)

Existem pelo menos sete espécies de *Leishmania* descritas e que estão associadas com a doença humana, sendo a *Leishmania braziliensis* e a *Leishmania amazonensis* as espécies mais amplamente distribuídas no Brasil (MORAES et al, 2006). A severidade da doença varia da forma cutânea benigna e de cura espontânea até formas severas, muitas vezes mutilantes, como a leishmaniose mucocutânea (figura 10) e leishmaniose tegumentar. A leishmaniose cutânea é uma das principais dermatoses tropicais de grande importância para a saúde pública. Apesar de haver diferentes espécies de *Leishmania* que afetam a pele durante a invasão parasitária, *L. major* e *L. amazonensis* ainda são as responsáveis pela maior parte dos casos. As principais manifestações clínicas são lesões ulcerativas em áreas expostas da pele que causam dano aos vasos sanguíneos e nervos, formação de cicatriz grosseira e infecções secundárias

Figura 10- a. Lesão característica da Leishmaniose mucocutânea. b) microscopia de formas infectantes de *Leishmania amazonensis*



Fonte: adaptado de Hypescience, 2010.

Há algumas drogas disponíveis com atividade leishmanicida, sendo seu uso limitado devido à alta toxicidade e ao aparecimento de resistências. Os medicamentos de primeira linha para o tratamento da leishmaniose são complexos de íon antimônio pentavalente, antimoniato de meglumina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostam®), introduzidos desde 1945 e continuam a ser utilizados para algumas formas de leishmaniose, porém, são requeridas altas doses, apresentam elevada toxicidade e o paciente precisa ser hospitalizado por 3 a 4 semanas, para administração parenteral (BRIONES et al, 2008). Ressaltam-se, ainda, as dificuldades inerentes ao controle dessas parasitoses, decorrentes principalmente de suas complexas características epidemiológicas (ASHFORD, 2000) e a

-VIANA, O.S.

resistência aos medicamentos atualmente disponíveis (BASTOS et al, 2012; HERWALTD, 1999). Para tentar resolver o problema da resistência deste parasita à terapia convencional, alguns estudos de terapia fotodinâmica tem sido desenvolvidos. Os principais estudos com TFD antileishmania envolvem o uso de porfirinas como as do ácido 5-aminolevulínico (ALA) ou seus derivados como fotossensibilizador (KOSAKA et al, 2007; ASILIAN & DAVAMI, 2006; GARDLO et al, 2003). Outros estudos tem utilizado azul de metileno (PELOI et al, 2011), Ftalocianinas (SILVA et al, 2015, MUEHLMANN et al, 2015) e outros tipos porfirinas sintéticas no tratamento da leishmaniose (GARDENER et al, 2010; BRISTOW et al, 2006)

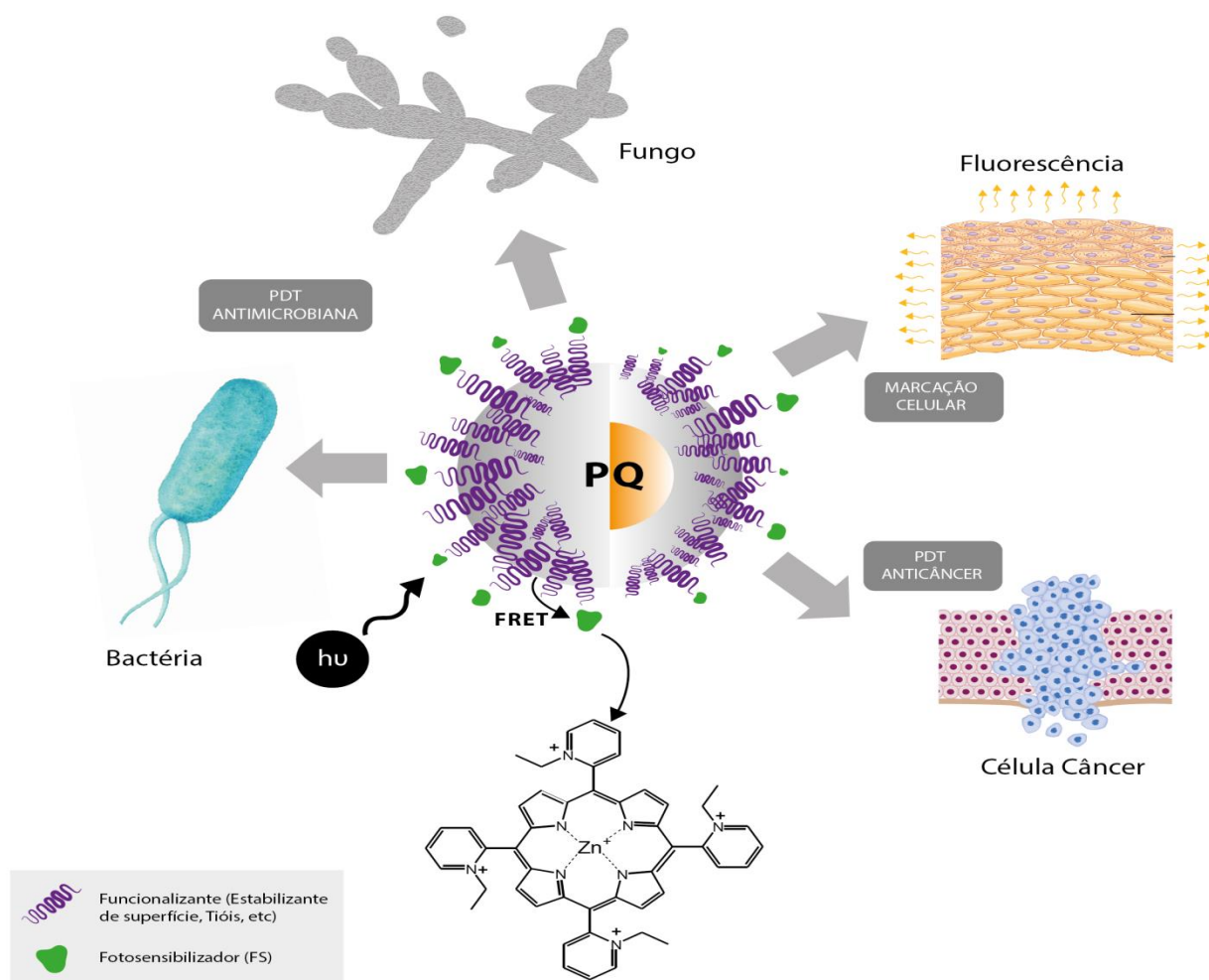
Além de parasitoses superficiais, a aplicação de terapia fotodinâmica contra microorganismos patogênicos, como alguns fungos e algumas bactérias de importância clínica, pode ser uma 45mazonenses para resistência microbiana, sendo conhecida como terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa). Nos casos de TFDa, esta tem sido utilizada para bactérias patogênicas e resistentes a antibióticos como meticilina, e com resultados promissores (FU et al, 2013; TANAKA et al, 2012; MAISCH, 2009; ZOLFAGHARI et al, 2009), bem como em odontologia para tratamento periodontal e no controle de biofilmes orais (SOUKOS e GOODSON, 2011). O uso indiscriminado de agentes antimicrobianos associado aos 45mazonens casos de surgimento de cepas de bactérias multiresistentes tem sido uma preocupação mundial. Algumas bactérias como espécies de *Staphylococcus aureus* tem desenvolvido multiresistência à maioria dos antibióticos existentes. Antibióticos potentes como a Vancomicina e meticilina são intensamente utilizados contra infecções resistentes causadas por microorganismos gram positivos, entretanto nas últimas duas décadas tem sido relatado aumento da resistência de cepas de *S aureus* a estes antibióticos (FU et al, 2013; GOULD, 2008; SAKOULAS, 2008)

A dificuldade no desenvolvimento de antibióticos com novos mecanismos de ação tem estimulado as pesquisas com técnicas alternativas para eliminação de bactérias resistentes, e TFDa tem sido intensamente testada por diversos grupos (FU et al, 2013; ORIEL e NITZAN, 2012; THAKURI et al, 2011; ZOLPHAGARI et al, 2009). A terapia fotodinâmica antimicrobiana é um processo que envolve morte da célula bacteriana pelo uso de radiação associada a substâncias fotossensibilizadoras, sendo uma técnica reprodutível, não invasiva e ideal para aplicação local. (DAIA et al, 2009, HAMBLIN e HASAN 2004) Os fotossensibilizadores mais comumente utilizados para TFDa são porfirinas, clorinas, ftalocianinas, fenotiazinas e acridinas. Wilson e colaboradores (1995) utilizando um tipo de

ftalocianina de alumínio conseguiu boa inativação fotodinâmica de cepas de *S aureus* resistentes à metilicina (SARM). Outros autores também tentaram inativação de cepas de SARM, mas sem tanta eficiência (Hajim et al, 2010; Griffiths et al, 2007). Como fotosensibilizadores para inativação fotodinâmica de microorganismos, as porfirinas tem sido bem exploradas por alguns pesquisadores (HANAKOVA et al, 2014; ORIEL, 2012; CARVALHO et al, 2009; CAMINOS et al, 2008; COSTA et al 2008). Maisch et al (2007) utilizaram porfirina catiônica como fotsensibilizadores contra SARM com elevada fotoinativação (> 3 logs de redução).

A Figura 11 apresenta um esquema resumido dos conteúdos até aqui abordados nesta seção, de algumas das possíveis aplicações da terapia fotodinâmica e PQs livres ou conjugados em terapêutica e marcação celular.

Figura 11- Aplicações dos PQs em biomedicina. Aplicações podem ser direcionadas para diagnóstico através da marcação celular com base na fluorescência específica ou não específica e recentemente para terapia fotodinâmica.



Como descrito até aqui, além dos fotosensibilizadores convencionais, outros materiais tem sido investigados para uso em TFD, como é o caso dos ponto quânticos, que induzem mecanismos de morte por danos ao DNA, danos oxidativos aos components celulares entre outros fatores (CHEN et al, 2010; ANAS et al, 2008, DERFUS et al, 2004) o que desperta para o uso destes em terapia fotodinâmica antimicrobiana e antiparasitária. Entretanto existem poucos trabalhos com enfoque no uso de PQs em TFD, o que reforça a importância do presente estudo na avaliação dos pontos quânticos na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e na atividade fotodinâmica contra espécies de *Leishmania*, *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Síntese dos pontos quânticos e zincoporfirina

Para realização da síntese de pontos quânticos de CdTe utilizou-se os seguintes reagentes e soluções: solução de perclorato de cádmio [$\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$] 0,01 M, como fonte de cádmio; telúrio elementar (Te^0); borohidreto de sódio (NaBH_4) fabricante Sigma/Aldrich; agentes estabilizantes: ácido mercaptosuccínico (MSA) e cisteamina (CYS), reagentes de fabricação da Sigma/Aldrich. A síntese de PQs CdTe foi realizada adicionando-se 0,2 mmol de $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ em água ultrapura (40 mL) com 0,46 mmol do agente estabilizante (MSA ou CYS). O pH desta mistura foi ajustado em função do pKa dos agentes estabilizantes ($\sim 5,5$ para CdTe-CYS e $\sim 10,4$ para CdTe-MSA), e a mistura foi submetida ao aquecimento até temperatura constante de 90°C . Paralelamente foi realizada a obtenção do telúrio reduzido, utilizando-se telúrio elementar (Te^0) (0,1 mmol) e solução de borohidreto de sódio (NaBH_4) com agente redutor, sob temperatura de 70°C e atmosfera inerte (N_2). Após adição do telúrio reduzido na solução contendo Cd^{2+} , a mistura continuou sob aquecimento pelo tempo necessário para obtenção/crescimento dos nanocristais de CdTe. O tempo de manutenção do sistema sob aquecimento determina o tamanho final dos cristais e portanto sua região de emissão. Os PQs obtidos foram purificados por filtração através de membrana específica (Pierce Concentrator 20K MWCO, ThermoScientific).

Para a síntese da zincoporfirina aqui avaliada, realizou-se etilação da Zn-tetrakis(2-piridil)porfirina (ZnT-2-PyP) (REBOUÇAS, CARVALHO e IDEMORI, 2002) usando uma adaptação de procedimentos da literatura (TOVMASYAN et al, 2013). O ZnT-2-PyP e o etiltosilato foram dissolvidos em N,N-dimetilformamida (DMF) e aquecido por 110° sob agitação magnética por 24 horas. A reação de etilação foi monitorado por cromatografia de camada delgada (CCD) e espectroscopia de absorção eletrônica e espectroscopia de emissão como reportado por porfirinas análogas (Rebouças, Spasojevic e Batinic, 2008). O produto final foi purificado conforme descrito por Ezzddine et al, (2013). A caracterização espectroscópica seguiu dados previamente reportados (Benov et al 2002) e, foi realizado a caracterização óptica. Após síntese, as amostras de CdTe e de ZnP foram diluídas para concentração de 10^{-5}mol.L^{-1} . Para avaliar os efeitos na geração de espécies reativas de oxigênio, escolhemos associar por interação eletrostática a zincoporfirina (ZnTE-2-PyP^+), carregada positivamente, com PQ de CdTe-MAS, carregado negativamente. As soluções de

ZnP e PQ foram misturadas por agitação mecânica por 10 minutos. A proporção molar de PQ e ZnP variou de acordo com o tipo de teste [caracterização óptica, avaliação de supressão de fluorescência (*quenching*), teste de produção indireta de ROS, ensaios fotodinâmicos com células animais e microbianas (*Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Leishmania amazonenses*)]. Os ensaios de supressão de fotoluminescência do conjugado PQ-ZnP encontram-se descritos nos anexos desta tese, através do artigo completo (VIANA et al, 2015 – Molecules doi: 10.3390/molecules20058893).

4.2. Caracterização óptica e estrutural de Pontos Quânticos e zincoporfirina e do conjugado PQ-ZnP

Após a síntese e purificação das suspensões dos nanocristais de CdTe e da zincoporfirina, estes, juntamente com os conjugados PQ-ZnP foram caracterizados opticamente através dos espectros de emissão e excitação realizados em espectrofluorímetro da marca PerkinElmer modelo LS55, e dos espectros de absorção eletrônica no UV-Vis realizados em espectrofotômetro modelo *Evolution 600 UV-vis*, fabricante Thermo scientific, utilizando o Software – visionpro. Para os pontos quânticos, os espectros de absorção foram realizados com o intuito de se confirmar a formação das nanopartículas, bem como estimar o tamanho médio das partículas seguindo método descrito por Yu et al (2003). A caracterização estrutural dos PQs foi realizada por difratometria de raio-X e microscopia eletrônica de transmissão (MET). O difratograma de raio-X dos nanocristais foi obtido entre $2\theta = 15$ e 60° , usando Ultima Rigako, 40 kV, 20 mA, com $\lambda(\text{Cu}) = 1.544 \text{ \AA}$. A MET foi obtida utilizando o microscópio Tecnai – G2-20-FEI 2006, 200 kV.

4.3. Produção de radicais livres por PQs, ZnP e seus conjugados

4.3.1. Detecção indireta de espécies reativas de oxigênio (ROS) por método RNO

Para avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio pelos PQs e ZnP estudados, realizou-se determinação indireta de ROS. Para este ensaio foi utilizada técnica indireta utilizando como reagentes N,N-dimetil-4-nitrosoanilina (RNO) e L-histidina, ambos da Aldrich®. Após adição do fotosensibilizador [(PQ (CdTe-MSA ou CdTe-CYS $1\mu\text{mol.L}^{-1}$ ou ZnP $1\mu\text{mol.L}^{-1}$ ou associação PQ-ZnP), as medidas da absorção foram realizadas no comprimento de onda de 440 nm. Os testes associando ZnP e PQ, foram conduzidos com

ponto quântico de CdTe-MSA, uma vez que este possui carga negativa do forma a produzir interação eletrostática com a zincoporfirina carregada positivamente. As amostras foram irradiada em intervalos de 1 minuto com LED de 420nm e 31mW. A avaliação da produção de oxigênio singlete pelo PQ sob irradiação foi realizada através da atenuação da densidade óptica em 440 nm, como consequência da degradação da solução de RNO na presença de L-Histidina, utilizando-se um espectrofotômetro modelo *Evolution 600 UV-vis*, fabricante Thermo scientific, utilizando o Software – visionpro. Os dados foram analisados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA *one way*) com valor de *p* menor que 0,01.

4.3.2. Detecção indireta de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelo método de oxidação do Nitrotetrazólio azul (NBT)

Um teste usado para a determinação de ROS, especialmente ânion superóxido é o conhecido teste de oxidação do Nitrotetrazólio azul (NBT). Este método utiliza o cloreto de tetrazólio azul (NBT-Sigma-Aldrich, 99%) e a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) (Sigma-Aldrich, 99%) como reagentes. Após adição do fotosensibilizador (PQs, ZnP ou PQ-ZnP), a absorção é medida em 580 nm. A avaliação da produção de ROS pelo FS após irradiação do sistema por LED a 32 mW e fonte de 420 nm (± 20), foi realizada por aumento da densidade óptica da solução final a 580 nm como consequência da oxidação da solução do NBT na presença do NADH. As amostras foram irradiadas por intervalos de 1 minuto. As quantidades de cada reagente e FS usados neste procedimento foram $80 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (NADH), 10 mmol.L^{-1} (NBT) e $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ do FS ou razão molar de PQ-ZnP de 0,12:1 a 1:1.

4.4. Ensaio de atividade fotodinâmica de PQs, ZnP e seus conjugados sobre microorganismos patogênicos

4.4.1. Avaliação qualitativa e quantitativa da ação fotodinâmica de PQ e ZnP em diferentes concentrações sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonenses*

Para realização deste experimento utilizou-se cultura padronizada de protozoário da espécie *Leishmania amazonenses* na forma promastigota (infectante) cultivados em meio 199 (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Cripion), e 1% de

antibiótico (penicilina/streptomicina). Utilizou-se como fotossensibilizadores os seguintes materiais: zincotetraetilpiridilporfirina (ZnP) nas concentrações 1, 10 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, diluídas em solução salina tamponada (PBS) com pH 7,4; nanopartículas de CdTe-CYS (concentrações 0,1, 1 e 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), também diluídas em PBS.

Alíquotas de 20 μL de suspensão dos parasitas foram repicadas em garrafas *roux* para cultivo das promastigotas, em fase metacíclica durante três dias. Após este tempo, todo o volume da suspensão parasitária das garrafas era centrifugado em tubos falcon no seguinte protocolo: 3600 rpm, 10 minutos, a 20° C. O pellet de parasitas era então ressuspensionado em 4 mL de PBS e, procedia-se contagem em Câmara de Neubauer para ajuste da concentração de parasitas de forma a obter aproximadamente 10^7 cel/mL. Após a determinação da concentração celular, foram realizados os experimentos de TFD nas seguintes condições: em microplacas de 96 poços adicionou-se 100 μL da suspensão parasitária ($\sim 1.10^7$ cel/mL), 100 μL do fotossensibilizador nas concentrações determinadas. Dessa forma o experimento seguiu o delineamento com os seguintes grupos: grupos não irradiados (controle sem fotossensibilizador e não irradiado, e grupos com fotossensibilizador não irradiado); grupos irradiados (controle sem fotossensibilizador e irradiado e grupos com fotossensibilizador irradiados com luz de LED), conforme detalhado no quadro 4.

Para os ensaios manteve-se um tempo de incubação do FS de 10 min antes de irradiar as amostras. O tempo de irradiação utilizado foi de 5 minutos em cada poço. Os experimentos foram realizados em triplicata. Como fonte de radiação foi utilizado LED 460 nm (± 20) com 160mW. Imediatamente após o término da irradiação as placas foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi desprezado. Realizou-se lavagem cuidadosa com PBS, posterior centrifugação e então adição de 20 μL de MTT [(5mg/mL) (Brometo de (3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazolium azul (Sigma®)]. Foi adicionado 180 μL de PBS homogeneizando o conteúdo. A placa foi então incubada por 3 horas em estufa a 37°C. Após a incubação, as placas foram centrifugadas como descrito anteriormente, o sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO-Sigma®) nos poços contendo as amostras, homogeneizando todo o conteúdo, para total diluição dos cristais de formazan formados. As absorbâncias das amostras foram obtidas a 570 nm em um leitor de microplacas (Labsystems Multiskan MS).

A determinação da atividade da desidrogenase mitocondrial foi baseada na redução do MTT. As células viáveis produzem cristais de formazan como produto de reação, indicando atividade metabólica. Todos esses procedimentos foram realizados para os grupos

não irradiados. Após os experimentos foi realizada comparação dos resultados de todos os grupos na ausência e presença de irradiação. As diferenças entre os grupos controle e grupos tratados com fotosensibilizadores foram medidas usando análise de variância (ANOVA *one-way*), e diferenças com valores de *p* menores do que 0,01 foram consideradas estatisticamente significantes. Os dados foram plotados como percentual em relação ao grupo controle. Após os experimentos foi realizada comparação dos resultados de todos os grupos na ausência e presença de radiação.

Quadro 4 – Composição dos grupos utilizados no ensaio de inibição fotodinâmica de formas promastigotas de *Leishmania amazonenses* usando como fotosensibilizadores ZnP e PQ (CdTe-CYS)

Grupos*	Código	Composição
Controle positivo	Controle	1.10 ⁷ parasitas/poço incubados com PBS
Controle negativo	Negativo	1.10 ⁷ parasitas/poço incubados com DMSO
ZnP 1 µmol.L ⁻¹	ZnP1	1.10 ⁷ parasitas/poço incubados com ZnP 1 µmol.L ⁻¹
ZnP 10 µmol.L ⁻¹	ZnP10	1.10 ⁷ parasitas/poço incubados com ZnP 10 µmol.L ⁻¹
ZnP 50 µmol.L ⁻¹	ZnP50	1.10 ⁷ parasitas/poço incubados com ZnP 50 µmol.L ⁻¹
PQ 0,1 µmol.L ⁻¹	PQ0,1	1.10 ⁷ parasitas/poço incubados com PQ 0,1 µmol.L ⁻¹
PQ 1 µmol.L ⁻¹	PQ1	1.10 ⁷ parasitas/poço incubados com PQ 1 µmol.L ⁻¹

Notas: controle positivo definido como 100% viabilidade celular; DMSO (dimetilsulfóxido) como controle negativo para obtenção de 100% de mortalidade (confirmação da especificidade do método). *Todos esses grupos foram submetidos a dois experimentos: na ausência de irradiação e na presença de irradiação com luz de LED.

4.4.2. Inativação fotodinâmica de *Staphylococcus aureus* utilizando ponto quânticos de CdTe e porfirinas como fotosensibilizadores

A cultura de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi colocada em meio BHI (*brain heart infusion*) e mantida a 37°C por 24 h, para obtenção de uma cultura microbiana na fase estacionária de crescimento. Depois realizou-se uma suspensão em salina tampão fosfato para obtenção de concentração de 10⁹ UFC/mL. Alíquotas de 180 µL da suspensão microbiana foi transferida para placas de 96 micropoços, seguido da adição de 20 µL de fotosensibilizador [PQ (CdTe-CYS ou CdTe-MSA) ou zincoporfirina (ZnP)]. A mistura foi homogeneizada e incubada por 10 minutos. A concentração de PQ utilizada foi de 100 nmol.L⁻¹ e a de

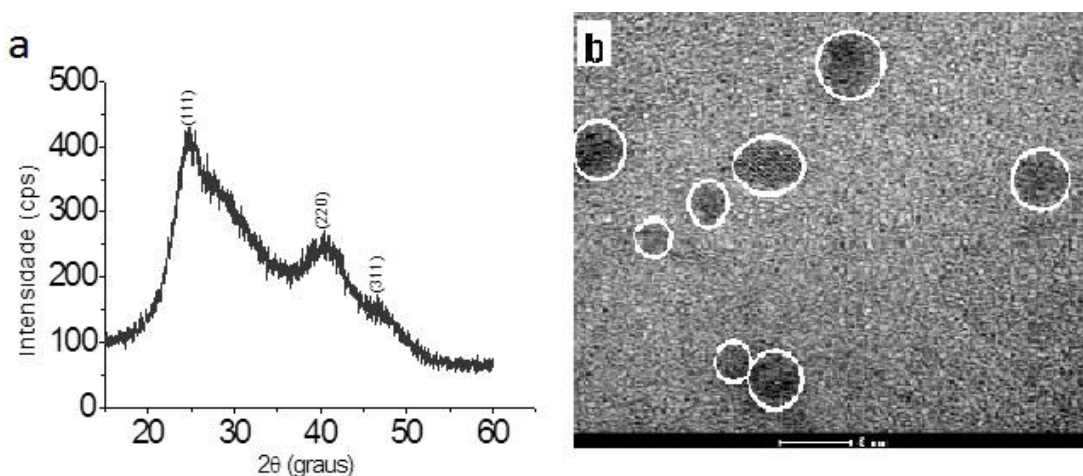
zincoporfirina (ZnP) foi de 5 e 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, definidas previamente com base em dados da literatura. Após o tempo de incubação as amostras foram submetidas à radiação usando LED azul com emissão em 460 nm (± 20 nm) com 150 mW.cm^{-2} por 9 minutos. Alguns grupos foram irradiados por tempos de 30 segundos, e 1, 3 e 6 minutos de acordo com a potência de inativação fotodinâmica do fotossensibilizador. Os experimentos foram conduzidos de forma que a luz em cada grupo irradiado não interferisse nos demais grupos testados. Os grupos controle negativos (sem fotossensibilizador) irradiados e não irradiados foram usados no ensaio. O resultado foi expresso como Log_{10} calculado a partir da quantidade de UFC usando método proposto por Jeff et al (1997). Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata. Os dados foram analisados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA one way) dos grupos tratados em relação ao grupo controle e valores de p menores que 0,01 foram considerados para fins de significância estatística.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização óptica e estrutural de PQs de CdTe e da Zincoporfirina

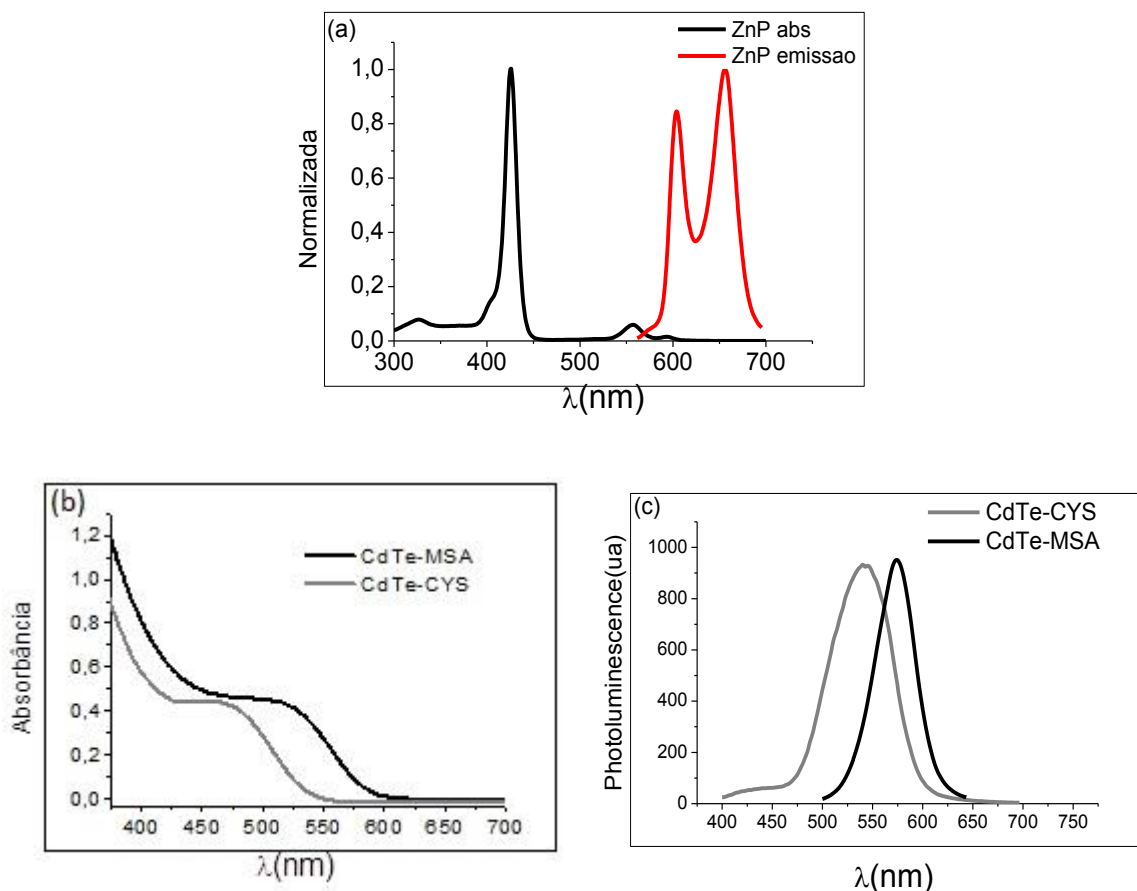
Todos os PQs sintetizados apresentaram aspecto límpido, sem precipitação e com manutenção de fluorescência por mais de 12 meses. Na caracterização física dos PQs através do difratograma da Figura 12a, verifica-se a presença de um alargamento das linhas correspondentes aos planos cristalinos, sugerindo que se trata de material de tamanho nanométrico (apresentando certo grau de amorfização). Utilizando dados do sistema de identificação da biblioteca cristalográfica *Joint Committee on Powder Diffraction Standards* (JCPDS, 2011), verificou-se que os picos mais intensos correspondem ao sistema cristalino do CdTe, do tipo estrutura cúbica tipo blenda de zinco, semelhantes aos difratogramas reportados na literatura para este nanocristal (GU et al, 2008; ROGACH et al, 2007). De acordo com o JCPDS, os picos localizados em 24,7; 39,0 e 46,6 graus (2θ) correspondem, respectivamente, aos planos (111), (220) e (311) do CdTe. Os resultados da microscopia eletrônica de transmissão (MET) para os nanocristais de CdTe, apresentados na Figura 12b, corroboram para confirmação das dimensões das nanopartículas. Pela aplicação da equação de Scherrer foi estimado o tamanho médio das partículas em $d=3,1$ nm. Esta estimativa foi corroborada pelas análises da microscopia de transmissão com partículas de dimensões entre 2 e 5 nm.

Figura 12. Caracterização estrutural dos PQs de CdTe. (a) Difratograma representativo de Raios-X de nanocristais de CdTe. (b) Microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas de CdTe, apresentando dimensões médias entre 2-5 nm (Escala de 5 nm), marcadas na figura.



Os espectros de absorção e emissão da Zincoporfirina está representada na Figura 13^a. O espectro de absorção da ZnP é característico de metaloporfirinas com uma banda de *Soret* em torno de 420 nm e bandas Q entre 560 e 590 nm (Benov et al, 2002) e o espectro e emissão com máximos em 596 e 657nm, semelhante ao da zincoporfirina metilada. (KALYANASUNDARAM, 1984). Os espectros de absorção e emissão dos PQs de CdTe-CYS e CdTe-MAS estão apresentados na Figura 13b e 13c. Os espectros de absorção dos pontos quânticos sintetizados, são característicos destes nanocristais (JHONSI & RENGANATHAN, 2010; FRASCO et al, 2010; SILVA et al, 2010, ROGACH et al, 2007) e permitiram verificar qualitativamente a homogeneidade de tamanho das partículas, além de estimar a dispersão de tamanho da nanopartícula. A caracterização óptica das mistura PQ-ZnP, bem como estudos de supressão da fluorescência deste conjugado estão descritos no artigo publicado na Molecules® (doi: 10.3390/molecules20058893) presente no anexo desta tese

Figura 13. Caracterização óptica de PQ de CdTe e ZnP. (a) Espectros de absorção e emissão de ZnP; (b) Espectros de absorção de CdTe-CYS e CdTe-MSA; (c) Espectros de emissão de CdTe-CYS e CdTe-MSA

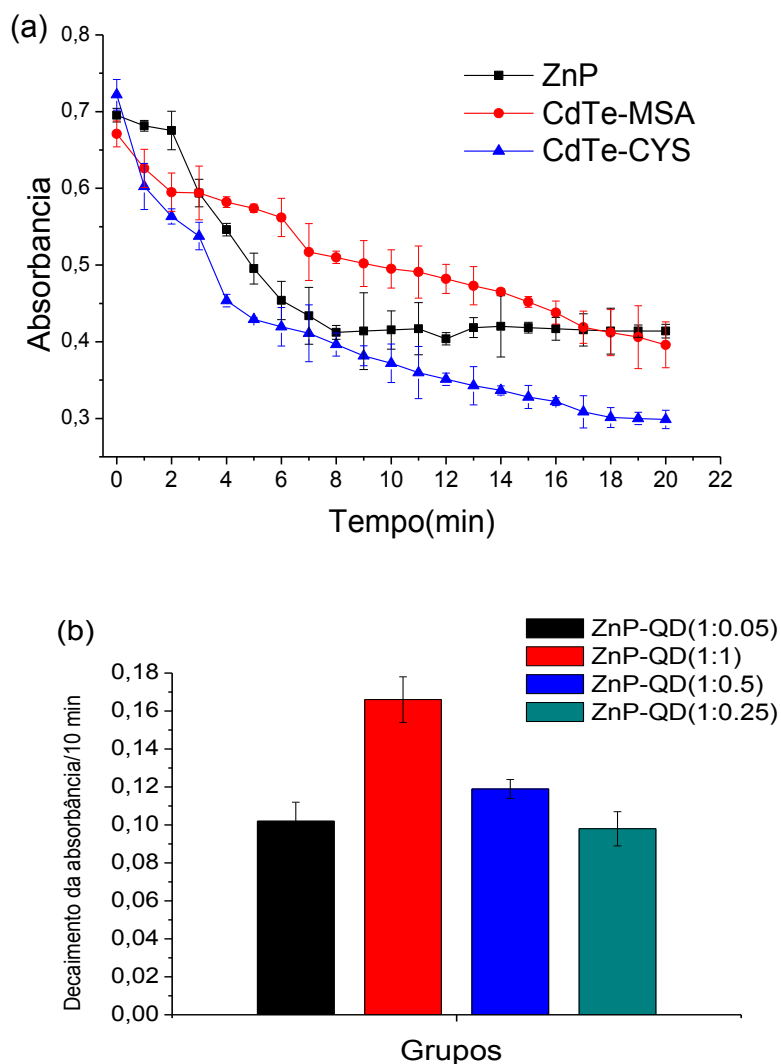


5.2. Produção de radicais livres por PQs, ZnP e seus conjugados

5.2.1. Detecção indireta de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelo método de RNO

Diferentemente das porfirinas, especialmente as zincoporfirinas, os ponto quânticos são amplamente utilizados como sondas para obtenção de imagens e marcação celular ou tecidual, mas pouco explorados em terapia fotodinâmica. Um dos mecanismos principais para avaliação do potencial para terapia fotodinâmica de fotosensibilizadores é a geração de oxigênio singleto, superóxido e outras espécies reativas de oxigênio (ROS). Os gráficos da Figura 14 apresentam a dinâmica da formação de espécies reativas de oxigênio pela irradiação de PQs livre [CdTe-CYS (carregado positivamente) e CdTe-MSA (carregado negativamente), ZnP livre e do conjugado PQ/ZnP (CdTe-MSA/ZnP), detectados indiretamente através da degradação do composto RNO na presença L-histidina. A degradação do RNO produz uma redução da densidade óptica deste composto em 440 nm indicando a presença de espécies reativas de oxigênio, especialmente oxigênio singleto (KRALJIC, 1986). Podemos observar que em todos os casos há uma produção de ROS evidenciada pela redução da densidade óptica da amostra em função do tempo de irradiação em minutos. Todas as amostras de PQs na concentração de $1\mu\text{mol.L}^{-1}$ testados evidenciaram produção de ROS, sendo a maior produção verificada com as nanopartículas de CdTe estabilizadas com cisteamina, cujo resultado é bem próximo do resultado obtido para o ZnP. Os resultados do teste de RNO para as amostras contendo conjugado ZnP/PQ em diferentes razões evidenciou uma produção de ROS mais efetiva quando do aumento da relação PQ/ZnP.

Figura 14. Redução da densidade óptica do RNO em função da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) por (a) Zincoporfirina, diferentes ponto quânticos de CdTe e b) Decaimento da densidade óptica de diferentes razões molares do conjugado ZnP-PQ (CdTe-MSA) após 20 minutos de irradiação com LED de 420 nm ($\pm$). A análise estatística mostrou que existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,01$). Os dados representam média dos grupos e seus respectivos desvios padrão ($n = 3$).

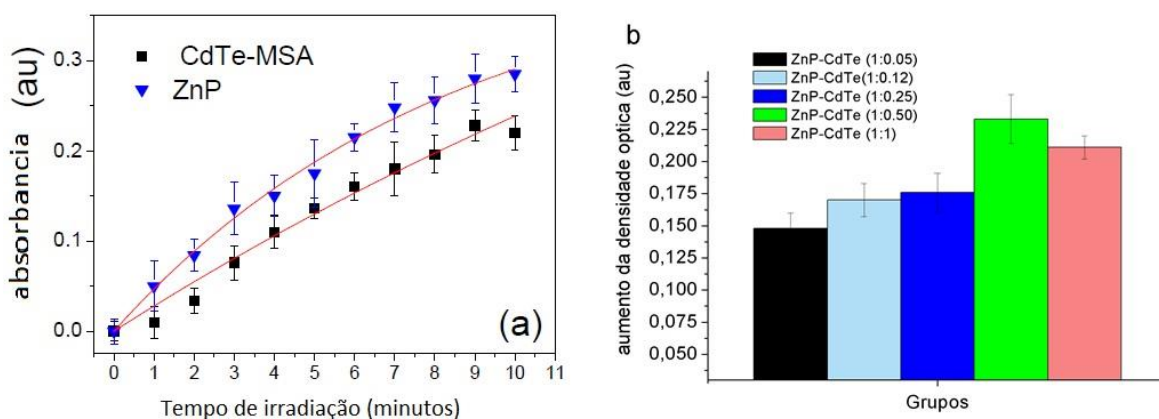


5.2.2. Detecção indireta de ROS por método de oxidação do NBT

Além do teste de RNO, um outro método utilizado para testar a eficiência na produção de ROS pelos fotosensibilizadores aqui sintetizados, foi através do método de oxidação do NBT na presença de NADH. A figura 15 mostra a dinâmica da formação de espécies reativas de oxigênio via irradiação dos fotosensibilizadores e evidenciado pelo aumento da densidade óptica do sistema. As amostras de PQs (apenas CdTe-MSA, devido ao melhor resultado em comparação ao CdTe-CYS, no teste de RNO) e ZnP foram testadas individualmente na geração de ROS (Figura 15a). Uma maior geração de ROS foi verificada utilizando a solução de ZnP, o que reforça os excelentes resultados deste tipo de composto -VIANA, O.S.

orgânico como fotosensibilizador, corroborando com informações da literatura sobre porfirinas catiônicas na geração de ROS (CORNÍK et al, 2009; Benov et al, 2011 e 2012), entretanto os pontos quânticos também produziram ROS, entretanto de forma menos eficiente do que o ZnP. Após a verificação da produção de ROS pelos fotosensibilizadores individualmente, iniciamos os testes com o conjugado de nanopartículas e a zincoporfirina. A comparação entre as taxas de geração de ROS após 10 minutos de irradiação entre as diferentes frações molares do conjugado PQ-ZnP está demonstrado na figura 15b. O valor do aumento de cada densidade óptica dos conjugados foi calculado matematicamente pela diferença da densidade óptica da amostra (mistura PQ-ZnP + NBT + NADH) antes e após 10 minutos de irradiação. Verificamos que o aumento da fração molar do PQ em relação ao ZnP provocou um aumento de ROS até a proporção máxima de 1:0,5 (ZnP-PQ). Estes resultados demonstram o potencial de PQ, ZnP e seus conjugados na geração de espécies reativas de oxigênio.

Figura 15. Detecção indireta de geração de ROS monitorado pelo aumento da densidade óptica (OD) a 580 nm. (a) Geração de ROS após irradiação de ZnP e CdTe-MSA e (b) geração de ROS após irradiação por 10 minutos das misturas contendo diferentes proporções de ZnP e PQ CdTe-MSA. Análise de variância (ANOVA) mostrou que as diferenças entre as várias frações molares do conjugado PQ-ZnP foram significativas ($p < 0,01$).



5.3. Ensaios de atividade fotodinâmica de PQs, ZnP e seus conjugados sobre microorganismos patogênicos

5.3.1. Ensaio de terapia fotodinâmica e interação de nanopartículas luminescentes (ponto quânticos) e zincoporfirina sobre *Leishmania amazonenses*

Os estudos utilizando protozoários como é o caso de parasitas do gênero *Leishmania*, necessitam preparação adequada em função da sensibilidade do parasita. Culturas padronizadas e isentas de contaminação microbiana são fundamentais para obtenção de -VIANA, O.S.

resultados confiáveis e reprodutíveis. Desta forma houve necessidade da condução dos experimentos em ambiente controlados e sob condições assépticas. Os resultados do efeito fotodinâmico de PQs e ZnP sobre cultura de formas promastigotas de *Leishmania amazonenses* estão apresentados na Figura 16. Podemos observar a não toxicidade dos fotosensibilizadores utilizados nos ensaios realizados no escuro (sem irradiação). Nos grupos submetidos à irradiação com LED 460 nm, observou-se redução significativa da viabilidade celular dos parasitas. Nos resultados de viabilidade dos grupos não irradiados (Figura 16a). Verifica-se que todos apresentaram uma excelente viabilidade, o que é esperado para um bom fotosensibilizador quando não fotoativado. Alguns grupos testados (ZnP1 e ZnP10) até melhoraram a viabilidade em relação ao grupo controle mostrando a baixa citotoxicidade no escuro, o que também foi confirmado pela microscopia dos parasitas. Observa-se que, no escuro, em todos os casos a viabilidade celular foi maior que 90% e nos grupos Zp 1 e 10 μM e PQ 0,1 e 1 μM , a viabilidade foi até maior que a do grupo controle. Apesar da diferença estatisticamente significativa entre os grupos no escuro em relação ao grupo controle, estes resultados estão dentro do esperado para bons fotosensibilizadores, com viabilidade maior do que 90% em todos os grupos.

Em relação aos grupos irradiados (Figura 16b) a inativação fotodinâmica foi evidente em praticamente todos os grupos de fotosensibilizadores irradiados, e a análise de variância mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação ao grupo controle ($p < 0,01$), excetuando-se os grupos de PQs de 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. A redução da atividade enzimática em termos aqui expressados como viabilidade celular foram menores que 30% para todos os grupos de fotosensibilizadores à base de ZnP (concentrações entre 1 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Apesar de uma redução da viabilidade menor do que a observada utilizando ZnP como FS, a redução de viabilidade celular para 66% utilizando PQ 100 nmol.L^{-1} desperta interesse para uso dessas nanopartículas em TFD, uma vez não foram encontrados trabalhos na literatura referenciando aplicação de ponto quânticos como fotosensibilizadores em TFD antiparasitária, mais especificamente contra protozoários do gênero *Leishmania*. A Figura 17 apresenta a microscopia de formas promastigotas antes e após TFD utilizando ZnP como fotosensibilizador, mostrando uma redução da população de parasitas por inativação fotodinâmica, e reforçando o potencial deste FS contra este tipo de parasita.

Figura 16: Viabilidade celular de suspensão de cultura de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*: a) grupos não irradiados; b) grupos contendo fotossensibilizadores [ZnP e PQ (CdTE-CYS)] e submetidos à irradiação de LED 460 nm(± 20) e 160 mV por 5 minutos. A análise de variância mostrou que as diferenças entre os grupos com fotossensibilizadores irradiados foram significantes em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). Os dados são expressos como média e desvio padrão ($n=3$).

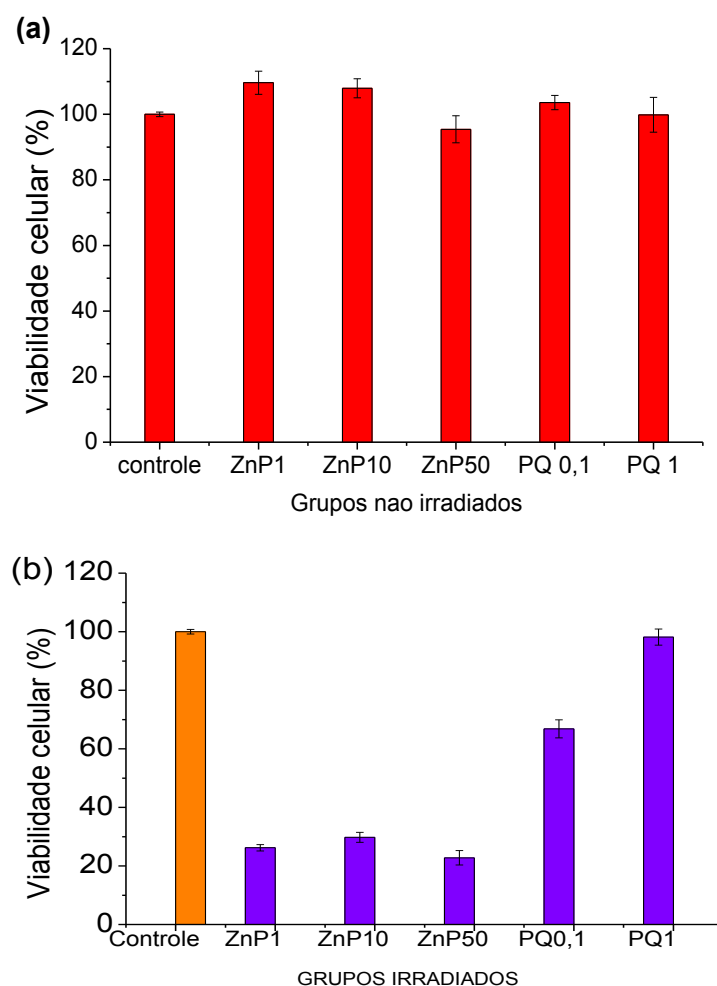
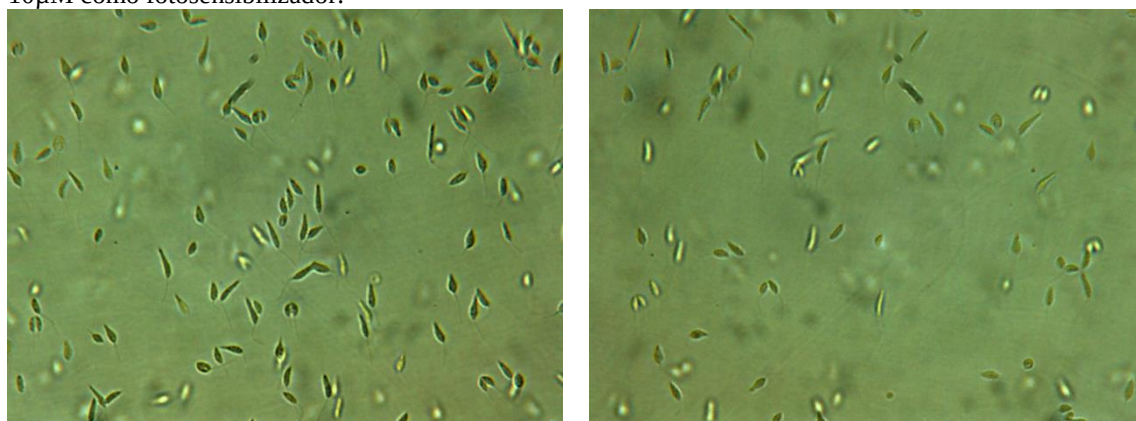


Figura 17: Microscopia da cultura de *Leishmania amazonensis*: a) antes do ensaio fotodinâmico utilizando ZnP 10 μ M como fotossensibilizador; b) após ensaio fotodinâmico utilizando zincoporfirina 10 μ M como fotossensibilizador.



A utilização de novos fotosensibilizadores contra parasitas do gênero *Leishmania* associados à TFD tem mostrado bons resultados. Silva et al (2015) investigaram a fotoatividade de quatro zincoftalocianinas (PcZns) em células de macrófagos murinos infectados com *Leishmania 61mazonenses* ou *Leishmania braziliensis*. Usaram concentrações entre 1 a 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, mostrando que os PcZns exibiram elevada fotoatividade, entretanto os efeitos foram observados tanto para macrófagos infectados e não infectados, sendo mais intensos no primeiro grupo. Pinto et al (2011), obtiveram bons resultados na inativação fotodinâmica de *Leishmania major* e *L. braziliensis*, utilizando outras ftalocianina também na concentração de 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. O uso de PQs em TFD tem sido testado para inibição de alguns microorganismos (Ristic, 2014; Narbando ET AL, 2008), mas não em *Leishmania*.

Já o uso de porfirinas fotoativadas contra *Leishmania* também tem apresentado bons resultados. Gardner et al (2010) obtiveram resultados promissores usando TFD em combinação com acenaftoporfirinas com lipossomas para o tratamento da leishmaniose. Estes autores verificaram por microscopia confocal que os lipossomas transportaram as porfirinas para o interior de formas promastigotas de *Leishmania tarentolae*, e que este mesmo sistema lipossoma-porfirina foi efetivo na inativação fotodinâmica de formas intracelulares de amastigotas de *Leishmania panamensis* em macrófagos (extraídos de líquido peritoneal de Hamster). Já Boyle e colaboradores verificaram a amazonense de fotossensibilizadores catiônicos para fotoativação de bactérias *gram-positivas* e *gram-negativas* e utilizaram este mesmo princípio na inativação fotodinâmica de espécies de *Leishmania*. O caráter negativo das membranas celulares de *Leishmania spp.* Levou à investigação de uma pequena série de fotossensibilizadores catiônicos como potenciais agentes leishmanicidas (BRISTOL et al, 2006)

Gardlo e colaboradores (2003) testaram quatro porfirinas catiônicas combinadas com terapia fotodinâmica, mostrando que essas moléculas após irradiação foram eficazes na inativação de formas promastigotas de *Leishmania major*. Uma comparação entre o uso dessas porfirinas em TFD e de sulfato de paromomicina mostrou uma melhor resposta terapêutica com a terapia fotodinâmica, baixo risco de toxicidade, com a ocorrência apenas de uma pequena reação local inflamatória.

O uso de fotosensibilizadores pode ser de grande importância para inativação fotodinâmica de formas parasitárias presentes nas lesões características de leishmaniose cutânea e muco-cutânea. Essas lesões são crônicas e atualmente de difícil tratamento devido à

resistência adquirida pelos parasitas. A leishmaniose cutânea é produzida por múltiplas espécies de *Leishmania*, incluindo a *L. amazonensis*, produzindo inicialmente uma pápula que evolui para um nódulo e úlcera em 1 a 3 meses. A busca de terapias alternativas, além daquelas com quimioterápicos convencionais são recomendadas reduzindo o risco produção de lesões disseminadas (MURRAY, 2005). Segundo Kosaka e colaboradores (2007), a carga positiva das porfirinas facilita a internalização pelo parasita, e que outras substâncias carregadas positivamente poderiam ser extremamente eficazes para leishmaniose cutânea. Isso também poderia justificar nossa escolha do ponto quântico de CdTe-CYS (carregado positivamente) em detrimento do PQ-CdTe-MSA, nos ensaios com *Leishmania*. Entretanto a penetração do PQ, mesmo com carga positiva, pode ter uma limitação maior do que a que ocorre com as porfirinas. Talvez isso também justifique o maior efeito fotodinâmico da zincoporfirina aqui testada sobre sobre este parasita do que os PQs usados nas condições empregadas em nosso estudo. Santos e colaboradores (2006) obteve marcação de formas promastigotas de *Leishmania amazonenses* usando PQ de CdS funcionalizados com polifosfato e ou glutaraldeído, conseguindo distinguir organelas, mostrando que estas nanopartículas são facilmente internalizadas pelo parasita. Outros estudos também indicam fortemente a possibilidade de absorção de PQs via endocitose por parasitas do gênero epimastigota. (FEDER et al 2009; CHAVES et al, 2008)

Entretanto, apesar de alguns autores relatarem que os mecanismos de morte da *Leishmania* está relacionado diretamente a formação de espécies reativas de oxigênio e que estes parasitas podem apresentar mecanismo de resistência contra estas substâncias pela produção de agentes redutores (BATISTA & WAINWRIGHT, 2011), o mecanismo de efeito de TFD contra *Leishmania* intracelular ainda não está bem estabelecido. Atualmente, mesmo com as drogas antiparasitárias comercialmente disponíveis verifica-se que os casos de Leishmaniose não tem diminuído, uma vez que o agente etiológico que causa a Leishmaniose tem adquirido resistência aos medicamentos comumente descritos (MOREIRA et al, 2011), o que reforça importância de novos estudos com terapias não convencionais como a TFD e a busca de novos fotosensibilizadores eficazes.

Os resultados aqui apresentados demonstram o potencial de ZnP e PQs como fotosensibilizadores, com ZnP apresentado maior eficiência nas concentrações testadas. Ensaios futuros poderão ser realizados com concentrações menores que 100 nM e com diferentes tipos de ponto quânticos, e com outros tempos de irradiação. Estudos associando PQs e ZnP também poderão ser conduzidos para avaliação da potencialização dos efeitos

fotodinâmicos dos dois FS sobre cultura de *Leishmania* de forma a melhorar o entendimento do mecanismo de morte celular desses parasitas a nível intracelular e a potência fotodinâmica desses compostos. A aplicação de TFD não requer equipamentos tecnologicamente muito avançados ou caros o que possibilita boas perspectivas para a exploração desta técnica para uso em leishmaniose tegumentar e a cutânea, principalmente no tratamento de lesões crônicas e nas lesões características desta infecção.

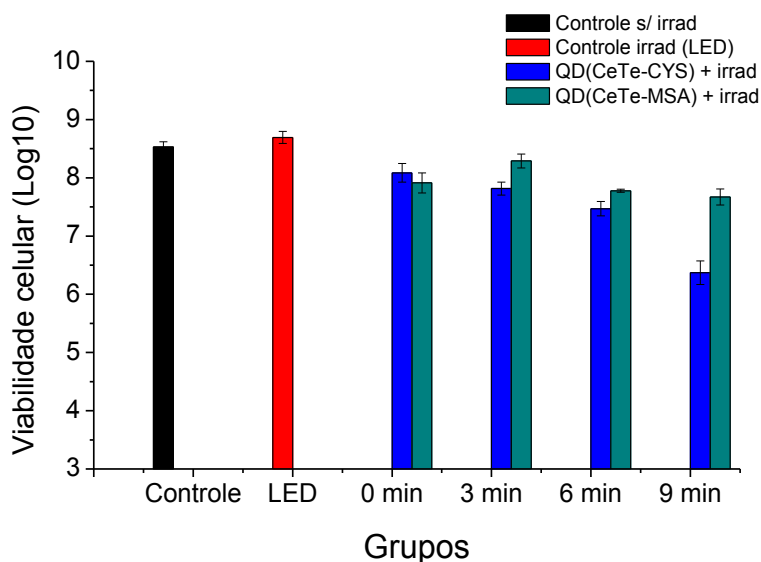
5.3.2. Inativação fotodinâmica de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* por PQ, ZnP e seus conjugados

A descrição dos efeitos fotodinâmicos de PQ, ZnP e seus conjugados sobre *Candida albicans* está descrito na artigo presente nos apêndices desta tese (VIANA et al, 2015 – Molecules doi: 10.3390/molecules20058893).

A morte da célula bacteriana via TFD pode ser provocada por danos ao DNA, desestabilização de membrana bacteriana, inativação dos sistemas de transporte de membrana, alterações de proteína de membrana ou distúrbios na síntese de parede celular. Segundo Maisch (2009) substâncias fotosensibilizadoras como porfirinas induzem efeito fotodinâmico sobre bactérias gram negativas e gram positivas, entretanto a eficácia varia em função das diferenças morfológicas entre essas duas classes de bactérias. Os resultados da inativação fotodinâmica de *S aureus* aqui obtidos mostraram efeito da morte celular induzidos por PQs e ZnP como fotosensibilizadores (FS), após irradiação com LED azul. A figura 18 mostra os efeitos fotodinâmicos de PQ de CdTe-MSA e de CdTe-CYS após diferentes tempos de irradiação. Observamos que, na concentração de PQ aqui utilizada, houve uma redução da viabilidade celular mesmo na ausência de irradiação. Entretanto, apesar da análise de variância demonstrar diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) entre os grupos não irradiados (0 min) e o grupo controle, comumente este efeito é pouco relevante em bacteriologia, uma vez que a redução efetiva de viabilidade celular foi menor que uma unidade de Log10. Entre os grupos tratados com os PQs e o grupo controle, apenas o grupo contendo CdTe-CYS apresentou um resultado mais relevante com redução próxima de duas unidades logarítmicas no tempo 9 minutos (barra azul). A análise estatística mostra diferença

significativa entre todos os grupos tratados em relação ao grupo controle, entretanto isso foi mais evidente com o PQ CdTe-CYS em relação ao PQ-CdTe-MSA.

Figura 18. Avaliação da inativação fotodinâmica de cultura de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 por CdTe-CYS em diversos tempos de irradiação. A viabilidade celular é expressa pela redução do Log₁₀ após adição do PQ e irradiação com LED 460 nm (± 20), 150 mW.cm⁻².



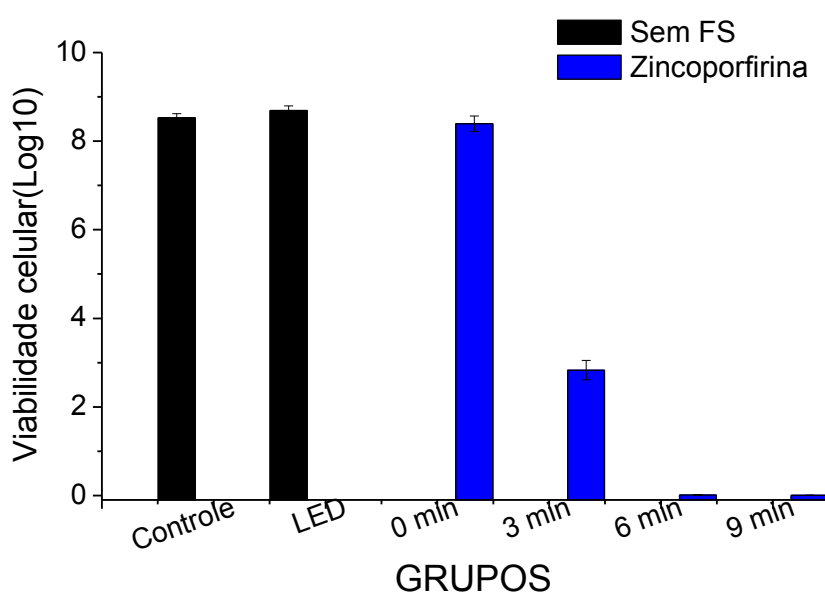
Poucos trabalhos na literatura descrevem atividade fotodinâmica de ponto quânticos sobre sistemas biológicos. Entre eles está o de Narband e colaboradores (2008), que utilizaram ponto quânticos de CdSe/ZnS para intensificar a inativação fotodinâmica de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus pyogenes* por azul de toluidina como fotosensibilizador. Segundo os autores a morte de *S aureus* foi aumentado na ordem de 1,72 unidades de Log₁₀ e a morte de *S pyogenes* foi elevada em 1,55 unidades de Log₁₀ quando o ponto quântico foi adicionado e associada ao efeito de FTD, resultado bem próximo ao encontrado aqui com o grupo PQ-CdTe-CYS 9 minutos. Ristic et al (2014), verificaram a eficiência de ponto quânticos de grafeno na inativação fotodinâmica de *Escherichia coli* e *S aureus* resistente à metilicina. Neste estudo os autores utilizaram LED azul (470nm, 1W), tempos de radiação de 5 a 15 minutos, concentrações de PQs (50, 100 e 200 µg/mL) e verificaram o dano da membrana e parede celular por microscopia de força atômica e o estresse oxidativo foi avaliado por marcador fluorescente específico. Talvez os efeitos fotodinâmicos utilizando PQs como fotosensibilizadores possam ser melhorados por modificações na superfície ou melhorando a absorção desses ao nível celular. O processo de internalização de ponto quânticos por organismos procariontes ainda não foi bem entendido.

-VIANA, O.S.

Naturalmente a internalização de PQs por endocitose é um processo específico de organismos eucariontes. Demchick e Koch (1996) e Dabbousi et al (1997), sugeriram alguns mecanismos possíveis pelos quais os nanocristais possam penetrar através da parede celular de células procariotas: difusão não específica; danos à membrana celular e absorção específica mediada por receptores de superfície celular.

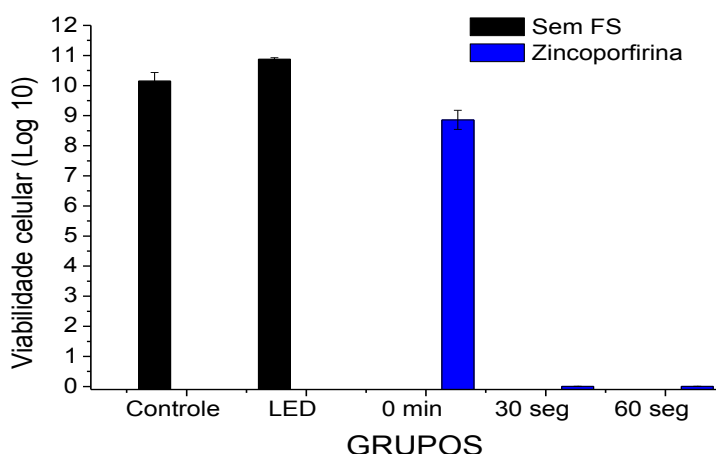
Diferentemente dos ponto quânticos que possuem em geral dimensões entre 3 e 10 nm, as porfirinas possuem dimensões menores que 0,05 nm, o que possibilita uma maior facilidade de penetração via endocitose e outros mecanismos o que é uma vantagem para uso em TFD. A figura 19 apresenta os resultados da inativação fotodinâmica de *S aureus* por zincoporfirina. Os resultados do grupo tratados e não irradiados (0 min) não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle. Entretanto um intenso efeito de inibição fotodinâmica de *S aureus* foi observado nos grupos contendo ZnP e fotoestimulados. A mortalidade desta bactéria foi maior que 4 unidades de Log_{10} em todos os casos e no caso da Zincoporfirina após 6 minutos de irradiação uma redução de viabilidade microbiana de mais de 8 unidades de Log_{10} foi verificado. A análise de variância mostrou uma diferença bastante significativa entre todos os grupos tratados e irradiados e o grupo controle ($p < 0,01$).

Figura 19. Avaliação comparativa da inativação fotodinâmica de cultura de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 por zincoporfirina nas concentrações de 10 μM . A viabilidade celular é expressa pela redução do Log_{10} , comparando os grupos tratados e não tratados na ausência e na presença de radiação com LED 460 nm (± 20), 150 mW.cm^{-2} por 3, 6 e 9 minutos.



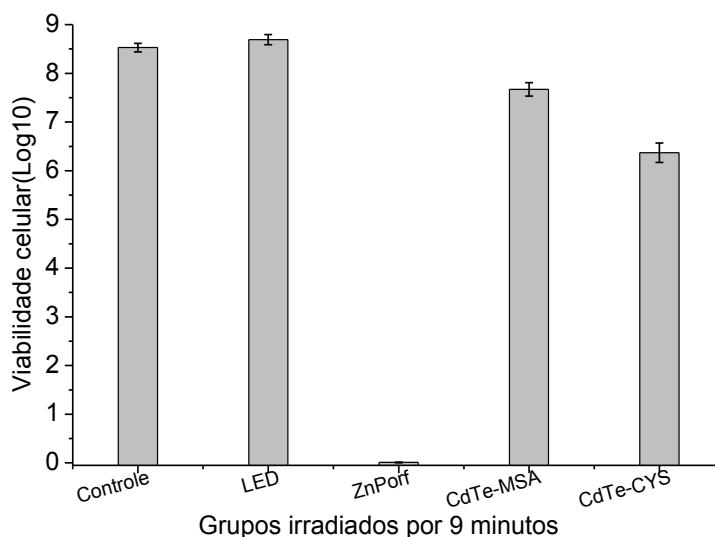
Devido ao intenso efeito inibitório no crescimento microbiano desta bactéria, realizou-se outro experimento com tempos de irradiação ainda menores (figura 20) e com concentrações na ordem de 5 μ M. Verificou-se que o efeito de inativação fotodinâmica de *S aureus* pelas porfirinas nestas condições continuou bastante elevado com apenas 30 segundos de irradiação, com redução de mais de 8 unidades de Log₁₀, o que representa um potencial muito interessante para um fotosensibilizador. A diluição do sistema produziu um efeito fotodinâmico ainda mais positivo na inativação do crescimento desta bactéria, o que pode ser justificado pelo aumento do rendimento quântico em função da redução da densidade óptica da amostra.. São resultados bastante relevantes e que confirmam o potencial dessa porfirina para TFD antimicrobiano. Segundo Malik et al (1990), a carga positiva destas porfirinas possibilita uma penetração mais eficaz tanto em bactérias gram-negativas como em bactérias gram-positivas. Gois et al (2010), avaliou a susceptibilidade de *Staphylococcus aureus* frente à porfirinas. Estes autores verificaram a inibição fotodinâmica desta bactéria por porfirina sintética (Photogem®). Os resultados demonstraram 100% de bactérias eliminadas após exposição de 60 J/cm² com luz de LED (628 nm e 14,6 mW/cm²), em diferentes concentrações (12, 25 e 50 μ /mL), o que representa uma concentração maior que 100 vezes a que foi utilizada em nosso estudo. Outros trabalhos trazem porfirinas com redução microbiana menores que 6 unidades de Log10 e em tempos de irradiação que variam entre 30 e 60 minutos (Hanakova et al, 2014; Gonzales et al, 2013, Rossi et al 2012), resultados menores dos que foram aqui encontrados para a ZnP em estudo com tempo menor que 1 minuto.

Figura 20. Avaliação comparativa da inativação fotodinâmica de cultura de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 por zincoporfirina na concentração de 5 μ M. A viabilidade celular é expressa pela redução do Log₁₀, comparando os grupos tratados e não tratados na ausência e presença de radiação com LED 460 nm ($\pm$ 20), 150 mW.cm⁻².



A figura 21 ilustra os resultados comparativos do efeito fotodinâmico sobre culturas de *S aureus* por CdTe-MSA, CdTe-CYS e ZnP sob as mesmas condições de irradiação. Nesta figura podemos perceber melhor a potência fotodinâmica das porfirinas em relação aos ponto quânticos, nas concentrações utilizadas neste experimento. Outras variações podem ser posteriormente testadas, como outros tipos de ponto quânticos, diferentes concentrações e associação entre PQs e porfirinas. Os resultados são promissores e abrem perspectivas desses compostos para fotosensibilizadores em TFD.

Figura 21. Avaliação comparativa da inativação fotodinâmica de cultura de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 por ZnP e PQs após 9 minutos de irradiação com LED 460 nm (± 20), 150 mW.cm⁻². A viabilidade celular é expressa pela redução do Log₁₀ após adição do fotosensibilizador (CdTe-MSA ou CdTe-CYS 100 nM; ZnP 10 μ M.). Os resultados são comparados com o grupo controle não irradiado e sem adição de FS.



6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- Os ponto quânticos de CdTe sintetizados foram caracterizados e apresentaram-se mais estáveis com manutenção de fluorescência por mais de 12 meses após a data da síntese;
- Todas as misturas de ponto quânticos de CdTe e zincoporfirina apresentaram-se estáveis, límpidas e com ausência de precipitação;
- Todos os PQs de CdTe testados induziram a produção de espécies reativas de oxigênio através dos testes de detecção indireta;
- Os pontos quânticos utilizados e a zincoporfirina não produziram citotoxicidade no escuro para todos sistemas celulares aqui testados e nas concentrações dos fotosensibilizadores estudados, nos ensaios de Terapia fotodinâmica;
- A inativação fotodinâmica de cultura de *Staphylococcus aureus* foi verificada utilizando PQ CdTe-MSA e CdTe-CYS, sendo mais evidente o efeito produzido pelos PQs catiônicos.
- O ZnP na concentração de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ produziu um efeito fotodinâmico bastante intenso com redução de viabilidade de *S aureus* na ordem de mais de 8 unidades de Log10 com apenas 30 segundos de irradiação com LED azul.
- Foi verificado efeito de inativação fotodinâmica de *Leishmania amazonensis* maior que 30% por PQ em torno de 70% por ZnP, após 5 minutos de irradiação.
- Os resultados mostram potencial para uso de pontos quânticos de semicondutores e da zincoporfirina em terapia fotodinâmica entretanto, nas condições e concentrações aqui utilizadas, a porfirina estudada mostrou em efeito fotodinâmica maior para uso em TFD antimicrobiana. Os pontos quânticos que já tem seu uso em marcação bastante evidenciado poderão ser melhorados através de modificação de superfície ou conjugação com outros fotosensibilizadores para melhorar a efetividade fotodinâmica dos PQs e para uma possível obtenção de nanomateriais para aplicação simultânea em diagnóstico e terapêutica.

Como perspectivas:

- Obtenção de *Ponto quânticos* de Seleneto de zinco (ZnSe) para ensaios de terapia fotodinâmica, uma vez que zinco e selênio são elementos constituintes dos meios fisiológicos, apresentando um menor potencial de toxicidade para célula;
- Realizar novos ensaios de terapia fotodinâmica envolvendo outras cepas de *Staphylococcus aureus* com outros tipos de PQs em diferentes concentrações, livres e associados a diferentes porfirinas, verificando a potencialização do efeito fotodinâmico sobre este e outros tipos de bactérias;
- Testar outros tipos de PQs em diferentes concentrações, livres e associados a diferentes porfirinas, verificando a potencialização fotodinâmica contra culturas do gênero *Leishmania*;
- Aprofundar o estudo fotofísico da interação pontos quânticos e zincoporfirina.

REFERÊNCIAS

- ALIVISATOS, A. P.; GU, W.; LARABELL, C. *Quantum dots* as cellular probes. **Annu. Rev. Biomed. Eng.** v.7, p.55–76, 2005.
- AL-MUTAIRI, D.A.; CRAIK, J.D.; BATINIĆ-HARBELE, I.; BENOVA, L.T. Inactivation of metabolic enzymes by photo-treatment with zinc meta Nmethylpyridylporphyrin. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1770, p.1520-1527, 2007.
- ANAS A, AKITA H, HARASHIMA H, ITOH T, ISHIKAWA M, BIJU V. Photosensitized breakage and damage of DNA by CdSe–ZnS ponto quânticos. **Journal Physical-Chemistry B**, v.112, p.10005–11, 2008.
- ANDRADE, C.G.; FILHO, P.E.C.; TENÓRIO, D.P.L.; SANTOS, B.S.; BELTRÃO, E.I.C.; FONTES, A.; CARVALHO JR.; L.B.C. Evaluation of glycophenotype in breast cancer by quantum dot-lectin histochemistry. **Int J Nanomedicine**, v.8, p.4623-4629, 2013.
- ASHFORD, RW. The Leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.1269-1281, 2000.
- ASILIAN, A.; DAVAMI, M. Comparison between the efficacy of photodynamic therapy and topical paromomycin in the treatment of Old World cutaneous leishmaniasis: a placebo-controlled, randomized clinical trial. **Clinical Experiences Dermatology**, v.31, n.5, p.634-637, 2006.
- ASTELBAUER, F.; WALOCHNIK. J. Antiprotozoal compounds: state of the art and new developments **International Journal Antimicrobials Agents**, v.38, 118p, 2011.
- BAGALKOT, V.; ZHANG, L.; LEVY-NISSENBAUM, E.; JON, S.; KANTOFF, PW.; LANGER, R. et al. Quantum dotaptamer conjugates for synchronous cancer imaging, therapy, and sensing of drug delivery based on bio-fluorescence resonance energy transfer. **Nano Letters**; v.7, p.3065–70, 2007.
- BAKALOVA, R.; ZHELEV, Z.; KOKURYO, D.; SPASOV, L.; AOKI, I.; SAGA, T. Chemical nature and strcture of organic coating of quantum dots is crucial for their application in imaging diagnostics. **International Journal of Nanomedicine**, n.6, p.1717-1732, 2011.
- BALLOU, B. Quantum dot surfaces for use in vivo and in vitro, **Curr.Top. Dev. Biol**, v.70, p. 103–120, 2005.
- BÁNYAI, L.; KOCH, S. W., “**Semiconductor Quantum dots**”, 1ed., London, World Scientific Publishing Co.Pte.Ltd., London, 1993, 930p.

BARTANIC-HABERLE, I.; REBOUÇAS, J.S.; SPASOJEVIC, I. Superoxide dismutase mimics: chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. **Antioxidant & redox signaling**, v. 13, n.6, p.877-899, 2008.

BASTOS, M.M.; BOECHAT, N.; GOMES, A.T.C.; NEVES, M.G.P. M. S.; CAVALEIRO, J.A.S. O Uso de Porfirinas em Terapia Fotodinâmica no Tratamento da Leishmaniose Cutânea. **Rev. virtual quim**, v.4, n. 3, p.257-267, 2012

BATINIC-HABERLE, I.; REBOUÇAS, J.S.; SPAJOSEVIC, I. Superoxide Dismutase Mimics: chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. **Antioxidants & Redox signaling**, v.13, n.6, 2010. DOI: 10.1089/ars.2009.2876

BATISTA, M.S.; WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) for the treatment of malaria, leishmaniasis and trypanosomiasis. **Braz J Med Biol Res**, n.44, p.1–10, 2011. DOI:10.1590/S0100-879X2010007500141

BEGA, P. C. **Síntese e caracterização de nova porfirina meso tetrakis(4-butoxi-3-metoxifenil)porfirina, e seus derivados metalados**. 2008, 59 f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná.

BENEDITO, F. L.; NAKAGAKI, S.; SACZK, A. A.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; COSTA, C. M. M., Study of metalloporphyrin covalently bound to silica as catalyst in the ortho-dianisidine oxidation, **Appl. Cat. A:General**, v.250, p.1-11, 2003.

BENOV, L.; BATINIĆ-HABERLE, I.; SPASOJEVIĆ, I.; FRIDOVICH, I. Isomeric N-alkylpyridylporphyrins and their Zn(II) complexes: inactive as SOD mimics but powerful photosensitizers. **Arch Biochem Biophys**, v.402, p.159-165, 2002.

BENOV, L.; CRAICK, J.; BATINIC-HABERLE, I. Protein damage by photo-activated Zn(II) N-aldylpyridylporphyrins. **Amino Acids**, v.42, p.117-128, 2012.

BENOV, L.; CRAICK, J.; BATINIC-HABERLE, I. The potential of Zn(II)N-aldylpyridylporphyrins for anticancer therapy. **Anticancer Agent ME**, v.11, p.233-241, 2011.

BERMAN, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. **Rev. Infect. Dis.**, v.10, p.560, 1988.

BIJU V, ITOH T, ANAS A, SUJITH A, ISHIKAWA M. Semiconductor quantum dots and metal nanoparticles: syntheses, optical properties, and biological applications. **Anal Bioanal Chem**, v.391, p.2469–95, 2010.

BRIONES, E.; COLINO, C.I.; LANA O, J.M. Delivery systems to increase the selectivity of antibiotics in phagocytic cells. **Journal of control release**, v. 125.; p.210-225; 2008.

BRISTOW, C.A.; HUDSON, R.; PAGET, T.A.; BOYLE, R.W. Potential of cationic

-VIANA, O.S.

porphyrins for treatment of cutaneous Leishmaniasis. **Photodiagnostic and Photodynamic Therapy**, v.3, :p.162-7, 2006.

BRUCHEZ M JR; MORONNE, M.; GIN, P.; WEISS, S.; ALIVISATOS, A.P. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. **Science**, v.281, p. 2013–2016, 1998.

CAMINOS, D.A.; SPESIA, M.B.; PONS, P. AND DURANTINI, E.N. Mechanisms of *Escherichia coli* photodynamic inactivation by an amphiphilic tricationic porphyrin and 5,10,15,20-tetra(4-N,N,N-trimethylammoniumphenyl)porphyrin, **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.7, n.1071, 2008.

CARVALHO, C.M.B.; TOME, J.P.C.; FAUSTINO, M.A.F.; NEVES, M.G.P.M.S.; TOME, A.C.; CAVALEIRO, J.A.S.; COSTA, L.; ALVES, E.; OLIVEIRA, A.; CUNHA, A. and ALMEIDA, A. Antimicrobial photodynamic activity of porphyrin derivatives: potential application on medical and water disinfection, **J. Porphyrins Phthalocyanines**, v.13, p.574, 2009.

CASTANO A.P.; DEMIDOVA T.N.; HAMBLIN MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiag. PhotodynTher.**, v.1, p.279-293, 2004.

CHAN, W.C.W.; NIE, S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection, **Science**, v.281, p.2016–2018, 1998.

CHAVES, C.R.; FONTES, A.; FARIAS, P.M.A.; SANTOS, B.S.; MENEZES, F.D.; FERREIRA, R.; CESAR, C.L.; GALEMBECK, A.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q. Application of core-shell pegylated CdS/Cd(OH)₂ ponto quânticos as biolabels of *Trypanosoma cruzi* parasites. **Appl. Surf. Sci.**, v.255, p.728-730, 2008.

CHEN, J.Y.; LEE, Y-M.; ZHAO, D.; MAK, N.K.; WONG, R.N. Ponto quântico-mediated photoproduction of reactive oxygen species for cancer cell annihilation. **Photochemistry and photobiology**, v.86, p.431-437, 2010.

CHOI, A.O.; CHO, S.J.; DESBARATS, J.; LOVRIC, J.; MAYSINGER, D. Quantum dot-induced cell death involves Fas upregulation and lipid peroxidation in human neuroblastoma cells. **Nanobiotechnol**, v.5, p.1–13, 2007.

CHOI, A.O.; MAYSINGER D. Autores do capítulo: Applications of quantum dots in biomedicine. ROGACH, A.L. **Semiconductor nanocrystal Quantum dots. Synthesis, assembly, spectroscopy and applications**. 1ed, Austria, Ed. Springer-verlag/Wien, p.349 a 366, 2008.

CHOU et al 2013. Dopamine-quantum dotconjugate: a new kind of photosensitizers for photodynamic therapy of cancers. **J Nanopart Res**, v.15, p.1348, 2013.

CLARKE, S.J.; HOLLMANN, A.; ZHANG, Z.; SUFFERN, D.; BRADFORTH, S.E.; DIMITRIJEVIC, N.; MINARIK, W.G.; NADEAU, J.L. Photophysics of dopamine-modified Quantum dots and effects on biological systems. **Nature materials**, v. 5, p.409-417, 2006.

-VIANA, O.S.

CORMICK, M.P.; ALVAREZ, M.G.; ROVERA, M.; DURANTINI, E.N. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* sensitized by tri- and tetra-cationic porphyrin derivatives. **European journal of medicinal chemistry**. v.44, p.1592-1599, 2009.

COSTA, L.; ALVES, E.; CARVALHO, C.M.B.; TOME, J.P.C.; FAUSTINO, M.A.F.; NEVES, M.G.P.M.S.; TOME, A.C.; CAVALEIRO, J.A.S.; CUNHA, A. AND A. ALMEIDA. Sewage bacteriophage photoinactivation by cationic porphyrins: a study of charge effect, **Photochem. Photobiol. Sci.**, 2008, v.7, p.415.

COVOLAN, R; ARAÚJO, D. B; SANTOS, A. C. CENDES, F. Ressonância Magnética Funcional: A s funções do Cérebro Reveladas por Spins Nucleares. **Cienc. Cult.** v.56, n.1, Campinas, p. 40-42, 2004.

DABBOUSI, B.O.; J. RODRIGUEZ-VIEJO, F.V.; MIKULEC, J.R.; HEINE, H.; MATTOUSSI, R.; OBER, K.F.; JENSEN, K.F.; BAWENDI, M.G. (CdSe)ZnS coreshell ponto quânticos: Synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites. **J. Phys. Chem.**, v.101, p.9463-9475, 1997.

DAHAN, M.; LEVI, S.; LUCCARDINI, C.; ROSTAING, P.; RIVEAU, B.; TRILLER, A. Diffusion Dynamics of Glycine receptors revealed by single-Quantum dot tracking. **Science**, v.17, 2003, p.442-445.

DAI, T.; FUCHS, B.; COLEMAN, J.; PRATES, R.A.; ASTRAKAS, C.; DENIS, T.S.T.; RIBEIRO, M.S.; MYLONAKIS, E.; HAMBLIN, M.R.; and TEGO, G.P. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal Discovery platform. **Frontiers in microbiology**, v.3, n.120, p.1-16, 2012.

DAIA, T.; HUANG, Y.Y.; HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy for localized infections-State of the art. **Photodiagnosis Photodynamic Therapy**, v.6: p.170-88, 2009.

DEMCHICK, P.; KOCH, A.L. The permeability of the wall fabric of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, v.178, p.768-773, 1996.

DERFUS, A.M.; CHAN, W.C.W.; BHATIA, S.N. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots, **Nano Lett**, v.4, p.11-18, 2004.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**, v.27, p.305-318, 2004

DOLPHIN, D., TRAYLOR, T. G., XIE, L. Y.; Polyhaloporphyrins: Unusual Ligands for Metals and Metal-Catalyzed Oxidations **Acc. Chem. Res.**, v.30, p.251-259, 1997.

DONNELLY, R.F.; MCCARRON, P.A.; TUNNEY, M.M. Antifungal photodynamic therapy. **Microbiological research**, v.163, p.1-12, 2008.

DOVER, J. S.; BHATIA, A. C.; STEWART, B.; ARNDT, K. A. Tropical 5-VIANA, O.S.

aminolevulinic acid combined with intense pulsed light in the treatment of photoaging. **Arch. Dermatol.**, v.141, p.1247, 2005.

DUBERTRET, B.; SKOURIDES, P.; NORRIS, D.J.; NOIREAUX, V.; BRIVANLOU, A.H.; LIBCHABER, A. In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles, **Science**, v.298, p.1759–1762, 2002.

ETHIRAJAN, M.; CHEN, Y.; JOSHI, P.; PANDEY, R. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. **Chem. Soc. Rev.**, v.40, p.340, 2011.

EZZEDDINE, R.; AL-BANAW, A.; TOVMASYAN, A.; CRAIK, J.D.; BATINIC-HABERLE, I.; BENOVA, L.T. Effect of Molecular Characteristics on Cellular Uptake, Subcellular Localization, and Phototoxicity of Zn(II) N-Alkylpyridylporphyrins. **J Biol Chem.**, v.288, p.36579-36588, 2013.

FARIAS, P. M. A.; SANTOS, B. S.; MENEZES F.D.; CESAR C.L.; FONTES, A.; LIMA, P.R.M.; BARJAS-CAST, M.L.; CASTRO, V.; FERREIRA, R. CdS quantum dot efficient fluorescent markers for red cells, **J. microscopy**, n.219, v.3, p.103-108, 2005.

FEDER, D.; GOMES, S.A.O.; DE THOMAZ, A.A.; ALMEIDA, D.B.; FAUSTINO, W.M.; FONTES, A.; STAHL, C.V.; SANTOS-MALLET, J.R.; CESAR, C.L. In vitro and in vivo documentation of ponto quânticos labeled Trypanosoma cruzi & Rhodnius prolixus interaction using confocal microscopy. **Parasitol. Res.**, v.106, p.85-93, 2009.

FONTES, A.; LIRA, R.B.; SEABRA, M.A.B.; SILVA, T.G.; CASTRO NETO, A.G.; SANTOS, B.S. **Quantum dots in biomedical research**. Biomedical Engineering – *Technical applications in medicine*. 1ed. Rijeka: InTech. 2012, 269-290.

FRANGIONI, J.V. In vivo near-infrared fluorescence imaging, **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v.7, p.626–634, 2003.

FRASCO M. F.; VAMVAKAKI, V.; CHANIOTAKIS, N. Porphyrin decorated CdSe quantum dots for direct fluorescent sensing of metal ions. **J. nanopart Res.**, v.12, p.1449-1458, 2010.

FRIEDERMANN, G.R. **Estudo de porfirinas base livre e seus derivados de manganês por eletroquímica e espectro-eletroquímica de RPE e UV-Vis**. Tese doutorado (UFPR), 2005.

FU, X.J.; FANG, Y.F.; YAO, M. Antimicrobial photodynamic therapy for methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection. **Biomed Research International**, v.2013, p.1-9, 2013.

GAO XH, YANG LL, PETROS JÁ, MARSHAL FF, SIMONS JW, NIE SM. In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots. **Curr Opin Biotech**, p.; v.16, p.63–72, 2004.

-VIANA, O.S.

GAO, J.; CHEN, K.; XIE, R.; XIE, J.; YAN, Y.; CHENG, Z.; PENG, X. AND CHEN, X. In Vivo Tumor-Targeted Fluorescence Imaging Using Near-Infrared Non-Cadmium Quantum dots. **Bioconjugate Chem.**, v.21, p.604–609, 2010.

GAPOENKO, S. V. **Optical Properties of Semiconductor Nanocrystals**, 1ed., London, Cambridge University Press, Cambridge, 2003, 1210p.

GARDLO, K.; HORSKA, Z.; ENK, C. D.; RAUCH, L.; MEGAHED, M.; RUZICKA, T.; FRITSCH, C. Treatment of cutaneous leishmaniasis by photodynamic therapy. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.48, p.893, 2003.

GARDNER, D.M.; TAYLOR, V.M.; CEDEÑO, D.L.; PADHEE, S.; ROBLEDO, S.M.; JONES, M.A.; LASH, T.D.; VÉLEZ, I.D. Association of acenaphthoporphyrins with liposomes for the photodynamic treatment of leishmaniasis. **Photochem Photobiol.**, v.86, n.3, p.645–652, 2010. doi:10.1111/j.1751-1097.2010.00705.x

GOIS, M.M.; KURACHI, C.; SANTANA, E.J.B.; MIMA, E.G.O.; SPOLIDÓRIO, D.M.P.; PELINO, J.E.P.; BAGNATO, V.S. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* to porphyrin-mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy: na in vitro study. **Lasers medicine sciences**. v.25 , p.391-395, 2010.

GONZALES, F.P.; FELGENTRAGER, A.; BAUMIER, W.; MAISCH, T. Fungicidal photodynamic effect of a twofold positively charged porphyrin against *Candida albicans* planktonic cells and biofilms. **Future Microbiol.**, v.8, n.6, p.785-797, 2013.

GOULD, I. M. Clinical relevance of increasing glycopeptide MICs against *Staphylococcus aureus*, **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.31, o. 2, p.1–9, 2008.

GRIFFITHS, M. A.; WREN, B. W.; WILSON, M. “Killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro using aluminium disulphonated phthalocyanine, a light-activated antimicrobial agent,” **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 40, n. 6, p. 873–876, 1997.

GU, Z.; ZOU, L.; FANG, Z.; ZHU, W.; ZHONG, X. One-post synthesis of highly luminescent CdTe/CdS core/shell nanocrystals in aqueous phase. **Nanotechnology**, v.19, p.13, 2008.

GULLAPALLI, S.; BARRON, A. Characterization of Group 12-16 (II-VI) Semiconductor Nanoparticles by UV-visible Spectroscopy. **Physical Methods in Inorganic and Nano Chemistry**. 2010. Disponível em: <http://cnx.org/content/m34601/latest/?collection=col10699/latest>

HAJIM, K. I. ; SALIH, D. S.; RASSAM, Y. Z., “Laser light combined with a photosensitizer may eliminate methicillinresistant strains of *Staphylococcus aureus*,” **Lasers in Medical Science**, v. 25, n5, p. 743–748, 2010.

HAMBLIN, M.R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infections disease? **Photochem. Photobiol. Sci.** v.3, p.436-450, 2004.

HAMBRIGHT, P. In *The Porphyrin Handbook*; Kadish K.M.; Smith K. M.; Guillard, R. , Eds.; Academic Press: New York, 2000, Ch.18.

HANAKOVA, A.; BOGDANOVA, K.; TOMANKOVA, K.; PIZOVA K.; MALOHLAVA, J.; BINDER, S.; BAJGAR, R.; LANGOVA, K.; KOLAR, M.; MOSINGER, J.; KOLAROVA, H. The application of antimicrobial photodynamic therapy on *S. aureus* and *E. coli* using porphyrin photosensitizers bound to cyclodextrin. **Microbiology Researchs.** v;169, v.2-3, p163-70, 2014.

HATAKEYAMA, T.; MURAYAMA, Y.; KOMATSU, S.; SHIOZAKI, A.; KURIU, Y.; IKOMA, H.; NAKANISHI, M.; ICHIKAWA, D.; FUJIWARA, H.; OKAMOTO, K.; OCHIAI, T.; KOKUBA, K.; INOUE, K.; NAKAJIMA, M.; and OTSUJI, E. Efficacy of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy using light-emitting diodes in human colon cancer cells. **Oncology Reports**, v.29, p.911-916, 2013

HERWALTD, B.L. Leishmaniasis. **The Lancet** . v. 354, , p.1191-1199, 1999.

HILD WA, BREUNIG M, GOEPFERICH A. Quantum dots—nano-sized probes for the exploration of cellular and intracellular targeting. **Eur J Phram Biopharm**; v.68: p.153–68, 2008.

HYPESCIENCE (2010) <http://hypescience.com/pesquisadores-brasileiros-criam-biosensor-que-identifica-infeccoes-causadas-por-parasitas/> (acessado em 04-12-2014)

IPE, et al. On the generation of free radical species from quantum dots. **Small**, v.1, p.706-709, 2005.

ITOH, Y.; NINOMIYA, Y.; TAJIMA, S.; ISHIBASHI, A. Photodynamic therapy of acne vulgaris with topical delta-aminolaevulinic acid and incoherent light in Japanese patients. **Br. J. Dermatol.**, v.144, p.575, 2001.

JAISWAL, J.K.; MATTOUSSI, H.; MAURO, J.M.; SIMON, S.M. Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. **Natural biotechnology**. V.21, p.47-51, 2003.

JCPDS. Joint Committee on Powder Diffraction Standards. In *Powder Diffraction File Search Manual*; JCPDS: Swarthmore, Pennsylvania, USA, 2009, Index card: 00-015-0770.

JEFF, B.; HATTER, K.; HUYNCKE, M.; GILMORE, M. Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. **Biotechniques**, v.23, p.648-650, 1997.

JHONSI, M. A.; RENGANATHAN, R. Investigations on the photoinduced interaction of water soluble thioglycolic acid capped CdTe quantum dots with certain porphyrins. **Journal of colloid and interface Science**, n.344, p.596-602, 2010.

-VIANA, O.S.

JIANG, S.; GNANASAMMANDHAN M.K.; ZHANG Y; Opticalimaging-guidedcancertherapywithfluorescentnanoparticles, **J. R. Soc. Interface**, v.7, p.3–18, 2010.

JUZENAS P, CHEN W, SUN Y-P, COELHO MAN, GENERALOV R, GENERALOVA N, et al. Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer. **Adv Drug Deliv Rev**, v.60, p.1600–14, 2008a.

JUZENAS P, GENERALOV R, ASTA J, JUZENIENE A, MOAN J. Generation of nitrogen oxide and oxygen radicals by quantum dots. **J Biomed Nanotechnol**; v.4, p.450–6, 2008b.

KAIN, W., SCHWEDERSKI, B., **Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life**, John Wiley & Sons, New York, 2007.

KALYANASUNDARAM, K. Photochemistry of water-soluble porphyrins: comparative study of isomeric tetrapyrrolyl- and tetrakis(N-methylpyridiniumyl)porphyrins. **Inorg Chem**, , v.23, p.2453-2459, 1984.

KATO, I.T.; PRATES, R.A.; SABINO, C.P.; FUCHS, B.B.; TEGOS, G.P. MYLONAKIS E.; HAMBLIM, M.R.; RIBEIRO, MS. Antimicrobial photodynamic inactivation inhibits *Candida albicans* virulence factors and reduces *in vitro* pathogenicity. **Antimicrob. Agents Chemother.** , v.57, n.1, p.445-451, 2013.

KOSAKA, S.; AKILOV, O.E.; O’RIORDAN, K.; HASAN, T. A Mechanistic study of aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis. **Journal of Invest Dermatol**, v.127, n.6, p.1546-1549, 2007.

KOWERKO, ZA, D.; SCHUSTER, J.; AMECKE, N.; ABDEL-MOTTALEB, M.; DOBRAWA, R.; FRANK, B.; RTHNERB, W.; VON BORCZYKOWSKI, C. FRET and ligand related NON-FRET processes in single quantum dot-perylene bisimide assembliesw. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v.12, p.4112–4123, 2010.

KRALJIC, I. Detection of singlet oxygen and its role in dye-sensitized photooxidation in aqueous and micellar solutions. **Biochimie**, v. 68, n. 6, p. 807-811, 1986.

LAKOWICZ JR. Principles of fluorescence spectroscopy. 1ed., New York: Plenum Press; 1986.

Li et al 2012. Quantum dot-aluminum phthalocyanine conjugates perform photodynamic reactions to kill cancer cells via fluorescence resonance energy transfer. **Nanoscale Research Letters**, v.7, n.1, p.386, 2012.

LI, Z.; XIA, C-G., Oxidation of hydrocarbons with iodobenzene diacetate catalyzed by manganese(III) porphyrins in a room temperature ionic liquid, **J. Mol. Catal. A:Chem.**, v.214, p.95-101, 2004.

LIDKE, D.S.; NAGY, P.; HEINTZMANN, R.; ARNDT-JOVIN, D.J.; POST, J.N.; -VIANA, O.S.

GRECCO, H.E.; JARES-ERIJMAN, E.A.; JOVIN, T.M. Quantum dot ligands provide new insights into erbB/HER receptor-mediated signal transduction, **Nat. Biotechnol.**, v.22, 198–203V, 2004.

LIRA, R.B.; CAVALCANTI, M.B.; SEABRA M.A.B.L.; SILVA, D.C.N.; AMARAL, A.J.; SANTOS B.S.; FONTES A. Non-specific interactions of CdTe/Cds Quantum dots with human blood mononuclear cells. **Micron.**, v.43, p.621-626, 2012.

LIRA, R.B.; SEABRA M.A.B.L.; MATOS ANNA L.L.; VASCONCELOS J.V.; BEZERRA, D.P.; DE PAULA E.; SANTOS B.S. Studies on intracellular delivery of carboxyl-coated CdTe quantum dots mediated by fusogenic liposomes. **Journal of materials chemistry B**. 2013, v.1. p.4297-4305.

LOVRIC, J.; CHO, S.J.; WINNIK, F.M.; MAYSINGER, D. Unmodified cadmium telluride quantum dots induce reactive oxygen species formation leading to multiple organelle damage and cell death. **Chem Biol.**, v.12, p.1227–1234, 2005.

MA J, CHEN J-Y, IDOWU M, NYOKONG T. Generation of singlet oxygen via the composites of water-soluble thiol-capped CdTe quantum dots—sulfonated aluminum phthalocyanines. **J Phys Chem B**, v.112, p.4465–9, 2008.

MA, J.; CHEN, J.Y.; GUO, J.; WANG, C.C.; YANG, W.L.; XU, L.; WANG, P.N. Photostability of thiol-capped CdTe quantum dots in living cells: the effect of photooxidation, **Nanotechnology**, v.17, n.9, p.2083-2089, 2006.

MACHADO, A. E. H. Terapia Fotodinâmica: Princípios, Potencial de Aplicação e Perspectivas. **Quim. Nova**, v. 23(2), p. 237-243, 2000.

MAISCH, T. ; BOSL, C.; SZEIMIES, B.; LOVE, R. M.; AND ABELS, C. Determination of the antibacterial efficacy of a new porphyrin based photosensitizer against MRSA ex vivo,” **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 6, n. 5, p. 545–551, 2007.

MAISCH, T. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment, **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 8, p. 974–983, 2009.

MALIK, Z.; HANANIA, J.; NITZAN, Y. Bactericidal effects of photoactivated porphyrins – an alternative approach to antimicrobial drugs. **J Photochem Photobiol B**, v.5, p.281-293, 1990.

MAYSINGER, D.; BEHRENDT, M.; LALANCETTE-HEBERT M; KRIZ, J. Real-time imaging of astrocyte response to quantum dots: in vivo screening model system for biocompatibility of nanoparticles. **NanoLett**, v.7, p.2513–2520, 2007.

MEDINTZ, I. L.; UYEDA T.; , GOLDMAN, E.R.; MATTOUSSI, H. Quantum dot bioconjugates for imaging, 78nm.78nm and sensing. **Nature materials**, v. 4, 2005.

MEDINTZ, I.L.; MATTOUSSI, H. Quantum dot-based resonance energy transfer and its growing application in biology. **Phys.Chem.**; v.11, p.17–45, 2009.

-VIANA, O.S.

MITTON, D.; AND ACKROYD, R. Photodynamic therapy on esophageal carcinoma. **Photochemistry and Photobiologic Sciences.**, v.3, p.839-850, 2004.

MONTANARI, F., Biomimetic oxygenations catalyzed by metalloporphyrins and metallophorphinoids bearing co-catalytic functions, **Pure & Appl. Chem.**, v.66, p.1519-1526, 1994.

MORAES, M.E.; DORVAL, C.; OSHIRO, E.T.; CUPOLLILO, E.; CASTRO, A.C.C; ALVES, T.P. Occurrence of American tegumentary leishmaniasis in the Mato Grosso do Sul State associated to the infection for *Leishmania amazonenses*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.**, v.39, n.1, p.43-46, 2006.

MOREIRA, W.; LEPROHON, P.; OUELLETTE, M. Tolerance to drug-induced cell death favours the acquisition of multidrug resistance in *Leishmania*. **Cell Death Dis**, v.2, p.2012011. doi:10.1038/cddis.2011.83.

MOROSINI V; BASTOGNE T; FROCHOT C; SCHNEIDER R; FRANÇOIS A; GUILLEMIN F; BARBERI-HEYOB M; Ponto quântico-folic acid conjugates as potential photosensitizers in photodynamic therapy of cancer. **Photochem. Photobiol. Sci.**v.10, p.842–851, 2011.

MUEHLMANN, L.A.; RODRIGUES, M.C.; FIGUEIRÓ, J.P.; GARCIA, M.P.; PY-DANIEL, K.P.; VELOSO, A.B.; SOUZA, P.E.N.; SILVA, S.W.; AZEVEDO, R.B. Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: development and in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. **Journal nanobiotechnology**, v.13, p.13-36, 2015.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet.**, v.366; 2005.

NABIEV I, MITCHELL S, DAVIES A ET AL. Nonfunctionalized nanocrystals can exploit a cell's active transport machinery delivering them to specific nuclear and cytoplasmic compartments. **Nano Lett** v.7: p.3452–3461, 2007.

NAIK, R., JOSHI, P., UMBARKAR, S. DESHPANDE, R. R., Polystyrene encapsulation of manganese porphyrins: highly efficient catalysts for oxidation of olefins, **Cat. Comm.**, v.6, p.125-129, 2005.

NARBAND, N.; MUBARAK, M.; READY, D.; PARKIN, I.P.; NAIR, S.P.; GREEN, M.A.; BEEBY, A.; WILSON, M. Quantum dots as enhancers of the efficacy of bacterial lethal photosensitization. **Nanotechnology**, 2008, 19, 8p.

ORIEL, S.; NITZAN, Y. Mechanistic aspects of Photoinactivation of *Candida albicans* by Exogenous Porphyrins. **Photochemistry and Photobiology**, v.88, p.604-612, 2012.

OSAKI, F.; KANAMORI, T.; SANDO, S.; SERA, T.; AOYAMA, Y. A quantum dot conjugated sugar ball and its cellular uptake. on the size effects of endocytosis in -VIANA, O.S.

the subviral region, **J. Am. Chem. Soc.**, v.126, p.6520–6521, 2004.

OTHMAN, S.; MANSUY-MOURIES, V.; BENSOUSSAN, C.; BATTIONI, P.; MANSUY, D., Hydroxylation of diclofenac: an illustration of the complementary roles of biomimetic metalloporphyrin catalysts and yeasts expressing human cytochromes P450 in drug metabolism studies, **Acad. Sci. Série Iic. Chem.**, v.3, p.751-755, 2000.

OWENS, D.E.; PEPPAS, N.A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **Int. J. Pharm.**, n.307, p.93-102, 2006.

PANG, S.W.; PARK, H.-Y.; JANG, Y.-S.; KIM, W.; KIM, J.-H. Effects of charge density and particle size of poly(styrene/(dimethylamino) ethyl methacrylate) nanoparticle for gene delivery in 293 cells, **Colloids Surf. B, Biointerf.**, v.26, p.213–222, 2002.

PASZKO, E.; EHRHARDT, C; KELLEHER, DP; RYNOLDS, JV. Nanodrug applications in photodynamic therapy. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v.8, p.14-29, 2011.

PEIXOTO, I.N. **Otimização de *n*-piridilporfirinas precursoras de moduladores redox de estresse oxidativo e estudos de distorção não-planar**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 2012.

PELI, L.S.; BIONDO, C.E.G.; KIMURA, E.; POLITI, M.J.; LONARDONI, M.V.C.; ARISTIDES, S.M.A.; DOREA, R.C.C.; HIOKA, N.; SILVEIRA, T.G.V. Photodynamic therapy for American cutaneous leishmaniasis: The efficacy of methylene blue in hamsters experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) amazonenses*. **Experimental Parasitology**, v.128, p.353-356, 2011.

PINTO, J.G.; SOARES, C.P.; MITTMANN, J. Assessment of *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis* promastigote viability after photodynamic treatment with aluminum phthalocyanine tetrasulfonate (AlPcS4). **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, v.17, n.3, p.300–307, 2011. doi: 10.1590/S1678-91992011000300010

QI et al. Biocompatible quantum dot-based photosensitizer under two-photon excitation for photodynamic therapy. **J Mater Chem**, 21, 2455-2458, 2011.

RABINOW, B.; CHAUBAL, M.V. Injectable nanoparticles for efficient drug delivery. **Drugs Pharm. Sci**, v.159, p.199-229, 2006.

RAKOVICH et al. CdTe quantum dot/dye hybrid system as photosensitizer for photodynamic therapy. **Nanoscale Res Lett**, v.5; p.753-760, 2010.

REBOUÇAS, J.S.; DE CARVALHO, M.E.M.D.; IDEMORI, Y.M. Perhalogenated 2-pyridylporphyrin complexes: synthesis, self-coordinating aggregation properties, and catalytic studies. **J Porphyr Phthalocya**, v.06, p.50-57, 2002.

REBOUÇAS, J.S.; SPASOJEVIĆ, I.; BATINIĆ-HABERLE, I. Quality of potent Mn porphyrin-based SOD mimics and peroxynitrite scavengers for pre-clinical
-VIANA, O.S.

mechanistic/therapeutic purposes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2008, v.48, p.1046-1049.

RISTIC, B.Z.; MILENKOVIC, M.M.; DAKIC, I.R.; TODOROVIC-MARKOVIC, B.M.; MILOSAVLJEVIC, M.S.; BUDIMIR, M.D.; PAUNOVIC, V.G.; DRAMICANIN, M.D.; MARKOVIC, Z.M.; TRAJKOVIC, V.S. Photodynamic antibacterial effect of graphene quantum dots. **Biomaterials**, v.35, p.4428-4435, 2014.

RIZVI, S.B.; ROUHI S.; TANIGUCHI, S.; YANG, S.Y.; GREEN, M.; KESHTGAR, M.; SEIFALIAN, A.M. Near-infrared quantum dots for HER2 localization and imaging of cancer cells. **Int J Nanomedicine**, v.9, p.1323-1337, 2014.

ROBERTSON, C.A.; HAWKINS, D.; & ABRAHAMSE, E.H.. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v.96, n.1, p. 1-8, 2009.

ROGACH, A. L.; KORNOWSKI, A.; GAO, M.; EYCHMÜLLER, A.; WELLER, H.; Synthesis and Characterization of a Size Series of Extremely Small Thiol-Stabilized CdSe Nanocrystals. **J. Phys. Chem. B**, v.103, p.3065, 1999.

ROGACH, A.L. **Semiconductor nanocrystal Quantum dots. Synthesis, assembly, spectroscopy and applications**. Austria, Ed. Springer-verlag/Wien, 374p, 2008.

ROSSI, G.; GOI, D.; COMUZZI, C. The photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* in water using visible light with a new expanded porphyrin. **J Water health.**, v.10, n.3, p.390-399, 2012.

ROTAMSKIS et al. Complexes of functionalized quantum dots and chlorine e_6 in photodynamic therapy. **Lithuanian Journal of Physics**, v.53, n.1, p.57-68, 2013.

SAKOULAS, G. AND MOELLERING, R. C. “Increasing antibiotic resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Clinical Infectious Diseases**, vol. 46, supplement 5, p. S360–S367, 2008.

SAMIA ACS, CHEN XB, BURDA C. Semiconductor quantum dots for photodynamictherapy. **J Am Chem Soc**;v.125, p.15736–7, 2003.

SAMIA, A.C.; DAYAL, S.; BURDA, C. Quantum dot-based energy transfer: perspectives and potential for applications in photodynamic therapy. **Photochem Photobiol** v.82, p.617–625, 2006.

SANDROS MG, BEHRENDT M, MAYSINGER D, TABRIZIAN. ZnS-enriched chitosan nanoparticles: a versatile fluorescent probe for deep-tissue imaging. **AdvFunct Mater** v.17, p.3724–3730, 2007.

SANTOS, B.S. Obtenção de nanopartículas de CdS em sistemas amorfos e a investigação de suas propriedades óptico não-lineares em meio aquoso. Tese de -VIANA, O.S.

doutorado. UFP 2002.

SANTOS, B.S.; FARIAS, P.M.A.; FONTES, A. Semiconductor quantum dots for biological applications. **Handbook of self assembled semiconductor nanostructures for novel devices in photonics and electronics**. Chapter 26, p.773-798, 2008.

SANTOS, B.S.; FARIAS, P.M.A.; MENEZES, F.D.; FERREIRA, R.; GIORGIO, S.; BOSETTO, M.C.; MARIANO, E.A.; THOMAZ, A.A.; FONTES, A.; CESAR, C.L. Molecular differentiation of *Leishmania* protozoarium using CdS ponto quânticos as biolabels. **Proc. SPIE** 2006, doi: 10.1117/12.646912.

SCHMID, G. **Nanoparticles from theory to application**. Weinheim, 1ed.; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004, 795p.

SILVA, E.P.O.; MITTMANN, J.; FERREIRA, V.T.P.; CARDOSO, M.A.G.; BELTRANE-JR, M. Photodynamic effects of zinc phtalocyanines on intracellular amastigotes of *Leishmania amazonenses* and *Leishmania braziliensis*. **Lasers Medicine Sciences**, v.30, p.347-354, 2015.

SILVA, F.O.; SOUZA VIOL, L.C.; FERREIRA, D.L.; ALVES, J.L.A.; SCHIAVON, M.A. O estado da arte da síntese de semicondutores nanocristalinos coloidais. **Quim. Nova**, v. 33, n. 9, p.1933-1939, 2010.

SIMPLICIO, F. I; MAIONCHI, F; HIOKA, N. Terapia Fotodinâmica: Aspectos Farmacológicos, Aplicações e Avanços Recentes no Desenvolvimento de Medicamentos. **Quim. Nova**, Maringá, v. 25, n.5, p.801-807, 2002.

SMITH, A.M.; NIE, S. Chemical analysis and cellular imaging with quantum dots, **Analyst** v.129, p.672, 2004.

SOUKOS, N.S.; GOODSON J.M.; Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. **Periodontology**, v55, p.145-166, 2011.

STENDER, I. -M.; NA, R.; FOGH, H.; GLUUD, C.; WULF, H. C. Photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acido or placebo for recalcitrante foot and hand warts: randomisd double-blind trial. **Lancet**, v.355, p.963, 2000.

SUKHANOVA, A.; DEVY, J.; VENTEO, L.; KAPLAN, H.; ARTEMYEV, M.; OLEINIKOVE, V.; KLINOV, D.; PLUOT, M.; COHEN, J.H.M.; NABIEV, I. Biocomplatible fluorescente nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cells. **Analytical biochemistry**., v.324, p.60-67, 2004.

TANAKA, M.; KINOSHITA, M.; YOSHIHARA, Y.; SHINOMIYA, N.; SEKI, S.; NEMOTO, K.; HIRAYAMA, T.; DAÍ, T.; HUANG, L.; HAMBLIN, M.; MORIMOTO, Y. Optimal photosensitizers for potodynamic therapy of infections ,should kill bacteria but spare neutrophils. **Photochemistry and photobiology**, v.88: p.227-232, 2012.

TEKDAS et al. Photodynamic therapy potential of thiol-stabilized CdTe quantum -VIANA, O.S.

dot-group 3A phthalocyanine conjugates (PQ-Pc). **Spectrochimica Acta Part A**, v.93, p.313-320, 2012.

THAKURI, P.S.; JOSHI, R.; BASNET, S.; PANDEY, S.; TAUJAE, S.D.; MISRA, N. Antibacterial photodynamic therapy on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in-vitro. **Nepal Med Coll J**, v.13, n.4, p.281-284, 2011.

TOVMASYAN, A.; WEITNER, T.; SHENG, H.; LU, M.; RAJIC, Z.; WARNER, D.S.; SPASOJEVIC, I.; REBOUCAS, J.S.; BENOVO, L.; BATINIC-HABERLE, I. Differential Coordination Demands in Fe versus Mn Water-Soluble Cationic Metalloporphyrins Translate into Remarkably Different Aqueous Redox Chemistry and Biology. **Inorg Chem**, v.52, p.5677-5691, 2013.

TSAY JM, TRZOSS M, SHI L, KONG X, SELKE M, JUNG ME, et al. Singlet oxygen production by peptide-coated quantum dot-photosensitizer conjugates. **J Am Chem Soc**, v.129, p.6865–71, 2007.

VOSSMEYER, T.; KATSIKAS, L.; GIER SIG, M.; POPOVIC, I.G.; DIESNER, K.; CHEMSEDDINE, A.; EYCHMULLER, A.; WELLER, H. **J Phys chem.**, v.98, p.7665, 1994.

WEN, YA-NAN; SONG, WEI-SI; NA, LI MIM; LIU, YU-QIANG; WANG, YING-HUI; YANG, YAN-QIANG. Activation of porphyrin photosensitizers by semiconductor quantum dots via two-photon excitation. **Appl. Phys. Lett.**, v.95, 2009.

WENG KC, NOBLE CO, Papahadjopoulos-Sterberg B, Chen FF, Drummond DC, Kirpotin DB, et al. Targeted tumor cell internalization and imaging of multifunctional quantum dot-conjugated immunoliposomes in vitro and in vivo. **Nano Lett**; v.8, p.2851–7, 2008.

WIEGELL, S. R.; WULF, H. C. Photodynamic therapy of acne vulgaris using methyl aminolaevulinate: a blinded, randomized, controlled trial. **Br. J. Dermatol.**, v.154, 969, 2006.

WILSON, M; PRATTEN, J. “Lethal photosensitisation of *Staphylococcus aureus* in vitro: effect of growth phase, serum, and preirradiation time, **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 16, n. 3, p. 272–276, 1995.

WU, A.M.; GAMBHIR, S.S.; WEISS, S. Quantum dots for live cells, in vivo imaging and diagnostics. **Science**, n.307, v.5709, p.538-544, 2005.

WU, X.; LIU, H.; LIU, J.; HALEY, K.N. ; TREADWAY, J.A.; LARSON, J.P. GE, N.; PEALE, F.; BRUCHEZ, M.P. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots, **Nat. Biotechnol.**, v.21, p.41–46, 2003.

YAGHINI E, SEIFALIAN AM, MACROBERT AJ. Quantum dots and their potential biomedical applications in photosensitization for photodynamic therapy. **Nanomedicine**; v.4: p.353–63, 2009.

-VIANA, O.S.

YONG K-T, DING H, ROY I, LAW W-C, BERGEY EJ, MAITRA A, et al. Imaging pancreatic cancer using bioconjugated InP quantum dots. *ACS Nano*; v.3; p.502–10, 2009.

YU, W.W.; QU, L.; GUO, W.; PENG, X. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chem. Mater.*, v.15, p.2854–2860, 2003.

ZHANG H, SACHDEV D, WANG C, HUBEL A, GAILLARD-KELLY M, YEE D. Detection and downregulation of type I IGF receptor expression by antibody-conjugated quantum dots in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*; v.114, p.277–85, 2009.

ZHANG, C.; MA, H.; DING, Y.; JIN, L.; CHEN, D.; NIE, S. Quantum dot labeled trichosanthin, *Analyst*, 125, p.1029–1031, 2000.

ZHANG, T.; STILWELL, J.L.; GERION, D. *et al.* Cellular effect of high doses of silica-coated quantum dot profiled with high throughput gene expression analysis and high content cellomics measurements. *Nano Lett*, v.6, p. 800–808, 2006.

ZHANG, X.; LIU, Z.; MA, L.; HOSSU, M.; CHEN, W. Interaction of phosphorus with CdTe quantum dots. *Nanotechnology*, n. 22, 2011.

ZHOU, L.; XUEFENG, G.; ZHOU, J.; WEI, S. SHEN, J. Multicolor imaging and the anticancer effect of a bifunctional silica nanosystem based on the complex of graphene quantum dots and hypocrellin A. *Chem. Commun.*, 2015, v.51, p.421–424.

ZOLFAGHARI, P.S.; PACKER, M.; SINGER, S.P.; NAIR, J.; BENNETT, C.; In vivo killing of staphylococcus aureus using a light-activated antimicrobial agent. *BMC microbial*, v.9, p. 27, 2009.

APENDICE 1: artigo publicado no periódico *Molecules*® (*Molecules* **2015, *20*, 8893-8912; doi:10.3390/molecules20058893)**

molecules

ISSN 1420-3049

www.mdpi.com/journal/molecules

Article

Comparative Study on the Efficiency of the Photodynamic Inactivation of *Candida albicans* Using CdTe Quantum Dots, Zn(II) Porphyrin and Their Conjugates as Photosensitizers

Osnir S. Viana ¹, Martha S. Ribeiro ², Andréa C. D. Rodas ², Júlio S. Rebouças ³, Adriana Fontes ⁴ and Beate S. Santos ^{1,*}

¹ Pharmaceutical Sciences Department, Pernambuco Federal University, Recife 50670-901, Brazil;

E-Mail: osnirviana@yahoo.com.br

² Center for Lasers and Applications, IPEN-CNEN-SP, São Paulo 05508-000, Brazil;

E-Mails: marthasr@usp.br (M.S.R.); andrea.ipen@gmail.com (A.C.D.R.)

³ Chemistry Department, CCEN Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa 58051-900, Brazil;

E-Mail: jsreboucas@quimica.ufpb.br

⁴ Biophysics and Radiobiology Department, Pernambuco Federal University, Recife 50670-901, Brazil; E-Mail: adriana.fontes.biofisica@gmail.com

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail:

beate_santos@yahoo.com.br;

Tel.: +55-81-2126-7818; Fax: +55-81-2126-8560.

Academic Editor: Derek J. McPhee

Received: 26 January 2015 / Accepted: 29 April 2015 / Published:

Abstract: The application of fluorescent II-VI semiconductor quantum dots (QDs) as active photosensitizers in photodynamic inactivation (PDI) is still being

-VIANA, O.S.

evaluated. In the present study, we prepared 3 nm size CdTe QDs coated with mercaptosuccinic acid and conjugated them electrostatically with Zn(II) *meso*-tetrakis (*N*-ethyl-2-pyridinium-2-yl) porphyrin (ZnTE-2-PyP or ZnP), thus producing QDs-ZnP conjugates. We evaluated the capability of the systems, bare QDs and conjugates, to produce reactive oxygen species (ROS) and applied them in photodynamic inactivation in cultures of *Candida albicans* by irradiating the QDs and testing the hypothesis of a possible combined contribution of the PDI action. Tests of *in vitro* cytotoxicity and phototoxicity in fibroblasts were also performed in the presence and absence of light irradiation. The overall results showed an efficient ROS production for all tested systems and a low cytotoxicity (cell viability >90%) in the absence of radiation. Fibroblasts incubated with the QDs-ZnP and subjected to irradiation showed a higher cytotoxicity (cell viability <90%) depending on QD concentration compared to the bare groups. The PDI effects of bare CdTe QD on *Candida albicans* demonstrated a lower reduction of the cell viability ($\sim 1 \log_{10}$) compared to bare ZnP which showed a high microbicidal activity ($\sim 3 \log_{10}$) when photoactivated. The QD-ZnP conjugates also showed reduced photodynamic activity against *C. albicans* compared to bare ZnP and we suggest that the conjugation with QDs prevents the transmembrane cellular uptake of the ZnP molecules, reducing their photoactivity.

Keywords: quantum dots; Zn-porphyrins; photodynamic therapy; photodynamic inactivation; *Candida albicans*; fibroblasts

1. Introduction

Photodynamic therapy (PDT) is a relatively new type of therapy used for the treatment of tumorous cells/tissues and pathogenic microorganisms [1]. For antibacterial treatments the term Photodynamic Inactivation (PDI) is also frequently applied. Some types of cancer and local infections have been treated with PDT, by applying a photosensitizing substance (PS) followed by photoactivation. The basic principle of photodynamic therapy is that a photoactive PS drug causes the transfer of an electron or the transfer of energy to molecular oxygen generating reactive oxygen intermediaries (ROI) or *reactive oxygen species* (ROS), which immediately react with biomolecules in cell organelles, causing damage and resulting in cell death [2,3]. The main mechanism of PDI is thus related to the formation of free radicals, such as the hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), the superoxide radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$) or non-radical species, such as singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) [4–7]. There are various factors that influence the cell death, including PS type, concentration, incubation time, the availability of oxygen and also the wavelength, the power density ($\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$) and light energy dose ($\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$) of the irradiation source [8].

Among classical photosensitizing drugs that are now commercially available there are the porphyrins, which have been applied clinically in photodynamic therapy and photodynamic inactivation for various types of cancer and microorganisms [9–12] due to their high level of efficiency in terms of ROS production [13]. Porphyrins are cyclic organic molecules containing four nitrogen atoms arranged in a macrocyclic structure called a tetrapyrrole. These highly conjugated structures and their closed-shell complex counterparts, such as Zn(II) porphyrins, are highly fluorescent compounds largely studied as efficient photosensitizing agents [14,15]. Cationic Zn(II) complexes derived from *N*-alkylpyridylporphyrins are promising photosensitizing agents, capable of binding to cell membranes and targeting sub-cellular components, such as mitochondria. The mechanism of action of these compounds has often associated their high uptake and light-dependent ROS production to the resulting photodamage to lipid membranes and respiratory mitochondrial complexes [13,14,16–21].

Quantum dots (QDs) have emerged as an alternative to traditional PDI drugs, either bare or associated to other photosensitizing compounds [22–25]. Quantum dots are semiconductor nanocrystals composed of binary or ternary combinations from elements of the II–VI or III–V families of the Periodic Table. They possess very interesting electrical and optical properties and are currently used in various fields ranging from active opto-electrical devices, sensors and more recently as a new class of fluorescent biological probes. The luminescent properties of QDs make them able to label specific cells according to their surface functionality and they have shown a better performance when compared with commercially available organic dyes, due to the higher degree of photostability [26–28]. In addition to presenting exceptionally stable photoluminescence in relation to conventional fluorophores, QDs have a high quantum yield, which strengthens their application potential to stain cells and molecules in various types of tissues [6,21,29–32].

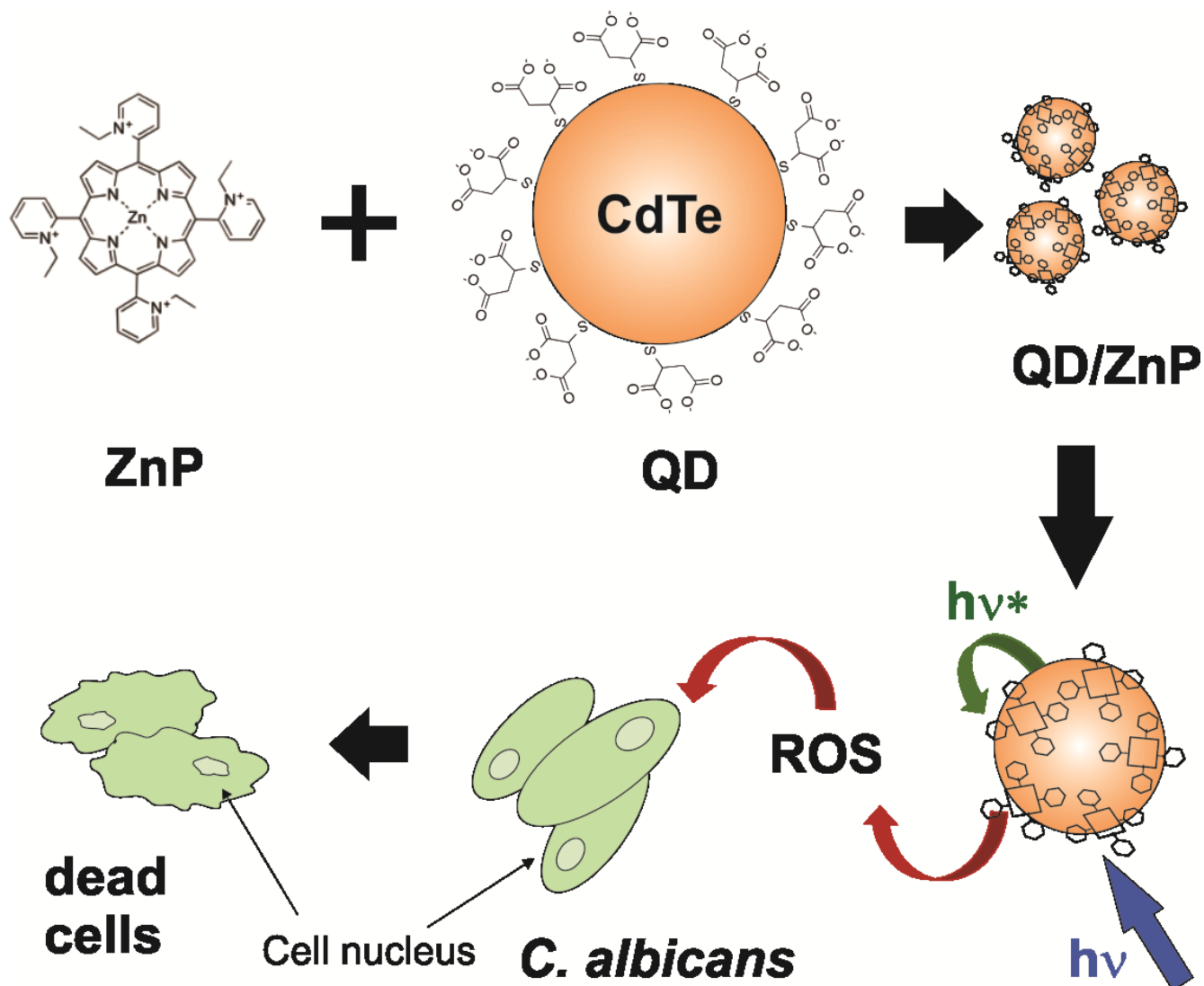


Figure 1. Schematic representation of the hypothesis tested here showing the cationic

Zn(II) meso-tetrakis(*N*-ethylpyridinium-2-yl)porphyrin (ZnP) conjugated to mercaptosuccinic acetate-stabilized CdTe QDs. The purple arrows ($h\nu$) represent the light excitation of the QDs while the blue arrow ($h\nu^*$) represents the energy transfer pathway from the QDs to the conjugated ZnP species. The excitation of this system may induce the formation of reactive oxygen species (ROS) that applied to *C. albicans* cells would induce their death.

In the last decade different research groups have been investigating the use of this new class of fluorophores as new photosensitizers in PDI. These nanostructures show not only efficient emitting light capability within the biological environment, but also the possibility, when photoexcited, of transferring charge to the oxygen molecules nearby inducing ROS. Since 2000, semiconductor QDs have been tested for ROS production and by now several advantages over the organic PS may be pointed out [2]: (i) a broader absorption band, enabling a more convenient excitation process; (ii) large extinction coefficients (from 10^5 to 10^6 L/mol·cm). -VIANA, O.S.

$10^6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at first excitonic band); (iii) narrow emission bands (bandwidth $\sim 25\text{--}50 \text{ nm}$) with high quantum yield; (iv) a chemically active surface allowing therapeutic targeting and (v) a very high photostability. This last optical property is especially appropriate for longer irradiation periods. Based on these properties quantum dots alone or in combination with conventional PS are being tested [33–37] in PDI. The association of QDs and porphyrins may result in alternative PS candidates in the search for a more powerful generation of ROS for photodynamic therapy against cancer cells and pathogenic microorganisms. Among pathogens of clinical importance *Candida albicans* is worth highlighting due to its notable virulence. *Candida albicans* is recognized as the most common fungal pathogens causing superficial infections of skin and mucosal membranes, reaching systemic levels, especially in immunocompromised individuals [38,39]. The resistance of *C. albicans* strains against classical antifungals such as fluconazole has increased, which drives the search for new therapeutic alternatives [40–42]. Porphyrin and non-porphyrin mediated photodynamic inactivation has already been applied successfully for some types of microorganisms, including *Candida albicans* [12,16,43–48], but its association to QDs as new PS candidates in PDI experiments is still being tested and almost all of the systems consist of lipophilic porphyrins or hydrophobic QDs. In the present study, we carried out the synthesis of water dispersed CdTe QDs and their conjugation to a highly hydrophilic cationic Zn(II) porphyrin, *ortho* Zn(II) *meso*-tetrakis(*N*-ethylpyridinium-2-yl)porphyrin [ZnTE-2-PyP⁴⁺ (abbreviated here as ZnP)], and evaluated their potential, either free or conjugated, in the photodynamic action against *Candida albicans* yeast cells. ZnP (Figure 1) is a cationic hydrophilic porphyrin that has shown a very good photodynamic activity against Gram-negative bacteria and cancer cells [16]. The main idea of this study (represented in Figure 1) was to verify the ability of the QDs to transfer energy to the porphyrin when irradiated and to cause more effective cell damage through PDI action. This class of porphyrins presents emission bands in the red region allowing its PDI action in a deeper tissue profile.

2. Results and Discussion

2.1. Structural and Optical Characterization of the QDs, ZnP and QDs-ZnP

The powder diffraction pattern of dried QD samples (Figure 2a) shows the characteristic CdTe crystalline plane profile thickened by the nanoscale dimension of the particles. Data from the *Joint Committee on Powder Diffraction Standards* crystallographic library [49] strongly suggest that the peaks located at 24.7° ; 39.0° and 46.6° (2θ) correspond, respectively, to the (111), (220) and (311) crystallographic planes of CdTe possessing the zinc blend cubic structure.

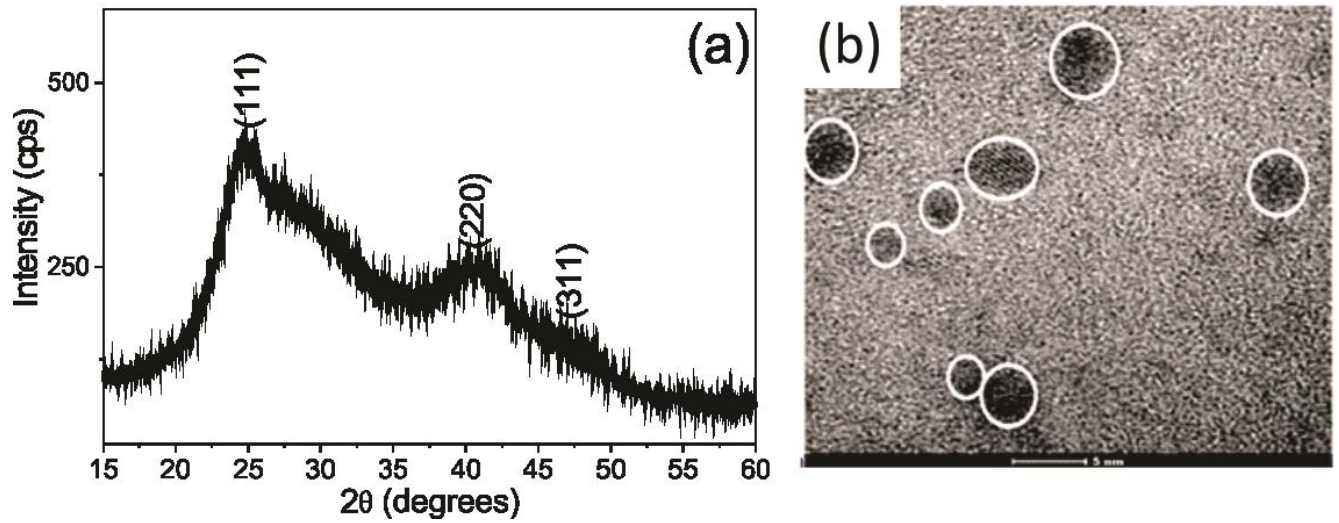


Figure 2. Structural characterization of the CdTe QDs used here. **(a)** A representative X-ray powder diffratogram of CdTe-MSA dried nanocrystals; **(b)** Transmission electron microscopy of CdTe-MSA. The circled electron dense structures represent individual nanoparticles. Bar = 5 nm.

By applying Scherrer's equation we estimate a mean particle size of $d = 3.1$ nm. This estimation is corroborated by the TEM analysis, which shows particles within the 2–5 nm size range (Figure 2b). The optical properties of the synthesized QDs are presented in Figure 3a. The absorption spectra of the synthesized CdTe QDs show the same features as other similar CdTe systems described in the literature [34,50–52] and allowed the estimation of the average particle size by applying Yu's semi-empirical equation (Equation (1)) [53]:

$$d = (9.8127 \times 10^{-7}) \lambda^3 - (1.7147 \times 10^{-3}) \lambda^2 + (1.0064) \lambda - 194.84 \quad (1)$$

where d is the mean QD diameter and λ is the maximum wavelength in nm corresponding to the first excitonic absorption peak.

Observing the first absorption maximum at $\lambda = 505$ nm we estimated an average size of $d = 2.7$ nm for the CdTe-MSA QDs which is in good agreement to the structural size estimation. Figure 3a also shows the emission band of the CdTe-MSA nanocrystals with maximum at $\lambda = 575$ nm ($\lambda_{\text{exc}} = 460$ nm) and a bandwidth (full width at half maximum—FWHM) of 42 nm. This emission band corresponds to the S-S exciton recombination of the CdTe nanoparticles. The characteristic absorption and emission spectra of the ZnP are presented in Figures 3b and 3c, respectively. Figure 3d shows an overlap of the emission spectrum of the QDs and the absorption spectrum of the ZnP porphyrin.

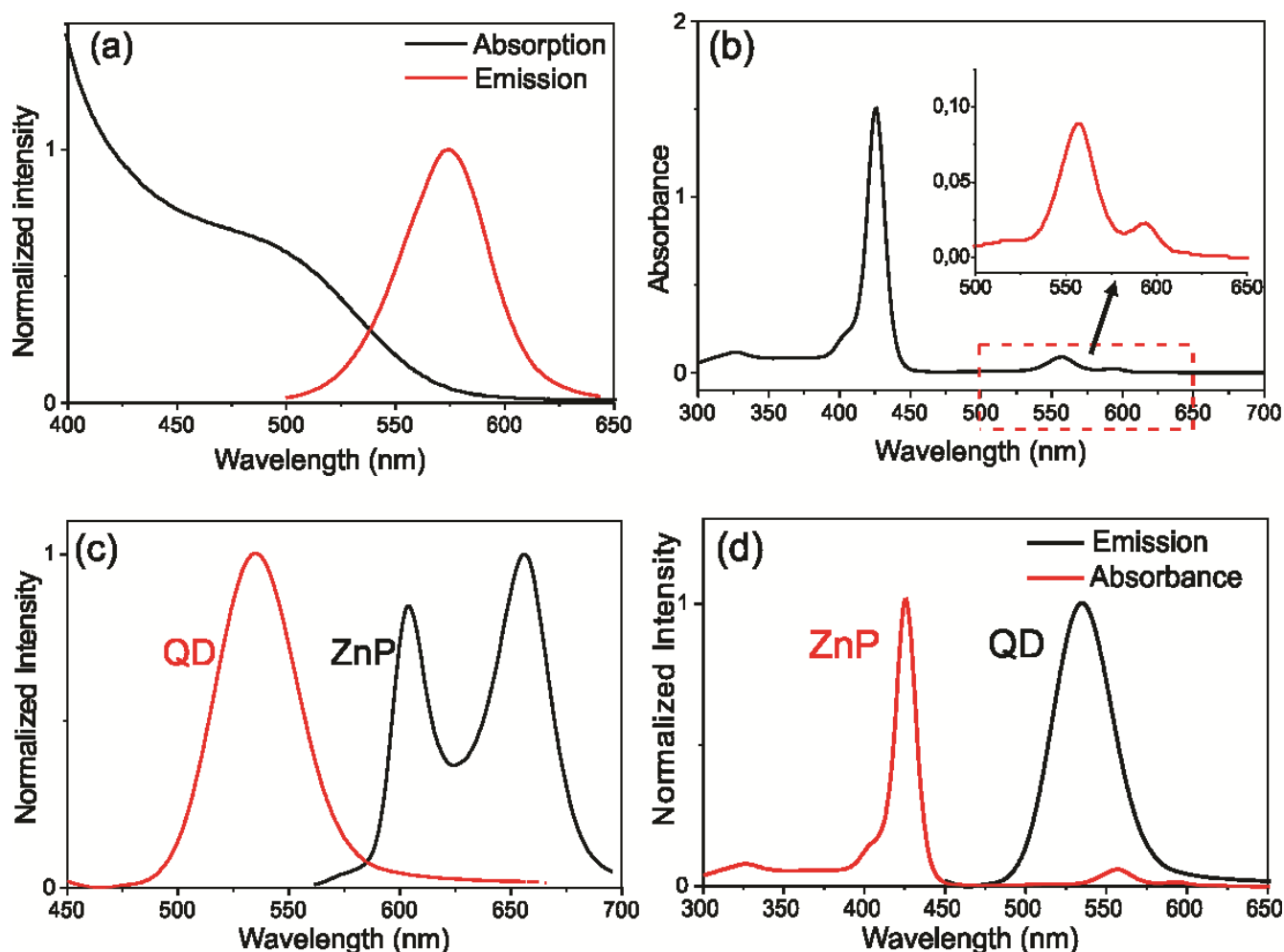


Figure 3. (a) Absorption and emission spectra of CdTe-MSA QDs (Exc: 460 nm); (b) absorption spectrum for the ZnP (the insert amplified the 500–650 nm spectral range); (c) superposition of the normalized emission spectra of CdTe QDs and the ZnP solution; (d) normalized absorption spectrum of ZnP and emission spectrum of CdTe QDs ($\lambda_{\text{exc}} = 460$ nm).

The absorption spectrum of ZnP is marked by an intense absorption band (the *Soret* band) at $\lambda = 420$ nm along with two bands (Q bands) with intensity maxima at 560 and 590 nm, in agreement with data reported by Benov et al. [17]. The emission spectra of ZnP show two intense bands in the red region ($\lambda = 596$ and 657 nm) with excitation at $\lambda = 420$ nm, consistent with the spectroscopic features reported for the analogous methyl complex [54]. Analyzing the spectra profiles presented by both species (Figures 3a and 3d) we note that in order to test the hypothesis of energy transfer from the QDs to the ZnP molecules, the systems must be excited next to the first maximum of the absorption band of the QDs and in a spectral region where no direct absorption of the porphyrin is expected. The chosen wavelength to study the PDI action of these systems was therefore $\lambda = 460$ nm.

The surface charges of the nanoparticles as inferred by their zeta potential ($\zeta = -57$ mV) indicate that, as expected, the CdTe-MSA particles are negative. The addition of ZnP molecules to CdTe-MSA QDs suspensions kept in a fixed pH ~ 7 is followed by an decrease in modulus of the zeta potential in a concentration-dependent fashion ($\zeta = -42, -36$ and -27 mV were observed for 1.5:0.15; 1.5:0.25 and 1.5:0.5 QDs:ZnP ratio respectively), strongly suggesting that the positive macromolecules are conjugated to the negative surface of the CdTe-MSA nanocrystals, most probably by adsorption.

2.2. Spectroscopic Studies of the QD-ZnP Conjugates

Before conducting the assays related to the production of ROS and anti-*Candida* PDI, the stability, as well as the spectroscopic changes of the conjugates containing different QD:ZnP ratios, were evaluated using their corresponding absorption and emission spectra. No evidence of precipitation or other incompatibility of the conjugated systems was observed, even after 12 weeks of storage. Moreover, the individual characteristic profiles of the absorption spectra of free QDs and ZnP were maintained upon their mixture at different ratios (Figure 4b) and reflect the overlap of their individual spectra.

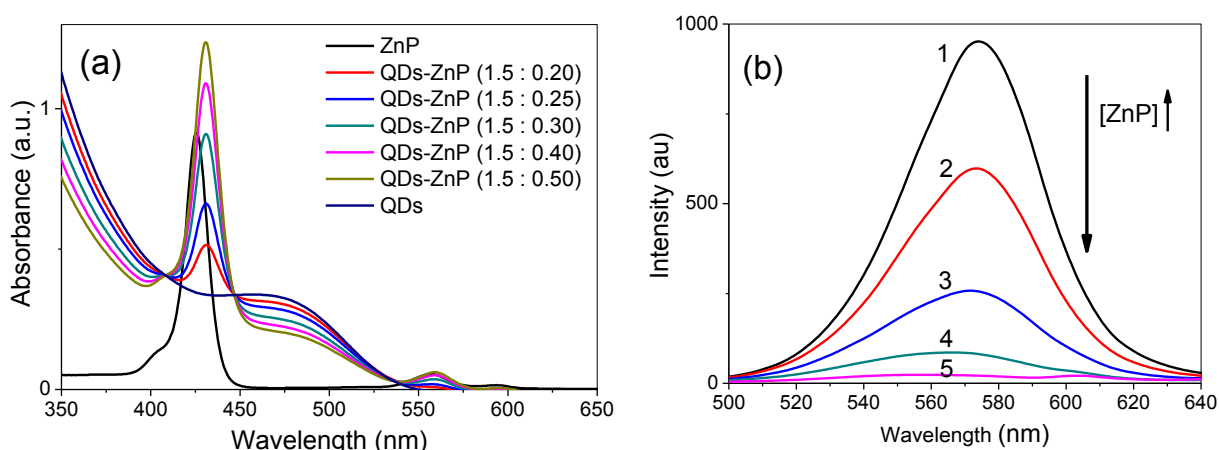


Figure 4. (a) Absorption spectra of different molar ratios of QDs:ZnP; (b) Emission spectra of CdTe-MSA QDs ($\lambda_{\text{exc}} = 460$ nm) with addition of increasing quantities of ZnP (1) = QDs; (2) QDs:ZnP 1:0.12; (3) QDs:ZnP = 1:0.25; (4) QDs:ZnP = 1:0.5; (5) QDs:ZnP = 1:1.

On the other hand, the emission spectrum intensity of the QDs gradually decreased with increasing amount of conjugated ZnP molecules (Figure 4b). The luminescence quenching of QDs upon increasing the net concentration of porphyrins was reported in the literature and the following processes were applied to explain this effect: (i) dynamic or static energy transfer between the QDs and the photosensitizer triggered by radiative energy transfer or Förster Resonance Energy Transference (FRET) [55–58] and (ii) competition among the absorbers [50]. As ZnP molecules present practically no absorbance at the excitation wavelength

applied (460 nm) we rule out the competition hypothesis and we suggest that there is a high probability of energy transfer from the QDs to the ZnP molecules.

2.3. Indirect Detection of ROS

One of the main mechanisms for evaluating the potential of a certain photosensitizer-candidate for photodynamic therapy is to measure its capacity for generating singlet oxygen, superoxide and other reactive oxygen species [25,59,60]. Here we tested the efficiency of this mechanism by indirectly detecting the ROS production by oxidation of NBT molecules in the presence of NADH. The graphs in Figure 5 show the dynamics of the formation of reactive oxygen species via irradiation of the photosensitizers (QDs, ZnP and QDs-ZnP) using this method. The oxidation of NBT produces an increase in the optical density of the sample at 580 nm, indicating the presence of ROS. The ZnP and QDs samples were tested individually as photosensitizers [Figure 5a—ROS production curve as a function of time (minutes)]. A greater rate of ROS production was found in the ZnP systems, which is consistent with the excellent photosensitizer behavior previously reported for this porphyrin [9,13,14,61]. To compare the rates of NBT oxidation, we assumed that the absorbance can be expressed by $A(t) = A_0(1 - \alpha t)$, where $A(t)$ is the intensity of absorbance at time, A_0 is the minimum absorbance, and α is a fit parameter. Then, the rate of ROS generation can be calculated from the equation: $V = dA(t)/dt$ [62]. Thus, the relative rate ($V_{\text{ZnP}}/V_{\text{CdTe-MSA}}$) of ROS formation of ZnP is approximately 27.5% faster than CdTe-MSA.

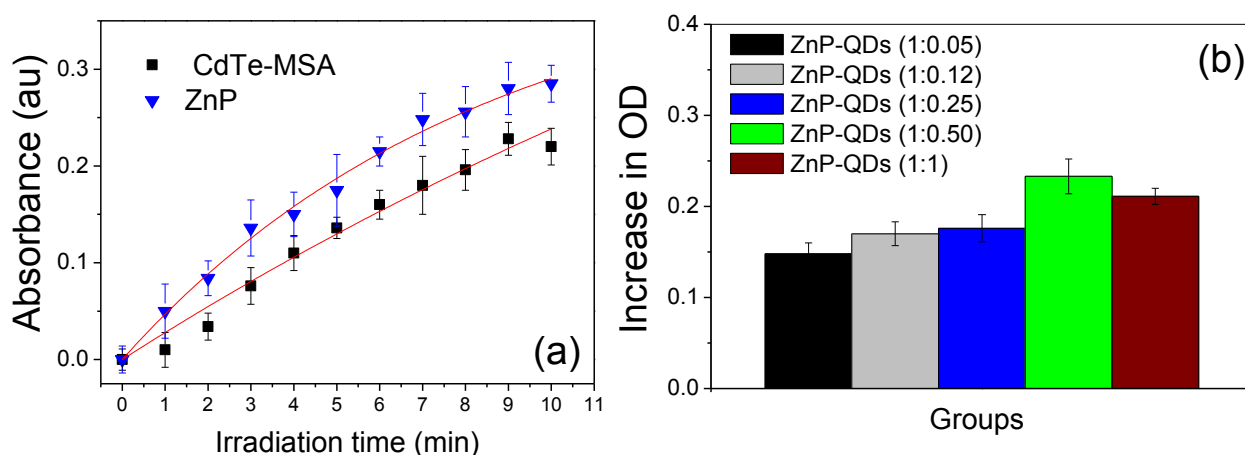


Figure 5. Indirect detection of ROS generation monitored by the increase in optical density (OD) at 580 nm (NBT oxidation). **(a)** Generation of ROS upon irradiation of ZnP (blue triangles, $R^2 = 0.997$) and CdTe-MSA QDs (black squares, $R^2 = 0.965$ ($[PS] = 1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)) and **(b)** ROS generation upon irradiation for 10 min of mixtures containing different proportions of ZnP and CdTe-MSA QDs. Analysis of variance (ANOVA) showed that the differences among the

various molar fractions of QDs-ZnP conjugates were significant ($p < 0.01$).

At a constant molar concentration of ZnP, the addition of increasing amounts of CdTe-MSA QDs to yield QDs-ZnP conjugates of different molar composition was accompanied by an increase in ROS production up to a ZnP:QDs ratio of 1:0.5 (Figure 5b—10 min of irradiation). These results confirm the potential of QDs, ZnP, and conjugated QDs-ZnP to induce light-dependent ROS generation, although at a cellular level this effect may be strengthened or suppressed by interactions of the photosensitizers with cell components.

2.4. Cytotoxicity Assays of the PSs in Fibroblast Cells

The PDI tests were preceded by fibroblast cytotoxicity assays in the dark and under irradiation, using the same range of concentrations that would be used for the other assays relating to the generation of ROS and PDI against *Candida albicans*. The results summarized in Figure 6 show that cells irradiated by blue light alone exhibited an increase of about 20% in cell viability. This result is not surprising since it is known that blue light irradiation regulates proliferation and differentiation in human skin cells depending on energy dose [63]. In fact, low levels of reactive oxygen species are generated during low energy visible light illumination of cells [64] and ROS are created following ligand-receptor interactions. They function as specific second messengers in signaling cascades involved in cell proliferation and differentiation [65] that may lead to cellular proliferation. Besides, the absorption spectrum of human fibroblast monolayers shows absorption peaks in the blue region of the electromagnetic spectrum.

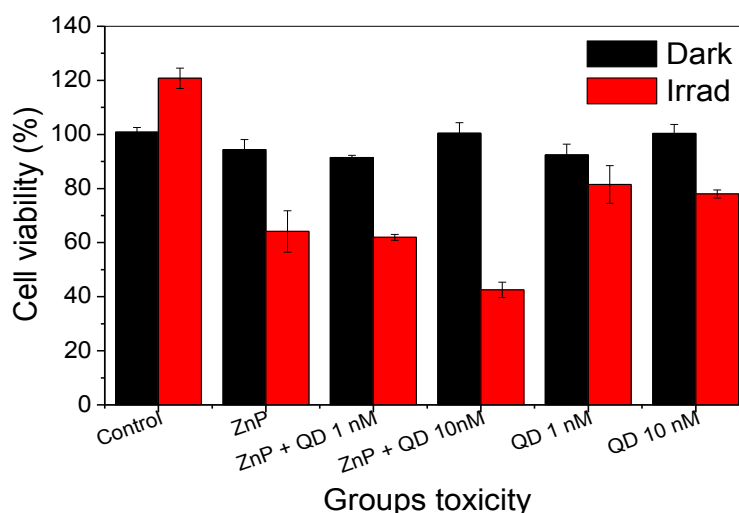


Figure 6. Measurement of cytotoxicity of fibroblasts cells treated with two different photosensitizers or their combinations: cells were exposed to (1) QDs (CdTe-MSA) in a concentration of 1 and 10 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; (2) ZnP kept at 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and (3) QD/ZnP conjugates. All the systems were tested in the dark

(dark shadow) or were irradiated at 460 nm (± 20) 150 mW irradiation for 9 min (red shadow). The estimative of cytotoxicity was obtained by MTS test (data points show the mean standard deviation, $n = 5$). ANOVA results showed $p < 0.05$. All irradiated groups had a statistically significant difference compared to the non-irradiated control.

Fibroblasts incubated with the three types of photosensitizers for 10 min in the dark showed survival rates greater than 90%, showing that dark toxicity of the photosensitizers (ZnP, QDs and QDs-ZnP) was low. In the group of cells treated with QDs and then irradiated with 460 (± 20) nm light, the cell survival rate was higher than or close to 80% at 1 to 10 nmol·L⁻¹ concentration of QDs, which indicates that at this concentration range, QDs exerted low phototoxicity for these cells. The phototoxicity of ZnP studied individually or in combination with different concentrations of CdTe-MSA QDs was more pronounced than that observed with bare QDs. In fact, following irradiation, ZnP alone exhibited about 65% of cell viability. The QDs-ZnP conjugates produced a more significant decrease in cell viability ranging from 60% to 40% depending on increase of QD concentration.

2.5. Photodynamic Inactivation Assays for *Candida albicans*

After observing the indirect light-dependent ROS production by QDs and ZnP photosensitizers, free or conjugated, and their effect on fibroblast cell cultures, these systems were tested as active components in antimicrobial photodynamic therapy. Owing to its medical importance and previous PDI background, *Candida albicans* was chosen as the model microorganism. The viability of these cells as a function of different exposure times is shown in Figure 7a for bare QDs system. According to the results, the cell viability of *C. albicans* decreased to a greater or lesser extent after the PDI session in the presence of the type of PS (QDs, ZnP, QDs-ZnP). It was especially noticeable that a low efficiency in PDI against *Candida albicans* occurred when applying QDs. Compared to the control groups, CdTe-MSA QDs barely altered *Candida* sp. cell viability (Figure 7a). These results demonstrate that, under the experimental conditions used here, the CdTe-MSA QDs show a low efficiency in the photodynamic inhibition of *Candida albicans*.

The use of Zn(II) porphyrin as photosensitizer against *C. albicans* resulted in a significant reduction of cell viability by 3 log units (Figure 7b), which reinforces its potential for use in antimicrobial photodynamic therapy, as also reported previously by Benov et al., who applied this porphyrin to *Escherichia coli* [17]. The positive charge of ZnP can speed up the absorption of the PS by the cell [14,61,66] and once internalized and photostimulated, ZnP could trigger internal cell apoptosis mechanisms [17]. It is worthwhile mentioning that all experiments were performed irradiating with a LED at 460 $\pm$ 20 nm which is not efficient for the porphyrin's own excitation (Figure 3b). It is expected that its PS capability will be greatly enhanced using an irradiation wavelength at the maximum absorbance of the ZnP (i.e., 420 nm).

To evaluate the effect of photodynamic inhibition on the *C. albicans* cells by the QDs-ZnP conjugates, an assay was carried out preparing systems of different ratios, maintaining the concentration of porphyrin constant at $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and varying the concentration of QDs. The results presented in Figure 7c show that there was no increase in the photodynamic effect on the microorganisms by conjugating QDs and ZnP and that the increase in the concentration of QDs had a negative impact on the production of ROS and consequently on cell death.

As described before, we tested the irradiation at $460 \pm 20 \text{ nm}$ to verify the hypothesis of a possible energy transfer mechanism from the QDs to the ZnP molecules in order to verify an overall increase in the PDI action. Interestingly, although barely any absorption of the ZnP is expected in this spectral range, its PDI action is greater than for the QDs alone and of the conjugate.

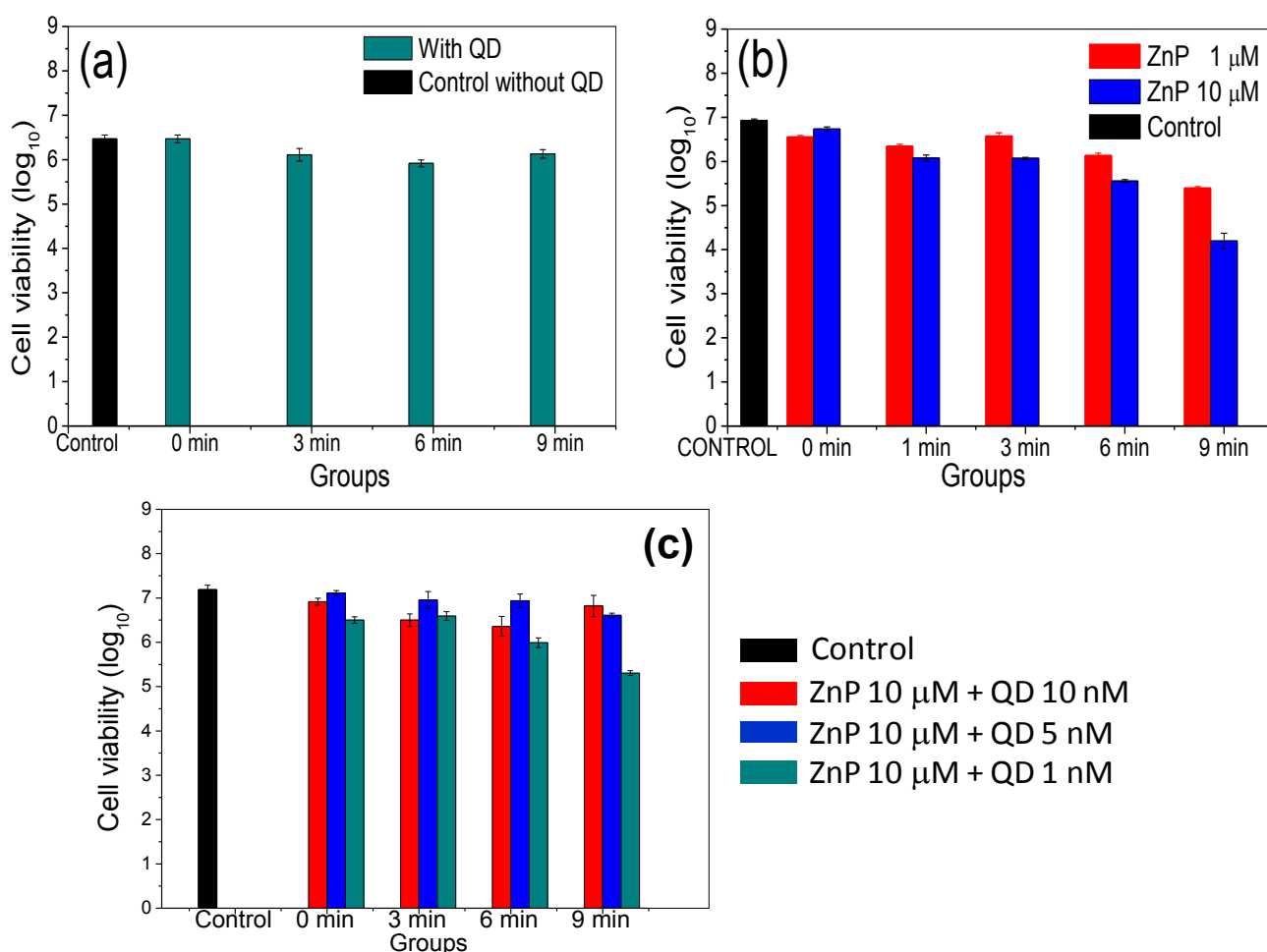


Figure 7. Evaluation of photodynamic inactivation of a culture of *Candida albicans* ATCC 10231. **(a)** Cell viability after addition of $20 \mu\text{L}$ of CdTe-MSA QD $10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, under different irradiation doses with LED 460 nm ($\pm 20 \text{ nm}$). Between the control group and the non-irradiated QD group (0 min) there is no

significant difference; there is a significant difference between the irradiated groups compared to the control group with p value < 0.01 ; **(b)** Cell viability after addition of 20 μL of ZnP 1 and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, under different irradiation doses with LED 460 nm (± 20 nm); there are statistically significant differences between all groups evaluated, with greater evidence for ZnP (10 μM) groups at times 6 and 9 min irradiation and ZnP (1 μM) in 9 min compared to the control group; **(c)** Cell viability after addition of 20 μL of different proportions of QDs-ZnP under different levels of irradiation. Control means non-irradiated cells. There are statistically significant differences between all groups evaluated, with greater evidence for QD-ZnP group (1 nM:10 μM and 9 min irradiation) compared to the control group. Control group (non-irradiated; incubation time = 9 min).

Energy transfer was suspected to be the main mechanism explaining the emission quenching of the QDs when the amount of ZnP molecules increases, as shown in Figure 4b, but this conclusion does not explain the PDI results. The PDI performance of the QDs and of the QDs-ZnP conjugates on *C. albicans* was almost negligible. In order to understand this result we have to remember that the overall PDI action takes into account the penetration of the PS within the cell and within the cell components. The cell distribution of ZnP and its analogues (*meta*- and *para*-ZnP, and similar Zn(II)*N*-alkylpyridylporphyrins) before and after light irradiation was already studied by some authors [16–18]. Ezzedine et al., showed that the methyl and ethyl ZnP porphyrins were dispersed in the cytosol and remained outside the nucleus, localizing predominantly in the lysosomes and that this distribution was concentration independent in the 5–20 μmol^{-1} range [18]. The PDI efficiency in cells depends highly on the PS cellular uptake by transmembrane channels and by endocytic processes. The conjugation of the ZnP molecules to the larger QDs (2–3 nm size) hinders an efficient transmembrane cellular uptake of the small porphyrin molecules (< 1 nm). Fungal cells are comprised of a cell wall structure preventing the uptake of bare CdTe-MSA QDs [67], and consequently of QDs-ZnP conjugates, and we suggest that this decreased the ZnP PDI action. Further studies are needed to better understand these aspects.

In the last decade quantum dots have emerged as new PS candidates in PDI processes. Their tunable emission capability, allied to their surface activity and high photoresistance are listed as their great advantages for diverse fluorescence applications. Among several authors Samia et al., summarized their potential in PDI processes [24], mainly as energy donors to conventional PS through FRET mechanisms or in energy transfer processes that result in the production of ROS. Our present results point out that although isolated QDs present the capability of generating ROS, their application in biological environments or even in clinic trials is still an issue to be thoroughly studied. Their ability of interfering in the cell viability in PDI is also dependent on their cell uptake and retention time in the biological system, especially

-VIANA, O.S.

for cells that do not perform endocytosis. Thus, modifications of these systems, such as targeting the QDs to the cell membranes may guarantee their effective applications.

3. Experimental Section

3.1. Synthesis of CdTe QDs and ZnP

The synthesis of CdTe-MSA QDs was carried out according to a previously reported method [68], using the following reagents and solutions: cadmium perchlorate solution $[\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2]$ $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, elementary tellurium (Te^0), sodium borohydride (NaBH_4) and mercaptosuccinic acid (MSA), all of them from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). The CdTe QDs were synthesized by mixing $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ (0.2 mmol) with the stabilizing agent (MSA, 0.46 mmol) in ultrapure water (40 mL). The pH of this mixture was adjusted according to the pKa of MSA and the mixture was heated to a constant temperature of 90°C ($\pm 5^\circ\text{C}$). In parallel, Te^{2-} ions were obtained by the NaBH_4 induced reduction of Te^0 (0.1 mmol), at a temperature of 70°C ($\pm 5^\circ\text{C}$) under an inert atmosphere (N_2). After complete reduction, the Te^{2-} solution was added to the Cd^{2+} solution, and the system heated long enough to grow the quantum dots to a desired size. Prior to application, the QDs were purified by filtration through a specific membrane (Pierce Concentrator 20 K MWCO, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The pH was kept constant during all experiments ($\text{pH} = 7.2$).

The porphyrin ZnTE-2-PyPCL₄ was synthesized by alkylation of the precursor Zn(II) *meso*-tetrakis (2-pyridyl)porphyrin (ZnT-2-PyP) [69] using an adaptation of a literature procedure [70]. ZnT-2-PyP (10 mg) and ethyl tosylate (400 μL = 469 mg) were dissolved in *N,N*-dimethylformamide (DMF, 2 mL) and heated to 110°C under magnetic stirring for 24 h. The ethylation reaction was monitored by thin layer chromatography and electronic absorption spectroscopy as reported for the Mn analogue [71]. The resulting ZnTE-2-PyP⁴⁺ sample was isolated and purified as the chloride salt (ZnTE-2-PyPCL₄) as described elsewhere [17,18]. Spectroscopic characterization data for ZnTE-2-PyP⁴⁺ (ZnP) were identical to those previously reported [17]. After synthesis, the CdTe QDs and ZnP solutions were diluted to a concentration of $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

3.2. Characterization of the Systems

The optical properties of CdTe nanocrystals and ZnP were evaluated by absorption, emission and excitation spectroscopy. The emission and excitation spectra were carried out on a PerkinElmer LS55 spectrofluorometer and the UV-Vis electronic absorption spectra were obtained using an Evolution 600 UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific). The absorption spectra were also used to estimate the mean size of the QDs. The molar concentrations of the CdTe-MSA QDs suspensions were calculated by the empirical method described by Yu et al. [53]:

$$d = (9.8127 \times 10^{-7}) \lambda^3 - (1.7147 \times 10^{-3}) \lambda^2 + (1.0064) \lambda - 194.84 \quad (2)$$

where d is the mean QD diameter and λ is the maximum wavelength in nm corresponding to the first excitonic absorption peak. The molar concentration was then calculated from the following equation:

$$c = A / (10043 \times d^{2.12}) \quad (3)$$

where d is the mean size of a given nanocrystals sample, A is the absorbance of the excitonic absorption peak of the corresponding sample, c is the molar concentration ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) of the QD suspension.

Structural characterization of CdTe nanoparticles was carried out by X-ray diffractometry (XRD) and transmission electron microscopy (TEM). TEM was performed using a Tecnai—G2-20-FEI 2006 (Hillsboro, Oregon, USA), 200 kV, transmission electron microscope. The X-ray diffractograms (XRD) of the nanocrystals were obtained between $2\theta = 15$ and 60° , using an Ultima Rigako®, 40 kV, 20 mA current diffractometer (Washington, DC, USA), with $k\alpha_{\text{(Cu)}} = 1.544 \text{ \AA}$ radiation. The diffractograms were used to obtain information related to the structural arrangement of the material and its crystalline profile. For XRD analysis, the samples were precipitated using 99% isopropyl alcohol, at a ratio of 1:1 (QD suspension/alcohol) and centrifuged at 3600 rpm for 5 min. Thereafter, the sediment was resuspended in acetone (99%, Merck, Darmstadt, Germany), distributed on a glass plate with evaporation of acetone and analyzed by XRD.

3.3. Characterization of QDs-ZnP Conjugates

In order to evaluate the optical characterization and the effects on ROS generation, we chose to associate by electrostatic interactions positively charged (ZnTE-2-PyP^{4+}) with negatively charged QDs (CdTe-MSA). The conjugation was performed by mixing fractions of QDs and ZnP under mechanical agitation. The molar proportions of QD and ZnP varied according to the type of test performed: (1) optical characterization and quenching evaluation [QDs-ZnP (1:0.12 to 1:1)]; (2) ROS production test [QDs-ZnP (0.12:1 to 1:1)]; (3) biological assays involving fibroblast cells and (4) *Candida albicans* [QDs-ZnP (1:1000 to 1:100)]. The chosen concentrations and molar ratios were defined according to the sensitivity of each test or based on values reported in the literature. The samples containing the mentioned mixtures of QDs and ZnP were evaluated by using absorption and emission spectroscopy and by zeta potential measurements (using a ZetaSizer Nano ZS90, Malvern, Worcestershire, UK). A preliminary study of the spectral behavior of the CdTe-MSA QDs conjugated to porphyrin molecules was performed. Aiming to evaluate a possible energy transfer of the QDs to the ZnP species during the photo-oxidation experiments, the solutions were excited at $\lambda = 460 \text{ nm}$ where negligible absorption of the ZnP was expected. This wavelength was determined after the optical characterization of the systems. Increasing amounts of ZnP were added to a fixed concentration of QDs maintaining a fixed volume.

3.4. Indirect Detection of ROS by the Oxidation of Nitrotetrazolium Blue (NBT)

-VIANA, O.S.

One of the tests used for the determination of ROS, especially superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) is the known NBT oxidation technique. This method uses nitroblue tetrazolium blue chloride (NBT—Sigma-Aldrich 99%) and nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) (Sigma-Aldrich 99%) as reagents. After addition of the photosensitizer (QDs or ZnP, or QDs-ZnP), the absorption was measured at $\lambda = 580$ nm wavelength. The evaluation of the production of ROS for the QDs, ZnP and the QDs-ZnP conjugate under irradiation of a 31 mW Light Emission Diode (LED) source at $\lambda = 420$ nm (± 20 nm) was analyzed according to the increase in optical density (OD) at 580 nm as a consequence of the oxidation of the NBT solution in the presence of NADH. This wavelength was chosen after the analysis of the spectral absorbance of the isolated species and is well absorbed by both. The samples were irradiated at one-minute intervals. The amounts of each reagent used in this procedure were $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (NADH), $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (NBT) and $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of the PS (QDs or ZnP) or molar ratios QDs-ZnP of 0.12:1 to 1:1.

3.5. Cytotoxicity of QDs and ZnP against Fibroblast Cells in the Presence and Absence of Radiation

We used fibroblasts to verify the cytotoxicity in mammalian cells and the possibility of using this approach, for instance, in human treatment of candidiasis. The cytotoxicity of the three samples (bare ZnP, bare QDs and conjugated samples) was initially evaluated in murine fibroblast cell lines (ATCC CRL 163) in the dark as well as after irradiation. The cells were kept in DMEM supplemented with antibiotics and antimycotics ($100 \text{ units}\cdot\text{mL}^{-1}$ penicillin, $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ streptomycin, and $0.025 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ amphotericin B), $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ glutamine, and 10% calf serum, at 37°C in a humidified 5% CO_2 atmosphere until they reached 80% confluence. For subculturing and for the experiments, cells were harvested using 0.05% trypsin and 0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in phosphate-buffered saline, pH 7.4. A suspension of cells was prepared at a concentration of 2×10^4 per $100 \mu\text{L}$ to be seeded in each well of a 96-cell culture plate and placed in a humidified incubator for 24 h at 37°C with 5% CO_2 atmosphere. The culture medium was removed and replaced with $100 \mu\text{L}$ of QDs, ZnP or QDs-ZnP conjugates, which had been diluted in Gey's buffer to a concentration range from 1 to $10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (QD); $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (ZnP) and $1\text{--}10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$: $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (QDs-ZnP). Two plates were prepared: one was exposed to light and the other was kept in the dark. The irradiated plate was kept protected from light for 10 min before being exposed to a 460 nm (± 20 nm) LED source and fluence rate of $150 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ for 9 min. The non-irradiated plate had the medium replaced with the samples and treated in the same way as for the irradiated plate but without light exposure (*i.e.*, the plate was left in the dark for 19 min). For both plates, the samples were then removed, the wells were washed twice with culture medium, new culture medium was added in, and the plates were returned to the incubator for 24 h. Standard solutions of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H tetrazolium (MTS), in the presence of phenazine methosulfate (PMS),

following the MTS/PMS protocol (Promega[®]—CellTiter 96[®] Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay) were used to quantify the cell viability according to the equation:

$$CV(\%) = \frac{OD_{treatment}}{OD_{control}} \times 100 \quad (4)$$

where: CV = cell viability, $OD_{treatment}$ = optical density of the sample in different concentrations at 490 nm, $OD_{control}$ = optical density of the non-irradiated cell at 490 nm. All numerical data were pooled for each condition. Datasets were analyzed using the software Statistica 7. Comparisons were made using one-way analysis of variance using ANOVA.

3.6. Photodynamic Inactivation of *Candida albicans*

A culture of the fungus *Candida albicans* ATCC 10231 was placed in Sabouraud medium and maintained at 37 °C for 24 h to obtain a microbial culture at the stationary growth stage. The cultures were centrifuged at 2000 rpm for 10 min and resuspended in phosphate buffer saline (PBS) to a concentration of 10^7 colony forming units (CFU)·mL⁻¹. This concentration was adjusted following the method described by Kato et al., using the transmittance obtained by the calibration curve at $\lambda = 540$ nm [38]. Aliquots of 180 μ L of microbial suspension were transferred to a 96-well plate. Subsequently, 20 μ L of photosensitizer (QDs, ZnP or QDs-ZnP) were added. The mixture was homogenized and incubated for 10 min (previously optimized incubation time). The concentrations of the QDs varied from 1 to 200 nmol·L⁻¹ and the concentration of ZnP used in the experiment was fixed at 10 μ mol·L⁻¹, based on previous assays and data in the literature [14,72]. After an incubation time of 10 min, the samples received different doses of irradiation using a blue LED with emission at $\lambda = 460$ nm (± 20 nm) with 150 mW·cm⁻². The experiment was carried out in such a way that the spread of light in each of the irradiated wells did not interfere with the next group tested. Irradiated and non-irradiated negative control groups (without PS) were used in the experiment. CFU were counted using the method proposed by Jeff et al. [73]. All assays were carried out in triplicate. The LEDs used in the experiments are commercially available for routine procedures in medicine and dentistry. Datasets were analyzed using the software Statistica 7. The differences between control and treatment groups were measured using one-way analysis of variance (ANOVA) and differences with p values of less than 0.01 were considered statistically significant.

4. Conclusions

The results of indirect detection of reactive oxygen species show the potential of CdTe-MSA quantum dots, ZnTE-2-PyP⁴⁺ porphyrin and their conjugates to generate ROS, although the same behavior was not observed in the photodynamic inactivation tests involving *Candida* -VIANA, O.S.

albicans. The CdTe QDs showed no effect in reducing cell viability of this microorganism, even after photo-activation. We believe that the PDI process was not effective on applying QDs due to the lack of uptake by the fungal cells. Moreover, in cytotoxicity assays, QDs and their conjugates were found to be more harmful against fibroblasts after light exposure. The use of isolated QDs or in combination with conventional photosensitizers for photodynamic therapy should therefore be investigated in greater depth. Conversely, the Zn(II) porphyrin proved to be promising for the photodynamic inactivation of *Candida albicans*. Detailed photophysical studies are also needed to better understand the phenomena of energy transfer between CdTe QDs and ZnP in order to better understand the photodynamic effects of these QDs- and ZnP-based PS on microorganisms and other biological systems.

Acknowledgments

Authors are grateful to the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica (INCT-Fotônica—INFo) and Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). The authors also thank FAPESP and CNPq for financial support.

Author Contributions

OSV participated in all experiments involved in the study; AR designed, performed and discussed the fibroblast cell viability test; JSR synthesized and characterized the porphyrins; MSR designed, performed and discussed the PDT experiments on the *C. albicans*; AF participated in the ROS measurements and spectroscopic characterization; BSS performed spectroscopic measurements and characterization of the materials. All authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References and Notes

1. Tanaka, M.; Kinoshita, M.; Yoshihara, Y.; Shinomiya, N.; Seki, S.; Nemoto, K.; Hirayama, T.; Dai, T.; Huang, L.; Hamblin, M.R.; et al. Optimal photosensitizers for photodynamic therapy of infections should kill bacteria but spare neutrophils. *Photochem. Photobiol.* **2012**, *88*, 227–232.
2. Yaghini, E.; Seifalian, A.M.; MacRobert, A.J. Quantum dots and their potential biomedical applications in photosensitization for photodynamic therapy. *Nanomedicine* **2009**, *4*, 353–363.
3. Simplicio, F.I.; Maionchi, F.; Hioka, N. Terapia fotodinâmica: Aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Quím. Nova* **2002**, *25*, 801–807.

-VIANA, O.S.

4. Chen, J.-Y.; Lee, Y.-M.; Zhao, D.; Mak, N.-K.; Wong, R.N.-S.; Chan, W.-H.; Cheung, N.-H. Quantum dot-mediated photoproduction of reactive oxygen species for cancer cell annihilation. *Photochem. Photobiol.* **2010**, *86*, 431–437.
5. Juzenas, P.; Chen, W.; Sun, Y.-P.; Coelho, M.A.N.; Generalov, R.; Generalova, N.; Christensen, I.L. Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1600–1614.
6. Tsay, J.M.; Trzoss, M.; Shi, L.; Kong, X.; Selke, M.; Jung, M.E.; Weiss, S. Singlet oxygen production by peptide-coated quantum dot-photosensitizer conjugates. *J. Am. Chem Soc.* **2007**, *129*, 6865–6871.
7. Machado, A.E.D.H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Quím. Nova* **2000**, *23*, 237–243.
8. Soukos, N.S.; Goodson, J.M. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontology 2000* **2011**, *55*, 143–166.
9. Cormick, M.P.; Alvarez, M.G.; Rovera, M.; Durantini, E.N. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* sensitized by tri- and tetra-cationic porphyrin derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 1592–1599.
10. O'Connor, A.E.; Gallagher, W.M.; Byrne, A.T. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: Preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **2009**, *85*, 1053–1074.
11. Caminos, D.A.; Spesia, M.B.; Pons, P.; Durantini, E.N. Mechanisms of *Escherichia coli* photodynamic inactivation by an amphiphilic tricationic porphyrin and 5,10,15,20-tetra(4-*N,N,N*-trimethylammoniumphenyl) porphyrin. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 1071–1078.
12. Lambrechts, S.; Aalders, M.; van Marle, J. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 2026–2034.
13. Benov, L.; Craik, J.; Batinic-Haberle, I. The potential of Zn (II) *N*-alkylpyridylporphyrins for anticancer therapy. *Anti-Cancer Agent Med. Chem.* **2011**, *11*, 233–241.
14. Benov, L.; Craik, J.; Batinic-Haberle, I. Protein damage by photo-activated Zn(II) *N*-alkylpyridylporphyrins. *Amino Acids* **2012**, *42*, 117–128.
15. Kee, H.L.; Bhaumik, J.; Diers, J.R.; Mroz, P.; Hamblin, M.R.; Bocian, D.F.; Lindsey, J.S.; Holten, D. Photophysical characterization of imidazolium-substituted Pd(II), In(III), and Zn(II) porphyrins as photosensitizers for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2008**, *200*, 346–355.
16. Odeh, A.M.; Craik, J.D.; Ezzeddine, R.; Tovmasyan, A.; Batinic-Haberle, I.; Benov, L.T. Targeting mitochondria by Zn (II) *N*-alkylpyridylporphyrins: The impact of compound sub-mitochondrial partition on cell respiration and overall photodynamic efficacy. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e108238.

17. Benov, L.; Batinić-Haberle, I.; Spasojević, I.; Fridovich, I. Isomeric *N*-alkylpyridylporphyrins and their Zn(II) complexes: Inactive as SOD mimics but powerful photosensitizers. *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *402*, 159–165.
18. Ezzeddine, R.; Al-Banaw, A.; Tovmasyan, A.; Craik, J.D.; Batinic-Haberle, I.; Benov, L.T. Effect of molecular characteristics on cellular uptake, subcellular localization, and phototoxicity of Zn(ii) *N*-alkylpyridylporphyrins. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 36579–36588.
19. Pavani, C.; Uchoa, A.F.; Oliveira, C.S.; Iamamoto, Y.; Baptista, M.S. Effect of zinc insertion and hydrophobicity on the membrane interactions and PDT activity of porphyrin photosensitizers. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 233–240.
20. Pavani, C.; Iamamoto, Y.; Baptista, M.S. Mechanism and efficiency of cell death of type ii photosensitizers: Effect of zinc chelation. *Photochem. Photobiol.* **2012**, *88*, 774–781.
21. Biju, V.; Itoh, T.; Anas, A.; Sujith, A.; Ishikawa, M. Semiconductor quantum dots and metal nanoparticles: Syntheses, optical properties, and biological applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 2469–2495.
22. Li, L.; Zhao, J.-F.; Won, N.; Jin, H.; Kim, S.; Chen, J.-Y. Quantum dot-aluminum phthalocyanine conjugates perform photodynamic reactions to kill cancer cells via fluorescence resonance energy transfer. *Nanoscale Res. Lett.* **2012**, *7*, 1–8.
23. Morosini, V.; Bastogne, T.; Frochot, C.; Schneider, R.; François, A.; Guillemain, F.; Barberi-Heyob, M. Quantum dot-folic acid conjugates as potential photosensitizers in photodynamic therapy of cancer. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10*, 842–851.
24. Samia, A.C.S.; Chen, X.; Burda, C. Semiconductor quantum dots for photodynamic therapy. *J. Am. Chem Soc.* **2003**, *125*, 15736–15737.
25. Ma, J.; Chen, J.-Y.; Idowu, M.; Nyokong, T. Generation of singlet oxygen via the composites of water-soluble thiol-capped cdte quantum dots sulfonated aluminum phthalocyanines. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 4465–4469.
26. Fontes, A.; Lira, R.B.D.; Seabra, M.A.B.L.; Silva, T.G.D.; Neto, A.G.D.C.; Santos, B.S. Quantum dots in biomedical research. In *Biomedical Engineering—Technical Applications in Medicine*, Hudak, R., Ed.; InTech: Rijeka, Croatia, 2012; Chapter 12, doi:10.5772/50214.
27. Farias, P.; Santos, B.; Menezes, F.; Cesar, C.; Fontes, A.; Lima, P.; Barjas-Castro, M.; Castro, V.; Ferreira, R. CdS Quantum dots, efficient fluorescent markers for red cells. *J. Microsc.* **2005**, *219*, 103–108.
28. Wu, X.; Liu, H.; Liu, J.; Haley, K.N.; Treadway, J.A.; Larson, J.P.; Ge, N.; Peale, F.; Bruchez, M.P. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotech.* **2003**, *21*, 41–46.
29. Gao, J.; Chen, K.; Xie, R.; Xie, J.; Yan, Y.; Cheng, Z.; Peng, X.; Chen, X. *In vivo* tumor-targeted fluorescence imaging using near-infrared non-cadmium quantum dots. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 604–609.

30. Bagalkot, V.; Zhang, L.; Levy-Nissenbaum, E.; Jon, S.; Kantoff, P.W.; Langer, R.; Farokhzad, O.C. Quantum dot-aptamer conjugates for synchronous cancer imaging, therapy, and sensing of drug delivery based on bi-fluorescence resonance energy transfer. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3065–3070.
31. Clarke, S.J.; Hollmann, C.A.; Zhang, Z.; Suffern, D.; Bradforth, S.E.; Dimitrijevic, N.M.; Minarik, W.G.; Nadeau, J.L. Photophysics of dopamine-modified quantum dots and effects on biological systems. *Nat. Mater.* **2006**, *5*, 409–417.
32. Alivisatos, A.P.; Gu, W.; Larabell, C. Quantum dots as cellular probes. *Ann. Rev. Biomed. Eng.* **2005**, *7*, 55–76.
33. Tekdaş, D.A.; Durmuş, M.; Yanık, H.; Ahsen, V. Photodynamic therapy potential of thiol-stabilized CdTe quantum dot-group 3A phthalocyanine conjugates (QD-Pc). *Spectrochim. Acta Part. A* **2012**, *93*, 313–320.
34. Jhonsi, M.A.; Renganathan, R. Investigations on the photoinduced interaction of water soluble thioglycolic acid (TGA) capped CdTe quantum dots with certain porphyrins. *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *344*, 596–602.
35. Xing, Z.; Zhongxin, L.; Lun, M.; Marius, H.; Wei, C. Interaction of porphyrins with CdTe quantum dots. *Nanotechnology* **2011**, *22*, 195501.
36. Rakovich, A.; Savateeva, D.; Rakovich, T.; Donegan, J.; Rakovich, Y.; Kelly, V.; Lesnyak, V.; Eychmüller, A. CdTe quantum dot/dye hybrid system as photosensitizer for photodynamic therapy. *Nanoscale Res. Lett.* **2010**, *5*, 753–760.
37. Chatterjee, D.K.; Fong, L.S.; Zhang, Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 1627–1637.
38. Kato, I.T.; Prates, R.A.; Sabino, C.P.; Fuchs, B.B.; Tegos, G.P.; Mylonakis, E.; Hamblin, M.R.; Ribeiro, M.S. Antimicrobial photodynamic inactivation inhibits *Candida albicans* virulence factors and reduces *in vivo* pathogenicity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 445–451.
39. Soares, B.M.; da Silva, D.L.; Sousa, G.R.; Amorim, J.C.F.; de Resende, M.A.; Pinotti, M.; Cisalpino, P.S. *In vitro* photodynamic inactivation of *Candida* spp. growth and adhesion to buccal epithelial cells. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2009**, *94*, 65–70.
40. Dai, T.; Fuchs, B.B.; Coleman, J.J.; Prates, R.A.; Astrakas, C.; St. Denis, T.G.; Ribeiro, M.S.; Mylonakis, E.; Hamblin, M.R.; Tegos, G.P. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 120.
41. Gómez-López, A.; Zaragoza, O.; Rodríguez-Tudela, J.L.; Cuenca-Estrella, M. Pharmacotherapy of yeast infections. *Expert Opin. Pharmacother.* **2008**, *9*, 2801–2816.
42. Brion, L.P.; Uko, S.E.; Goldman, D.L. Risk of resistance associated with fluconazole prophylaxis: Systematic review. *J. Infect.* **2007**, *54*, 521–529.
43. Oriel, S.; Nitzan, Y. Photoinactivation of *Candida albicans* by its own endogenous porphyrins. *Curr. Microbiol.* **2010**, *60*, 117–123.

44. Mora, S.J.; Cormick, M.P.; Milanesio, M.E.; Durantini, E.N. The photodynamic activity of a novel porphyrin derivative bearing a fluconazole structure in different media and against *Candida albicans*. *Dyes Pigments* **2010**, *87*, 234–240.
45. Walther, J.; Bröcker, M.J.; Wätzlich, D.; Nimtz, M.; Rohde, M.; Jahn, D.; Moser, J. Protochlorophyllide: A new photosensitizer for the photodynamic inactivation of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **2009**, *290*, 156–163.
46. Yin, R.; Wang, M.; Huang, Y.-Y.; Landi, G.; Vecchio, D.; Chiang, L.Y.; Hamblin, M.R. Antimicrobial photodynamic inactivation with decacationic functionalized fullerenes: Oxygen-independent photokilling in presence of azide and new mechanistic insights. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, *79*, 14–27.
47. Gonzales, F.P.; Felgenträger, A.; Bäumler, W.; Maisch, T. Fungicidal photodynamic effect of a twofold positively charged porphyrin against *Candida albicans* planktonic cells and biofilms. *Future Microbiol.* **2013**, *8*, 785–797.
48. Rosseti, I.; Chagas, L.; Costa, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) inhibits biofilm formation by *Candida albicans*, increasing both ROS production and membrane permeability. *Lasers Med. Sci.* **2014**, *29*, 1059–1064.
49. Joint Committee on Powder Diffraction Standards. In *Powder Diffraction File Search Manual*; JCPDS: Swarthmore, Pennsylvania, USA, 2009, Index card: 00-015-0770.
50. Frasco, M.; Vamvakaki, V.; Chaniotakis, N. Porphyrin decorated CdSe quantum dots for direct fluorescent sensing of metal ions. *J. Nanopart Res.* **2010**, *12*, 1449–1458.
51. Silva, F.O.; de Souza Viol, L.C.; Ferreira, D.L.; Alves, J.L.A.; Schiavon, M.A. O estado da arte da síntese de semicondutores nanocristalinos coloidais. *Quim. Nova* **2010**, *33*, 1933–1939.
52. Rogach, A.L.; Franzl, T.; Klar, T.A.; Feldmann, J.; Gaponik, N.; Lesnyak, V.; Shavel, A.; Eychmüller, A.; Rakovich, Y.P.; Donegan, J.F. Aqueous synthesis of thiol-capped CdTe nanocrystals: State-of-the-art. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 14628–14637.
53. Yu, W.W.; Qu, L.; Guo, W.; Peng, X. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 2854–2860.
54. Kalyanasundaram, K. Photochemistry of water-soluble porphyrins: Comparative study of isomeric tetrapyrrolyl- and tetrakis(N-methylpyridiniumyl)porphyrins. *Inorg. Chem.* **1984**, *23*, 2453–2459.
55. Kowerko, D.; Schuster, J.; Amecke, N.; Abdel-Mottaleb, M.; Dobrawa, R.; Wurthner, F.; von Borczyskowski, C. FRET and ligand related NON-FRET processes in single quantum dot-perylene bisimide assemblies. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 4112–4123.
56. Blaudeck, T.; Zenkevich, E.I.; Cichos, F.; von Borczyskowski, C. Probing wave functions at semiconductor quantum-dot surfaces by non-FRET photoluminescence quenching. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 20251–20257.
57. Clapp, A.R.; Pons, T.; Medintz, I.L.; Delehanty, J.B.; Melinger, J.S.; Tiefenbrunn, T.; Dawson, P.E.; Fisher, B.R.; O'Rourke, B.; Mattoussi, H. Two-photon excitation of quantum-

- dot-based fluorescence resonance energy transfer and its applications. *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 1921–1926.
58. Medintz, I.L.; Clapp, A.R.; Melinger, J.S.; Deschamps, J.R.; Mattoussi, H. A reagentless biosensing assembly based on quantum dot-donor Förster resonance energy transfer. *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 2450–2455.
 59. Paszko, E.; Ehrhardt, C.; Senge, M.O.; Kelleher, D.P.; Reynolds, J.V. Nanodrug applications in photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2011**, *8*, 14–29.
 60. Medintz, I.L.; Mattoussi, H. Quantum dot-based resonance energy transfer and its growing application in biology. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 17–45.
 61. Benov, L. Photodynamic therapy: Current status and future directions. *Med. Princ. Pract.* **2015**, *24* (Suppl. 1), 14–28.
 62. Garcez, A.S.; Nunez, S.C.; Baptista, M.S.; Daghasanli, N.A.; Itri, R.; Hamblin, M.R.; Ribeiro, M.S. Antimicrobial mechanisms behind photodynamic effect in the presence of hydrogen peroxide. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10*, 483–490.
 63. Liebmann, J.; Born, M.; Kolb-Bachofen, V. Blue-light irradiation regulates proliferation and differentiation in human skin cells. *J. Invest. Dermatol.* **2009**, *130*, 259–269.
 64. Lavi, R.; Shainberg, A.; Friedmann, H.; Shneyvays, V.; Rickover, O.; Eichler, M.; Kaplan, D.; Lubart, R. Low energy visible light induces reactive oxygen species generation and stimulates an increase of intracellular calcium concentration in cardiac cells. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 40917–40922.
 65. Sauer, H.; Wartenberg, M.; Hescheler, J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell. Physiol. Biochem.* **2001**, *11*, 173–186.
 66. Castano, A.P.; Demidova, T.N.; Hamblin, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodyn. Ther.* **2004**, *1*, 279–293.
 67. Tenório, D.P.L.A.; Andrade, C.G.; Cabral Filho, P.E.; Sabino, C.P.; Kato, I.T.; Carvalho, L.B., Jr.; Alves, S., Jr.; Ribeiro, M.S.; Fontes, A.; Santos, B.S. CdTe quantum dots conjugated to concanavalin A as potential fluorescent molecular probes for saccharides detection in *Candida albicans*. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2015**, *142*, 237–243.
 68. Andrade, C.G.; Cabral Filho, P.E.; Tenório, D.P.; Santos, B.S.; Beltrão, E.I.; Fontes, A.; Carvalho L.B., Jr. Evaluation of glycophenotype in breast cancer by quantum dot-lectin histochemistry. *Int. J. Nanomed.* **2013**, *8*, 4623.
 69. Rebouças, J.S.; de Carvalho, M.E.M.D.; Idemori, Y.M. Perhalogenated 2-pyridylporphyrin complexes: Synthesis, self-coordinating aggregation properties, and catalytic studies. *J. Porphyr. Phthalocyan* **2002**, *6*, 50–57.
 70. Tovmasyan, A.; Weitner, T.; Sheng, H.; Lu, M.; Rajic, Z.; Warner, D.S.; Spasojevic, I.; Rebouças, J.S.; Benov, L.; Batinic-Haberle, I. Differential coordination demands in Fe

versus Mn water-soluble cationic metalloporphyrins translate into remarkably different aqueous redox chemistry and biology. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 5677–5691.

71. Rebouças, J.S.; Spasojević, I.; Batinić-Haberle, I. Quality of potent Mn porphyrin-based SOD mimics and peroxynitrite scavengers for pre-clinical mechanistic/therapeutic purposes. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *48*, 1046–1049.
72. Wu, C.; Shi, L.; Li, Q.; Jiang, H.; Selke, M.; Ba, L.; Wang, X. Probing the dynamic effect of Cys-CdTe quantum dots toward cancer cells *in vitro*. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *23*, 82–88.
73. Jett, B.; Hatter, K.; Huycke, M.; Gilmore, M. Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. *Biotechniques* **1997**, *23*, 648–650.

Sample Availability: Not available.

© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

APÊNDICE 2: Quantum dots in photodynamic therapy (capítulo do livro *Redox-active therapeutics* – Springer editor)

Quantum Dots in Photodynamic Therapy

Osnir S. Viana¹, Martha S. Ribeiro², Adriana Fontes³ and Beate S. Santos¹

¹ Pharmaceutical Sciences Department, Pernambuco Federal University, Recife, Brazil.

² Center for Lasers and Applications, Nuclear and Energy Research Institute, National Nuclear Energy Commission, São Paulo, Brazil.

³ Biophysics and Radiobiology Department, Pernambuco Federal University, Recife, Brazil.

1. Introduction

Since the first applications of nanostructured semiconductor materials in heterogeneous photocatalysis in the 1980s, their unique optical and electrical properties have opened up several research fields. These semiconductor nanoparticles were denominated “Quantum Dots” (QDs) when grown to a certain size regime where their optical and electrical properties could be controlled by the dimensions of the nanocrystals. Soon, their optical and electric properties attracted scientists at the biomedical and health interfaces and the first accomplishments of these QDs included the concept of a new class of fluorescent biolabels. A deeper knowledge of the preparation, stabilization, and characterization of these systems allowed their recent applications in Photodynamic Therapy. Photodynamic Therapy (PDT) is a well-established clinical treatment modality for various diseases, including especially malignant tumors (e.g., melanoma, esophagus, and bladder cancers) and antimicrobial inactivation. This treatment is based on the administration of a photosensitizer, which induces the production of oxygen reactive species upon excitation by light within the targeted tissue, causing cellular death by oxidative stress. Only in the last decade (>2000s) QDs have emerged as new photosensitizer candidates in PDT processes [1-3] and although a deeper scenario must still be drawn, a great number of studies may be mentioned delineating the state of the art of their applications in this treatment modality. In the following sections of this Chapter we will present the fundamentals of Photodynamic Therapy and some features related to QDs as active redox materials. The last section in the Chapter summarizes the QD applications in PDT and shows that more studies are still needed to completely understand the therapeutic role of these nanoparticles.

2. Photodynamic Therapy

Photodynamic therapy (PDT) is the application of light-activated photosensitizers (PSs) in the presence of oxygen for either host cell destruction, as desired in cancer PDT, or antimicrobial purposes (also known as photodynamic inactivation, PDI). This process results in light-activated transfer of energy or electrons from the PS molecule to the surrounding environment. The first step in this process is administering the PS to the target, which may be achieved by topical (skin lesions and cancer) or systemic (mainly in cancer PDT) routes. After a certain period of time (pre-irradiation

-VIANA, O.S.

time) sufficient to allow biodistribution of PS, the treatment site is irradiated. The absorption of light by PS induces a cascade of photochemical reactions producing reactive oxygen species (ROS). Subsequently, there is the generation of multiple redox processes that installs oxidative stress in the site of action leading to irreversible damage to the target cell and/or tissue.

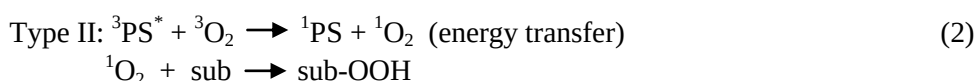
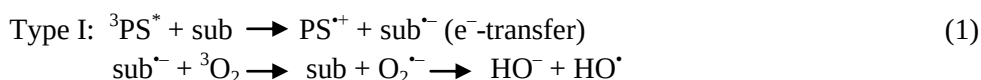
The first experiences with PDT date from about 115 years ago, reported by Raab, who observed that the exposure of paramecium to acridine dye and light could be lethal to the protozoan that causes malaria disease. He postulated that this effect was caused by the transfer of the luminous energy to the chemical environment within the cell, similarly to the process that occurs in plants by the absorption of light by chlorophyll. Neither the dye nor the light alone had any apparent effect on the paramecium organisms, but together they were highly cytotoxic [4]. In 1903, Von Tappeiner and his colleague Jesionek attempted to apply PDT in humans, for treatment of cancerous, syphilitic, and tuberculosis skin conditions [5].

Since then, several examples of photodynamic effect were observed for a variety of photosensitizers, both *in vitro* and *in vivo*. The research then took a different turn, leading to concentration of studies in the diagnosis and fight against cancer and the development of new photosensitizers and new light sources. In 1972, Diamond and colleagues tried to destroy tumor cells with hematoporphyrin association, currently one of the photosensitizing agents more accepted, with X-ray exposure. However, experiments were unsuccessful, demonstrating that the light source (*i.e.* its electromagnetic radiation) should be in resonance with the absorption spectrum of the dye photosensitizer [6].

Diseases, such as macular degeneration of the retina, several types of cancer, psoriasis, fungal and bacterial infections, warts, which are characterized by an abnormal growth of cells, are also being treated by photodynamic effect [2, 7, 8].

The photodynamic effect depends on the combined action of drugs that are photoactivated (photosensitizers) by a specific wavelength and energy of light, to destroy pathogenic organisms or tissues that have rapid multiplication. The photodynamic process is based on the photo-oxidation of organic matter. The presence of PS, oxygen, and light irradiation at the site to be treated is needed. When PS absorbs light, it goes from the ground state to an excited state. The return to the ground state may take place through a triplet state, which then reacts with either the substrate (mechanism type I) or with molecular oxygen (mechanism type II) (Figure 1).

Representative type I and type II reactions are expressed in Equations 1 and 2, respectively:



where *sub* is substrate. Thus, reactive oxygen species (hydroxyl radical, superoxide anion, hydrogen peroxide in reaction type I, and singlet oxygen in reaction type II) are generated locally resulting in cell death in tumor tissue or inactivation of infectious agents by oxidative stress.

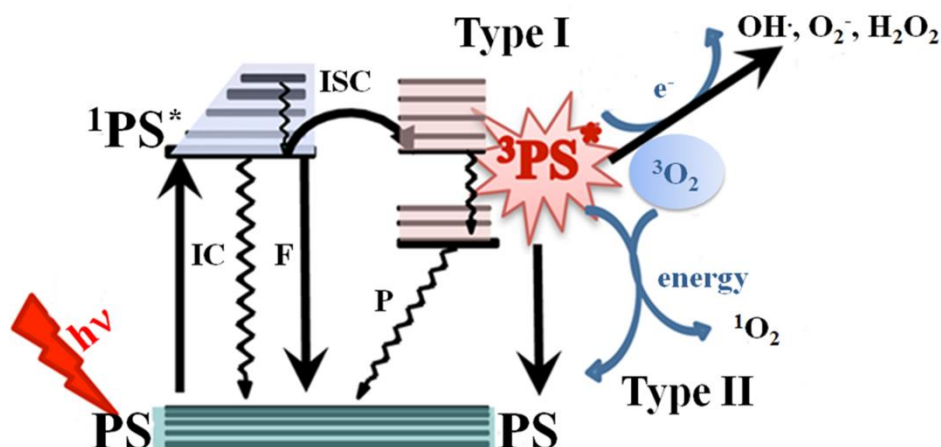


Figure 1 - Modified Jablonski diagram adapted from personal communication of Michael R. Hamblin. The photosensitizer in the ground state (^0PS) absorbs luminous energy ($E = h\nu$) resulting in an excited singlet state ($^1\text{PS}^*$). Returning to the ground state, the excited photosensitizer may undergo a transition to its triplet excited state ($^3\text{PS}^*$), where it may have two types of reaction. In the type I reaction, it can react directly with the substrate, such as the cell membrane or a molecule, transferring electrons (e^-) to form a radical or radical ion in both PS and substrate. These radicals can further interact with oxygen to produce oxidized products. Otherwise, in the type II reaction, the excited photosensitizer transfers its energy directly to molecular oxygen ($^3\text{O}_2$), to produce singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), a highly reactive oxygen species, which may oxidize the substrate. IC: internal conversion; F: fluorescence; ISC: intersystem crossing; P: phosphorescence.

Literature strongly supports the hypothesis that PDT can represent a viable alternative to treat cancer and infectious diseases. For cancer, the major favorable features of PDT comprise the avoidance of systemic treatment, selectivity for malignant cells, and repeatability. Regarding antimicrobial PDT (PDI), main advantages are the broad spectrum of action (bacteria, yeasts, and parasitic protozoa), outcome is independent of the antibiotic resistance pattern of the microbial strain, wide decrease in pathogens with minimal damage to the host tissue, absence of selection of photoresistant strains after multiple treatments, and lack of mutagenicity. In addition, PDT is a low cost and minimally invasive localized therapy.

For successful PDT, biological, physical, and chemical factors should be considered. The selectivity and retention of the photosensitizer by the target cell is of utmost importance. Additionally, the intensity of light reaching the treatment region should be adequate to promote oxidizing effects on PS. Different types of organic molecules and complexes have been synthesized and studied as PS agents for use in PDT, such as phenothiazines, porphyrins and their derivatives, chlorins and phthalocyanines [9]. Although literature reports successful of PDT for treatment of some types of cancer and resistant infections in clinical trials, few photosensitizing agents have been produced commercially, due to the difficulty in obtaining stable and highly efficient photosensitizers. Therefore, the search for new alternatives has driven the use of nanoparticles for this type of therapy, and QDs as a unique class of nanostructured fluorophores appear as promising alternative PS [10].

3. Quantum Dots – A Brief Review

The resizing of many materials from macroscopic to the nanoscale world has revealed that their physical and chemical properties could be changed drastically, depending on their size and shape. These features were key factors for the nanotechnology success. Among these materials, there are the nanocrystals of semiconductor materials in the quantum confinement regime, also known as Quantum Dots (QDs) [11, 12].

QDs are fluorescent colloidal nanocrystals composed by semiconductor materials mainly comprised of II-VI or II-V chemical elements in binary or ternary combinations. With dimensions ranging from 2 to 10 nm, they present unique optical properties, such as their size-dependent fluorescence wavelength and great photostability. Due to these special properties, QDs have been applied as fluorescent probes for molecular, cellular, and *in vivo* imaging, cytometry and fluoroimmunoassays, for biosensors and also, more recently, as photosensitizer in photodynamic therapy [13-24]. As fluorescent probes, QDs present the following advantages:

- (a) Broad absorption spectrum band, which allows the fluorescence excitation of different QDs sizes at the same time (Figure 2(a)) [14].
- (b) Fluorescence emission tuned according only to the nanoparticle size, for QDs synthesized from the same semiconductor materials, which provides access to a wide range of fluorophores colours tuned by the particle size (Figure 2(b)).
- (c) Narrower and symmetric emission bands (full width at half-maximum $\sim$ 25-40 nm), from the blue to the near infrared region, which allow multicolour analyses avoiding spectral crosstalk.
- (d) Large Stokes shift (Figure 2(a)), interesting for experiments with QDs as FRET (Forster Resonance Energy Transfer) donors for minimizing the possibility of direct excitation of the acceptors [25].
- (e) Long emission lifetimes (dozens to hundreds of nanoseconds), allowing elimination of cell autofluorescence (which has considerably shorter lifetime) by fluorescence lifetime analysis.
- (f) Higher brightness and photostability, especially for core/shell QDs, which presents an even greater resistance against photobleaching (1000-fold more photostable than organic compounds), allowing the follow up of events by fluorescence detection for long periods [26, 27].
- (g) An active surface for chemical conjugation. The QDs can be conjugated to a variety of biomolecules and become hybrid (inorganic-biological) nanoparticles combining the characteristics of the two materials, the fluorescence properties of the QDs and the biochemical functions of the conjugated biomolecule, allowing analysis with a high specificity (Figure 2(c)) [22]. The conjugation can be achieved electrostatically, by adsorption, or by covalent bonding.

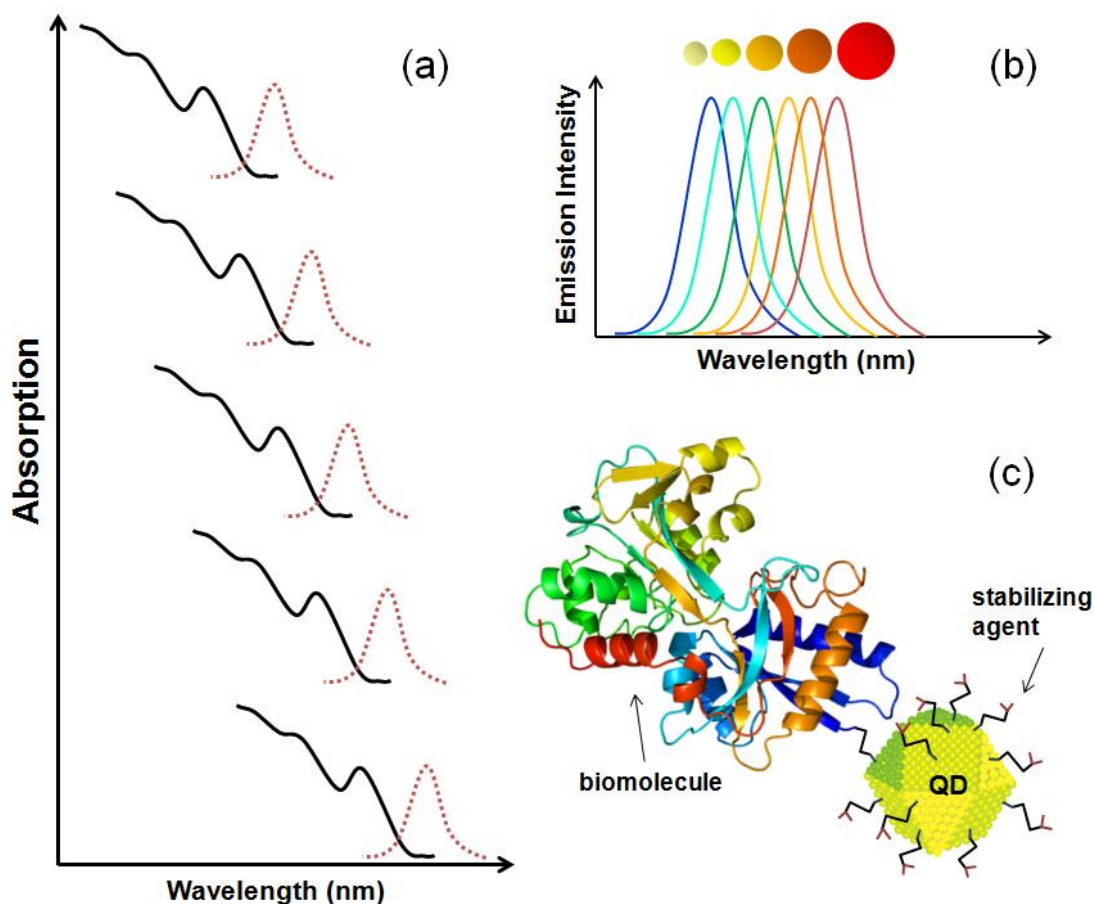


Figure 2 – Some interesting optical and structural properties of II – VI semiconductor quantum dots. (a) Size-dependent behaviour of absorption and emission spectra. (b) Characteristic size-dependent narrow emission band profile of the nanocrystals. (c) Chemical active surface of the quantum dots, allowing the bioconjugation of targeting molecules.

QDs are generally constituted of atoms of elements from the II-VI (for example: CdS, CdSe and CdTe) or III-V (such as, InP and InAs) groups of the periodic table. Semiconductors from the two groups have been extensively studied and can be prepared using colloidal synthesis involving organic or inorganic building blocks, depending on the solvent (organic or aqueous, respectively) to render hydrophilic or hydrophobic QDs [26, 28-31]. In general, semiconductors III-V QDs are more difficult to prepare due to their physico-chemical nature and hydrophobic, or hydrophilic, II-VI QDs became then more popular fluorescent probes than III-V QDs.

As QDs are synthesized from semiconductor materials, their electronic description are characterized by energy band profiles, which contrasts with that of molecular energy level description of ordinary single molecules. The most important optical properties of these materials are related to their valence band and their conduction band, which are separated by an energy band gap (E_g). This energy band gap depends on the intrinsic nature of the QDs. After light excitation, the electrons from valence band are promoted to the conduction band and this transient charge separation within the particle is called “exciton”. After being excited to the conduction band, electrons return to the valence band producing the excitonic recombination and producing fluorescence. The colour of the fluorescence is proportionally related to the QD band gap. The higher the QD band gap, the more energetic is the observed emission band. The exciton is described as an independent electronic species,

which possesses an electronic level configuration distinct from that of the band energy of the semiconductor material, defined by its exciton Bohr radius. When the nanocrystals reach the size dimension of the exciton Bohr radius of that semiconductor material, their excitons sense the size confinement and as consequence the nanocrystals' energy levels modify. This is called the quantum confinement of the exciton and it is possible to tune the band gap energy and consequently the optical properties in this size regime (as depicted in Figure 2(a-b)). The size regime in which the quantum-confinement effect is observed is dependent on the chemical nature of QD composition. QDs are semiconductor nanocrystals quantum-confined in all three dimensions (3D) and as a consequence, smaller QDs present higher band gaps than larger QDs. Thus, smaller QDs present fluorescence towards to the blue spectral region and, in the other hand, larger QDs emit light toward the red spectral region reaching, occasionally, the infrared spectral region (as in the case of PbS QDs).

The QDs absorption and emission spectra can offer important information about these nanoparticles. The position (wavelength) and width of the maximum of the first absorption band (Figure 2(a)) is related to the nanoparticles size and size dispersion, respectively. The particle size of CdS and CdTe QDs have been correlated experimentally to their absorption band maximum wavelengths; the absorbance intensity can also provide the nanoparticles' concentrations for CdTe QDs [26, 32, 33]. Additionally, the width of the emission spectrum reflects the combination of the excitonic emission and the presence of crystal surface defects. The presence of surface dangling bonds result in new electronic state traps between the valence and conduction bands. These new electronic states are responsible for the red shift and an enlargement of the emission band [14, 31, 34]. Figure 3 depicts the radiative pathways usually observed for light excited QDs.

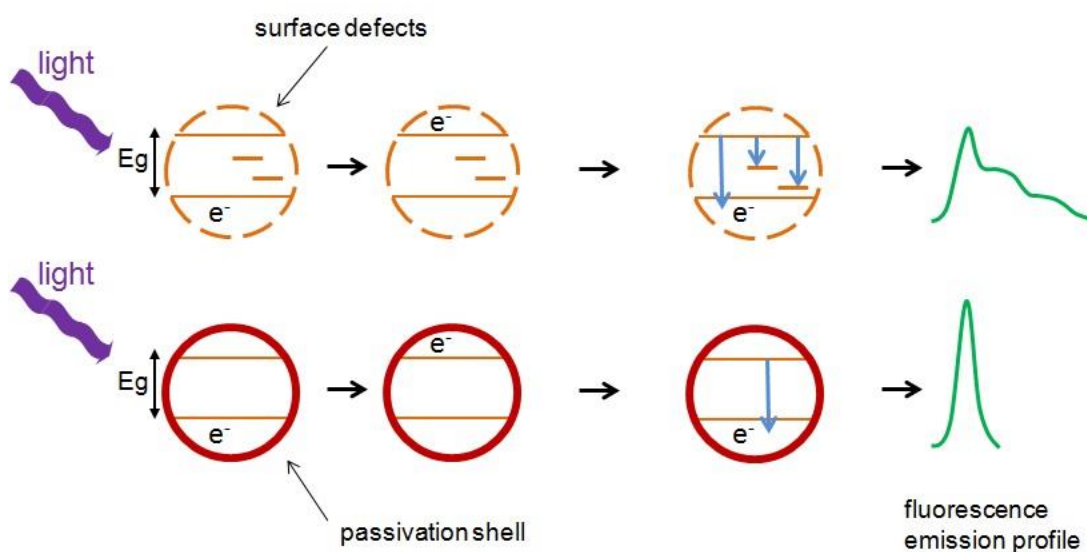


Figure 3 – Light deactivation pathways observed in QDs. For surfaces where defects are in great concentration, the emission band is composed of wide bands of lower energy than that observed for the electron excitonic recombination band.

The emission quantum yield of these systems is related to the energy conversion output in excitonic recombination processes. In order to decrease the possibility of energy losses by traps, the dangling bonds of the QDs may be compensated by growing a shell on the semiconductor core. QDs semiconductor core can be capped with organic or inorganic materials. For emission enhancement purposes a shell of another semiconductor material of greater band gap is usually applied. This

-VIANA, O.S.

chemical shell is called passivation shell and is formed by depositing some monolayers of a second semiconductor onto the QD core to guarantee a physical separation of the optically active core from the surrounding medium. This removes the trapping electronic states and reduces the QDs sensitivity to chemical changes of the neighbouring environment, which results in improved optical properties (Figure 3) [35].

QDs can label living biological systems by non-specific and specific interactions. Usually the labeling of living cells by QDs is limited to the membranes. The use of QDs for intracellular study is still restricted because their passage through the cell membrane does not occur passively. QDs usually are internalized by cells and become trapped in endocytic vesicles, requiring the development of methods to deliver them freely into the cytosol. The internalization process depends either on the QDs properties (such as size, shape, surface functionalization, surface charge, and the combination of these properties) or on the cell type, for example: cell lineage, metabolic state, cell cycle stage, normal or cancerous cells [31, 36, 37].

As the stages of preparation, conjugation, and application of QDs in biology are relatively well established, there is a growing interest in test these nanocrystals in clinical research. Although promising, there is noteworthy concern in using QDs in humans due to the potential risk of toxicity, especially when they are based on heavy metals such as cadmium [38]. In this context, QDs of different compositions and coatings are being evaluated not only in *in vitro* cell culture assays, but also in *in vivo* small animal and primates experiments [39]. Although there are QDs based on InP, ZnSe and silicon that can be considered less toxic, QDs based on cadmium stand for their optical quality and good fluorescence intensity.

One of the alternatives explored to minimize the effect of QD toxicity is to modify their surface with materials that form a protective shell around the core of the nanocrystal. Among the types of coatings, there are: (1) polyethylene glycol, which is able to circumvent the immune system responses and (2) zinc-based shells, as this is an essential element for humans. These coatings can be important to avoid degradation of cadmium-based QD cores and consequently release of toxic Cd^{2+} ions. A study using mass spectrometry showed that the release rate of Cd^{2+} ions resulting from the deterioration of the core was greater in CdTe QDs without passivation layer. Conversely, the release of Cd^{2+} ions from coated QDs was lower, which resulted thus in lower toxicity, especially when QD were coated with a zinc shell [40].

In terms of biodistribution, hydrophilic QDs based on cadmium tend to concentrate in the liver in the first four hours after injection. A greater accumulation of QDs in kidney was observed over the following days, with QDs being detected in the body even after 80 days. Despite this long-term QDs accumulation it was not observed toxicity in mice in *in vivo* studies, even after QDs decomposition [41]. Controversially, cytotoxicity has been observed for Cd^{2+} QDs in *in vitro* studies. Although considerable information aroused from toxicity studies, further investigations are still needed to provide better conclusions on QDs toxicity and to address the consequences of their use in clinical research [42]. Aspects such as the QDs toxicity and the QDs interaction with living biological systems are critical to the development of QDs as photosensitizers.

3. Photodynamic Therapy and Quantum Dots

Almost a decade after QDs were successfully applied as fluorescent nanolabels in biological systems, their potential as ROS inductors for PDT started to be tested [43]. What attracted scientists to apply these nanocrystals as PSs was their known capability of selectively transferring energy and/or

charge to the surrounding species when excited by light. Unlike most organic photosensitizers, QDs do not have metastable excited states, which can promote effective energy transfer, and distinct processes are expected to occur in these systems to yield reactive oxygen species [44]. Two processes namely type I and type II (depicted in Figure 4), are described in the literature as possible mechanisms for QD-promoted ROS production.

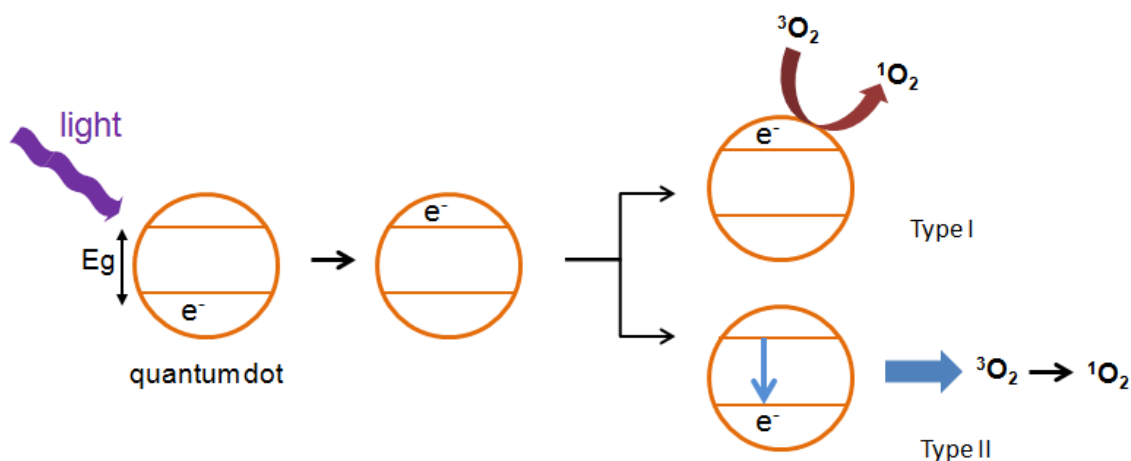


Figure 4 – Light excitation of QDs followed by their possible mechanisms (type I and II) of producing ROS.

In the so called type I induced photoreaction, QDs absorb a photon and produce electron-hole pairs, named excitons. These excited electrons normally return to the ground state emitting light but they may also migrate to electronic traps present on the surface of the QDs. These trapped electrons may eventually be scavenged by O_2 or O-containing molecules present in the surrounding medium, resulting in ROS production. This effect is even more expected for unpassivated QDs or those that were partially corroded by chemical processes exposing unshared bonds and increasing electronic traps. Some authors observed that up to a certain amount of corrosion of CdTe QD surface in water, the particles increased their ROS production, indicating a successful trapping of electrons at the surface electronic levels [44, 45].

The type II photoreactions induce the excitation of the surrounding species after the primary excitation of QDs followed by relaxation *via* electron-hole recombination. This transferred energy may be sufficient to promote singlet oxygen (1O_2) species. For these processes, efficient luminescence is a determining factor for ROS production efficiency.

In the late 1980s some authors reported on the energy transfer occurring between QDs and other species (molecules, proteins, and nanoparticles). The first attempts observed in the literature of producing ROS using QDs were summarized by Samia and coworkers in 2003 [43]. They found that direct photoactivation of QDs produces singlet oxygen (1O_2) due to the excitonic energy transfer from QD to molecular oxygen (3O_2) (Figure 5); this process is marked, however, by an energy transfer of low efficiency. Some years later Lovric *et al.* [46] were studying the cytotoxicity of QDs and they observed that one of the mechanisms related to their toxicity involved the production of reactive oxygen species within the cell milieu. They concluded that applying bare QDs to biological systems caused a greater cell injury including damage to the plasma membrane, mitochondrion, and nucleus. Moreover, they suggested that QDs induced ROS formation and demonstrated that they avoided the

oxidative processes by treating the cells with molecular antioxidants such as *N*-acetylcysteine or by surface modifications of QDs.

Alternatively there is also a third indirect process by which QDs may induce ROS production. This process involves the QD energy transfer (via radiative or non-radiative manner by FRET) to other PS species present nearby the nanoparticles (Figure 5). In this case the PS molecules attached to the particles or present in the colloidal medium can be activated by radiative or non-radiative energy transfers and re-emit at a wavelength more prone to be absorbed by the cells and tissues (i.e. > 600 nm).

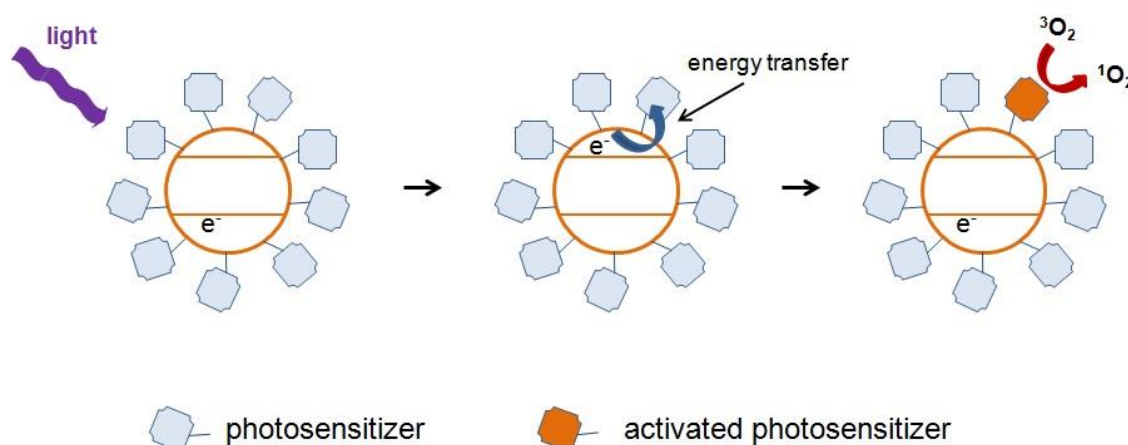


Figure 5 – ROS production process of QDs associated to other PS molecules.

The use of QDs associated with photosensitizers has attracted the attention of many researchers particularly due to the ability of QDs to produce light over a broad range of wavelengths, which can be tuned to the correct wavelength to excite the PS [47-52]. Several authors have tried to increase the PS efficiency by exciting the associated QDs, expecting to induce energy transfer to organic PS compounds, such as porphyrins, phthalocyanines, dopamine, methylene blue, and peptides, or to inorganic complexes. Since the light extinction coefficients of QDs are one order of magnitude larger than that of PSs, the conjugation of QDs-PS seems a potential strategy to increase the PDT effect. Nevertheless the expectation, in the majority of cases the quantum yields observed for ROS production by the QDs-PS conjugates have been found to be lower than that of the free PS. Other energy wasting processes, such as self-quenching of PS on the QD shell, are accounted for this inefficiency [53].

We observe that in a period of over a decade several systems have been tested for PDT applications: bare QDs, QDs in the presence of other PS molecules and QDs attached to PS molecules. QDs of CdSe and CdTe have been the main systems tested. Some examples of systems tested in PDT are described in Table 1.

Table 1 - Studies exemplifying the application of QDs as photosensitizers in PDT.

QD	PS	Main Results	References
----	----	--------------	------------

QD	PS	Main Results	References
CdSe	Phthalocyanine	The system produced $^1\text{O}_2$ via FRET by the system. ROS was also produced by the QDs but they were less effective.	[43]
CdSe/CdS/ZnS	Rose Bengal and Chlorine e_6	PS produced $^1\text{O}_2$ via FRET with a quantum yield in the range of 0.1 – 0.3 depending on their excitation conditions and of the applied PS.	[51]
CdTe-Thiol	Sulphonated Aluminum Phthalocyanine	The conjugation of QDs to the PS increased ~15% the $^1\text{O}_2$ quantum yield.	[54]
CdTe	Methylene blue (MB)	QDs within the PS solution contributed to a greater $^1\text{O}_2$ production compared to the MB alone via FRET and charge transference.	[48]
CdSe	Porphyrin	The $^1\text{O}_2$ production was twofold greater for the conjugated system than for the porphyrin alone.	[55]
CdSe/CdS/ZnS	Sulphonated Aluminum Phthalocyanine	The conjugate was capable of penetrating nasopharyngeal carcinoma cells and the authors detected the $^1\text{O}_2$ production via FRET (84% efficiency).	[47]
CdTe-Thiol	Phthalocyanine derivatives (AlPc, GaPc and InPc)	The presence of QDs increased the $^1\text{O}_2$ quantum yield via FRET processes.	[56]
CdSe/ZnS	Chlorine e_6	There was a more efficient $^1\text{O}_2$ production when the QD-PS were excited than for the non-conjugated PS.	[57]
CdTe	Zn(II) Porphyrin	Bare QDs and conjugates were able to produce ROS. However, bare QDs and conjugates also showed reduced photodynamic activity against <i>C. albicans</i> compared to Zn(II) Porphyrin alone.	[53]

However, biological systems are much more complicated as compared to aqueous solution chemistry. Up to the present date a great number of studies showed that the QDs are indeed good candidates for PDT purposes [13, 20, 52, 55, 58]. So far, the FRET mediated PDT by PS-QD conjugates has not been achieved in living systems, leaving a doubt whether the PS-QD conjugates can really work in PDT [47]. How QDS are internalized within the cell moiety, for instance, also play an important role in the PDT action. We have recently reported that the internalization mechanism of QDs by cells controlled the PDT action [53]. For cells without cell wall such as parasites and human -VIANA, O.S.

cells, QDs end up internalized more easily and the overall PDT action usually can be greater. For those cells that present a cell wall, such as the *Candida albicans* yeast cells, QDs are not internalized by the common up take mechanisms. This challenge may be overcome by bioconjugating the QDs with specific targeting molecules.

4. Conclusions and Perspectives

There are several advantages and limitations for both conventional PS drugs and QDs when individually applied for PDT. For example, some properties such as NIR absorption, broad absorption bands and photostability are desirable for PDT. In contrast the current PSs still present some disadvantages when compared to the unique optical properties of QDs, such as narrow absorption band, poor photostability and visible light absorption. The need to meet most of these properties together has led the search for new photosensitizers for PDT [62]. Besides the QDs advantageous properties such as efficient light outputs and the capacity of tuning their absorption and emission bands, they present an exceptional photoresistance, when compared to the known organic photosensitizers. This last characteristic allows light excitation for continuous ROS production either via type I or type II processes enabling prolonged phototherapies. Some photoresistance studies were performed with different organic PS molecules and QDs confirming that PSs are more prone to photodegradation (e.g. Kunz *et al.* [61]).

Although the overall reports [59] show a potential application of QDs and their conjugates with other PSs in PDT, the Φ_{Δ} (quantum yield of singlet oxygen) of different systems (mainly CdSe and CdTe QDs) determined by distinct authors in different colloidal media lie within the $\Phi_{\Delta} = 0.01 - 0.05$ range [20, 43, 54, 60]. These values are considered low when compared to the most common photosensitizers and several key points must be also taken into account when choosing the systems such as: (i) absorption and emission profiles of both QDs and PS species, (ii) resilient time of the excited electron on the surface of the nanocrystals decay, which models transfer time interval of the excited light and (iii) photoresistance of the QDs.

Looking at the big picture, after a decade since the first results on application of QDs as PSs, there is still no definite answers, but rather some nice clues on the real potential of using QDs in PDT.

Acknowledgement

The authors are grateful for discussions with the members of Nanotecnologia Biomédica/UFPE research group. Funding from Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Academia Brasileira de Ciências, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica (INCT-INFo), and the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) is greatly acknowledged.

References

1. Wieder, M.E., et al., *Intracellular photodynamic therapy with photosensitizer-nanoparticle conjugates: cancer therapy using a 'Trojan horse'*. Photochemical & Photobiological Sciences, 2006. 5(8): p. 727-734.

2. Allison, R.R., V.S. Bagnato, and C.H. Sibata, *Future of oncologic photodynamic therapy*. *Future Oncology*, 2010. **6**(6): p. 929-940.
3. Paszko, E., et al., *Nanodrug applications in photodynamic therapy*. *Photodiagnosis and Photodynamic therapy*, 2011. **8**(1): p. 14-29.
4. Raab, O., *Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien*. *Z. Biol*, 1900. **39**(5): p. 524–546.
5. Von Tappeiner, H. and A. Jesionek, *Therapeutische versuche mit fluoreszierenden stoffen*. *Münch Med Wochenschr*, 1903. **47**: p. 2042-2044.
6. Diamond, I., et al., *Photodynamic Therapy of Malignant Tumours*. *The Lancet*, 1972. **300**(7788): p. 1175-1177.
7. Hanout, M., et al., *Therapies for Neovascular Age-Related Macular Degeneration: Current Approaches and Pharmacologic Agents in Development*. *BioMed Research International*, 2013. **2013**: p. 8.
8. Kharkwal, G.B., et al., *Photodynamic therapy for infections: Clinical applications*. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2011. **43**(7): p. 755-767.
9. Wainwright, M., *Photodynamic Therapy: The Development of New Photosensitisers*. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry- Anti-Cancer Agents*, 2008. **8**(3): p. 280-291.
10. Geszke-Moritz, M. and M. Moritz, *Quantum dots as versatile probes in medical sciences: Synthesis, modification and properties*. *Materials Science and Engineering: C*, 2013. **33**(3): p. 1008-1021.
11. Bruchez, M., et al., *Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels*. *Science*, 1998. **281**(5385): p. 2013-2016.
12. Chan, W.C.W. and S. Nie, *Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection*. *Science*, 1998. **281**(5385): p. 2016-2018.
13. Brannon-Peppas, L. and J.O. Blanchette, *Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012. **64**, **Supplement**: p. 206-212.
14. Fontes, A. and B.S. Santos, *Quantum Dots: Applications in Biology*. 2nd ed. *Methods in Molecular Biology*. 2014: Springer. 258.
15. Law, W.-C., et al., *Aqueous-Phase Synthesis of Highly Luminescent CdTe/ZnTe Core/Shell Quantum Dots Optimized for Targeted Bioimaging*. *Small*, 2009. **5**(11): p. 1302-1310.
16. Tian, J., et al., *Synthesis of CdTe/CdS/ZnS quantum dots and their application in imaging of hepatocellular carcinoma cells and immunoassay for alpha fetoprotein*. *Nanotechnology*, 2010. **21**(30): p. 305101.
17. Vannoy, C.H., et al., *Biosensing with quantum dots: a microfluidic approach*. *Sensors*, 2011. **11**(10): p. 9732.

18. Lira, R.B., et al., *Non-specific interactions of CdTe/Cds Quantum Dots with human blood mononuclear cells*. Micron, 2012. **43**(5): p. 621-626.
19. Andrade, C.G., et al., *Evaluation of glycophenotype in breast cancer by quantum dot-lectin histochemistry*. Int J Nanomed, 2013. **8**: p. 4623.
20. Samia, A.C.S., S. Dayal, and C. Burda, *Quantum Dot-based Energy Transfer: Perspectives and Potential for Applications in Photodynamic Therapy*. Photochemistry and Photobiology, 2006. **82**(3): p. 617-625.
21. Li, Y., et al., *Electrochemiluminescence biosensor based on CdSe quantum dots for the detection of thrombin*. Electrochimica Acta, 2012. **65**(0): p. 1-6.
22. Carvalho, K.H.G., et al., *Fluorescence Plate Reader for Quantum Dot-Protein Bioconjugation Analysis*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2014. **14**(5): p. 3320-3327.
23. Tenório, D.P.L.A., et al., *CdTe quantum dots conjugated to concanavalin A as potential fluorescent molecular probes for saccharides detection in Candida albicans*. J Photochem Photobiol B Biol, 2015. **142**(0): p. 237-243.
24. Ma, Q. and X. Su, *Recent advances and applications in QDs-based sensors*. Analyst, 2011. **136**(23): p. 4883-4893.
25. Medintz, I.L. and H. Mattoussi, *Quantum dot-based resonance energy transfer and its growing application in biology*. Phys. Chem. Chem. Phys., 2009. **11**(1): p. 17-45.
26. Santos, B.S., P.M.A. Farias, and A. Fontes, *Semiconductor Quantum Dots for Biological Applications*, in *Handbook of Self Assembled Semiconductor Nanostructures for Novel Devices in Photonics and Electronics*, M. Henini, Editor. 2008, Elsevier: Amsterdam. p. 773-798.
27. Choi, A.O. and D. Maysinger, *Applications of quantum dots in biomedicine*, in *Semiconductor Nanocrystal Quantum Dots*, A.L. Rogach, Editor. 2008, Springer Vienna. p. 349-365.
28. Chan, W.C.W., et al., *Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging*. Curr Opin in Biotech, 2002. **13**(1): p. 40-46.
29. Mičić, O.I. and A.J. Nozik, *Chapter 5 - Colloidal quantum dots of III-V semiconductors*, in *Nanostructured Materials and Nanotechnology*, H.S. Nalwa, Editor. 2002, Academic Press: San Diego. p. 183-205.
30. Gaponik, N., et al., *Efficient Phase Transfer of Luminescent Thiol-Capped Nanocrystals: From Water to Nonpolar Organic Solvents*. Nano Letters, 2002. **2**(8): p. 803-806.
31. Fontes, A., et al., *Quantum Dots in Biomedical Research*, in *Biomedical Engineering - Technical Applications in Medicine*, R. Hudak, Editor. 2012, InTech.
32. Yu, W.W., et al., *Experimental Determination of the Extinction Coefficient of CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals*. Chemistry of Materials, 2003. **15**(14): p. 2854-2860.

33. Dagtepe, P., et al., *Quantized Growth of CdTe Quantum Dots; Observation of Magic-Sized CdTe Quantum Dots*. The Journal of Physical Chemistry C, 2007. **111**(41): p. 14977-14983.
34. Dabbousi, B.O., et al., *(CdSe)ZnS Core–Shell Quantum Dots: Synthesis and Characterization of a Size Series of Highly Luminescent Nanocrystallites*. The Journal of Physical Chemistry B, 1997. **101**(46): p. 9463-9475.
35. Dai, T., et al., *Concepts and Principles of Photodynamic Therapy as an Alternative Antifungal Discovery Platform*. Frontiers in Microbiology, 2012. **3**: p. 120.
36. Lira, R.B., et al., *Studies on intracellular delivery of carboxyl-coated CdTe quantum dots mediated by fusogenic liposomes*. Journal of Materials Chemistry B, 2013. **1**(34): p. 4297-4305.
37. Jaiswal, J.K., et al., *Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates*. Nature biotechnology, 2003. **21**(1): p. 47-51.
38. Nawrot, T., et al., *Cadmium-related mortality and long-term secular trends in the cadmium body burden of an environmentally exposed population*. Environmental Health Perspectives, 2008. **116**(12): p. 1620-1628.
39. Yong, K.-T., et al., *Nanotoxicity assessment of quantum dots: from cellular to primate studies*. Chemical Society Reviews, 2013. **42**(3): p. 1236-1250.
40. Xu, M., et al., *Free cadmium ions released from CdTe-based nanoparticles and their cytotoxicity on Phaeodactylum tricornutum*. Metallomics, 2010. **2**(7): p. 469-473.
41. Su, Y., et al., *In vivo distribution, pharmacokinetics, and toxicity of aqueous synthesized cadmium-containing quantum dots*. Biomaterials, 2011. **32**(25): p. 5855-5862.
42. Hauck, T.S., et al., *In vivo Quantum-Dot Toxicity Assessment*. Small, 2010. **6**(1): p. 138-144.
43. Samia, A.C.S., X. Chen, and C. Burda, *Semiconductor Quantum Dots for Photodynamic Therapy*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(51): p. 15736-15737.
44. Chen, J.-Y., et al., *Quantum Dot-mediated Photoproduction of Reactive Oxygen Species for Cancer Cell Annihilation*. Photochemistry and Photobiology, 2010. **86**(2): p. 431-437.
45. Cho, S.J., et al., *Long-Term Exposure to CdTe Quantum Dots Causes Functional Impairments in Live Cells*. Langmuir, 2007. **23**(4): p. 1974-1980.
46. Lovrić, J., et al., *Unmodified Cadmium Telluride Quantum Dots Induce Reactive Oxygen Species Formation Leading to Multiple Organelle Damage and Cell Death*. Chemistry & Biology, 2005. **12**(11): p. 1227-1234.

47. Li, L., et al., *Quantum dot-aluminum phthalocyanine conjugates perform photodynamic reactions to kill cancer cells via fluorescence resonance energy transfer*. *Nanoscale Research Letters*, 2012. **7**(1): p. 1-8.
48. Rakovich, A., et al., *CdTe Quantum Dot/Dye Hybrid System as Photosensitizer for Photodynamic Therapy*. *Nanoscale Research Letters*, 2010. **5**(4): p. 753-760.
49. Jhonsi, M.A. and R. Renganathan, *Investigations on the photoinduced interaction of water soluble thioglycolic acid (TGA) capped CdTe quantum dots with certain porphyrins*. *J. Colloid Interface Sci.*, 2010. **344**(2): p. 596-602.
50. Wen, Y.-n., et al., *Activation of porphyrin photosensitizers by semiconductor quantum dots via two-photon excitation*. *Applied Physics Letters*, 2009. **95**(14): p. -.
51. Tsay, J.M., et al., *Singlet Oxygen Production by Peptide-Coated Quantum Dot-Photosensitizer Conjugates*. *Journal of the American Chemical Society*, 2007. **129**(21): p. 6865-6871.
52. Clarke, S.J., et al., *Photophysics of dopamine-modified quantum dots and effects on biological systems*. *Nature materials*, 2006. **5**(5): p. 409-417.
53. Viana, O., et al., *Comparative Study on the Efficiency of the Photodynamic Inactivation of Candida albicans Using CdTe Quantum Dots, Zn(II) Porphyrin and Their Conjugates as Photosensitizers*. *Molecules*, 2015. **20**(5): p. 8893.
54. Ma, J., et al., *Generation of Singlet Oxygen via the Composites of Water-Soluble Thiol-Capped CdTe Quantum Dots/Sulfonated Aluminum Phthalocyanines*. *J Phys Chem B*, 2008. **112**(15): p. 4465-4469.
55. Qi, Z.-D., et al., *Biocompatible CdSe quantum dot-based photosensitizer under two-photon excitation for photodynamic therapy*. *Journal of Materials Chemistry*, 2011. **21**(8): p. 2455-2458.
56. Tekdaş, D.A., et al., *Photodynamic therapy potential of thiol-stabilized CdTe quantum dot-group 3A phthalocyanine conjugates (QD-Pc)*. *Spectrochim. Acta, Part A*, 2012. **93**(0): p. 313-320.
57. Rotomskis, R., et al., *Complexes of functionalized quantum dots and chlorin e6 in photodynamic therapy*. *Lithuanian Journal of Physics*, 2013. **53**(1).
58. Narband, N., et al., *Quantum dots as enhancers of the efficacy of bacterial lethal photosensitization*. *Nanotechnology*, 2008. **19**(44): p. 445102.
59. Planas, O., et al., *Chapter 9 Newest approaches to singlet oxygen photosensitisation in biological media*, in *Photochemistry: Volume 42*. 2015, The Royal Society of Chemistry. p. 233-278.
60. Zenkevich, E.I., et al., *Quantitative Analysis of Singlet Oxygen (1O_2) Generation via Energy Transfer in Nanocomposites Based on Semiconductor Quantum Dots and Porphyrin Ligands*. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2011. **115**(44): p. 21535-21545.

61. Kunz, L., et al., *Photodynamic modification of disulfonated aluminium phthalocyanine fluorescence in a macrophage cell line*. Photochemical & Photobiological Sciences, 2007. **6**(9): p. 940-948.
62. Biju, V., T. Itoh, and M. Ishikawa, *Delivering quantum dots to cells: bioconjugated quantum dots for targeted and nonspecific extracellular and intracellular imaging*. Chemical Society Reviews, 2010. **39**(8): p. 3031-3056.