



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE MATERIAIS

RODRIGO DA SILVA VIANA

**DESENVOLVIMENTO DE RADIOFÁRMACOS LUMINESCENTES PARA O
DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE COLORRETAL**

Recife

2019

RODRIGO DA SILVA VIANA

**DESENVOLVIMENTO DE RADIOFÁRMACOS LUMINESCENTES PARA O
DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE COLORRETAL**

Tese de doutoramento apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência de Materiais.

Area de concentração: Nano e Biomateriais

Orientador: Prof. Dr. Severino Alves Junior

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Henrique Lago Falcão

Recife

2019

Catálogo na fonte
Bibliotecária Arabelly Ascoli CRB4-2068

V614d Viana, Rodrigo da Silva
Desenvolvimento de radiofármacos luminescentes para o diagnóstico do câncer de colorretal / Rodrigo da Silva Viana. – 2019.
137 f.: fig., tab.

Orientador: Severino Alves Junior
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Ciência de Materiais. Recife, 2019.
Inclui referências e apêndice.

1. Nanomateriais. 2. Biomateriais. 3. Fotoluminescência. 4. Ácido dipicolínico. I. Alves Junior, Severino (orientador). II. Título.

620.5 CDD (22. ed.) UFPE-FQ 2019-34

RODRIGO DA SILVA VIANA

**DESENVOLVIMENTO DE RADIOFÁRMACOS LUMINESCENTES PARA O
DIAGNÓSTICO DE CÂNCER COLORRETAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência de Materiais.

Aprovada em: 28/02/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Severino Alves Junior (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Ivani Malvestiti (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Eduardo Padrón Hernández (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Helen Jamil Khoury (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Wagner de Mendonça Faustino (Examinador Externo)
Universidade Federal da Paraíba

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à inteligência suprema, causa primária de todas as coisas.

A minha família, nas pessoas de Dona Nina e Rafael Viana, por enfrentarem da melhor maneira possível as minhas faltas e por me proporcionarem um ambiente de muito aprendizado e felicidade. Com certeza são minhas ALAVANCAS na busca de uma vida honrada.

A minha Vidinha (Cintya Barbosa) por ser minha parceira e meu PONTO DE APOIO nas descobertas, enfrentamentos, alegrias, tristezas e desafios que o mundo nos proporciona em cada amanhecer e anoitecer.

Aos meus amigos por acompanharem toda esta caminhada, dando-me força nos momentos de crise.

Ao professor Eduardo Falcão por ser um orientador cuidadoso, ético e por compartilhar do seu grande conhecimento científico.

Ao professor Severino Júnior, por me dar total liberdade para o meu desenvolvimento científico, por me deixar compartilhar de muitas de suas ideias (que não são poucas) e por me ensinar como encarar os maus resultados com otimismo, o que o torna um orientador diferenciado.

Ao Dr. J. Michael Mathis, membro do corpo docente da *Louisiana State University*, por todo o conhecimento, paciência, parceria, oportunidades e momentos de *stress* que com certeza me fizeram evoluir como pesquisador e como pessoa.

A Dra. Graca Vicente, membro do corpo docente da *Louisiana State University*, por ser um ser humano doce e uma cientista com ideias muito surpreendentes.

Ao grupo de pesquisa da Dra. Vicente por me acolherem muitíssimo bem e por suportarem com uma firmeza a minha deficiência na língua inglesa.

A todos que fazem o grupo BSTR pelo ótimo ambiente de trabalho, pelas discussões científicas no cafezinho e principalmente pelas diversas oportunidades de crescimento. Realmente aqui é meu lar e estará sempre em meu coração.

A central analítica do DQF pela ajuda nas caracterizações dos materiais.

A *Loisiana State University* por todo suporte científico.

Ao CETENE e ao Departamento de Física da UFPE pelas medidas de raios-X e SEM.

Aos órgãos financiadores do projeto: CNPQ, FACEPE e CAPES.

“Dê-me uma alavanca e um ponto de apoio e levantarei o mundo”
(NETZ, 2009)

RESUMO

O câncer de colorretal é uma das doenças mais preocupantes ao redor do mundo, principalmente pelo seu elevado grau de incidência e mortalidade. Uma alternativa para solucionar este problema está no uso de biomarcadores nanoparticulados que auxiliem na identificação da doença o mais cedo possível. Neste âmbito, o uso de nanopartículas luminescentes e/ou radioativas são excelentes alternativas na produção desta classe de materiais. Este trabalho reporta o *design* de duas classes de nanomateriais, os derivados da cerâmica NaYF₄ contendo 5% de Európio (NaYF₄:5%Eu) e o composto híbrido formado pela combinação de SiO₂ amorfo com complexo de Európio (Eu-ácido dipicolínico; EuDPA \subset SiO₂-NH₂), visando explorar sua luminescência para ensaios de bioimagem. Adicionalmente, incorporou-se aos compostos supracitados aos radioisótopos I-123 e Lu-177, respectivamente, buscando-se a obtenção de sistemas de diagnóstico multifuncionais. Para produção do material à base de NaYF₄:5%Eu, utilizou-se protocolo previamente estabelecido na literatura. Posteriormente as partículas foram conjugadas com pequenas moléculas orgânicas aromáticas (ácido p-cumárico, tirosina, BODIPY e fitalocianina de zinco (ZnPC)), buscando-se incrementar a especificidade do biomarcador luminescente em células de câncer de colorretal (HT-29). Três destas partículas conjugadas foram selecionadas para reações de incorporação do I-123. A síntese do EuDPA \subset SiO₂-NH₂ também foi realizada utilizando-se metodologias reportadas na literatura e o material foi testado como biomarcador, analogamente ao composto anterior. A incorporação do Lu-177 neste composto foi obtida pela adição do radioisótopo *in situ* durante o processo de síntese. Os nanocompostos sintetizados foram caracterizados por diferentes técnicas avaliando suas propriedades morfológicas, químicas, composicionais, térmicas, biológicas e ópticas. Adicionalmente, os materiais radiomarcados foram analisados em relação a sua absorção celular e/ou imageamento *in vivo* (SPECT/CT). Os resultados revelam que ambas as classes de nanomateriais apresentaram aprimoramento na biomarcação luminescente a nível citoplasmático. Por fim, o composto ¹⁷⁷Lu-EuDPA \subset SiO₂-NH₂ foi testado preliminarmente em camundongos *nude* através de administração intratumoral, o que revelou o seu potencial como marcador multimodal através da captação de radiação gama através de imagens de SPECT/CT.

Palavras-Chave: NaYF₄: 5%Eu. Fotoluminescência. Células HT-29. Ácido dipicolínico. Compostos de coordenação. Iodo-123. Lutécio-177. SPECT/CT.

ABSTRACT

Colorectal cancer is one of the most worrisome diseases around the world, mainly because of its self-reported incidence and mortality. An alternative to solving this problem is the use of nanoparticulate bioprobes that support existing techniques for identifying the disease as early as possible, thus increasing the patient's survival rate. In this context, the use of luminescent and/or radioactive nanoparticles are excellent alternatives in the production of those nanomaterials. The present manuscript reports the synthesis, characterization and use of two classes of nanomaterials, the NaYF₄:5%Eu derivatives and the hybrid compound formed from the combination of SiO₂ and Europium complex (EuDPA-SiO₂-NH₂), in order to exploit its luminescence for bioimaging assays. In addition, radioisotopes I-123 and Lu-177 were incorporated into the aforementioned compounds, respectively, seeking to obtain multifunctional systems. For the production of NaYF₄:5%Eu based material was used a protocol previously described in the literature. The nanoparticles were conjugated with small organic aromatic molecules, seeking to increase the specificity of the luminescent bioprobes in colorectal cancer cells (HT-29). Therefore, three of these conjugated nanoparticles were selected for I-123 incorporation reactions. On the other hand, the synthesis of the EuDPA-SiO₂-NH₂ hybrid compound was also performed using methodologies reported in the literature and the final material was tested as a luminescent bioprobe in HT-29 cells. Incorporation of Lu-177 into this compound was accomplished by the addition of the *in situ* radioisotope during the synthetic protocol. Both nanomaterials were evaluated for their use as biomarker in *in vitro* assays. The nanocomposites synthesized were characterized by their structural, morphological, chemical/compositional, thermal, biological and optical properties. In addition, the radiolabeled materials were analyzed for their cellular uptake assays. The results show that nanoparticles based on NaYF₄:5%Eu have shown improvement in the biomarking of HT-29 cells at the cytoplasmic level. The results for the EuDPA-SiO₂-NH₂ nanoparticles presented similar behavior, with efficiency in the labeling of HT-29 cells at the cytoplasmic level. Finally, the compound was preliminarily tested in nude mice by intratumoral administration, which revealed its potential as a multimodal marker through the uptake of gamma radiation by SPECT / CT images.

Keywords: NaYF₄:5%Eu. Photoluminescence. HT-29 Cell line. Dipicolinic acid. Coordination compound. Iodine-123. Lutetium-177. SPECT/CT.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|-------------------|---|----|
| Figura 1 - | Principais interações intra-atômicas para o caso do íon lantanídeo livre e considerando a contribuição do campo ligante..... | 28 |
| Figura 2 - | Representação do uso das nanopartículas NaYF ₄ :Yb,Er/PEI para biomarcação em ensaios in vitro utilizando células a) HT-29 e b) OVACAR3. O ensaio de biomarcação com experimentos in vivo é apresentado em c)..... | 31 |
| Figura 3 - | Imagens de TEM (esquerda) e microscopia óptica confocal (direita) para nanopartículas híbridas luminescentes Tbpic-SiO ₂ isoladas e após incubação em células de levedura Candida albicans, respectivamente..... | 32 |
| Figura 4 - | Estrutura representativa do complexo Lu-DOTA..... | 33 |
| Figura 5 - | Representação da célula unitária para o composto β-NaEuF ₄ ilustrando os ambientes químicos entorno dos cátions metálicos presentes na estrutura cristalina..... | 36 |
| Figura 6 - | Ilustração da correlação entre a penetração da luz em tecidos epiteliais e o comprimento de onda utilizado..... | 38 |
| Figura 7 - | Imagem de tecidos de melanoma com PNA-conjugado com NaGdF ₄ :Eu ³⁺ . Tecidos de camundongos corados com H&E (A) Demonstração da abundância dos vasos (laranja) e sítios de produção de melanina (preto) (B); O mesmo campo de visão fotografada no modo campo claro demonstrando a absorção de luz de melanina (C). Representam com maior magnificação da região indicada, utilizando a fluorescência do DAPI, indicando a coloração núcleos (D), β-NaGdF ₄ :Eu ³⁺ (E) e os sinais fundidos (Marge; F)..... | 39 |
| Figura 8 - | Imagem confocal mostrando a marcação da linhagem de célula Panc 1, em (A) células não marcadas e (B) o composto NaYF ₄ :Gd (10%), Eu (10%) conjugado com anticorpo Anti-claudin 4 com luminescência no vermelho.. | 40 |
| Figura 9 - | Representações do mecanismo de formação das nanopartículas de SiO ₂ utilizando o método sol-gel desenvolvido por Stöber e colaboradores..... | 42 |

| | | |
|--------------------|--|-----|
| Figura 10 - | Diagrama representativo dos processos ocorridos na funcionalização com grupos amina para partículas do tipo NaLnF ₄ , utilizando o método Stöber..... | 109 |
| Figura 11 - | Mecanismo para reação de acoplamento utilizando o sal de urônio/amínio TBTU na formação de ligações amida..... | 44 |
| Figura 12 - | Representação da estrutura química do BODIPY COOH..... | 48 |
| Figura 13 - | Representação da estrutura química do BODIPY NCS..... | 49 |
| Figura 14 - | Representação da estrutura química do ZnPC..... | 50 |
| Figura 15 - | Estrutura química do ácido 3-(4-acetoxifenil)acrílico (acet_cumárico)..... | 51 |
| Figura 16 - | Comparação entre difratogramas de raios-X experimentais β-NaYF ₄ :5%Eu (linha vermelha), β-NaYF ₄ :5%Eu-NH ₂ (linha azul) e o padrão de raios-X simulado para o β-NaYF ₄ (linha preta) obtido a partir da informação cristalográfica descrita na literatura..... | 67 |
| Figura 17 - | Imagens de microscopia eletrônica de transmissão para o composto β-NaYF ₄ :5%Eu em diferentes magnificações..... | 68 |
| Figura 18 - | Histograma de distribuição de tamanho obtidos por DLS para as partículas NaYF ₄ :5%Eu-NH ₂ | |
| Figura 19 - | Representação das nanopartículas conjugadas obtidas a partir de reações de conjugações entre o NaYF ₄ :5%Eu-NH ₂ e os compostos orgânicos investigado neste trabalho..... | 70 |
| Figura 20 - | Espectros de infravermelho para os compostos NaYF ₄ :5% Eu (linha preta) e NaYF ₄ :5% Eu - NH ₂ (linha azul)..... | 71 |
| Figura 21 - | Espectros de infravermelho para os compostos NaYF ₄ :5% Eu (linha preta) e NaYF ₄ :5% Eu - NH ₂ (linha vermelha), NaYF ₄ :5% Eu - Ac. Coumaric (linha azul) e NaYF ₄ :5% EU - Coumaric (linha rosa)..... | 73 |
| Figura 22 - | Espectros de infravermelho para os compostos NaYF ₄ :5% Eu (linha preta) e NaYF ₄ :5% Eu - NH ₂ (linha vermelha), NaYF ₄ :5% Eu - Tyr1 (linha azul), NaYF ₄ :5% Eu - Tyr2 (linha rosa) E NaYF ₄ :5% Eu - Tyr3 (linha verde)..... | 75 |
| Figura 23 - | Espectros de infravermelho para os compostos NaYF ₄ :5% Eu (linha preta) e NaYF ₄ :5% Eu - NH ₂ (linha vermelha) E NaYF ₄ :5% Eu - BODIPY COOH (linha azul)..... | 76 |

| | | |
|--------------------|--|----|
| Figura 24 - | Espectros de infravermelho para os compostos NaYF ₄ :5% Eu (linha preta) e NaYF ₄ :5% Eu - NH ₂ (linha vermelha), BODIPY NCS (linha azul) e NaYF ₄ :5% Eu - BODIPY NCS (linha rosa)..... | 78 |
| Figure 25 - | Espectros de infravermelho para os compostos NaYF ₄ :5% Eu (linha preta) e NaYF ₄ :5% Eu - NH ₂ (linha vermelha) e NaYF ₄ :5% Eu - ZnPC (linha azul)..... | 79 |
| Figura 26 - | Espectros de infravermelho para os compostos NaYF ₄ :5% Eu (linha preta) e NaYF ₄ :5% Eu - NH ₂ (linha vermelha) E NaYF ₄ :5% Eu - BODIPY NCS/Tyr3 (linha azul)..... | 81 |
| Figura 27 - | Análise termogravimétrica para cada etapa de obtenção dos nanopartículas conjugadas produzidas a partir dos derivados de a) Ácido p-Cumárico, b) Tirosina, c) BODIPY COOH, D) ZnPC, E) BODIPY NCS e D) BODIPY NCS/Tyr3..... | 82 |
| Figura 28 - | Espectros de excitação ($\lambda_{em} = 615$ nm; linha pontilhada) e emissão ($\lambda_{ex} = 395$ nm; linha cheia) para os compostos β - NaYF ₄ :5% Eu (linha vermelha) e β - NaYF ₄ :5% Eu - NH ₂ (linha preta) obtidos a temperatura ambiente na forma de suspensão de partículas em PBS (pH = 7,4; concentração 100 μ g/mL)..... | 84 |
| Figura 29 - | Espectros de excitação ($\lambda_{em} = 615$ nm; linha pontilhada) e emissão ($\lambda_{ex} = 395$ nm; linha cheia) para os compostos β - NaYF ₄ :5% Eu - NH ₂ (linha preta), β - NaYF ₄ :5% Eu - Coumaric (linha laranja) e β - NaYF ₄ :5% Eu - Tyr3 obtidos a temperatura ambiente na forma de suspensão de partículas em PBS (pH = 7,4; concentração 100 μ g/mL)..... | 85 |
| Figura 30 - | Espectros de excitação ($\lambda_{EM} = 615$ nm; linha preta) e emissão ($\lambda_{EX} = 395$ nm; linha azul) para o composto β - NaYF ₄ :5% Eu - BODIPY COOH obtidos a temperatura ambiente na forma de suspensão de partículas em PBS (pH = 7,4; concentração 100 μ g/mL)..... | 86 |
| Figura 31 - | Espectros de excitação ($\lambda_{EM} = 615$ nm; linha preta e $\lambda_{EM} = 540$ nm; linha cinza) e emissão ($\lambda_{EX} = 395$ nm; linha azul) para o composto β - NaYF ₄ :5% Eu - BODIPY NCS obtidos a temperatura ambiente na forma de suspensão de partículas em PBS (pH = 7,4; concentração 100 μ g/mL)..... | 88 |

| | | |
|--------------------|---|----|
| Figura 32 - | Espectros de excitação ($\lambda_{EM} = 658$ nm; linha preta) e emissão ($\lambda_{EX} = 395$ nm; linha azul) para o composto β - NaYF ₄ :5% Eu - ZnPC obtidos a temperatura ambiente na forma de suspensão de partículas em PBS (pH = 7,4; concentração 100 μ g/mL)..... | 89 |
| Figura 33 - | Espectros de excitação ($\lambda_{EM} = 615$ nm; LINHA PRETA E $\lambda_{EM} = 540$ nm; linha azul) e emissão ($\lambda_{EX} = 395$ nm; linha vermelha) para o composto β - NaYF ₄ :5% Eu - BODIPY NCS/Tyr3 obtidos a temperatura ambiente na forma de suspensão de partículas em PBS (pH = 7,4; concentração 100 μ g/mL)..... | 90 |
| Figura 34 - | Representação do diagrama de cromaticidade para as nanopartículas conjugadas A) NaYF ₄ :5% Eu - Coumaric, B) NaYF ₄ :5% Eu - Tyr3, C) NaYF ₄ :5% Eu - BODIPY COOH, D) NaYF ₄ :5% Eu - BODIPY NCS, D) NaYF ₄ :5% Eu - BODIPY NCS/Tyr3 E E) NaYF ₄ :5% Eu - ZnPC obtido pelo software SPECTRA LUX 2.0..... | 91 |
| Figura 35 - | Viabilidade celular para NaYF ₄ :5% Eu - NH ₂ após 48 h nas concentrações de 1, 10 e 100 μ g/mL, determinado por ensaio de XTT..... | 93 |
| Figura 36 - | Imagens de microscopia confocal (imagem ampliada de 63x) para NaYF ₄ :5% Eu - Coumaric, NaYF ₄ :5% Eu - Tyr3, NaYF ₄ :5% Eu - BODIPY COOH, NaYF ₄ :5% Eu - BODIPY NCS, NaYF ₄ :5% Eu - BODIPY NCS/TYR3 e NaYF ₄ :5% Eu - ZnPC marcando células da linhagem HT-29; O núcleo celular é azul e os nanopartículas conjugadas são vermelhos (excitação e detecção $\lambda_{EX} = 395$ nm e de 500-700 nm, Respectivamente) obtidos na concentração de 100 μ g/mL em PBS (pH = 7,4)..... | 94 |
| Figura 37 - | Imagens de (A-B) microscopia eletrônica de varredura e (C-D) microscopia eletrônica de transmissão obtidas para o material EuDPA ₁ SiO ₂ -NH ₂ | 96 |
| Figura 38 - | Histograma de distribuição de tamanho obtidos por DLS para as partículas a) SiO ₂ e b) EuDPA ₁ SiO ₂ -NH ₂ | 97 |
| Figura 39 - | Imagens de (A-C) microscopia eletrônica de varredura e (D) imagem de mapeamento obtidos por EDS para o material Lu _{0,5} -Eu _{0,5} DPA ₁ SiO ₂ -NH ₂ | 98 |
| Figura 40 - | Espectro de EDS para a amostra Lu _{0,5} -Eu _{0,5} DPA ₁ SiO ₂ -NH ₂ | 99 |

| | | |
|--------------------|---|-----|
| Figura 41 - | Espectro de infravermelho para o composto H2DPA..... | 101 |
| Figura 42 - | Espectros de infravermelho para os compostos H2DPA (linha preta) e EuDPA (linha azul) e EuDPA ₂ SiO ₂ -NH ₂ (linha vermelha)..... | 102 |
| Figura 43 - | Análise termogravimétrica para o complexo de EuDPA..... | 104 |
| Figura 44 - | Análise termogravimétrica para as nanopartículas EuDPA ₂ SiO ₂ -NH ₂ | 105 |
| Figura 45 - | Espectros de excitação (linha pontilhada) e emissão (linha cheia) para os compostos EuDPA ($\lambda_{em} = 615$ nm e $\lambda_{ex} = 283$; linha azul) e EuDPA ₂ SiO ₂ -NH ₂ ($\lambda_{em} = 615$ nm e $\lambda_{ex} = 279$ nm; linha vermelha) obtidos a temperatura ambiente; o EuDPA em solução aquosa 1×10^{-5} mol/L e o EuDPA ₂ SiO ₂ -NH ₂ na forma de suspensão de partículas em PBS (pH = 7,4; concentração 100 μ g/mL..... | 107 |
| Figura 46 - | Curva de decaimento exponencial para os compostos a) EuDPA ($\lambda_{ex} = 283$ nm e $\lambda_{em} = 615$ nm) e b) EuDPA ₂ SiO ₂ - NH ₂ ($\lambda_{ex} = 279$ nm e $\lambda_{em} = 615$ nm)..... | 109 |
| Figura 47 - | Espectros de excitação (linha pontilhada) e emissão (linha cheia) para os compostos EuDPA ₂ SiO ₂ -NH ₂ ($\lambda_{em} = 615$ nm e $\lambda_{ex} = 283$ nm; linha vermelho) e Lu _{0,5} - Eu _{0,5} DPA ₂ SiO ₂ - NH ₂ ($\lambda_{em} = 615$ nm e $\lambda_{ex} = 279$ nm; linha rosa) obtidos a temperatura ambiente; o Lu _{0,5} -Eu _{0,5} DPA ₂ SiO ₂ -NH ₂ e o EuDPA ₂ SiO ₂ -NH ₂ na forma de suspensão de partículas em PBS (pH = 7,4; concentração 100 μ g/ml)..... | 110 |
| Figura 48 - | Imagens de microscopia confocal (lente ampliada de 63x) para EuDPA ₂ SiO ₂ -NH ₂ marcando células da linhagem HT-29; o núcleo celular é azul e as partículas são vermelhas (excitação e detecção a 279 nm e 500-700 nm, respectivamente) obtidos nas concentrações de 10, 100 e 1000 μ g/mL em PBS (PH 7,4)..... | 111 |
| Figura 49 - | Ensaio de absorção das partículas NaYF ₄ :5% Eu - Coumaric- ¹²³ I, NaYF ₄ :5% Eu - Tyr3- ¹²³ I e NaYF ₄ :5% Eu-BODIPY NCS / Tyr3- ¹²³ I em células HT-29 em função do tempo de tratamento..... | 114 |

| | | |
|--------------------|---|-----|
| Figura 50 - | Taxa de incorporação de Lu-177 (linha preta) e atividade específica (linha azul) em função da radiação inicial para as partículas $^{177}\text{Lu-EuDPA}\langle\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ | 115 |
| Figura 51 - | Ensaio de absorção das partículas $^{177}\text{Lu-EuDPA}\langle\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ em células HT-29 em função do tempo de tratamento..... | 116 |
| Figura 52 - | Ensaio de absorção das partículas $^{177}\text{Lu-EuDPA}\langle\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ em células HT-29 em função da atividade utilizada..... | 117 |
| Figura 53 - | Imagens obtidas após 2, 24 e 48 h para as nanopartículas $^{177}\text{Lu-EuDPA}\langle\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ injetadas intratumoralmente em camundongos <i>NUDE</i> | 118 |
| Figura 54 - | Avaliação do potencial terapêutico das nanopartículas $^{177}\text{Lu-LuDPA}\langle\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ ($^{177}\text{Lu NP}$) através da investigação do volume do tumor em função do tempo de observação, antes e após tratamento intravenoso em camundongos nude, em comparação com as nanopartículas $\text{EuDPA}\langle\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ (NP) e o controle negativo (PBS)..... | 119 |
| Figura S1 - | Representação do mecanismo de síntese utilizado na obtenção do $\text{NAYF}_4:5\%\text{Eu-Coumaric}$ | 133 |
| Figura S2 - | Representação do mecanismo de síntese utilizado na obtenção do $\text{NAYF}_4:5\%\text{Eu-Tyr3}$ | 134 |
| Figura S3 - | Representação do mecanismo de síntese utilizado na obtenção do $\text{NAYF}_4:5\%\text{Eu-COOH}$ | 135 |
| Figura S4 - | Representação do mecanismo de síntese utilizado na obtenção do $\text{NAYF}_4:5\%\text{Eu-ZnPC}$ | 136 |
| Figura S5 - | Representação do mecanismo de síntese utilizado na obtenção do $\text{NAYF}_4:5\%\text{Eu-BODIPY NCS}$ | 137 |
| Figura S6 - | Representação do mecanismo de síntese utilizado na obtenção do $\text{NAYF}_4:5\%\text{Eu- BODIPY NCS / Tyr3}$ | 138 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|--------------------|--|-----|
| Tabela 1 - | Tempo de meia vida ($t_{1/2}$) e principais energias dos decaimentos beta ($E_{\beta_{\max}}$) e gama (E_{γ}) para os lantanídeos beta-emissores..... | 34 |
| Tabela 2 - | Faixa de comprimento de onda, variação de cor e distância de penetração da luz quando exposta a pele humana (AVCI et al., 2013.)..... | 38 |
| Tabela 3 - | Reagentes utilizados nos procedimentos experimentais..... | 45 |
| Tabela 4 - | Quantificação de resíduos orgânicos presentes nas nanossondas luminescentes sintetizadas a partir do ácido p-cumárico e tirosina obtidos a partir dos dados da TGA. Os compostos foram obtidos combinando 0,2 mmol de compostos orgânicos e 10 mg de NaYF ₄ :5%Eu-NH ₂ | 56 |
| Tabela 5 - | Quantificação de resíduos orgânicos presentes nas nanossondas luminescentes sintetizadas a partir do ácido p-cumárico e tirosina obtidos a partir dos dados da TGA. Os compostos foram obtidos combinando 0,3 mmol de compostos orgânicos e 10 mg de NaYF ₄ :5%Eu-NH ₂ | 56 |
| Tabela 6 - | Quantificação de resíduos orgânicos presentes nas nanossondas luminescentes sintetizadas a partir do ácido p-cumárico e tirosina obtidos a partir dos dados da TGA. Os compostos foram obtidos combinando 1,5 mmol de compostos orgânicos e 10 mg de NaYF ₄ :5%Eu-NH ₂ | 57 |
| Tabela 7 - | Valores para as distâncias angulares relativas ao picos de difração tomados a meia altura ($\beta_{(100)}$, $\beta_{(200)}$ e $\beta_{(2-11)}$) e os tamanho médios de cristalito (τ_{med}) calculados para as amostras NaYF ₄ :5%Eu e NaYF ₄ :5%Eu-NH ₂ | 67 |
| Tabela 8 - | Análise quantitativa elementar com as porcentagens atômicas e de massas obtidas pelo EDS para o composto Lu _{0,5} Eu _{0,5} DPA \subset SiO ₂ -NH ₂ | 100 |
| Tabela 9 - | Análise termogravimétrica utilizada como estimativa composicional do complexo EuDPA..... | 103 |
| Tabela 10 - | Valores experimentais dos parâmetros de intensidade Ω_2 , Ω_4 and Ω_6 , decaimentos radioativos (A_{rad}) e não-radioativos (A_{nrad}) e eficiência quântica de emissão (η)..... | 109 |

Tabela 11 - Valores obtidos para atividade inicial, atividade final, radiação incorporada (IR) e atividade específica para as partículas NaYF₄:5% Eu-Coumaric-¹²³I, NaYF₄:5% Eu-Tyr3-¹²³I, e NaYF₄:5% Eu-BODIPY NCS /Tyr3-¹²³I.....

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

| | |
|---------------|--|
| Acet_cumrico | cido 3-(4-acetoxifenil)acrílico |
| A_{nrad} | Taxa de Decaimento Não-Radiativo |
| APTES | 3-aminopropil)trietoxilano |
| A_{rad} | Taxa de Decaimento Radiativo |
| A_{tot} | Taxa de Decaimento Total |
| CIE | Comissão Internacional em Iluminao |
| DBU | 1,8-Diazabicyclo [5.4.0] undec-7-eno |
| DLS | Espalhamento de Luz Dinâmico |
| DMP | Dimetilbenzoilmetano |
| EDS | Espectroscpia de Raios-X por Dispersão de Energia |
| FT-IR | Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho |
| IR | Taxa de Incorporao de Radioatividade |
| NIR | Radiao Eletromagnética no Infravermelho Próximo |
| PEI | Polietileneimina |
| PET | Tomografia por Emissão de Psitrn |
| Phen | Fenantrolina |
| PXRD | Difrao de Raios-X de p |
| SEM | Microscopia Eletrônica de Varredura |
| SNP | Sílica Amorfa Funcionalizada |
| SPECT/CT | Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton nico |
| TBTU | N,N,N',N'-Tetrametil-O-(benzotriazol-1-il)uranio tetrafluoroborato |
| TEM | Microscopia Eletrônica de Transmissão |
| TEOS | Tetraetil ortosilicato |
| TGA | Análise termogravimétrica |
| ZnPC | Fitalocianina de Zinco |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 21 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 24 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL..... | 24 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 24 |
| 3 | FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... | 26 |
| 3.1 | ÍONS LANTANÍDEOS: ESTRUTURA ELETRÔNICA E PROPRIEDADES ESPECTROSCÓPICAS. | 26 |
| 3.2 | BIOMARCADORES..... | 29 |
| 3.2.1 | <i>BIOMARCADORES LUMINESCENTES.....</i> | 29 |
| 3.2.2 | <i>BIOMARCADORES À BASE DE NANOMATERIAIS RADIOATIVOS.....</i> | 32 |
| 3.3 | NANOPARTÍCULAS INORGÂNICAS DA CLASSE NaLnF_4 | 35 |
| 3.4 | COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO COM ÍONS LANTANÍDEOS INSERIDOS EM NANOPARTÍCULAS DE SiO_2 | 40 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 45 |
| 4.1 | REAGENTES..... | 45 |
| 4.1.1 | <i>SÍNTESE DO 10- (2-CARBOXIETIL) -5,5-DIFLUORO-5H- DIPIRROLO [1,2-C: 2', 1'-F] [1,3,2] DIAZABORININ-4-IUM-5- UIDE (BODIPY COOH).....</i> | 48 |
| 4.1.2 | <i>SÍNTESE DO 5,5-DIISOTIOCIANATO-1,3,7,9-TETRAMETHIL-10-FENIL-5H DIPIRROLO [1,2:2', 1'F] [1,3,2] DIAZABORININ-4-IUM- 5- UIDE (BODIPY NCS).....</i> | 48 |
| 4.1.3 | <i>SÍNTESE DA FTALOCIANINA DE ZINCO (ZNPC).....</i> | 49 |
| 4.1.4 | <i>ACETILAÇÃO DO ÁCIDO P-CUMÁRICO.....</i> | 50 |
| 4.1.5 | <i>PREPARAÇÃO DOS CLORETOS DE ÍTRIO, EURÓPIO E LUTÉRCIO....</i> | 51 |
| 4.2.1 | <i>SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE $\text{NaYF}_4:5\%Eu$.....</i> | 51 |
| 4.2.1.1 | <i>FUNCIONALIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS $\text{NaYF}_4:5\%EU$ COM GRUPOS AMINA ($\text{NaYF}_4:5\%Eu - \text{NH}_2$).....</i> | 52 |
| 4.2.1.2 | <i>METODOLOGIA DE CONJUGAÇÃO DAS PARTÍCULAS $\text{NaYF}_4:5\%Eu - \text{NH}_2$ COM COMPOSTOS ORGÂNICOS AROMÁTICOS.....</i> | 52 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.2.1.2.1 | <u>MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE NaYF₄: 5% Eu-NH₂ COM ÁCIDO P-CUMÁRICO (NaYF₄: 5% Eu - COUMARIC).....</u> | 52 |
| 4.2.1.2.2 | <u>MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE NaYF₄: 5% Eu-NH₂ COM TIROSINA (NaYF₄: 5% Eu - TYR3).....</u> | 53 |
| 4.2.1.2.3 | <u>MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE NaYF₄: 5% Eu-NH₂ COM BODIPY COOH (NaYF₄: 5% Eu - BODIPY COOH).....</u> | 54 |
| 4.2.1.2.4 | <u>MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE NaYF₄: 5% Eu-NH₂ COM BODIPY NCS (NaYF₄: 5% Eu - BODIPY NCS).....</u> | 54 |
| 4.2.1.2.5 | <u>MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE NaYF₄: 5% Eu-NH₂ COM BODIPY NCS/TYR3 (NaYF₄: 5% Eu - BODIPY NCS/TYR3).....</u> | 54 |
| 4.2.1.2.6 | <u>MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE NaYF₄: 5% Eu-NH₂ COM ZnPC (NaYF₄: 5% Eu - ZnPC).....</u> | 55 |
| 4.2.1.3 | <i>ESTIMATIVA DA QUANTIDADE DE COMPOSTO ORGÂNICO ADICIONADO MODIFICAÇÃO AS SUPERFÍCIES DAS PARTÍCULA.....</i> | 55 |
| 4.2.1.4 | <i>CULTURA DE CÉLULAS E MICROSCOPIA ÓPTICA CONFOCAL....</i> | 57 |
| 4.2.1.5 | <i>METODOLOGIA DE RADIODACÃO APLICADA AS NANOPARTÍCULAS NaYF₄:5% Eu - COUMARIC, NaYF₄:5% Eu - TYR3 E NaYF₄:5% Eu - BODIPY/TYR3 COM O RADIOISÓTOPO I-123.....</i> | 58 |
| 4.2.1.6 | <i>METODOLOGIA DE ABSORÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS NaYF₄:5% Eu - COUMARIC-¹²³I, NaYF₄:5% Eu - TYR3-¹²³I E NaYF₄:5% Eu - BODIPY/TYR3-¹²³I POR CÉLULAS HT-29.....</i> | 59 |
| 4.2.2 | <i>SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS EuDPA-SiO₂-NH₂ E Lu_{0.5}-Eu_{0.5}DPA-SiO₂-NH₂.....</i> | 59 |
| 4.2.2.1 | <i>CULTURA DE CÉLULAS E MICROSCOPIA ÓPTICA CONFOCAL....</i> | 60 |
| 4.2.2.2 | <i>SÍNTESE DO COMPOSTO HÍBRIDO ¹⁷⁷Lu- EuDPA-SiO₂-NH₂.....</i> | 60 |
| 4.2.2.3 | <i>METODOLOGIA DE ABSORÇÃO DO COMPOSTO HÍBRIDO ¹⁷⁷Lu- EuDPA-SiO₂-NH₂ EM CÉLULAS HT-29.....</i> | 61 |
| 4.3 | INSTRUMENTAÇÃO..... | 62 |
| 4.3.1 | ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (FT-IR)..... | 62 |
| 4.3.2 | ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS)..... | 62 |

| | | |
|----------------|---|------------|
| 4.3.3 | <i>DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DE PÓ.....</i> | 62 |
| 4.3.4 | <i>ESPECTROSCOPIA DE FOTOLUMINESCÊNCIA.....</i> | 62 |
| 4.3.4.1 | <i>CÁLCULO DAS TAXAS RADIATIVAS A_{01}, A_{02}, A_{03} E A_{04}.....</i> | 63 |
| 4.3.4.2 | <i>EFICIÊNCIA QUÂNTICA DE EMISSÃO.....</i> | 63 |
| 4.3.5 | <i>MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (SEM).....</i> | 64 |
| 4.3.6 | <i>MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (TEM).....</i> | 64 |
| 4.3.7 | <i>VIABILIDADE CELULAR.....</i> | 64 |
| 4.3.8 | <i>ANIMAIS.....</i> | 65 |
| 4.3.9 | <i>DETECTOR DE RADIAÇÃO IONIZANTE.....</i> | 65 |
| 4.3.10 | <i>TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA POR EMISSÃO DE FÓTON ÚNICO (SPECT).....</i> | 65 |
| 5 | <i>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</i> | 66 |
| 5.1 | <i>BIOMARCADORES LUMINESCENTES.....</i> | 66 |
| 5.1.1 | <i>BIOMARCADORES LUMINESCENTES À BASE DE $NaYF_4:5\%Eu$.....</i> | 66 |
| 5.1.1.1 | <i>CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ESTRUTURAL DAS PARTÍCULAS $NaYF_4:5\%Eu$ E $NaYF_4:5\%Eu-NH_2$.....</i> | 66 |
| 5.1.1.2 | <i>ANÁLISE COMPOSICIONAL DAS NANOPARTÍCULAS CONJUGADO À BASE DE $NaYF_4:5\%Eu$.....</i> | 69 |
| 5.1.1.3 | <i>ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DO SISTEMA CONJUGADO.....</i> | 83 |
| 5.1.1.4 | <i>ANÁLISE DA ABSORÇÃO DOS BIOMARCADORES LUMINESCENTES POR CÉLULAS HT-29 VIA MICROSCOPIA CONFOCAL.....</i> | 92 |
| 5.1.2 | <i>BIOMARCADORES LUMINESCENTES À BASE DAS PARTÍCULAS HÍBRIDAS $EuDPA\subset SiO_2-NH_2$.....</i> | 95 |
| 5.1.2.1 | <i>ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS PARTÍCULAS HÍBRIDAS $EuDPA\subset SiO_2-NH_2$.....</i> | 95 |
| 5.1.2.2 | <i>ANÁLISE QUÍMICA E COMPOSICIONAL DAS PARTÍCULAS HÍBRIDAS $EuDPA\subset SiO_2-NH_2$.....</i> | 100 |
| 5.1.2.3 | <i>ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DAS PARTÍCULAS HÍBRIDAS $EuDPA\subset SiO_2-NH_2$.....</i> | 106 |
| 5.1.2.4 | <i>ANÁLISE DA ABSORÇÃO DAS PARTÍCULAS $EuDPA\subset SiO_2-NH_2$ POR CÉLULAS HT-29 VIA MICROSCOPIA CONFOCAL.....</i> | 110 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 5.2 | BIOMARCADORES RADIOATIVOS..... | 112 |
| 5.2.1 | RADIOIODAÇÃO DE BIOMARCADORES CONJUGADOS À BASE DE NANOPARTÍCULAS DE NaYF ₄ :5% Eu..... | 112 |
| 5.2.2 | ANÁLISE DA ABSORÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS NaYF ₄ :5% Eu - COUMARIC- ¹²³ I, NaYF ₄ :5% Eu - TYR03- ¹²³ I E NaYF ₄ :5% Eu - BODIPY/TYR03- ¹²³ I EM CÉLULAS HT-29..... | 113 |
| 5.2.3 | BIOMARCADORES RADIOATIVOS À BASE DAS PARTÍCULAS HÍBRIDAS ¹⁷⁷ Lu-EuDPA-SiO ₂ -NH ₂ | 114 |
| 5.2.3.1 | ANÁLISE DA ABSORÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS ¹⁷⁷ Lu-EuDPA-SiO ₂ -NH ₂ EM CÉLULAS HT-29..... | 115 |
| 5.2.3.2 | AVALIAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS ¹⁷⁷ Lu-EuDPA-SiO ₂ -NH ₂ ATUANDO RADIOMARCADORES IN VIVO..... | 117 |
| 6 | CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS..... | 121 |
| | REFERÊNCIAS..... | 123 |
| | APÊNDICE A: REAÇÕES ENVOLVIDAS NOS PROCESSOS DE CONJUGAÇÃO..... | 133 |

1 INTRODUÇÃO

Estima-se, a partir de dados coletados em 2018, que o câncer de colorretal é o terceiro tipo de câncer (9,7%) com maior incidência no mundo (excluindo-se o câncer de pele), atrás apenas do câncer de pulmão (13%) e câncer de mama (11,9%) (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2018). No que se refere a índice de mortalidade, o dado ainda é mais alarmante, pois o câncer de colorretal ocupa segunda posição (9,2%) o que demonstra o grau de perigo que esta doença pode causar (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2018).

No que se refere ao Brasil o câncer de colorretal também tem indicadores de mortalidade e incidência elevados. No país, o índice de mortalidade para o ano de 2018 apresentou valor igual a 9,3%, ocupando o terceiro lugar considerando ambos os sexos, apenas atrás do câncer de mama e próstata com 15,3% e 15,2%, respectivamente. A relação de gênero também mostra-se importante para determinação da incidência deste câncer no país. Estima-se que em 2018 ocorreram 27.737 (8,9 %) novos casos de câncer de colorretal considerando apenas homens e 27.046 (9,6%) novos casos de câncer de colorretal considerando apenas mulheres, correspondendo a ocupação das segundas posições no número de incidência (INCA, 2017; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2018).

A incidência do câncer de cólon e reto é o segundo mais frequente nas regiões Sudeste e Sul. Nas regiões, Centro-Oeste, Nordeste e Norte é o terceiro mais frequente (INCA, 2017). Como mencionado anteriormente, as taxas de incidência do câncer de colorretal apresentam-se muito distintas em relação às regiões do Brasil. Um motivo para isso pode ser o fato da doença ser influenciada por fatores genéticos, ambientais e pelo estilo de vida do indivíduo (ARNOLD et al., 2017; BOYLE; LEON, 2002; SANDLER, 1996).

O diagnóstico do câncer de colorretal é realizado através da identificação de feridas (úlceras) no colon ou no reto. Para isso, existem alguns métodos tipicamente utilizados para o detecção da doença, tais como: teste de sangue oculto nas fezes (TSOF), sigmoidoscopia e colonoscopia (LIEBERMAN, 2010).

TSOF é o teste mais utilizado atualmente principalmente pela sua maior simplicidade de análise em comparação com os demais métodos de investigação (LIEBERMAN, 2010). Este teste é baseado na identificação de pequenas quantidades de sangue nas fezes do paciente, visando perceber indícios de úlceras nos mesmos, o que pode indiciar a presença de câncer de colorretal. Apesar de ser uma técnica bastante simples é também a menos sensível dentre as

existentes, visto que a mesma é passível de falsos positivos pela ingestão de determinados alimentos. Além disto, a percepção da enfermidade dependerá da qualidade e do número de reproduções na análise da amostra (CUNNINGHAM et al., 2010).

Uma outro método de diagnóstico muito importante na detecção do câncer de colorretal é a signoscopia. Este exame baseia-se no uso de uma sonda que é inserida no intestino grosso (cólon) avaliando os órgãos a uma distância de no máximo 60 cm, onde se desenvolve a maior parte do câncer de colorretal. Esta análise permite identificar a presença de feridas nos tecidos, além de permitir, caso necessário, a remoção de amostras para biopsias que são importantes na identificação do carcinoma (LIEBERMAN, 2010).

A Colonoscopia é a técnica de rastreamento mais comum para identificação do câncer de colorretal atualmente devido principalmente ao seu alto índice de precisão, o que pode reduzir a incidência da doença em cerca de 76% a 90% dos casos (ASSIS, 2008). Esta técnica, analogamente à signoscopia, também é baseada na introdução de uma sonda no intestino grosso e reto, agora em uma maior profundidade, possibilitando diagnósticos mais eficientes. Entretanto, este método está associado a um maior risco de complicações em relação aos outros, bem como maior ocorrência de perfurações e hemorragias na região investigada (ASSIS, 2008; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018). Além de requerer uma maior preparação intestinal, restrição alimentar e seus resultados serem muito dependente da perícia do operador (ASSIS, 2008).

Apesar de existirem técnicas bem estabelecidas para o diagnóstico de câncer de colorretal ainda ocorrem muitas falhas nas análises médicas que podem ser solucionadas. Neste sentido, vem sendo desenvolvidos métodos alternativos para detecção deste mal ao longo dos anos visando complementar as técnicas já existentes e promover diagnósticos com maior precisão e menor tempo. Uma dessas alternativas é a exploração da nanociência no âmbito do desenvolvimento de nanomateriais. Estes campo vem ocupando posição de destaque, principalmente por possibilitar o alcance de alta especificidade e sensibilidade nos diagnósticos. Estas qualidades provem das propriedades intrínsecas dos nanomateriais, fazendo com que o uso desta classe de compostos apresente-se como uma via mais versátil em comparação com as técnicas de diagnósticos comumente empregadas (GUERRINI; GARCIA-RICO; ALVAREZ-PUEBLA, 2018). Atualmente a escolha de nanomateriais para utilização como biomarcadores de câncer tem ganhado evidência na ciência, os quais podem ser representados por uma diversidade de compostos como, por exemplo, na forma de óxidos metálicos, semicondutores, polímeros, dentre outros. O sucesso no emprego das nanopartículas para uso

como biomarcadores e/ou na terapia do câncer está diretamente relacionado às suas propriedades físico-químicas, dentre as quais podemos destacar o magnetismo, radioatividade e luminescência como uma das mais relevantes (PAN et al., 2018; YE et al., 2018).

Neste trabalho são desenvolvidos duas classes de nanomateriais, as partículas de $\text{NaYF}_4:5\%\text{Eu}$ conjugadas com pequenas moléculas aromáticas (ácido p-cumárico, tirosina, BODIPY e fitalocianina de zinco (ZnPC)) e o complexo de coordenação inserido em uma matriz de SiO_2 , visando o seu uso para biomarcação de câncer de colorretal. Os marcadores biológicos exploram as propriedades luminescentes provenientes da espectroscopia do íon Európio trivalente inserido nas matrizes inorgânicas de ambos os compostos. Adicionalmente, a radioatividade é incorporada ao material pelo uso dos isótopos radioativos Lu-177 e I-123 nos compostos, seja por substituição do sítio lantanídeo ou por incorporação via reação de iodação em anéis fenólicos, respectivamente, resultando na composição de sondas multimodais (luminescentes-radioativas) que funcionem como alternativas para o diagnóstico do câncer de colorretal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver duas classes de nanopartículas luminescentes e radioativas para atuar como biomarcadores de câncer de colorretal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Neste trabalho preparou-se duas classes de nanomateriais multimodais (luminescentes-radioativos), onde os seus objetivos específicos individuais são apresentado a seguir:

- i) Nanopartículas à base de NaYF₄:5%Eu:
- Sintetizar e caracterizar as nanopartículas NaYF₄:5%Eu
 - Aplicar a metodologia de funcionalização das nanopartículas NaYF₄:5%Eu com grupos amina (NaYF₄:5%Eu-NH₂) e caracteriza-las;
 - Realizar as reações de conjugação entre as partículas NaYF₄:5%Eu-NH₂ e as moléculas ácido p-cumárico, tirosina, BODIPYs, ZnPC e BODIPY/Tirosina e caracteriza-las;
 - Avaliar as propriedades ópticas tanto para as partículas NaYF₄:5%Eu-NH₂ quanto para os compostos conjugados NaYF₄:5%Eu-Coumaric, NaYF₄:5%Eu-Ty3, NaYF₄:5%Eu-BODIPY COOH, NaYF₄:5%Eu-BODIPY NCS, NaYF₄:5%Eu-ZnPC e NaYF₄:5%Eu-BODIPY NCS/Ty3;
 - Estudar a absorção celular, utilizando a linhagem HT-29, para as nanopartículas conjugadas utilizando-se da microscopia óptica confocal;
 - Realizar reações de incorporação de I-123 nos compostos NaYF₄:5%Eu-Coumaric, NaYF₄:5%Eu-Ty3 e NaYF₄:5%Eu-BODIPY NCS/Ty3;
 - Avaliar a absorção celular utilizando em células HT-29 quantificando a atividade radioativas dos compostos sintetizados.

ii) Nanopartículas à base de $\text{EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$:

- Sintetizar e caracterizar o complexo EuDPA conforme descrito na literatura;
- Preparar o nanocomposto híbrido de coordenação $\text{EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ e caracteriza-lo;
- Investigar as propriedades ópticas dos compostos EuDPA e $\text{EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$;
- Estudar a absorção das nanopartículas $\text{EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ por células de colorretal da linhagem HT-29 por microscopia óptica confocal;
- Realizar reações de incorporação de Lu-177 nas nanopartículas $\text{EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ (^{177}Lu - $\text{EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$);
- Avaliar a absorção celular utilizando em células HT-29 quantificando a atividades radioativa para o ^{177}Lu - $\text{EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$;
- Obter e avaliar imagens de SPECT/CT para o composto ^{177}Lu - $\text{EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ em ensaios *in vivo*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 ÍONS LANTANÍDEOS: ESTRUTURA ELETRÔNICA E PROPRIEDADES ESPECTROSCÓPICAS

Os lantanídeos são elementos que compõem o sexto período da tabela periódica, compreendendo os quinze elementos que vão do lantânio (La, $Z = 57$) ao lutécio (Lu, $Z = 71$). Estes elementos possuem uma configuração eletrônica no estado fundamental representada por: $[\text{Xe}]4f^n 5d^{1-x} 6s^2$, com n variando de zero (La) a quatorze (Lu) e com valores de $x = 0$ ou 1 (BINNEMANS, 2015). Eles tipicamente apresentam o número de oxidação $+3$, o que leva à configuração $[\text{Xe}]4f^n$ ($n = 1, 2, 3, \dots, 14$), promovendo para a maioria de seus elementos uma camada f semi-preenchida, fato que é de suma importância para o surgimento das propriedades deste íon (BINNEMANS, 2015). Uma das principais características dos íons lantanídeos é o fato de os elétrons pertencentes aos orbitais $4f$ encontrarem-se protegidos pelos orbitais $5s$ e $5p$, fenômeno denominado como efeito de blindagem. A principal consequência deste efeito é observado no comportamento das transições $f-f$, que apresentam linhas finas e bem definidas nos espectros de excitação e emissão, similar ao que ocorre em um espectro atômico. Além disso, o preenchimento preferencial do orbital mais energético ($4f$) proporcionado pelo efeito de blindagem favorece uma situação não usual de diminuição do raio iônico como o aumento do número atômico, e este processo é nomeado por contração lantanídica (BINNEMANS, 2015; SEITZ; OLIVER; RAYMOND, 2007).

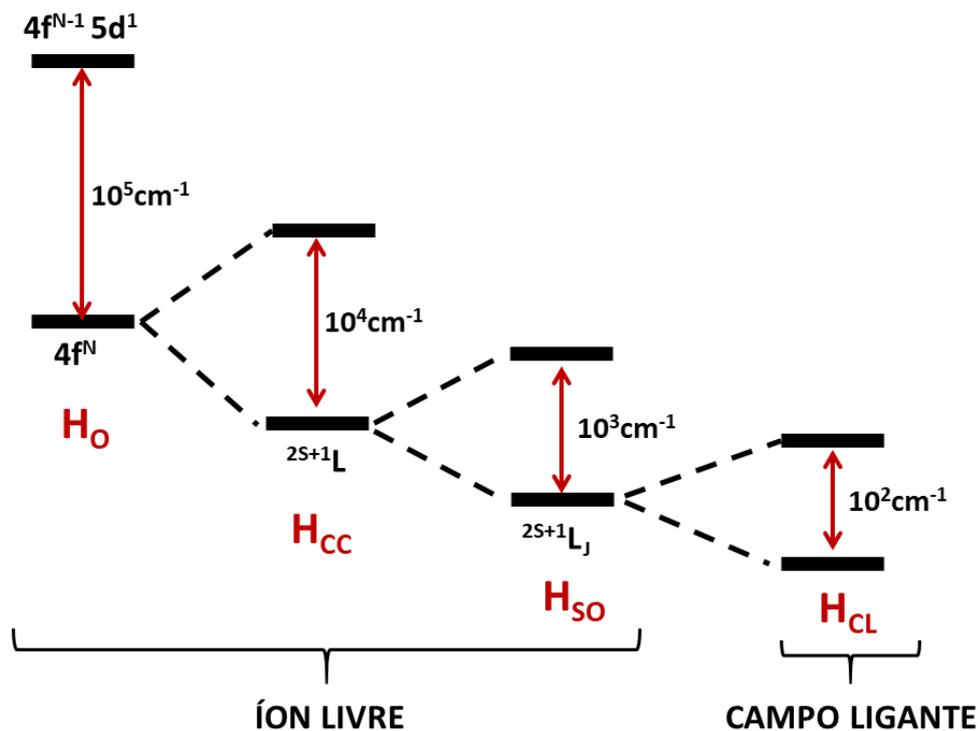
Como uma das consequências do efeito de blindagem dos orbitais $4f$ é apropriado tratar este nível energético como um orbital atômico isolado que pode sofrer influência de um campo perturbativo promovido pelas entidades ligadas a eles. Deste modo, é interessante considerar inicialmente o sistema formado pelo íon lantanídeo livre para a descrição dos seus níveis $4f$ de energia e em seguida considerar a influência do ligante no seu ambiente químico (BINNEMANS, 2015; CARNALL et al., 1989). No caso do íon lantanídeo livre, pode-se imaginá-lo em uma simetria esferossimétrica, sem a presença de ligações químicas, onde a influência do ambiente externo consiste em interações eletrônicas formadas pelo campo central (H_0), pela repulsão coulombiana (H_C) e pelo acoplamento spin-órbita (H_{SO}), ordenadas de forma crescente em relação à magnitude da influência exercida no íon. O campo central se relaciona com a energia potencial gerada na configuração esferossimétrica. É a partir deste campo que são obtidos os níveis de energia da configuração $[\text{Xe}]4f^n$ (CARNALL et al., 1989). A repulsão coulombiana entre os elétrons $4f^n$ promove a quebra de degenerescência destes estados e

formação dos níveis eletrônicos representados por termos espectroscópicos ^{2S+1}L , onde S é o momento de spin total e L o momento angular de spin total. A interação spin-órbita promove o acoplamento dos números quânticos L e S na composição do momento angular total (J) para a formação dos níveis $^{2S+1}L_J$ (BINNEMANS, 2015).

Quando nos referimos a formação de compostos com lantanídeos, considera-se que o efeito de blindagem dos orbitais 4f pelos orbitais 5s e 5p tornam o caráter covalente menos relevante na formação de suas ligações químicas e, sendo assim, a descrição mais apropriada se baseia na teoria do campo ligante (CARNALL et al., 1989). Esta abordagem pode ser compreendida, de forma representativa, pela deformação da simetria esferossimétrica do íon livre provocada pela presença dos ligantes, que em uma aproximação eletrostática atuam como portadores de carga na deformação do ambiente químico do metal. A presença do campo ligante (H_{CL}) promove uma quebra de degenerescência dos estados $^{2S+1}L_J$ em novos estados, implicando no surgimento dos chamados níveis starks, que são formados pelo acoplamento dos números quânticos M_{J^s} (BINNEMANS, 2015). De modo geral, a formação dos estados dos íons Ln^{3+} pode ser descrita pela composição de interações referentes ao íon livre (Híon livre) e interações devido ao campo ligante (H_{CL}) como mostrado na Figura 1.

Dentre os íons lantanídeos o mais explorado em termos de suas propriedades ópticas é o Eu^{3+} , e isto se relaciona com a característica de seus compostos apresentarem alta pureza de cor, e principalmente pelo íon európio servir como uma ótima sonda estrutural (BINNEMANS, 2015). Esta última está intimamente relacionada com a natureza do seu nível emissor 5D_0 , que por não sofrer separação sob a influência do campo ligante ($2J+1 = 1$) favorece a formação de poucas linhas espectrais que podem ser relacionadas com a modificação da simetria em torno do íon. As linhas de emissão do Eu^{3+} geralmente investigadas correspondem às transições $^5D_0 \rightarrow ^7F_J$ (onde, $J = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ e 6) que são oriundas de sua configuração eletrônica $4f^6$. Em termos do caráter da transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ o mecanismo é regido por dipolo magnético e suas linhas não são afetadas pela mudança de simetria. Por outro lado, a transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ é governada predominantemente pelo mecanismo de dipolo elétrico forçado, mais sensível a alterações no ambiente químico que circunda o íon. Isto significa que pequenas mudanças na simetria do íon podem ser correlacionadas por alterações no padrão de linhas no seu espectro de emissão (BINNEMANS, 2015).

Figura 1 - Principais interações intra-atômicas para o caso do íon lantanídeo livre e considerando a contribuição do campo ligante.



Fonte: Fornecida pelo próprio autor.

A transição ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ também é governada por mecanismo de dipolo elétrico, contudo esta transição somente é verificada em simetrias muito baixas (tipicamente para sistemas com grupos pontuais C_n , C_{nv} e C_s ,) onde não suas simetrias não possuem de centro de inversão, e a regra de seleção de Laporte, que outrora apresentava-se proibida ($\Delta J = 0$), é relaxada (DA SILVA VIANA et al., 2014; LIMA; MALTA; ALVES JÚNIOR, 2005). Além disso, ainda é possível, em alguns casos, estimar o número de sítios metálicos no composto pela quantidade de linhas presentes na transição ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$, quando houver ocorrência da mesma no sistema estudado, pois cada sítio deverá contribuir com uma linha nesta transição (multiplicidade: $2J+1 = 1$) (BINNEMANS, 2015).

As excelentes propriedades apresentadas anteriormente sugerem de a exploração da espectroscopia de íons Eu^{3+} em diferentes materiais. Para isso, duas classes de compostos serão investigadas neste trabalho: i) nanopartículas do tipo $\text{NaYF}_4:\text{Eu}^{3+}$ e ii) compostos híbridos de coordenação com íons Európio inseridos em nanopartículas de sílica radiomarcados ($\text{EuDPA}@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$) visando a composição de materiais alternativos para biomarcação.

3.2 BIOMARCADORES

3.2.1 *BIOMARCADORES LUMINESCENTES*

Os compostos luminescentes vêm ao longo dos anos representando uma das mais importantes classes de materiais, visto que a eles são atribuídos uma vasta gama de aplicações que podem influenciar direta ou indiretamente no progresso das mais diversas áreas, bem como no desenvolvimento de novas tecnologias (BÜNZLI; PIGUET, 2005; DA LUZ et al., 2015), segurança (WEBER et al., 2011) e saúde pública (HUANG et al., 2014). De forma geral, a luminescência destes compostos pode ser definida como a emissão de luz gerada como resposta a um estímulo qualquer aplicado a matéria, com exceção à variação de temperatura. Quando um corpo material é estimulado através da incidência de luz (fotóns) a luminescência resultante é classificada por fotoluminescência (BLASSE; GRABMAIER, 1994).

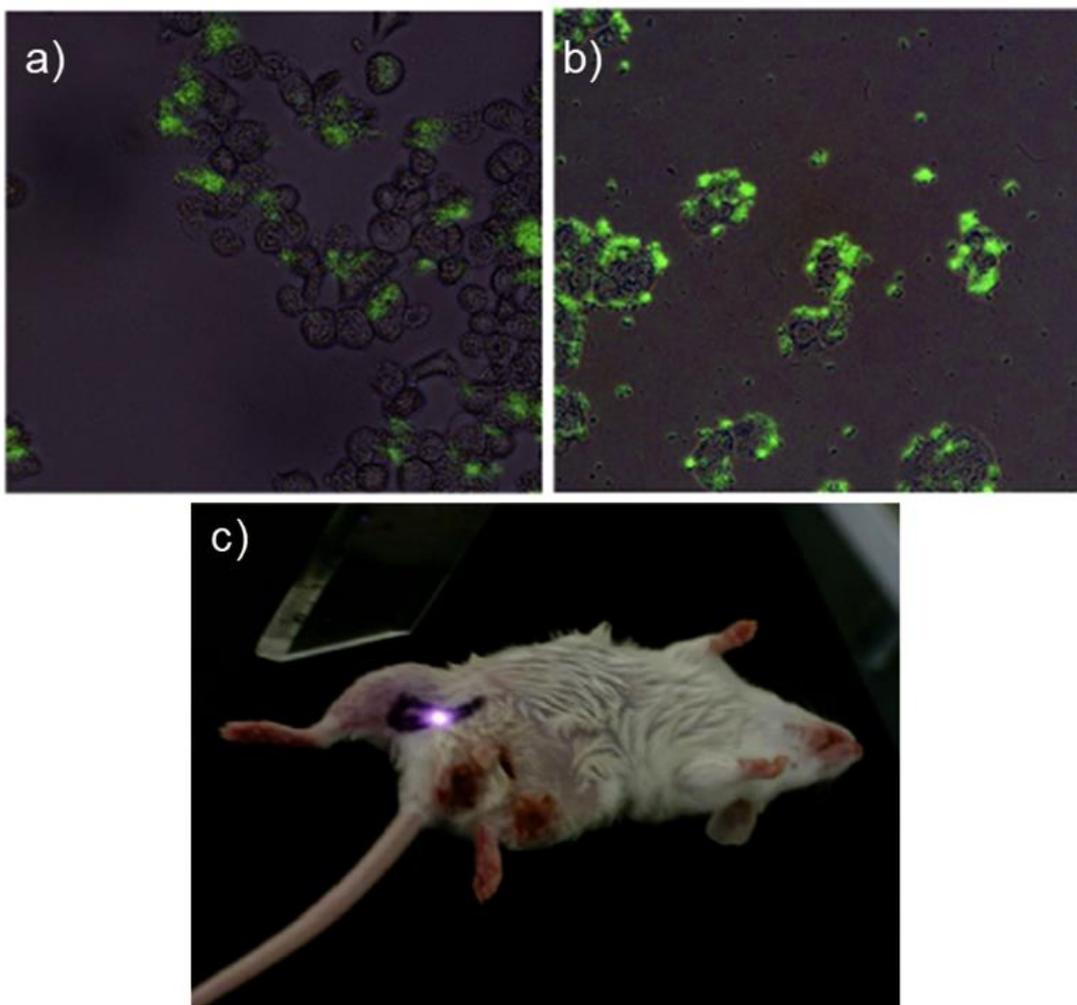
O processo de fotoluminescência pode ocorrer por diferentes caminhos (mecanismos) e está relacionado com o comportamento óptico intrínseco de cada material. Um exemplo clássico de material luminescente são os pontos quânticos (Qdots). Qdots são nanocristais inorgânicos da classe dos semicondutores e o seu comportamento óptico pode ser correlacionado com o seu tamanho de partícula, devido ao fenômeno conhecido como confinamento quântico (MATTOUSSI; PALUI; NA, 2012).

Além da escolha do tipo do composto luminescente é de fundamental importância o entendimento da aplicação de interesse. Quando estes materiais exploram suas propriedades ópticas no meio biológicos são classificados como biomarcadores luminescentes. Os biomarcadores são materiais que podem ser introduzidos em um organismo e que possuem capacidade de servir como indicador mensurável, ou seja, capaz de monitorar funções biológicas normais, progressões de doenças, eficácia de tratamentos e efeitos adversos ocasionados por agentes terapêuticos (YE et al., 2018). Na literatura existem vários sistemas luminescentes que utilizam nanomateriais inorgânicos como plataformas para diversas aplicações na composição de biomarcadores (HUANG et al., 2014), (LIU et al., 2013). Um exemplo disso é mostrado por Chatterjee e colaboradores (CHATTERJEE; RUFAlHAH; ZHANG, 2008), onde é descrito um sistema para marcação de células e tecidos utilizando nanopartículas luminescentes formadas pelo composto $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ recoberto com polietilenimina ($\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}/\text{PEI}$). Este material apresenta emissão de luz violeta intensa, avaliando-se a suspensão de partículas em tampão fosfato-salino (PBS), após exposição a radiação laser ($\lambda_{\text{ex}} = 980 \text{ nm}$) em função do tempo de

incubação. Adicionalmente, o material apresenta viabilidade celular, efeitos na proliferação celular ou efeitos tóxicos que eventualmente podem conduzi-las a morte, acima de 80%, além de revelar eficiente marcação em células tumorais para as linhagens HT-29 e OVCAR3 referente aos carcinomas de colorretal e ovário, respectivamente (Figura 3a-b). A eficiência no uso das partículas NaYF₄:Yb,Er/PEI em sistema de marcação *in vivo* também foi verificado pela injeção das partículas em camundongos, as quais revelaram-se sondas eficazes como pode ser observado pela emissão de luz visível no tecido do animal (Figura 3c).

Um outro exemplo de biomarcadores luminescentes são os nanocompostos híbridos formados pela encapsulação de complexos metálicos fluorescentes por nanopartículas de sílica amorfa funcionalizada (SNP). Um representante desta classe de materiais é relatado por Gomes e colaboradores (GOMES et al., 2013) no qual é explorado a luminescência do complexo de Térbio, formado pela coordenação com o ácido picolínico, inserido dentro de SNP (Tbpic-SiO₂; Figura 4).

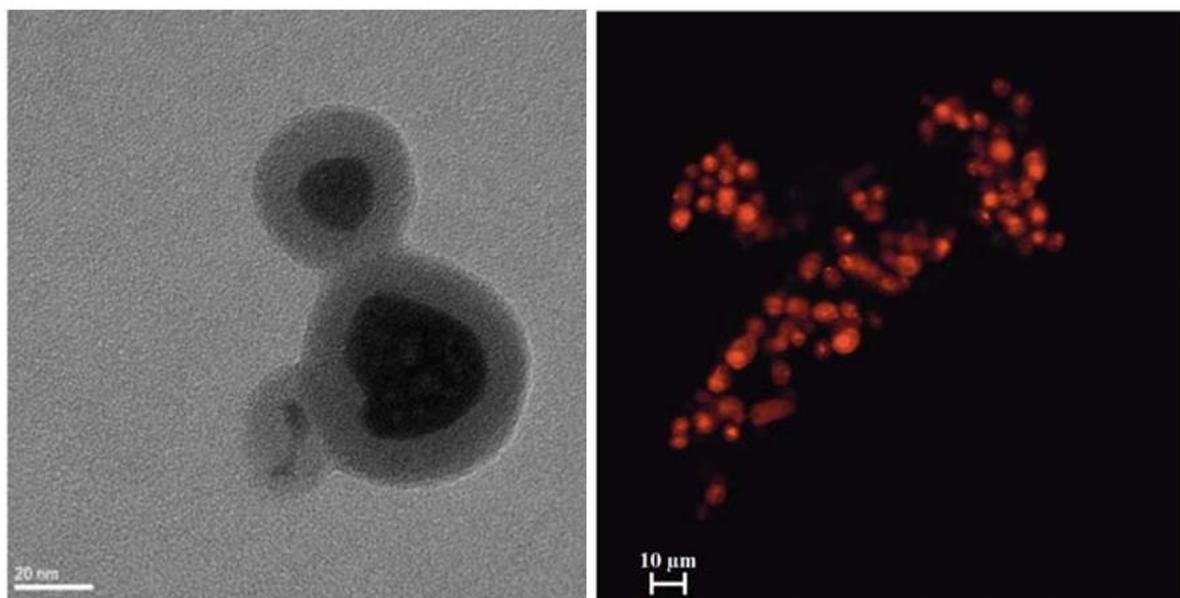
Figura 2: Representação do uso das nanopartículas $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er/PEI}$ para biomarcação em ensaios *in vitro* utilizando células a) HT-29 e b) OVACAR3. O ensaio de biomarcação com experimentos *in vivo* é apresentado em c).



Fonte: Adaptado de (CHATTERJEE; RUFAlHAH; ZHANG, 2008).

Este sistema foi projetado visando minimizar a instabilidade química do marcador fluorescente em relação ao meio externo. O composto híbrido Tbpic-SiO_2 formado mostrou-se atóxico após incubação em células de levedura *Candida albicans*, além de apresentarem boa interação na membrana celular, o que é revelado pela microscopia óptica confocal (Figura 4).

Figura 3: Imagens de TEM (esquerda) e microscopia óptica confocal (direita) para nanopartículas híbridas luminescentes Tbpic-SiO₂ isoladas e após incubação em células de levedura *Candida albicans*, respectivamente.



Fonte: Adaptado de (GOMES et al., 2013).

Importante notar que existem outras classes de biomarcadores, tais como materiais para ressonância magnética de imagem (RMI) e radiomarcadores biológicos, onde estes últimos iremos explorar em maiores detalhes para composição de parte de nossos materiais.

3.2.2 BIOMARCADORES À BASE DE NANOMATERIAIS RADIOATIVOS

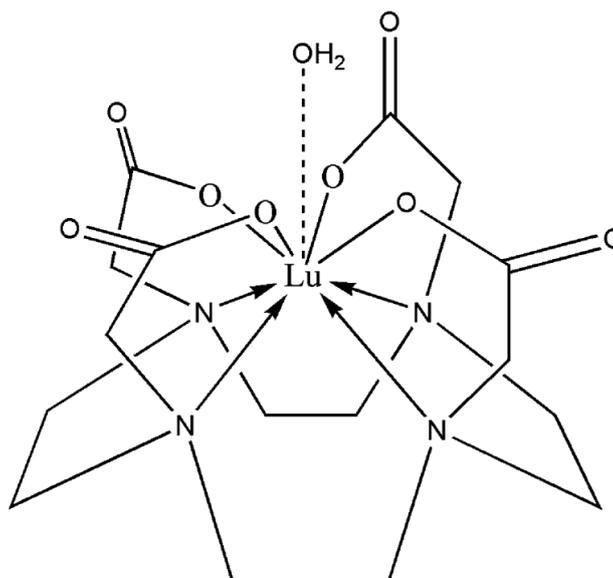
A diferença básica entre um nanomaterial convencional e um nanomaterial radioativo está na possibilidade de introduzir as propriedades físico-química únicas dos radionucleotídeos em nanocompostos de forma sinérgica, explorando a capacidade de detecção da radiação emitida pelo radioisótopo na geração de imagem (LU; HONG; CAI, 2016). A maioria dos nanomateriais radioativos são utilizados como agentes para obtenção de imagem por tomografia por emissão de pósitron (PET) ou tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT). No presente trabalho daremos mais enfoque em imagens obtidas pela técnica de SPECT, principalmente oriundas dos radionucleotídeos escolhidos para composição dos biomateriais geradores de radiação gama (Lu-177 e I-123).

O SPECT é uma técnica nuclear para obtenção de imagens de moléculas, metabolismos e/ou funções bioquímicas dos órgãos e células. Como o nome sugere as imagens são formadas

a partir de único raio- γ por desintegração nuclear. Uma quantidade grande de raios- γ são coletadas por câmeras de detecção que recebem essa radiação após a aquisição dos sinais em movimento rotacional, comumente em ângulos de 0° a 360° , convertendo-os em imagens 3D, as quais identificam a localização do radionucleotídeo com precisão (LONG, 2015).

Além das impressionantes características ópticas destacadas anteriormente, os lantanídeos se destacam também pelas suas propriedades radioativas (BANERJEE; PILLAI; KNAPP, 2015). Esta classe de radioisótopos são conhecidos por serem extensivamente utilizados como agentes de imagens com capacidade de formar compostos metalorgânicos estáveis e específicos que são úteis para uso em diagnóstico e terapia de diversas doenças (HOWELL et al., 1994; LU; HONG; CAI, 2016). Um exemplo destes são os compostos metalorgânicos que utilizam ligantes quelatos, onde os seus representante mais conhecidos são proveniente de complexos utilizando o composto macrocíclico DOTA (ácido 1,4,7,10 - tetraazaciclododecano - 1,4,7,10 - tetraacético), devido sua estrutura química favorecer alta estabilidade na coordenação com radioisótopos, o que viabiliza a obtenção de sondas eficazes para geração de imagens. (STASIUK; LONG, 2013). Na Figura 4 é representada a estrutura química do complexo Lu-DOTA, configuração análoga ao seu complexo radioativo (BANERJEE; PILLAI; KNAPP, 2015) .

Figura 4: Estrutura representativa do complexo Lu-DOTA



Fonte Adaptado de (BANERJEE; PILLAI; KNAPP, 2015).

A escolha do radioisótopo para uso médico depende de alguns fatores importantes, bem como o seu tempo de meia vida ($t_{1/2}$), tipo de decaimento radioativo (α , β^- ou γ), energia de emissão (KeV) e atividade específica (mCi/mg) (CUTLER et al., 2000). Dentre as partículas emissoras existentes as α e β^- são potencialmente utilizáveis para radioterapia, pois sua energia é capaz de produzir danos em distâncias mais curtas (entre 50 - 100 μm e entre 0,2 - 15 mm, respectivamente), possibilitando assim a realização no tratamento de câncer de colorretal, por exemplo, com maior precisão atingindo tanto quanto possível apenas a região enferma. Dentre os lantanídeos beta-emissores, os mais apropriados para uso em tratamentos são: Pm-149, Sm-153, Dy-166, Ho-166, Yb-175 e Lu-177 (CUTLER et al., 2000). Na Tabela 1 é descrito o tempo de meia vida, energia máxima para emissão beta e a energia da emissão gama destes elementos.

Tabela 1: Tempo de meia vida ($t_{1/2}$) e principais energias dos decaimentos beta ($E_{\beta\text{max}}$) e gama (E_γ) para os lantanídeos beta-emissores.

| Radioisótopo | $t_{1/2}$ (dias) | Decaimento | |
|--------------|------------------|-----------------------------|------------------|
| | | $E_{\beta\text{max}}$ (MeV) | E_γ (KeV) |
| Pm-149 | 2,21 | 1,10 | 286,00 |
| Sm-153 | 1,93 | 0,69 | 103,00 |
| Dy-166 | 3,40 | 0,40 | 82,50 |
| Ho-166 | 1,12 | 1,80 | 80,60 |
| Yb-175 | 4,19 | 0,47 | 396,00 |
| Lu-177 | 6,71 | 0,50 | 208,00 |

Diante dos radioisótopos lantanídeos anteriormente apresentados podemos destacar o Lu-177 como um dos elementos mais interessantes para composição de compostos para diagnósticos e terapia (BANERJEE; PILLAI; KNAPP, 2015). Como supracitado, as partículas β^- são capazes de se depositarem em distâncias mais curtas do tecido e isso pode ser explorado no tratamento de tumores de forma específica (evitando órgãos sadios). Neste âmbito o Lu-177 apresenta-se como um forte candidato no campo da radioterapia devido ao mesmo possuir grande abundância para sua emissão β^- de maior energia (498 KeV), cerca de 79,3%, seguido de 9,1 e 12,2% para as emissões β^- de energia intermediária (380 KeV) e de baixa energia (176 KeV), respectivamente (BANERJEE; PILLAI; KNAPP, 2015). Além disso, este radioisótopo possui duas emissões γ com abundâncias consideráveis 208 KeV (11,00%) e 112,95 KeV (6,40%), as quais são capazes de ser detectáveis e convertidas em imagem (SPECT/CT), que

são importantes para análises de pré-terapia, biofarmacocinética e guia de dosimetria do radiofármaco utilizado (BANERJEE; PILLAI; KNAPP, 2015).

O segundo radionucleotídeo explorado neste trabalho é o I-123. Este radioisótopo vem se apresentando como um ótimo candidato na composição de biomarcadores explorando sua propriedade γ -emissor. O uso deste radionucleotídeo surge como uma resposta aos problemas enfrentados pelo radiomarcadores clássicos, principalmente o Flúor-18 ($t_{1/2} = 109.7$ minutos), devido a sua maior facilidade de promover reações de halogenação, por apresentar tempo de meia vida suficientemente longo para detecção e monitoramento de processos bioquímicos ($t_{1/2} = 13.3$ h), além de possuir linhas gama com energias e abundâncias capazes de serem detectadas com eficiência por câmeras de radiação ionizante (STÖCKLIN, 1977).

Para composição do biomarcador é altamente importante a determinação do método de radiomarcagem escolhido, o que passa pelo conhecimento das propriedades químicas e composicionais do material estudado. Neste sentido, técnicas de radioiodação aplicáveis ao I-123 podem ser divididas pela natureza do processo empregado, onde é possível destacar os métodos físico-químico, enzimático e químico (BOURGUIGNON et al., 1997). Além disso, no que se refere a técnica de radioiodação química é possível classificá-la pela reação de substituição envolvida: eletrofílica ou nucleofílica. Considerando as reações de radioiodação para preparação de biomarcadores, temos que as reações nucleofílicas ocorrem pela substituição de um iodeto radioativo por substituintes orgânicos, como por exemplo reações de substituição em anéis fenólicos. Por outro lado, reações eletrofílicas podem ser realizadas a partir do uso de iodo molecular ($^{123}\text{I}_2$) juntamente com reagentes oxidantes favorecendo a obtenção do material de interesse (BOURGUIGNON et al., 1997).

3.3 NANOPARTÍCULAS INORGÂNICAS DA CLASSE NaLnF_4

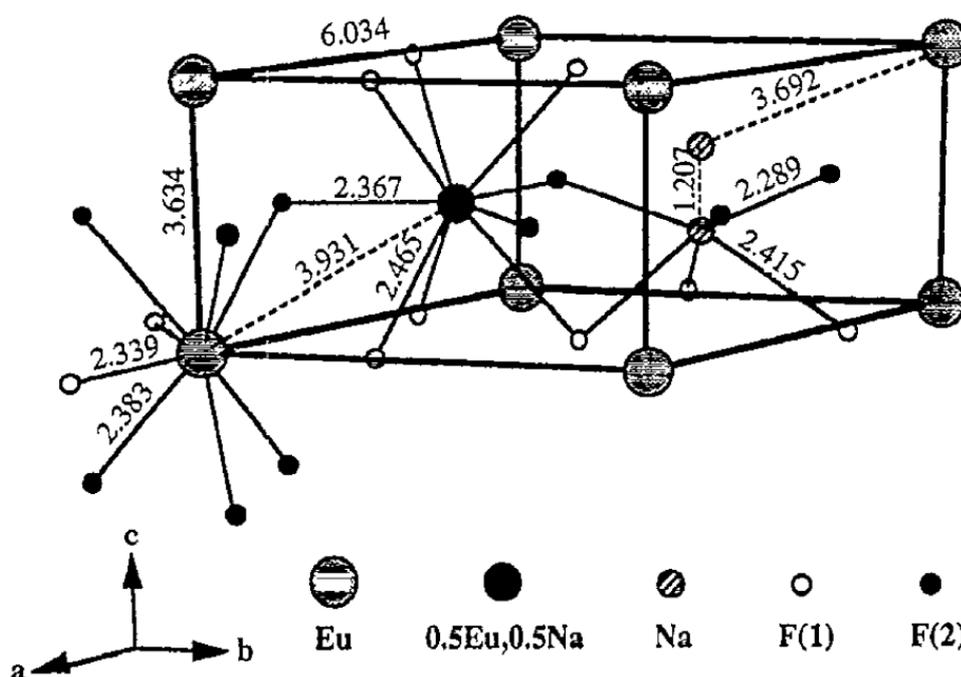
Compostos do tipo NaLnF_4 (onde, Ln = lantanídeos) compõem um importante grupo de materiais com uma larga variedade de aplicações resultante de suas propriedades, tais quais, o baixo tamanho médio de partículas, baixa citotoxicidade e por apresentar sua espectroscopia de fotoluminescência com características únicas (QIAN; ZHANG, 2008).

Em termos de estrutura cristalina esta classe de materiais pode assumir duas fases distintas: $\alpha\text{-NaLnF}_4$ (cúbica) e $\beta\text{-NaLnF}_4$ (hexagonal). A fase $\beta\text{-NaLnF}_4$ é sem dúvida a mais relatada na literatura para composição de dispositivos luminescentes, principalmente por apresentar um grupo pontual de simetria mais baixa na vizinhança do íon Ln^{3+} , o que favorece

o aparecimento das transições $f-f$ e, por conseguinte, a observação mais expressiva de linhas características do íon lantanídeo no espectro de emissão.

O primeiro relato de uma descrição detalhada desta estrutura cristalina foi feita por Burnis em 1965 (BURNS, 1965). Neste trabalho o NaLnF_4 apresenta grupo espacial P-6 onde os ânions flúor se organizam em arranjos triangulares e os cátions com três formas distintas: um sítio ocupado por Ln^{3+} , um sítio ocupado estatisticamente por $\frac{1}{2} \text{Na}^+$ e $\frac{1}{2} \text{Ln}^{3+}$ e dois sítios ocupados estatisticamente por Na^+ e vacâncias (BURNS, 1965). Neste arranjo cristalino o íon lantanídeo pode assumir ambos os sítios cristalográficos com disposição estatística com números de coordenação 9 compondo dímeros conectados da forma Ln-F-Ln . A Figura 5 mostra o ordenamento cristalino desta classe de composto representado pela célula unitária do NaEuF_4 (ZAKARIA et al., 1997).

Figura 5: Representação da célula unitária para o composto $\beta\text{-NaEuF}_4$ ilustrando os ambientes químicos entorno dos cátions metálicos presentes na estrutura cristalina.



Fonte Adaptado de (ZAKARIA et al., 1997).

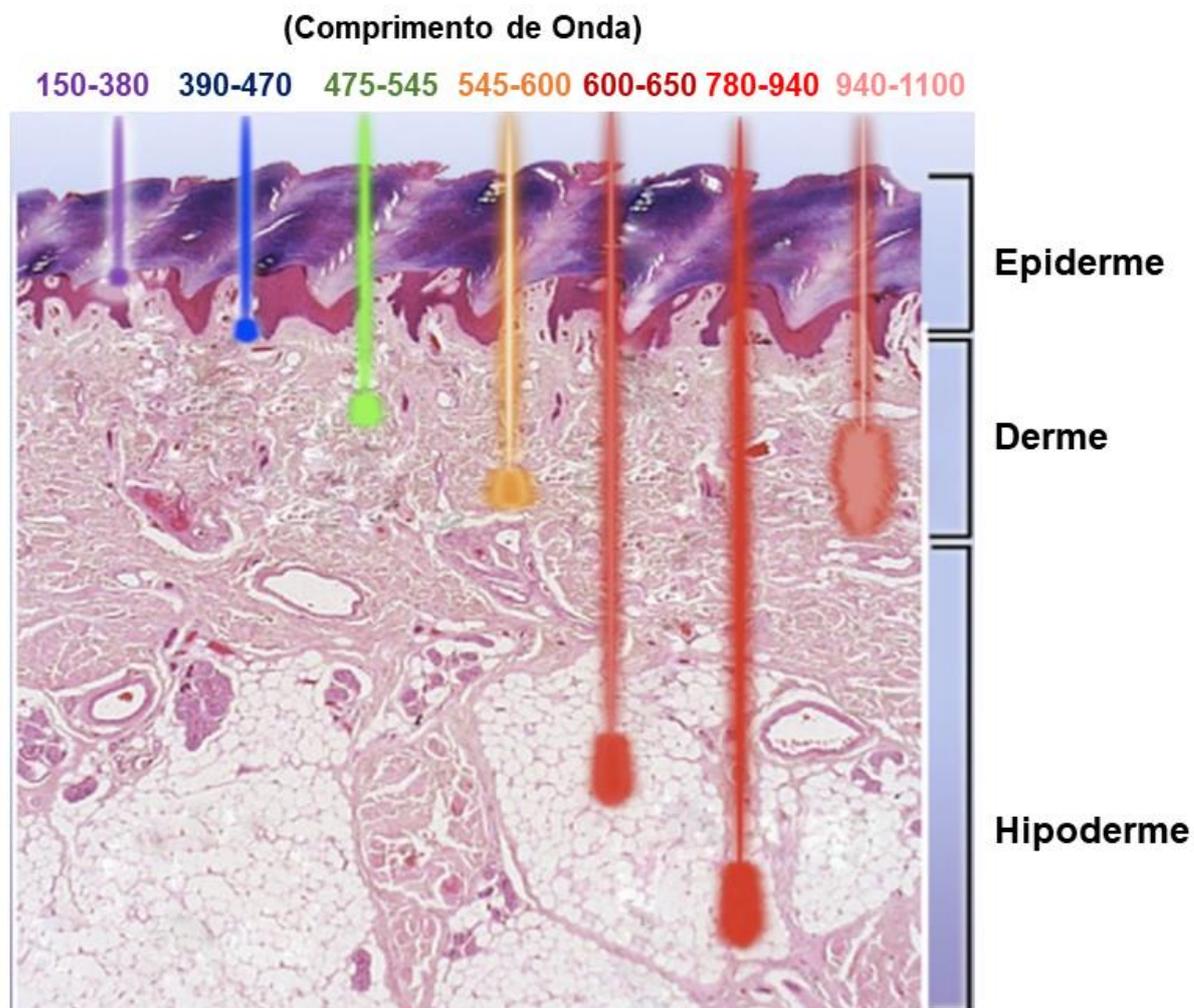
O que mais chama atenção em relação aos compostos NaLnF_4 são suas propriedades ópticas. Dentre a grande quantidade de íons lantanídeos possíveis para escolha, o íon európio inserido como dopante na composição do $\text{NaYF}_4:\text{Eu}^{3+}$ merece destaque, principalmente atuando como material promissor no campo da nanomedicina para composição de biomarcadores luminescentes (KUMAR et al., 2009; PODHORODECKI et al., 2012).

Atualmente a evolução tecnológica traz significativa melhora na relação de tempo entre a detecção de uma doença e a realização de um diagnóstico. Entretanto, no que se refere ao desenvolvimento de biomarcadores alguns critérios devem ser satisfeitos: as sondas devem ser preferencialmente multifuncionais, não-tóxicas, opticamente estáveis, pequenas em tamanho (tipicamente < 200 nm) além de serem funcionalizáveis com vetores seletivos (proteínas, anticorpos, dentre outros) (YAO; YAO; TONG, 2012).

Os materiais mais clássicos utilizados na formação de biomarcadores luminescentes são os Qdots. Entretanto, os métodos mais clássicos de preparação destes materiais baseiam-se no uso de metais pesados, como o Cádmio (CdTe, CdS), o que confere ao composto uma elevada toxicidade (GHADERI; RAMESH; SEIFALIAN, 2011). Tendo em vista esta problemática é importante buscar alternativas mais eficientes para a composição de biomarcadores luminescentes e neste ponto os compostos NaLnF_4 podem ser utilizáveis principalmente devido a sua alta biocompatibilidade (YANG, 2014). Na literatura são encontrados diversos exemplos destes materiais (NaYF_4 , NaGdF_4 ,...) que, por não apresentarem biotoxicidade e exibirem intensa emissão de luz, são fortes candidatos para composição de biomarcadores luminescentes (CHEN; LIU; TU, 2014).

Diante deste panorama, a utilização de nanopartículas do tipo $\text{NaLnF}_4:\text{Eu}^{3+}$ é uma via interessante na formação de biomarcadores eficientes, principalmente pelo íon európio possuir propriedades luminescentes únicas, bem como linhas de emissões estreitas e bem definidas e por possuir emissão predominante na região do vermelho/infravermelho próximo (NIR), o que é uma característica importante para uso em biomarcação, considerando o poder de penetração da radiação na pele (AVCI et al., 2013). A Figura 6 mostra a relação entre a penetração da luz em relação a irradiação em diferentes comprimentos de onda. É possível perceber que a radiação na região do vermelha/NIR pode chegar até a parte mais interna da pele (hipoderme) o que é interessante no que se refere ao desenvolvimento de biomarcadores luminescentes. A Tabela 2 mostra uma relação entre diferentes faixas de comprimento de onda e a profundidade de penetração da luz na pele.

Figura 6: Ilustração da correlação entre a penetração da luz em tecidos epiteliais e o comprimento de onda utilizado.



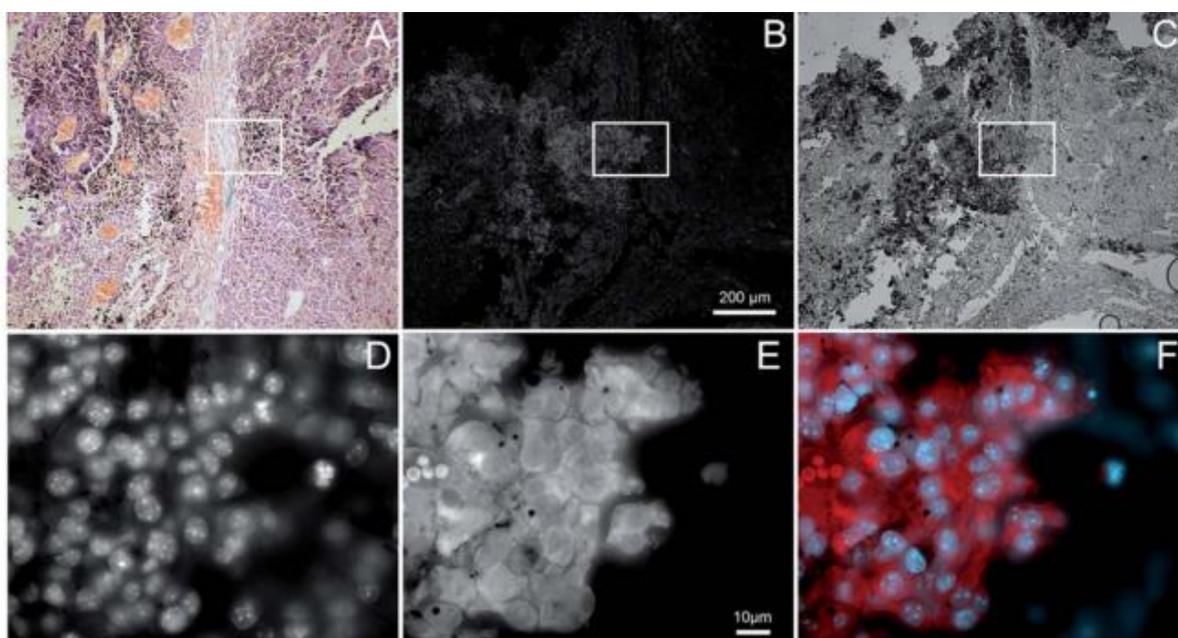
Fonte: Adaptado de (AVCI et al., 2013).

Tabela 2: Faixa de comprimento de onda, variação de cor e distância de penetração da luz quando exposta a pele humana (AVCI et al., 2013.)

| Comprimento de Onda (nm) | Varição de Cor | Penetração (mm) |
|---------------------------------|-------------------------|------------------------|
| 150-380 | Ultravioleta | < 0,1 |
| 390-470 | De Violeta para Azul | < 0,3 |
| 475-545 | Azul-Verde | ~ 0,3-0,5 |
| 545-600 | De Amarelo para laranja | ~ 0,5-1,0 |
| 600-650 | Vermelho | ~ 1,0-2,0 |
| 650-950 | Vermelho-NIR | 2-3 |
| 950-1200 | NIR | 1 |

Existem exemplos reportados na literatura que utilizam o $\text{NaLnF}_4:\text{Eu}^{3+}$ para bioimagem luminescente. Sojka e colaboradores (SOJKA et al., 2016) descrevem uma estratégia de síntese para as nanopartículas $\text{NaGdF}_4:\text{Eu}^{3+}$ utilizadas como biomarcador, de alta especificidade, aplicada a câncer de pele (melanoma). Tendo em vista que as células do melanoma não eram diferenciadas através de um único marcador protéico, os autores apresentam uma estratégia de conjugação de Lectinas às nanopartículas, visando o direcionamento do biomarcador para o sítio tumoral. A análise obtida via imagens de luminescência exploram o poder de penetração da emissão de luz do Eu^{3+} na região do vermelho/infravermelho próximo (NIR) para detecção das nanopartículas no tecido dos animais *ex vivo* (após seu sacrifício). Os resultados obtidos pela microscopia de fluorescência revelam que o sistema adquire especificidade pela conjugação $\text{NaGdF}_4:\text{Eu}^{3+}$ -Lectina na marcação de células de melanoma (Figura 7).

Figura 7: Imagem de tecidos de melanoma com PNA-conjugado com $\text{NaGdF}_4:\text{Eu}^{3+}$. Tecidos de camundongos corados com H&E (A) Demonstração da abundância dos vasos (laranja) e sítios de produção de melanina (preto) (B); O mesmo campo de visão fotografada no modo campo claro demonstrando a absorção de luz de melanina (C). Representam com maior magnificação da região indicada, utilizando a fluorescência do DAPI, indicando a coloração núcleos (D), b- $\text{NaGdF}_4:\text{Eu}^{3+}$ (E) e os sinais fundidos (*Merge*; F).

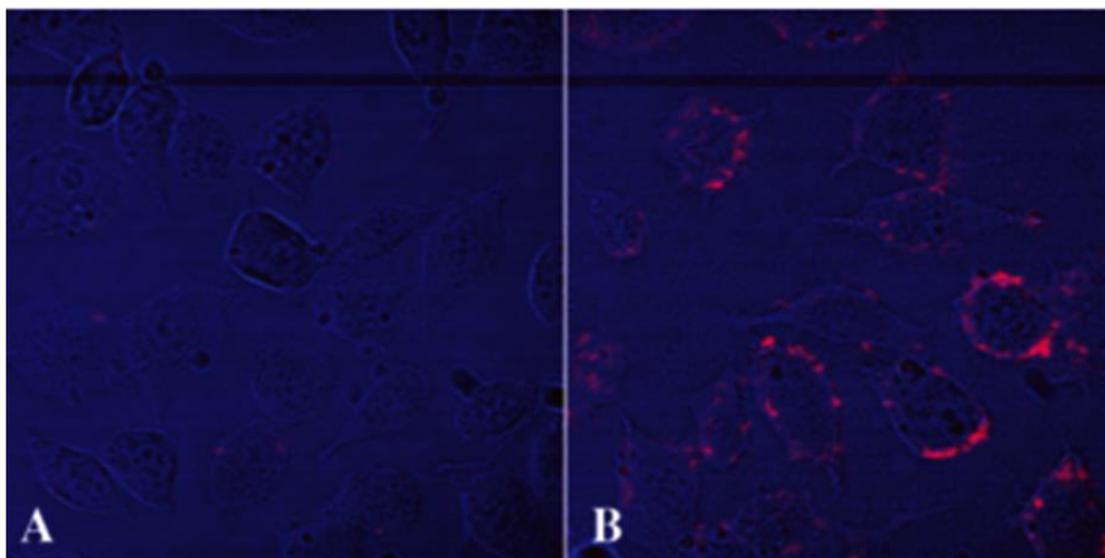


Fonte: Adaptado de (SOJKA et al., 2016).

Em outro trabalho Kumar e colaboradores (KUMAR et al., 2009) descrevem a utilização do NaYF_4 dopado com diferentes lantanídeos (incluindo o Eu^{3+}) para marcação de células de tumor pancreático (linhagem de célula Panc 1) utilizando a microscopia confocal para verificação da marcação luminescente. O composto NaYF_4 dopados com Gd^{3+} (10%) e Eu^{3+}

(10%) apresenta as transições características do Eu^{3+} no seu espectro de emissão na região do visível, o qual se correlaciona com a cor vermelha detectada pelo olho humano. A análise do tempo de vida mostra um valor igual a $\tau \sim 10$ ms, o que os autores qualificam como uma característica ótima para bioimagens resolvidas no tempo. Na Figura 8 é mostrado as imagens confocais considerando apenas o anticorpo Anti-claudin 4 (específico para reconhecimento das células tumorais) e o sistema conjugado formado pelo composto NaYF_4 dopados com Gd^{3+} (10%) e Eu^{3+} (10%) funcionalização com o anticorpo Anti-claudin 4.

Figura 8: Imagem confocal mostrando a marcação da linhagem de célula Panc 1, em (A) células não marcadas e (B) o composto $\text{NaYF}_4:\text{Gd}$ (10%), Eu (10%) conjugado com anticorpo Anti-claudin 4 com luminescência no vermelho.



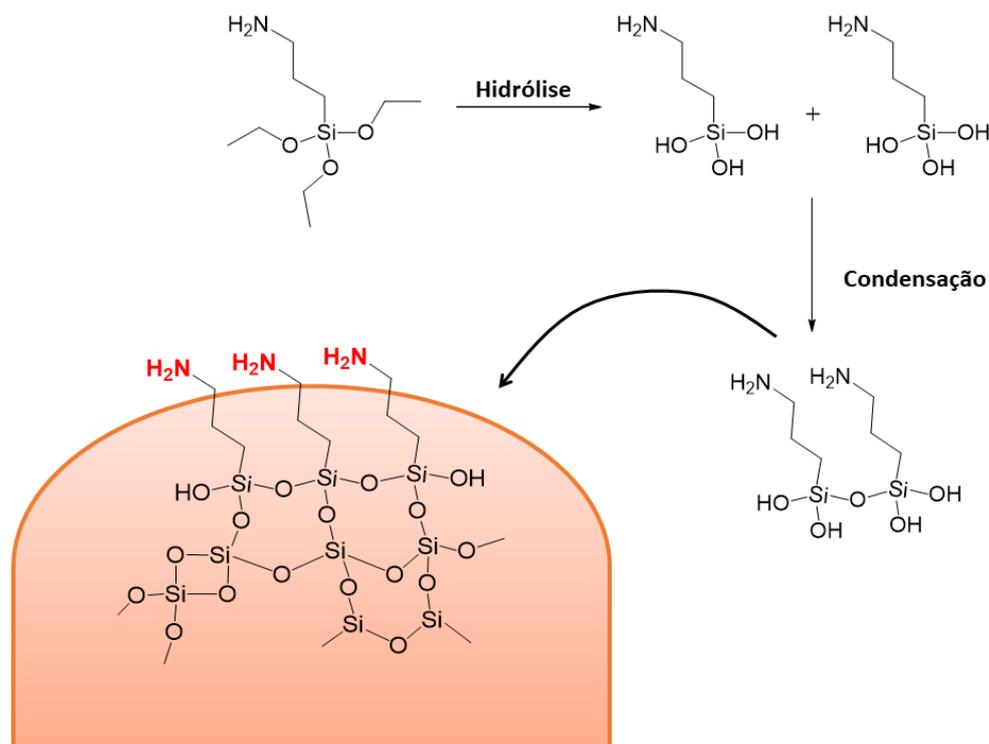
Fonte: Adaptado de (KUMAR et al., 2009).

3.4 COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO COM ÍONS LANTANÍDEOS INSERIDOS EM NANOPARTÍCULAS DE SiO_2

Outra classe de composto que merece destaque são as nanopartículas de sílica. Este material foi observado pela primeira vez por Stöber e colaboradores em 1968 (STÖBER; FINK; BOHN, 1968) na obtenção de micro- e nanopartículas com morfologia esférica produzida à base de alcóxidos de silício (tipicamente tetraortosilicato de etila e/ou 3-(aminopropil)trióxido de silício para o TEOS e APTES, respectivamente). A formação destas nanopartículas é oriunda de uma reação de condensação destes alcóxidos que, após um processo de hidrólise, são conectados através dos grupos $-\text{OH}$, produzindo assim partículas de sílica

estabilizadas por ligações siloxiano (Si-O-Si). A Figura 9 mostra uma esquema geral da construção destas partículas.

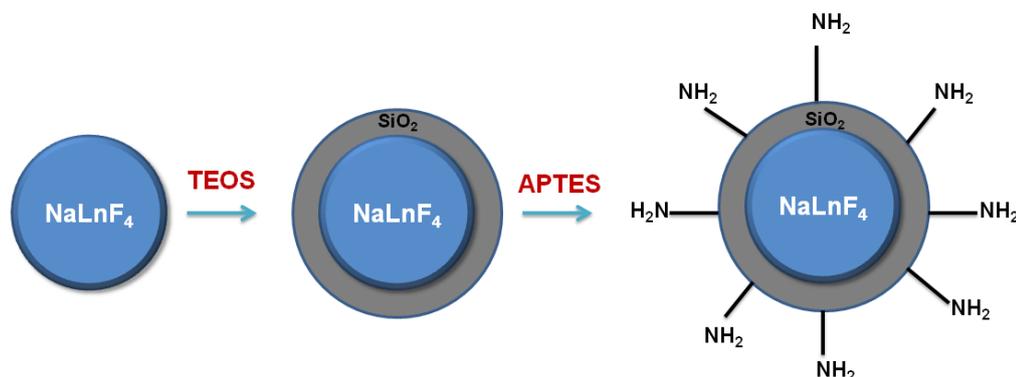
Figura 9: Representações do mecanismo de formação das nanopartículas de SiO₂ utilizando o método sol-gel desenvolvido por Stöber e colaboradores.



Fonte: Fornecida pelo próprio autor

Quando se deseja inserir grupos amina na superfície de partículas como, por exemplo, as nanopartículas de NaLnF₄ supracitadas, utiliza-se comumente um processo análogo ao utilizado na produção da nanopartículas de SiO₂. Para isto as partículas de interesse atuam como sementes (pontos de nucleação) e uma camada de sílica é formada no entorno de suas paredes em um processo de recobrimento regular na forma de casca (Figura 10). Deste modo o uso do APTES confere a partícula grupos funcionais -NH₂ em sua superfície, o que é de suma importância, pois permite que ligações químicas possam ser realizadas na região funcionalizada, possibilitando que moléculas possam ser conjugadas as partículas.

Figura 10: Diagrama representativo dos processos ocorridos na funcionalização com grupos amina para partículas do tipo NaLnF₄, utilizando o método Stöber (STÖBER; FINK; BOHN, 1968).



Fonte: Fornecido pelo próprio autor.

Ao longo dos anos esta metodologia sofreu vários avanços e sua utilização foi adaptada não somente para obtenção de micro- ou nanopartículas e funcionalização de suas superfícies, mas também para o encapsulamento de diferentes moléculas no interior das nanoestruturas de silício (HERMANSON, 2013). No que se refere a esta estratégia, o encapsulamento de compostos luminescentes tem-se mostrando uma via interessante na formação de novos biomarcadores. Neste sentido, podemos destacar a composição de materiais híbridos formados por complexos metálicos utilizando, por exemplo, íons lantanídeos introduzidos em nanopartículas de sílica (CHEN et al., 2015; DUARTE et al., 2013; LIU; YAN, 2015; YU et al., 2013). É bem verdade que esta classe de complexos de coordenação é amplamente conhecida isoladamente por suas propriedades ópticas, entretanto a estabilidade química, solubilidade e biocompatibilidade por vezes podem dificultar a exploração destes complexos de coordenação na biomedicina. Por outro lado, o encapsulamento destes compostos com materiais baseados em SiO₂ apresenta-se como uma excelente condição de contorno, visto que estes são conhecidos por serem biocompatíveis, solúveis em água e quimicamente estáveis (GOMES et al., 2013). Existem na literatura variadas metodologias para a obtenção destes compostos híbridos de coordenação (CHEN et al., 2015; DUARTE et al., 2013; LIU; YAN, 2015; YU et al., 2013). Um exemplo disso é reportado por Yu e colaboradores (YU et al., 2013), onde um complexo formado com o íon Európio coordenado aos ligantes Dibenzoilmetano e fenantrolina (Eu(DBM)₃Phen) foi envolvido por uma camada de SiO₂ que foi oriunda da adição de TEOS e amônia para a formação do sistema núcleo-casca para o composto Eu(DBM)₃Phen@SiO₂.

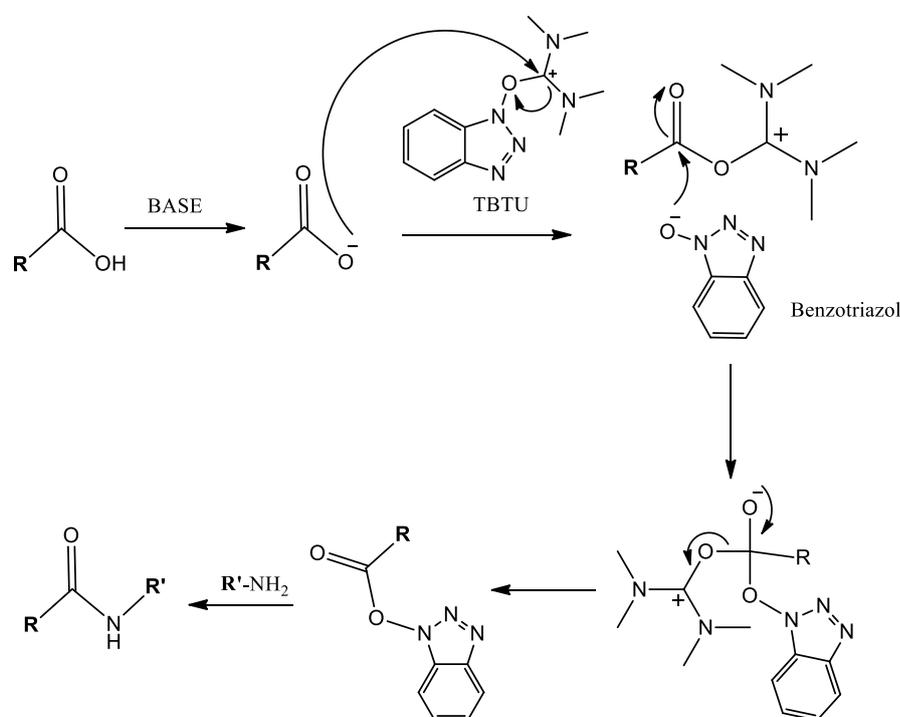
3.5 MÉTODOS DE CONJUGAÇÃO APLICADO A REAÇÕES DE AMIDAS

Um dos mais importantes fatores que qualificam o uso de nanopartículas como biomateriais promissores é a eficácia de sua interação com o meio biológico (HERMANSON, 2013). Visando alcançar inteiramente este objetivo é necessário fornecer um aumento da especificidade do biomaterial. Uma meio para que a especificidade seja alcançada é promovendo-se modificações químicas ou processos de conjugações entre grupos funcionais distintos que resultem na formação de ligações covalentes, responsáveis pela união de nanopartículas com vetores bioativos que promovam essa especificidade (HERMANSON, 2013). Estes vetores podem ser os mais diversos possíveis como: proteínas, peptídeos, aptameros e pequenas moléculas orgânicas, onde todos tem a função de direcionar os nanomateriais conjugados para próximo de regiões onde os processos biomoleculares ocorram (HERMANSON, 2013) . Um exemplo disso é apresentado por Kostiv e colaboradores (KOSTIV et al., 2016) que descrevem o uso de nanopartículas de $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ funcionalizadas com grupos amina (derivada de silanois) para conjugação com peptídeo RGDS objetivando a preparação de biomarcadores seletivos. Os autores exploram o conhecimento prévio da sequência de aminoácidos deste peptídeo (arginina (Arg), glicina (Gly) e ácido aspártico (Asp)) como unidade básica de reconhecimento celular e o utiliza como vetor de direcionamento das partículas luminescentes para as células tumorais HeLa.

Como visto anteriormente o processo de conjugação de nanopartículas é uma estratégia importante para aplicação de biomateriais, contudo é necessário entender as reações envolvidas para a sua formação. Existe na literatura científica uma diversidade de métodos para conjugação, onde sua escolha está intimamente ligada a reatividade dos grupos funcionais envolvidos. O grupo funcional mais abundante nestas reações é a amina, principalmente por este grupo ser o principal responsável pela maior parte das reações de conjugação com peptídeos e proteínas, que interagem com os ácidos carboxílicos presentes nas macromoléculas para geração de ligações amida (HERMANSON, 2013). Em geral a união de ácidos carboxílicos e aminas não ocorre espontaneamente sob temperatura ambiente, estas são tipicamente observadas com eliminação de água ocorrendo apenas em altas temperaturas (> 200 °C), o que pode levar a decomposicao dos reagentes de partida. Por isso, é necessário que se converta o -OH proveniente do ácido carboxílico em um grupo funcional mais reativo antes do processo de conjugação com amina e, para isso, utilizam-se comumente os chamados reagentes de acoplamento (VALEUR; BRADLEY, 2009a).

Uma das classes de reagentes de acoplamento que merece destaque são os sais de urônio/amínio. A estrutura química destes sais favorecem uma alta reatividade com os ácidos carboxílicos na formação de éster ativos mantendo o compromisso com a velocidade de reação, pureza e minimização da geração de subprodutos, produzindo assim as conexões amidas necessárias para a conjugação (VALEUR; BRADLEY, 2009a). O mecanismo geral para esta reação utilizando sal de urônio/amínio é representado da Figura 11. É importante mencionar que esta classe de reagente de acoplamento são tipicamente utilizados como reagentes na síntese de peptídeos (HERMANSON, 2013). Entretanto, em alguns casos o sal de urônio/amínio N,N,N',N'-Tetrametil-O-(benzotriazol-1-il)urônio tetrafluoroborato (TBTU) é utilizado como um eficiente agente de acoplamento na conjugação de pequenas moléculas orgânicas com nanopartículas (BASU et al., 2009; HAGLUND et al., 2008; KIZILTEPE et al., 2012; LITTI et al., 2018; MCMASTERS et al., 2017; ROY; BAEK, 2003). Contudo, neste trabalho utilizou-se o TBTU como reagente de acoplamento na conjugação de parte das nanopartículas (NaYF₄:5%Eu-Coumaric, NaYF₄:5%Eu- Tyr03, NaYF₄:5%Eu- BODIPY COOH, NaYF₄:5%Eu- ZnPc e NaYF₄:5%Eu- BODIPY NCS/Tyr03).

Figura 11: Mecanismo para reação de acoplamento utilizando o sal de urônio/amínio TBTU na formação de ligações amida.



Fonte: Fornecido pelo próprio autor.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Todos os procedimentos experimentais foram realizados usando reagentes com grau analítico adquiridos comercialmente, os quais foram listados na Tabela 3.

Tabela 3: Reagentes utilizados nos procedimentos experimentais.

| Composto | Fórmula molecular | Procedência | Pureza |
|--|---|---|--------|
| Óxido de Európio | Eu_2O_3 | Sigma-Adrich | 99,9% |
| Óxido de Lutécio | Lu_2O_3 | Sigma-Adrich | 99% |
| Cloreto de Zinco | ZnCl_2 | Sigma-Adrich | 97% |
| Sulfeto de Magnésio | MgSO_4 | Sigma Aldrich | 98% |
| Iodeto de Sódio (^{123}I) | Na^{123}I | Nordion International, Ltd. | |
| Cloreto de Lutécio (^{177}Lu) | $^{177}\text{LuCl}_3$ | Missouri University Research Reactor (MURR) | |
| Carbonato de Potássio | K_2CO_3 | Sigma Aldrich | 97% |
| Tetraetil ortosilicato (TEOS) | $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ | Sigma Aldrich | 98% |
| 3-aminopropil)trietoxilano (APTES) | $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ | Acros | 99% |
| Hidroxido de Lítio | LiOH | Sigma Aldrich | 98 % |
| Hidróxido de Sódio | NaOH | Sigma Aldrich | P.A. |
| Cloreto de Sódio | NaCl | Vetec | P.A. |
| Fluoreto de Sódio | NaF | Sigma-Aldrich | 98% |
| Hidroxido de Amônia | NH_4OH | Sigma Aldrich | 28% |

| | | | |
|---|---|--------------------|---------------|
| Ácido Clorídrico | HCl | Sigma Aldrich | 37% |
| Compostos Orgânicos | Fórmula molecular | Procedência | Pureza |
| Pirrol | C ₄ H ₅ N | Sigma Aldrich | 98% |
| Ácido Oléico | CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH | Sigma Aldrich | 99% |
| 1,2-Dicianobenzeno | C ₆ H ₄ (CN) ₂ | Sigma Adrich | 98% |
| Anidrido Acético | (CH ₃ CO) ₂ O | Sigma Aldrich | 98% |
| 1-Pentanol | CH ₃ (CH ₂) ₄ OH | Sigma Aldrich | 99% |
| N,N,N',N'-Tetrametil-O-(benzotriazol-1-il)urânio tetrafluoroborato (TBTU) | C ₁₁ H ₁₆ N ₅ O.BF ₄ | Sigma Aldrich | 97% |
| Álcool isopropílico | C ₃ H ₇ OH | Dinâmica | P.A. |
| Trietilamina (Et ₃ N) | (C ₂ H ₅) ₃ N | Sigma Aldrich | 99% |
| Octadeceno | C ₁₈ H ₃₆ | Sigma Aldrich | 90% |
| Ácido p-Cumárico | C ₉ H ₈ O ₃ | Sigma Aldrich | 98% |
| Acido dipicolínico (H ₂ DPA) | C ₇ H ₅ NO ₄ | Sigma Aldrich | 99% |
| Piperidina | C ₅ H ₁₁ N | Sigma Aldrich | P.A. |
| Eterato de Trifluoreto de Boro (BF ₃ OEt ₂) | BF ₃ O·(C ₂ H ₅) ₂ | Sigma Aldrich | P.A. |
| 1,8-Diazabicyclo [5.4.0] undec-7-eno (DBU) | C ₉ H ₁₆ N ₂ | Sigma Aldrich | 98% |
| Isotiocianato de trimetilsilano | (CH ₃) ₃ SiNCS | Sigma Aldrich | 99% |
| Acido 4-hidroxibenóico | HOC ₆ H ₄ CO ₂ H | Sigma Aldrich | 99% |
| Anidrido Succínico | (CH ₂ CO) ₂ O | Sigma Aldrich | 99% |
| Solventes | Fórmula molecular | Procedência | Pureza |

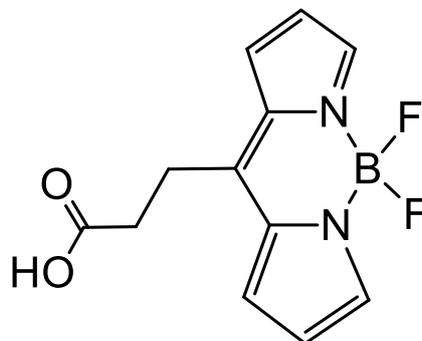
| Acetonitrila | C_2H_3N | Sigma Aldrich | P.A. |
|---|--------------------------|--|---------------|
| Diclorometano (DCM) | CH_2Cl_2 | Sigma Aldrich | P.A. |
| Dimetilsulfóxido (DMSO) | $(CH_3)_2SO$ | Sigma Aldrich | P.A. |
| Metanol (MeOH) | CH_3OH | Sigma Aldrich | P.A. |
| Acetato de Etila (EtOAc) | $C_4H_8O_2$ | Sigma Aldrich | P.A. |
| Dimetilformamida (DMF) | C_3H_7NO | Sigma Aldrich | P.A. |
| Tetrahidrofurano (THF) | C_4H_8O | Sigma Aldrich | 99% |
| Tolueno | $C_6H_5CH_3$ | Sigma Aldrich | 99 % |
| Substâncias para Cultivo Celular | Fórmula molecular | Procedência | Pureza |
| Linhagem celular HT-29 | - | American Type Culture Collection (Manassas, VA) | P.A |
| Hoechst 33342 | $C_{27}H_{31}N_6$ | Thermo Fisher Scientific | P.A. |
| Solução tampão de fosfato (BUBECO'S PBS) | - | Gen Clone | P.A |
| Penicilina | $C_9H_{11}N_2O_4S$ | HyClone | P.A. |
| Soro fetal Bovino | - | CAISSON LABS | P.A. |
| <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM) | - | - | P.A. |
| <i>Trypsin</i> | $C_{35}H_{47}N_7O_{10}$ | Gen Clone | P.A. |
| Estreptomicina | $C_{21}H_{39}N_7O_{12}$ | - | P.A. |

4.1.1 *SÍNTESE DO 10-(2-CARBOXIETIL) -5,5-DIFLUORO-5H- DIPIRROLO [1,2-C: 2', 1'-F] [1,3,2] DIAZABORININ-4-IUM-5- UIDE (BODIPY COOH)*

A síntese do BODIPY COOH foi previamente relatada por Wang et al. (WANG et al., 2009) e cedido para os nossos experimentos pelo *Vicente Research group* atualmente sediado na *Louisiana State Univerity – USA*, como descrito a seguir.

Em um balão de fundo redondo, uma mistura de anidrido succínico (200 mg, 2,0 mmol) e pirrol (457 mg, 4,80 mmol), dissolvida numa mistura de CH₂Cl₂ seco (20 mL) e CH₃CN seco (5 mL), foi aquecida a refluxo. sob N₂ por 8 h. Depois da solução ter sido arrefecida até alcançar a temperatura ambiente, adicionaram-se lentamente 6 equivalentes de Et₃N (1,21 g, 12 mmol) e depois adicionou-se continuamente 8 equivalentes de BF₃OEt₂ (2,27 g, 16 mmol). A mistura reacional foi rapidamente agitada sob N₂ a 50 durante mais 4 horas. A reação foi extinta, lavada com água, extraída com CH₂Cl₂ e depois a fase orgânica foi lavada com salmoura e seca sobre MgSO₄ anidro. Finalmente, o solvente foi evaporado em vácuo. Após a cromatografia em coluna de sílica gel (CH₂Cl₂/EtOAc, gradiente de 4:1 a 1:1) produziu 134 mg do composto na forma de um pó vermelho alaranjado. A estrutura química do composto obtido é mostrada na Figura 12.

Figura 12: Representação da estrutura química do BODIPY COOH



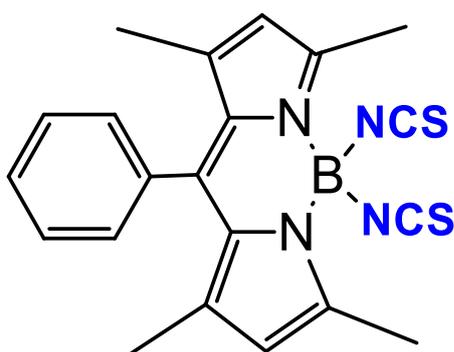
Fonte: Fornecido pelo próprio autor.

4.1.2 *SÍNTESE DO 5,5-DIISOTIOCIANATO-1,3,7,9-TETRAMETHIL-10-FENIL-5H DIPIRROLO [1,2:2', 1'F] [1,3,2] DIAZABORININ-4-IUM- 5-UIDE (BODIPY NCS)*

O BODIPY NCS foi sintetizado pela adição de solução de cloreto de estanho à mistura de F-BODIPY e isotiocianato de (trimetilsilil) em diclorometano (DCM). O produto foi

recristalizado a partir da evaporação lenta da solução de DCM com 92% de rendimento. F-BODIPY foi obtido como relatado (BUYUKCAKIR et al., 2009; DOST; ATILGAN; AKKAYA, 2006; LOUDET; BURGESS, 2007) e cedido para os nossos experimentos pelo *Vicente Research group* atualmente sediado na *Louisiana State University – USA*. A estrutura química do composto BODIPY NCS é mostrada na Figura 13.

Figura 13: Representação da estrutura química do BODIPY NCS



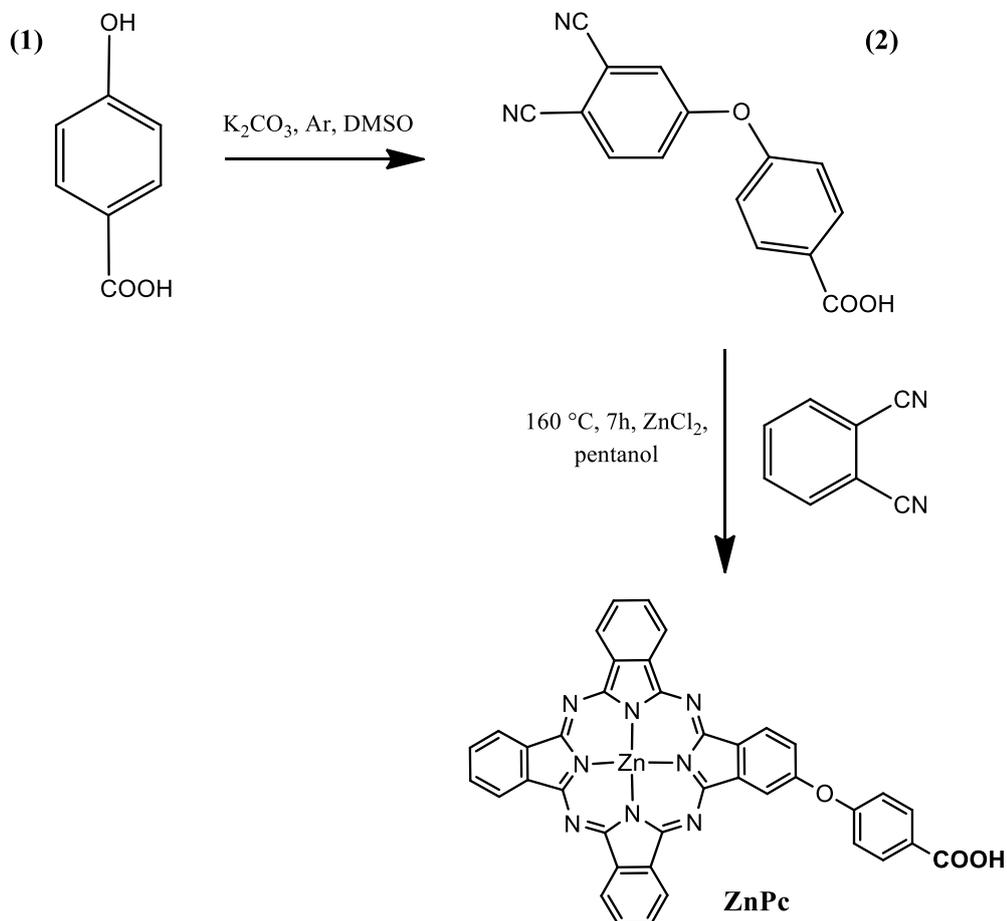
Fonte: Fornecido pelo próprio autor.

4.1.3 SÍNTESE DA FTALOCIANINA DE ZINCO (ZnPc)

A metodologia utilizada na preparação do composto ZnPc foi adaptada do trabalho descrito por Luan et al. (LUAN et al., 2016) e cedido para os nossos experimentos pelo *Vicente Research group* atualmente sediado na *Louisiana State University – USA*. O composto ZnPc foi sintetizado por reação de 2,01 g (0,011 mol) de **1** com 1,89 g (0,011 mol) de ácido 4-hidroxibenzóico e 1,50 g (composto **1**; 0,010 mol) de K₂CO₃ seco em 20 mL de DMSO seco por 48 horas a rendimento 2,18 g do composto **2**. O composto **2** foi precipitado utilizando água gelada contendo algumas gotas de HCl. O precipitado foi filtrado, lavado com água e recristalizado duas vezes com metanol. A síntese de ZnPc foi também realizada utilizando condensação mista de dois ftalonitrilos como se segue: 1,2 Dicianobenzeno (0,320 g, 2,5 mmol) e composto **2** (0,435 g, 1,5 mmol) foram misturados com cloreto de zinco (0,20 g, 1,5 mmol) em 2 ml de 1-pentanol. A reação foi realizada a 160 °C durante 7 horas catalisada com algumas gotas de DBU. O produto desejado (ZnPc) foi separado da mistura por cromatografia em coluna

extensa de sílica e 5% de metanol em THF como o solvente de eluição. A estrutura química dos reagentes e do composto final obtido é mostrada na Figura 14.

Figura 14: Representação da estrutura química do ZnPC

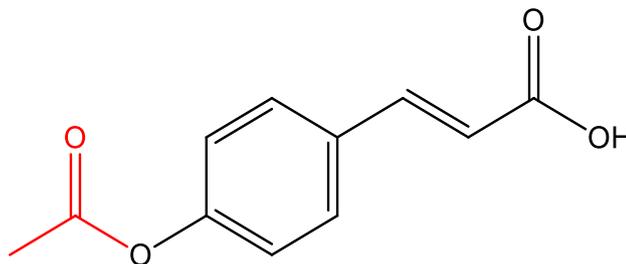


Fonte: Fornecido pelo próprio autor.

4.1.4 ACETILAÇÃO DO ÁCIDO P-CUMÁRICO

A produção do ácido 3-(4-acetoxifenil)acrílico realizou-se pela utilização da reação de acetilação. Para isso em um balão de fundo redondo adicionou-se 5 mL de anidrido acético, 1 g do ácido p-cumárico (6,1 mmols) e 5 mL de piridina, os quais foram submetidos a agitação vigorosa por 24 horas. Após isso, adicionou-se ao sistema pequenas porções de HCl (gota-a-gota) até alcançar o $\text{pH} = 7$. O produto foi extraído com acetato de etila e rotaevaporado para obtenção do composto orgânico acetilado na fase sólida (Figura 15).

Figura 15: Estrutura química do ácido 3-(4-acetoxifenil)acrílico (acet_cumárico)



Fonte: Fornecida pelo próprio autor.

4.1.5 PREPARAÇÃO DOS CLORETOS DE ÍTRIO, EURÓPIO E LUTÉRCIO

Os sais de lantanídeos foram obtidos pela reação entre o ácido clorídrico e o óxido de Lantanídeo (Y, Eu ou Lu), seguindo a procedimento empregado no Laboratório de Terras Raras – BSTR.

O procedimento utilizado para a síntese consiste no condicionamento do Ln_2O_3 em um béquer com 10 mL de água destilada, em seguida adicionamos HCl 1M gota-a-gota sob aquecimento e agitação até que o sistema seja totalmente solubilizado. Neste momento a solução é mantida sob aquecimento e agitação, sofrendo evaporações e adições sucessivas de pequenas porções de H_2O até o alcance do pH entre 5-6. Quando o sistema encontra-se neste estado, o sólido residual é removido e transportado para um recipiente, lacrado e armazenado em local seco.

4.2 PARTE EXPERIMENTAL

4.2.1 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE $\text{NaYF}_4:5\% \text{Eu}$

As partículas foram sintetizadas utilizando-se a metodologia adaptada de Johnson e colaboradores (JOHNSON et al., 2011). Para isso, adicionou-se no interior de um balão de fundo redondo, com volume total de 100 mL, 0.95 mmol de $\text{YCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ e 0.05 mmol de $\text{EuCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 4 mL de ácido oléico, e 15 mL de octadeceno. Todo o sistema foi aquecido por 30 min a 140 °C sob atmosfera de nitrogênio, onde uma solução amarela foi formada. Subsequentemente, o sistema foi resfriado a temperatura ambiente e uma mistura formada de 2,5 mmol de NaOH e 4 mmol de NH_4F em 10 mL de metanol foi preparada e adicionada ao frasco. O frasco foi agitado durante 15 horas sob atmosfera de nitrogênio. Depois disso, o balão

foi aquecido a 70 ° C durante 5 min. Finalmente, o frasco foi rapidamente aquecido até à temperatura de 280 °C durante 90 min e a solução tornou-se escura, indicando a formação das partículas desejadas. O conteúdo do balão foi recolhido à temperatura ambiente e o material produzido foi precipitado utilizando metanol. O produto foi centrifugado, separado e lavado cinco vezes com tolueno utilizando centrifugações sucessivas durante 15 min a 8000 rpm.

4.2.1.1 *FUNCIONALIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS NaYF₄:5%Eu COM GRUPOS AMINA (NaYF₄:5%Eu - NH₂)*

A funcionalização das partículas com grupos funcionais amina baseou-se na utilização do método Stöber (STÖBER; FINK; BOHN, 1968) adaptado do trabalho descrito por Liu e colaboradores (LIU et al., 2014). Para o presente trabalho 30 mg de NaYF₄:5%Eu foi disperso em 80 mL de álcool isopropílico em banho ultrassônico por 1 hora em um erlemeyer com volume total igual a 200 mL. Logo após adicionou-se 7,50 mL de água ultrapura, 8,94 mL de NH₄OH e 54 µL de Tetraetil ortosilicato (TEOS), na suspensão previamente preparada, e o sistema foi agitado vigorosamente por 4 horas. Finalmente, 26 µL de (3-aminopropil)trióxido (APTES) foi adicionado e o sistema permaneceu em regime de agitação por mais 1 hora. O produto obtido foi removido na forma de um sólido de cor marrom por centrifugação a 6000 rpm por 10 minutos, devidamente lavado por centrifugações sucessivas (cinco lavagens com utilizando a mistura etanol:H₂O ultrapura na proporção 1:1) e seco a vácuo.

4.2.1.2 *METODOLOGIA DE CONJUGAÇÃO DAS PARTÍCULAS NaYF₄:5%Eu - NH₂ COM COMPOSTOS ORGÂNICOS AROMÁTICOS*

4.2.1.2.1 *MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE NaYF₄: 5% Eu-NH₂ COM ÁCIDO P-CUMÁRICO (NaYF₄: 5% Eu - Coumaric)*

O primeiro passo inclui a introdução de uma porção de ácido p-cumárico as nanopartículas NaYF₄:5% Eu-NH₂ utilizando a metodologia de amidificação ativada por agente de acoplamento. Nesta reação, NaYF₄:5% Eu-NH₂ (10 mg) e o ácido 3-(4-acetoxifenil)acrílico (1,5 mmol) foram activados com N, N, N', N'-tetrametil-O-(benzotriazol-1-il)urio (TBTU; 1,5 mmol) numa mistura de DMF (5 mL) e trietilamina (5 ml), ambos a seco. A mistura foi deixada reagir durante 24 h sob uma atmosfera inerte de nitrogênio. Após este período, o

produto da reação foi centrifugado, separado e lavado cinco vezes com DMF (5 mL cada), utilizando ciclos de centrifugação sucessivos durante 15 minutos a 8000 rpm, produzindo as partículas NaYF₄: 5%Eu-Ac. Coumaric. O segundo passo consistiu na remoção do grupo acetil presente nas partículas. Neste procedimento, NaYF₄: 5%Eu-NH₂ (5 mg) foram adicionados a uma mistura de LiOH (10,5 mg), água destilada (2,5 mL), metanol (2,5 mL) e THF (2,5 mL). A mistura foi mantida durante 24 h à temperatura ambiente sob condições de agitação. Depois disso, adicionou-se HCl 1 M gota a gota até se obter um pH 5,0. As partículas foram centrifugadas, separadas e lavadas cinco vezes com água (5 mL de cada vez), utilizando ciclos de centrifugação sucessivos durante 15 minutos a 8000 rpm, o que gerou as partículas NaYF₄:5%Eu-Coumaric.

4.2.1.2.2 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE NaYF₄:5%Eu-NH₂ COM TIROSINA (NaYF₄: 5% Eu - Tyr3)

O primeiro passo incluiu a introdução de um resíduo de tirosina em NaYF₄:5%Eu-NH₂ usando a metodologia de amidificação ativada por reagente de acoplamento. A reação envolveu a conjugação das nanopartículas com Fmoc-O-terc-butil-L-tirosina (1,5 mmol) sob ativação com N, N, N', N' -tetrametil-O- (benzotriazol-1-il) urônio tetrafluoroborato (TBTU; 1,5 mmol) numa mistura de DMF (5 mL) e trietilamina (5 mL), ambos secos. Esta mistura foi mantida sob condições de agitação durante 24 horas e sob atmosfera inerte. Após esta etapa as partículas resultantes foram centrifugadas, separadas e lavadas cinco vezes com água destilada (5 mL cada vez) utilizando ciclos sucessivos de centrifugação durante 15 min a 8000 rpm, produzindo NaYF₄:5%Eu-Tyr1. O segundo passo consistiu na remoção do grupo Fmoc presente nas partículas. Para isso, NaYF₄: 5% Eu-Tyr1 (5 mg) foram dissolvidos em 5 mL de piperidina: DMF (8:2, v/v) e mantidos durante 24 horas à temperatura ambiente sob condições de agitação. As partículas foram novamente centrifugadas, separadas e lavadas cinco vezes com DMF (5 mL cada) usando ciclos sucessivos de centrifugação durante 15 min a 8000 rpm, produzindo NaYF₄:5% Eu-Tyr2. O terceiro passo removeu o grupo terc-butilo das partículas. As nanopartículas de NaYF₄:5%Eu-Tyr2 (5 mg) foram dissolvidas em uma mistura de LiOH (10,5 mg), água destilada (2,5 mL), metanol (2,5 mL) e THF (2,5 mL) e mantidas por 24 horas sob temperatura ambiente e condições de agitação. Depois disso, adicionou-se HCl 1M gota a gota até se obter um pH 5,0. As partículas foram centrifugadas, separadas e lavadas cinco vezes com

água (5 mL cada) usando sucessivos ciclos de centrifugação durante 15 min a 8000 rpm, produzindo NaYF₄: 5% Eu-Tyr3.

4.2.1.2.3 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE NaYF₄:5%Eu-NH₂ COM BODIPY COOH (NaYF₄: 5% Eu – BODIPY COOH)

Para obter nanopartículas de NaYF₄:5%Eu-BODIPY COOH, uma reação de acoplamento entre 10-(2-carboxietil)-5,5-difluoro-5H-dipirrolo [1,2-c:2',1'-f] [1,3,2] diazaborinina-4-ium-5-uide (BODIPY COOH; 1,5 mmol) e nanopartículas NaYF₄:5% Eu-NH₂ (10 mg) foi realizada usando como agente de ativação o N, N, N', N' -tetrafluoroborato de tetrametil-O- (benzotriazol-1-il) urio (TBTU; 1,5 mmol) numa mistura de DMF (5 mL) e trietilamina (5 mL), ambos secos. A mistura reagiu durante 24 horas sob uma atmosfera inerte. As partículas resultantes foram centrifugadas, separadas e lavadas cinco vezes com DMF (5 mL cada) utilizando ciclos sucessivos de centrifugação durante 15 min a 8000 rpm, produzindo o composto NaYF₄:5%Eu-BODIPY COOH.

4.2.1.2.4 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE NaYF₄:5%Eu-NH₂ COM BODIPY NCS (NaYF₄: 5% Eu – BODIPY NCS)

Para obter nanopartículas de NaYF₄: 5% Eu-BODIPY NCS uma mistura entre 5,5-diisotiocianato-1,3,7,9-tetrametil-10-fenil-5H dipirrolo [1,2: 2', 1'f] [1,3,2] diazaborinina-4-ium-5-uida (BODIPY NCS; 1,5 mmol), nanopartículas NaYF₄:5%Eu-NH₂ (10 mg) e acetona anidra (5 mL) foi preparada. Deixou-se a mistura reagir durante 24 horas à temperatura ambiente sob atmosfera inerte de nitrogênio. As partículas resultantes foram centrifugadas, separadas e lavadas cinco vezes com acetona (5 mL cada) utilizando ciclos sucessivos de centrifugação durante 15 min a 8000 rpm, produzindo NaYF₄:5% Eu-BODIPY NCS.

4.2.1.2.5 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE NaYF₄:5%Eu-NH₂ COM BODIPY NCS/TYR3 (NaYF₄: 5% Eu – BODIPY NCS/Tyr3)

A síntese das partículas NaYF₄:5% Eu-BODIPY NCS / Tyr3 é descrita em duas etapas. Na primeira etapa, reproduzimos o procedimento de síntese para as partículas de NaYF₄:5% Eu-BODIPY NCS, como descrito acima (seção 4.2.1.2.4). Na segunda etapa, usamos NaYF₄:5% Eu-BODIPY NCS (10 mg) e reproduzimos o procedimento descrito na seção 4.2.1.2.2. As partículas resultantes foram centrifugadas, separadas e lavadas cinco vezes com

acetona (5 mL cada) utilizando ciclos sucessivos de centrifugação durante 15 min a 8000 rpm, produzindo NaYF₄:5%Eu-BODIPY NCS / Tyr3.

4.2.1.2.6 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE NaYF₄:5%Eu-NH₂ COM ZnPC

Para obter nanopartículas de NaYF₄:5%Eu-ZnPc através de uma reação de acoplamento, foram conjugadas combinando-se a ftalocianina de zinco (ZnPc; 1,5 mmol) e nanopartículas NaYF₄:5%Eu-NH₂ (10 mg), utilizando o N, N, N', N'- tetrafluoroborato de tetrametil-O-(benzotriazol-1-il) urio (TBTU: 1,5 mmol) numa mistura de DMF (5 mL) e trietilamina (5 mL); a mistura foi deixada reagir durante 24 h sob uma atmosfera inerte. As partículas resultantes foram centrifugadas, separadas e lavadas cinco vezes com DMF (5 mL cada) utilizando ciclos sucessivos de centrifugação durante 15 min a 8000 rpm, produzindo NaYF₄: 5% de Eu-ZnPc.

4.2.1.3 ESTIMATIVA DA QUANTIDADE DE COMPOSTO ORGÂNICO ADICIONADO MODIFICAÇÃO AS SUPERFÍCIES DAS PARTÍCULAS

Para racionalizar a quantidade de compostos orgânicos usados na conjugação com as nanopartículas à base de NaYF₄:5% Eu, três diferentes condições de reação foram avaliadas. A otimização da quantidade de composto conjugado a ser adicionado foi obtida em função de combinação entre equivalentes molares dos composto utilizando (ácido p-cumárico e tirosina), com os valores iguais a 0,18 mmol, 0,30 mmol e 1,50 mmol reagindo com 10 mg do NaYF₄:5%-NH₂ por síntese. A análise por TGA dos compostos conjugados (NaYF₄:5% Eu-Coumaric e NaYF₄:5% Eu-Tirosina) revela uma quantidade de massa residual diretamente proporcional à quantidade de composto orgânico conjugado (Tabelas 3-5). A análise mostra que a melhor condição foi obtida com o uso de 1,5 mmol de fração orgânica, o que proporcionou maior porcentagem de conjugação de moléculas orgânicas nas partículas, o que é evidenciado pela diferença entre os resíduos dos nanomateriais (Δ Resíduo). Experimentos adicionais indicaram que maiores quantidades molares não apresentaram grandes alterações. A partir desses dados, esta condição sintética foi adotada para todas as reações de conjugação apresentadas neste trabalho.

Tabela 4. Quantificação de resíduos orgânicos presentes nas nanossondas luminescentes sintetizadas a partir do ácido p-cumárico e tirosina obtidos a partir dos dados da TGA. Os compostos foram obtidos combinando 0,2 mmol de compostos orgânicos e 10 mg de NaYF₄:5%Eu-NH₂.

| | Resíduo (%) | $\Delta_{\text{Resíduo}}$ (%) |
|--|--------------------|---|
| NaYF ₄ :5%Eu- NH ₂ | 95,7 | - |
| NaYF ₄ :5%Eu- NH-Ac. Coumaric | 53,4 | 42 |
| NaYF ₄ :5%Eu- NH-Coumaric | 79,8 | 16 |
| NaYF ₄ :5%Eu- NH-Tyr1 | 82,7 | 13 |
| NaYF ₄ :5%Eu- NH-Tyr2 | 84,3 | 11 |
| NaYF ₄ :5%Eu- NH-Tyr3 | 88,7 | 7 |

Tabela 5. Quantificação de resíduos orgânicos presentes nas nanossondas luminescentes sintetizadas a partir do ácido p-cumárico e tirosina obtidos a partir dos dados da TGA. Os compostos foram obtidos combinando 0,3 mmol de compostos orgânicos e 10 mg de NaYF₄:5%Eu-NH₂.

| | Resíduo (%) | $\Delta_{\text{Resíduo}}$ (%) |
|--|--------------------|---|
| NaYF ₄ :5%Eu- NH ₂ | 95,7 | - |
| NaYF ₄ :5%Eu- NH-Ac. Coumaric | 74,2 | 22 |
| NaYF ₄ :5%Eu- NH-Coumaric | 76,4 | 19 |
| NaYF ₄ :5%Eu- NH-Tyr1 | 66,0 | 30 |
| NaYF ₄ :5%Eu- NH-Tyr2 | 67,2 | 28 |
| NaYF ₄ :5%Eu- NH-Tyr3 | 82,1 | 14 |

Tabela 6. Quantificação de resíduos orgânicos presentes nas nanossondas luminescentes sintetizadas a partir do ácido p-cumárico e tirosina obtidos a partir dos dados da TGA. Os compostos foram obtidos combinando 1,5 mmol de compostos orgânicos e 10 mg de NaYF₄:5%Eu-NH₂.

| | Resíduo (%) | $\Delta_{\text{Resíduo}}$ (%) |
|--|-------------|-------------------------------|
| NaYF ₄ :5%Eu- NH ₂ | 95,7 | - |
| NaYF ₄ :5%Eu- NH-Ac. Coumaric | 59,1 | 37 |
| NaYF ₄ :5%Eu- NH-Coumaric | 62,7 | 33 |
| NaYF ₄ :5%Eu- NH-Tyr1 | 67,8 | 28 |
| NaYF ₄ :5%Eu- NH-Tyr2 | 72,6 | 23 |
| NaYF ₄ :5%Eu- NH-Tyr3 | 75,7 | 20 |

4.2.1.4 CULTURA DE CÉLULAS E MICROSCOPIA ÓPTICA CONFOCAL

A linhagem celular HT-29 de adenocarcinoma de colon humano foi obtida da *American Type Culture Collection* (Manassas, VA) e cultivada em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 50 U / mL de penicilina e 50 mg / mL de estreptomicina sob condições de cultura de 5% de CO₂ e 37 ° C. As células foram plaqueadas em placas de cultura de células de fundo de vidro de 35 mm (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA) para microscopia confocal. Após 24 horas, as células foram tratadas com 100 µg / mL de cada nanopartícula por mais 24 horas. Após este período o meio foi removido e as células foram incubadas durante 10 min com 1 mL de uma solução salina tamponada com fosfato (PBS; pH 7.4) contendo 5 mL de corantes Hoechst 33342. Subsequentemente, as células foram lavadas três vezes com 1 mL de PBS e visualizadas por microscopia confocal utilizando uma plataforma confocal Leica SP8.

4.2.1.5 **METODOLOGIA DE RADIODAÇÃO APLICADA AS NANOPARTÍCULAS NaYF₄:5% Eu - COUMARIC, NaYF₄:5% Eu - Tyr3 E NaYF₄:5% Eu - BODIPY/Tyr3 COM O RADIOISÓTOPO I-123**

Em uma microbalança foi pesado 0.400 mg de partículas (NaYF₄:5%Eu - Coumaric, NaYF₄:5%Eu - Try3 ou NaYF₄:5%Eu - BODIPY/Tyr03) no interior de um *eppendorf*. Em seguida, adicionou-se 400 µL de PBS (1 mg/mL), e este sistema foi sonificado durante 3 minutos até obtenção de uma suspensão estável de partículas.

O procedimento de radioiodação foi realizado no interior de um tubo iodação de vidro fabricado pela *Thermo Scientific Pierce* pré-revestido com Iodogênio, reagente necessário para oxidação química onde o iodeto de sódio é convertido em sua forma reativa de iodo, que então incorpora espontaneamente em grupos tirosil (derivados da Tirosina). Para isso, inseriu-se 50 uL de Na¹²³I_(aq) (~1 mCi) e 250 uL de partículas (1 mg/mL) no interior do tubo de iodação. O sistema foi agitado em um *shaker* horizontal por 30 minutos sob temperatura ambiente. Após a reação o composto foi transferido para um *eppendorf* e centrifugado por 10 minutos a 8000 RPM. O procedimento de centrifugação foi reproduzido mais três vezes utilizando 1mL de PBS para lavagem do material. Por fim, a atividade foi registrada pelo detector de radiação ionizante e o material foi devidamente estocado para as análises subsequentes.

A quantidade de incorporação de I-123 nas nanopartículas conjugadas (IR) foi definida pela quantidade final de radioatividade emanada (atividade) pelo composto após a reação, a qual é dada pela relação entre a atividade inicial ($A_{inicial}$) e a atividade final (A_{final}), como mostrado a seguir na Equação 1:

$$\%IR = \frac{A_{final}}{A_{inicial}} \times 100\%. \quad (1)$$

4.2.1.6 **METODOLOGIA DE ABSORÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS NaYF₄:5% Eu – COUMARIC-¹²³I, NaYF₄:5% Eu - Tyr3-¹²³I E NaYF₄:5% Eu - BODIPY/Tyr3-¹²³I POR CÉLULAS HT-29**

A linha celular de adenocarcinoma do cólon humano HT-29 foi cultivada em meio de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal, 50 U / mL penicilina e 50 mg / mL de estreptomicina, sob condições de cultura de CO₂ a 5% e 37 ° C. As células foram plaqueadas em placas de cultura de células de 12 poços (Thermo Fisher Científico; Waltham, MA). Após 24 h, as células foram tratadas com 100 µg/mL (1 mCi) de NaYF₄:5%Eu – Coumaric-¹²³I, NaYF₄:5%Eu - Tyr3-¹²³I ou NaYF₄:5%Eu - BODIPY/Tyr3-¹²³I em diferentes intervalos de tempo t = 0, 0,5, 1, 3, 6 e 12 h. Após esse período de incubação, o meio foi removido, lavado três vezes com 1 mL de PBS e a atividade do radionucleotídeo contida no sobrenadante foi registrada utilizando um detector de radiação ionizante. As células aderidas na superfície dos poços também foram removidas com adição de 1mL de tripsina e transferidas para um tubo falcon. Por fim, a atividade das partículas absorvidas pelas células foi registrada.

4.2.2 **SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS EuDPA⊂SiO₂ - NH₂ e Lu_{0.5}-Eu_{0.5}DPA⊂SiO₂-NH₂**

O composto híbrido foi sintetizado em duas etapas: **i)** Síntese do complexo de coordenação EuDPA; **ii)** Síntese das nanopartículas híbridas. O procedimento empregado é mostrado a seguir:

- i)** Composto de coordenação (EuDPA): O complexo EuDPA foi sintetizado utilizando a metodologia descrita por Tao e colaboradores (TAO et al., 2015a). Para isso, 0,343 g de H₂DPA (2 mmol) foi adicionado a 20 mL de etanol sob agitação. Logo em seguida adicionou-se gota-a-gota porções de NaOH_(aq) 1 M até que a solução alcance o pH = 7. Por fim, 0,366 g de EuCl₃·6H₂O (1 mmol) foi dissolvido em outros 20 mL de etanol. O precipitado foi produzido adicionando gota a gota solução de EuCl₃·6H₂O. Depois disso, o precipitado foi filtrado, lavado com etanol e estocado em um frasco limpo e seco.
- ii)** Nanopartículas híbridas EuDPA⊂SiO₂- NH₂: Para síntese das nanopartículas híbridas empregou-se uma adaptação do método sol-gel de Stober (LIU et al., 2014; STÖBER; FINK; BOHN, 1968) visando incorporação do complexo EuDPA na matriz de

nanopartículas de sílica. A metodologia consiste na mistura de 30 μL /0,09 mmol de $\text{EuDPA}_{(\text{aq})}$ (2 mg/mL), 20 μL de NH_4OH e 27 μL de TEOS durante 4 horas sob agitação a temperatura ambiente. Logo após este período é adicionado a mistura 5,2 μL de APTES e o sistema é agitado por mais 1 hora. Por fim, o composto foi transferido para um tubo falcon e centrifugado por 10 minutos a 8000 RPM. O procedimento de centrifugação foi reproduzido mais três vezes utilizando 1 mL de água ultrapura para lavagem do material. Para obtenção das partículas $\text{Lu}_{0,5}\text{-Eu}_{0,5}\text{DPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ utilizou-se o mesmo protocolo empregado para a síntese do $\text{EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$, alterando-se apenas a adição de 0,045 mmol of $\text{EuDPA}_{(\text{aq})}$ e 0,045 mmol $\text{LuCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}_{(\text{aq})}$ em um volume de 30 μL de água ao invés de apenas 0,09 mmol de $\text{EuDPA}_{(\text{aq})}$ como previamente descrito.

4.2.2.1 CULTURA DE CÉLULAS E MICROSCOPIA ÓPTICA CONFOCAL

A linhagem celular de adenocarcinoma de colon humano (HT-29) foi obtida da *American Type Culture Collection* (Manassas, VA) e cultivada em *Ulbecco's Modification of Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 50 U / mL de penicilina e 50 mg / mL de estreptomicina. sob condições de cultura de 5% de CO_2 e 37 ° C. As células foram plaqueadas em placas de cultura de células de fundo de vidro de 35 mm (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA) para microscopia confocal. Após 24 horas, as células foram tratadas com 10, 100 e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de nanopartículas híbrida de $\text{EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ por mais 24 horas. Após este período o meio foi removido e as células foram incubadas durante 10 min com 1 mL de uma solução salina tamponada com fosfato (PBS; pH 7.4) contendo 5 mL de corantes Hoechst 33342. Subsequentemente, as células foram lavadas três vezes com 1 mL de PBS e visualizadas por microscopia confocal utilizando uma plataforma confocal Leica SP8 com uma fonte laser de luz branca.

4.2.2.2 SÍNTESE DO COMPOSTO HÍBRIDO $^{177}\text{Lu}\text{-EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$

A síntese do composto $^{177}\text{Lu}\text{-EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ é realizada de forma análoga ao sistema descrito na seccao 4.2.2. ítem ii). Para isso, foi preparada uma mistura a partir de 25 μL /0.09 mmol de $\text{EuDPA}_{(\text{aq})}$ (2 mg /mL), 5 μL de $^{177}\text{LuCl}_3$ (1-3 mCi), 20 μL de NH_4OH e 10 μL of TEOS, a qual foi condicionada durante 4 horas sob agitação a temperatura ambiente.

Logo após este período é adicionado à mistura 5,2 µL de APTES e o sistema é agitado por mais 1 hora. Por fim, o composto foi transferido para um *ependorff* e centrifugado por 10 minutos a 8000 RPM. O procedimento de centrifugação foi reproduzido mais três vezes utilizando 1 mL de água para lavagem do material, registrando-se a atividade do sobrenadante e do sólido obtido após a centrifugação. Após os processos de lavagem o composto ^{177}Lu -EuDPA -SiO_2 -NH $_2$ foi obtido na forma de um sólido branco.

4.2.2.3 METODOLOGIA DE ABSORÇÃO DO COMPOSTO HÍBRIDO ^{177}Lu -EuDPA -SiO_2 -NH $_2$ EM CÉLULAS HT-29

A linha celular de adenocarcinoma do cólon humano HT-29 foi cultivada em meio de *Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)* suplementado com 10% de soro bovino fetal, 50 U / mL penicilina e 50 mg / mL de estreptomomicina, sob condições de cultura de CO $_2$ a 5% e 37 ° C. As células foram plaqueadas em placas de cultura de células de 12 poços (Thermo Fisher Científico; Waltham, MA). Após 24 h, as células foram tratadas com o ^{177}Lu -EuDPA -SiO_2 -NH $_2$ avaliando-se a absorção do composto em relação ao tempo e em relação a atividade.

Absorção celular em função do tempo de incubação: As células HT-29 foram tratadas com 100 µg/mL (200 uCi) de partículas em diferentes intervalos de tempo $t = 0, 1, 3, 6, 12$ e 24 h. Após cada tempo de tratamento, o meio foi removido, lavado três vezes com 1 mL PBS e a atividade do radionucleotídeo apresentada no sobrenadante foi registrada. As células aderidas na superfície dos poços também foram removidas com adição de 1mL de Tripsina e transferidas para um tubo falcon. Por fim a radiação emitida pelas partículas absorvidas pelas células foi registrada.

Absorção celular em função da atividade inserida: Analogamente ao experimento anterior as células HT-29 foram tratadas com diferentes atividades obtidas a partir das diferentes concentrações de nanopartículas, com valores iguais a 200 µg/mL (200 µCi), 100 µg/mL (100 µCi), 10 µg/mL (50 µCi), 1 µg/mL (25 µCi), 0.1 µg/mL (12,5 µCi) e 0.01 ug/mL (6,25 µCi) durante 24 h de incubação. Após esse período, o meio foi removido, lavado com 1 mL PBS (3 vezes) e a atividade do radionucleotídeo contida no sobrenadante foi registrada. As células aderidas na superfície dos poços também foram removidas com adição de 1mL de Tripsina e transferidas para um tubo falcon. Por fim, a radiação emitida pelas partículas absorvidas pelas células foi registrada.

4.3 INSTRUMENTAÇÃO

4.3.1 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (FT-IR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho, foram obtidos a temperatura ambiente em um espectrômetro FT-IR Brucker, modelo Tensor 27, no intervalo de 4000 cm^{-1} à 650 cm^{-1} , equipado com uma célula para ATR de diamante/ZnSe. Todas as medidas de FT-IR foram obtidas no Departamento de Química da *Louisiana State University - USA*.

4.3.2 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS)

As análises de DLS foram realizadas em um contador de partículas Microtrac Zeta Trac 150, modelo/série: S3000/S3500 obtidas através da preparação de uma suspensões de partícula em meio aquoso. Todas as medidas foram obtidas no Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas.

4.3.3 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DE PÓ

Os dados de difração de raios-X em pó (PXRD) foram registrados à temperatura ambiente em uma radiação XRD Empryean PANalytical com radiação $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 1,5406\text{ \AA}$), passo de $0,02^\circ$, tempo de aquisição de 1 segundo e janela angular (2θ) de 5° - 70° . Todas as medidas de PXRD foram obtidas no Departamento de Química da *Louisiana State University - USA*.

4.3.4 ESPECTROSCOPIA DE FOTOLUMINESCÊNCIA

As propriedades fotoluminescentes (espectros de excitação e emissão, e tempo de vida do estado excitado) dos materiais produzidos neste trabalho foram realizadas em um espectrofluorímetro Horiba Jobin Yvon, modelo Fluorolog-3 ISA. O aparelho é equipado com monocromador duplo de excitação e de emissão, modelo FL-1039/40. Lâmpadas contínua de xenônio com potência de 450 W e pulsada de xênon de 150 W, fotomultiplicadora R928P. Os dados foram coletados em um ângulo de 90° , em relação ao feixe de emissão. Os espectros de emissão foram corrigidos para a resposta dependente do comprimento de onda do sistema de detecção. Um detector de referência de fotodíodo de silício foi usado para monitorar e

compensar a variação na saída da lâmpada de xenônio, usando espectros de correção típicos fornecidos pelo fabricante. Todas as medidas de Luminescência foram obtidas nas instalações do Departamento de Química da *Louisiana State University – USA* ou no Laboratório de Terras Raras – BSTR, localizado no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco.

4.3.4.1 CÁLCULO DAS TAXAS RADIATIVAS A_{01} , A_{02} , A_{03} e A_{04}

As taxas radiativas A_{01} , A_{02} , A_{03} e A_{04} são também conhecidas como coeficiente de emissão espontânea (A_{0J}), que estima quantitativamente um valor referente as transições radiativas ocorridas para cada transição ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_J$ (com $J = 1, 2, 3$ e 4) do íon Europío trivalente. Para o cálculo destas é levado em consideração as áreas sob as curvas (S_{0J}), as energias dos seus baricentros (ν_{0J}), ambas referentes às suas respectivas transições observadas no espectro de emissão, e utiliza-se o índice de refração médio ($n = 1,5$), onde sua expressão é dada por: $A_{0J} = A_{01} \left(\frac{S_{0J}}{S_{01}} \right) \left(\frac{\nu_{01}}{\nu_{0J}} \right)$. Para o cálculo anterior a transição ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$, governada por mecanismos de dipolo magnético, foi tomada como referência devido a esta ser insensível a influências do campo ligante no íon Eu^{3+} . Deste modo o A_{01} é obtido pela expressão: $A_{01} = 0,31 \times 10^{-11} (n)^3 (\nu_{01})^3$, onde A_{01} é o coeficiente de emissão espontânea para a transição ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$, ν_{01} é a energia média do seu baricentro e o $0,31 \times 10^{-11}$ um fator de correção para o íon Eu^{3+} (DONEGA; SILVA, 2000), (BORGES et al., 2012).

4.3.4.2 EFICIÊNCIA QUÂNTICA DE EMISSÃO

A eficiência quântica de emissão (η) é definida como a razão entre o taxa de fótons emitidos e absorvidos pelo íon no estado emissor. Neste trabalho, esta relação foi calculada a partir da Equação 2, onde A_{rad} é a taxa de decaimento radiativo, dada por $A_{\text{rad}} = \sum_{J=1}^4 A_J$ e a taxa de decaimento radiativo total (A_{total}) é dada pela relação $A_{\text{total}} = \tau^{-1}$, onde τ representa o tempo de vida para o decaimento radiativo relacionado com a transição ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$. Por fim, a taxa de decaimento não radiativo (A_{nrad}) é dada pela diferença $A_{\text{nrad}} = A_{\text{total}} - A_{\text{rad}}$.

$$\eta = \frac{A_{\text{rad}}}{A_{\text{rad}} + A_{\text{nrad}}} \times 100\% \quad (3)$$

4.3.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (SEM)

Todas as imagens foram adquiridas em um microscópio eletrônico de varredura de baixo vácuo JEOL JSM-6610LV. Todas as medidas de SEM foram obtidas nas instalações do Departamento de Química da *Louisiana State University*.

4.3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (TEM)

O equipamento utilizado foi um microscópio eletrônico de transmissão da marca FEI, modelo Morgagni 268 D, voltagem de aceleração 40-100 kV, resolução de ponto de 0,45 nm, resolução de linha 0,34 nm, magnificação de até 180, 000 vezes e câmera de CCD acoplada. Todas as medidas de TEM foram obtidas nas instalações do Departamento de Química da *Louisiana State University*.

4.3.7 VIABILIDADE CELULAR

As células HT-29 foram plaqueadas durante uma noite em placas de 96 poços em uma concentração de 10.000 células/poço em 200 μ L de meio DMEM descrito acima sob condições de cultura de 5% de CO₂ e 37 °C. Após esse período, o meio foi removido e substituída por 200 μ L de meio contendo 1, 10 ou 100 μ g/mL de partículas. Como controles para o experimento, as células não tratadas (PBS) ou tratadas com uma solução 10 μ g/mL de doxorrubicina. Após 72 h de tratamento, a viabilidade celular foi determinada usando um ensaio XTT de acordo com o protocolo reportado na literatura (Scudiero et al. 1988). Para cada poço foi adicionado 50 μ L de solução de detecção XTT (Cell Signaling Technology; Danvers, 12 MA), e após 2 horas de incubação a 37 °C, a densidade óptica de cada poço foi medido a 450 nm utilizando um leitor de placas Spectra Max 190 (Molecular Devices; Sunnyvale, CA). Poços sem células, contendo os meios DMEM e XTT reagente sozinho foram utilizados como leituras em branco. Os dados foram analisados e expressos como percentagem média de crescimento celular de células de controle (não tratadas) para determinar qualquer efeito na viabilidade celular. Todas as amostras foram analisadas em réplicas de oito. Todas as análises de viabilidade celular foram realizadas nas instalações do Departamento de Ciências Biomedicas Comparadas da *Louisiana State University*.

4.3.8 ANIMAIS

Os camundongos *nude* (nu/nu) fêmeas de 4–5 semanas (Envigo, Indianapolis, IN) foram utilizados neste trabalho para obtenção das imagens via SPECT.

Os animais foram ambientados em salas climatizadas localizadas no Departamento de Ciências Biomédicas Comparativas da *Louisiana State University* (LSU) nas condições de criação de temperatura ambiente (22 ± 2 °C), iluminação artificial com ciclos de 12 horas de luz/ 12 horas de escuridão com ração e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso Animal da *Louisiana State University* (LSU) (Protocolo LSU IACUC nº 18-004). Os procedimentos e políticas da LSU IACUC seguem as diretrizes estabelecidas no Guia do NIH para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório.

A indução do tumor foi realizado pela injeção de células HT-29 via subcutânea nos animais. Após sete dias foi possível observar a olho nu a presença de uma massa no dorso dos camundongos, possibilitando assim a realização dos nossos experimentos de biomarcação radioativa.

4.3.9 DETECTOR DE RADIAÇÃO IONIZANTE

Toda a atividade dos nanocompostos foi quantificada utilizando-se uma câmara de ionização de raios gama equipada com um calibrador CRC®-55tR e contador de poços (*Capintec, Inc., Florham Park, NJ*), calibrando-se previamente o equipamento com padrões de Lu-177 e I-123 antes das medições realizadas. Todas as manipulações com radioisótopos foram realizadas nas instalações do Departamento de Ciências Biomedicas Comparadas da *Louisiana State University*.

4.3.10 TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA POR EMISSÃO DE FÓTON ÚNICO (SPECT)

Todas as imagens obtidas nos experimentos *in vivo* foram coletadas em um instrumento Triumph II SPECT/CT (*Northridge Tri-Modality Imaging, Inc., Chatsworth, CA*). Todas as manipulações com radioisótopos e obtenção das imagens de SPECT/CT foram obtidas nas instalações do Departamento de Ciências Biomedicas Comparadas da *Louisiana State University*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 BIOMARCADORES LUMINESCENTES

5.1.1 BIOMARCADORES LUMINESCENTES À BASE DE $\text{NaYF}_4:5\% \text{Eu}$

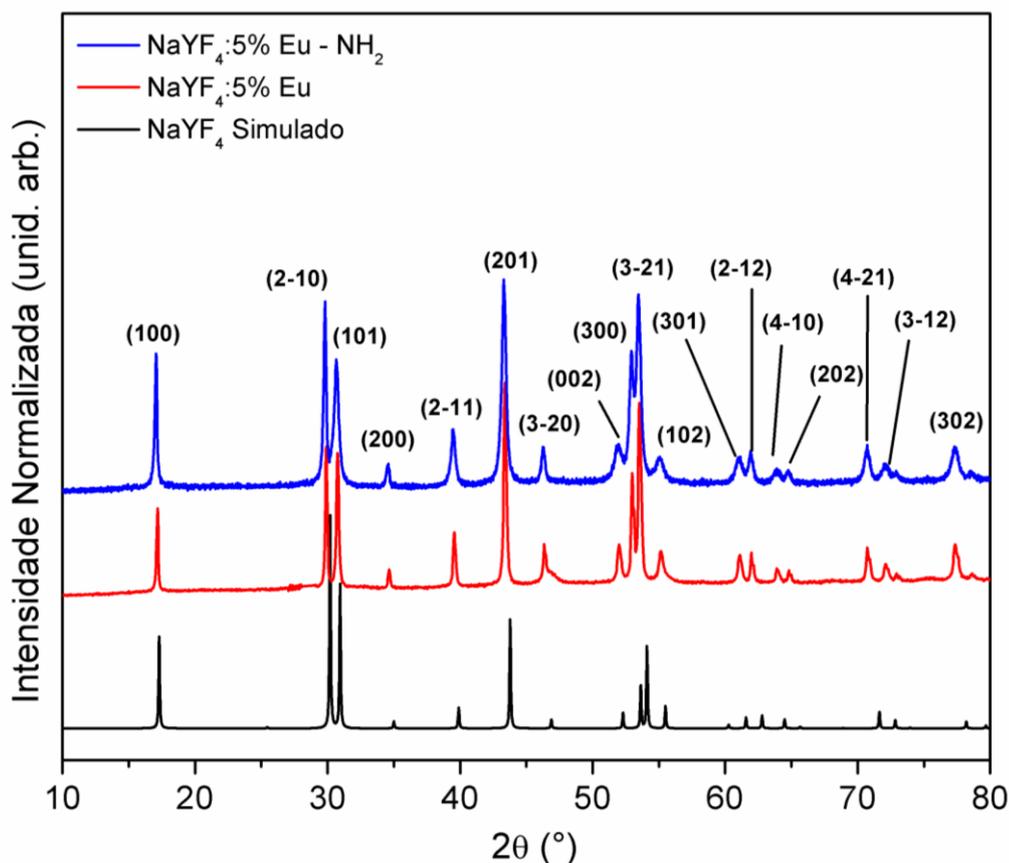
5.1.1.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ESTRUTURAL DAS PARTÍCULAS $\text{NaYF}_4:5\% \text{Eu}$ E $\text{NaYF}_4:5\% \text{Eu-NH}_2$

A difração de raios-X de pó (PXRD) foi realizada para os compostos a fim de obter-se informações sobre a cristalinidade e identificação de fases dos materiais. Na Figura 16 é realizada a comparação entre os resultados de PXRD para o $\text{NaYF}_4:5\% \text{Eu}$ (Figura 16; linha vermelha) e $\text{NaYF}_4:5\% \text{Eu-NH}_2$ (Figura 16; linha azul) em relação ao padrão de raios-X simulado (Figura 16; linha preta), o qual foi obtido através dos dados cristalográficos para o composto NaYF_4 previamente descrito na literatura (TU et al., 2013). Observa-se que os resultados de PXRD para o composto $\text{NaYF}_4:5\% \text{Eu}$ apresentou boa correlação de picos em relação ao padrão de raios-X simulado, indicando a obtenção da fase análoga a $\beta\text{-NaYF}_4$, que se arranja em uma conformação hexagonal com grupo espacial P-6. A análise comparativa entre as duas amostras $\text{NaYF}_4:5\% \text{Eu}$ e $\text{NaYF}_4:5\% \text{Eu-NH}_2$ revela a manutenção dos picos de difração, indicando que o processo de funcionalização com grupos -NH_2 não promove danos no arranjo cristalino do material e preserva a sua estrutural original.

Para determinação do tamanho médio do cristalito (τ_{med}) para os materiais $\text{NaYF}_4:5\% \text{Eu}$ e $\text{NaYF}_4:5\% \text{Eu-NH}_2$, utilizou-se a equação de Scherrer como descrita na Equação 3 (CULLITY, 1978). Para isto, avaliou a média entre os valores τ obtidos para os planos (100), (200) e (2-11). O cálculo considerou o valor λ igual a $K\alpha_{\text{Cu}} = 1,54056 \text{ \AA}$, sabendo que θ é a posição angular referente a intensidade máxima do pico e B largura a meia altura do pico de difração. Importante salientar que está equação admite partículas esféricas como aproximação. Deste modo, pôde-se obter o tamanho médio de cristalito para os sistema $\text{NaYF}_4:5\% \text{Eu}$ e $\text{NaYF}_4:5\% \text{Eu-NH}_2$, como apresentado na Tabela 7.

$$\tau = \frac{0,9\lambda}{B \cos\theta} \quad (3)$$

Figura 16: Comparação entre difratogramas de raios-X experimentais β -NaYF₄:5%Eu (linha vermelha), β -NaYF₄:5%Eu-NH₂ (linha azul) e o padrão de raios-X simulado para o β -NaYF₄ (linha preta) obtido a partir da informação cristalográfica descrita na literatura (TU et al., 2013).



Fonte: Fornecida pelo próprio autor.

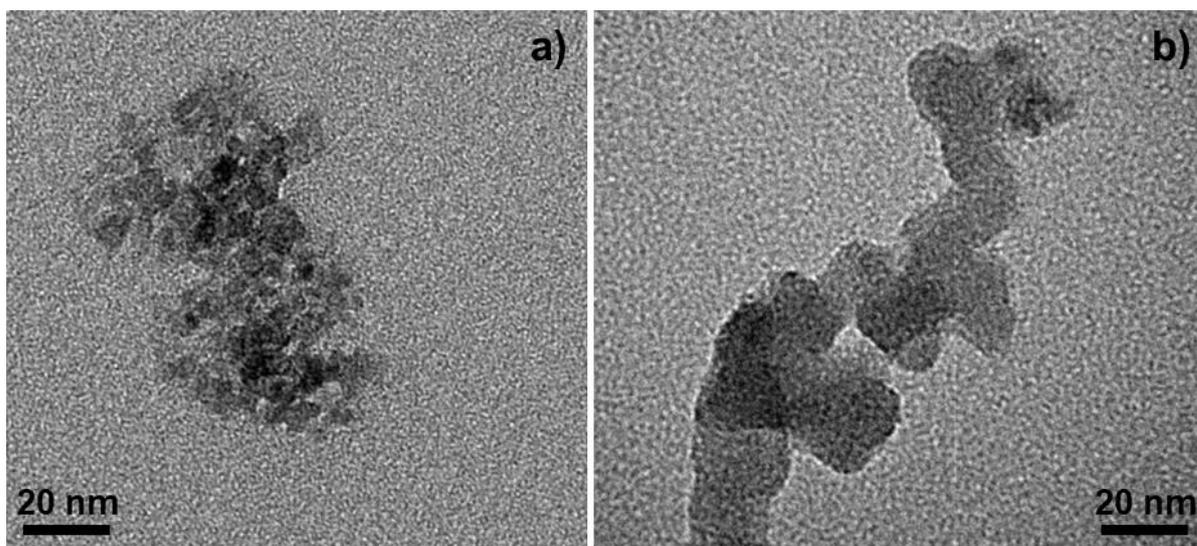
Tabela 7: Valores para as distâncias angulares relativas ao picos de difração tomados a meia altura ($\beta_{(100)}$, $\beta_{(200)}$ e $\beta_{(2-11)}$) e os tamanho médios de cristalito (τ_{med}) calculados para as amostras NaYF₄:5%Eu e NaYF₄:5%Eu-NH₂.

| | $\beta_{(100)}$ (rad) | $\tau_{(100)}$ (nm) | $\beta_{(200)}$ (rad) | $\tau_{(200)}$ (nm) | $\beta_{(2-11)}$ (rad) | $\tau_{(2-11)}$ (nm) | τ_{med} (nm) |
|---|--------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|---------------------------|-------------------------|----------------------|
| NaYF ₄ :5%Eu | 0,22 | 36 | 0,25 | 33 | 0,45 | 19 | 29 ± 9 |
| NaYF ₄ :5%Eu-NH ₂ | 0,17 | 47 | 0,19 | 46 | 0,23 | 37 | 43 ± 6 |

A microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foi realizada para as partículas sintetizadas visando a identificação morfológica e estimar o tamanho de partícula a partir de suas imagens. A análise de TEM para a amostra NaYF₄:5%Eu (Figura 17a) revela partículas em escala nanométrica, apresentadas em pequenos aglomerados com tamanho próximo de 20 nm (estimada com base na barra de escala do equipamento). Este valor está de acordo com a

estimativa calculada pela equação de Sherrer, onde o τ_{med} apresenta valor igual a 29 nm (Tabela 3). Após o procedimento de funcionalização com grupos $-\text{NH}_2$ notamos que as partículas $\text{NaYF}_4:5\%\text{Eu}-\text{NH}_2$ (Figura 17b) apresentam um aumento em seu tamanho, com dimensões maiores que 20 nm (estimada com base na barra de escala do equipamento), o que também é compatível com o valor encontrado para o tamanho de cristalito, como mostrado na Tabela 7.

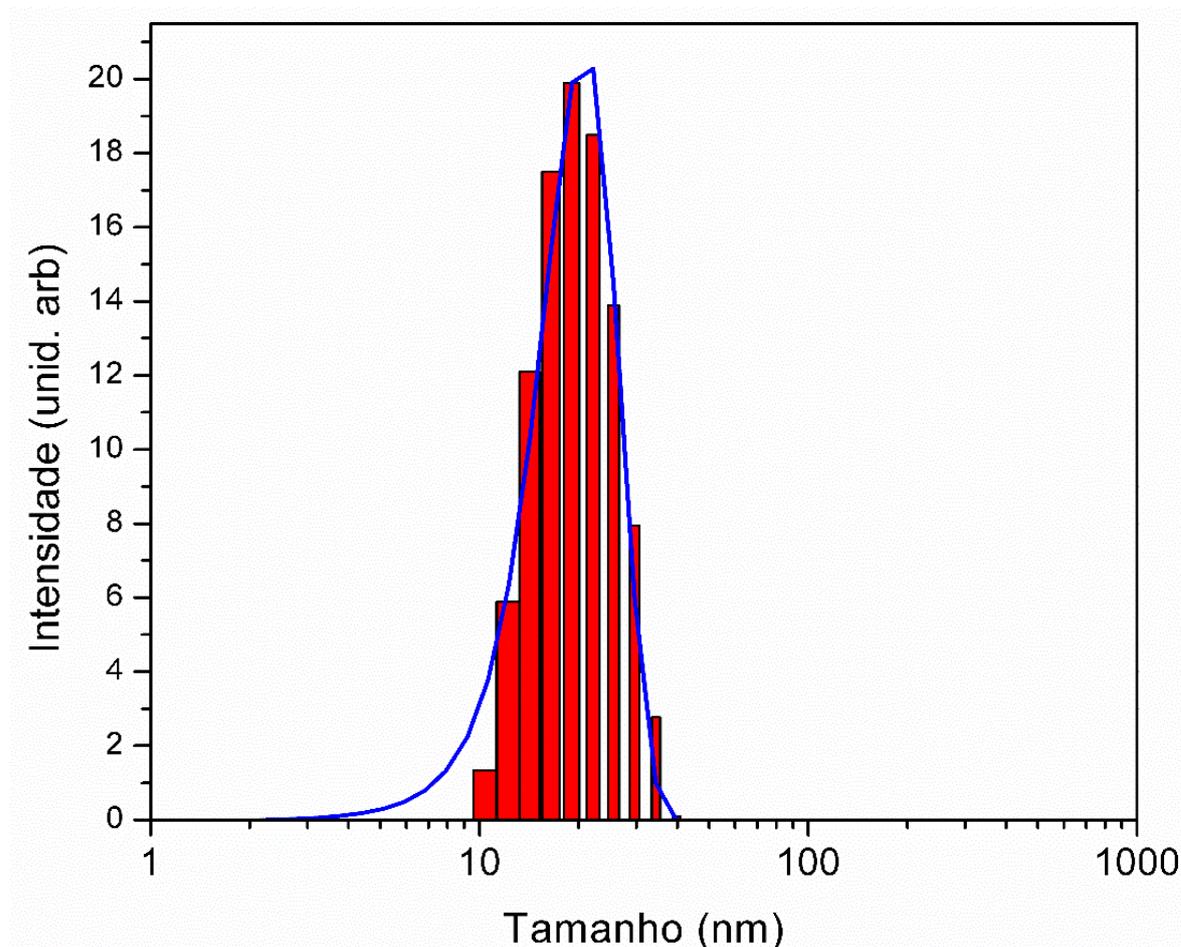
Figura 17: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão para o composto $\beta\text{-NaYF}_4:5\%\text{Eu}$ em diferentes magnificações.



Fonte: Fornecida pelo próprio autor.

A análise de tamanho de partículas também foi realizada utilizando-se a técnica de DLS para as nanopartículas $\text{NaYF}_4:5\%\text{Eu}-\text{NH}_2$ mostrado nas Figura 18. A análise revela que as partículas tem tamanho médio de partícula de 27,7 nm, apresentando valores próximos ao estimado pela análise das imagens de TEM.

Figura 18: Histograma de distribuição de tamanho obtidos por DLS para as partículas NaYF₄:5%Eu-NH₂



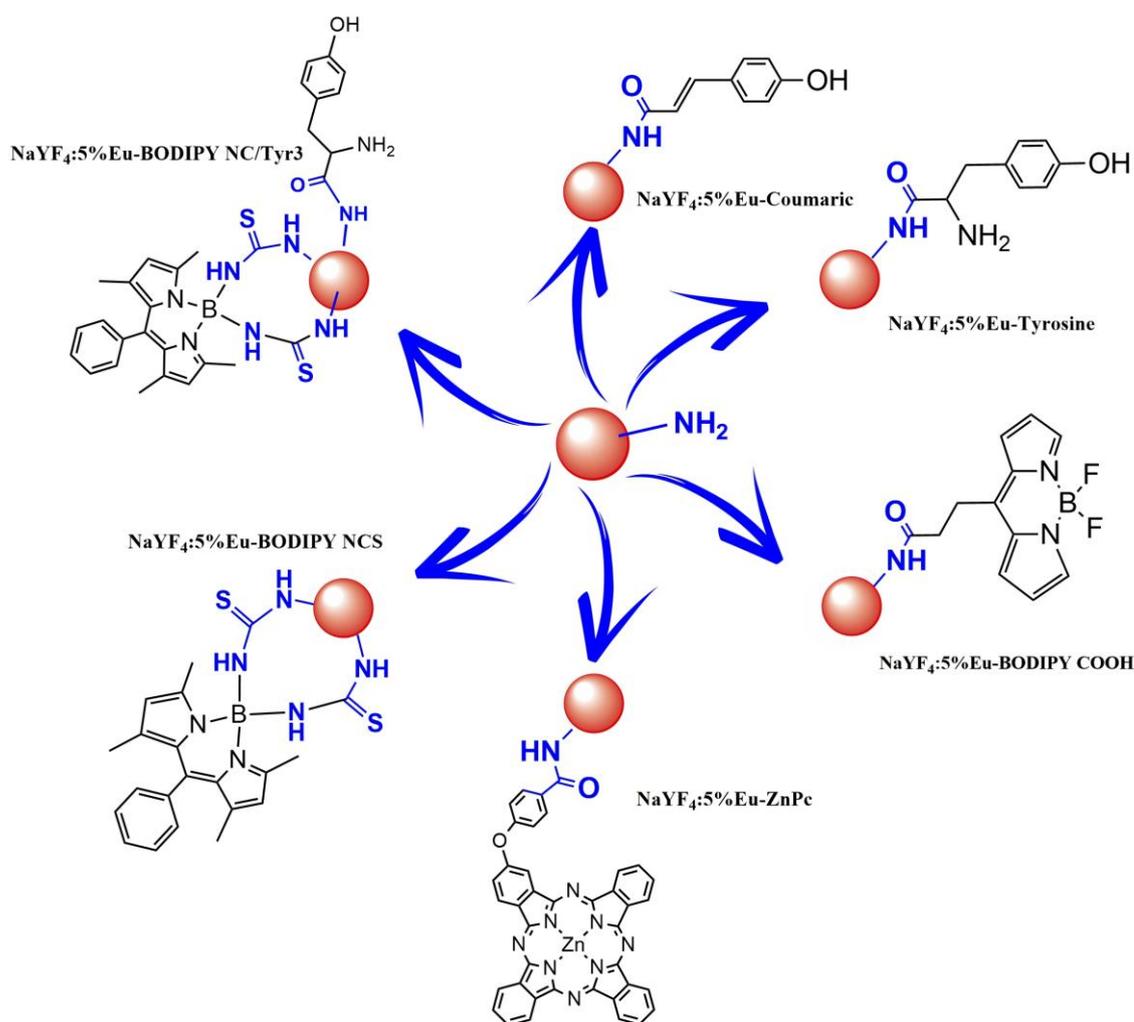
Fonte: Fornecida pelo próprio autor

5.1.1.2 ANÁLISE COMPOSICIONAL DAS NANOPARTÍCULAS CONJUGADO À BASE DE NaYF₄:5% Eu

O composto NaYF₄:5% Eu-NH₂ foi utilizado como matriz para a conjugação com pequenas moléculas aromáticas, objetivando proporcionar uma melhor interação entre as nanopartículas e células HT-29. É conhecido na literatura que o aumento na lipofilicidade das espécies a serem usadas como ligantes em um meio biológico elevam a especificidade na interação com os alvos na superfície celular (WARING, 2010). Deste modo, selecionamos seis compostos orgânicos diferentes, conhecidos na literatura por possuírem boa interação em sistemas biológicos, visando ancora-los na superfície das nanopartículas de NaYF₄:5% Eu-NH₂ por intermédio de conjugação entre as duas espécies. As nanopartículas que serão utilizados neste trabalho: NaYF₄:5% Eu-Coumaric, NaYF₄:5% Eu -Tyr3, NaYF₄:5% Eu -BODIPY

COOH , NaYF₄:5% Eu-BODIPY NCS e NaYF₄:5% Eu -ZnPc e NaYF₄:5% Eu -BODIPY NCS/Tyr3 são apresentadas no diagrama mostrado na Figura 19. É importante notar que a adição de compostos orgânicos já foi relatada na literatura como uma medida interessante para aumento da especificidade celular e viabilidade na interação entre nanopartículas e células tumorais (LI et al., 2014). Diante disso, neste trabalho fornecemos novas alternativas para obter essa classe de materiais e utiliza-los como nanomarcadores luminescentes e radioativos.

Figura 19: Representação das nanopartículas conjugadas obtidas a partir de reações de conjugações entre o NaYF₄:5%Eu-NH₂ e os compostos orgânicos investigado neste trabalho.

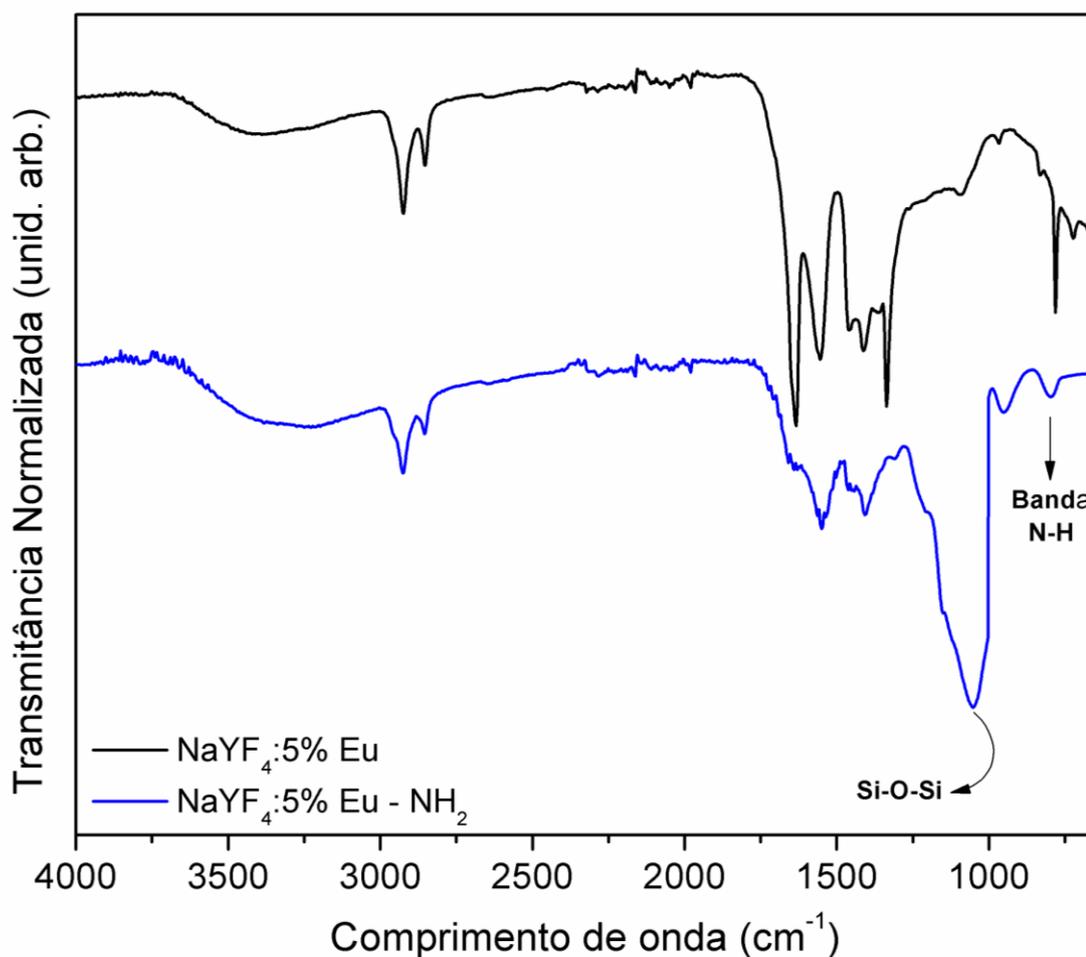


Fonte: Fornecida pelo próprio autor.

O processo de funcionalização do NaYF₄:5% Eu-NH₂ foi analisado por espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR), onde foi realizada uma comparação entre os espectros

NaYF₄:5% Eu (Figura 20; linha preta) e NaYF₄:5% Eu-NH₂ (Figura 20; linha azul). O espectro com linha azul na Figura 20 revelou a presença de uma banda larga e intensa centrada em 1070 cm⁻¹ para o NaYF₄:5% Eu-NH₂, o que está relacionado ao estiramento assimétrico Si-O-Si proveniente de grupos silano nas superfície das partículas. A funcionalização com grupos -NH₂ foi caracterizada pela presença de duas bandas localizadas em 1635 cm⁻¹ e 794 cm⁻¹ devido aos estiramentos N-H da amina (Figura 20; linha azul), respectivamente (PAVIA et al., 2009). É importante notar que os resultados descritos na literatura apresentam um perfil de FT-IR semelhante ao encontrado no presente estudo, o que fortalece a hipótese de funcionalização bem sucedida para o nosso material (LIU et al., 2014).

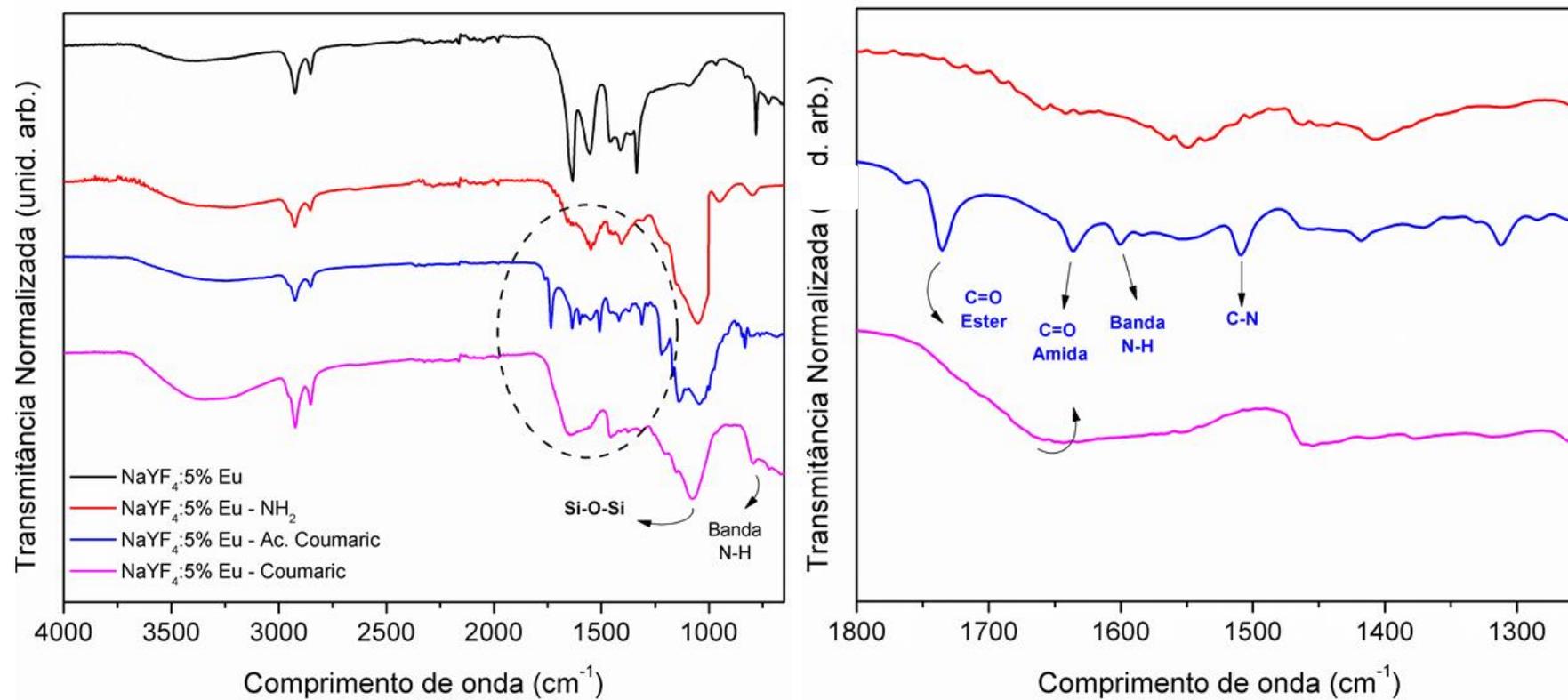
Figura 20: Espectros de infravermelho para os compostos NaYF₄:5% Eu (linha preta) e NaYF₄:5% Eu - NH₂ (linha azul).



Fonte: Fornecida pelo próprio autor.

Reações de acoplamento foram usadas como estratégia para produção de nanopartículas conjugadas. Esta metodologia foi realizada em duas etapas utilizando o TBTU como o agente de acoplamento para a reação de amidificação (VALEUR; BRADLEY, 2009b). Esta rota sintética foi utilizada para a conjugação no processo de formação partículas NaYF₄:5% Eu-Coumaric, como mostrado no esquema descrito na Figura S1. A reação foi realizada em duas etapas, onde o primeiro passo consiste na reação entre o ido 3- (4-acetoxifenil)acrico(ido cumárico) e as partículas NaYF₄:5% Eu-NH₂ na produção do composto intermediário NaYF₄:5% Eu-NH-Ac. Coumaric. Para a segunda etapa a remoção do grupo protetor acetil é realizada gerando grupo hidroxilas no composto final, mantendo a estrutura da fração orgânica conjugada no NaYF₄:5% Eu-Coumaric o mais próximo possível da estrutura molecular do ácido p-Cumárico. Para analisar a preparação das partículas de NaYF₄: 5% Eu-Comaric, os materiais obtidos na primeira e segunda etapas foram caracterizados utilizando FT-IR. Uma análise preliminar mostra os perfis espectrais comparando NaYF₄:5% Eu-NH₂ (Figura 21; linha vermelha), NaYF₄:5% Eu-Ac. Coumaric (Figura 21; linha azul) e NaYF₄:5% Eu-Coumaric (Figura 21; linha rosa). Observou-se alterações significativas na região de impressão digital compreendida entre 1800-1250 cm⁻¹. A Figura 21 mostra ainda uma seção do espectro, onde a presença de um estiramento N-H em 1635 cm⁻¹ foi notada para NaYF₄:5% Eu-NH₂ (Figura 21; linha vermelha) (PAVIA et al., 2009). O espectro do composto NaYF₄:5% Eu-Ac. Coumaric apresenta uma banda com máximo em 1738 cm⁻¹, a que está relacionada com o estirmento de éster carbonílico, relacionado ao grupo acetila do composto (Figura 21; linha azul). Além disso, a revelação de uma banda centrada em 1630 cm⁻¹ indica a presença de grupos C = O da amida que surge pela reação de formação do NaYF₄:5% Eu-Ac. Coumaric. Para o composto NaYF₄:5% Eu-Coumaric (Figura 21; linha rosa) observa-se a manutenção da banda C = O do grupo amida, sugerindo que o material conjugado foi obtido com sucesso.

Figura 21: Espectros de infravermelho para os compostos NaYF₄:5% Eu (linha preta) e NaYF₄:5% Eu – NH₂ (linha vermelha), NaYF₄:5% Eu - Ac. Coumaric (linha azul) e NaYF₄:5% Eu - Coumaric (linha rosa).

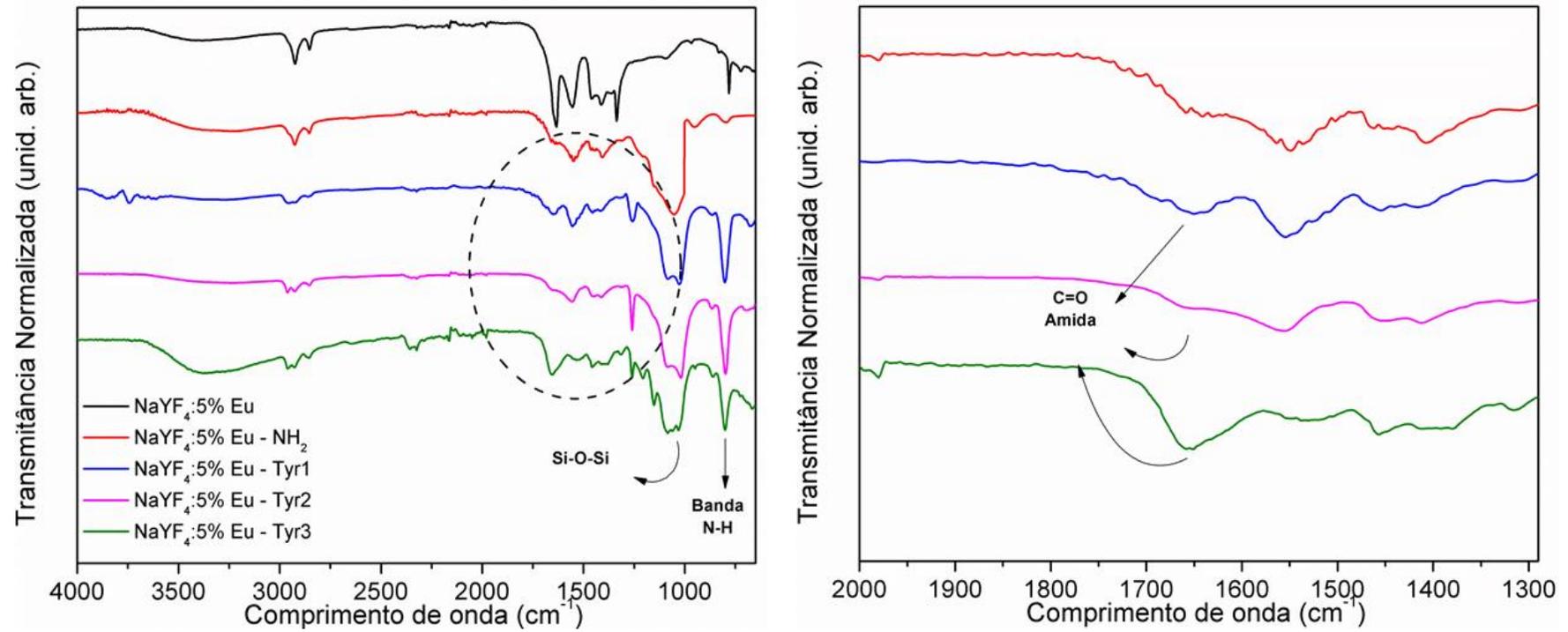


Fonte: Fornecida pelo próprio autor.

Reações de conjugação para formação das partículas NaYF₄:5%Eu-Tyr3 foram realizadas como mostrado no esquema da Figura S2. A reação foi realizada em três etapas, onde a primeira delas consiste na reação de acoplamento entre Tirosina e NaYF₄:5%Eu-NH₂, gerando NaYF₄:5%Eu-Tyr1 como produto. A segunda etapa consistiu na remoção do primeiro grupo protector em meio alcalino e produção de NaYF₄:5% Eu-Tyr2. Finalmente, o composto desejado NaYF₄:5% Eu-Tyr3 foi obtido pela remoção do último grupo protector por exposição do sistema em meio ácido. A funcionalização entre as nanopartículas de NaYF₄:5% Eu-NH₂ com compostos derivados da tirosina foram avaliados usando FT-IR, como mostrado na Figura 21. A análise preliminar o FT-IR mostrou que os perfis espectrais de NaYF₄: 5% Eu-NH₂ (Figura 22; linha vermelha), NaYF₄:5% Eu-Tyr1 (Figura 22; linha azul), NaYF₄: 5% Eu-Ty2 (Figura 22; linha rosa) e NaYF₄:5% Eu -Ty3 (Figura 22; linha verde) não sofreram grandes alterações, com exceção da região entre 1800-1300 cm⁻¹. Uma análise para a região supracitada observou-se a presença da estiramento de C = O oriundo dos grupos amida com máximo centrado em 1658 cm⁻¹ para o NaYF₄:5% Eu-Tyr1 (Figura 22; linha azul), indicando que as partículas continham a porção orgânica de interesse em sua constituição. Os compostos NaYF₄:5% Eu - Tyr2 (Figura 22; linha rosa) e NaYF₄:5% Eu - Tyr3 (Figura 22; linha verde) também não mostraram alterações significativas na intensidade referente estiramento C = O dos grupos amida, indicando que as ligações conjugadas não sofreram eliminação após os processos de remoção dos grupos protetores. Estes dados sugerem que após todas as reações, lavagens e etapas de purificação os componentes orgânicos residuais foram removidos das partículas da fase sólida e que o composto derivado de tirosina foi formado.

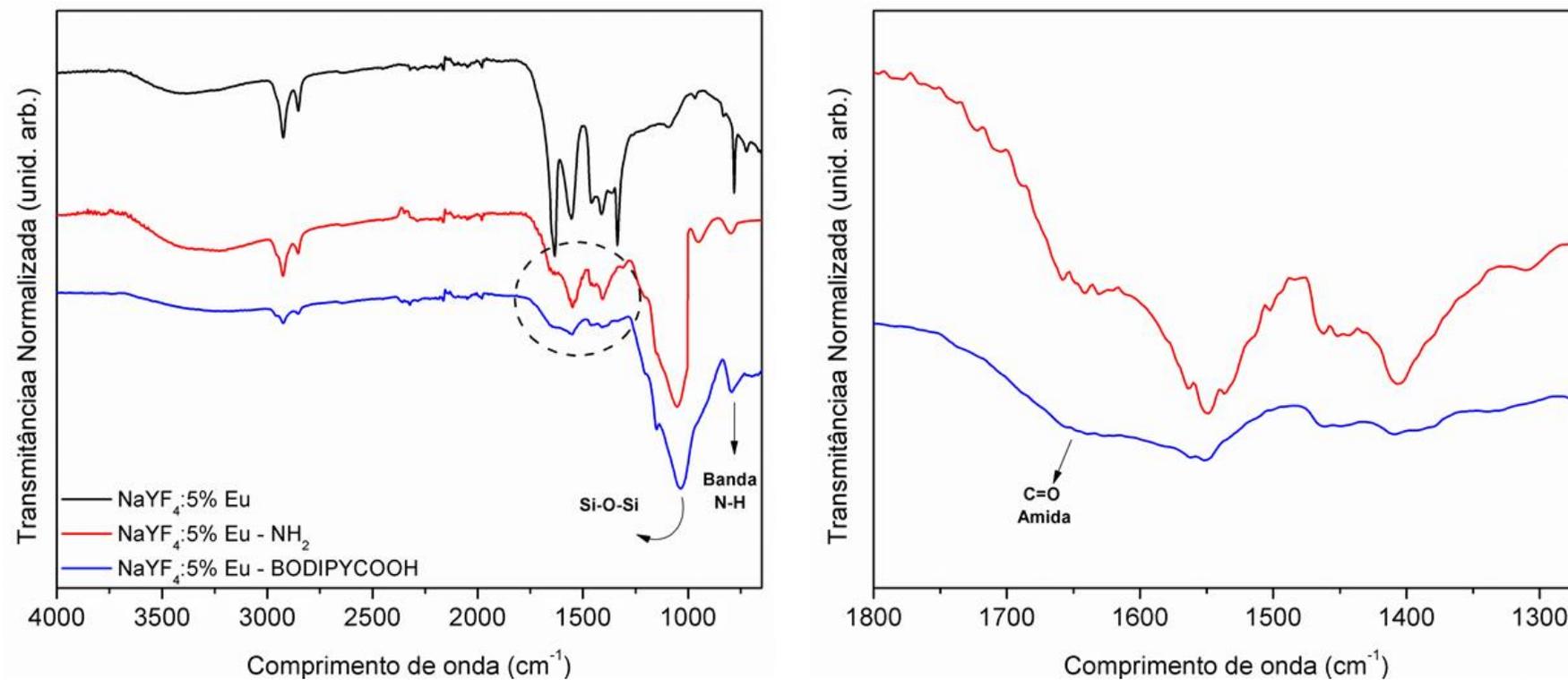
Utilizou-se a mesma metodologia empregada anteriormente, agora realizada em uma única etapa, para realizar a conjugação de moléculas BODIPY contendo em sua estrutura ácidos carboxílicos terminais (BODIPY COOH). O diagrama esquemático para esta reação de conjugação é mostrado na Figura S3. A avaliação da conjugação da fração orgânica também foi realizada utilizando espectroscopia de infravermelho (Figura 23). Os resultados de FT-IR mostraram pequenas mudanças nos espectros de NaYF₄:5% Eu-BODIPY COOH (Figura 23; linha azul) na região de formação da ligação amida, percebida pela modificação do perfil espectral com surgimento de uma banda localizada em 1642 cm⁻¹ devido ao estiramento C = O do grupo amida (PAVIA et al., 2009).

Figura 22: Espectros de infravermelho para os compostos NaYF₄:5% Eu (linha preta) e NaYF₄:5% Eu – NH₂ (linha vermelha), NaYF₄:5% Eu – Tyr1 (linha azul), NaYF₄:5% Eu - Tyr2 (linha rosa) e NaYF₄:5% Eu – Tyr3 (linha verde).



Fonte: Fornecida pelo próprio autor.

Figura 23: Espectros de infravermelho para os compostos $\text{NaYF}_4:5\% \text{Eu}$ (linha preta) e $\text{NaYF}_4:5\% \text{Eu} - \text{NH}_2$ (linha vermelha) e $\text{NaYF}_4:5\% \text{Eu} - \text{BODIPY COOH}$ (linha azul).



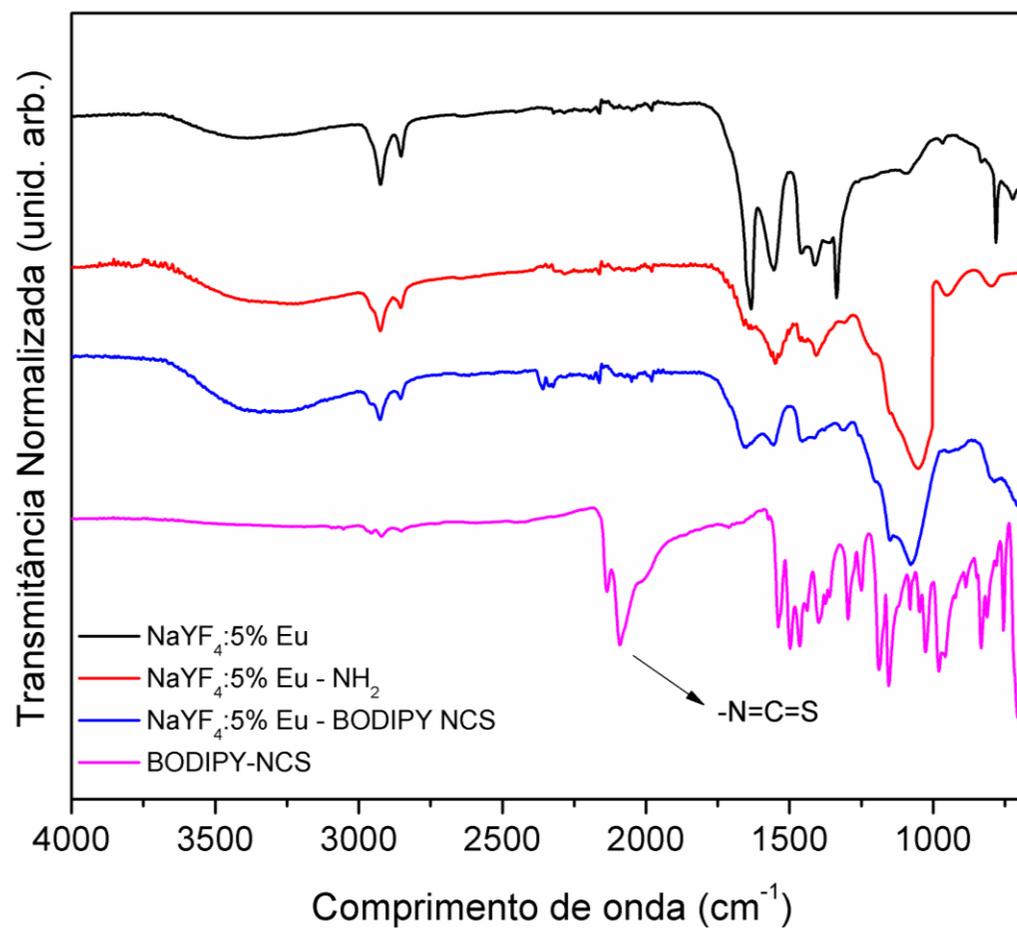
Fonte: Fornecida pelo autor.

Também avaliou-se a conjugação de nanopartículas de NaYF₄:5% Eu-NH₂ com BODIPY contendo em sua estrutura o grupo -N = C = S terminal (BODIPY NCS). O diagrama esquemático para esta reação é mostrada na Figura S4. Também realizou-se para este composto uma comparação entre os espectros de FT-IR entre NaYF₄:5% Eu-NH₂ (linha vermelha), NaYF₄: 5% Eu-BODIPY NCS (linha azul) e BODIPY NCS livre (linha rosa), como mostrado na Figura 24. Admitindo o sucesso no processo de conjugação, seria de se esperar que o espectro de FT-IR não apresente ou apresente parcialmente (para o caso de conjugação em apenas um dos grupos -N = C = S) uma banda referente ao estiramento -N = C = S referente ao composto BODIPY NCS livre, representada por um sinal pronunciado no espectro com máximo centrado em 2088 cm⁻¹ (Figura 24; linha rosa) (PAVIA et al., 2009). Entretanto, tal estiramento não pôde ser observado, sugerindo que a nanopartícula NaYF₄:5% Eu-BODIPY NCS foi obtida com sucesso.

Para validar a conjugação de ZnPc com as nanopartículas de NaYF₄:5% Eu-NH₂, foi utilizado a mesma metodologia para as reações de acoplamento descritas neste trabalho. O diagrama esquemático da metodologia empregada é mostrado na Figura S5. A análise da reação de conjugação também foi realizada usando FT-IR (Figura 25). O espectro de infravermelho revela pequenas alterações para o composto NaYF₄:5% Eu-ZnPc (Figura 25; linha azul), onde notou-se a formação da ligação amida, o que foi indicado pela modificação do perfil espectral do FT-IR evidenciado pelo surgimento do sinal C = O do grupo amida centrado em 1642 cm⁻¹ (PAVIA et al., 2009).

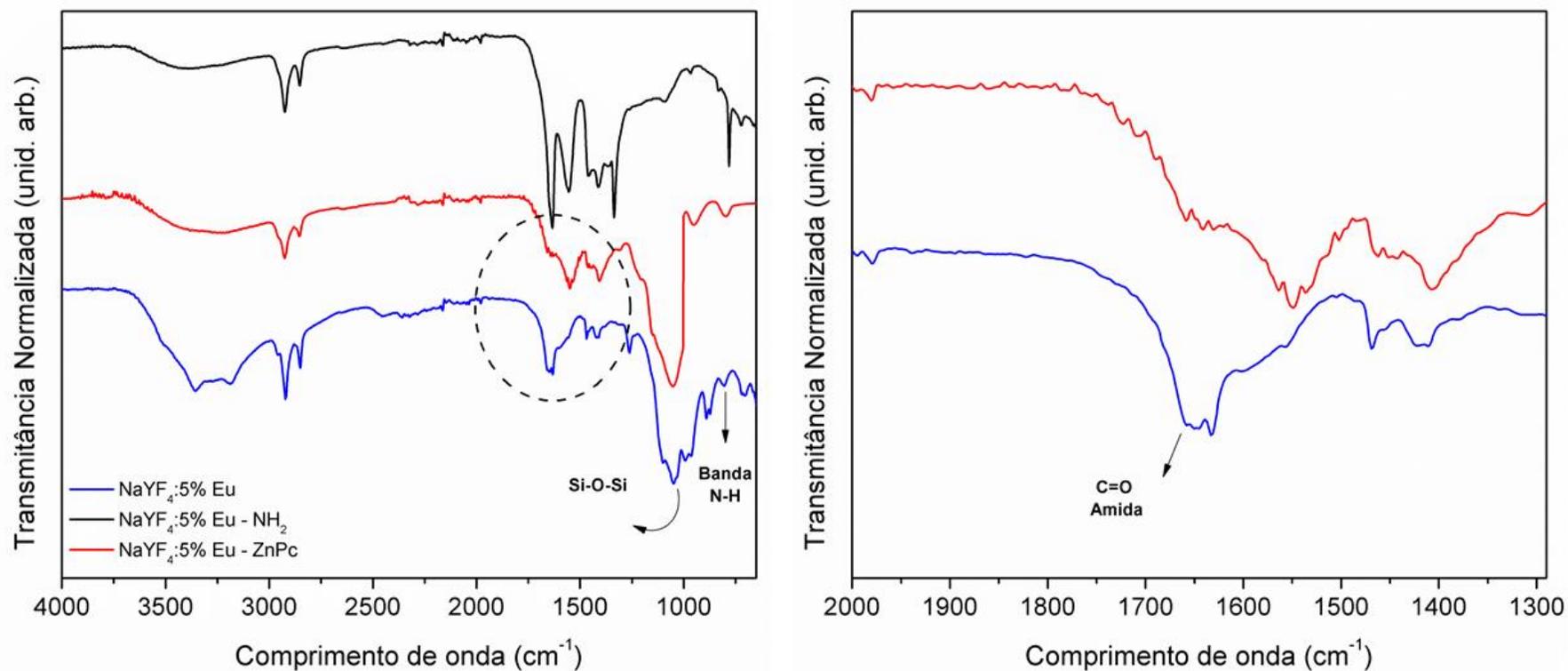
A última nanopartícula conjugada obtida neste trabalho foi o NaYF₄:5% Eu-BODIPY NCS / Tyr3, que foi sintetizado utilizando a combinação entre os procedimentos de conjugação do NaYF₄:5% Eu-BODIPY NCS e NaYF₄:5% Eu-Tyr3. Um diagrama esquemático da metodologia empregada é mostrado na Figura S6. Uma análise do composto obtido foi realizada utilizando FT-IR (Figura 26). Ao comparar NaYF₄:5% Eu-NH₂ (Figura 26; linha vermelha) e NaYF₄:5% Eu-BODIPY NCS / Tyr3 (Figura 26; linha azul), observamos a ausência do sinal referente ao estiramento -N = C = S, indicando que não há BODIPY NCS livre nas partículas sintetizadas. Além disso, observamos a presença do estiramento C = O referente a presença de grupos amida, indicando que um resíduo de tirosina integra o material final (PAVIA et al., 2009).

Figura 24: Espectros de infravermelho para os compostos $\text{NaYF}_4:5\% \text{Eu}$ (linha preta) e $\text{NaYF}_4:5\% \text{Eu} - \text{NH}_2$ (linha vermelha), BODIPY NCS (linha azul) e $\text{NaYF}_4:5\% \text{Eu} - \text{BODIPY NCS}$ (linha rosa).



Fonte: Fornecida pelo autor.

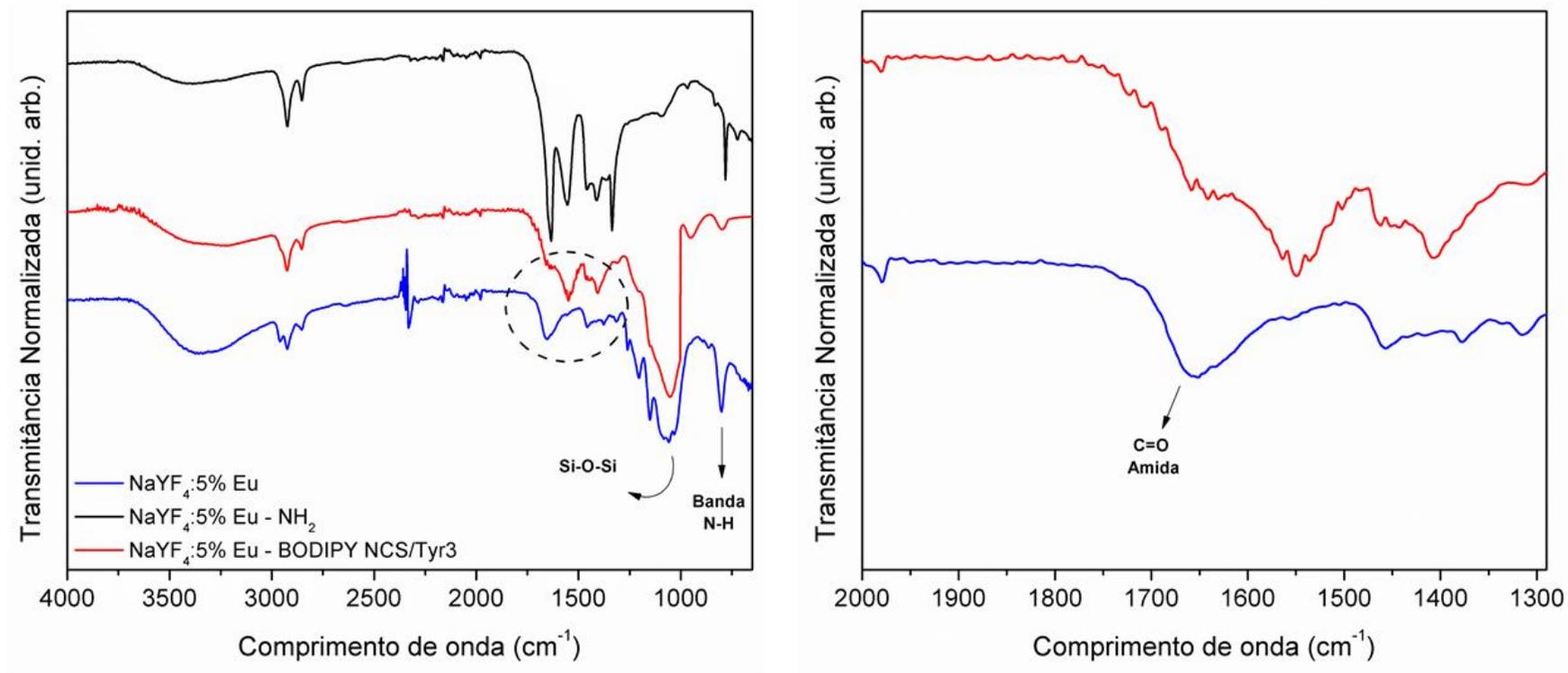
Figura 25: Espectros de infravermelho para os compostos $\text{NaYF}_4:5\% \text{Eu}$ (linha preta) e $\text{NaYF}_4:5\% \text{Eu} - \text{NH}_2$ (linha vermelha) e $\text{NaYF}_4:5\% \text{Eu} - \text{ZnPc}$ (linha azul).



Fonte: Fornecida pelo autor.

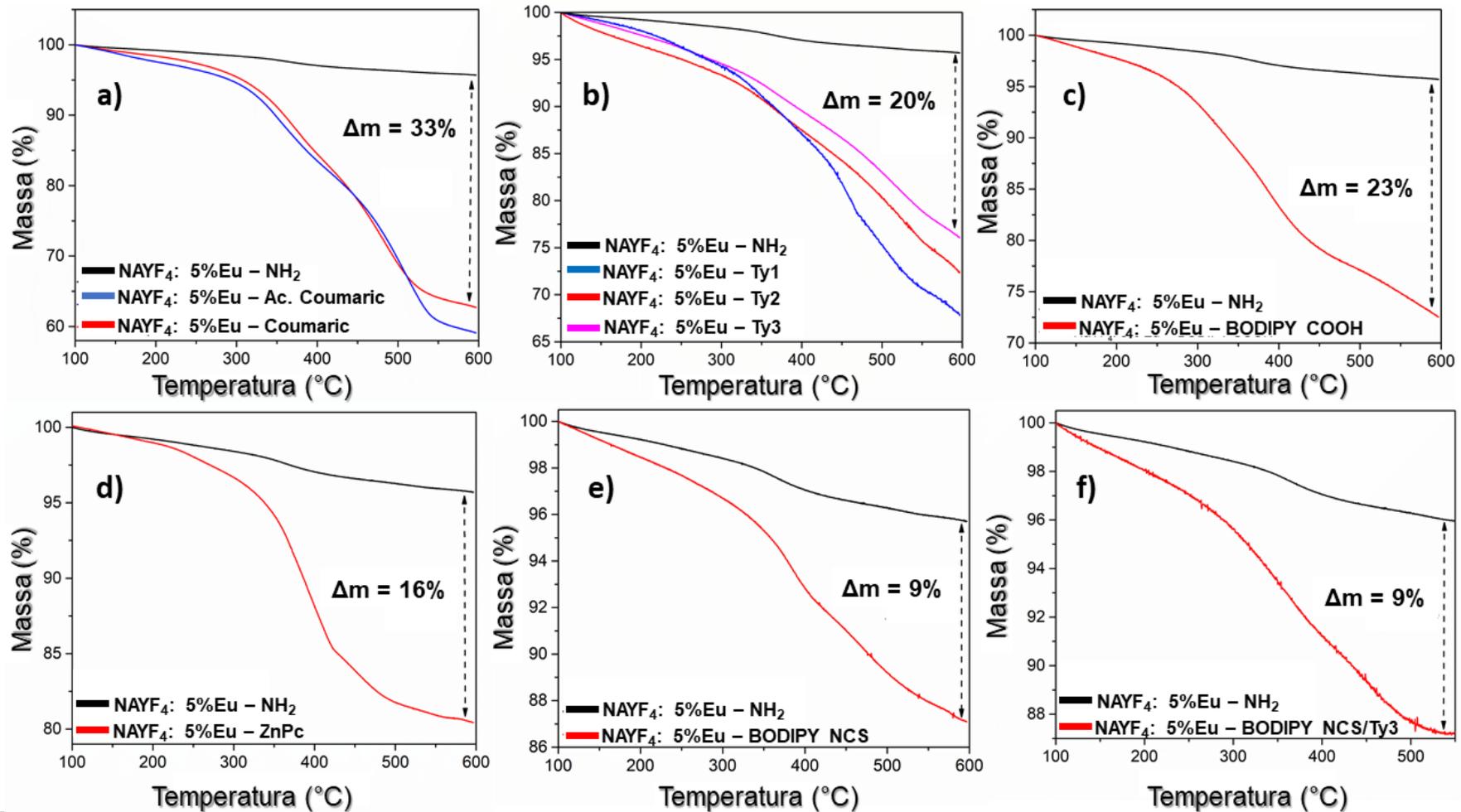
A quantificação do resíduo orgânico conjugadas nas nanopartículas foi estimada por meio de análise termogravimétrica (TGA). O protocolo de avaliação foi baseado na diferença entre a porcentagem da massa residual (Δ Resíduo) entre o $\text{NaYF}_4:5\% \text{ Eu-NH}_2$ e as partículas conjugadas (Figura 27). As partículas sintetizadas com derivados do Ácido p-Cumárico apresentam 59% de massa residual para $\text{NaYF}_4:5\% \text{ Eu-Ac. Coumaric}$ e 63% para $\text{NaYF}_4:5\% \text{ Eu-Coumaric}$. A análise da diferença para $\text{NaYF}_4:5\% \text{ Eu-Coumaric}$ resultou em um Δ Resíduo = 33% (Figura 27a). Por outro lado a mesma análise realizada para partículas conjugadas com tirosina são observados valores iguais a 68%, 73% e 78% para $\text{NaYF}_4:5\% \text{ Eu-Tyr1}$, $\text{NaYF}_4:5\% \text{ Eu-Tyr2}$ e $\text{NaYF}_4:5\% \text{ Eu-Tyr3}$, respectivamente. A partir da análise de TGA da partícula $\text{NaYF}_4: 5\% \text{ Eu-Tyr3}$, obtida após os três estágios de preparação, revela um Δ Resíduo = 20% referente ao composto orgânico em sua constituição, corroborando com a hipótese de sucesso no processo de conjugação (Figura 27b). Analogamente, os compostos $\text{NaYF}_4:5\% \text{ Eu-BODIPY COOH}$ (Figura 27c.), $\text{NaYF}_4:5\% \text{ Eu-BODIPY NCS}$ (Figura 27d), $\text{NaYF}_4:5\% \text{ Eu-ZnPc}$ (Figura 27e) e $\text{NaYF}_4:5\% \text{ Eu-BODIPY NCS/Tyr3}$ (Figura 27f) foram analisadas usando curvas TGA, apresentando Δ Resíduo = 23%, 16%, 9% e 9% respectivamente. Uma análise mais detalhada dos valores de Δ Resíduo revelou a relação entre a quantidade de compostos aromáticos conjugados e o tamanho de sua estrutura química. Observamos que estruturas menos volumosas, como o ácido p-Cumárico, possuem maior massa residual (Δ Resíduo = 33%) em relação aos demais compostos, como por exemplo o BODIPY NCS (Δ Resíduo = 9%). Acreditamos que o efeito estérico tenha influência significativa nas reações de conjugação e, conseqüentemente, no aumento ou diminuição da massa residual. Observamos também que os compostos com ZnPC (Δ Resíduo = 16%) e BODIPY COOH (Δ Resíduo = 23%) apresentam alta variação de massa residual em relação as demais partículas conjugadas, o que pode estar relacionado com o maior espaçamento entre a unidade base molecular e o grupo terminal -COOH participante da reação de acoplamento, favorecendo assim as reações de conjugação.

Figura 26: Espectros de infravermelho para os compostos $\text{NaYF}_4:5\% \text{Eu}$ (linha preta) e $\text{NaYF}_4:5\% \text{Eu} - \text{NH}_2$ (linha vermelha) e $\text{NaYF}_4:5\% \text{Eu} - \text{BODIPY NCS/Tyr3}$ (linha azul).



Fonte: Fornecida pelo autor.

Figura 27: Análise termogravimétrica para cada etapa de obtenção das nanopartículas conjugadas produzidas a partir dos derivados de a) ácido p-Cumárico, b) Tirosina, c) BODIPY COOH, d) ZnPc, e) BODIPY NCS e d) BODIPY NCS/Tyr3.



v

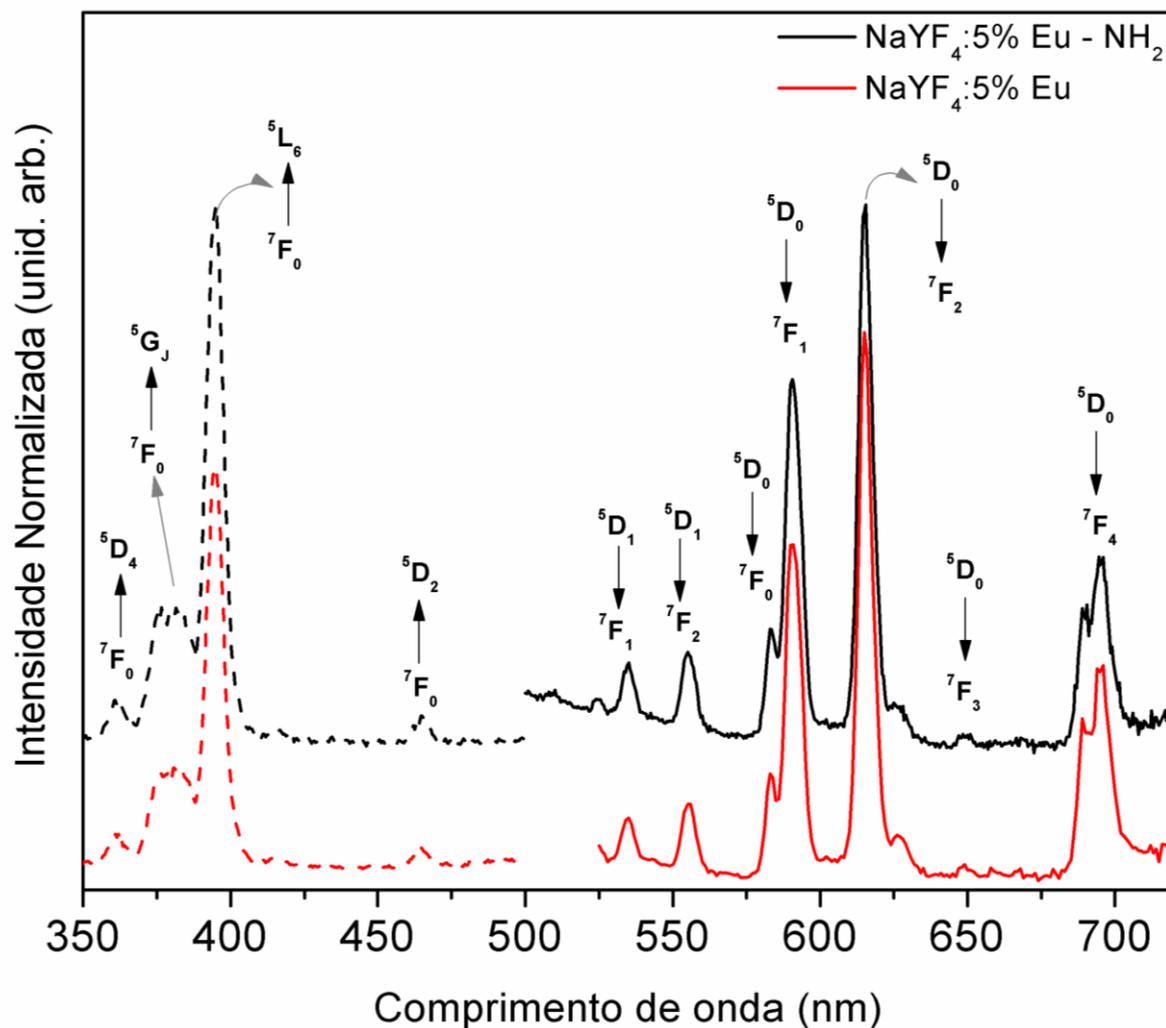
Fonte: Fornecida pelo autor.

5.1.1.3 ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DO SISTEMA CONJUGADO

A fotoluminescência dos compostos β -NaYF₄:5%Eu e β -NaYF₄:5%Eu-NH₂ foram analisadas por intermédio dos seu espectros de excitação ($\lambda_{em} = 615$ nm) e emissão ($\lambda_{ex} = 395$ nm) como mostrado na Figura 28. De forma geral, podemos observar que os espectros de excitação e emissão para os compostos NaYF₄:5%Eu (Figura 28; linha vermelha) e NaYF₄:5%Eu-NH₂ (Figura 28; linha preta) apresentam mesmo perfil espectral, indicando que a funcionalização com grupos -NH₂ não produz grandes modificações em suas propriedades ópticas. Uma análise mais detalhada mostra que ambos os espectros de excitação dos compostos apresentam linhas finas referentes às transições do íon Eu³⁺: $^5D_{2,4}$, 5L_6 e $^5G_J \leftarrow ^7F_0$ para a configuração 4f⁶ do Eu³⁺ situadas na região entre 350-550 nm (BINNEMANS, 2015). Os espectros de emissão revelam as transições referentes a relaxação do nível emissor 5D_0 do Eu³⁺ para os níveis de mais baixa energia 7F_J (J = 0, 1, 2, 3 e 4). Adicionalmente, os espectros revelam a presença da transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$ o que indica a restrição da simetria pontual entorno do íon para as representações C_n, C_{nv} e C_s.

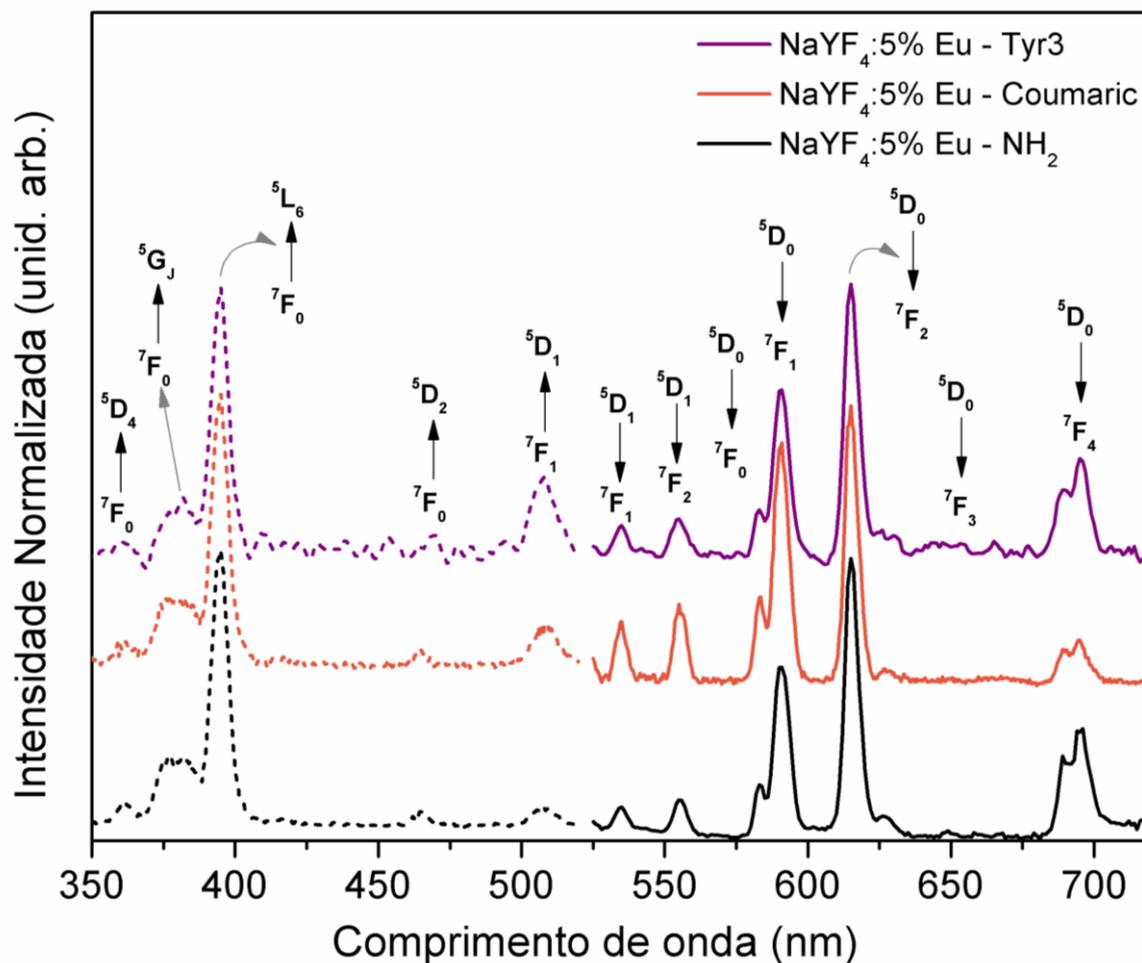
As propriedades ópticas dos compostos conjugados também foram analisadas usando espectros de excitação e emissão. Os primeiros resultados apresentados referem-se com a comparação entre a fotoluminescência do NaYF₄:5% Eu-NH₂ (Figura 29; linha preta), NaYF₄:5% Eu-Coumaric (Figura 29; linha laranja) e NaYF₄:5% Eu-Tyr3 (Figura 29; linha violeta), para isto, os espectros de excitação foram obtidos utilizando $\lambda_{Em} = 615$ nm (Figura 29; linhas pontilhadas). Observamos que os compostos apresentaram as transições $f-f$ $^5D_{1,2,4}$, 5L_6 e $^5G_J \leftarrow ^7F_0$ características para o íon Eu³⁺ compreendidos na região de 350-525nm. Os espectros de emissão para o NaYF₄:5% Eu-NH₂ (Figura 25; linha cheia preta), NaYF₄:5% Eu-Cumaric (Figura 29; linha cheia laranja) e NaYF₄:5% Eu-Tyr3 (Figura 29; linha cheia violeta) também foram obtidos pela excitação da transição $^5L_6 \leftarrow ^7F_0$ ($\lambda_{Ex} = 395$ nm). Os dados apresentados para os espectros de emissão revelam as transições $^5D_1 \rightarrow ^7F_{1,2}$, $^5D_0 \rightarrow ^7F_J$ (onde, J = 0, 1, 2, 3 e 4) que são típicas para o íon europium trivalente. Dentre estas a transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ apresenta-se com maior intensidade no espectro, bem como é a principal responsável pela característica emissão de cor vermelha do material. É importante notar que tanto os espectros de excitação quanto de emissão apresentam perfis espectrais com fortes semelhanças entre suas posições e intensidades relativa entre suas linhas, indicando que a conjugação entre as nanopartículas NaYF₄:5% Eu-NH₂ e o Ácido p-Coumárico ou Tirosina não promovem alterações nas propriedades ópticas originais das partículas.

Figura 28: Espectros de excitação ($\lambda_{EM} = 615 \text{ nm}$; linha pontilhada) e emissão ($\lambda_{EX} = 395 \text{ nm}$; linha cheia) para os compostos $\beta\text{-NaYF}_4:5\%\text{Eu}$ (linha vermelha) e $\beta\text{-NaYF}_4:5\%\text{Eu} - \text{NH}_2$ (linha preta) obtidos a temperatura ambiente na forma de suspensão de partículas em PBS (pH = 7,4; Concentração $100 \mu\text{g/mL}$).



Fonte: Fornecida pelo próprio autor.

Figura 29: Espectros de excitação ($\lambda_{EM} = 615$ nm; linha pontilhada) e emissão ($\lambda_{EX} = 395$ nm; linha cheia) para os compostos β -NaYF₄:5%Eu - NH₂ (linha preta), β -NaYF₄:5%Eu - Coumaric (linha laranja) e β -NaYF₄:5%Eu - Tyr3 obtidos a temperatura ambiente na forma de suspensão de partículas em PBS (pH = 7,4; Concentração 100 μ g/mL).

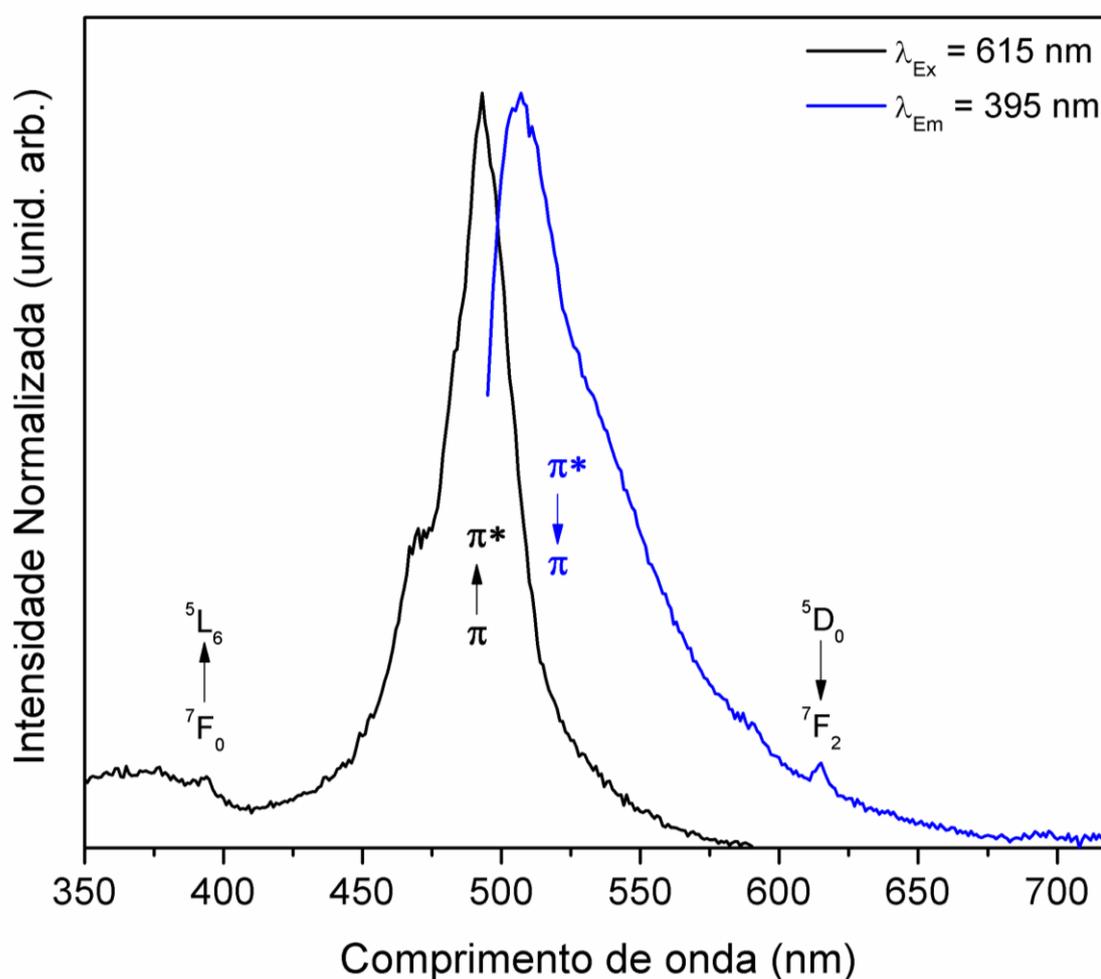


Fonte: Fornecida pelo próprio autor.

As propriedades fotoluminescentes dos compostos NaYF₄:5% Eu-BODIPY COOH (Figura 30), NaYF₄:5% Eu-BODIPY NCS (Figura 31), NaYF₄:5% Eu-ZnPc (Figura 32) e NaYF₄: 5 % Eu-BODIPY NCS / Tyr3 (Figura 33) também foram analisadas. O espectro de excitação do composto NaYF₄: 5% Eu - BODIPY COOH foi obtido monitorando o comprimento de onda $\lambda_{Em} = 615$ nm, onde apresentara-se duas bandas largas na região entre 350-580 nm com um máximos centrados em 370 nm e 493 nm, referindo-se a transições $\pi^* \leftarrow \pi$ do BODIPY COOH conjugado à partícula. Também foi possível observar a transição $^5L_6 \leftarrow ^7F_0$ centrada em 395 nm, indicando a presença de uma das transições do íon Eu³⁺, ocorrendo com menor intensidade no material sintetizado (Figura 30; linha preta). O espectro de emissão

para o NaYF₄:5% Eu-BODIPY COOH, obtido usando $\lambda_{\text{EX}} = 395$ nm, mostrou uma banda larga na região entre 500-700 nm indicando o relaxamento do estado excitado para o estado fundamental $\pi^* \rightarrow \pi$, onde o seu máximo encontra-se centrado em 508 nm. Além disso, a transição $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ foi observada em seu espectro de emissão, com menor intensidade quando comparado a sua emissão oriunda da parte orgânica (Figura 30, linha azul).

Figura 30: Espectros de excitação ($\lambda_{\text{EM}} = 615$ nm; linha preta) e emissão ($\lambda_{\text{EX}} = 395$ nm; linha azul) para o composto β -NaYF₄:5%Eu – BODIPY COOH obtidos a temperatura ambiente na forma de suspensão de partículas em PBS (pH 7,4; Concentração 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).



Fonte: Fornecida pelo autor.

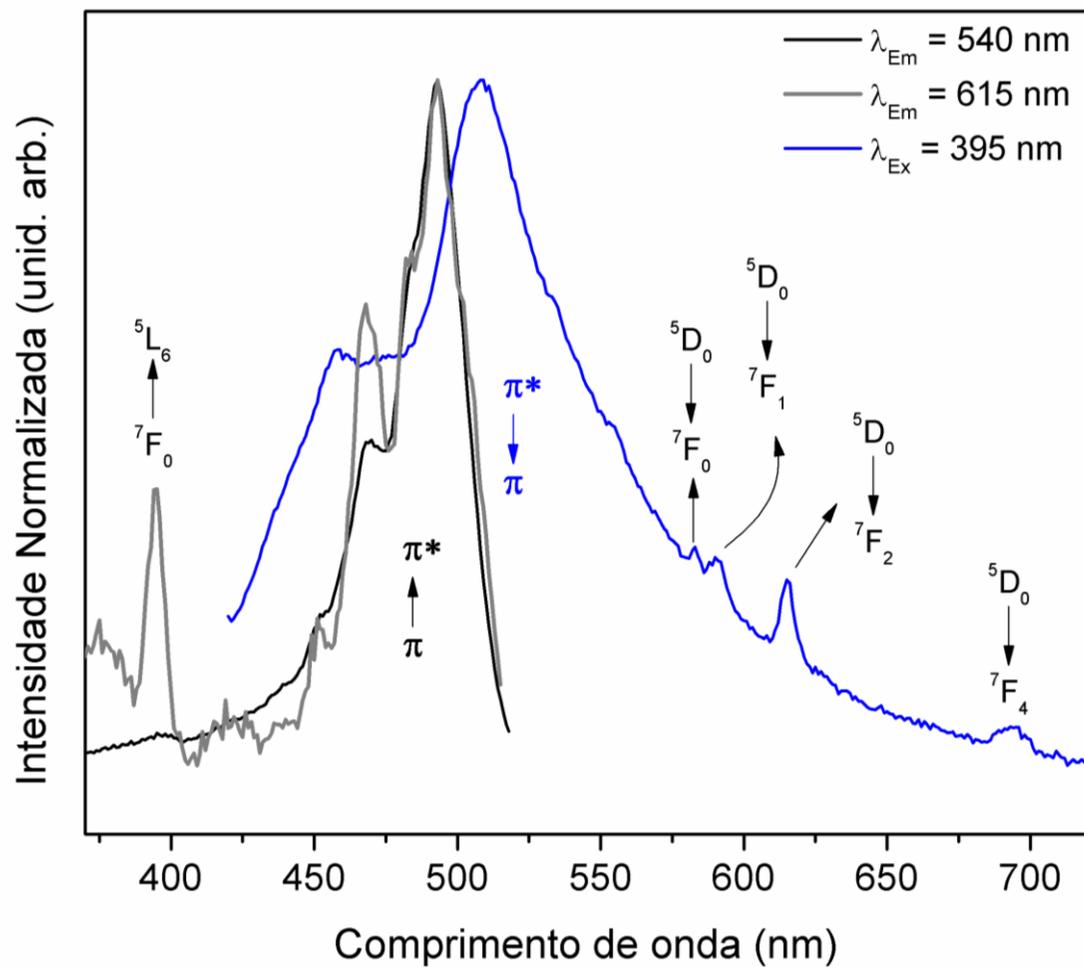
A investigação espectroscópica do composto NaYF₄:5% Eu-BODIPY NCS também foi estudada como mostrado na Figura 31. O espectro de excitação para o composto foi obtido através do monitoramento do comprimento de onda $\lambda_{\text{Em}} = 615$ nm (Figura 31; linha cinza).

Podemos observar uma banda larga na região entre 325-575 nm com máximos localizados em 467 nm e 493 nm referente às transições $\pi^* \leftarrow \pi$ para o derivado derivado de BODIPY NCS conjugado as nanopartículas. Adicionalmente, é possível perceber também um sinal centrado em 395 nm referente à transição ${}^5L_6 \leftarrow {}^7F_0$ do íon Eu^{3+} . Além disso, obtivemos o espectro de excitação monitorando o comprimento de onda igual a $\lambda_{\text{Em}} = 540$ nm (Figura 31; linha preta), que apresentou espectro semelhante ao obtido anteriormente, com exceção da transição ${}^5L_6 \leftarrow {}^7F_0$ que agora é percebida sugerindo que o composto orgânico adicionado não deve contribuir com processos de transferência de energia para o íon lantanídeo. O espectro de emissão do $\text{NaYF}_4:5\% \text{Eu} - \text{BODIPY NCS}$ foi obtido utilizando o comprimento de onda $\lambda_{\text{Ex}} = 395$ nm (Figura 31; linha azul) o qual apresenta as transições ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_J$ (onde, $J = 0, 1, 2, \text{ e } 4$) referente as linhas de emissão típica para o íon europium trivalente na região entre 425-720 nm. Observamos também nesta região a presença de uma banda larga com um máximo centrado em 507 nm, resultante do relaxamento ${}^*\pi \rightarrow \pi$ proveniente do composto orgânico conjugado.

As propriedades ópticas do $\text{NaYF}_4:5\% \text{Eu-ZnPc}$ também foram avaliadas como mostrado na Figura 32. O espectro de excitação do composto foi obtido monitorando o comprimento de onda $\lambda_{\text{Em}} = 658$ nm, onde é revelado um sinal centrado a 414 nm no espectro, representando a transição $\pi^* \leftarrow \pi$ da parte orgânica do composto conjugado (Figura 32; linha preta). O espectro de emissão utilizando $\lambda_{\text{Ex}} = 395$ nm (Figura 32; linha azul) apresentou dois sinais intensos com máximos a 455 nm e 658 nm relativos ao relaxamento para o estado fundamental $\pi^* \rightarrow \pi$ oriunda dos derivados do ZnPc no composto conjugado final. Além disso, o composto exibiu linhas de emissão do íon Eu^{3+} , com mais baixa intensidade, relacionada as transições ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_{0-4}$ do íon Eu^{3+} para a partícula $\text{NaYF}_4:5\% \text{Eu-ZnPc}$.

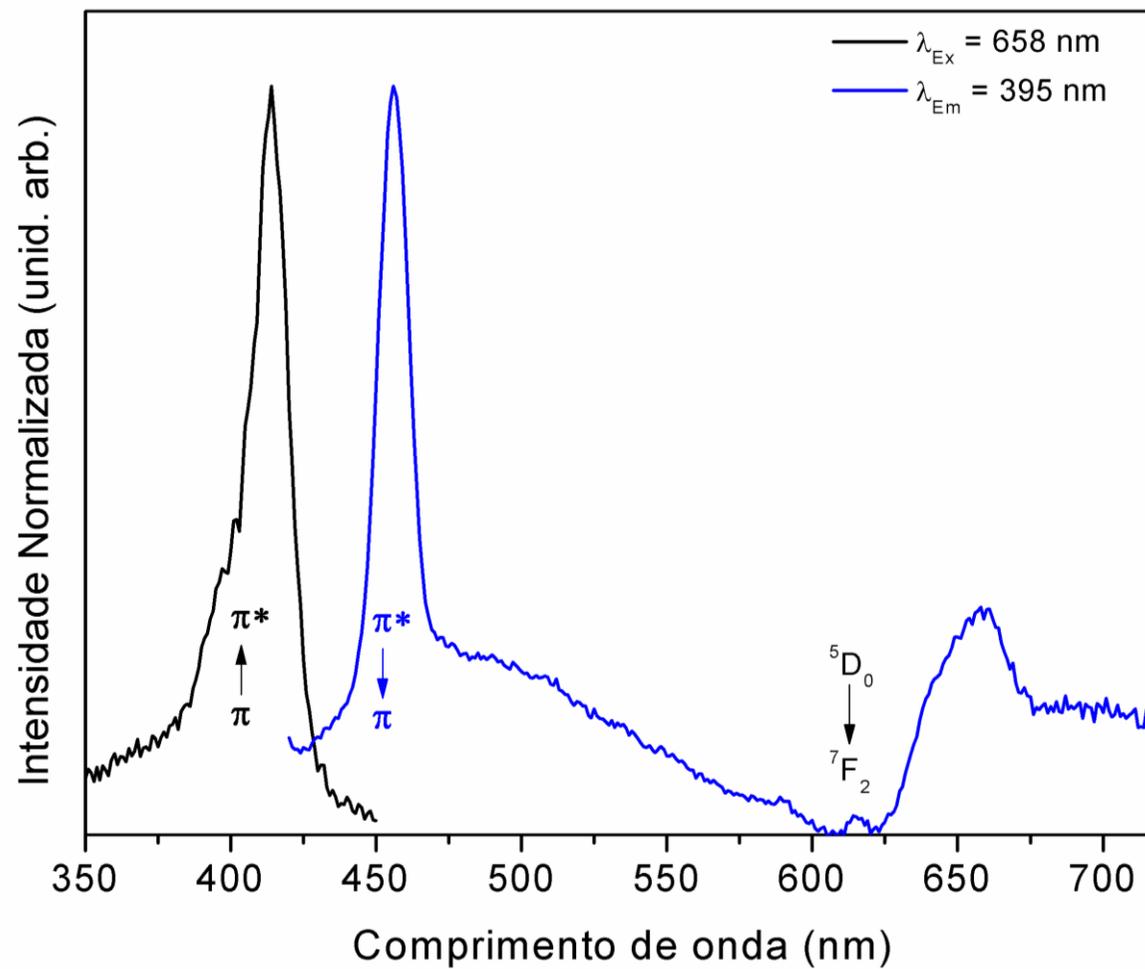
O comportamento fotofísico do composto $\text{NaYF}_4:5\% \text{Eu-BODIPY NCS} / \text{Tyr3}$ também foi analisado, como mostrado na Figura 33. Para este material observa-se um sinal centrado em 395 nm referente a transição ${}^5L_6 \leftarrow {}^7F_0$ do íon Eu^{3+} no seu espectro de excitação ($\lambda_{\text{Em}} = 615$ nm; linha preta). O espectro de emissão obtido usando $\lambda_{\text{Ex}} = 395$ nm, mostrou uma banda larga na região de 525-675 nm em relacionado ao composto orgânico conjugado BODIPY NCS. Observamos também as transições $f-f$ para o íon Eu^{3+} ${}^5D_1 \rightarrow {}^7F_{1,2}$ e ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ (onde, $J = 0, 1, 2, 3 \text{ e } 4$), como mostrado na Figura 33 (linha azul).

Figura 31: Espectros de excitação ($\lambda_{EM} = 615$ nm; linha preta e $\lambda_{EM} = 540$ nm; linha cinza) e emissão ($\lambda_{EX} = 395$ nm; linha azul) para o composto β -NaYF₄:5%Eu – BODIPY NCS obtidos a temperatura ambiente na forma de suspensão de partículas em PBS (pH 7,4; Concentração 100 μ g/mL).



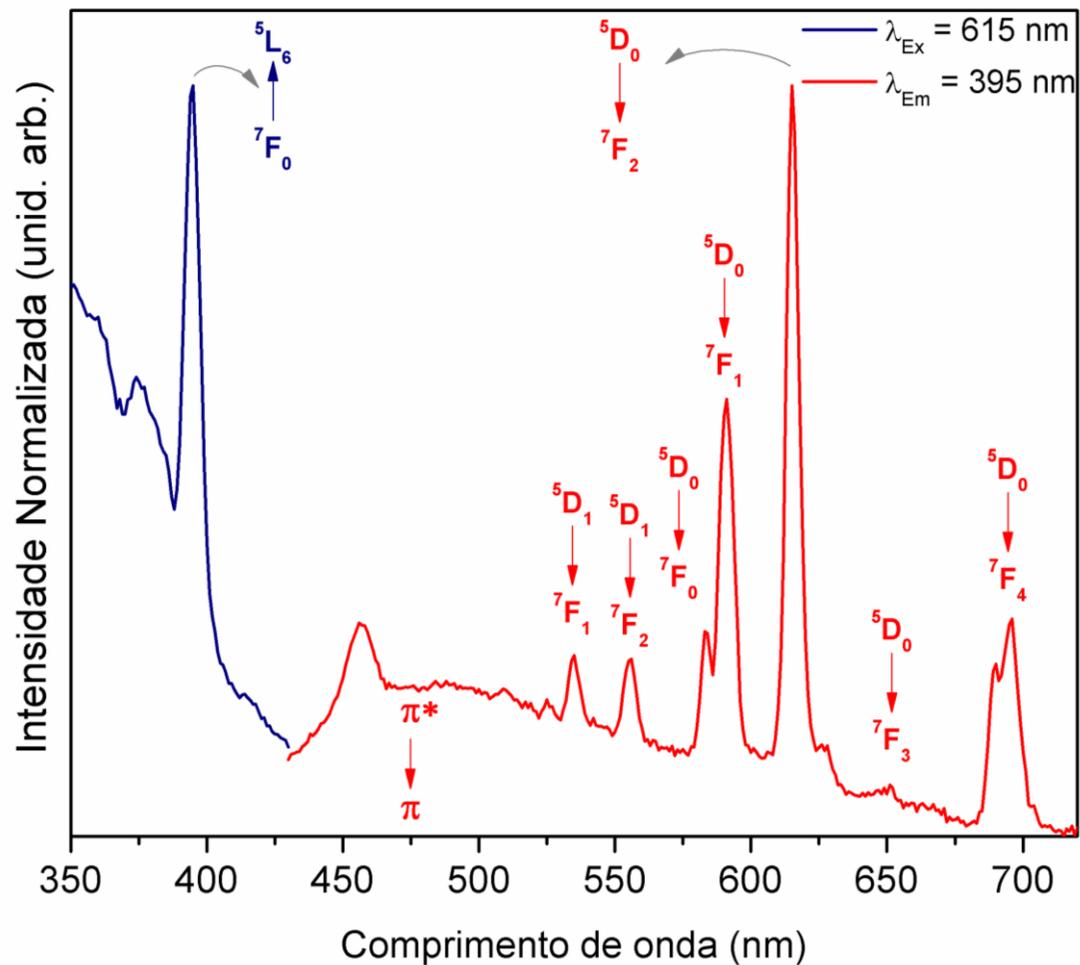
Fonte: Fornecida pelo autor.

Figura 32: Espectros de excitação ($\lambda_{EM} = 658 \text{ nm}$; linha preta) e emissão ($\lambda_{EX} = 395 \text{ nm}$; linha azul) para o composto $\beta\text{-NaYF}_4\text{:5\%Eu - ZnPc}$ obtidos a temperatura ambiente na forma de suspensão de partículas em PBS (pH 7,4; Concentração $100 \mu\text{g/mL}$).



Fonte: Fornecida pelo autor.

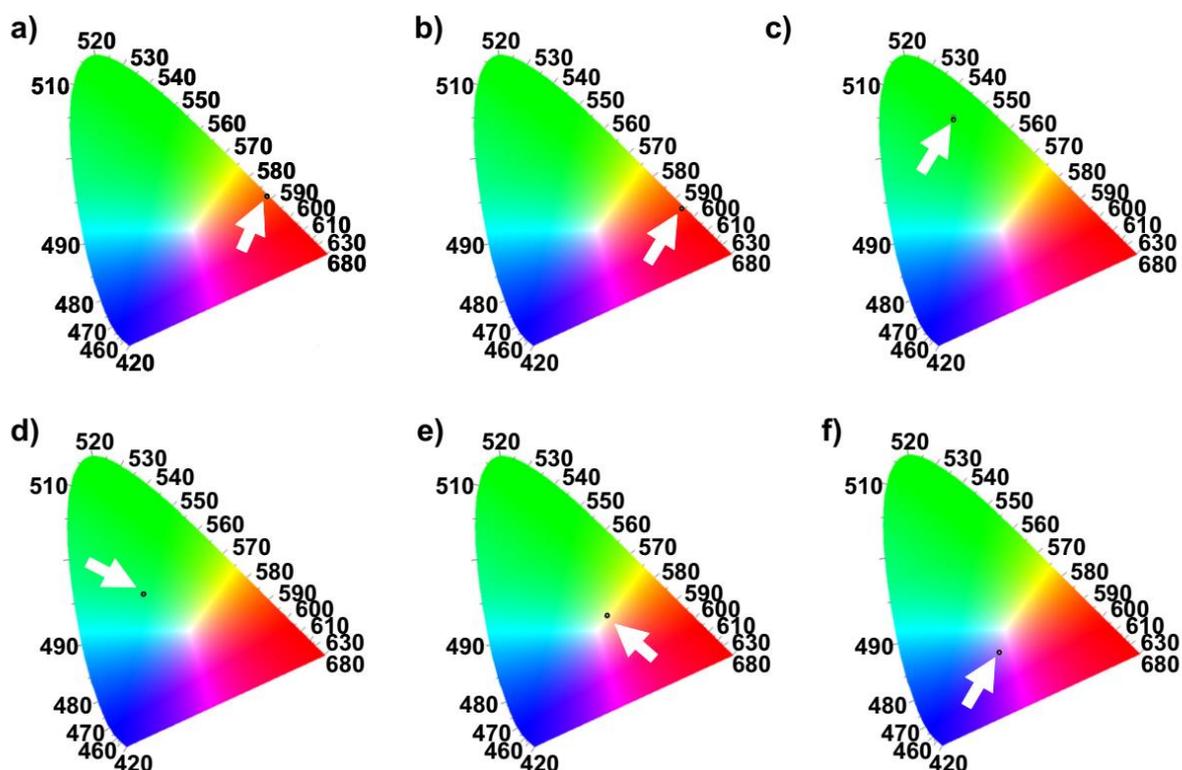
Figura 33: Espectros de excitação ($\lambda_{EM} = 615$ nm; linha preta e $\lambda_{EM} = 540$ nm; linha azul) e emissão ($\lambda_{EX} = 395$ nm; linha vermelha) para o composto β -NaYF₄:5%Eu – BODIPY NCS/Tyr3 obtidos a temperatura ambiente na forma de suspensão de partículas em PBS (pH 7,4; Concentração 100 μ g/mL).



Fonte: Fornecida pelo autor.

O diagrama CIE (Comission Internationale de L'clairage [International Commission on Illumination]) é um sistema de 2 coordenadas usado para representar a cor percebida pelo olho humano a partir de dados espectroscópicos (SMITH; GUILD, 1931). No caso dos espectros de emissão apresentados nas Figuras 28-33, os dados podem ser traduzidos em coordenadas de cores em um diagrama de cromaticidade CIE. Como mostrado na Figuras 34a-f, os diagramas de cromaticidade para os biomarcadores luminescentes exibiram uma cor de emissão diferente após irradiação com luz ultravioleta.

Figura 34: Representação do diagrama de cromaticidade para as nanopartículas conjugadas a) NaYF₄:5% Eu - Coumaric, b) NaYF₄:5% Eu - Tyr3, c) NaYF₄:5% Eu - BODIPY COOH, d) NaYF₄:5% Eu - BODIPY NCS, e) NaYF₄:5% Eu - BODIPY NCS/Tyr3 e e) NaYF₄:5% Eu - ZnPc obtido pelo software Spectra Lux 2.0.



Fonte: Fornecida pelo autor.

A análise do diagrama de cromaticidade da CIE revelou para NaYF₄:5% Eu-Coumaric uma cor vermelha e coordenada igual a (0,559; 0,430), NaYF₄: 5% Eu-Tyr3 uma cor vermelha e coordenada igual a (0,591; 0,596), NaYF₄: 5% Eu-BODIPY COOH uma cor verde e

coordenada igual a (0,214; 0,653), NaYF₄: 5% Eu-BODIPY NCS uma cor verde e coordenada igual a (0,218; 0,436), NaYF₄: 5% Eu-BODIPY NCS / Tyr3 uma cor branca e coordenada igual a (0,377; 0,375) e NaYF₄: 5% Eu-ZnPc uma cor rosa e coordenada igual a (0,334; 0,267). Estes resultados indicam que a adição de compostos cromóforos orgânicos, além de ampliar a faixa de emissão de luz no espectro, modificou a cor resultante das nanopartículas conjugadas, possibilitando o ajuste da cor para a utilização desejada.

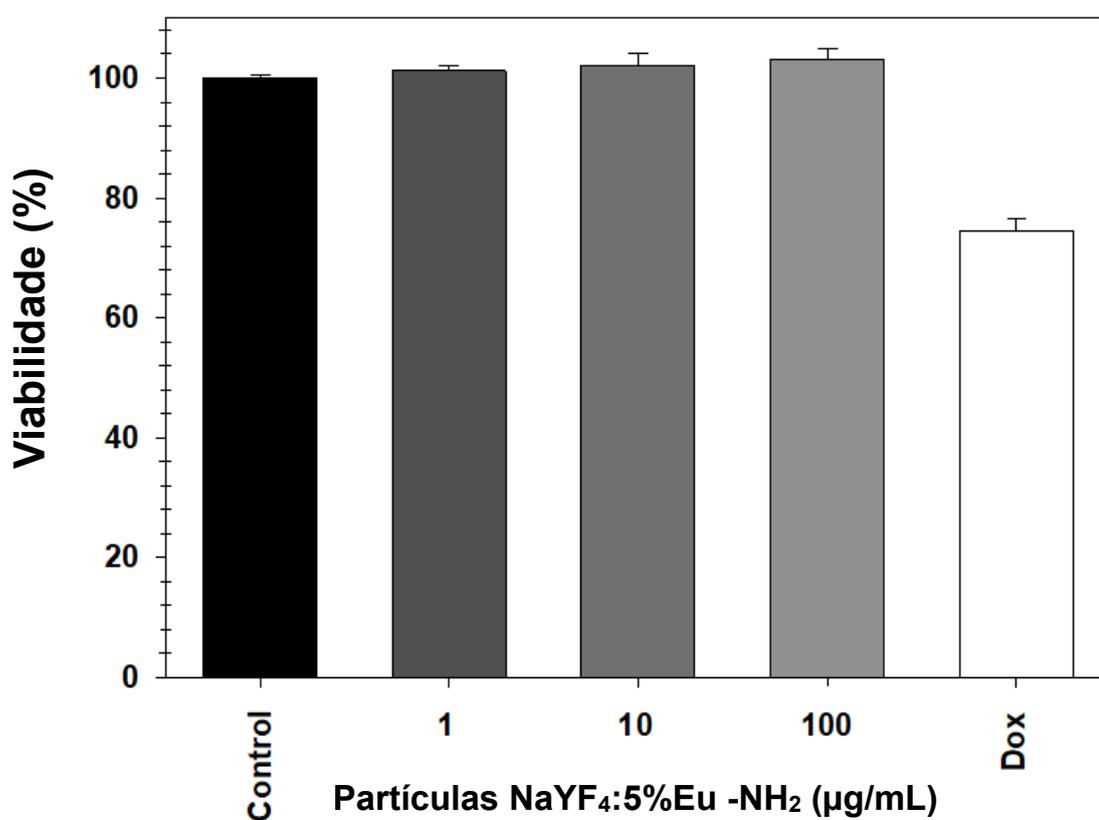
5.1.1.4 ANÁLISE DA ABSORÇÃO DOS BIOMARCADORES LUMINESCENTES POR CÉLULAS HT-29 VIA MICROSCOPIA CONFOCAL

A propriedade de biomarcação para as nanopartículas conjugadas foi analisada por microscopia confocal através de ensaio *in vitro* utilizando células da linhagem HT-29. Em uma investigação preliminar, observamos que as partículas apresentaram boa interação celular durante o seu cultivo, além de não apresentarem indicação de alterações morfológicas das mesmas após 24 horas de incubação. Além disso, a citotoxicidade do NaYF₄:5% Eu-NH₂ foi testada em células HT-29 usando um ensaio XTT para avaliar a biocompatibilidade das partículas precursoras. Os ensaios realizados revelam que a viabilidade celular não foi significativamente afetada pelas nanopartículas nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL (Figura 35). Estes dados mostram resultados satisfatórios, indicando que o material pode servir como uma biomarcador luminescente promissor de baixa citotoxicidade. Da mesma forma, os compostos BODIPY's, ZnPc, Ácido p-Cumárico e Tirosina são amplamente relatados na literatura por apresentarem biocompatibilidade quando utilizados na forma de biomarcadores (BIZET et al., 2018; ESCOBEDO et al., 2010; LOUDET; BURGESS, 2007; NASKAR et al., 2016) ou como constituintes moleculares presentes nos alimentos (DZIEDZIC et al., 2018; PANDEY; RIZVI, 2009; SOOBRAATTEE et al., 2005), favorecendo a possibilidade de uso destes para a conjugação com as nanopartículas de NaYF₄: 5% Eu-NH₂.

Após o procedimento de exposição das nanopartículas conjugadas observa-se a excelente afinidade celular do sistema, representada pelo acúmulo de partículas luminescentes na superfície das células HT-29 (Figura 36). Entretanto, as imagens de microscopia obtidas para o NaYF₄: 5% Eu-NH₂ revelam que o composto não apresentaram boa afinidade celular em comparação aos demais partículas, mostrando que a etapa de modificações de superfície por grupos lipofílicos é importante para o melhoramento desta propriedade. Uma análise mais detalhada revela que mesmo com a diferença nas intensidades de luz detectada pelo

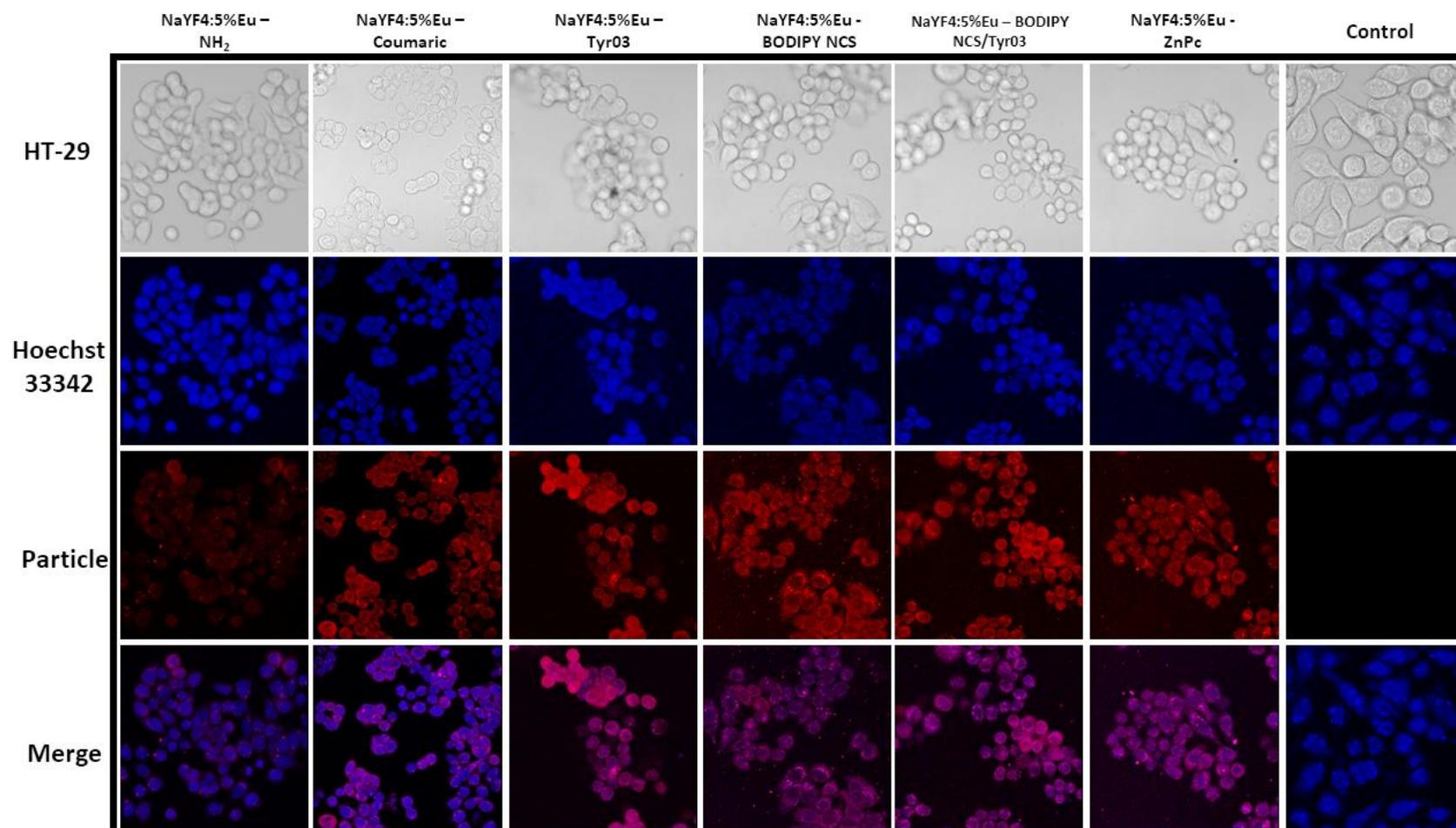
microscópio, todas as nanopartículas conjugadas apresentaram absorção celular com deposição a nível citoplasmático. Na literatura, é possível encontrar alguns outros marcadores particulados que mostram resultados semelhantes as imagens obtidas na interação partícula-citoplasma descrita neste trabalho, suportando mais fortemente os resultados apresentados (WOLFBEIS, 2015; YAN et al., 2015). Estes resultados são importantes na classificação dos nanopartículas conjugadas como promissores na composição de biomarcadores luminescentes alternativos

Figura 35: Viabilidade celular para NaYF₄:5% Eu-NH₂ após 48 h nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL, determinado por ensaio de XTT.



Fonte: Fornecida pe lo autor.

Figura 36: Imagens de microscopia confocal (lente ampliada de 63x) para NaYF₄:5%Eu - Coumaric, NaYF₄:5%Eu - Tyr3, NaYF₄:5%Eu - BODIPY COOH, NaYF₄:5%Eu - BODIPY NCS, NaYF₄:5%Eu - BODIPY NCS/Tyr3 e NaYF₄:5%Eu - ZnPc marcando células da linhagem HT-29; o núcleo celular é azul e os nanopartículas conjugadas são vermelhos (excitação e detecção a 395 e 500-700 nm, respectivamente) obtidos na concentração de 100 µg/mL em PBS (pH 7,4).



Fonte: Fornecida pelo autor.

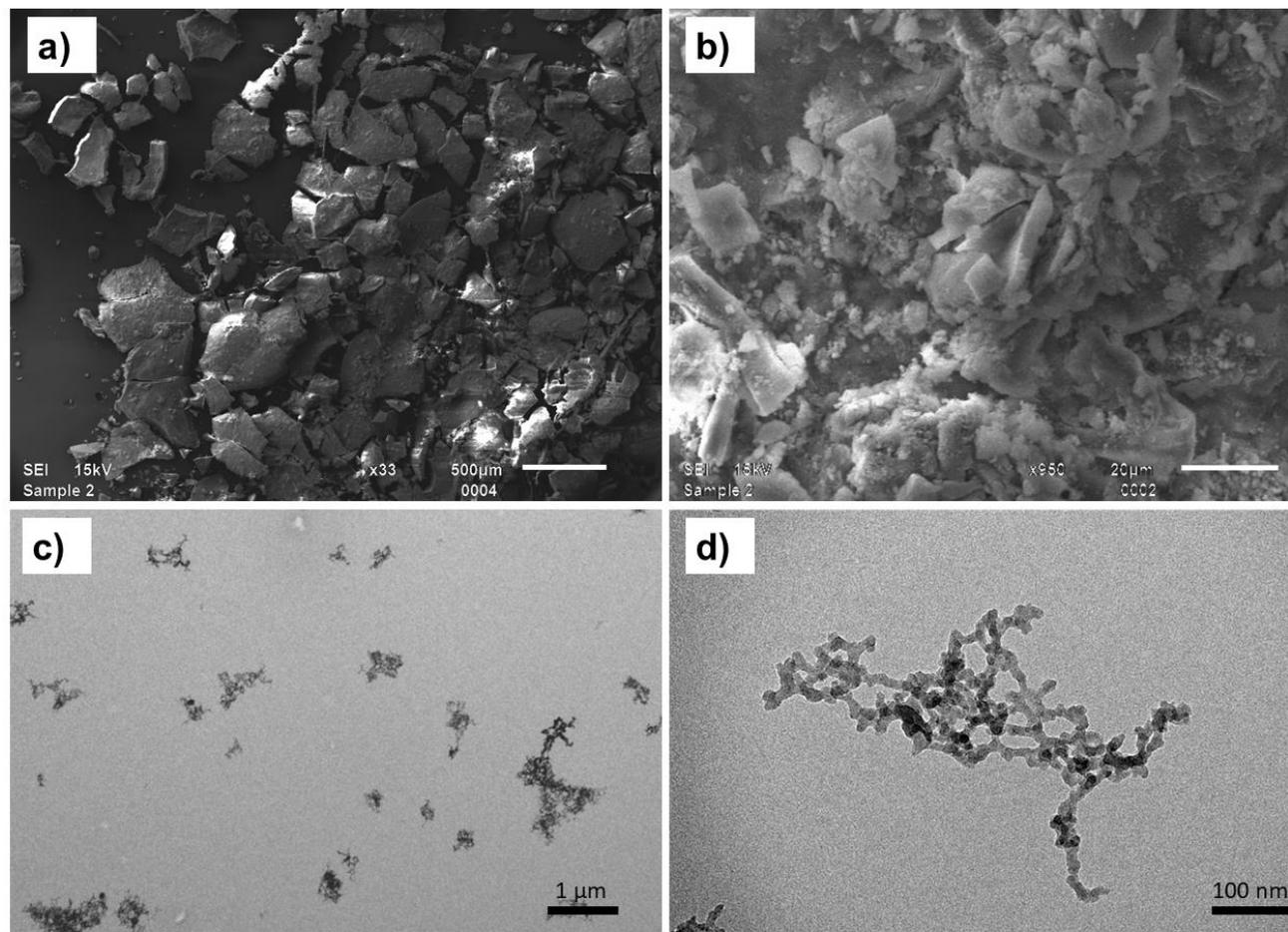
5.1.2 *BIOMARCADORES LUMINESCENTES À BASE DAS PARTÍCULAS HÍBRIDAS EuDPA \subset SiO₂-NH₂*

5.1.2.1 *ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS PARTÍCULAS HÍBRIDAS EuDPA À BASE DAS PARTÍCULAS HÍBRIDAS EuDPA \subset SiO₂-NH₂*

A microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e microscopia eletrônica de varredura (SEM) foram realizadas para as partículas de EuDPA \subset SiO₂-NH₂ sintetizadas, visando a elucidação das propriedades morfológicas do sistema. A análise de SEM (Figura 37a-b) revela a formação de pequenos blocos com geometria irregular. Os resultados de TEM (Figura 37c-d) mostraram que o composto EuDPA \subset SiO₂-NH₂ é formado por partículas organizadas em pequenas partículas, com tamanhos menores que 20 nm (estimado a partir da barra de escala do equipamento). Importante salientar que partículas possuem morfologia semelhante a trabalhos publicados na literatura que apresentaram bons resultados na composição de materiais utilizados como biomarcadores luminescente (AYGAR et al., 2015; SHAH, 2018; SHAH et al., 2017), o que fortalece a ideia de utilização do sistema apresentado neste trabalho.

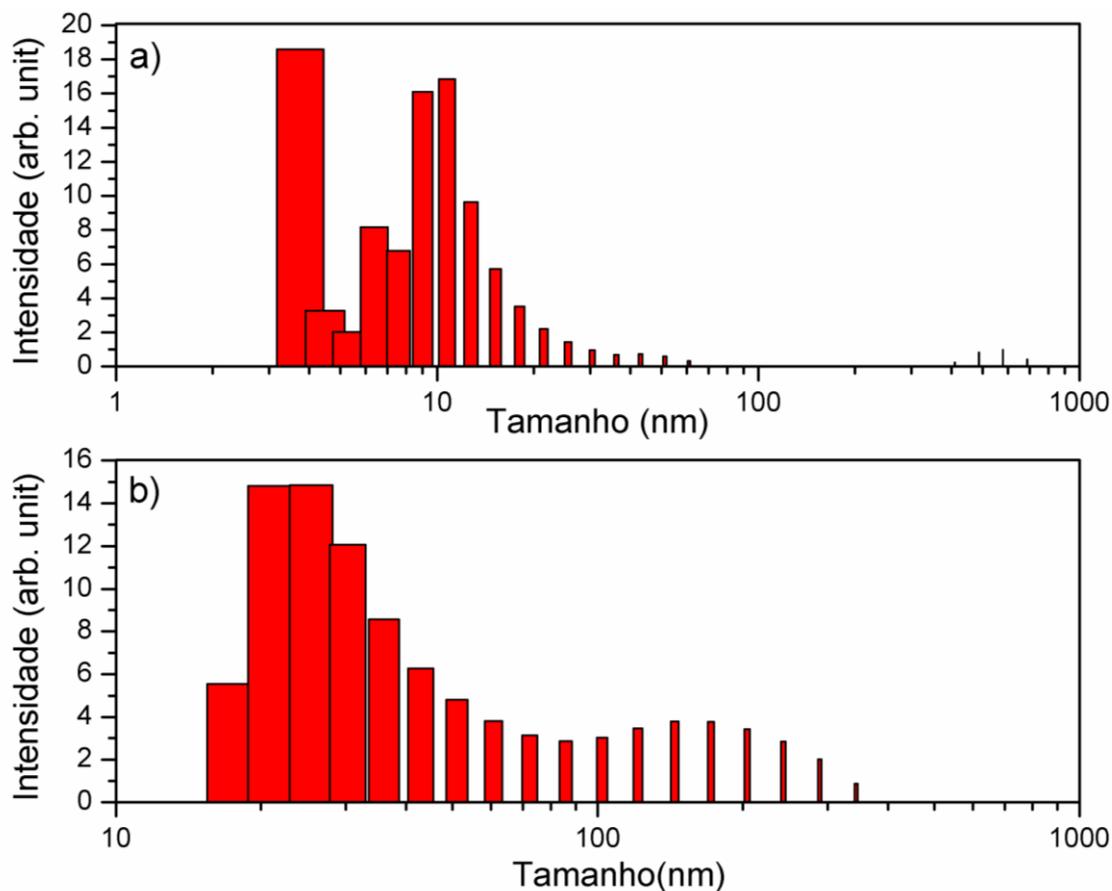
A análise de tamanho de partículas também foi realizada utilizando-se a técnica de DLS para as nanopartículas de sílicio sem EuDPA e para o composto EuDPA \subset SiO₂-NH₂, como mostrado nas Figura 38a e 38b respectivamente. A análise revela que as partículas de sílicio tem tamanho médio de partícula de 21,7 nm enquanto as partículas EuDPA \subset SiO₂-NH₂ apresenta valor igual a 63.3 nm, indicando que o composto se mantém em escala nanométrica e que a introdução do complexo no meio reacional favorece um aumento no tamanho das partículas

Figura 37: Imagens de (a-b) microscopia eletrônica de varredura e (c-d) microscopia eletrônica de transmissão obtidas para o material $\text{EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$.



Fonte: Fornecida pelo autor.

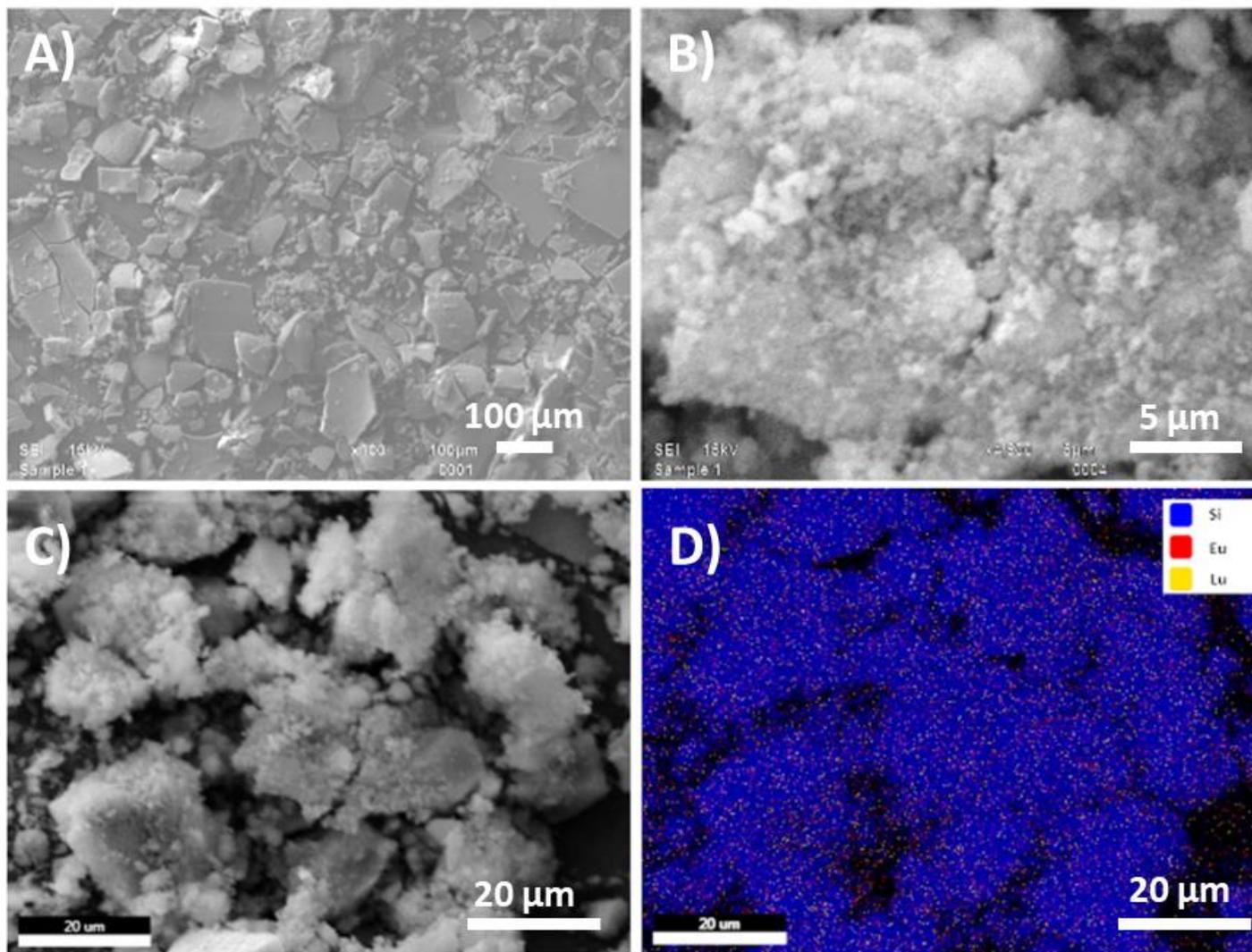
Figura 38: Histograma de distribuição de tamanho obtidos por DLS para as partículas a) SiO_2 e b) $\text{EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$.



Fonte: Fornecida pelo autor.

A fim de determinar se há ocupação preferencial do Lu^{3+} , projetando a preparação do radiofármaco $^{177}\text{Lu}\text{-EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$, as imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram analisada para o composto $\text{Lu}_{0.5}\text{-Eu}_{0.5}\text{DPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ (Figura 39a-c). Observamos que o composto apresenta morfologia semelhante a apresentada para o $\text{EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$, com a presença de pequenos blocos irregulares indicando que a introdução do íon Lutécio no material não atera a morfologia do material.

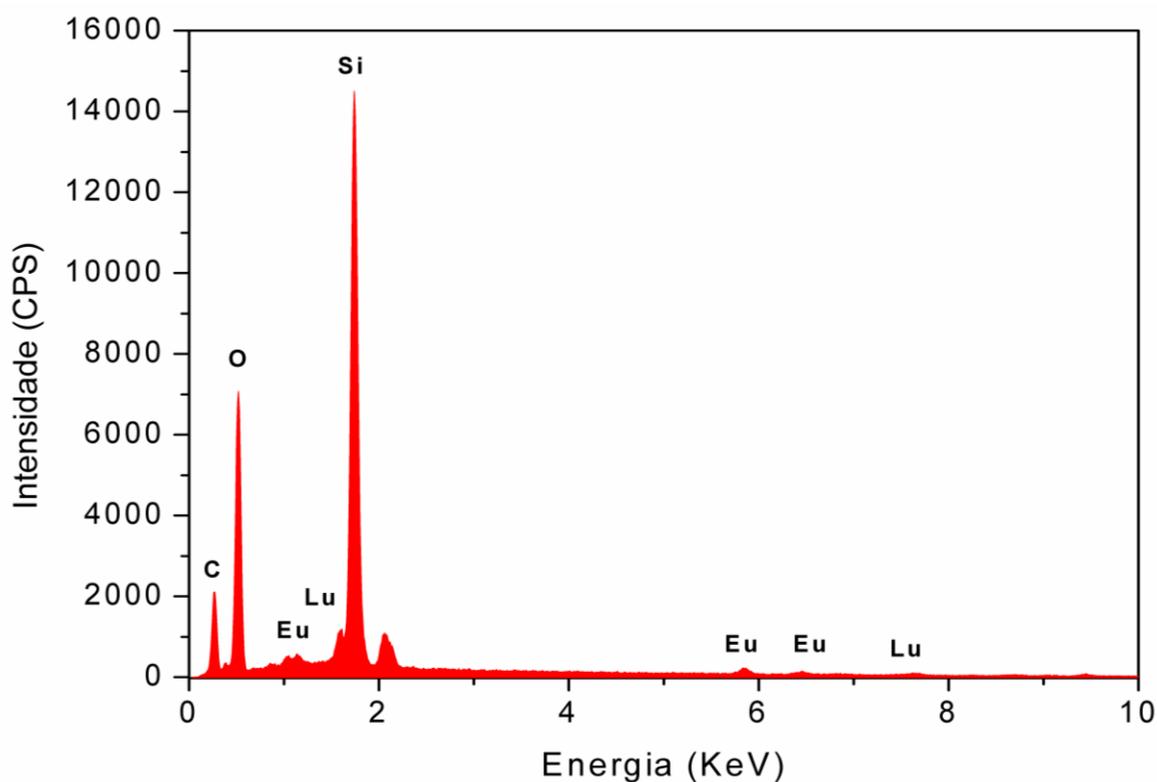
Figura 39: Imagens de (a-c) microscopia eletrônica de varredura e (d) Imagem de mapeamento obtidos por EDS para o material $\text{Lu}_{0,5}\text{-Eu}_{0,5}\text{DPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$.



Fonte: Fornecida pelo autor.

Também foi realizado o mapeamento do composto $\text{Lu}_{0,5}\text{-Eu}_{0,5}\text{DPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ por EDS (Figura 39d), a qual revelou que o material realmente é constituído em maior quantidade Si (13%) dentre os elementos inorgânicos presentes. Adicionalmente, observou-se que a porcentagem de Európio e Lutécio encontrados dentro do material é a mesma (0,4%), indicando que não há preferência na introdução dos íons metálicos na matriz de silício, além dos lantanídeos estarem distribuídos em toda a amostra de maneira uniforme. A identificação todos os elementos fica mais evidente pela análise do espectro de EDS, mostrado na Figura 40. A representação quantitativa das porcentagens de massa e porcentagem atômica para os elementos presentes na amostra são apresentados na Tabela 8.

Figura 40: Espectro de EDS para a amostra $\text{Lu}_{0,5}\text{-Eu}_{0,5}\text{DPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$



Fonte: Fornecida pelo autor.

Tabela 8: Análise quantitativa elementar com as porcentagens atômicas e de massas obtidas pelo EDS para o composto $\text{Lu}_{0,5}\text{-Eu}_{0,5}\text{DPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$

| Elemento (%) | Massa (%) | Atomica (%) | Erro (%) |
|--------------|-----------|-------------|----------|
| C K | 32,8 | 45,5 | 9,9 |
| O K | 38,9 | 40,5 | 8,7 |
| Si K | 22,0 | 13,2 | 3,2 |
| Eu L | 3,0 | 0,4 | 21,3 |
| Lu L | 3,3 | 0,4 | 36,6 |

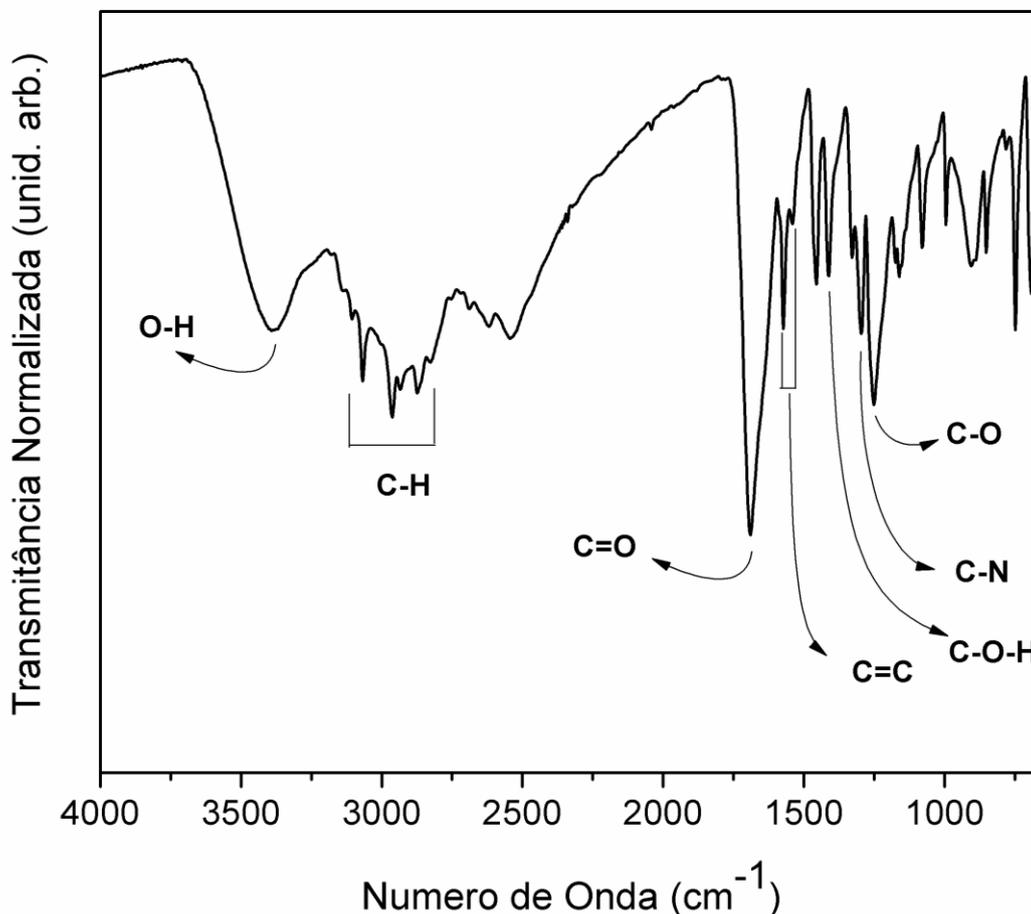
5.1.2.2 ANÁLISE QUÍMICA E COMPOSICIONAL DAS PARTÍCULAS HÍBRIDAS $\text{EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$

Para análise do composto $\text{EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ é necessário que se conheça com mais detalhes os principais grupos funcionais presentes no ácido dipcolínico (H_2DPA) e, para isto, o composto foi submetido a espectroscopia no infravermelho (FT-IR). O espectro da Figura 41 revela uma banda larga e de média intensidade na região de $3300\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$, referente ao estiramento O-H do ácido carboxílico localizado nos terminais do ligante (PAVIA et al., 2009). Também é possível identificar o sinal referente à carbonila (C=O) por uma banda única de perfil estreito e bastante pronunciada localizada em 1701 cm^{-1} (PAVIA et al., 2009). Ainda para a carbonila, observa-se o estiramento fora do plano C-O-H representado por um sinal de intensidade mediana centrado em 1419 cm^{-1} , além de um sinal em 939 cm^{-1} que está correlacionado com as ligações de hidrogênio intermoleculares presentes no sólido (PAVIA et al., 2009). Também é verificado o estiramento simétrico C-O com um sinal situado em 1254 cm^{-1} (PAVIA et al., 2009). A presença do anel aromático é evidenciada pela observação dos estiramentos C=C do anel, composto por três sinais em 1569 , 1538 e 1462 cm^{-1} , além dos dos estiramentos C-H assimétrico e simétrico em 2962 e 2871 cm^{-1} , respectivamente (PAVIA et al., 2009; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

Tendo-se obtida a identificação dos principais grupos funcionais do H_2DPA , agora é possível realizar uma análise comparativa do complexo metálico EuDPA com maior propriedade (Figura 42; linha azul). Inicialmente pôde-se verificar que o estiramento assimétrico $\nu_{\text{ASS}}(\text{COO}^-)$ da carbonila (1591 cm^{-1}) apresenta-se deslocado em relação ao sinal C=O proveniente do ligante (1701 cm^{-1}), e isto se dá devido a desprotonação da carbonila e coordenação deste grupo com o íon metálico que proporciona uma redução da frequência da vibração molecular e surgimento de sua banda em um número de onda mais baixo do que

observado para o ligante livre (PAVIA et al., 2009; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

Figura 41: Espectro de infravermelho para o compostos H₂DPA.



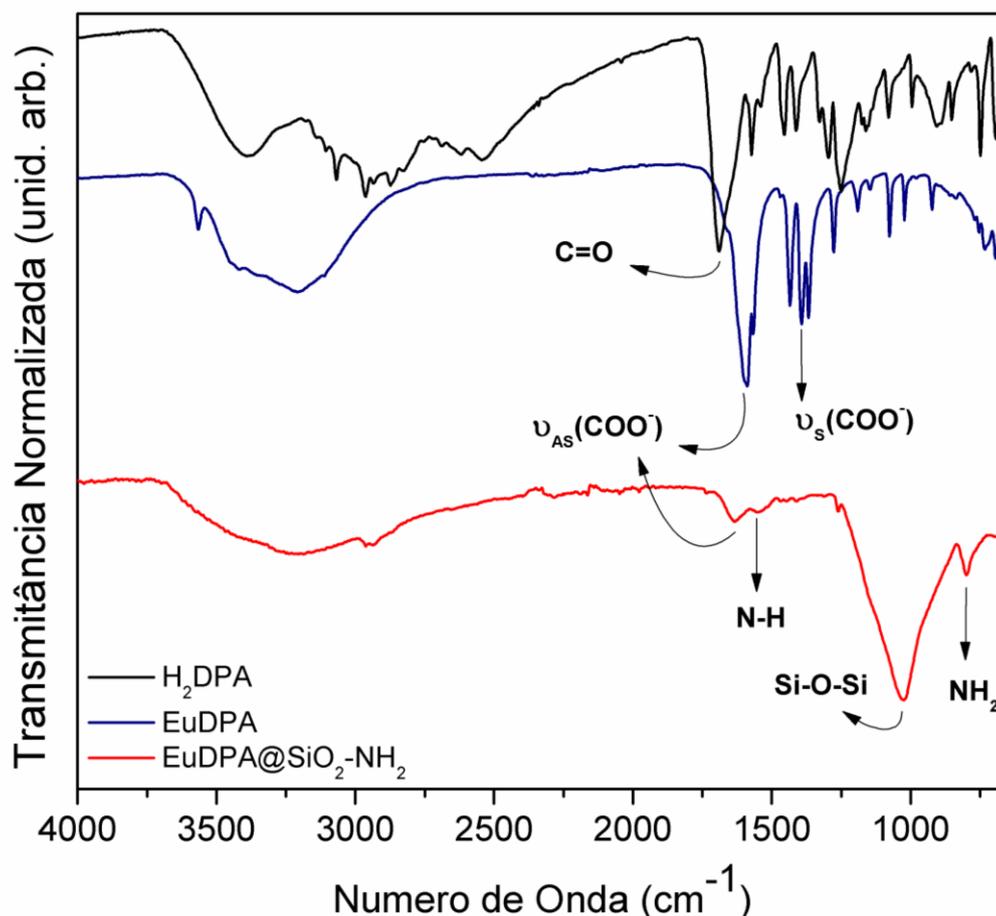
Fonte: Fornecida pelo autor.

Ainda de modo a fortalecer os indícios de coordenação no composto, o espectro revela um deslocamento do estiramento C-O de 1247 cm^{-1} , do ligante puro H₂DPA, para 1277 cm^{-1} no EuDPA referente à coordenação do íon lantanídeo pelo oxigênio na carbonila, o que indica a desprotonação do ácido carboxílico e formação da ligação metal-ligante neste sítio (PAVIA et al., 2009; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

A análise das nanopartículas de EuDPA-SiO₂-NH₂ também foi realizada utilizando a técnica de FT-IR, como mostrado na Figura 42 (linha vermelha). Esta revelou a presença de uma banda larga e intensa com máximo centrado em 1070 cm^{-1} , que está relacionada ao estiramento assimétrico Si-O-Si proveniente de grupos derivados do silano. A funcionalização com grupos -NH₂ pôde ser caracterizada pela presença de uma banda pouco intensa localizada em 800 cm^{-1} devido as vibrações N-H direcionadas fora do plano (PAVIA et al., 2009;

SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). Adicionalmente, é observado um sinal na centrado em 1562 cm^{-1} , referente a deformação angular N-H para amina primária.

Figura 42: Espectros de infravermelho para os compostos H₂DPA (linha preta) e EuDPA (linha azul) e EuDPA@SiO₂-NH₂ (linha vermelha).



Fonte: Fornecida pelo autor.

O composto EuDPA@SiO₂-NH₂ também apresenta um sinal de baixa intensidade, com máximo centrado em 1637 cm^{-1} , o qual é atribuído ao estiramento assimétrico $\nu_{ASS}(\text{COO}^-)$ do complexo de coordenação incorporado as nanopartículas de SiO₂ (PAVIA et al., 2009; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). Os resultados sugerem que o complexo está internalizado na rede rígida de silício, em sua conformação original, a qual estabiliza o sistema híbrido por interações supramoleculares.

A análise termogravimétrica (TGA) também foi instrumento importante tanto para auxiliar a caracterização do complexo metálico EuDPA quanto para determinação do perfil de estabilidade térmica dos compostos EuDPA e EuDPA@SiO₂-NH₂. No que se refere ao

comportamento térmico para o EuDPA observamos a sua decomposição em duas frações (Figura 43). Na primeira evento térmico observamos a eliminação de 14% de massa na faixa de temperatura entre 30-150 °C ocorrendo em duas etapas, a qual é atribuída a remoção de sete moléculas de água, de hidratação e coordenação, presentes no complexo de coordenação. O segundo evento térmico em destaque é relacionado com a parte orgânica do ligante DPA²⁻ coordenado que é eliminado em três etapas, totalizando 45% de perda de massa na faixa de temperatura entre 150-800 °C, conferindo ao composto dois ligantes coordenados ao íon metálico. Deste modo, a composição química do complexo sintetizado apresenta boa concordância com a estrutura proposta teoricamente $\text{Eu}(\text{DPA})_2(3\text{H}_2\text{O}) \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, como mostrado na Tabela 9.

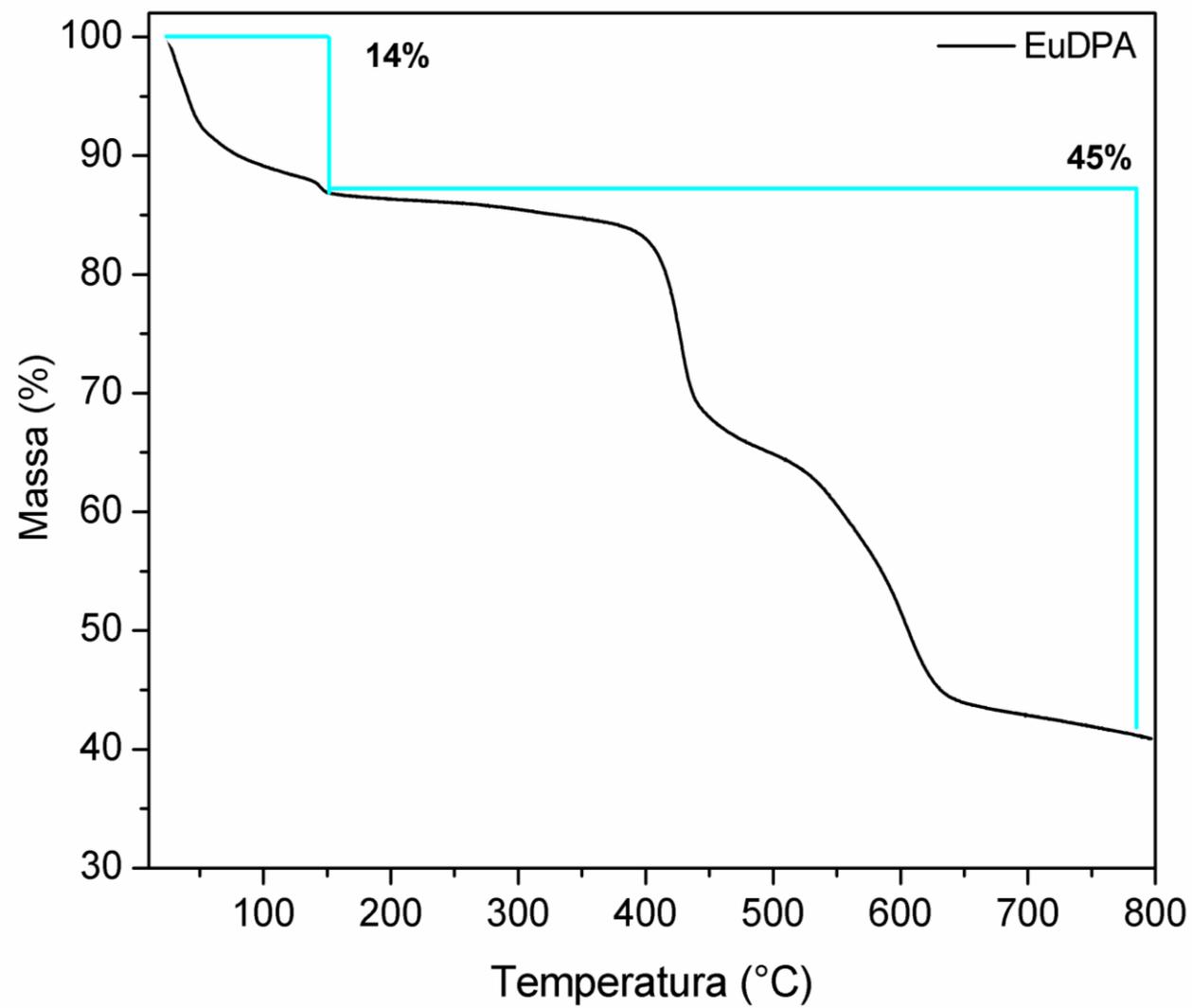
Tabela 9: Análise termogravimétrica utilizada como estimativa composicional do complexo EuDPA.

| | 2 DPA ²⁻ | 7 H ₂ O | Eu | Na |
|---|---------------------|--------------------|-----|-----|
| | (%) | (%) | (%) | (%) |
| EuDPA Experimental | 45 | 14 | - | - |
| Na[Eu(DPA) ₂ (3H ₂ O)]4H ₂ O Teórico (TAO et al., 2015b) | 51 | 14 | 24 | 4 |

A análise de TGA para as nanopartículas de $\text{EuDPA} \subset \text{SiO}_2\text{-NH}_2$ foi realizada entre as regiões de 25-600 °C, como apresentado na Figura 44. Observa-se que o composto apresenta dois eventos de perda de massa até a produção de resíduo proveniente da eliminação de 25% da massa inicial do composto. Importante salientar que o perfil do termograma encontrado para $\text{EuDPA} \subset \text{SiO}_2\text{-NH}_2$ se assemelha com o descrito na literatura para nanopartículas de SiO_2 (KIM et al., 2014). Adicionalmente, os resultados encontrados concordam com dados reportados, onde compostos derivados de nanopartículas de SiO_2 tem a percentagem de massa remanescente aumentada com o acréscimo dos outros componentes.

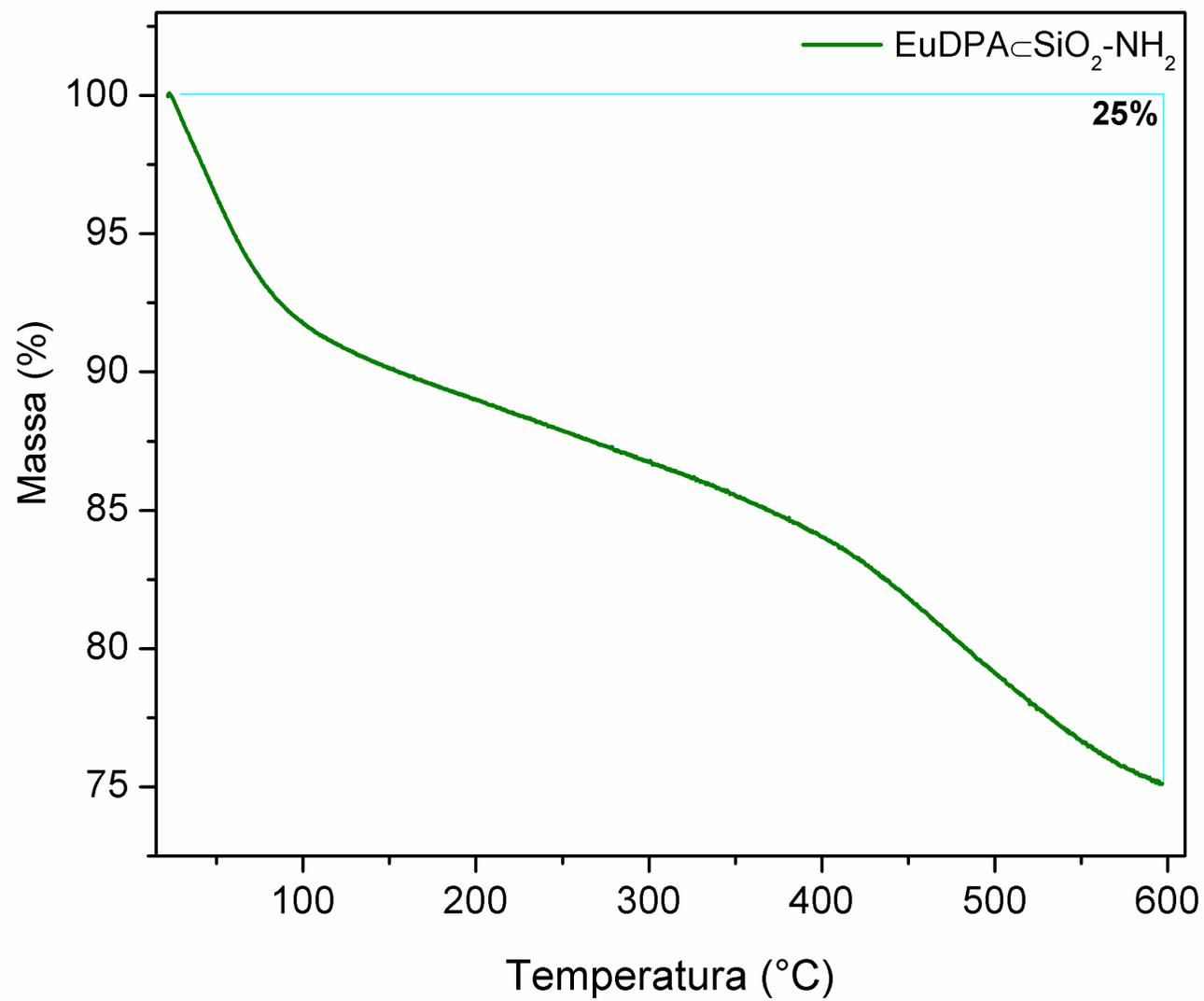
A análise de TGA para as nanopartículas de $\text{EuDPA} \subset \text{SiO}_2\text{-NH}_2$ foi realizada entre as regiões de 25-600 °C, como apresentado na Figura 44. Observa-se que o composto apresenta dois eventos de perda de massa até a produção de resíduo proveniente da eliminação de 25% da massa inicial do composto. Importante salientar que o perfil do termograma encontrado para $\text{EuDPA} \subset \text{SiO}_2\text{-NH}_2$ se assemelha com o descrito na literatura para nanopartículas de SiO_2 (KIM et al., 2014). Adicionalmente, os resultados encontrados concordam com dados reportados, onde compostos derivados de nanopartículas de SiO_2 tem a percentagem de massa remanescente aumentada com o acréscimo dos outros componentes.

Figura 43: Análise termogravimétrica para o complexo de EuDPA.



Fonte: Fornecida pelo autor.

Figura 44: Análise termogravimétrica para as nanopartículas $\text{EuDPA@SiO}_2\text{-NH}_2$



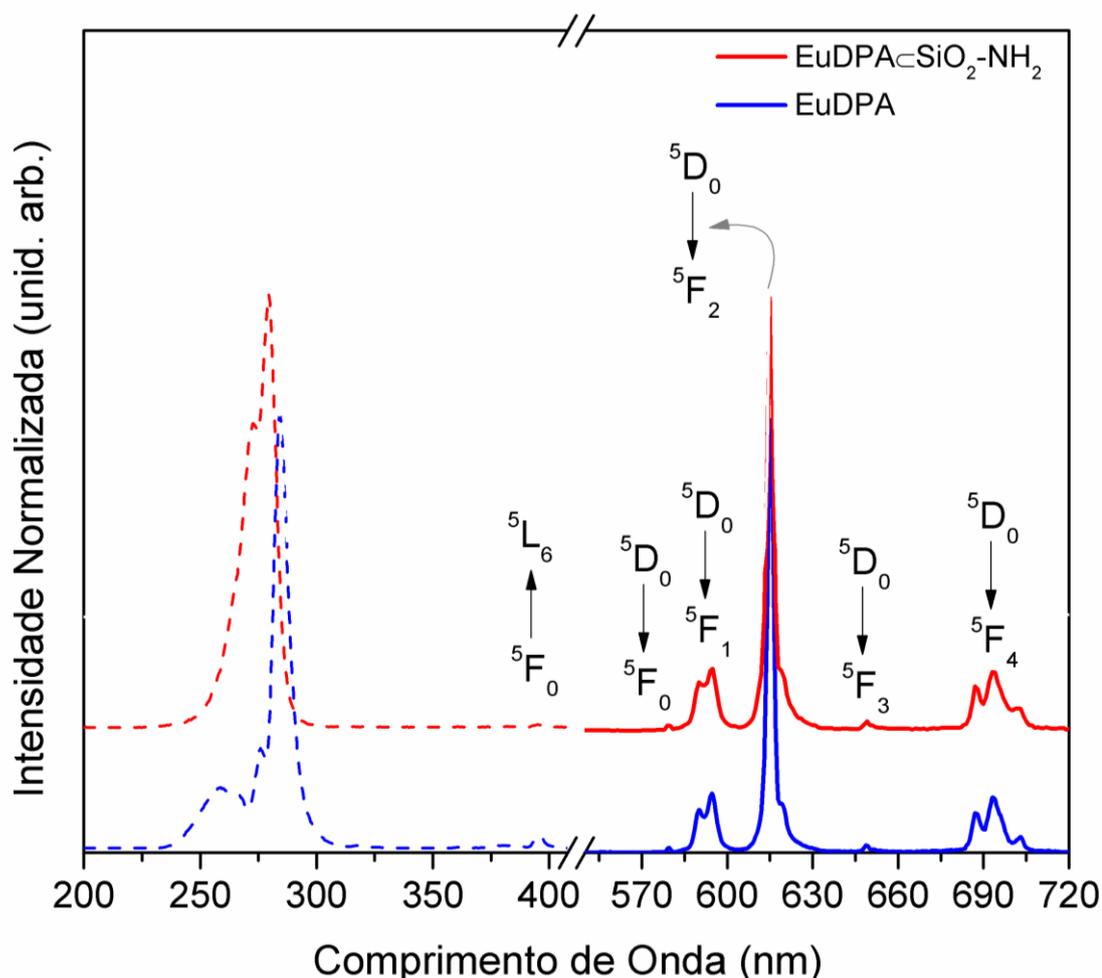
Fonte: Fornecida pelo autor.

5.1.2.3 ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DAS PARTÍCULAS HÍBRIDAS $\text{EuDPA}\subset\text{SiO}_2\text{-NH}_2$

O comportamento óptico dos compostos EuDPA e $\text{EuDPA}\subset\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ foi analisado utilizando espectros de excitação, emissão e tempo de vida. O espectro de excitação para o complexo EuDPA, obtido monitorando $\lambda_{\text{EM}} = 615$ nm (Figura 45; linha pontilhada azul), apresenta duas bandas na região entre 240-310 nm, com máximo centrado em 283 nm referente a transição $\pi \rightarrow \pi^*$ do ligante DPA^{2-} . Também é possível observar a presença de um sinal de menor intensidade centrado em 395 nm, o qual é relacionado a transição ${}^5\text{F}_0 \rightarrow {}^5\text{L}_6$ do íon Eu^{3+} . O espectro de emissão para o EuDPA, utilizando $\lambda_{\text{EX}} = 283$ nm (Figura 45; linha cheia azul), revela as transições ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_J$ (onde $J = 0, 1, 2, 3$ e 4) típicamente relacionadas com a configuração $4f^6$ do Eu^{3+} . A análise do espectro de emissão também revela a ausência de bandas de emissão oriundas do ligante, indicando que a conversão de energia ligante-metal acontece eficientemente (efeito antena). Adicionalmente, o espectro revela a presença da transição ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_0$ o que indica a restrição da simetria pontual entorno do íon para as representações C_1 , C_n , C_{nv} e C_s . É importante mencionar que o perfil de emissão para o composto EuDPA é análogo ao reportado na literatura (TAO et al., 2015b).

A análise da fotoluminescência para o composto $\text{EuDPA}\subset\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ também foi avaliada pelos seus espectros de excitação (Figura 45; linha pontilhada vermelha) e emissão (Figura 45; linha cheia vermelha). O espectro de excitação, obtido monitorando $\lambda_{\text{EM}} = 615$ nm, revela a presença de duas bandas na região entre 240-310 nm, com máximo centrado em 279 nm referente a transição $\pi \rightarrow \pi^*$ do ligante DPA^{2-} , agora com perfil levemente diferente do observado para o EuDPA. Esta diferença deve estar relacionada com a organização do complexo EuDPA que agora se encontra imobilizado em estado sólido na forma de nanopartículas $\text{EuDPA}\subset\text{SiO}_2\text{-NH}_2$. O espectro de emissão para o $\text{EuDPA}\subset\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ apresenta mesmo perfil espectral em relação ao apresentado para o EuDPA, indicando que o complexo incorporado na rede híbrida confere a mesma simetria pontual entorno do íon em relação ao complexo de coordenação livre.

Figura 45: Espectros de excitação (linha pontilhada) e emissão (linha cheia) para os compostos EuDPA ($\lambda_{EM} = 615$ nm e $\lambda_{EX} = 283$; linha azul) e $\text{EuDPA@SiO}_2\text{-NH}_2$ ($\lambda_{EM} = 615$ nm e $\lambda_{EX} = 279$; linha vermelha) obtidos a temperatura ambiente; O EuDPA em solução aquosa 1×10^{-5} mol/L e o $\text{EuDPA@SiO}_2\text{-NH}_2$ na forma de suspensão de partículas em PBS (pH = 7,4; Concentração 100 $\mu\text{g/mL}$).



Fonte: Fornecida pelo autor.

Os decaimentos exponenciais para o estado emissor 5D_0 foram determinados a partir da curva de decaimento exponencial dos compostos EuDPA e $\text{EuDPA@SiO}_2\text{-NH}_2$ (Figura 46). As curvas de ambos os materiais apresentaram um perfil monoexponencial, indicando a existência de apenas um sítio metálico emissor para cada sistema. Observa-se também que o composto EuDPA, Figura 46a, apresenta uma baixa eficiência quântica de emissão em relação aos complexos usuais de Európio (DE MELLO DONEGÁ; JUNIOR; DE SÁ, 1996), igual a 18 %, a qual está associada a um alto valor da taxa não-radiativa ($A_{\text{nrad}} = 1546,6 \text{ s}^{-1}$) em relação a taxa radiativa ($A_{\text{rad}} = 340,5 \text{ s}^{-1}$), além de possuir um baixo tempo de vida ($\tau = 0,53$ ms). Este baixo valor obtido para a eficiência quântica de emissão pode ser explicado pela presença de estados energéticos oriundos dos osciladores O-H da água, a qual apresenta-se ressonante ao estado

emissor 5D_0 do Eu^{3+} promovendo a desativação da luminescência e, conseqüentemente, resultando na baixa eficiência quântica de emissão quando comparado a resultados apresentados na literatura utilizando outros solventes (STEIN; WÜRZBERG, 1975; TAO et al., 2015a).

A análise das curvas de decaimento exponencial para o composto $\text{EuDPA}@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ também apresenta valor baixo para a taxa radiativas ($A_{\text{rad}} = 326,1 \text{ s}^{-1}$), enquanto o valor para a taxa não-radiativa apresenta-se elevado ($A_{\text{nr}} = 1340,6 \text{ s}^{-1}$). Este fato, aliado a diminuição no tempo de vida ($\tau = 0,60 \text{ ms}$) obtido pela curva de decaimento radiativo da Figura 46b, promove a obtenção de eficiência quântica de emissão igual a 20 %.

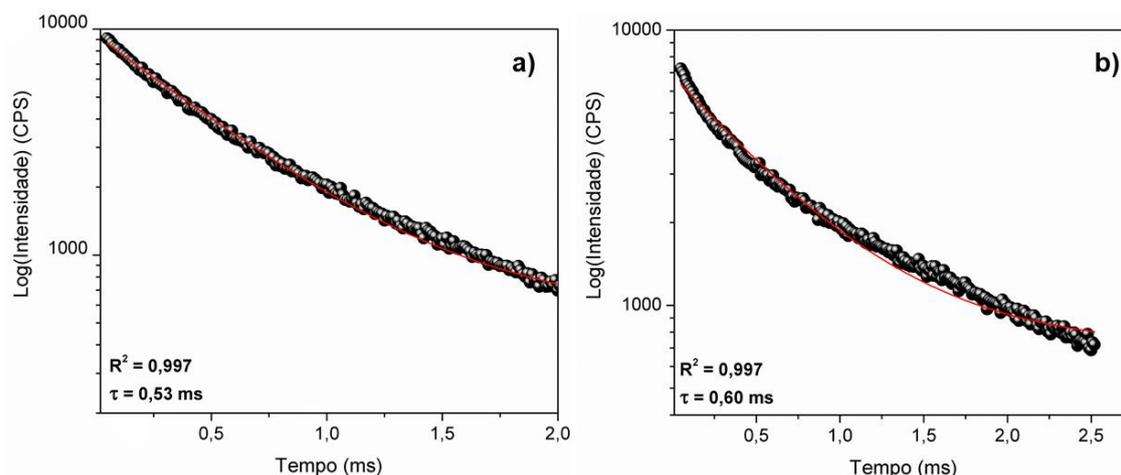
Os parâmetros experimentais de intensidade (Ω_λ), também foram determinados a partir do espectro de emissão usando a Equação 4.

$$\Omega_\lambda = \frac{4e^2 \omega^3 A_{0J}}{3\hbar \chi \langle {}^7F \parallel U^\lambda \parallel {}^5D_0 \rangle^2} \quad (4)$$

Os detalhes para obtenção dos parâmetros físicos são discutidos em detalhes na literatura (MALTA, 2008). É conhecido que a análise dos parâmetros de intensidade (Ω_λ) deve sugerir uma relação com o grau de interações covalentes entre o ligante e o íon lantanídeo. Quando o acoplamento dinâmico é o principal mecanismo, como na maioria dos casos dos compostos de coordenação, o parâmetro de intensidade Ω_4 é mais apropriado para estimar o grau de covalência (MOURA et al., 2016). Como descrito anteriormente, espera-se que o íon Eu^{3+} na forma de $\text{EuDPA}@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ apresente a mesma simetria pontual que a encontrada para o complexo de coordenação livre. Entretanto, observa-se que os valores dos parâmetros de intensidade $\Omega_{2,4}$ apresentam diferenças em seus valores absolutos, indicando que o composto coordenação livre EuDPA ($\Omega_4 = 4,45 \times 10^{-20} \text{ cm}^2$) possui um grau de covalência inferior ao obtido para as partículas de $\text{EuDPA}@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ ($\Omega_4 = 4,70 \times 10^{-20} \text{ cm}^2$). Este resultado sugere que a imobilização não altera o ambiente químico do Európio no sólido nanoparticulado, mas de alguma maneira deve modificar a distribuição eletrônica do ligante e, por conseguinte, o grau de covalência da ligação Ligante-Metal no material.

Os valores experimentais para os parâmetros de intensidade Ω_λ ($\lambda = 2$ e 4), taxas radiativas (A_{rad}) e não-radiativas (A_{nrad}) e eficiência quântica de emissão (η) para os compostos EuDPA e EuDPA \subset SiO $_2$ -NH $_2$ estão disponíveis na Tabela 10.

Figura 46: Curva de decaimento exponencial para os compostos a) EuDPA ($\lambda_{EX} = 283$ nm e $\lambda_{EM} = 615$ nm) e b) EuDPA \subset SiO $_2$ -NH $_2$ ($\lambda_{EX} = 279$ nm e $\lambda_{EM} = 615$ nm).



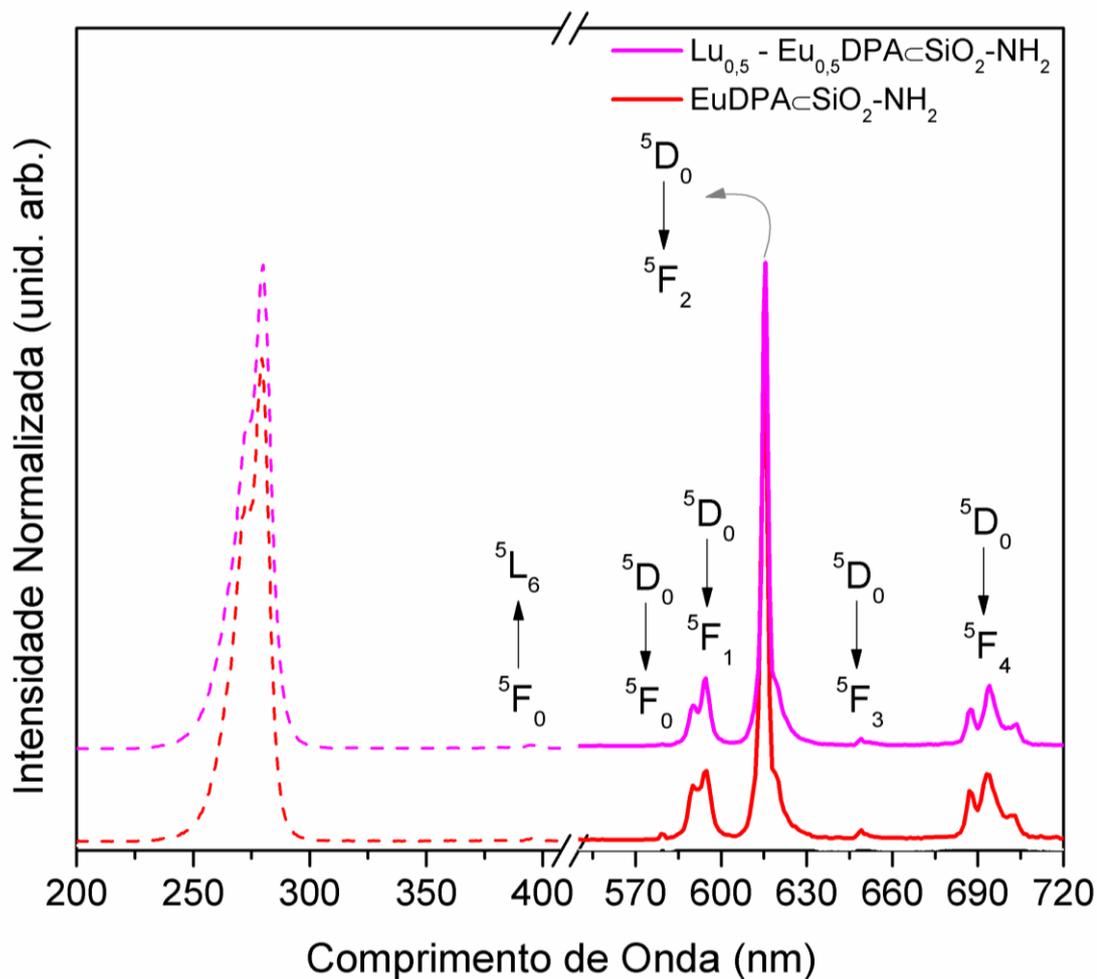
Fonte: Fornecida pelo autor.

Tabela 10: Valores experimentais dos parâmetros de intensidade Ω_2 , Ω_4 and Ω_6 , decaimentos radioativos (A_{rad}) e não-radioativos (A_{nrad}) e eficiência quântica de emissão (η).

| | Parâmetros de Intensidade (10^{-20} cm 2) | | | A_{rad} (s^{-1}) | A_{nrad} (s^{-1}) | τ (ms) | η (%) |
|-----------------------------------|---|------------|---------------------|------------------------|-------------------------|-------------|------------|
| | Ω_2 | Ω_4 | Ω_2/Ω_4 | | | | |
| EuDPA | 6,31 | 4,45 | 1,42 | 340,5 | 1546,6 | 0,53 | 18 |
| EuDPA \subset SiO $_2$ -NH $_2$ | 5,79 | 4,70 | 1,29 | 326,1 | 1340,6 | 0,60 | 20 |

A comparação entre os espectros de excitação ($\lambda_{EM} = 615$ nm) e emissão ($\lambda_{EX} = 283$ nm) entre os compostos EuDPA \subset SiO $_2$ -NH $_2$ e Lu $_{0,5}$ -Eu $_{0,5}$ DPA \subset SiO $_2$ -NH $_2$ foi realizada (Figura 47). Observa-se que os padrões espectrais de excitação e emissão não sofrem alterações, indicando que a introdução do Lutécio não causa alterações no ambiente químico do complexo de Európio dentro da matriz.

Figura 47: Espectros de excitação (linha pontilhada) e emissão (linha cheia) para os compostos $\text{EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ ($\lambda_{\text{EM}} = 615 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{EX}} = 283$; linha vermelho) e $\text{Lu}_{0,5}\text{-Eu}_{0,5}\text{DPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ ($\lambda_{\text{EM}} = 615 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{EX}} = 279$; linha rosa) obtidos a temperatura ambiente; O $\text{Lu}_{0,5}\text{-Eu}_{0,5}\text{DPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ e o $\text{EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ na forma de suspensão de partículas em PBS (pH = 7,4; Concentração 100 $\mu\text{g/mL}$).



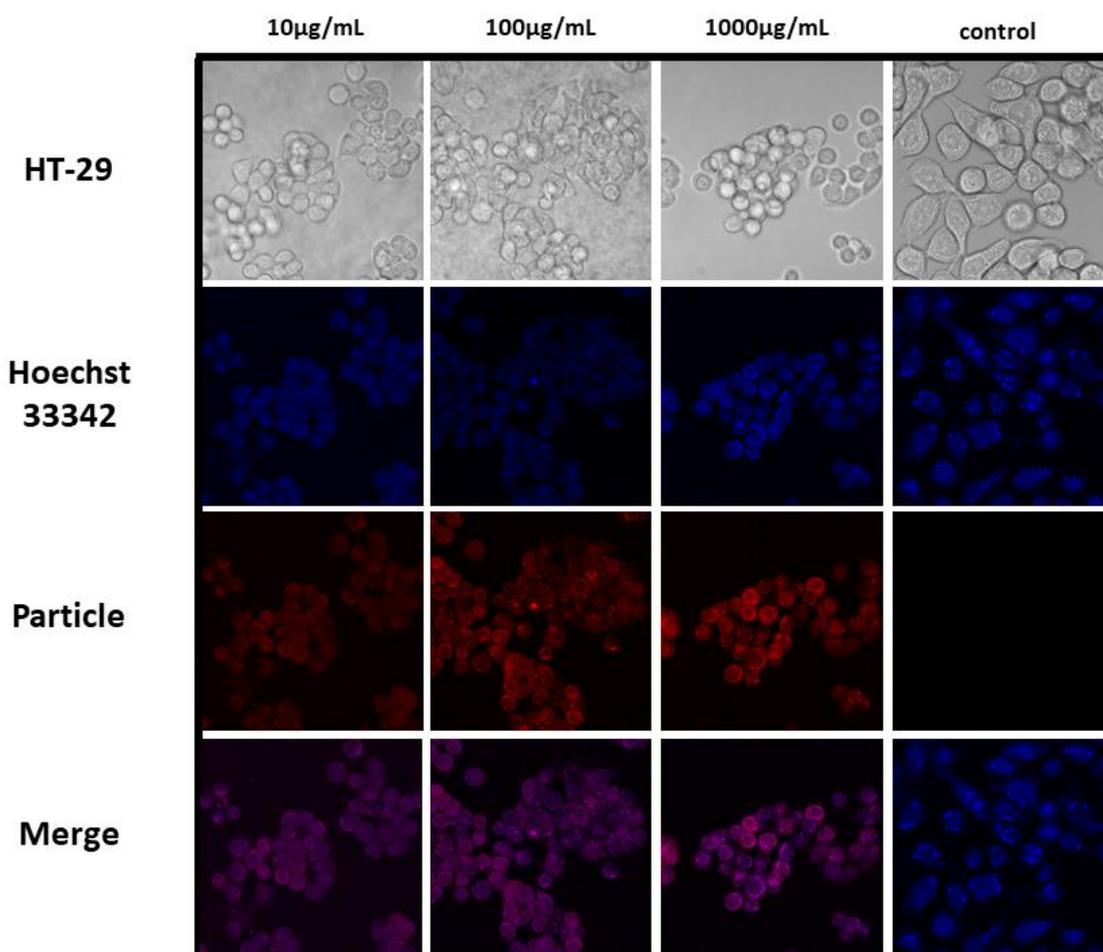
Fonte: Fornecida pelo autor.

5.1.2.4 ANÁLISE DA ABSORÇÃO DAS PARTÍCULAS $\text{EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ POR CÉLULAS HT-29 VIA MICROSCOPIA CONFOCAL

As nanopartículas $\text{EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ foram analisadas utilizando experimentos de microscopia confocal como mostrado na Figura 48. Neste ensaio foi avaliada a capacidade de internalização das partículas em células HT-29 nas concentrações 10 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$ durante um período de incubação de 24 horas. Após uma investigação preliminar é possível observar que o composto nas diferentes concentrações apresentaram boa interação com células HT-29 durante o seu cultivo, sem indicação de alterações morfológicas das mesmas

após o período de incubação. Após o procedimento de exposição entre as nanopartículas de $\text{EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ nas diferentes condições é possível observar uma excelente afinidade celular, representada pelo acúmulo de partículas luminescentes na superfície das células HT-29. Uma análise mais detalhada mostra que mesmo com a diferença nas intensidades de luz emitida, todas as concentrações tiveram absorção celular depositada na região do citoplasma, semelhante aos outros materiais apresentados na seção 4.1.2.3 deste manuscrito, indicando que as partículas $\text{EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ são promissoras na composição de biomarcadores luminescentes.

Figura 48: Imagens de microscopia confocal (lente ampliada de 63x) para $\text{EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ marcando células da linhagem HT-29; o núcleo celular é azul e as partículas são vermelhas (excitação e detecção a 279 e 500-700 nm, respectivamente) obtidos nas concentrações de 10, 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ em PBS (pH 7,4).



Fonte: Fornecida pelo autor.

5.2 BIOMARCADORES RADIOATIVOS

5.2.1 *RADIOIODAÇÃO DE BIOMARCADORES CONJUGADOS À BASE DE NANOPARTÍCULAS DE NaYF₄:5% Eu*

Alguns dos nanomarcadores luminescentes sintetizados na seção 4.2.1.2., NaYF₄:5%Eu - Coumaric, NaYF₄:5%Eu - Tyr3 e NaYF₄:5%Eu - BODIPY NCS / Tyr3, foram utilizados como matrizes para incorporação do radioisótopo ¹²³I. A estratégia empregada baseou-se na metodologia de radioiodação tipicamente aplicada para marcação de compostos derivados da tirosina, como peptídeos e proteínas, em reações iodação oxidativa usando o Iodogen (HERMANSON, 2013).

A quantificação da incorporação de ¹²³I nas nanopartículas conjugadas (IR) foi definida por uma relação entre a atividade emanada pelo composto antes e após a reação de radioiodação, como descrito na seção experimental. Após a reação os compostos apresentaram valores de IR iguais a 30, 28 e 19% para NaYF₄:5% Eu-Tyr3-¹²³I, NaYF₄:5% Eu-Coumaric-¹²³I e NaYF₄:5% Eu-BODIPY NCS/Tyr3-¹²³I, respectivamente. É possível perceber que os resultados de IR estão diretamente relacionados com a quantidade de derivados de tirosina e ácido p-cumárico conjugados nas amostras (Figura 27), ou seja, os compostos NaYF₄:5% Eu-Tyr3-¹²³I e NaYF₄:5% Eu-Coumaric-¹²³I apresentam o maior porcentagem de incorporação devido à eficiência na reação com compostos fenólicos para-substituídos. Consequentemente o menor valor de IR para o NaYF₄:5% Eu-BODIPY NCS / Tyr3-¹²³I deve estar relacionado com a presença de menos grupos tirosina conjugadas as nanopartículas. Adicionalmente, também pôde-se determinar a atividade específica, definida pela relação entre a atividade do radiomarcador e a massa de material utilizado, para NaYF₄:5% Eu-Tyr3-¹²³I, NaYF₄:5% Eu-Coumaric-¹²³I e NaYF₄:5% Eu-BODIPY NCS / Tyr3-¹²³I, onde os materiais revelaram valores iguais a 661, 643 e 596 μCi / mg, respectivamente.

Os valores para as atividades inicial e final, percentual de incorporação e atividade específica para todas as nanopartículas são apresentadas na Tabela 11.

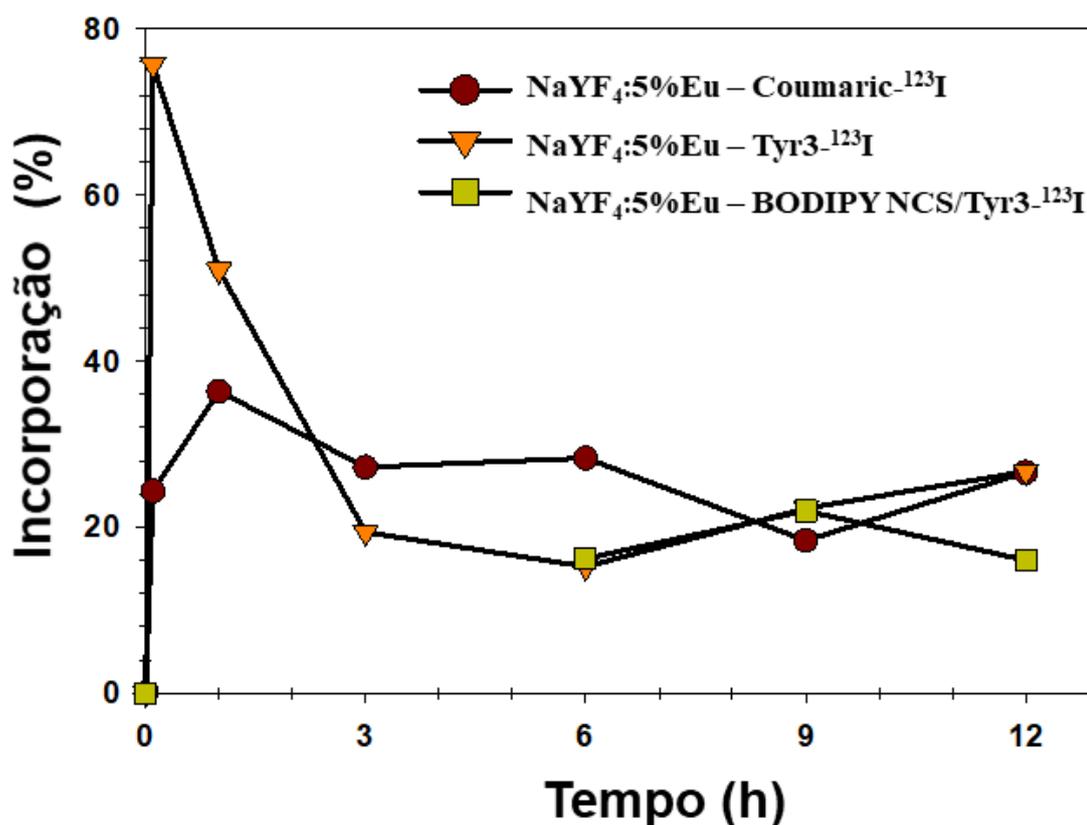
Tabela 11: Valores obtidos para atividade inicial, atividade final, radiação incorporada (IR) e atividade específica para as partículas NaYF₄:5% Eu-Coumaric-¹²³I, NaYF₄:5% Eu-Tyr3-¹²³I, e NaYF₄:5% Eu-BODIPY NCS / Tyr3-¹²³I

| | NaYF ₄ :5% Eu – Coumaric – ¹²³ I | NaYF ₄ :5% Eu – Tyr3 – ¹²³ I | NaYF ₄ :5% Eu – BODIPY NCS/Tyr3 – ¹²³ I |
|---------------------------|---|---|--|
| Atividade inicial (μCi) | 661 | 643 | 596 |
| Atividade final (μCi) | 253 | 273 | 142 |
| IR (%) | 28 | 30 | 19 |
| Ativ. Especifica (μCi/mg) | 661 | 643 | 596 |

5.2.2 ANÁLISE DA ABSORÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS NaYF₄:5% Eu – COUMARIC-¹²³I, NaYF₄:5% Eu - Tyr3-¹²³I E NaYF₄:5% Eu - BODIPY/Tyr3-¹²³I EM CÉLULAS HT-29

A determinação da quantidade de radioisótopos absorvida pelas células HT-29 foi medida através da intensidade da radiação emanada pelas partículas absorvidas nas células remanescentes, as quais encontram-se aderidas nos poços de cultivo após exposição aos nanocompostos. Na Figura 49 é apresentada a relação entre o tempo de interação e porcentagem de incorporação das nanopartículas nas células HT-29. Observamos que para as nanopartículas NaYF₄:5% Eu - Coumaric-¹²³I e NaYF₄: 5% Eu – Tyr3-¹²³I ocorre um incremento da taxa de incorporação em função do tempo seguido de uma estabilização em um patamar próximo de 20% a partir de 6 horas de incubação. Diferentemente ao dos outros compostos absorção de NaYF₄: 5% Eu - BODIPY NCS/Tyr3-¹²³I foi avaliado em tempos t iguais a 0, 6, 9 e 12 horas devido a disponibilidade de material suficiente para síntese. Podemos observar que para este composto há também uma estabilização da absorção celular em um patamar igual a 20%, a partir de 6 horas de incubação, semelhante aos demais compostos apresentados.

Figura 49: Ensaio de absorção das partículas $\text{NaYF}_4:5\% \text{Eu-Coumaric-}^{123}\text{I}$, $\text{NaYF}_4:5\% \text{Eu-Tyr3-}^{123}\text{I}$, e $\text{NaYF}_4:5\% \text{Eu-BODIPY NCS / Tyr3-}^{123}\text{I}$ em células HT-29 em função do tempo de tratamento.



Fonte: Fornecida pelo autor.

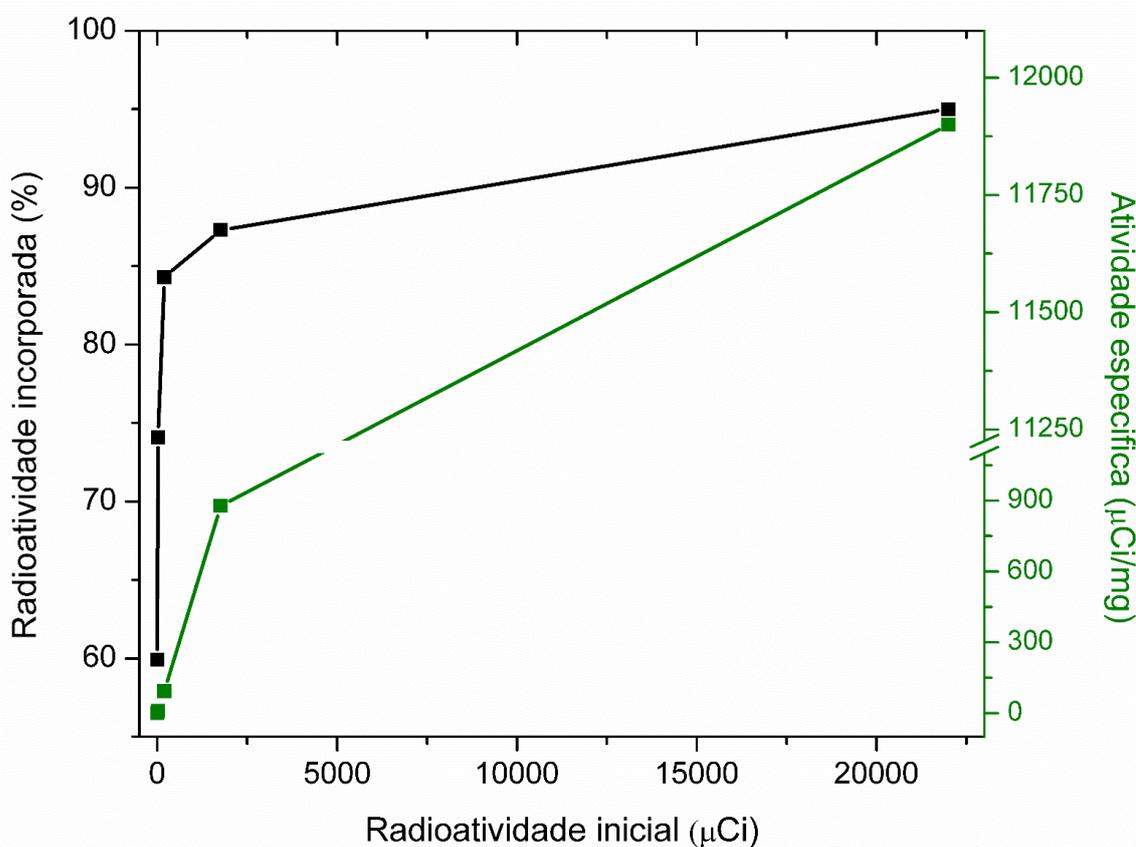
5.2.3 BIOMARCADORES RADIOATIVOS À BASE DAS PARTÍCULAS HÍBRIDAS $^{177}\text{Lu-EuDPA}\subset\text{SiO}_2\text{-NH}_2$

O nanomarcador luminescente $\text{EuDPA}\subset\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ foi utilizado como matriz para produção do radiofármaco utilizando o elemento ^{177}Lu como constituinte do material ($^{177}\text{Lu-EuDPA}\subset\text{SiO}_2\text{-NH}_2$). A estratégia empregada baseou-se na metodologia de incorporação do radioisótopo *one-pot* na formação do material híbrido à base de nanopartículas de sílica (detalhes na seção 4.2.2.2). Para a quantificação da porcentagem de incorporação do ^{177}Lu (%IR) também foi definida tomando por base a relação entre quantidade de atividade do composto antes e após a reação de formação das nanopartículas $^{177}\text{Lu-EuDPA}\subset\text{SiO}_2\text{-NH}_2$, analogamente ao descrito na Equação 1. Para isso a quantidade de radioisótopo adicionado à reação foi variada buscando-se obter a melhor taxa %IR para o material. Avaliando-se a introdução de 22 mCi (~10.000x), 1,8 mCi (~1000x), 192,3 mCi (~100x), 21,0 μCi (~10x) e 2,94 μCi (~1x) de $^{177}\text{LuCl}_3$ no sistema observamos valores de IR iguais a 60, 74, 84, 87 e 93%

para a incorporação no $^{177}\text{Lu-EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ (Figura 50; linha preta). Este resultado indica que a faixa de melhor incorporação do radioisótopo na matriz de sílica é obtida quando utilizado 22 mCi como atividade inicial.

Sabendo-se que a atividade específica é estimada a partir da razão entre atividade pela massa de material ($\mu\text{Ci}/\text{mg}$), decidiu-se estimar esta grandeza para o composto $^{177}\text{Lu-EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$. Considerando que a síntese das partículas $\text{EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ geram uma massa igual a 1.75 ± 0.50 mg, determinamos a atividade específica para o composto, como mostrado na Figura 50 (linha azul).

Figura 50: Taxa de incorporação de Lu-177 (linha preta) e atividade específica (linha azul) em função da radiação inicial para as partículas $^{177}\text{Lu-EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$.



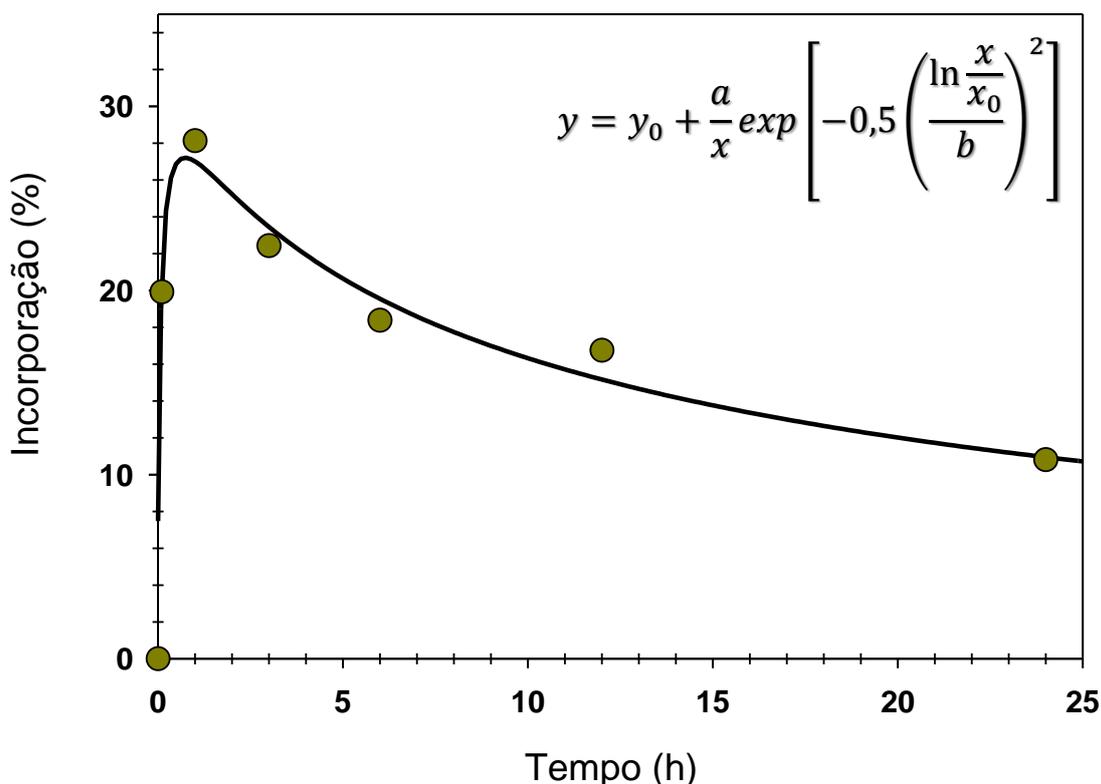
Fonte: Fornecida pelo autor.

5.2.3.1 ANÁLISE DA ABSORÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS $^{177}\text{Lu-EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ EM CÉLULAS HT-29

A determinação da quantidade de radioisótopos absorvida pelas células HT-29 foi medida através da atividade do radionucleotídeo nas células remanescentes, as quais

encontram-se aderidas nos poços de cultivo após exposição aos nanocompostos. Na Figura 51 é apresentada a relação entre o tempo de interação e porcentagem de incorporação das nanopartículas nas células HT-29. Observamos que para as nanopartículas $^{177}\text{Lu-EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ há um incremento da taxa de incorporação em função do tempo seguido de uma estabilização em de 13% após 24 horas de incubação.

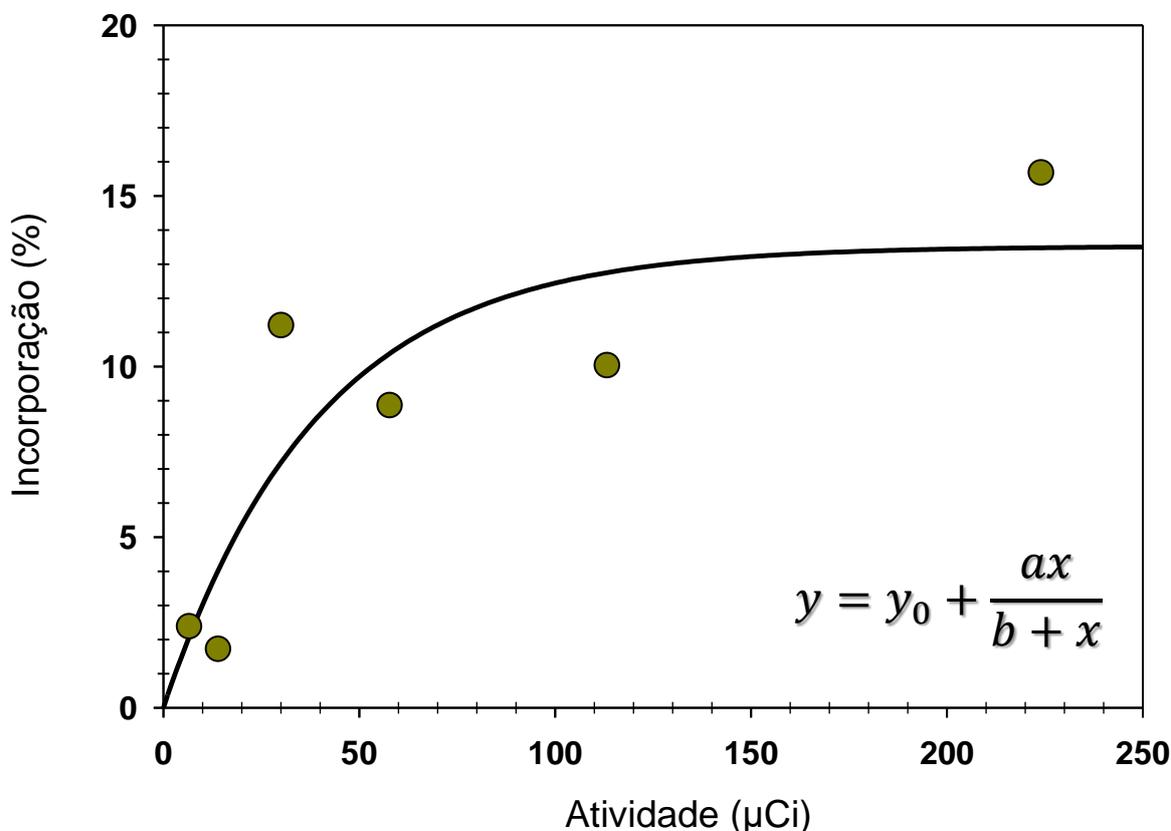
Figura 51: Ensaio de absorção das partículas $^{177}\text{Lu-EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ em células HT-29 em função do tempo de tratamento.



Fonte: Fornecida pelo autor.

Na Figura 52 é apresentada a relação entre a atividade do radiomarcador aplicada no meio celular e porcentagem de incorporação das nanopartículas nas células HT-29 durante 24 h de incubação. Observa-se a ocorrência de um aumento gradual da absorção celular ao passo que a concentração de nanopartículas $^{177}\text{Lu-EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ é elevada. Entretanto o comportamento da curva sugere que a partir de 100 μCi a absorção indica um patamar de estabilização de 13% de incorporação.

Figura 52: Ensaio de absorção das partículas $^{177}\text{Lu-EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ em células HT-29 em função da atividade utilizada.

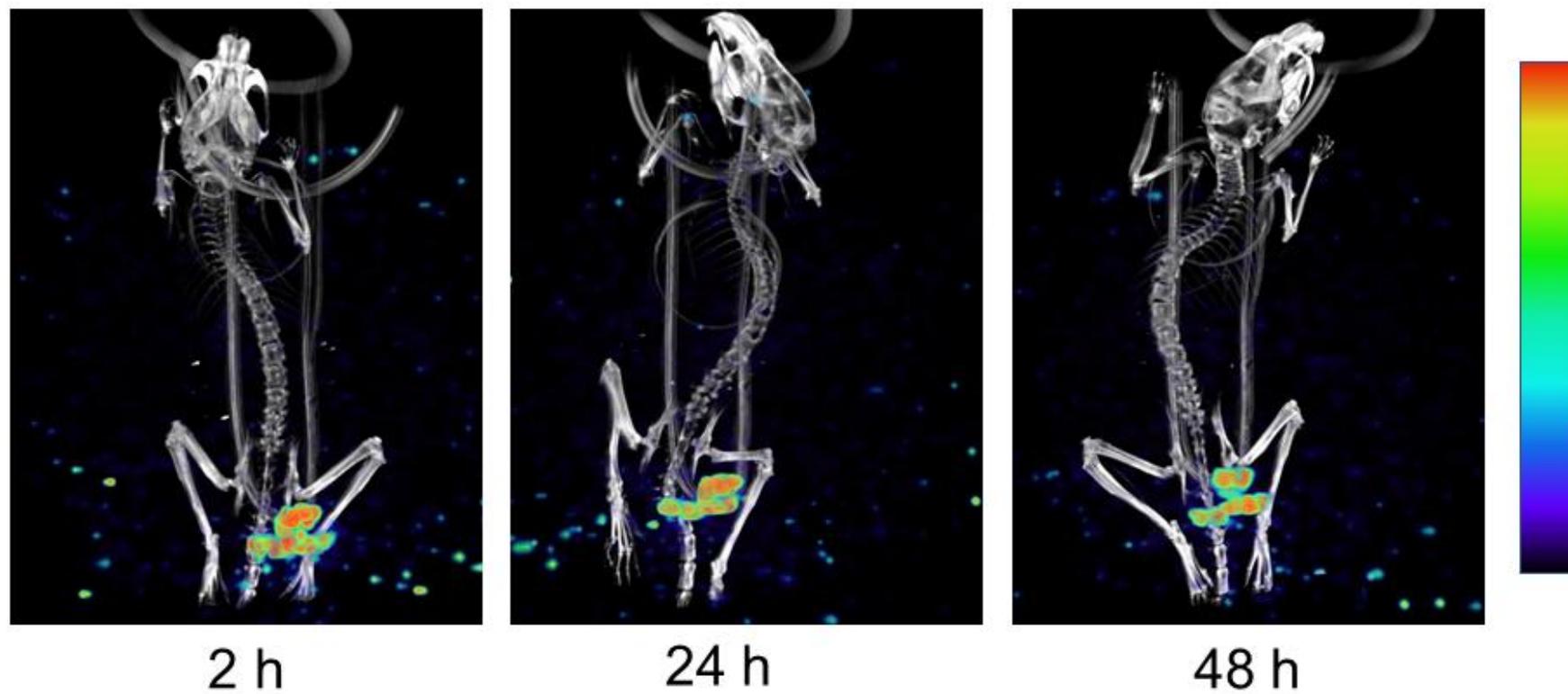


Fonte: Fornecida pelo autor.

5.2.3.2 AVALIAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS $^{177}\text{Lu-EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ ATUANDO RADIOMARCADORES IN VIVO

Em ensaio preliminar visando o entendimento do comportamento do nanocomposto as partículas $^{177}\text{Lu-EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ (2 mCi) foram administradas intratumoralmente em pequenos animais ($n = 5$) e o progresso da atividade radioativa foi avaliada em função do tempo por imagens de SPECT/CT (Figura 53). As imagens revelaram que a radioatividade manteve-se confinada aos tumores subcutâneos HT-29 em 2 h após a injeção de $^{177}\text{Lu-EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ (Figura 53). Entretanto observou-se uma diminuição da radioatividade do tumor em 24 h. Adicionalmente, esta mesma radioatividade observada apresenta-se mais homogênea em 24 h e 48 h (Figura 53) após a injeção, sugerindo difusão intratumoral das nanopartículas adicionadas.

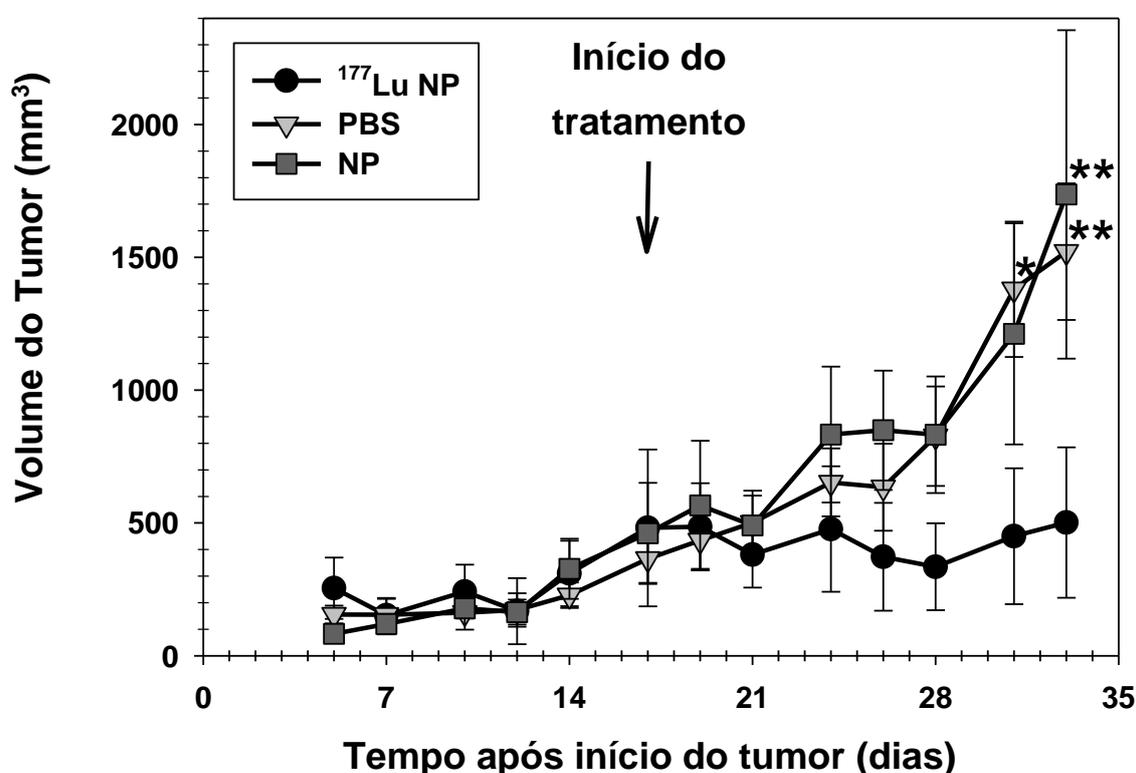
Figura 53: Imagens obtidas após 2, 24 e 48 h para as nanopartículas ^{177}Lu -EuDPA \subset SiO $_2$ -NH $_2$ injetadas intratumoralmente em camundongos *nude*.



Fonte: Fornecida pelo autor

Verificado que as nanopartículas possuem potencialidades na absorção de células tumorais, realizou-se experimentos para investigação do potencial terapêutico do composto $^{177}\text{Lu-EuDPACSiO}_2\text{-NH}_2$ ($^{177}\text{Lu NP}$) após administração intratumoral. Para isso, avaliou-se o volume do tumor dos animais após o tempo de tratamento, considerando o $\text{EuDPACSiO}_2\text{-NH}_2$ como controle positivo (NP) e a solução de tampão fosfato-salino como controle negativo (PBS), como mostrado na Figura 54.

.Figura 54: Avaliação do potencial terapêutico das nanopartículas $^{177}\text{Lu-EuDPACSiO}_2\text{-NH}_2$ ($^{177}\text{Lu NP}$) através da investigação do volume do tumor em função do tempo de observação, antes e após tratamento intravenoso em camundongos *nude*, em comparação com as nanopartículas $\text{EuDPACSiO}_2\text{-NH}_2$ (NP) e o controle negativo (PBS)



Fonte: Fornecida pelo autor

A investigação do potencial terapêutico iniciou após os animais atingissem tumores de aproximadamente 500 mm^3 , o que foi constatado no décimo sexto dia. Após isso, as substâncias foram injetadas e a avaliação do tratamento foi analisada. É possível através da Figura 54 que o composto $^{177}\text{Lu NP}$ apresentou um perfil de regressão do seu volume tumoral após o vigésimo primeiro dia de observação, o que não é apresentado para os controles NP e PBS que continuam a exibir um crescimento do tumor diretamente proporcional ao número de dias. Finalmente,

após o trigésimo terceiro dia de observação o composto ^{177}Lu NP apresenta regressão do tamanho do tumor, comportamento extremamente diferente dos obtidos para os animais analisados após tratamento com o NP e PBS. Este resultado indica que o nosso composto, além de apresentar-se como um ótimo marcador multifuncional (luminescente-radioativo) apresenta-se também bastante promissor para uso em diagnóstico o que é uma característica interessante para composição de um novo radiofármaco em escala nanométrica.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Pode-se concluir que:

i) Nanopartículas à base de NaYF₄:5%Eu:

1. Os compostos NaYF₄:5%Eu e o NaYF₄:5%Eu-NH₂ foram sintetizados e caracterizados com sucesso utilizando difração de raios-x de pó, espectroscopia de fotoluminescência;
2. O tamanho de partículas do NaYF₄:5%Eu-NH₂ foi estimado utilizando a equação de Scherrer (42 nm), microscopia de transmissão (próxima de 20 nm) e DLS (27,7 nm) indicando que o material final encontra-se em nanoescala;
3. As reações de acoplamento foram caracterizadas pelas técnicas de FT-IR e TGA, indicando que todos os compostos conjugados NaYF₄:5% Eu-Coumaric, NaYF₄:5%Eu -Tyr3, NaYF₄:5%Eu -BODIPY COOH, NaYF₄:5% Eu-BODIPY NCS e NaYF₄:5%Eu -ZnPc e NaYF₄:5%Eu -BODIPY NCS/Try3 foram devidamente preparados;
4. As propriedades ópticas de todos os materiais supracitados foram investigadas utilizando espectros de excitação e emissão;
5. As partículas conjugadas foram eficientemente absorvidas por células HT-29, como revelou a microscopia confocal;
6. Os compostos radiomarcados NaYF₄:5% Eu-Coumaric-¹²³I, NaYF₄:5% Eu -Tyr3-¹²³I e NaYF₄:5% Eu -BODIPY NCS/Try3-¹²³I foram obtidos com reação de iodação com valores próximos de 30%;
7. A absorção celular para os compostos radiomarcados NaYF₄:5% Eu-Coumaric-¹²³I, NaYF₄:5% Eu -Tyr3-¹²³I e NaYF₄:5% Eu -BODIPY NCS/Try3-¹²³I pôde ser obtida e as cerca de 20% das partículas foram absorvidas pelas células HT-29.

ii) Nanopartículas à base de EuDPA₂SiO₂-NH₂

1. O composto EuDPA foi devidamente sintetizado e caracterizado por FT-IR, TGA e Luminescência;
2. As nanopartículas híbridas EuDPA₂SiO₂-NH₂ também foram sintetizadas e caracterizadas utilizando SEM, FT-IR, TGA e luminescência;

3. O tamanho de partícula para o material híbrido $\text{EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ foi estimado através das análises de TEM (menor que 50 nm) e de DLS (21.5 nm);
4. A absorção celular das nanopartículas $\text{EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ em células HT-29 revelou que as partículas são marcadores eficientes a nível citoplasmático;
5. Os ensaios do radioinserção do Lu-177 nas nanopartículas mostraram que as partículas $^{177}\text{Lu}\text{-EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ incorporaram 93% da atividade no composto final;
6. Experimentos de absorção celular em função do tempo e da atividade aplicada revelaram uma taxa de absorção de células HT-29 de 13% em ambos os experimentos após a estabilização da curva de absorção.
7. Imagens preliminares de SPECT/CT foram obtidas para o composto $^{177}\text{Lu}\text{-EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ após administração intravenosa em diferentes tempos de tratamento 24h, 48h e 72h, onde observou-se a intensidade da radiação diminuindo na região de análise após 48h, indicando uma leve distribuição da atividade no corpo do animal. Por outro lado, a maior parte das nanopartículas ficaram retidas na região tumoral indicando que o material foi absorvido nesta região.

Como perspectivas futuras pretende-se:

1. Realizar os ensaios in vivo para as partículas $\text{NaYF}_4\text{:5\% Eu-Coumaric-}^{123}\text{I}$, $\text{NaYF}_4\text{:5\% Eu-Tyr3-}^{123}\text{I}$ e $\text{NaYF}_4\text{:5\% Eu-BODIPY NCS/Trp3-}^{123}\text{I}$ avaliando-se a biodistribuição do material após administração intravenosa;
2. Realizar experimentos de biodistribuição para as partículas $^{177}\text{Lu}\text{-EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ após administração intravenosa;
3. Avaliar o potencial das partículas $^{177}\text{Lu}\text{-EuDPA}\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ como radiofarmacos explorando a emissão de radiação beta do Lu-177.

REFERÊNCIAS

- ARNOLD, M. et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. **Gut**, [s. l.], v. 66, n. 4, p. 683–691, 2017. Disponível em: <<http://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2015-310912>>
- ASSIS, R. V. B. F. Screening for Colorectal Cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. **Annals of Internal Medicine**, [s. l.], v. 149, n. 9, p. 627, 2008. Disponível em: <<http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/0003-4819-149-9-200811040-00243>>
- AVCI, P. et al. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. **Seminars in cutaneous medicine and surgery**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 41–52, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4126803&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>
- AYGAR, G. et al. Preparation of silica coated cobalt ferrite magnetic nanoparticles for the purification of histidine-tagged proteins. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, [s. l.], v. 87, p. 64–71, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpcs.2015.08.005>>
- BANERJEE, S.; PILLAI, M. R. A.; KNAPP, F. F. (Russ). Lutetium-177 Therapeutic Radiopharmaceuticals: Linking Chemistry, Radiochemistry, and Practical Applications. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 115, n. 8, p. 2934–2974, 2015. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr500171e>>
- BASU, S. et al. Nanoparticle-mediated targeting of MAPK signaling predisposes tumor to chemotherapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 106, n. 19, p. 7957–7961, 2009. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0902857106>>
- BINNEMANS, K. Interpretation of europium(III) spectra. **Coordination Chemistry Reviews**, [s. l.], v. 295, p. 1–45, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2015.02.015>>
- BIZET, F. et al. Cellular imaging using BODIPY-, pyrene- and phthalocyanine-based conjugates. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 413–420, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.11.050>>
- BLASSE, G.; GRABMAIER, B. C. **Luminescent Materials**. [s.l.] : SpringerVerlag, 1994.
- BORGES, A. S. et al. Synthesis and characterization of the europium(III) pentakis(picrate) complexes with imidazolium counteranions: structural and photoluminescence study. **Inorganic chemistry**, [s. l.], v. 51, n. 23, p. 12867–78, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23151323>>
- BOURGUIGNON, M. H. et al. Iodine-123 labelled radiopharmaceuticals and single-photon

emission tomography: A natural liaison. **European Journal of Nuclear Medicine**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 331–344, 1997.

BOYLE, P.; LEON, M. E. Epidemiology of colorectal cancer. **British Medical Bulletin**, [s. l.], v. 64, n. 1, p. 1–25, 2002. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bmb/article/64/1/1/293587>>

BÜNZLI, J.-C. G.; PIGUET, C. Taking advantage of luminescent lanthanide ions. **Chemical Society reviews**, [s. l.], v. 34, n. 12, p. 1048–77, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16284671>>. Acesso em: 10 jul. 2014.

BURNS, J. H. Crystal Structure of Hexagonal Sodium Neodymium Fluoride and Related Compounds. **Inorganic Chemistry**, [s. l.], v. 4, n. 6, p. 881–886, 1965. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ic50028a025>>

BUYUKCAKIR, O. et al. Tetrastryl-bodipy dyes: Convenient synthesis and characterization of elusive near IR fluorophores. **Organic Letters**, [s. l.], v. 11, n. 20, p. 4644–4647, 2009.

CARNALL, W. T. et al. A systematic analysis of the spectra of the lanthanides doped into single crystal LaF₃. **The Journal of Chemical Physics**, [s. l.], v. 90, n. 7, p. 3443, 1989. Disponível em: <<http://link.aip.org/link/JCPSA6/v90/i7/p3443/s1&Agg=doi>>. Acesso em: 15 mar. 2012.

CHATTERJEE, D. K.; RUFAlHAH, A. J.; ZHANG, Y. Upconversion fluorescence imaging of cells and small animals using lanthanide doped nanocrystals. **Biomaterials**, [s. l.], v. 29, n. 7, p. 937–943, 2008.

CHEN, H. et al. Dual mode emission of core-shell rare earth nanoparticles for fluorescence encoding. **Journal of Materials Chemistry C**, [s. l.], v. 3, n. 24, p. 6314–6321, 2015.

CHEN, X.; LIU, Y.; TU, D. Lanthanide-Doped Luminescent Nanomaterials. In: *Nanomedicine and Nanotoxicology* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. p. 217.

CULLITY, B. D. **ELEMENTS OF X-RAY DIFFRACTION**. SECOND EDI ed. [s.l.] : Addison-Wesley Publishing Company, 1978.

CUNNINGHAM, D. et al. Colorectal cancer. **The Lancet**, [s. l.], v. 375, n. 9719, p. 1030–1047, 2010. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60353-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60353-4)>

CUTLER, C. S. et al. Current and Potential Therapeutic Uses of Lanthanide Radioisotopes. **Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 531–545, 2000. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/cbr.2000.15.531>>

DA LUZ, L. L. et al. Inkjet Printing of Lanthanide-Organic Frameworks for Anti-Counterfeiting Applications. **ACS Applied Materials and Interfaces**, [s. l.], v. 7, n. 49, p.

27115–27123, 2015.

DA SILVA VIANA, R. et al. New experimental and theoretical approach in Eu₂O₃ microspheres: From synthesis to a study of the energy transfer. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, [s. l.], v. 281, p. 1–7, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S101060301300467X>>. Acesso em: 18 maio. 2015.

DE MELLO DONEGÁ, C.; JUNIOR, S. A.; DE SÁ, G. F. Europium(III) mixed complexes with β -diketones and o-phenanthroline-N-oxide as promising light-conversion molecular devices. **Chemical Communications**, [s. l.], n. 10, p. 1199–1200, 1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/CC9960001199>>

DONEGA, C. D. M.; SILVA, E. F. **Spectroscopic properties and design of highly luminescent lanthanide coordination complexes**. [s.l: s.n.]. v. 196

DOST, Z.; ATILGAN, S.; AKKAYA, E. U. Distyryl-boradiazaindacenes: facile synthesis of novel near IR emitting fluorophores. **Tetrahedron**, [s. l.], v. 62, n. 36, p. 8484–8488, 2006.

DUARTE, A. P. et al. Organosilylated complex [Eu(TTA)₃(Bpy-Si)]: A bifunctional moiety for the engineering of luminescent silica-based nanoparticles for bioimaging. **Langmuir**, [s. l.], v. 29, n. 19, p. 5878–5888, 2013.

DZIEDZIC, K. et al. The cytotoxic effect of artificially digested buckwheat products on HT-29 colon cancer cells. **Journal of Cereal Science**, [s. l.], v. 83, n. July, p. 68–73, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521018303631>>

ESCOBEDO, J. O. et al. NIR dyes for bioimaging applications. **Current Opinion in Chemical Biology**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 64–70, 2010.

GHADERI, S.; RAMESH, B.; SEIFALIAN, A. M. Fluorescence nanoparticles “quantum dots” as drug delivery system and their toxicity: a review. **Journal of drug targeting**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 475–486, 2011.

GOMES, M. C. et al. Fluorescence biolabeling using methylated silica nanoparticles containing a lanthanide complex. **Journal of Materials Chemistry B**, [s. l.], v. 1, n. 40, p. 5429, 2013. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c3tb20688b>>

GUERRINI, L.; GARCIA-RICO, E.; ALVAREZ-PUEBLA, R. **The Role of Nanoscience in Cancer Diagnosis**. [s.l.] : Elsevier Inc., 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813339-2.00007-4>>

HAGLUND, E. M. et al. Peptide targeting of quantum dots to human breast cancer cells. In: (M. Osinski, T. M. Jovin, K. Yamamoto, Eds.) 2008, **Anais...** [s.l: s.n.] Disponível em: <<http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?doi=10.1117/12.764107>>

HERMANSON, G. **Bioconjugate Techniques**. [s.l.] : Elsevier, 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/C20090642409>>

HOWELL, R. W. et al. Relative biological effectiveness of alpha-particle emitters in vivo at low doses. **Radiation research**, [s. l.], v. 137, n. 3, p. 352–360, 1994. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8146279>>

HUANG, P. et al. Lanthanide-doped LiLuF₄ Upconversion nanoprobe for the detection of disease biomarkers. **Angewandte Chemie - International Edition**, [s. l.], v. 53, n. 5, p. 1252–1257, 2014.

INCA. **Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>>

International Agency for Research on Cancer. 2018. Disponível em: <<http://www.iarc.fr/>>. Acesso em: 25 jul. 2018.

JOHNSON, N. J. J. et al. Size-Tunable, Ultrasmall NaGdF₄ Nanoparticles: Insights into Their T₁ MRI Contrast Enhancement. **Chemistry of Materials**, [s. l.], v. 23, n. 16, p. 3714–3722, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/cm201297x>>

KIM, Y.-J. et al. Polyimide nanocomposites with functionalized SiO₂ nanoparticles: enhanced processability, thermal and mechanical properties. **RSC Adv.**, [s. l.], v. 4, n. 82, p. 43371–43377, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C4RA04952G>>

KIZILTEPE, T. et al. Rationally engineered nanoparticles target multiple myeloma cells, overcome cell-adhesion-mediated drug resistance, and show enhanced efficacy in vivo. **Blood Cancer Journal**, [s. l.], v. 2, n. 4, 2012.

KOSTIV, U. et al. RGDS- and TAT-Conjugated Upconversion of NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺&SiO₂ Nanoparticles: In Vitro Human Epithelioid Cervix Carcinoma Cellular Uptake, Imaging, and Targeting. **ACS Applied Materials and Interfaces**, [s. l.], v. 8, n. 31, p. 20422–20431, 2016.

KUMAR, R. et al. Combined optical and MR bloimaging using rare earth ion doped NaYF₄ nanocrystals. **Advanced Functional Materials**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 853–859, 2009.

LI, J. et al. Toxicity of inorganic nanomaterials in biomedical imaging. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 727–743, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.12.009>>

LIEBERMAN, D. Progress and Challenges in Colorectal Cancer Screening and Surveillance. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 138, n. 6, p. 2115–2126, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2010.02.006>>

LIMA, P. P.; MALTA, O. L.; ALVES JÚNIOR, S. Estudo espectroscópico de complexos de Eu^{3+} , Tb^{3+} e Gd^{3+} com ligantes derivados de ácidos dicarboxílicos. **Química Nova**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 805–808, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422005000500014&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>

LITTI, L. et al. A SERRS/MRI multimodal contrast agent based on naked Au nanoparticles functionalized with a Gd(III) loaded PEG polymer for tumor imaging and localized hyperthermia. **Nanoscale**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 1272–1278, 2018. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C7NR07398D>>

LIU, C.; YAN, B. Highly effective chemosensor of a luminescent silica@lanthanide complex@MOF heterostructured composite for metal ion sensing. **RSC Advances**, [s. l.], v. 5, n. 123, p. 101982–101988, 2015. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C5RA19973E>>

LIU, M. et al. Mn²⁺-doped NaYF₄:Yb/Er upconversion nanoparticles with amplified electrogenerated chemiluminescence for tumor biomarker detection. **J. Mater. Chem. B**, [s. l.], v. 2, n. 38, p. 6626–6633, 2014. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84907209298&partnerID=tZOtx3y1>>

LIU, Y. et al. Lanthanide-doped luminescent nano-bioprobes: from fundamentals to biodetection. **Nanoscale**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 1369–1384, 2013. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C2NR33239F>>

LONG, N. J. **The Chemistry of Molecular Imaging**. 1 Edition ed. New Jersey: Wiley, 2015.

LOUDET, A.; BURGESS, K. BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 107, n. 11, p. 4891–4932, 2007. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr078381n>>

LU, W.; HONG, H.; CAI, W. Radio-nanomaterials for biomedical applications: State of the art. **European Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 151–170, 2016.

LUAN, L. et al. Phthalocyanine-cRGD conjugate: synthesis, photophysical properties and in vitro biological activity for targeting photodynamic therapy. **Organic & Biomolecular Chemistry**, [s. l.], v. 14, n. 10, p. 2985–2992, 2016. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C6OB00099A>>

MALTA, O. L. Mechanisms of non-radiative energy transfer involving lanthanide ions revisited. **Journal of Non-Crystalline Solids**, [s. l.], v. 354, n. 42–44, p. 4770–4776, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2008.04.023>>

MATTOUSSI, H.; PALUI, G.; NA, H. Bin. Luminescent quantum dots as platforms for probing in vitro and in vivo biological processes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 64, n. 2, p. 138–166, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2011.09.011>>

MCMASTERS, J. et al. Delivery of anti-inflammatory peptides from hollow PEGylated poly(NIPAM) nanoparticles reduces inflammation in an ex vivo osteoarthritis model. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 258, n. May, p. 161–170, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.05.008>>

MOURA, R. T. et al. On the calculation and interpretation of covalency in the intensity parameters of 4f–4f transitions in Eu³⁺ complexes based on the chemical bond overlap polarizability. **Journal of Luminescence**, [s. l.], v. 170, p. 420–430, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022231315004457>>

NASKAR, B. et al. A simple Schiff base molecular logic gate for detection of Zn²⁺ in water and its bio-imaging application in plant system. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, [s. l.], v. 321, p. 99–109, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotochem.2016.01.022>>

NETZ, R. **The Works of Archimedes**. [s.l.] : Cambridge University Press, 2009. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=G7MBoQEACAAJ>>

PAN, Y. et al. Metal-Based Hybrid Nanoparticles as Radiosensitizers in Cancer Therapy. **Colloid and Interface Science Communications**, [s. l.], v. 23, n. December 2017, p. 45–51, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colcom.2018.01.004>>

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2, n. 5, p. 270–278, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20716914>> <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2835915>>

PAVIA, D. L. et al. **Introduction to Spectroscopy**. Fourth Ed. ed. Washington.

PODHORODECKI, A. et al. Multicolor light emitters based on energy exchange between Tb and Eu ions co-doped into ultrasmall β-NaYF₄ nanocrystals. **Journal of Materials Chemistry**, [s. l.], v. 22, n. 12, p. 5356, 2012. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c2jm15785c>>

QIAN, H.-S.; ZHANG, Y. Synthesis of hexagonal-phase core-shell NaYF₄ nanocrystals with tunable upconversion fluorescence. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, [s. l.], v. 24, n. 21, p. 12123–5, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18839973>>

ROY, R.; BAEK, M. G. Multivalent breast cancer T-antigen markers scaffolded onto PAMAM dendrimers. **Methods in Enzymology**, [s. l.], v. 362, n. 1997, p. 240–249, 2003.

SANDLER, R. S. EPIDEMIOLOGY AND RISK FACTORS FOR COLORECTAL CANCER. **Gastroenterology Clinics of North America**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 717–735, 1996. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889855305702715>>

SEITZ, M.; OLIVER, A. G.; RAYMOND, K. N. The lanthanide contraction revisited. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 129, n. 36, p. 11153–60, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3159577&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 12 dez. 2014.

SHAH, K. W. Nanosynthesis Techniques of Silica-Coated Nanostructures. In: **Novel Nanomaterials - Synthesis and Applications**. [s.l.] : InTech, 2018.

SHAH, S. T. et al. Surface Functionalization of Iron Oxide Nanoparticles with Gallic Acid as Potential Antioxidant and Antimicrobial Agents. **Nanomaterials**, [s. l.], v. 7, n. 10, p. 306, 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2079-4991/7/10/306>>

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2018. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 68, n. 1, p. 7–30, 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21442>>

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. Seventh ed ed. [s.l: s.n.].

SMITH, T.; GUILD, J. The C.I.E. colorimetric standards and their use. **Transactions of the Optical Society**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 73–134, 1931. Disponível em: <<http://stacks.iop.org/1475-4878/33/i=3/a=301?key=crossref.3dec82dbb24569e539ed1a7e2fdbbee98>>

SOJKA, B. et al. β -NaGdF₄:Eu³⁺ nanocrystal markers for melanoma tumor imaging. **RSC Adv.**, [s. l.], v. 6, n. 63, p. 57854–57862, 2016. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C6RA10351K>>

SOBRATTEE, M. A. et al. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, [s. l.], v. 579, n. 1–2, p. 200–213, 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0027510705002587>>

STASIUK, G. J.; LONG, N. J. The ubiquitous DOTA and its derivatives: The impact of 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid on biomedical imaging. **Chemical Communications**, [s. l.], v. 49, n. 27, p. 2732–2746, 2013.

STEIN, G.; WÜRZBERG, E. Energy gap law in the solvent isotope effect on radiationless transitions of rare earth ions. **The Journal of Chemical Physics**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 208–213, 1975. Disponível em: <<https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.430264>>

STÖBER, W.; FINK, A.; BOHN, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 62–69, 1968. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0021979768902725>>

STÖCKLIN, G. Bromine-77 and iodine-123 radiopharmaceuticals. **The International Journal**

of **Applied Radiation and Isotopes**, [s. l.], v. 28, n. 1–2, p. 131–148, 1977. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0020708X77901673>>

TAO, C. et al. Pyridine-2,6-dicarboxylic acid for the sensitization of europium(III) luminescence with very long lifetimes. **RSC Advances**, [s. l.], v. 5, n. 72, p. 58936–58942, 2015. a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C5RA08393A>>

TAO, C. et al. Pyridine-2,6-dicarboxylic acid for the sensitization of europium(III) luminescence with very long lifetimes. **RSC Advances**, [s. l.], v. 5, n. 72, p. 58936–58942, 2015. b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C5RA08393A>>

TU, D. et al. Breakdown of Crystallographic Site Symmetry in Lanthanide-Doped NaYF₄ Crystals. **Angewandte Chemie International Edition**, [s. l.], v. 52, n. 4, p. 1128–1133, 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/anie.201208218>>

VALEUR, E.; BRADLEY, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. **Chem. Soc. Rev.**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 606–631, 2009. a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19169468>>

VALEUR, E.; BRADLEY, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. **Chem. Soc. Rev.**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 606–631, 2009. b. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=B701677H>>

WANG, D. et al. Carboxyl BODIPY dyes from bicarboxylic anhydrides: One-pot preparation, spectral properties, photostability, and biolabeling. **Journal of Organic Chemistry**, [s. l.], v. 74, n. 20, p. 7675–7683, 2009.

WARING, M. J. Lipophilicity in drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 235–248, 2010. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17460441003605098>>

WEBER, I. T. et al. High photoluminescent metal - Organic frameworks as optical markers for the identification of gunshot residues. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 83, n. 12, p. 4720–4723, 2011.

WOLFBEIS, O. S. An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging. **Chem. Soc. Rev.**, [s. l.], v. 44, n. 14, p. 4743–4768, 2015. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C4CS00392F>>

YAN, J. et al. Simultaneously targeted imaging cytoplasm and nucleus in living cell by biomolecules capped ultra-small GdOF nanocrystals. **Biomaterials**, [s. l.], v. 59, p. 21–29, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961215004160>>

YANG, Y. Upconversion nanophosphors for use in bioimaging, therapy, drug delivery and bioassays. **Microchimica Acta**, [s. l.], v. 181, n. 3–4, p. 263–294, 2014. Disponível em:

<<http://link.springer.com/10.1007/s00604-013-1139-8>>

YAO, C.; YAO, C.; TONG, Y. Lanthanide ion-based luminescent nanomaterials for bioimaging. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 39, p. 60–71, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2012.07.007>>

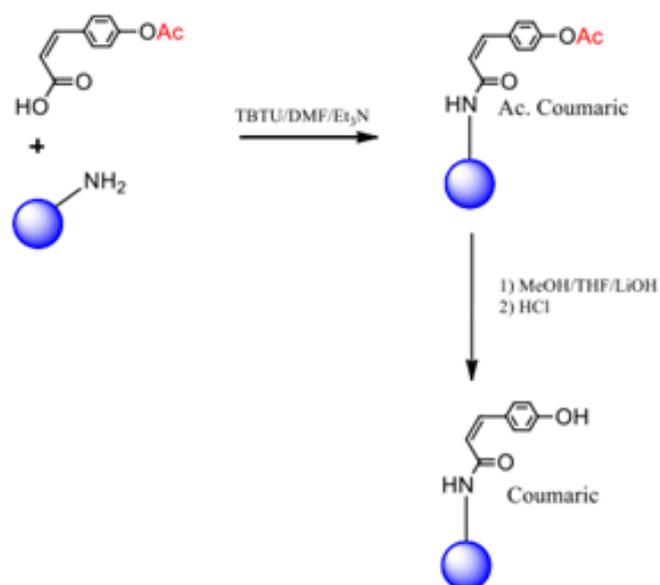
YE, F. et al. Advances in nanotechnology for cancer biomarkers. **Nano Today**, [s. l.], v. 18, p. 103–123, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nantod.2017.12.008>>

YU, M. et al. Preparation and Characteristics of Core–Shell Structure Eu(DBM)₃Phen@SiO₂ Micro-Sphere. **Journal of Materials Science & Technology**, [s. l.], v. 29, n. 9, p. 801–805, 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1005030213001114>>

ZAKARIA, D. et al. Single-crystal structure refinement and luminescence analysis of β -NaEuF₄. **Journal of Alloys and Compounds**, [s. l.], v. 257, n. 1–2, p. 65–68, 1997. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925838897000169>>

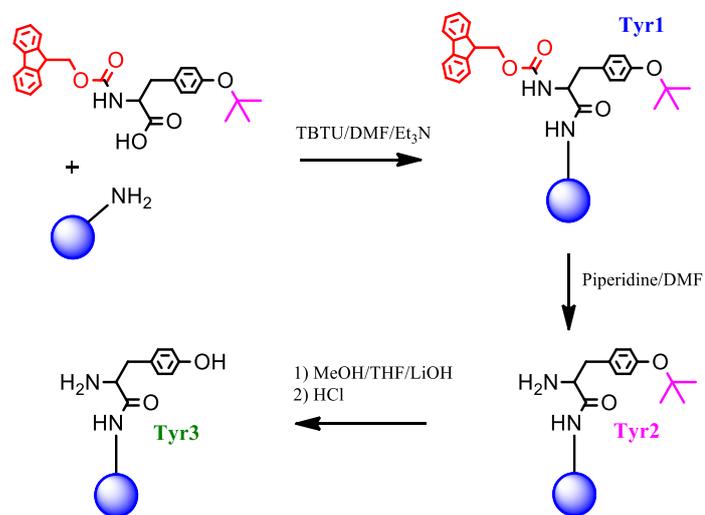
APÊNDICE A: REAÇÕES ENVOLVIDAS NOS PROCESSOS DE CONJUGAÇÃO

Figura S1: Representação do mecanismo de síntese utilizado na obtenção do NaYF₄:5%Eu-Coumaric



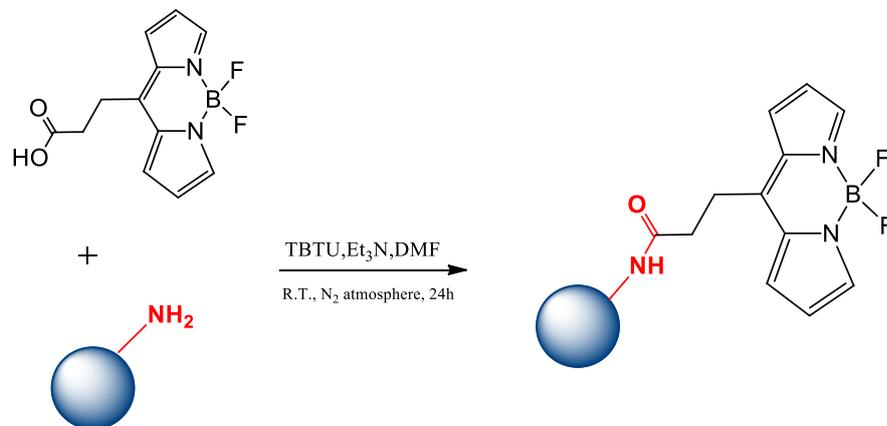
Fonte: Fornecida pelo autor

Figura S2: Representação do mecanismo de síntese utilizado na obtenção do NaYF₄:5%Eu-Tyr3



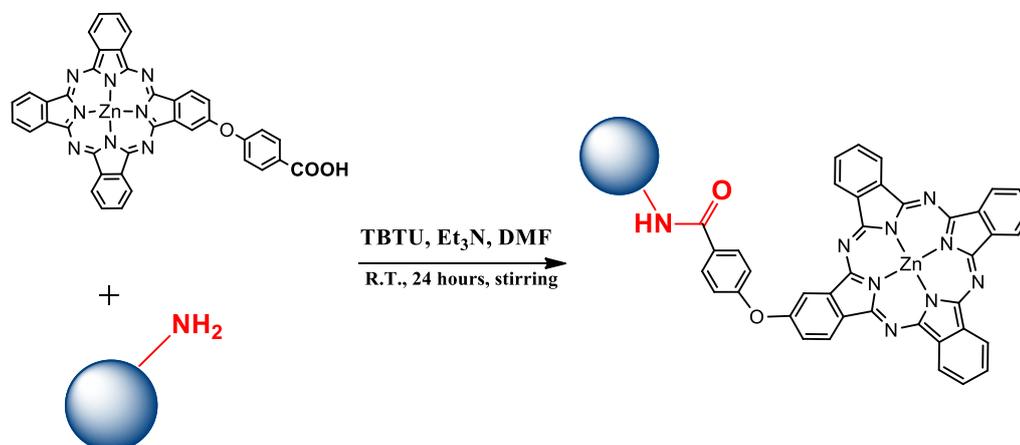
Fonte: Fornecida pelo autor

Figura S3: Representação do mecanismo de síntese utilizado na obtenção do NaYF₄:5%Eu-BODIPY COOH



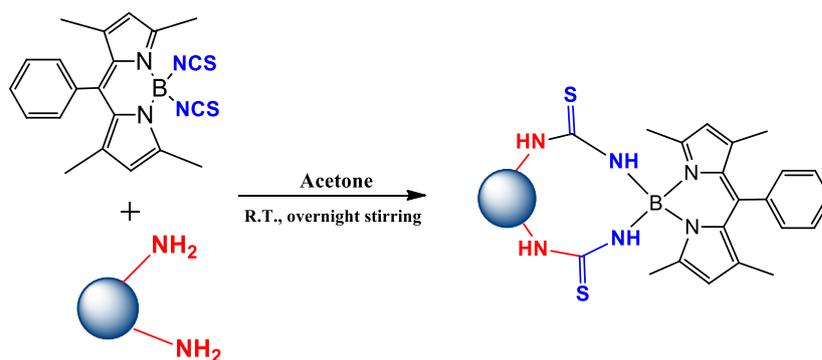
Fonte: Fornecida pelo autor

Figura S4: Representação do mecanismo de síntese utilizado na obtenção do NaYF₄:5%Eu-ZnPC



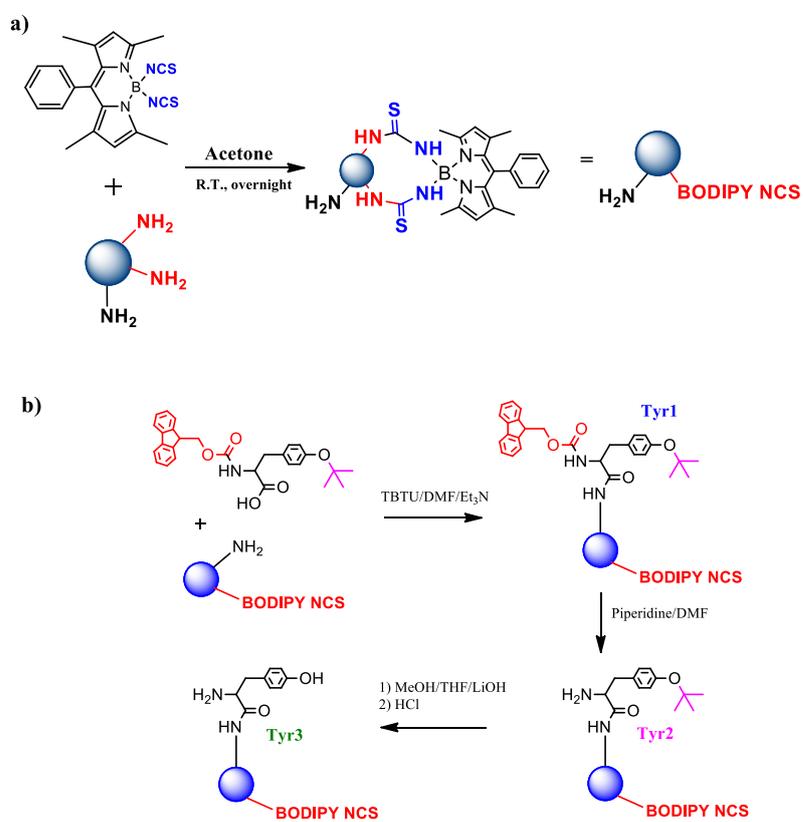
Fonte: Fornecida pelo autor

Figura S5: Representação do mecanismo de síntese utilizado na obtenção do NaYF₄:5%Eu-BODIPY NCS



Fonte: Fornecida pelo autor

Figura S6: Representação do mecanismo de síntese utilizado na obtenção do NaYF₄:5%Eu-BODIPY NCS/Tyr3



Fonte: Fornecida pelo autor