



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA**

JOYCE FRANCINE DA SILVA DE LIMA

**NANOSSONDA $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina-MTX$: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO,
CITOTOXICIDADE E POTENCIAL TERANÓSTICO**

**RECIFE
2023**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL
BACHARELADO EM QUÍMICA**

JOYCE FRANCINE DA SILVA DE LIMA

**NANOSSONDA $Gd_2O_3:Yb/Er$ @Gelatina-MTX: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO,
CITOTOXICIDADE E POTENCIAL TERANÓSTICO**

TCC apresentado ao Curso de Bacharelado em Química da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Ciências Exatas e da Natureza, como requisito para a obtenção do título de bacharel em Química.

Orientador: Severino Alves Júnior

Coorientador: Rodrigo da Silva Viana.

RECIFE

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Lima, Joyce Francine da Silva de.

Nanossonda Gd₂O₃:Yb/Er@Gelatina-MTX: Síntese, caracterização, citotoxicidade e potencial teranóstico / Joyce Francine da Silva de Lima. - Recife, 2023.

71 : il., tab.

Orientador(a): Severino Alves Júnior

Coorientador(a): Rodrigo da Silva Viana

(Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, , 2023.

1. upconversion. 2. glutaraldeído. 3. relaxometria. I. Alves Júnior , Severino. (Orientação). II. Viana, Rodrigo da Silva. (Coorientação). IV. Título.

540 CDD (22.ed.)

JOYCE FRANCINE DA SILVA DE LIMA

**NANOSSONDA Gd₂O₃:Yb/Er@Gelatina-MTX: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO,
CITOTOXICIDADE E POTENCIAL TERANÓSTICO**

TCC apresentado ao Curso de Bacharelado em Química da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Ciências Exatas e da Natureza, como requisito para a obtenção do título de bacharel em Química.

Aprovado em: 19/09/2023.

BANCA EXAMINADORA

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

Dr. Rodrigo da Silva Viana (Coorientador)
Universidade Federal de Alagoas

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

Ma. Caroliny Oliveira Cavalcante (Examinadora)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Inês, agradeço por todo o amor, suporte e conselhos. Obrigada por acreditar em mim e não me deixar desistir. Agradeço por estar sempre presente, por todas as conversas risadas e apoio. Nenhuma palavra é suficiente para expressar o quanto eu te amo. Sem você, nada disso teria sido possível.

Aos amigos que a UFPE me proporcionou e que tornaram meus períodos na universidade menos difíceis, em especialmente Paulo e Bianca, agradeço imensamente.

Ao PET-Química, onde passei a maior parte da minha graduação, agradeço pela contribuição fundamental no meu desenvolvimento como estudante, em especial a Prof^a Giovannia por cada ensinamento, pela generosidade e disponibilidade.

Ao Prof. Severino Júnior e ao Rodrigo Viana, agradeço a oportunidade de desenvolver esse projeto.

Aos meus colegas do Laboratório de Terras Raras, agradeço a amizade, por todas as discussões científicas, pelas risadas, pelos desesperos compartilhados, e por terem contribuído de alguma forma na realização desse trabalho.

Aos professores e funcionários do departamento de Química Fundamental.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (Pibic/UFPE/CNPq) e aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FACEPE.

A todos meu muito obrigada.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo desenvolver uma nanossonda teranóstica para aplicação no câncer colorretal (CCR). Esta nanossonda é composta por nanopartículas (NPs) *upconversion* revestidas com gelatina e conjugadas ao metotrexato (MTX). Inicialmente, foi sintetizado o óxido de gadolínio dopado com itérbio e érbio ($Gd_2O_3:Yb/Er$) por meio da técnica de precipitação homogênea. As partículas $Gd_2O_3:Yb/Er$ foram recobertas com gelatina ($Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina$) por meio do método de dessolvatação. Foram conduzidas quatro sínteses com diferentes concentrações de gelatina com e sem a utilização do glutaraldeído (GA), como agente reticulante. Em seguida, o MTX foi conjugado às NPs por meio do emprego do agente de acoplamento TBTU. A caracterização da nanossonda englobou análises estruturais, relaxométricas, luminescentes e de citotoxicidade. Os resultados indicam a reticulação com GA diminui o tamanho das NPs, sugerindo uma maior compactação das cadeias de gelatina. Observou-se que o revestimento com a gelatina aumenta a concentração de moléculas de água próximas às NPs, por meio de interações de ligação de hidrogênio, além de modular o tempo de difusão das mesmas nas proximidades do centro paramagnético influenciando na diminuição do tempo de relaxação dos prótons. Por outro lado, a reticulação com o GA restringe a mobilidade das moléculas de água, porém todos os valores da relaxividade se mostraram maiores do que agente de contrastes comerciais. Na caracterização luminescente, observou-se que embora o perfil espectral da emissão *upconversion* entre íons Yb^{3+} e Er^{3+} não tenha alterado em relação ao óxido, a razão entre as intensidades de emissão (I_R/I_G) diminuiu com o revestimento e conjugação do MTX. Foi observado também que as NPs $Gd_2O_3:Yb/Er$ e $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina$ não tiveram efeito citotóxico em células saudáveis, apresentando viabilidade celular acima de 90%. Entre as nanossondas sintetizadas, o composto $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX1$, foi a que apresentou o melhor resultado de carga de fármaco (DLC%), com valor de 6,66 %. A nanossonda desenvolvida demonstra propriedades luminescentes e relaxométricas, o que a torna uma ferramenta promissora para bioimagem e teranóstica do CCR.

Palavras-chave: *upconversion*; glutaraldeído; relaxometria.

ABSTRACT

The present study aimed to develop a theranostic nanoprobe for application in colorectal cancer (CRC). This nanoprobe is composed of upconversion nanoparticles (NPs) coated with gelatin and conjugated to methotrexate (MTX). Initially, erbium-ytterbium co-doped gadolinium oxide ($Gd_2O_3:Yb/Er$) was synthesized using the homogeneous precipitation technique. The $Gd_2O_3:Yb/Er$ particles were coated with gelatin ($Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatin$) using the desolvation method. Four syntheses were conducted with different gelatin concentrations and the use of glutaraldehyde (GA) as a cross-linking agent. Subsequently, MTX was conjugated to the NPs using the coupling agent TBTU. The characterization of the nanoprobe included structural, relaxometric, luminescent, and cytotoxicity analyses. The results indicate that cross-linking with GA reduces the size of the NPs, suggesting a greater compaction of the gelatin chains. It was observed that the gelatin coating increases the concentration of water molecules near the NPs through hydrogen bonding interactions and modulates their diffusion time near the paramagnetic center, influencing the decrease in proton relaxation time. On the other hand, cross-linking with GA restricts the mobility of water molecules, by all relaxivity values were found to be higher than those of commercial contrast agents. In the luminescent characterization, it was observed that although the spectral emission profile of upconversion between Yb^{3+} and Er^{3+} ions did not change compared to the oxide, the ratio between emission intensities (I_R/I_G) decreased with the coating and conjugation of MTX. It was also observed that $Gd_2O_3:Yb/Er$ and $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatin$ NPs had no cytotoxic effect on healthy cells, with cell viability above 90%. Among the synthesized nanoprobes, the compound $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatin2_GA-MTX1$ showed the best drug loading results (DLC%), with a value of 6.66%. The developed nanoprobe demonstrates luminescent and relaxometric properties, making it a promising tool for bioimaging and theranostics of CRC.

Keywords: upconversion; glutaraldehyde; relaxometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Representação geral do efeito perturbativo nos orbitais 4f pelas principais interações intra-atômicas e com o campo ligante. 18
- Figura 2:** Espectros de excitação ($\lambda_{Em} = 615 \text{ nm}$) e emissão ($\lambda_{Ex} = 300 \text{ nm}$) do íon európio. 19
- Figura 3:** Representação da UCNPs. 20
- Figura 4:** Diagrama de energia entre o Yb^{3+} e Er^{3+} . 23
- Figura 5:** a) Representação dos prótons na ausência de B_0 ; (b) Alinhamento dos prótons sob B_0 , criando uma magnetização resultante de equilíbrio (M_z) e (c) representação em ampulheta da precessão. 25
- Figura 6:** (a) Após aplicar um B_0 ; (b) Após transmissão de um pulso de radiofrequência; (c) Retornando à posição de equilíbrio; (d) Comportamento dos prótons ao se alinharem novamente na direção do B_0 . 26
- Figura 7:** Vetor magnetização resultante M_z (a) Na presença de B_0 ; (b) Após transmissão de um pulso de RF; (c) Desfasamento entre os spins; (d) Anulamento das projeções no plano xy e diminuição do vetor resultante; (e) Comportamento dos prótons ao se alinhar. 26
- Figura 8:** Estrutura química da gelatina. 29
- Figura 9:** (a) Estrutura química do MTX e (b) estrutura química do ácido fólico. 31
- Figura 10:** Mecanismo de atuação da enzima diidrofolato redutase. 31
- Figura 11:** DRX para o $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$ e Gd_2O_3 simulado obtido do trabalho de Zachariasen et al. (1927). 38
- Figura 12:** Imagens de MEV para os composto a) $\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3:\text{Yb}/\text{Er}$ e b) $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$. 39
- Figura 13:** Espectros de FT-IR para os compostos $\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3:\text{Yb}/\text{Er}$ e $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$. 40
- Figura 14:** TGA para os compostos (a) $\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3:\text{Yb}/\text{Er}$ e (b) $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$. 41
- Figura 15:** a) Espectro de emissão *upconversion* do $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$, com potência em 1900 mW; (b) Espectros de emissão *upconversion* do $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$, com potência variada (500 a 1900 mW) de 510 e 580 nm; (c) Espectros de emissão *upconversion* do composto $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$, com potência variada (500 a 1900 mW) de 630 a 710 nm; (d) Gráfico log-log da

intensidade de emissão em função da potência de bombeamento para o $Gd_2O_3:Yb/Er$. 42

Figura 16: Variação da taxa de relaxação longitudinal ($1/T_1$) e da taxa de relaxação transversal ($1/T_2$) em função da concentração de íons Gd^{3+} (20 MHz, 37°C). 44

Figura 17: DRX para os compostos $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1_GA$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$ e $Gd_2O_3:Yb/Er$. 45

Figura 18: Imagens de MEV e histogramas para os composto a) $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1$, b) $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1_GA$, c) $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2$ e d) $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$. 46

Figura 19: FT-IR para os compostos $Gd_2O_3:Yb/Er$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1_GA$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2$ e $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$. 48

Figura 20: TGA referentes aos compostos $Gd_2O_3:Yb/Er$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2$ e $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$. 49

Figura 21: Espectros de emissão *upconversion* referentes aos compostos $Gd_2O_3:Yb/Er$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1_GA$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2$ e $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$ ($\lambda_{ex} = 980$ nm), com potência de 1900 mW. 50

Figura 22: Citotoxicidade dos compostos a) $Gd_2O_3:Yb/Er$, b) $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1$, c) $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1_GA$, d) $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2$ e e) $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$ 53

Figura 23: Mecanismo de atuação do TBTU, com base nos trabalhos Balalaie; Mahdidoust; Eshaghi-Najafabadi (2008); Valeur; Bradley (2009) obtidos na literatura. 54

Figura 24: TGA referente aos compostos $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX1$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX2$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX3$ e $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX4$. 55

Figura 25: DRX para os compostos $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX1$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$ e $Gd_2O_3:Yb/Er$. 57

Figura 26: Espectros de emissão *upconversion* dos compostos $Gd_2O_3:Yb/Er$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$ e $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX1$

($\lambda_{\text{Ex}} = 980 \text{ nm}$), com potência de 300 mW; a) de 450 a 750 nm e b) de 510 a 590 nm.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições da síntese das nanopartículas de Gd ₂ O ₃ :Yb/Er@Gelatina.	33
Tabela 2: Condições da síntese de Gd ₂ O ₃ :Yb/Er@Gelatina-MTX.	34
Tabela 3: Análise semi-quantitativa das porcentagens de massas para os metais Gd ³⁺ , Yb ³⁺ e Er ³⁺ obtidas pelo EDS para os compostos Gd(OH)CO ₃ :Yb/Er e Gd ₂ O ₃ :Yb/Er.	41
Tabela 4: Diâmetro de partícula dos compostos Gd ₂ O ₃ :Yb/Er@Gelatina1, Gd ₂ O ₃ :Yb/Er@Gelatina1_GA, Gd ₂ O ₃ :Yb/Er@Gelatina2 e Gd ₂ O ₃ :Yb/Er@Gelatina2_GA.	46
Tabela 5: Análise quantitativa da intensidade no vermelho (I _R), intensidade no verde (I _G) e da razão de intensidades verde e vermelha (I _R /I _G) referentes aos compostos Gd ₂ O ₃ :Yb/Er, Gd ₂ O ₃ :Yb/Er@Gelatina1, Gd ₂ O ₃ :Yb/Er@Gelatina1_GA, Gd ₂ O ₃ :Yb/Er@Gelatina2 e Gd ₂ O ₃ :Yb/Er@Gelatina2_GA.	50
Tabela 6: Relaxividades obtidas para os sistemas a 37 °C e 60 MHz (1,41 T).	52
Tabela 7: Resultado de DLC% para os compostos sintetizados.	56
Tabela 8: Análise quantitativa da intensidade no vermelho (I _R) da intensidade no verde (I _G) e da razão de intensidades verde e vermelhas (I _R /I _G) para os compostos Gd ₂ O ₃ :Yb/Er, Gd ₂ O ₃ :Yb/Er@Gelatina2_GA e Gd ₂ O ₃ :Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX1.	58
Tabela 9: Relaxividades obtidas para as amostras Gd ₂ O ₃ :Yb/Er, Gd ₂ O ₃ :Yb/Er@Gelatina2_GA e Gd ₂ O ₃ :Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX1 a 37 °C a 60MHz (1,41 T).	59

LISTA DE ABREVIações

ACs	Agentes de contraste
CCR	Câncer colorretal
DHF	Diidrofolato
DHFR	Diidrofolato redutase
DRX	Difração de raios-X
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X
EPR	Permeabilidade e retenção aumentada (do inglês <i>Enhanced Permeability and Retention</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FPGS	<i>Folilpoliglutamil sintase</i>
FT-IR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (do inglês <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
GA	Glutaraldeído
Gd ³⁺	Íon gadolínio trivalente
I _G	Intensidade de emissão no verde
I _R	Intensidade da emissão no vermelho
I _R /I _G	Razão de intensidades de emissão no verde e de emissão no vermelho
IRM	Imagem por ressonância magnética
Ln ³⁺	Íons lantanídeos trivalentes
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTX	Metotrexato
MTX-Glu	MTX poliglutamato
NIR	Radiação na região do infravermelho próximo (do inglês <i>near-infrared</i>)
NPs	Nanopartículas
RF	Radiofrequência
TBTU	Tetrafluoborato O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-Tetrametil-urânio
TGA	Análise termogravimétrica (do inglês <i>thermogravimetric analysis</i>)
THF	Tetraidrofolato
UCNPs	Nanopartículas de <i>upconversion</i> (do inglês <i>upconversion nanoparticles</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

r_i	relaxividade
T_1	Tempo de relaxação longitudinal
T_2	Tempo de relaxação transversal
M_0	Magnetização do campo magnético
M_Z	Magnetização resultante
I_{up}	Intensidade de emissão
$(\frac{1}{T_i})_d$	Taxa de relaxação diamagnética
$(\frac{1}{T_i})_{obs}$	Taxa de relaxação observada
$(\frac{1}{T_i})_p$	Taxa de relaxação paramagnética
$1/T_1$	Taxa de relaxação longitudinal
$1/T_2$	Taxa de relaxação transversal
P	Potência de excitação
N	Número de fótons bombeados
B_0	Campo magnético externo
H_C	Hamiltoniano coulombiano
H_{CC}	Hamiltoniano do campo central
H_S	Hamiltoniano stark
H_{SO}	Hamiltoniano acoplamento spin-órbita

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral	15
2.2	Objetivos Específicos	15
3	REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1	Lantanídeos	16
3.2	<i>Upconversion</i>	19
3.3.1	Sistema Yb ³⁺ /Er ³⁺	22
3.3	Imagem por Ressonância Magnética	24
3.4	Biopolímeros e seu Uso no Recobrimento de Nanomateriais	28
3.4.1	Gelatina	29
3.5	Metotrexato	30
4	METODOLOGIA	32
4.1	Reagentes	32
4.2	Síntese do Gd ₂ O ₃ :Yb/Er	32
4.3	Síntese do Gd ₂ O ₃ :Yb/Er@Gelatina	32
4.4	Síntese do Gd ₂ O ₃ :Yb/Er@Gelatina-MTX	33
4.5	Caracterizações	34
4.5.1	Difração de raios-X	34
4.5.2	Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X	34
4.5.3	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	35
4.5.4	Análise Termogravimétrica	35
4.5.5	Espectroscopia de Luminescência	35
4.5.6	Relaxometria	36
4.5.7	Viabilidade celular	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	Gd ₂ O ₃ :Yb/Er	38
5.2	Gd ₂ O ₃ :Yb/Er@Gelatina	44
5.3	Gd ₂ O ₃ :Yb/Er@Gelatina-MTX	53
6	CONCLUSÃO	60
	PESPECTIVA	61
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) é uma doença caracterizada pela presença de tumores no cólon e no reto, que fazem parte do intestino grosso. Sua principal origem são lesões na parede do intestino, conhecidas como pólipos, os quais, se não tratados, podem evoluir para um quadro de câncer (American Cancer Society, 2020). De acordo com o relatório GLOBOCAN 2020 da *International Agency for Research on Cancer* (IARC), o CCR é a terceira neoplasia mais comum no mundo, correspondendo a 10% dos cerca de 19,3 milhões de novos casos de câncer diagnosticados, ficando atrás apenas do câncer de mama (11,7%) e do câncer de pulmão (11,4%). Em relação à mortalidade, o CCR ocupa a segunda posição, com aproximadamente 10 milhões de óbitos registrados globalmente, evidenciando a gravidade dessa doença (IARC, 2023). No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o CCR ocupa a terceira posição entre os tipos de câncer mais frequentes no país (excluindo o câncer de pele não melanoma). Estima-se que ocorrerão 45.630 novos casos de CCR durante o triênio de 2023 a 2025. Em relação à mortalidade no Brasil, em 2020 foram registrados 20.245 óbitos por câncer de cólon e reto, correspondendo a uma taxa de 9,56 óbitos por 100 mil habitantes (INCA, 2022).

O principal método de diagnóstico do CCR é por meio da colonoscopia, um procedimento que consiste na introdução de um tubo fino, chamado colonoscópio no intestino grosso. O colonoscópio possui uma pequena câmera de vídeo permitindo a visualização do cólon e do reto. Durante o exame, além da visualização é possível remover os pólipos, caso sejam detectados, os quais são enviados para análise laboratorial por meio de biópsia. Uma vez confirmada a presença de câncer é iniciado o estadiamento, que permite obter informações sobre o estágio e avaliar a extensão da neoplasia e para isso são utilizados exames de imagem, como a tomografia computadorizada, ultrassonografia, entre outros (INCA, 2022 e American Cancer Society, 2020). O tratamento principal para o CCR é a cirurgia, frequentemente acompanhada pela radioterapia e/ou quimioterapia. A radioterapia e a quimioterapia podem ser administradas antes da cirurgia, com o objetivo de reduzir o tamanho do tumor e facilitar a sua remoção, sendo denominada terapia neoadjuvante. Também podem ser administradas após a cirurgia, conhecida como terapia adjuvante, visando destruir eventuais células cancerígenas remanescentes (Cisterna *et al.*, 2016; INCA, 2022).

No mercado de tratamento e diagnóstico do CCR, diversas empresas têm se destacado. Entre as empresas líderes nesse campo estão a Roche (Conitec, 2022) e a Exact Sciences (Imperiale *et al.*, 2014), entre outras. Essas empresas estão dedicando esforços significativos em pesquisa para o desenvolvimento de terapias-alvo, imunoterapias e medicamentos, além de soluções de diagnóstico. Apesar das técnicas bem estabelecidas para o tratamento, diagnóstico e estadiamento, há uma busca constante por métodos alternativos que possam complementar e aprimorar as abordagens existentes, visando desenvolver técnicas ainda mais específicas para o CCR. Uma dessas alternativas é a exploração da nanociência no desenvolvimento de nanoteranósticos, que consistem em sistemas nanométricos capazes de fornecer tanto o diagnóstico quanto o tratamento para as células cancerígenas.

O termo "teranóstico", que foi empregado inicialmente por Funkhouser em 2002, refere-se a um material que combina diagnóstico e terapia (Funkhouser, 2002). Os nanoteranósticos referem-se a sistemas nanométricos que integram ações terapêuticas e diagnósticas em um único agente (Enrico, 2018; Aminolroayaei *et al.*, 2021). Na nanoteranóstica, as nanopartículas (NPs) são utilizadas como agente teranóstico, sendo possível explorar algumas propriedades físico-químicas como luminescência e magnetismo, o que pode ser útil para o diagnóstico e monitoramento, além da sua grande área superficial que permite acoplar uma quantidade maior de agentes terapêuticos (Cabeza *et al.*, 2020). Além disso, as NPs apresentam maior tendência em se acumularem no tumor devido ao efeito conhecido como permeabilidade e retenção aumentada (EPR, do inglês *Enhanced Permeability and Retention*) (Enrico, 2018; Robertson; Rendina, 2021).

O EPR refere-se à capacidade das NPs de penetrarem no microambiente tumoral devido à maior vascularização dos vasos endoteliais presentes no tumor em comparação com o tecido saudável (Zi *et al.*, 2022). Esse efeito promove o acúmulo das NPs nos tecidos tumorais em detrimento dos tecidos saudáveis, o que aumenta a eficácia do tratamento e reduz a toxicidade em outros órgãos e tecidos (Rajora *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2019). O efeito de permeabilidade e retenção aumentada é um fator de grande importância a ser considerado no desenvolvimento de tratamentos de câncer que envolvem o uso de nanotecnologia (Shan *et al.*, 2022). Em suma, o desenvolvimento de nanoteranósticos representa uma abordagem promissora para o tratamento, diagnóstico, estadiamento e acompanhamento do CCR. A nanociência

oferece oportunidades para aprimorar as terapias existentes e melhorar os resultados para os pacientes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Sintetizar a nanossonda $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina-MTX$ e investigá-la como um potencial material teranóstico para o câncer colorretal.

2.2 Objetivos Específicos

- (i) Síntese do $Gd_2O_3:Yb/Er$;
- (ii) Caracterização estrutural, luminescente e relaxométrica do $Gd_2O_3:Yb/Er$;
- (iii) Investigar a viabilidade celular das NPs $Gd_2O_3:Yb/Er$ em ensaios *in vitro*;
- (iv) Síntese das NPs $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina$;
- (v) Caracterização estrutural, luminescente e relaxométrica das NPs $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina$;
- (vi) Investigar a viabilidade celular das NPs $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina$ em ensaios *in vitro*.
- (vii) Síntese de acoplamento do MTX as nanossondas $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina$;
- (viii) Caracterização estrutural, luminescente e relaxométricas das NPs $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina-MTX$;

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Lantanídeos

Os lantanídeos são um grupo de quinze elementos que se encontram no quarto período da Tabela Periódica e pertencem ao bloco f, formando a série lantanídica. Essa série tem início com o lantânio (La, $Z = 57$) e se encerra com o lutécio (Lu, $Z = 71$) (Bettencourt-Dias, 2014). A configuração eletrônica dos lantanídeos é geralmente $[\text{Xe}]4f^n6s^2$, em que n varia de um a quatorze, exceto para o lantânio, cério, gadolínio e lutécio, que apresentam a configuração $[\text{Xe}]4f^{n-1}5d^16s^2$. O estado de oxidação mais comum e amplamente estudado dos lantanídeos é $3+$, em razão de sua maior estabilidade. Os íons lantanídeos trivalentes (Ln^{3+}) apresentam configurações eletrônicas $[\text{Xe}]4f^n$, onde o orbital 4f é preenchido progressivamente ao longo da série lantanídica, com n variando de zero a quatorze (Eliseeva; Bünzli, 2010; Bettencourt-Dias, 2014).

Nos lantanídeos, os elétrons do orbital 4f estão localizados em camadas mais internas em relação aos elétrons dos orbitais 5s e 5p. Essa configuração eletrônica resulta em um fenômeno conhecido como efeito blindagem, no qual os elétrons do orbital 4f são "blindados" pelos elétrons dos orbitais posteriores, reduzindo sua propensão para interagir com o ambiente externo, especialmente em resposta a perturbações promovidas pelo campo ligante. Isso resulta em uma energia praticamente invariável e independente da matriz que esses íons se encontram (Belian, 2008).

A equação de Schrödinger descreve o comportamento do elétron em átomos (Bettencourt-Dias, 2014). Ela é representada por:

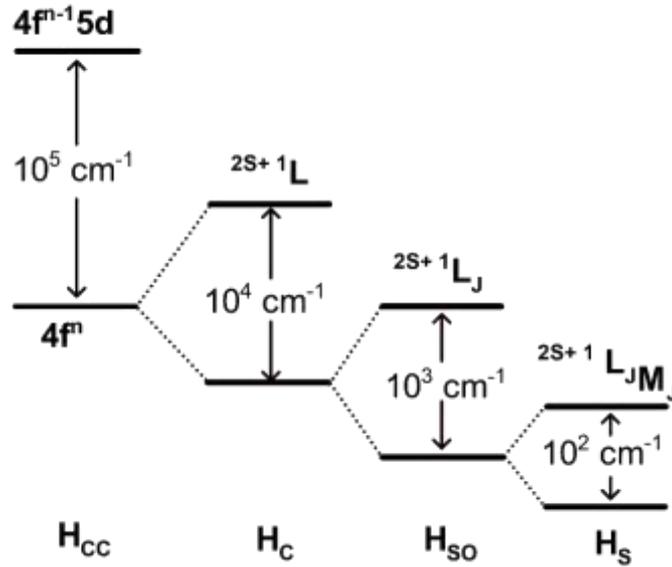
$$H\psi = E\psi \quad (1)$$

onde H é o operador Hamiltoniano que atua sobre a função de onda ψ , resultando em um valor de energia. Ao tratar de átomos hidrogenóides, é possível obter soluções exatas para essa equação. No entanto, ao tratar átomos polieletrônicos, a resolução desse problema requer uma aproximação. Uma das aproximações comumente utilizadas é a aproximação do campo central, onde a energia total é descrita pelo Hamiltoniano do campo central (H_{CC}), correspondente à energia cinética dos elétrons

e à energia de atração eletrostática elétron-núcleo. Nessa aproximação, assume-se que cada elétron se move independentemente dos demais e se comporta como uma esfera simétrica (Bettencourt-Dias, 2014). No entanto, quando a interação elétron-elétron é levada em consideração, o elétron sente não apenas a atração eletrostática do núcleo, mas também a repulsão eletrostática dos outros elétrons. Isso resulta na atenuação da atração elétron-núcleo. Nesse caso, a energia total do sistema passa a ser descrita pelo Hamiltoniano coulombiano (H_C), que leva em consideração a interação eletrostática repulsiva entre os elétrons (Belian, 2008; Bettencourt-Dias, 2014).

Além das interações eletrônicas formadas pelo campo central e pela repulsão coulombiana, ocorre a interação spin-órbita, resultando em um acoplamento entre o momento angular orbital (L) e do momento angular de spin (S). Esse acoplamento causa a quebra da degenerescência nos níveis eletrônicos, com uma energia da ordem de 10^3 cm^{-1} , descrita pelo Hamiltoniano acoplamento spin-órbita (H_{SO}) (Belian, 2008; Bettencourt-Dias, 2014). As interações eletrônicas formadas pelo campo central e pela repulsão coulombiana, juntamente ao acoplamento spin-órbita, ocorrem no íon livre. A interação spin-órbita desempenha um papel fundamental para o entendimento das propriedades espectroscópicas dos Ln^{3+} , pois leva à formação dos termos espectroscópicos $^{2S+1}L_J$, que descrevem os níveis energéticos dos Ln^{3+} . No entanto, quando os íons lantanídeos estão presentes em reticulados inorgânicos ou compostos em geral, cada elétron também sofre o efeito perturbativo gerado pelos ligantes que cercam o íon metálico. Esse efeito é chamado de efeito do campo cristalino ou efeito Stark, o que resulta na quebra da degenerescência de $2J+1$, que possuem números quânticos M_J , onde a energia total é descrita pelo hamiltoniano stark (H_S) (Bettencourt-Dias, 2014). A representação geral dos efeitos perturbativos promovido nos orbitais 4f são mostrados a **Figura 1**.

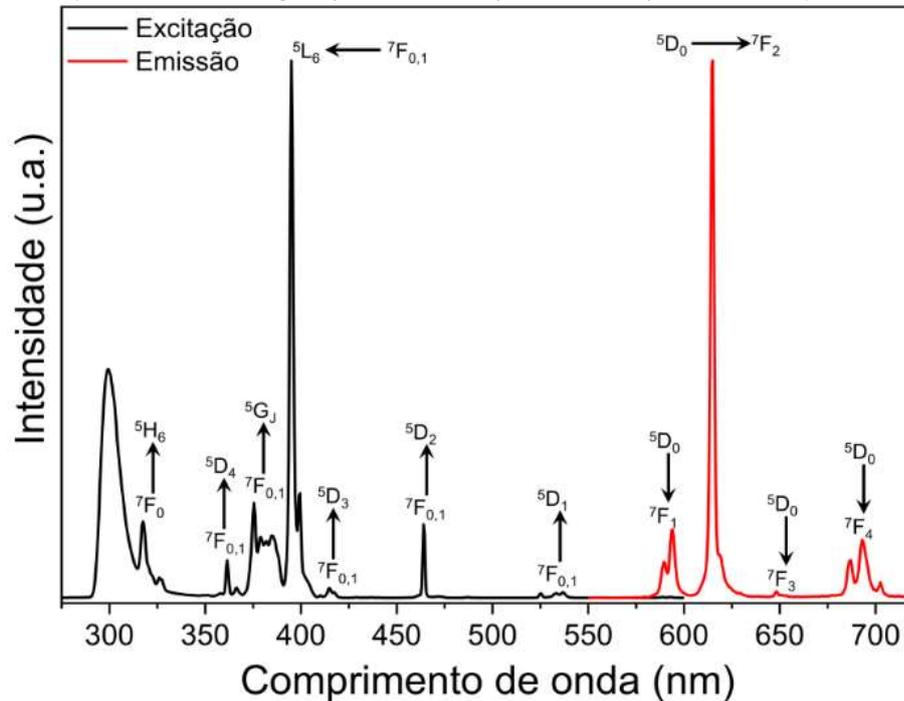
Figura 1: Representação geral do efeito perturbativo nos orbitais $4f$ pelas principais interações intra-atômicas e com o campo ligante.



Fonte: Adaptado de Bettencourt-Dias (2014).

O campo ligante promove uma distorção na simetria esférica no íon, sendo essa quebra da simetria responsável pelo relaxamento da regra de Laporte. Segundo a regra de Laporte, transições eletrônicas que conservem paridade são proibidas. Isto significa que, em simetria esférica, por exemplo, que apresenta uma paridade bem definida, as transições $f-f$ não podem ocorrer. No entanto, com a ocorrência dessa distorção, surgem transições eletrônicas que antes eram proibidas (Belian, 2008). Devido à proibição das transições $f-f$, a emissão dos íons Ln^{3+} apresenta um longo tempo de vida, o que resulta em transições eletrônicas nítidas e intensas, conforme ilustrado na **Figura 2**, como explica o princípio da incerteza (Belian, 2008).

Figura 2: Espectros de excitação ($\lambda_{Em} = 615 \text{ nm}$) e emissão ($\lambda_{Ex} = 300 \text{ nm}$) do íon európio.



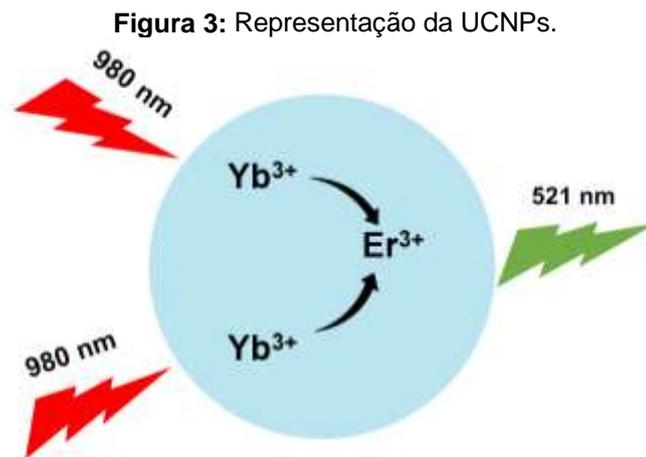
Fonte: Pereira (2019).

3.2 *Upconversion*

A conversão ascendente de energia, também conhecida como *upconversion*, é um processo óptico que converte fótons com energia menor em fótons com energia maior, por meio da absorção sequencial de dois ou mais fótons, resultando na emissão de radiação com comprimento de onda menor (Li *et al.*, 2020). A técnica de *upconversion* permite converter radiação na região do infravermelho em luz visível ou ultravioleta, o que tem implicações significativas em diversos campos, incluindo a biomedicina. A radiação na região do infravermelho próximo, mais conhecida como NIR (do inglês *near-infrared*), corresponde à faixa da primeira janela do infravermelho, que abrange aproximadamente de 700 a 1400 nm. Ela apresenta baixa absorção nos tecidos biológicos e maior capacidade de penetração, permitindo aplicações importantes, como a detecção de câncer (Zhang *et al.*, 2021; Ansari; Parchur; Chen, 2022).

As nanopartículas de *upconversion*, mais conhecida como UCNPs (do inglês *upconversion nanoparticles*), dopadas com Ln^{3+} apresentam características ópticas, como tempos de vida na ordem de micro/milissegundos e grandes deslocamentos anti-Stokes. Quando irradiadas na região do NIR, as UCNPs exibem altas razões

sinal-ruído, causam mínimo fotodano na pele e têm notável capacidade de penetração em aplicações *in vitro* e *in vivo*. Essas nanopartículas são geralmente compostas por uma matriz hospedeira inorgânica dopada com íons metálicos que desempenham o papel de íons ativadores e/ou sensibilizadores (**Figura 3**) (Zhang *et al.*, 2021; Ansari; Parchur; Chen, 2022). A matriz hospedeira inorgânica é responsável por fornecer uma estrutura que permite a incorporação e interação dos íons ativadores e/ou sensibilizadores, viabilizando o processo de *upconversion*. É importante que a matriz seja capaz de acomodar os íons ativadores e/ou sensibilizadores, o que é conhecido como tolerância para centros luminescentes. Além disso, é preferível que a matriz hospedeira apresente baixa energia de fônons, de modo a minimizar os relaxamentos não radiativos e evitar a perda de energia por dissipação térmica (Dong; Sun; Yan, 2015; Dacosta *et al*, 2014).



Fonte: Autoria própria.

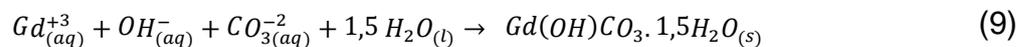
Outra característica desejável é a transparência na região NIR, para permitir a livre migração de fótons na rede cristalina, sendo crucial para a absorção e a emissão de fótons, seja realizada apenas pelos íons ativadores e sensibilizadores. Por fim, a estabilidade química da matriz hospedeira é fundamental para preservar a integridade das estruturas cristalinas originais. Diferentes tipos de materiais inorgânicos, como óxidos, fluoretos e outros compostos, podem ser utilizados como matrizes hospedeiras (Dong; Sun; Yan, 2015; Ansari; Parchur; Chen, 2022; Dacosta *et al*, 2014). Entre os óxidos metálicos, o óxido de gadolínio (Gd_2O_3) é amplamente utilizado como rede hospedeira para o desenvolvimento de materiais luminescentes. Isso se deve à excelente estabilidade química e térmica, sua baixa energia fônica ($\sim 600\text{ cm}^{-1}$) e

facilidade de dopagem com íons lantanídeos. Assim, o Gd_2O_3 é considerado um material promissor para o desenvolvimento de novas sondas para direcionamento de fármacos e técnicas de bioimagem, seja para marcação de moléculas ou teranóstica (Ahmad *et al.*, 2020; Ortega-Berlanga *et al.*, 2021).

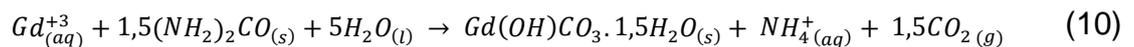
O Gd_2O_3 pode ser sintetizado por diversas técnicas, incluindo a síntese hidrotérmica, precipitação homogênea, decomposição térmica de precursores, entre outras. A técnica de precipitação homogênea envolve a gradual liberação de agentes precipitantes na solução. Essa técnica foi proposta por Matijević e Hsu (1987) para a síntese de óxidos de lantanídeos e baseia-se na hidrólise da ureia, que libera íons carbonatos e hidróxidos na solução, formando hidroxicarbonatos de íons metálicos, conforme demonstrados pelas **equações 3 a 10**. Esses precursores são posteriormente convertidos em óxidos metálicos através de tratamento térmico, mantendo a morfologia dos precursores (Skoog; Holler; Crouch, 2015; Ortega-Berlanga *et al.*, 2021).



A reação de precipitação do hidroxicarbonato de gadolínio:



Reação global:



Ainda no que se refere as propriedades ópticas dos UCNPs, os sensibilizadores têm a função de transferir energia para os ativadores. A seção transversal de absorção é um aspecto importante para os sensibilizadores, pois uma seção transversal de absorção relativamente grande, na ordem de 10^{-21} (no caso dos lantanídeos), permite a absorção eficiente de fótons de baixa energia. A ressonância entre os níveis de

energia do estado excitado do sensibilizador e do estado excitado do ativador, permite uma transferência eficiente de energia. Também é importante que o estado excitado do sensibilizador esteja na região do NIR para permitir a absorção eficiente da radiação incidente (Dong; Sun; Yan, 2015; Ansari; Parchur; Chen, 2022). A escolha típica para sensibilizador dentre os Ln^{3+} é o íon itérbio (Yb^{3+}), pois ele apresenta uma grande seção transversal de absorção, em relação a outros Ln^{3+} , cerca de $9,11 \times 10^{-21} \text{ cm}^{-2}$. Além disso, possui um diagrama de energia simples, contendo apenas um único estado excitado de energia. A diferença de energia entre seu estado fundamental ($^2\text{F}_{7/2}$) e seu estado excitado ($^2\text{F}_{5/2}$) corresponde à região do NIR, aproximadamente no comprimento de onda de 976 nm, e se sobrepõe bem com muitas das transições eletrônicas f-f de íons ativadores (Dong; Sun; Yan, 2015).

O íon ativador desempenha a função de absorver a energia transferida pelo íon sensibilizador e emitir fótons de maior energia durante o processo de *upconversion*. É essencial que os íons ativadores possuam níveis de energia compatíveis (ressonantes) com os íons sensibilizadores e com a região de emissão desejada. Dentre os íons Ln^{3+} comumente utilizados em materiais *upconversion*, destacam-se o hómio (Ho^{3+}), o túlio (Tm^{3+}) e o érbio (Er^{3+}). No entanto, entre esses três ativadores, o Er^{3+} apresenta a maior eficiência de *upconversion*. Isso se deve a diferenças de energia semelhantes entre os níveis $^4\text{I}_{15/2}$ e $^4\text{I}_{11/2}$ (primeira transição ascendente) e $^4\text{I}_{11/2}$ e $^4\text{F}_{7/2}$ (segunda transição ascendente) (Dong; Sun; Yan, 2015; Ansari; Parchur; Chen, 2022; Dacosta *et al.*, 2014).

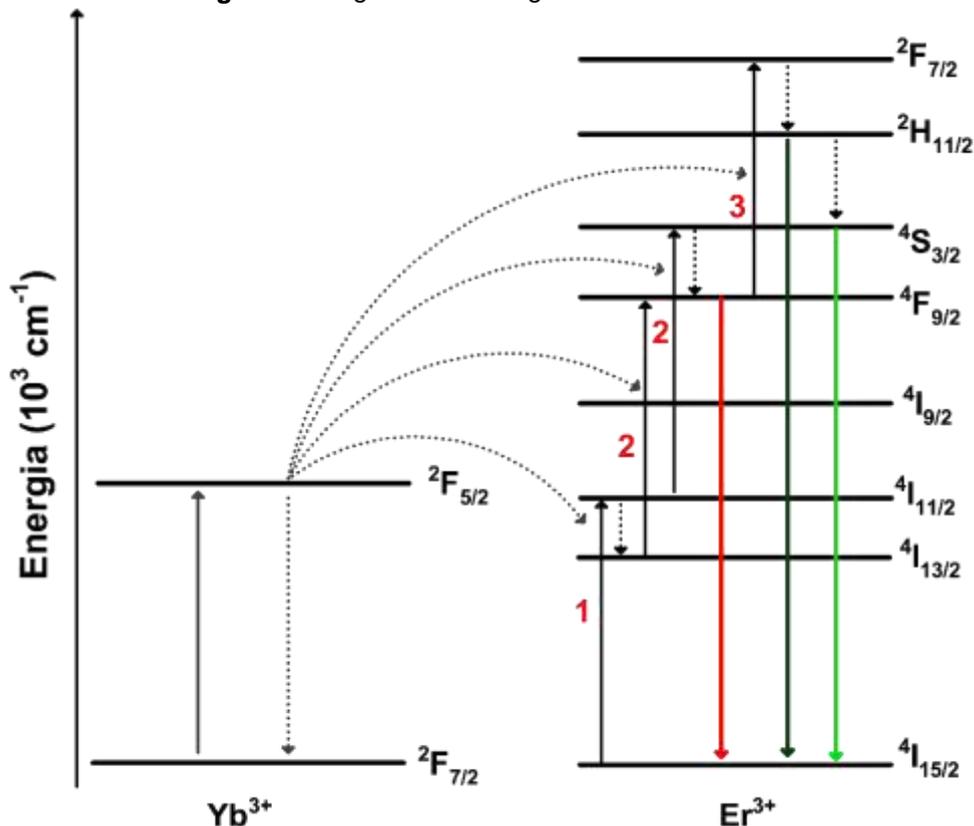
3.3.1 Sistema $\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$

Para as UCNPs dopadas com Yb^{3+} e Er^{3+} , as principais emissões sob excitação em 980 nm são as de luz verde e vermelha na região visível, sendo possível ocorrerem emissão de luz azul. As emissões na cor verde ocorrem na faixa de 510 a 570 nm e são atribuídas às transições dos estados excitados $^2\text{H}_{11/2}$ e $^4\text{S}_{3/2}$ para o estado fundamental $^4\text{I}_{15/2}$. A emissão vermelha ocorre na faixa de 610 a 630 nm e é atribuída a transição do estado excitado $^4\text{F}_{9/2}$ para o estado fundamental $^4\text{I}_{15/2}$ (Dong; Sun; Yan, 2015). Essas transições são mostradas na **Figura 4**, onde a ressonância entre os íons Yb^{3+} e Er^{3+} é claramente ilustrada, respectivamente na transição $^2\text{F}_{7/2} \rightarrow ^2\text{F}_{5/2}$ e na transição $^4\text{I}_{15/2} \rightarrow ^5\text{I}_{11/2}$. O mecanismo típico de transferência de energia envolve a absorção de fótons na região do NIR pelo o Yb^{3+} , gerando a transição $^2\text{F}_{7/2} \rightarrow ^2\text{F}_{5/2}$.

Em seguida, esse íon transfere a energia ao Er^{3+} adjacente, retornando ao seu estado fundamental, $^2\text{F}_{7/2}$. Isso promove o íon Er^{3+} ao estado excitado $^4\text{I}_{11/2}$ (rota 1, $^4\text{I}_{15/2} \rightarrow ^4\text{I}_{11/2}$) (Dacosta *et al.*, 2014; Dong; Sun; Yan, 2015; Wang *et al.*, 2019).

Após a absorção de um segundo fóton por meio do Yb^{3+} , o íon Er^{3+} é populado para estados excitados mais altos, o $^4\text{S}_{3/2}$ e/ou o $^4\text{F}_{9/2}$ (rota 2, $^4\text{I}_{11/2} \rightarrow ^4\text{S}_{3/2}$ ou $^4\text{I}_{13/2} \rightarrow ^4\text{F}_{9/2}$). O Er^{3+} populado no estado excitado $^4\text{S}_{3/2}$ pode relaxar radiativamente para o estado $^4\text{I}_{15/2}$, gerando emissão verde, por meio da transição ($^4\text{S}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$). Alternativamente, o elétron no estado $^4\text{F}_{9/2}$, que é populado por transferência não radiativa a partir de níveis de energia mais altos ou por transferência de energia ressonante de $^4\text{I}_{13/2}$, pode relaxar radiativamente, resultando em emissões na região do vermelho por meio da transição $^4\text{F}_{9/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ (Dacosta *et al.*, 2014; Dong; Sun; Yan, 2015; Wang *et al.*, 2019). Além disso, o íon Er^{3+} pode absorver um terceiro fóton, populando o estado $^2\text{H}_{11/2}$ (rota 3, $^4\text{F}_{9/2} \rightarrow ^2\text{H}_{11/2}$) e, em seguida, sofrer decaimentos não radioativos para o estado $^2\text{H}_{11/2}$ ou para o estado $^4\text{S}_{3/2}$. À medida que os elétrons retornam ao seu estado fundamental, podem ocorrer emissões de luz na região do verde correspondentes a faixa de 510 a 570 nm. (Dacosta *et al.*, 2014; Dong; Sun; Yan, 2015; Wang *et al.*, 2019).

Figura 4: Diagrama de energia entre o Yb^{3+} e Er^{3+} .

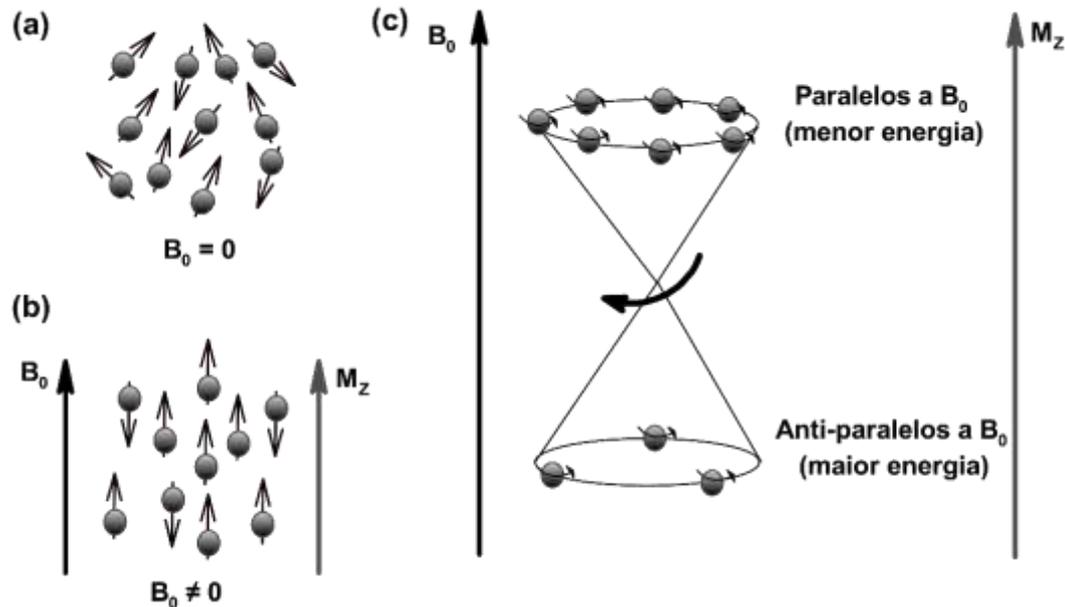


Fonte: Adaptado de Dong; Sun; Yan (2015).

3.3 Imagem por Ressonância Magnética

A imagem por ressonância magnética (IRM) é uma técnica de diagnóstico por imagem que permite visualizar tecidos moles e distinguir entre tecidos saudáveis e patológicos, sendo considerada não invasiva e não destrutiva. A IRM baseia-se na interação entre os spins nucleares dos prótons da água (^1H) e um campo magnético externo (B_0) (Pereira, 2008; Bottrill; Kwok; Long, 2006). Os prótons (spins nucleares) apresentam um momento angular de spin nuclear (I), com o número de estados possíveis (orientações) igual a $2I+1$, em que I é o spin nuclear total, variando de $+i$ a $-i$. Na ausência de B_0 , os spins se distribuem aleatoriamente sem uma orientação definida com mesma energia (**Figura 5a**). No entanto, na presença de B_0 , os spins se alinham a esse campo, em determinadas orientações, gerando estados de energia diferentes (**Figura 5b**). Os prótons da água (^1H) são os mais utilizados na IRM devido à sua alta concentração no corpo. Para o ^1H ($I = 1/2$), existem dois valores de spin: $i = +1/2$ e $i = -1/2$, conhecidos como α e β , respectivamente, representando os dois estados de energia (Gil; Geraldês, 2002). Assim, os spins nucleares para o ^1H podem se orientar de duas formas em relação ao B_0 : paralela e antiparalela. O estado de menor energia (α), estado preferencial, é aquele em que o spin está alinhado paralelamente ao B_0 , resultando em um excesso de spins alinhados paralelamente, criando uma magnetização resultante (M_z). Considerando o eixo z como o eixo paralelo ao campo magnético que será aplicado e o plano xy como o plano transversal, então temos, no equilíbrio, a magnetização do campo magnético (M_0) é igual a M_z ($M_0 = M_z$) (Gil; Geraldês, 2002). Contudo, é importante entender que os spins não se alinham exatamente ao longo do eixo z, mas sim se movimentam em torno dele, semelhante ao movimento de um pião, como mostrado na **Figura 5c**, sendo esse movimento denominado precessão.

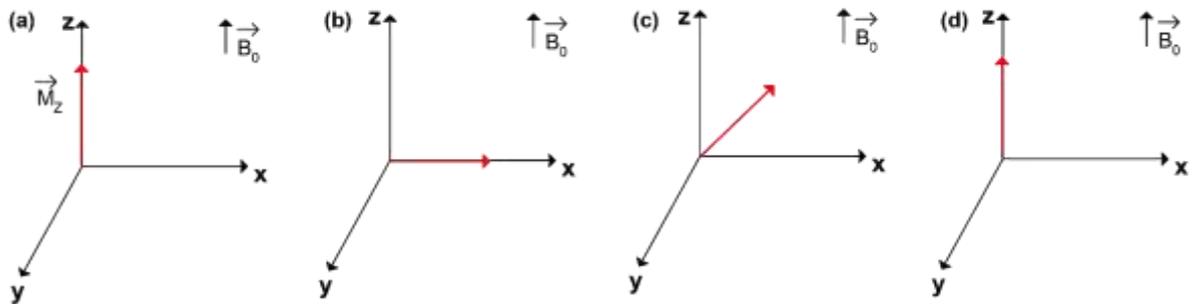
Figura 5: a) Representação dos prótons na ausência de B_0 ; (b) Alinhamento dos prótons sob B_0 , criando uma magnetização resultante de equilíbrio (M_z) e (c) representação em ampulheta da precessão.



Fonte: Adaptado de Souza Sobrinha (2018).

A técnica de IRM é baseada na Ressonância Magnética Nuclear (RMN), onde é necessário perturbar esse equilíbrio. Para isso, é aplicado um pulso de radiofrequência (RF), perpendicular ao campo externo, fazendo com que M_z se alinhe com o plano transversal (xy). Após o término do pulso, a magnetização retorna ao seu estado de equilíbrio, gerando sinais que são detectados para gerar a imagem. O tempo necessário para o retorno ao estado de equilíbrio é chamado de tempo de relaxação (Albuquerque *et al.*, 2021). Para obter a imagem, são adicionados gradientes de campo, que são aplicados em combinação com o campo magnético principal (B_0). Esses gradientes codificam informações espaciais do sinal e, por meio da transformada de Fourier, formam a imagem de IRM. O tempo de relaxação longitudinal (T_1) é o tempo necessário para que o vetor de magnetização M_z se realinhe com a direção de B_0 . Para alcançar esse realinhamento, um pulso de radiofrequência é aplicado, alterando a direção do vetor de magnetização para o plano transversal. Após o término do pulso de radiofrequência, a excitação é perdida e a magnetização longitudinal é gradualmente recuperada, conforme mostra a **Figura 6** (Albuquerque *et al.*, 2021; Gil; Geraldês, 2002).

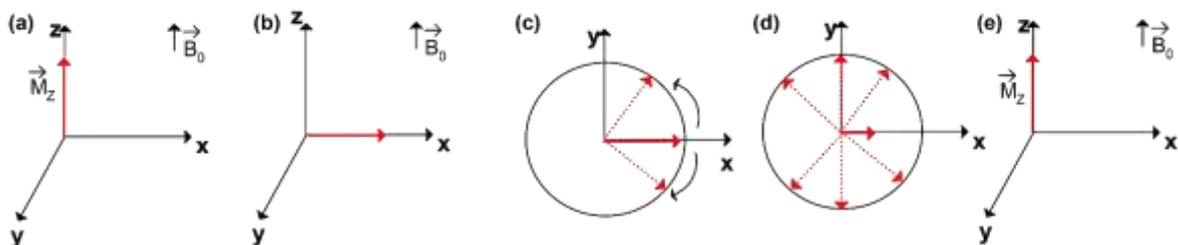
Figura 6: (a) Após aplicar um B_0 ; (b) Após transmissão de um pulso de radiofrequência; (c) Retornando à posição de equilíbrio; (d) Comportamento dos prótons ao se alinharem novamente na direção do B_0 .



Fonte: Autoria própria.

O tempo de relaxação transversal (T_2) representa o tempo necessário para a dissipação da magnetização no plano transversal. Logo após a excitação da amostra por um pulso de radiofrequência, os vetores dos spins estão inicialmente em sincronia, movendo-se em precessão, com uma angulação de 0° entre eles, estando em fase. Com o decorrer do tempo, essa sincronia gradualmente se desfaz, resultando em um desfasamento entre os spins. À medida que os vetores de momento magnético retornam ao estado de equilíbrio, suas projeções no plano xy tendem a se anular progressivamente, levando à diminuição da projeção do vetor resultante até sua completa dissipação, conforme mostra a **Figura 7**. (Albuquerque *et al.*, 2021; Gil; Geraldes, 2002).

Figura 7: Vetor magnetização resultante M_z (a) Na presença de B_0 ; (b) Após transmissão de um pulso de RF; (c) Desfasamento entre os spins; (d) Anulamento das projeções no plano xy e diminuição do vetor resultante; (e) Comportamento dos prótons ao se alinharem.



Fonte: Autoria própria.

Embora haja naturalmente uma diferença nos tempos de relaxação dos prótons entre tecidos, devido à concentração e mobilidade das moléculas de água presentes nos vários tecidos, o uso de agentes de contraste (ACs) desempenha um papel crucial na obtenção de imagens de maior qualidade, aumentando o contraste dos tecidos e a relação sinal/ruído, o que melhora a sensibilidade de detecção (Caravan, 2006). Os ACs consistem em compostos contendo espécies (super)paramagnéticas, que têm a

capacidade de modificar o tempo de relaxação dos núcleos de hidrogênio (^1H). Os ACs podem ser classificados como positivos, quando afetam principalmente o tempo de relaxação T_1 ou como negativos, quando afetam principalmente o tempo de relaxação T_2 (Caravan, 2006).

O íon gadolínio (Gd^{3+}) é amplamente utilizado como agente de contraste, devido aos sete elétrons desemparelhados em sua camada de valência ($4f^7$). Esses elétrons desemparelhados dão ao gadolínio um alto momento magnético, representado pelo número quântico de spin $S = 7/2$. Essa propriedade magnética do gadolínio torna-o altamente responsivo a campos magnéticos externos, como os utilizados na ressonância magnética, sendo considerado um dos elementos paramagnéticos mais poderosos (Caravan, 2006, Bottrill; Kwok; Long, 2006; Sarikhani, *et al.*, 2022; Albuquerque *et al.*, 2021). A eficiência de um AC é medida em termos de relaxividade (r_i) a qual pode ser definida como o aumento nas taxas de relaxação dos prótons da água provocadas por unidade de concentração do íon paramagnético, diminuindo os tempos de relaxação intrínseco dos núcleos de ^1H . Logo, quanto maior os valores de r_1 e r_2 (relaxividades longitudinais e transversais, respectivamente), menores serão os valores de T_1 e T_2 . A relaxividade pode ser calculada através de uma relação entre $(\frac{1}{T_i})_p$ e a concentração do Gd^{3+} através da **Equação 11**:

$$r_i = \frac{(\frac{1}{T_i})_{obs} - (\frac{1}{T_i})_d}{[\text{Gd}^{3+}]} = \frac{(\frac{1}{T_i})_p}{[\text{Gd}^{3+}]} \quad i = 1,2 \quad (11)$$

A taxa de relaxação observada, $(\frac{1}{T_i})_{obs}$, que advém de um processo de transferência de energia através da interação núcleo (H)-elétrons(Gd), é composta pelas contribuições da taxa de relaxação diamagnética, $(\frac{1}{T_i})_d$, e paramagnética, $(\frac{1}{T_i})_p$ (**Equação 12**), relacionadas respectivamente às medidas dos tempos de relaxação na ausência e na presença da espécie paramagnética. Alguns parâmetros interferem na relaxividade observada, tais como as propriedades eletrônicas do íon paramagnético, campo magnético aplicado. O número de moléculas de água coordenadas ao centro paramagnético bem como sua taxa de troca de com moléculas de água do *bulk*, influencia o efeito em T_1 . Por outro lado, o tempo de difusão das moléculas de água nas proximidades do íon metálico influencia o efeito em T_2 (Albuquerque *et al.*, 2021).

$$\left(\frac{1}{T_i}\right)_{obs} = \left(\frac{1}{T_i}\right)_d + \left(\frac{1}{T_i}\right)_p \quad i = 1,2 \quad (12)$$

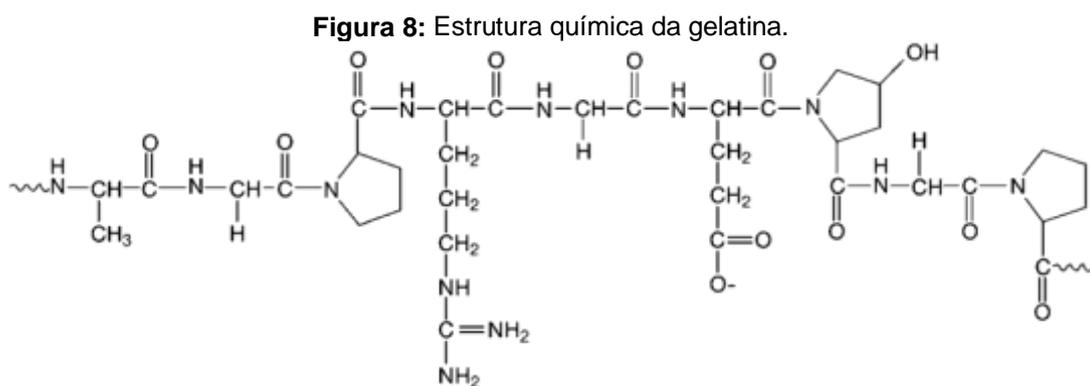
O estudo realizado por Mortezaadeh *et al.* (2020) teve como objetivo avaliar um agente de contraste para imagem por ressonância magnética para a detecção de tumores, sendo baseado em óxido de gadolínio (Gd_2O_3) revestido com policiclodextrina (PCD) e modificado com glicose ($Gd_2O_3@PCD-Glu$) para o direcionamento de receptores de glicose superexpressos. A análise de relaxividade foi realizada comparando as NPs $Gd_2O_3@PCD-Glu$ e o agente de contraste comercial Dotarem (Dotarem®). As amostras foram obtidas a partir de soluções de agar a 2,5% p/v em PBS (0,1 M, pH 7,4) com concentrações variáveis de gadolínio (0 a 0,64 mM), determinadas por ICP-MS. Os parâmetros de imagem utilizados para medir os tempos de relaxação T_1 e T_2 incluíram campo externo de 3 T a 22°C. Os resultados obtidos foram de uma relaxividade $r_1 = 4,86 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ e $r_2 = 7,84 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ para o $Gd_2O_3@PCD-Glu$ e de $r_1 = 2,79 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ e $r_2 = 5,21 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ para o Dotarem.

3.4 Biopolímeros e seu Uso no Recobrimento de Nanomateriais

Os biopolímeros são polímeros produzidos ou derivados de organismos vivos. As unidades monoméricas dos biopolímeros consistem geralmente em nucleotídeos, aminoácidos ou derivados de açúcares e são classificados em naturais e sintéticos (Christian, 2016; George *et al.*, 2020). Os biopolímeros de ocorrência natural são amplamente utilizados na administração de medicamentos devido à sua biocompatibilidade, não antigenicidade e fontes renováveis abundantes. Esses incluem polímeros à base de proteínas, como albumina, gelatina, soja, colágeno e polissacarídeos, como dextrana, ácido hialurônico, alginato, carragenina e ciclodextrina (George; Shah; Shrivastav, 2019). O uso de biopolímeros naturais para o recobrimento *core-shell* de nanopartículas tem atraído muita atenção para aplicações biomédicas devido à sua capacidade de se ligar a drogas, receptores, ligantes etc. (Soares *et al.*, 2022;). Em razão da sua estrutura intrínseca, esses biopolímeros possuem um elevado número de diferentes grupos funcionais acessíveis na superfície, como carboxilato (-COOH), hidroxila (-OH) e amino (-NH₂), que permite múltiplas possibilidades de modificação para o acoplamento de espécies químicas, seja por conjugação covalente ou não covalente (Chatterjee *et al.*, 2014; George; Shah; Shrivastav, 2019).

3.4.1 Gelatina

A gelatina (**Figura 8**) é um dos biopolímeros mais versáteis e amplamente utilizados na indústria farmacêutica devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixo custo e diversos grupos funcionais disponíveis para o acoplamento de moléculas. A gelatina é obtida pela hidrólise parcial do colágeno animal, que é a proteína mais encontrada naturalmente em humanos e animais, especialmente na pele, ossos, tendões e ligamentos. A gelatina tem uma longa história de uso seguro em produtos farmacêuticos, cosméticos, bem como produtos alimentícios e é considerada um material seguro pela *Food and Drug Administration* (FDA) nessas áreas (Elzoghby, 2013; Yasmin *et al.*, 2017). Quimicamente, a gelatina é composta de 18 variedades de aminoácidos, sendo a glicina, prolina e hidroxiprolina os compostos majoritários, correspondendo aproximadamente 66 % da sua estrutura. Um terço da cadeia é composto por glicina e outro terço é composto por prolina ou hidroxiprolina, enquanto o restante, 34%, é formado por outras famílias distintas de aminoácidos, como ácido glutâmico, alanina, arginina e ácido aspártico. Dessa forma, a gelatina possui grupos catiônicos e aniônicos, juntamente de grupos hidrofóbicos presentes na proporção aproximada de 1:1:1. A sua estrutura em tripla hélice é representada por $(\text{Gly-X-Pro})_n$, onde X representa principalmente lisina, arginina, metionina e valina (Alipal *et al.*, 2019; Elzoghby, 2013; Yasmin *et al.*, 2017).



Fonte: Elzoghby, 2013.

Sirivat e Paradee (2019) desenvolveram uma síntese bem-sucedida de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) revestidas com gelatina por meio de coprecipitação química em um único passo, para carregamento de mercaptopurina, que possui ação anticâncer. Os resultados mostram que as propriedades das

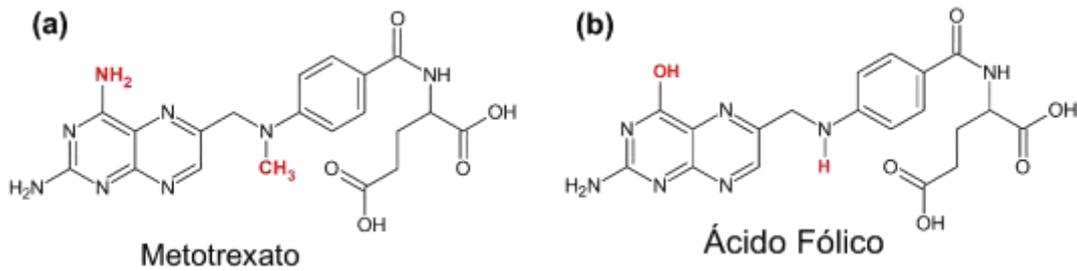
nanopartículas dependem do valor de pH durante a síntese, com tamanhos médios variando entre 28 e 80 nm e magnetização na faixa de 42-64 emu/g, exibindo comportamento superparamagnético. A cobertura de gelatina reduz a agregação das partículas, a condutividade elétrica e o valor da magnetização. Além disso, foi demonstrado que é possível carregar *in situ* a mercaptopurina nas nanopartículas sintetizadas.

O estudo realizado por Mofatehnia, Elhamifar e Ziarani (2023) apresenta um novo nanocatalisador, o $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Gelatin-Cu}$, que foi preparado através da cobertura de gelatina natural em partículas magnéticas de Fe_3O_4 seguida pelo tratamento com um sal de cobre. A gelatina possui grupos multifuncionais, como carboxila e amina, que a tornam uma escolha apropriada para a imobilização de catalisadores metálicos, o que permitiu a imobilização do cobre (Cu). Com isso, o recobrimento com gelatina permite que o $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Gelatin-Cu}$ seja um nanocatalisador altamente eficiente na preparação de hexahidroquinolinas sob condições verdes, com alta atividade catalítica e boa recuperabilidade, reutilização e estabilidade do nanocatalisador. Desse modo, fica evidente o potencial do uso da gelatina na conjugação de ativos farmacêuticos com nanomaterias de forma eficiente.

3.5 Metotrexato

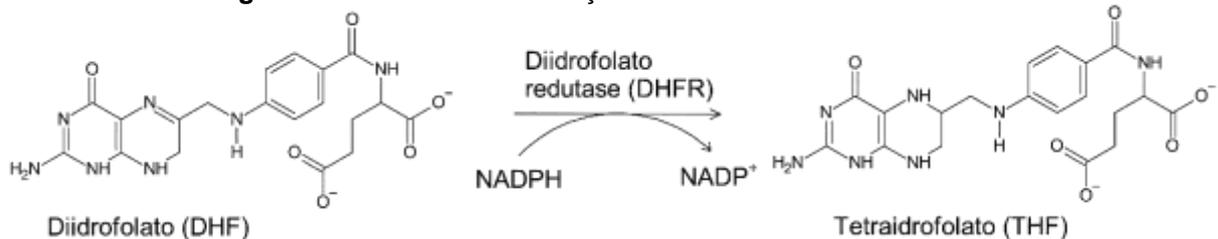
O metotrexato (MTX) é um antimetabólito do ácido fólico que atua como agente anticancerígeno. O ácido fólico é essencial na síntese de purinas e pirimidinas que, por sua vez, são importantes para a síntese de nucleotídeos, unidades básicas dos ácidos nucleicos (Hubner; Houlston, 2009). O MTX possui uma estrutura química semelhante ao ácido fólico, conforme mostra a **Figura 9**, e age interrompendo a divisão celular através da inibição de enzimas relacionadas ao folato, especialmente a diidrofolato redutase (DHFR). A DHFR é responsável por catalisar a conversão do diidrofolato (DHF) em tetraidrofolato (THF), forma ativa do ácido fólico, conforme mostrado na **Figura 10**, o qual atua como coenzima significativa em diversas reações de metilação nas vias de síntese de nucleotídeos de pirimidinas e purinas, essenciais na síntese de DNA. O MTX priva a célula de precursores para a síntese de DNA, levando a interrupção na síntese de DNA e subsequente apoptose celular, atuando na fase S do ciclo celular. (Hubner; Houlston, 2009; Maksimovic *et al.*, 2020).

Figura 9: (a) Estrutura química do MTX e (b) estrutura química do ácido fólico.



Fonte: Autoria própria.

Figura 10: Mecanismo de atuação da enzima diidrofolato redutase.



Fonte: Autoria própria.

O metil-THF atua como doador de metil nas de síntese de DNA, dessa forma, a inibição da produção de THF pelo MTX resulta na interrupção da proliferação celular. O MTX é metabolizado pela enzima folilpoliglutamil sintase (FPGS), gerando o MTX poliglutamato (MTX-Glu), que possui um poder de inibição de DHFR maior. O MTX-Glu priva a célula de precursores para a síntese de DNA, levando a interrupção na síntese de DNA e subsequente apoptose celular, atuando na fase S do ciclo celular. Por isso, o MTX é amplamente utilizado no tratamento de câncer (Hubner; Houlston, 2009; Maksimovic *et al.*, 2020).

O trabalho de Meng *et al.* (2021) apresenta um estudo sobre o uso de nanopartículas poliméricas para a entrega de dois agentes quimioterápicos, metotrexato (MTX) e curcumina (CUR), para o tratamento do câncer colorretal. Os resultados mostraram que as nanopartículas foram eficazes na entrega dos agentes quimioterápicos para as células cancerosas, resultando em uma maior taxa de apoptose em comparação com os agentes livres. Além disso, a terapia combinada com os dois agentes quimioterápicos mostrou ser mais eficaz do que o uso individual de cada agente. O estudo sugere que essa abordagem pode ser uma estratégia promissora para o tratamento do câncer colorretal.

4 METODOLOGIA

4.1 Reagentes

Óxido de gadolínio (III), óxido de itérbio (III) e óxido de érbio (III) (Aldrich, 99,9%), ureia (Vetec, P.A.), gelatina (Sigma-Aldrich), acetona (Dinâmica, P.A.), glutaraldeído (GA) (Dinâmica, 25% P.S.), ácido nítrico (Alphatec, P.A.), tetrafluoborato O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-Tetrametil-urânio (TBTU) (Sigma-Aldrich), metotrexato (Sigma-Aldrich), dimetilformamida (DMF) (Dinâmica, P.A.) e trimetilamina (Dinâmica, P.A.). $\text{Ln}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (com $\text{Ln}^{3+} = \text{Er}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$ e Gd^{3+}) foram obtidos por reação de ácido nítrico com o correspondente óxido de lantanídeo trivalente.

4.2 Síntese do $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$

A síntese das nanopartículas de $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$ foi conduzida com base no trabalho de Kamińska *et al* (2018), utilizando a técnica de precipitação homogênea, descrita anteriormente. Para obter o óxido, foram misturados em 100 mL de água destilada, 5,44 mmol (2,45 g) de $\text{Gd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,029 mmol (0,013 g) de $\text{Er}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,53 mmol (0,25 g) de $\text{Yb}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 0,040 mol (2,4 g) de ureia. A razão molar nominal entre o Gd^{3+} , Er^{3+} e Yb^{3+} foi de 1:0,005:0,01. A mistura reacional foi mantida sob agitação em um banho de glicerina a 75 °C por 3 horas. Em seguida, o material precursor formado ($\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3:\text{Yb}/\text{Er}$) foi separado por centrifugação a uma velocidade de 5000 rpm por 15 minutos e seco a 80 °C em uma estufa por 24 horas. Por fim, as nanopartículas de $\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3:\text{Yb}/\text{Er}$ foram submetidas ao processo de calcinação a uma temperatura de 900 °C, com uma taxa de aquecimento de 2°C/min por 3 horas.

4.3 Síntese do $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina

A síntese de $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina envolve uma adaptação do método de dessolvatação da gelatina em duas etapas proposto por Mozafari e Moztarzafari (2010). Com o objetivo de determinar a melhor condição de revestimento, foram realizadas quatro sínteses em condições distintas, conforme indicado na **Tabela 1**. Na primeira etapa da síntese, dissolveu-se a gelatina em 100 mL de água ultrapura, e a solução foi mantida sob agitação a uma temperatura de 45 °C até a completa dissolução da gelatina. Então foram adicionados 100 mL de acetona lentamente na

solução para a precipitação das cadeias de gelatina de baixo peso molecular. O sobrenadante foi então descartado e a gelatina assentada no fundo do frasco foi dissolvida em 100 mL de água ultrapura. Em seguida, foram adicionados 100 mL de uma suspensão de $Gd_2O_3:Yb/Er$ (1 mg/mL) sob condição de agitação por 30 minutos e aquecimento constante a 45 °C. Para a segunda etapa do processo de dessolvatação, foram adicionados 150 mL de acetona, e por fim, 1 mL da solução de glutaraldeído 25% (GA). O sistema ficou sob agitação durante 20 h a temperatura de 45 °C. As nanopartículas revestidas com gelatina foram lavadas com água destilada, seguida pela coleta do sólido via centrifugação a 5000 rpm por 20 minutos.

Tabela 1: Condições da síntese das nanopartículas de $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina$.

Amostra	Glutaraldeído (mL)	Concentração de Gelatina (mg/mL)
$Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1$	-	10
$Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1_GA$	1	10
$Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2$	-	5
$Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$	1	5

4.4 Síntese do $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina-MTX$

Na conjugação do MTX às NPs de $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina$, foi utilizado como base o trabalho desenvolvido por Da Silva Viana *et al* (2019). Com o objetivo de determinar a melhor condição de conjugação, foram realizadas quatro sínteses em condições distintas, conforme indicado na **Tabela 2**. Para o início da reação, foram dissolvidos 0,125 mmol de MTX em uma mistura composta por 0,125 mmol de TBTU, 5 mL de DMF seco e 5 mL de trietilamina seca, sob agitação por 30 minutos e atmosfera de nitrogênio (Solução A). Em seguida, foi realizada outra solução contendo 10 mg de NPs de $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina$ e 5 mL de DMF, também sob agitação por 30 minutos e atmosfera de nitrogênio (Solução B). Posteriormente, a Solução B foi adicionada à Solução A e a mistura reacional foi mantida sob agitação por 24 horas, sob atmosfera de nitrogênio. As nanossondas de $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina-MTX$ foram separadas e lavadas 5 vezes com 5 mL DMF, utilizando ciclos sucessivos de centrifugação por 10 minutos a 1000 rpm.

Tabela 2: Condições da síntese de Gd₂O₃:Yb/Er@Gelatina-MTX.

Condição	MTX (mmol) *	Massa de TBTU (g)	Massa de MTX (g)	Massa de Gd ₂ O ₃ :Yb/Er@Gelatina (mg)
1	0,125	0,0568	0,0401	10
2	0,0625	0,0284	0,0200	10
3	0,0313	0,0142	0,0100	10
4	0,0160	0,00700	0,00500	10

*A razão de MTX e TBTU foi de 1:1 em todas as condições.

4.5 Caracterizações

As instrumentações a seguir, descrevem os principais componentes e parâmetros utilizados nas investigações morfológicas, estruturais, fotofísicas, relaxométricas e viabilidade celular.

4.5.1 Difração de raios-X

A difração de raios-X (DRX) foi realizada na Central Multiusuário do Departamento de Física (dF) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), utilizando um difratômetro de raios X SmartLab da marca Rigaku, com uma fonte de raios X de ânodo giratório de 9 kW com potência de 1000 W. A fonte estava acoplada a um detector de semicondutor multidimensional 2D de alta resolução de energia, HyPix-3000. A análise foi realizada em uma faixa 2 θ de 10 a 70, em uma velocidade de varredura de 1°/min e incremento 0,02 °.

4.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X

Para a realização da microscopia eletrônica de varredura (MEV), as amostras foram colocadas em um suporte de alumínio (*stub*) revestido com fita de carbono. Em seguida, as amostras foram metalizadas com uma camada de ouro. As imagens foram adquiridas utilizando um microscópio eletrônico de varredura da marca Tescan, modelo MIRA3, que possui uma fonte de feixe de elétrons por emissão de campo. A espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS), foi acoplada ao MEV. Todas as medidas foram obtidas nas instalações da Central Multiusuário, localizado no DF da UFPE.

4.5.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

Foi realizada a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, conhecida como FT-IR, do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, em que os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos a temperatura ambiente. Essa análise foi realizada utilizando um espectrômetro por transformada de Fourier da marca PerkinElmer. A faixa de frequência analisada abrangeu de 4000 a 400 cm^{-1} . Para essa análise, utilizou-se uma pastilha de KBr. As medidas de foram obtidas nas instalações da Central Analítica localizada no departamento de Química Fundamental (dQF) da UFPE.

4.5.4 Análise Termogravimétrica

A análise termogravimétrica, mais conhecida como TGA, do inglês *thermogravimetric analyzer*, foi realizada por meio de utilizando um analisador termogravimétrico da marca Shimadzu, modelo TGA-60/60H. Para essa análise, foi utilizada uma porta amostra de alumina e um fluxo de ar comprimido de 50 mL/min. A taxa de aquecimento adotada foi de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, variando de 25 até 900 $^{\circ}\text{C}$. Essas análises de luminescência foram obtidas nas instalações do Laboratório de Terras Raras (BSTR), localizado no dQF da UFPE.

Também foi utilizado analisador termogravimétrico da marca Shimadzu, modelo TGA-50/50H. Para essa análise, foi utilizada uma porta amostra de platina e um fluxo de atmosfera de N_2 de 50 mL/min. A taxa de aquecimento adotada foi de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, variando de 25 até 900 $^{\circ}\text{C}$. Essa análise foi obtida nas instalações do Laboratório de Nanodispositivos Fotônicos e Bioinspirados François Auzel (LandFoton François Auzel) do dQF da UFPE.

4.5.5 Espectroscopia de Luminescência

Os espectros de emissão de *upconversion* foram obtidos utilizando um laser de 980 nm, da marca Laser tool, como fonte de excitação, com potência variando de 500 a 1900 mW. Esses espectros foram detectados pelo espectrofluorímetro Fluorolog-3 ISA, da marca Horiba Jobin Yvon, que possui uma faixa de detecção abrangendo de 400 a 750 nm. A partir das intensidades obtidas nos espectros de emissão, foram realizados estudos para determinar o número de fótons envolvidos na emissão de

upconversion. Essas análises de luminescência foram obtidas nas instalações do BSTR, localizado no dQF da UFPE.

Também foram realizadas medidas da emissão de *upconversion* no espectrofluorímetro modelo Fluorolog-3 FL3-122 da Horiba Jobin Yvon, utilizando um laser de 980 nm, modelo CL- 2005 da marca CrystaLaser, com potência de 300 mW. Essas análises foram conduzidas na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

4.5.6 Relaxometria

A caracterização relaxométrica consistiu na medição dos tempos de relaxação longitudinal e transversal (T_1 e T_2) dos núcleos de ^1H das moléculas de água. Os valores de T_1 e T_2 foram medidos a 37 °C utilizando relaxômetros da marca Bruker. Foram utilizados o modelo Minispec mq20, com campo magnético de 0,47 T, e o modelo Minispec mq60, com campo magnético de 1,41 T. Para a análise relaxométrica, foram preparadas cinco suspensões com concentrações diferentes de Gd^{3+} (0,1, 0,08, 0,06, 0,04 e 0,02 mM) para cada amostra. Essas concentrações foram preparadas considerando o valor nominal de Gd^{3+} em 1 mol de $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$, posteriormente, as suspensões com concentrações diferentes de Gd^{3+} das NPs $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina e para $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina-MTX foram preparadas com o auxílio do TGA. Essas suspensões foram preparadas utilizando água ultrapura contendo 0,0140 g de goma xantana, que foi utilizada como agente dispersante. As amostras foram submetidas a um banho ultrassônico por 5 minutos. Todos os valores experimentais de taxas de relaxação foram corrigidos para considerar as contribuições diamagnéticas, utilizando uma solução de goma xantana em água. As medidas foram obtidas nas instalações da Central Analítica localizada no dQF da UFPE.

4.5.7 Viabilidade celular

Para avaliar a citotoxicidade das NPs, células Vero foram cultivadas em uma placa de 96 poços por 24 horas. Posteriormente, o meio de cultura foi removido e as NPs com várias concentrações (3, 6, 12, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Além disso, células cultivadas apenas com o meio livre de NPs foram usadas como controle. Após uma incubação de 24 horas, a solução de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio brometo] foi adicionada a uma concentração de 5 mg/mL. Após mais uma incubação

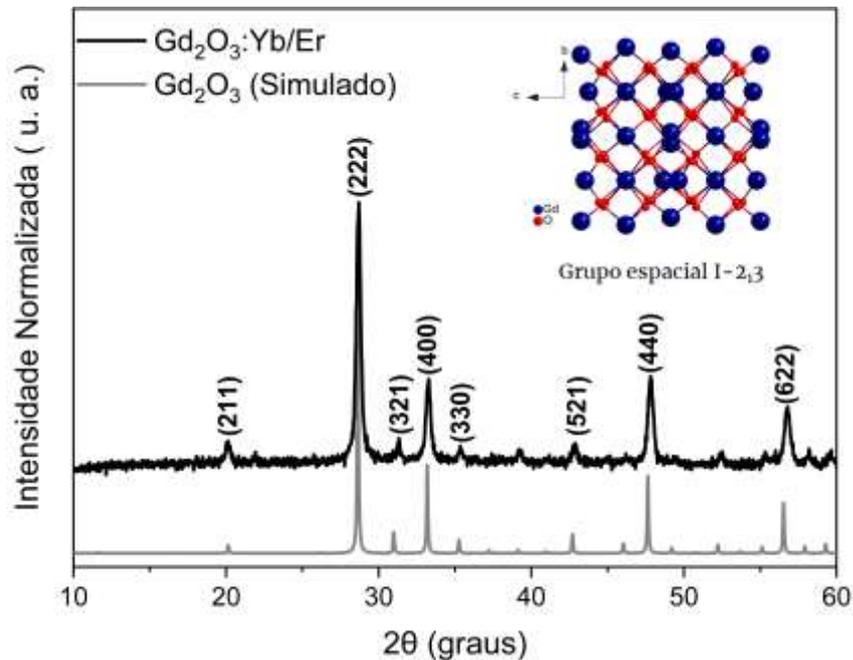
de 4 horas, a absorbância da solução foi medida a 570 nm utilizando o espectrofotômetro de microplacas Multiskan SkyHigh da marca Thermo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Gd₂O₃:Yb/Er

Realizou-se o DRX nos compostos com o objetivo de obter informações sobre a cristalinidade do material. O resultado do DRX (**Figura 11**) para o composto Gd₂O₃:Yb/Er foi comparado com o padrão de raios-X simulado obtido do trabalho de Zachariassen *et al.* (1927). Observa-se uma boa correlação de picos entre os difratogramas do composto Gd₂O₃:Yb/Er e o padrão de raios-X simulado, indicando a obtenção de uma estrutura análoga ao Gd₂O₃, que possui uma estrutura cristalina cúbica no grupo espacial I-2₁3.

Figura 11: DRX para o Gd₂O₃:Yb/Er e Gd₂O₃ simulado obtido do trabalho de Zachariassen *et al.* (1927).

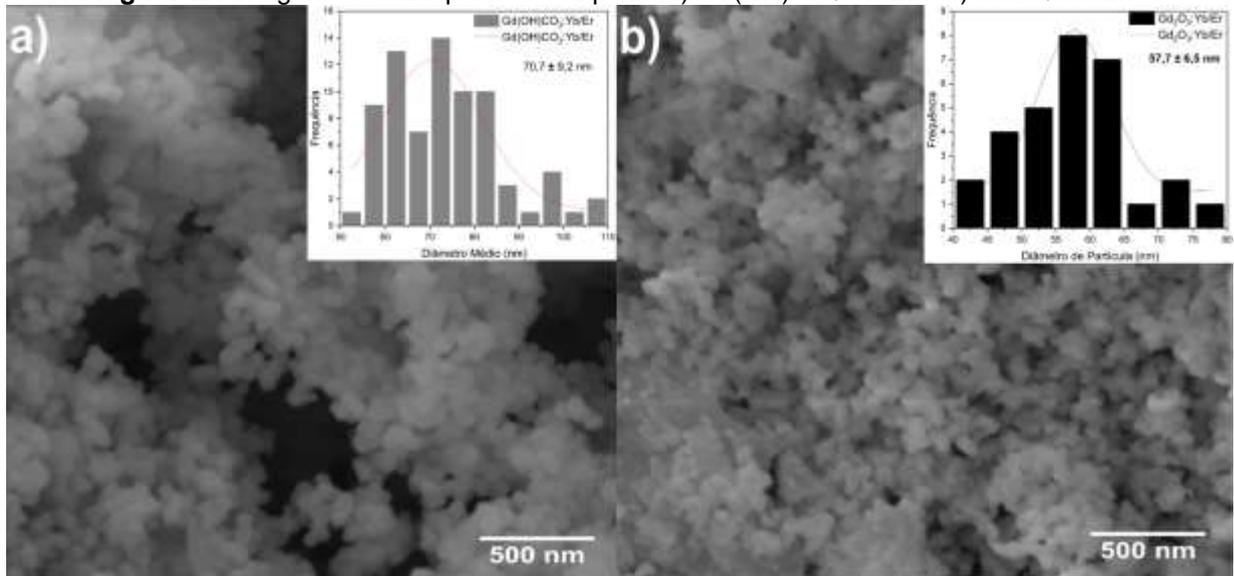


Fonte: Autoria própria.

A análise de MEV foi realizada com o objetivo de identificar sua morfologia e estimar o tamanho médio das partículas a partir das imagens obtidas. A análise de MEV da amostra Gd(OH)CO₃:Yb/Er (**Figura 12a**) revelou a presença de partículas nanométricas com morfologia esférica e uniforme, apresentando um tamanho médio de partícula de $70,7 \pm 9,2$ nm. Na análise de MEV da amostra Gd₂O₃:Yb/Er (**Figura 12b**), observou-se a manutenção da morfologia esférica, porém houve uma diminuição no tamanho médio das NPs, sendo o tamanho médio do Gd₂O₃:Yb/Er de

$57,7 \pm 6,5$ nm. Esse resultado pode ser atribuído ao processo de eliminação do carbonato e da hidroxila presente no $\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3:\text{Yb}/\text{Er}$ durante a etapa de calcinação.

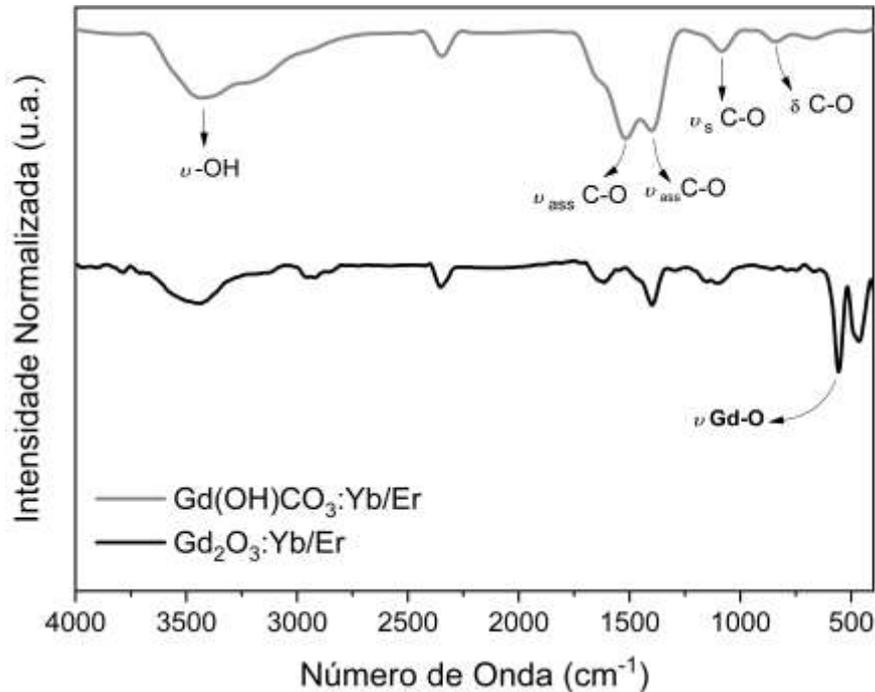
Figura 12: Imagens de MEV para os composto a) $\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3:\text{Yb}/\text{Er}$ e b) $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$.



Fonte: Autoria própria.

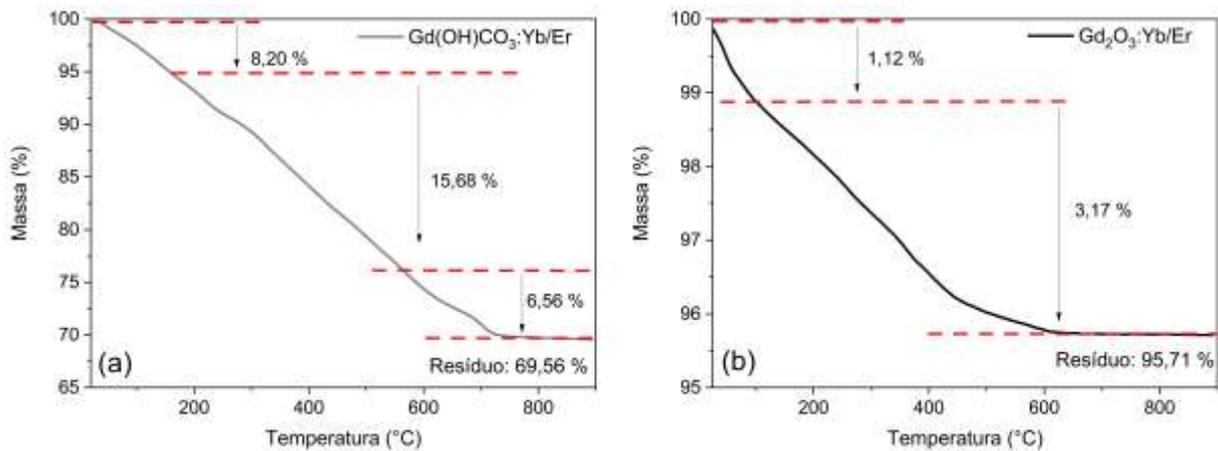
A **Figura 13** mostra os espectros de FT-IR do $\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3:\text{Yb}/\text{Er}$ e do $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$. No espectro do $\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3:\text{Yb}/\text{Er}$, foram identificadas as seguintes bandas: 3434 cm^{-1} relacionada ao estiramento da ligação O-H, 1523 cm^{-1} e 1403 cm^{-1} , associadas aos estiramentos assimétricos da ligação C-O. Além disso, as bandas em 1091 cm^{-1} e 848 cm^{-1} correspondem ao estiramento simétrico e à deformação da ligação C-O, respectivamente, referentes ao íon carbonato (Paiva *et al.*, 2001). No espectro do $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$, é possível observar o desaparecimento da maioria dos sinais relacionados aos grupos funcionais presentes no $\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3:\text{Yb}/\text{Er}$, indicando a transformação do precursor em $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$. Além disso, observou-se o surgimento de uma nova banda em 561 cm^{-1} , atribuída ao estiramento da ligação Gd-O. O perfil espectral do $\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3:\text{Yb}/\text{Er}$ e do $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$, são muito semelhantes aos encontrados na literatura (Gai *et al.*, 2011).

Figura 13: Espectros de FT-IR para os compostos $\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3:\text{Yb}/\text{Er}$ e $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$.



Fonte: Autoria própria.

O comportamento térmico dos materiais foi analisado por meio do TGA. O termograma do $\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3:\text{Yb}/\text{Er}$ (**Figura 14a**) apresenta três eventos de perda de massa. Segundo Anh *et al.* (2021) e Li *et al.* (2021), o primeiro evento ocorre entre 25 - 161 °C e está associado à eliminação de 8,20% da massa, o qual está relacionado à água adsorvida na superfície do material, a saída da hidroxila e a resíduo de ureia presentes no precursor. O segundo e o terceiro eventos de perda de massa ocorrem entre 161 - 787 °C e correspondem a perda de massa de 22,24%, os quais estão relacionadas à saída do CO e CO_2 devido à decomposição do grupo CO_3 , totalizando 30,44% de eliminação. O termograma do $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$ (**Figura 14b**) revela a ocorrência de dois eventos de perda de massa, ocorrendo entre 100-600 °C totalizando 4,29% de eliminação. O primeiro evento ocorre entre 30-100 °C e evidencia o processo de evaporação da água adsorvida na superfície das NPs (cerca de 1,12 %) e na região entre 100-623 °C, observa-se uma perda de massa de 3,17 % referente à massa residual do precursor.

Figura 14: TGA para os compostos (a) $\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3:\text{Yb}/\text{Er}$ e (b) $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$.

Fonte: Autoria própria.

Através da técnica de espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS), foi possível obter os resultados semi-qualitativos em termos das porcentagens de massa para os metais Gd^{3+} , Yb^{3+} e Er^{3+} presentes nas amostras $\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3:\text{Yb}/\text{Er}$ e $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$, conforme apresentado na **Tabela 3**. É possível verificar que as porcentagens de massa do Gd^{3+} , Yb^{3+} e do Er^{3+} apresentam valores muito próximos para ambos os compostos, sendo que o $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$ apresentou uma inserção de 24,6% do sensibilizador Yb^{3+} e uma dopagem de 0,4% do ativador Er^{3+} .

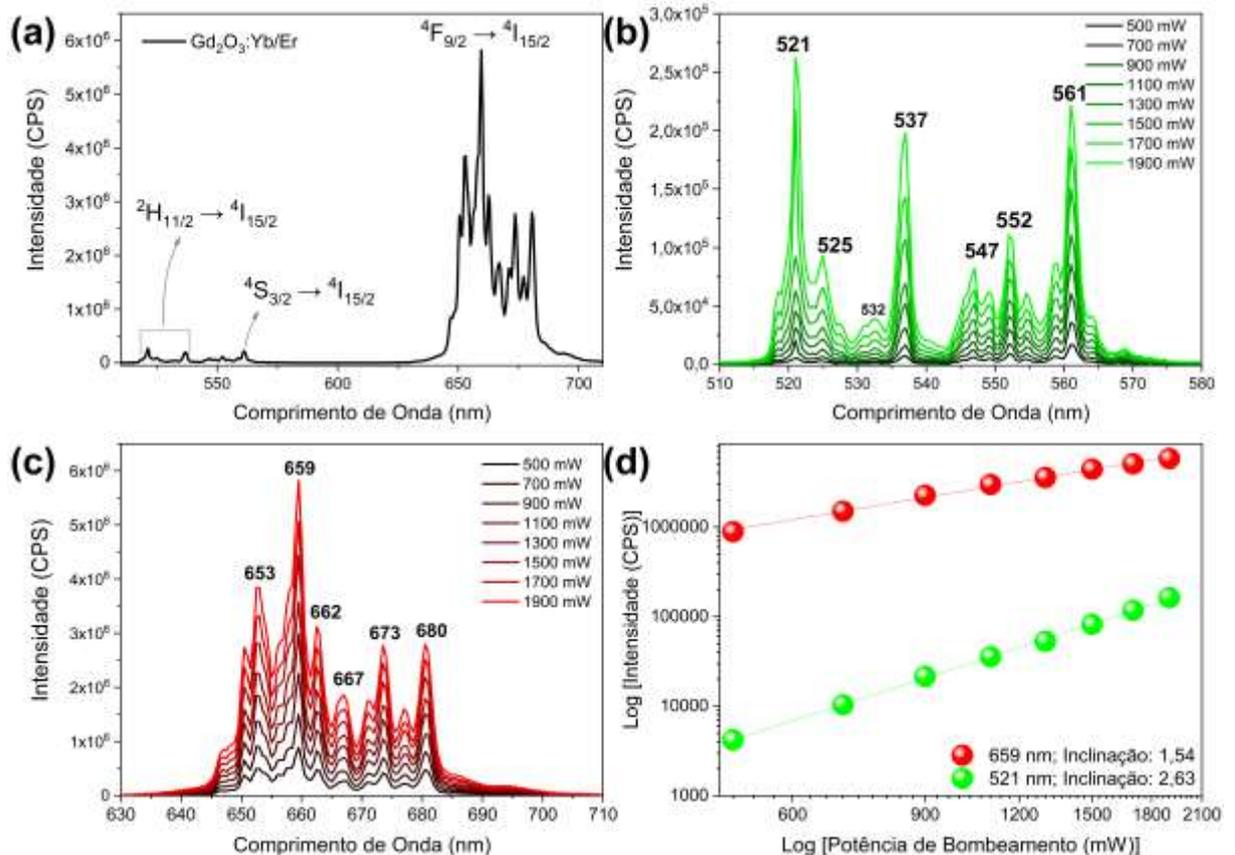
Tabela 3: Análise semi-quantitativa das porcentagens de massas para os metais Gd^{3+} , Yb^{3+} e Er^{3+} obtidas pelo EDS para os compostos $\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3:\text{Yb}/\text{Er}$ e $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$.

Amostra	Gd (%)	Yb (%)	Er (%)
$\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3:\text{Yb}/\text{Er}$	$75,5 \pm 0,3$	$24,4 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,3$
$\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$	$75,0 \pm 0,4$	$24,6 \pm 0,4$	$0,4 \pm 0,3$

A **Figura 15a** mostra o espectro de emissão, evidenciando o processo de *upconversion* entre $\text{Yb} \rightarrow \text{Er}$, para o $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$ sob excitação de laser em 980 nm com uma potência de 1900 mW. As NPs exibiram luminescência de *upconversion* máxima em 659 nm (emissão na região do vermelho), conforme observado na literatura (Anh *et al.*, 2021; Kamińska *et al.*, 2018). Além disso, cinco picos finos com comprimentos de onda em 653, 662, 667, 673 e 680 nm também podem ser observados. Todos os picos podem ser atribuídos à transição e $^4\text{F}_{9/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$. A emissão na região do verde teve comprimento de onda máximo de emissão em 521 nm, com três picos adicionais com comprimentos de onda em 525, 532 e 537 nm que

podem ser atribuídas às transições características do Er^{3+} : $^2\text{H}_{11/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$, e mais três picos com comprimento de onda em 547, 552 e 561 nm que são atribuídos à transição $^4\text{S}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ (Anh *et al.*, 2021).

Figura 15: a) Espectro de emissão *upconversion* do $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$, com potência em 1900 mW; (b) Espectros de emissão *upconversion* do $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$, com potência variada (500 a 1900 mW) de 510 e 580 nm; (c) Espectros de emissão *upconversion* do composto $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$, com potência variada (500 a 1900 mW) de 630 a 710 nm; (d) Gráfico log-log da intensidade de emissão em função da potência de bombeamento para o $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$.



Fonte: Autoria própria.

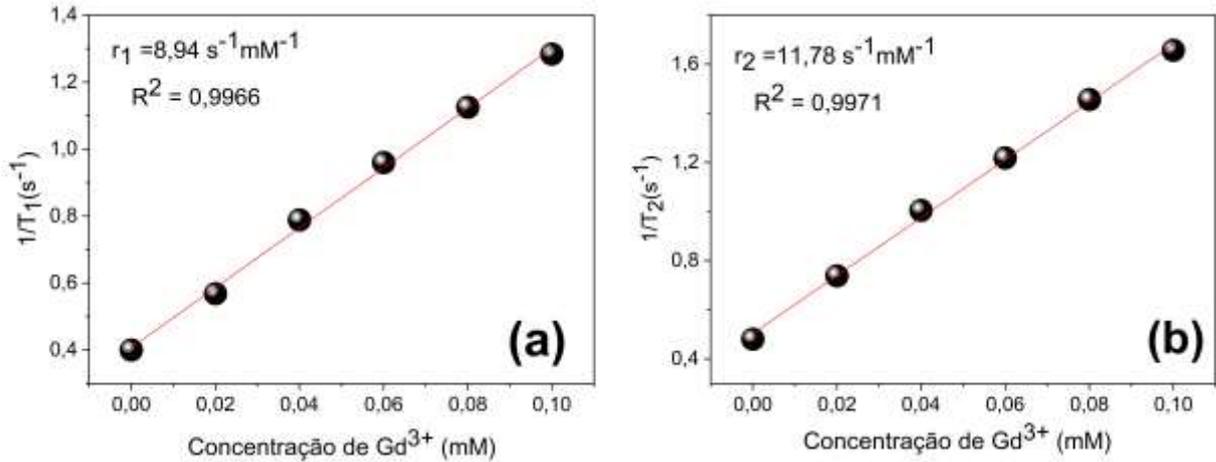
Para entender o mecanismo de *upconversion*, a intensidade de emissão (I_{up}) foi medida em função da potência de excitação (P). As **Figuras 15b** e **15c** mostram a dependência de I_{up} em relação a P , onde com o aumento da potência do laser resultou no aumento a intensidade do processo de *upconversion*, portanto uma relação diretamente linear. A **Figura 15d** demonstra a dependência de I_{up} em P para o $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$. A linha de $\log(I_{up})$ versus $\log(P^N)$ é ajustada de acordo com a **Equação 13** (Li *et al.*, 2015):

$$I_{up} \propto (P^N) \rightarrow \log(I_{up}) = \log(kP^N) = N \log P + C \quad (13)$$

onde N é o número de fótons incidentes necessários para produzir emissão de luz através do processo de *upconversion*, o qual é determinado pela inclinação da reta (coeficiente angular) obtida pelo ajuste linear dos pontos e k é a constante de proporcionalidade. Em nosso estudo, os coeficientes angulares das retas para essas bandas de emissão localizadas em 659 nm e 521 nm são 2,53 e 1,54, respectivamente. A equação obtida para a emissão na região do verde foi $y = 1,54x + 2,34$, com um ajuste de $R = 0,9997$, já a equação obtida para a emissão na região do vermelho foi de $y = 2,53x - 2,99$, com um ajuste de $R = 0,9995$. Esses resultados sugerem que o processo de três fótons é responsável pela *upconversion* da transição $^4S_{3/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$ (verde) e $^2H_{11/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$ (verde) e o processo de dois fótons responsável pelo *upconversion* da transição $^4F_{9/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$ (vermelho).

Na **Figura 16**, são apresentados dados relaxométricos das NPs de $Gd_2O_3:Yb/Er$ e observamos que as medidas dos tempos de relaxação longitudinal e transversal a 20 MHz demonstram um comportamento próximo da linearidade de $1/T_1$ e $1/T_2$ na faixa de concentrações analisada. Portanto, os coeficientes angulares, obtidos por meio da **equação 11** (seção 3.3) fornecem os valores para relaxividade: $r_1 = 8,87 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ (**Figura 16a**) e $r_2 = 11,78 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ (**Figura 16b**). Isso indica que a diminuição do tempo de relaxação é menos efetiva para T_1 e maior para T_2 , o que sugere que o processo de difusão da água entre as partículas tem uma influência maior. Esse mesmo comportamento foi observado no trabalho de Norek *et al.* (2007) foi visto que as NPs de Gd_2O_3 , em um campo de 7 T e 25 °C apresentaram um efeito muito menor no tempo de relaxação T_1 do que no T_2 , o que indica o processo de difusão da água entre as partículas tem uma influência maior. O mesmo efeito foi observado para outros óxidos de Ln^{3+} , analisados no trabalho. Esses valores obtidos são valores superiores dos relatados para os complexos comerciais, como o DTPA-Gd (MAGNEVIST[®]), que apresenta r_1 e r_2 $3,4 \pm 0,2$ e $4,0 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ respectivamente, a 20 MHz e 37 °C. E o DOTA-Gd (DOTAREM[®]) que apresenta r_1 e r_2 $3,4 \pm 0,2$ e $4,1 \pm 0,2 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ respectivamente, a 20 MHz e 37 °C (Rohrer *et al.*, 2005).

Figura 16: Variação da taxa de relaxação longitudinal ($1/T_1$) e da taxa de relaxação transversal ($1/T_2$) em função da concentração de íons Gd^{3+} (20 MHz, 37°C).

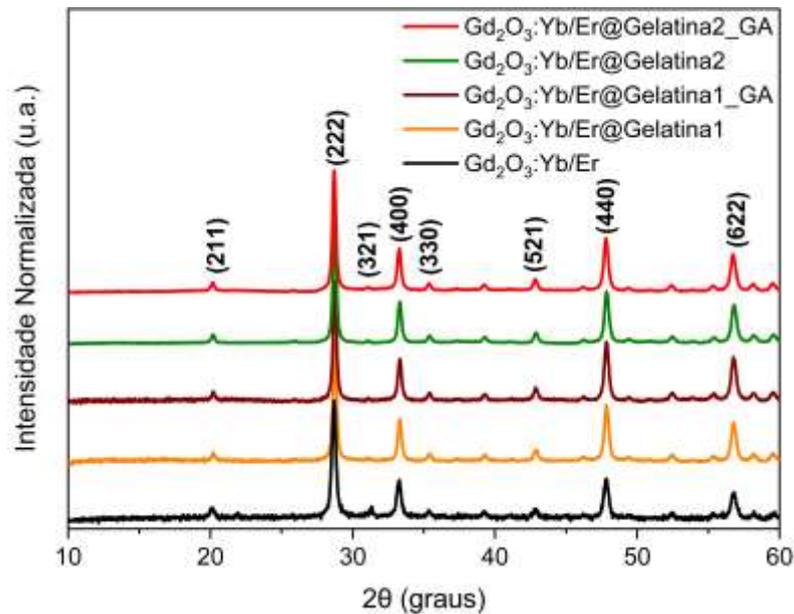


Fonte: Autoria própria.

5.2 $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina$

O DRX foi realizado com o objetivo de obter informações sobre possíveis alterações na cristalinidade do material original, $Gd_2O_3:Yb/Er$, devido ao revestimento com a gelatina. Essas alterações podem levar a mudanças no perfil espectral de emissão no processo *upconversion*. Foram comparados os resultados de DRX para as seguintes amostras: $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1_GA$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$ em relação à amostra $Gd_2O_3:Yb/Er$ (**Figura 17**). Observa-se nos difratogramas a manutenção dos picos de difração devido à boa correlação de picos em relação ao $Gd_2O_3:Yb/Er$. Isso sugere que o processo de revestimento com a gelatina não promoveu alterações no arranjo cristalino e preservando a sua estrutura original do material. Isso está alinhado com o estudo de Lin *et al.* (2017), no qual o processo de revestimento das NPs de ZnO com a gelatina não provocou alterações na estrutura hexagonal das NPs.

Figura 17: DRX para os compostos $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina1, $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina1_GA, $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina2, $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina2_GA e $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$.



Fonte: Autoria própria

A **Tabela 4** apresenta os diâmetros médios das partículas sintetizadas, obtidos por meio da análise de MEV (**Figura 18**). O $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina1 possui um tamanho médio de $88,5 \pm 9,1$ nm, enquanto o $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina1_GA, apresenta um tamanho médio de $83,6 \pm 9,8$ nm. O $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina2 possui um tamanho de $78,1 \pm 5,7$ nm e o $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina2_GA apresenta um tamanho de $73,9 \pm 2,9$ nm. Observou-se que a morfologia esférica foi mantida e, de maneira geral, verificou-se que o tamanho médio das partículas foi maior em comparação ao composto $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$. Isso sugere que o processo de revestimento permitiu a formação de uma camada de gelatina ao redor do $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$.

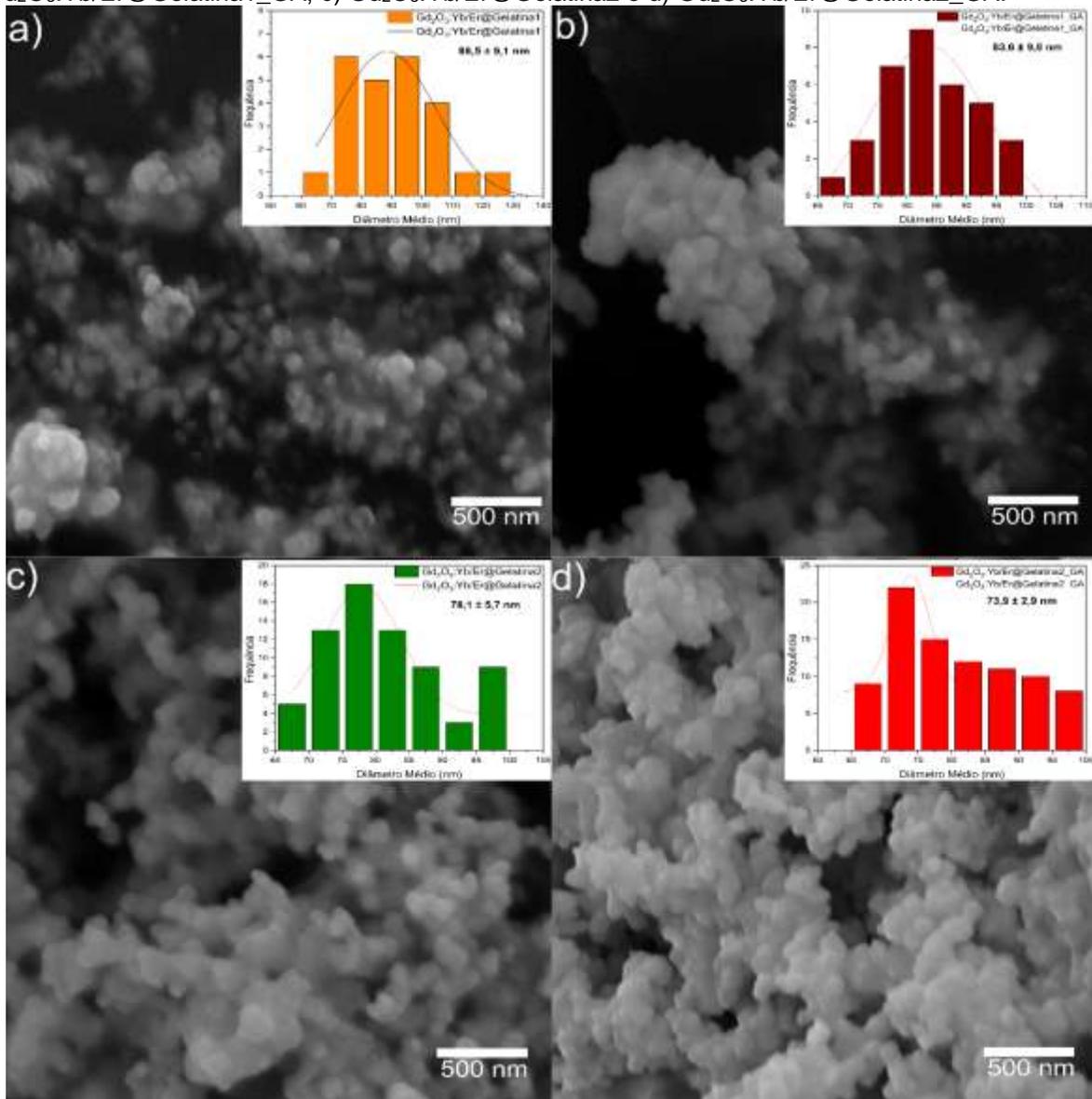
Para os compostos $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina1 e $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina1_GA, os quais foram sintetizados com uma concentração maior de gelatina (10 mg/mL), observou-se um aumento maior no tamanho médio das partículas, de aproximadamente 30,8 nm e 25,9 nm, respectivamente, em comparação ao $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$. Notavelmente, as NPs $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina1_GA, que foram reticuladas com GA apresentaram o menor tamanho. Por outro lado, nos compostos $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina2 e $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina2_GA, que foram sintetizados com uma concentração menor de gelatina (5 mg/mL), observou-se um aumento menor no tamanho médio das partículas, de aproximadamente 20,4 nm e 16,2 nm, respectivamente, em comparação ao $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$. As NPs

Gd₂O₃:Yb/Er@Gelatina2_GA reticuladas com GA, teve o menor aumento de tamanho. Em resumo, os resultados indicam a reticulação com GA diminui o tamanho das NPs, sugerindo uma maior compactação das cadeias de gelatina.

Tabela 4: Diâmetro de partícula dos compostos Gd₂O₃:Yb/Er@Gelatina1, Gd₂O₃:Yb/Er@Gelatina1_GA, Gd₂O₃:Yb/Er@Gelatina2 e Gd₂O₃:Yb/Er@Gelatina2_GA.

Amostra	Diâmetro de partícula (nm)
Gd ₂ O ₃ :Yb/Er@Gelatina1	88,5 ± 9,1
Gd ₂ O ₃ :Yb/Er@Gelatina1_GA	83,6 ± 9,8
Gd ₂ O ₃ :Yb/Er@Gelatina2	78,1 ± 5,7
Gd ₂ O ₃ :Yb/Er@Gelatina2_GA	73,9 ± 2,9

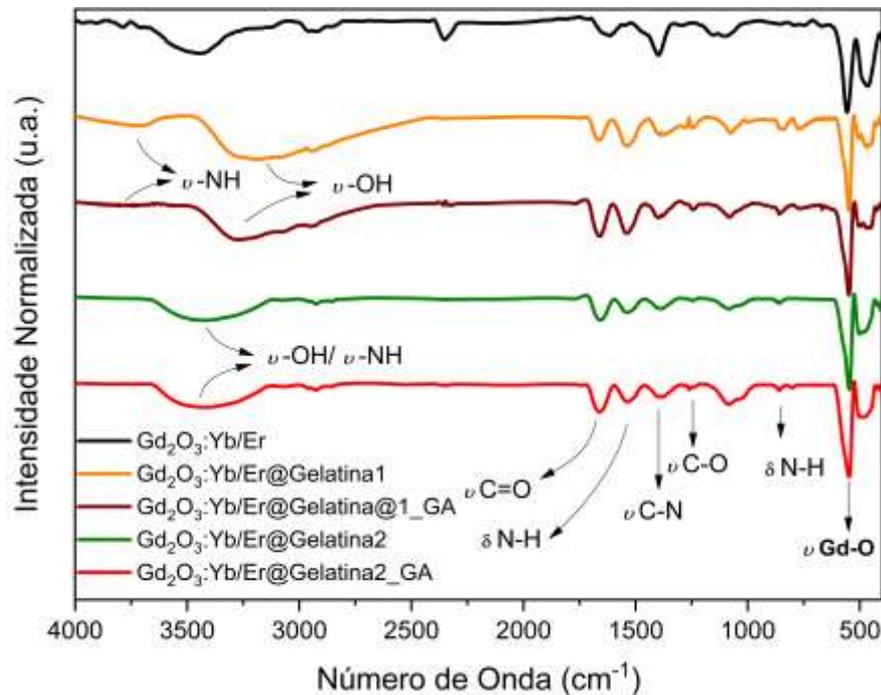
Figura 18: Imagens de MEV e histogramas para os composto a) Gd₂O₃:Yb/Er@Gelatina1, b) Gd₂O₃:Yb/Er@Gelatina1_GA, c) Gd₂O₃:Yb/Er@Gelatina2 e d) Gd₂O₃:Yb/Er@Gelatina2_GA.



Fonte: Autoria própria.

O processo de funcionalização do $Gd_2O_3:Yb/Er$ com a gelatina também foi analisado pela técnica de FT-IR (**Figura 19**). Os espectros da $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1$ e $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1_GA$ revelam uma banda centrada em 3733 cm^{-1} e 3292 cm^{-1} referentes aos estiramentos simétricos das ligações O-H e N-H, respectivamente. A banda em 1665 cm^{-1} é referente ao estiramento da ligação C=O de amidas. A banda em 1538 cm^{-1} é atribuída à deformação da ligação N-H do grupo amino e, a banda em 858 cm^{-1} é referente à deformação da ligação N-H de aminas. A banda em 1380 cm^{-1} corresponde ao estiramento da ligação C-N de aminas, a banda em 1236 cm^{-1} é referente ao estiramento da ligação C-O. Por fim, a banda em 548 cm^{-1} é atribuída à ligação Gd-O, presente no composto $Gd_2O_3:Yb/Er$ (Paiva *et al.*, 2001). Por outro lado, o espectro de FT-IR obtido para a $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2$ e $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$ apresenta uma banda larga centrada em 3413 cm^{-1} , correspondente aos estiramentos simétricos das ligações O-H e N-H. A banda em 1658 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da ligação C=O de amidas. A banda em 1519 cm^{-1} é atribuída à deformação da ligação N-H do grupo amino, e a banda em 860 cm^{-1} é referente à deformação da ligação N-H de aminas para fora do plano. A banda em 1382 cm^{-1} é corresponde ao estiramento da ligação C-N de aminas, enquanto a banda em 1238 cm^{-1} é referente ao estiramento da ligação C-O. Por fim, a banda em 543 cm^{-1} é atribuída à ligação Gd-O, presente no composto $Gd_2O_3:Yb/Er$. A identificação do grupo amino ($-NH_2$) no recobrimento com a gelatina sugere a possibilidade de funcionalização neste sítio com fármacos, a partir de reação covalente de acoplamento.

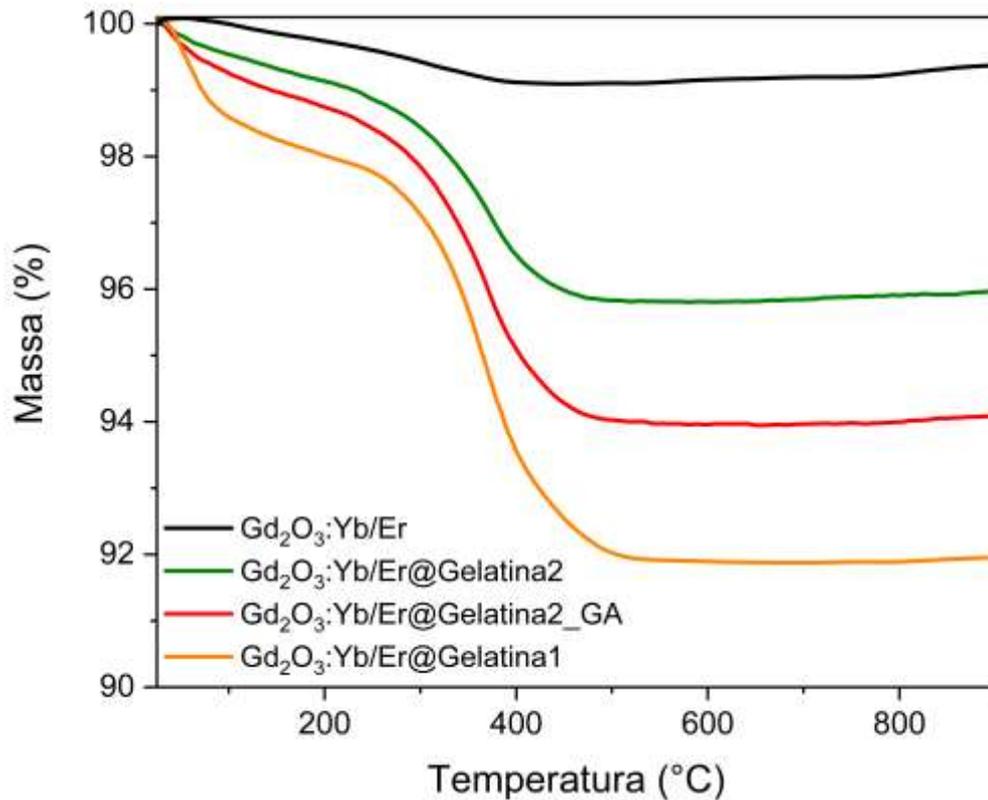
Figura 19: FT-IR para os compostos $Gd_2O_3:Yb/Er$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1_GA$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2$ e $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$.



Fonte: Autoria própria.

A análise de TGA revela duas perdas de massa, para os compostos revestidos com gelatina conforme ilustrado na **Figura 20**: a primeira ocorre aproximadamente entre 25 e 200 °C, e a segunda ocorre em aproximadamente entre 200 e 500°C. No sistema $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2$, a perda de gelatina é de cerca de 3,40%. Já no sistema $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$, a perda de massa é de aproximadamente 4,58% de gelatina. Sugerindo que o composto $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$ possui uma quantidade maior de gelatina do que o $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2$, mesmo ambos sintetizados com a mesma concentração de gelatina. Isso indica que a reticulação com GA, aumenta a quantidade de gelatina ao redor do $Gd_2O_3:Yb/Er$, porém de forma compactada, visto que a análise de MEV do $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$, apresentou um tamanho de partícula menor. No caso do sistema a $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1$, a perda chega a cerca de 7,42% de gelatina. Observa-se que quanto maior a concentração de gelatina, maior é a perda de massa de gelatina. O resultado para o $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1_GA$, não foi obtido a tempo. Entretanto, será realizado em ensaios futuros. Importante destacar que diferentemente das anteriores essa análise foi realizada em atmosfera de N_2 e, por isso não pode ser comparada com o resultado anterior, mostrado na **Figura 14**.

Figura 20: TGA referentes aos compostos $Gd_2O_3:Yb/Er$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2$ e $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$.

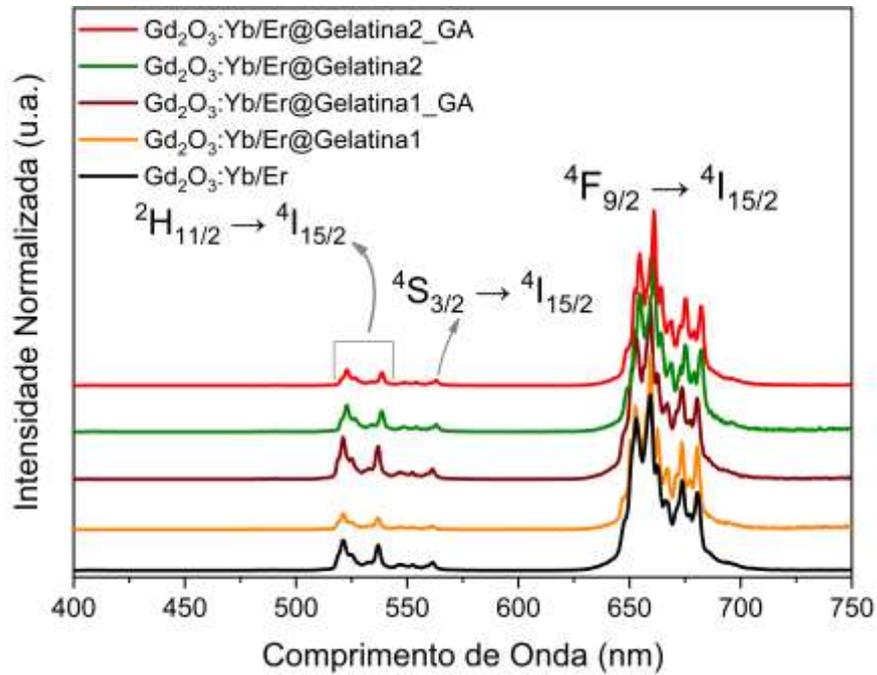


Fonte: Autoria própria.

A **Figura 21** mostra os espectros de emissão para os compostos $Gd_2O_3:Yb/Er$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1_GA$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$. Observou-se que o processo de recobrimento não altera o perfil espectral do material, conforme verificado no trabalho de Gai *et al.*, (2011). Isso pode ser correlacionado com os resultados do DRX, nos quais foi observado que o processo de recobrimento não afeta a cristalinidade do $Gd_2O_3:Yb/Er$.

Na **Tabela 5**, observa-se que a razão da intensidade da emissão no vermelho (I_R) e no verde (I_G) para os compostos revestidos com gelatina diminui em comparação com a razão para o $Gd_2O_3:Yb/Er$, indicando que o processo de revestimento reduz as intensidades relativas de emissão no verde (I_G) devido à presença de uma camada de gelatina ao redor do $Gd_2O_3:Yb/Er$. Sugerindo que a presença da gelatina aumenta a concentração de água adsorvida na superfície do material, aumentando efeito *quenching* (supressão da emissão), provocando uma diminuição da intensidade de emissão pelo processo de *upconversion*. As razões entre as intensidades de emissão dos compostos $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1$ e $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$ foram as que menos diminuíram em comparação ao $Gd_2O_3:Yb/Er$. (Chen, *et al.*, 2011).

Figura 21: Espectros de emissão *upconversion* referentes aos compostos $Gd_2O_3:Yb/Er$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1_GA$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2$ e $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$ ($\lambda_{Ex} = 980$ nm), com potência de 1900 mW.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 5: Análise quantitativa da intensidade no vermelho (I_R), intensidade no verde (I_G) e da razão de intensidades verde e vermelha (I_R/I_G) referentes aos compostos $Gd_2O_3:Yb/Er$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1_GA$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2$ e $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$.

Amostra	I_R (CPS)	I_G (CPS)	I_R/I_G
$Gd_2O_3:Yb/Er$	$5,8 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^5$	22,3
$Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1$	$4,6 \cdot 10^5$	$4,2 \cdot 10^4$	11,0
$Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1_GA$	$8,2 \cdot 10^5$	$1,9 \cdot 10^5$	4,3
$Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2$	$3,3 \cdot 10^5$	$4,9 \cdot 10^4$	6,7
$Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$	$1,3 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^5$	11,0

Na **Tabela 6**, estão sumarizados os dados relaxométricos obtidos a 60 MHz a 37 °C para os sistemas $Gd_2O_3:Yb/Er$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1_GA$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2$ e $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$. Observa-se que os sistemas revestidos com gelatina têm um efeito significativo no tempo de relaxação do próton da água, em comparação ao $Gd_2O_3:Yb/Er$, sugerindo que o processo de revestimento é a razão desse aumento da relaxividade nas NPs de $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina$. A gelatina é composta por grupos hidrofílicos, permitindo interações das moléculas de água com seus grupos funcionais através de ligação de hidrogênio. Como resultado, atrai moléculas de água,

aumentando a densidade local de água e melhorando a taxa de troca de água de $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina com o *bulk* (água do meio) (Albuquerque *et al.*, 2021; Mortezaazadeh *et al.*, 2020). Além disso, observa-se que r_2 é maior do que r_1 , ou seja, T_2 é menor do que T_1 , o que indica o processo de difusão da água nas NPs é predominante, como foi visto, anteriormente na medida da relaxividade para o $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$ obtido em 20 MHz a 37 °C. Os dados obtidos para r_2 e r_1 ficaram superiores aos agentes de contraste comerciais como o DTPA-Gd (MAGNEVIST®) que apresentam r_1 e r_2 $3,3 \pm 0,2$ e $3,9 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ à 60 MHz e 37 °C, respectivamente e o DOTA-Gd (DOTAREM®) que apresenta r_1 e r_2 $2,9 \pm 0,2$ e $3,2 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ respectivamente, à 60 MHz e 37 °C (Rohrer *et al.*, 2005).

Nos resultados obtidos, nota-se que entre as NPs sintetizadas, as NPs $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina1 e $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina2, apresentaram valores de relaxividade maiores, do que o $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$, sugerindo que a presença da gelatina aumenta a concentração de água ao redor do íon paramagnético, devido à gelatina ser um composto hidrofílico, que retém moléculas de água em sua estrutura por meio ligações de hidrogênio. Isso resulta na modificação do tempo de difusão das moléculas de água, aumentando-o, o que acarreta o aumento da relaxividade das NPs. No caso das NPs reticuladas com GA, as NPs $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina1_GA e as NPs $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina2_GA, apresentaram valores de relaxividade menores, sugerindo que a reticulação com GA compacta as cadeias de gelatina, diminuindo a mobilidade das moléculas de água. Além disso, diminui a concentração de água retida na gelatina, prejudicando tanto a difusão das moléculas de água de esfera externa quanto a taxa de troca de água com o *bulk*.

Nos resultados obtidos, observou-se que entre as NPs sintetizadas com a mesma quantidade de gelatina (10 mg/mL), as NPs $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina1 e $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina1_GA, conforme informado na **Tabela 1**, as NPs $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina1 apresentaram valores de relaxividades maiores, provavelmente devido à maior quantidade de gelatina no revestimento, como visto na análise de MEV. Isso acarreta na mudança na mobilidade das moléculas de água, favorecendo tanto a difusão das moléculas de água quanto a taxa de troca de água com o *bulk*. Comparando os resultados da relaxividade entres as NPs $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina2 e as NPs $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina2_GA, que foram sintetizadas com a mesma quantidade de gelatina (5 mg/mL), conforme informado na **Tabela 1**, sugere-se que o processo de reticulação não interferiu de forma significativa

mobilidade das moléculas de água, pois os valores de r_2 foram muito próximos. As NPs $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina2 e as NPs $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina2_GA apresentaram uma relaxividade menor se comparado as NPs $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina1, provavelmente devido à menor quantidade de gelatina no revestimento.

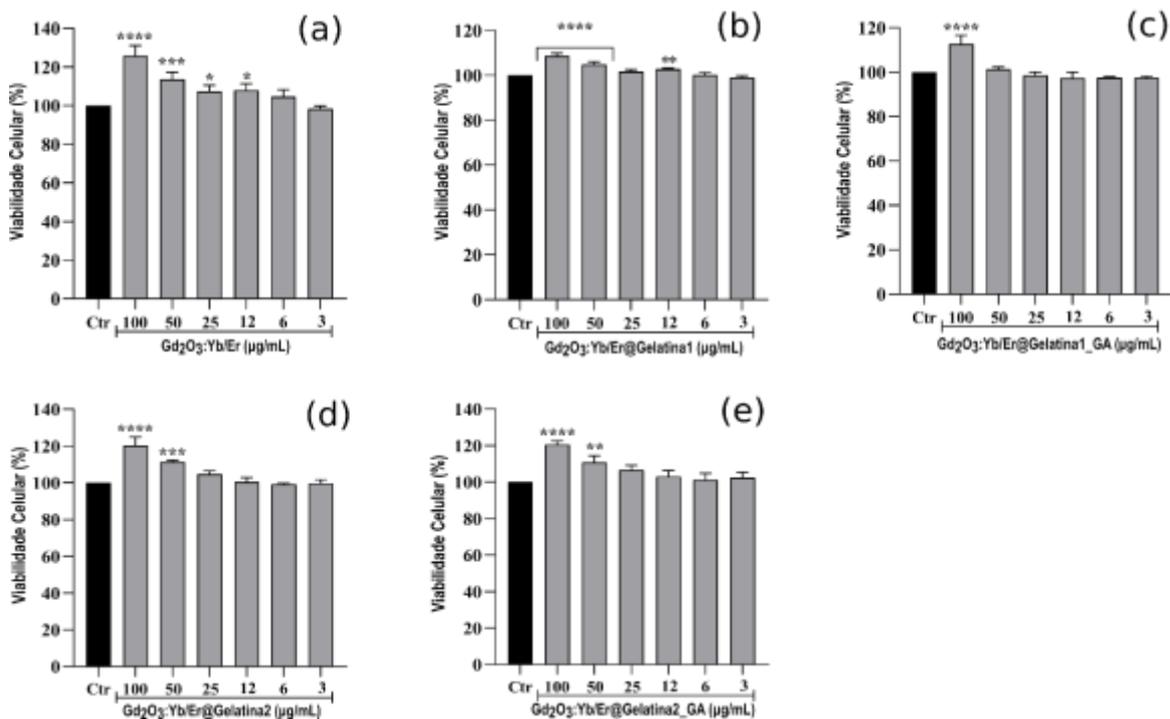
Tabela 6: Relaxividades obtidas para os sistemas a 37 °C e 60 MHz (1,41 T).

Amostra	r_1 ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)	r_2 ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)
$\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$	$2,70 \pm 0,12$	$10,32 \pm 0,71$
$\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina1	$15,08 \pm 0,46$	$33,71 \pm 2,47$
$\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina1_GA	$4,12 \pm 0,083$	$13,62 \pm 1,94$
$\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina2	$9,24 \pm 0,40$	$20,32 \pm 0,89$
$\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina2_GA	$12,17 \pm 0,24$	$20,01 \pm 2,17$

A partir dos dados de luminescência e da relaxividade, o sistema $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina2_GA foi escolhido para o acoplamento com o MTX. Essa escolha considerou que o sistema $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina2_GA apresentou resultados mais favoráveis em comparação com os outros sistemas avaliados. Isso é evidenciado ao observar inicialmente que as intensidades de emissão para o composto $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina2_GA foram as que menos diminuíram em comparação com o $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$. Por outro lado, apesar da relaxividade do sistema $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina1 ($r_2 = 33,71 \pm 2,47$) ter sido maior em relação ao sistema $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina2_GA ($r_2 = 20,01 \pm 2,17$), o $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina2_GA apresenta vantagens em sua composição química devido à utilização do GA em sua síntese como agente de reticulação. A gelatina é um composto solúvel em meio aquoso devido à sua natureza hidrofílica, mas a reticulação com GA proporciona maior estabilidade ao sistema, tornando a gelatina mais resistente à dissolução em água. Além disso, a reticulação da gelatina com o GA envolve a reação de grupos amino livres de resíduos de aminoácidos lisina ou hidroxilisina das cadeias com os grupos aldeído do GA. Dessa forma, garante-se que o revestimento do $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}$ com a gelatina não se desfará diante da aplicação biológica desejada (Bigi *et al.*, 2001). Além disso, o sistema $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb}/\text{Er}@$ Gelatina2_GA apresentou o menor tamanho, conforme revelou o MEV, e quanto menores forem as NPs mais eficiente será a penetração nos vasos sanguíneos tumorais.

A citotoxicidade das NPs de $Gd_2O_3:Yb/Er$ e $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina$ foi avaliada utilizando o ensaio de MTT com células Vero, células saudáveis. O efeito dependente da concentração das nanopartículas foi avaliado em comparação com as células no experimento controle (sem NPs), conforme mostrado na **Figura 22**. As NPs demonstraram ser viáveis nas células, com valores acima de 90% para todas as concentrações estudadas. O mesmo ocorreu no estudo de Chen *et al.* (2011), no qual as NPs de $NaYF_4:Yb/Er$ revestidas com quitosana e conjugadas com o ácido fólico, também apresentaram uma viabilidade celular com valores acima de 90%. Além disso, é importante observar que as NPs promoveram um efeito proliferativo para algumas das concentrações estudadas, como pode ser evidenciado na observação de viabilidade média das células acima de 100%.

Figura 22: Citotoxicidade dos compostos a) $Gd_2O_3:Yb/Er$, b) $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1$, c) $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1_GA$, d) $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2$ e e) $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$



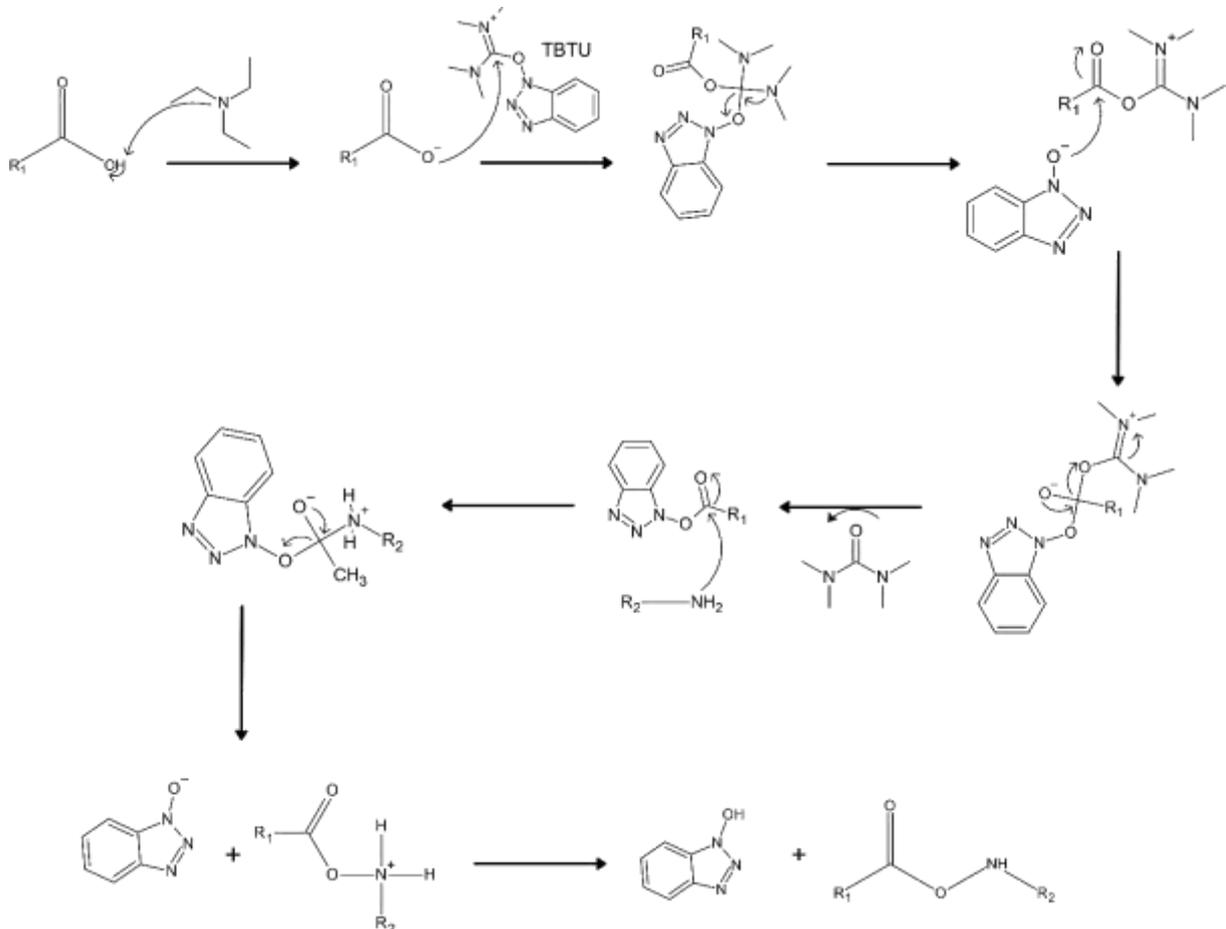
Fonte: Autoria própria.

5.3 $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina-MTX$

Para explicar o funcionamento do TBTU como agente de acoplamento, a **Figura 23** mostra o mecanismo de reação para a amidacão utilizada no trabalho. Foi utilizado um ácido carboxílico e amina genéricos para simplificar o mecanismo. O

mecanismo foi ilustrado como base nos trabalhos obtidos na literatura (Balalaie; Mahdidoust; Eshaghi-Najafabadi, 2008; Valeur; Bradley, 2009).

Figura 23: Mecanismo de atuação do TBTU, com base nos trabalhos Balalaie; Mahdidoust; Eshaghi-Najafabadi (2008); Valeur; Bradley (2009) obtidos na literatura.

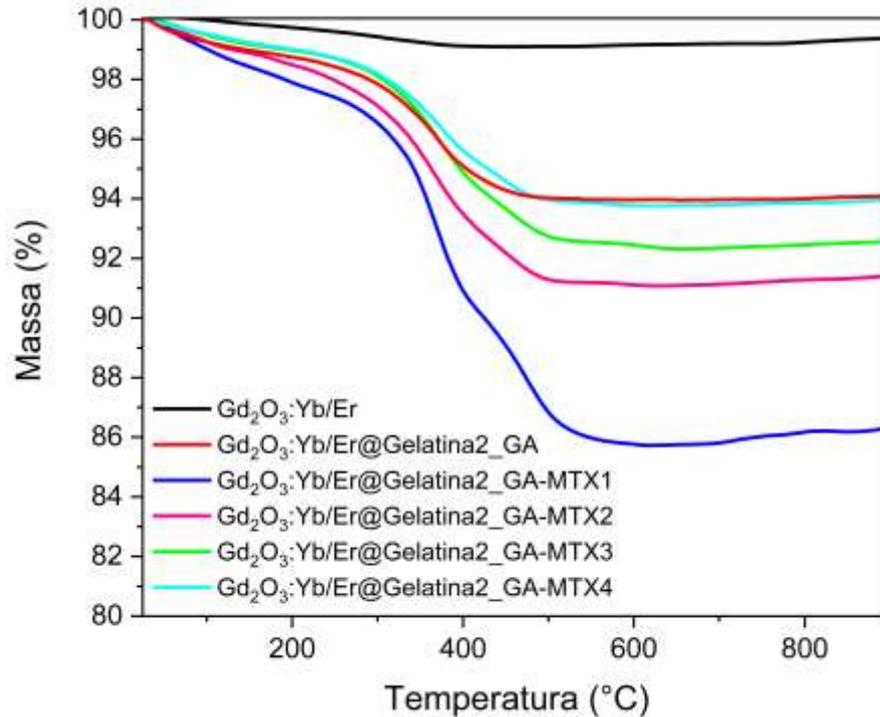


Fonte: Adaptado de Balalaie; Mahdidoust; Eshaghi-Najafabadi (2008); Valeur; Bradley (2009).

A análise de TGA dos compostos conjugados com o MTX, conforme ilustrado na **Figura 24**, revela uma perda de massa de 6,03% para $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX4$ (resíduo: 93,95%), 7,44% para $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX3$ (resíduo: 92,56%), 8,58% para o $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX2$ (resíduo: 91,42%) e 13,67% para o $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX1$ (resíduo: 86,33%). A quantidade de MTX foi estimada a partir da diferença entre as porcentagens residuais entre o $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$ e $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX$, os quais apresentaram valores iguais a 0,13 % para a amostra $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX4$, 1,52 % para a amostra $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX3$, 2,66 % para a

amostra $\text{Gd}_2\text{O}_3\text{:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX2}$ e 7,75% para a amostra $\text{Gd}_2\text{O}_3\text{:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX1}$. Como esperado, observa-se que quanto maior a quantidade de MTX adicionada na síntese, maior é a massa de material conjugado.

Figura 24: TGA referente aos compostos $\text{Gd}_2\text{O}_3\text{:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX1}$, $\text{Gd}_2\text{O}_3\text{:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX2}$, $\text{Gd}_2\text{O}_3\text{:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX3}$ e $\text{Gd}_2\text{O}_3\text{:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX4}$.



Fonte: Autoria própria

A capacidade de carregamento de medicamento, do inglês *Drug Loading Capacity* (DLC%) é um parâmetro que mensura a quantidade máxima de um medicamento incorporado às nanopartículas ou outras estruturas. A equação 14 usada para calcular a capacidade de carregamento de medicamento é a seguinte (Zatorska *et al.* 2020; Piacentini, 2016):

$$DLC\% = \frac{m_{MTX\ ACOPLADO}}{m_{NANOPARTÍCULAS}} * 100 \quad (14)$$

Em outras palavras, a DLC% avalia a porcentagem de massa de nanopartícula composta pelo medicamento incorporado. Para realizar esse cálculo, a análise termogravimétrica foi empregada para determinar a massa residual dos compostos, onde a massa de material acoplado ($m_{acoplado}$) foi determinado pela diferença entre a

massa residual do composto $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$ e o nanocomposto acoplado com o MTX considerando 100 mg de amostra total conforme apresentado na Tabela 7:

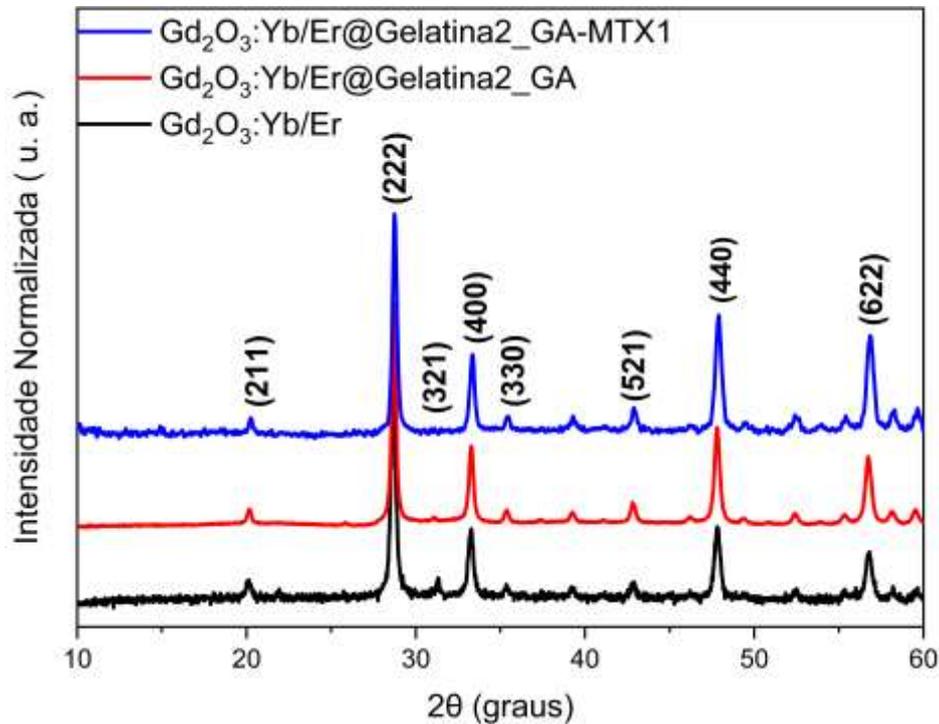
Tabela 7: Resultado de DLC% para os compostos sintetizados.

Sistema	Massa Residual final (mg) em 100 mg de amostra	DLC %
$Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$	94,08	-
$Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX1$	86,33	6,66
$Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX2$	91,42	2,90
$Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX3$	92,56	1,64
$Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX4$	93,95	0,14

A nanossonda que demonstrou a maior DLC% foi a $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX1$, com uma DLC de 6,66 %, conforme indicado na Tabela 7. Isso significa que 6,66% da composição da nanossonda consiste em MTX. A partir desse resultado de DLC% o composto $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX1$ foi escolhido para dar continuidade ao trabalho.

O DRX foi realizado com o objetivo de obter informações sobre possíveis alterações na cristalinidade do material, devido ao acoplamento do MTX. Foram comparados os resultados de DRX para as seguintes amostras: $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$ e $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX1$ em relação à amostra $Gd_2O_3:Yb/Er$ (**Figura 25**). Observa-se nos difratogramas a manutenção dos picos de difração devido à boa correlação de picos em relação ao. $Gd_2O_3:Yb/Er$. Isso sugere que o processo de acoplamento do MTX não promoveu alterações no arranjo cristalino e preservando a sua estrutura original do material, assim como foi observado com o revestimento com a gelatina, conforme apresentado anteriormente.

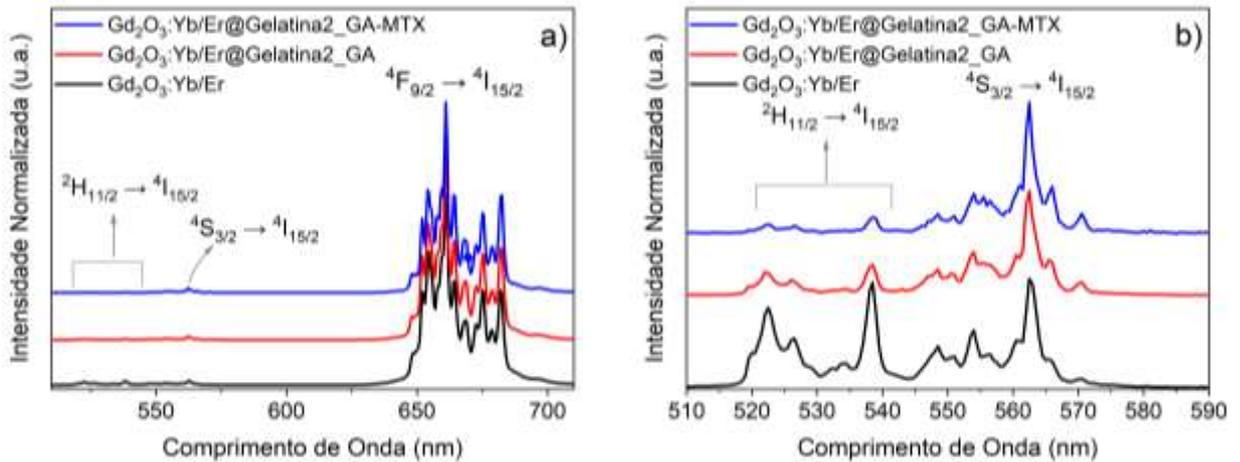
Figura 25: DRX para os compostos $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX1$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$ e $Gd_2O_3:Yb/Er$.



Fonte: Autoria própria.

A **Figura 26** mostra os espectros de emissão para os compostos $Gd_2O_3:Yb/Er$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$ e $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX1$. Observou-se que o processo de acoplamento do MTX não altera as propriedades fotofísicas do material, assim como foi visto com o recobrimento com gelatina. Isso pode ser correlacionado com o resultado do DRX, no qual foi observado que o processo de acoplamento com o MTX não afeta a cristalinidade do $Gd_2O_3:Yb/Er$. Na **Tabela 8**, observa-se que a razão entre a intensidade da emissão no vermelho (I_R) e no verde (I_G) para o composto com MTX aumentou em comparação à razão para o $Gd_2O_3:Yb/Er$ e $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$, indicando que o processo de acoplamento do MTX reduz as intensidades relativas de emissão, principalmente da emissão na região do verde. Isso sugere, semelhante ao observado no processo de recobrimento, que a presença do MTX também deve atrair moléculas de água, aumentando o efeito de *quenching* no sistema. Importante salientar que estas análises foram realizadas na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) por isso apresenta valores diferentes dos relatados anteriormente, porém o mesmo comportamento foi observado em relação às medidas anteriores.

Figura 26: Espectros de emissão *upconversion* dos compostos $Gd_2O_3:Yb/Er$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$ e $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX1$ ($\lambda_{Ex} = 980$ nm), com potência de 300 mW; a) de 450 a 750 nm e b) de 510 a 590 nm.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 8: Análise quantitativa da intensidade no vermelho (I_R) da intensidade no verde (I_G) e da razão de intensidades verde e vermelhas (I_R/I_G) para os compostos $Gd_2O_3:Yb/Er$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$ e $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX1$.

Amostra	I_R (CPS)	I_G (CPS)	I_R/I_G
$Gd_2O_3:Yb/Er$	$1,1 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^4$	45,8
$Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$	$9,6 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^4$	53,3
$Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX1$	$2,9 \cdot 10^5$	$7,1 \cdot 10^3$	40,9

Na **Tabela 9** estão resumidos os dados relaxométricos obtidos a 60 MHz e 37 °C para os sistemas $Gd_2O_3:Yb/Er$, $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$ e $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX1$. Observou-se que o sistema $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX1$ apresentou r_2 maior do que o $Gd_2O_3:Yb/Er$, sugerindo que o revestimento com a gelatina aumenta a concentração de moléculas de água próximas às NPs, além de modular o tempo de difusão das mesmas nas proximidades do centro paramagnético (efeito de esfera externa e segunda esfera), influenciando na diminuição do tempo de relaxação dos prótons, como mencionado anteriormente. Além disso, o $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX1$ apresentou r_2 muito semelhante ao $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA$, o que sugere que o MTX não interfere na mobilidade das moléculas de água.

Tabela 9: Relaxividades obtidas para as amostras Gd₂O₃:Yb/Er, Gd₂O₃:Yb/Er@Gelatina2_GA e Gd₂O₃:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX1 a 37 °C a 60MHz (1,41 T).

Amostra	r_1 (mM⁻¹s⁻¹)	r_2 (mM⁻¹s⁻¹)
Gd ₂ O ₃ :Yb/Er	2,70 ± 0,12	10,32 ± 0,71
Gd ₂ O ₃ :Yb/Er@Gelatina2_GA	12,17 ± 0,24	20,01 ± 2,17
Gd ₂ O ₃ :Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX1	5,66 ± 0,58	21,93 ± 2,25

6 CONCLUSÃO

Nesse estudo, desenvolveu-se uma nanossonda a partir das NPs *upconversion* de $Gd_2O_3:Yb/Er$ revestidas com gelatina e conjugadas com MTX para aplicações teranóstica no CCR. A análise de DRX confirmou a estrutura cristalina cúbica para o $Gd_2O_3:Yb/Er$, e que o revestimento com gelatina não afetou sua cristalinidade. A análise de MEV revelou a redução do diâmetro das nanopartículas, após a calcinação do precursor, indicando a formação do óxido. A formação de uma camada de gelatina ao redor do $Gd_2O_3:Yb/Er$ foi evidenciada pelo MEV, e sugeriu que a reticulação com GA reduz o tamanho das NPs. A espectroscopia de luminescência para o $Gd_2O_3:Yb/Er$ apresentou picos característicos de emissão do Er^{3+} , e observou-se que o processo de recobrimento não alterou as propriedades fotofísicas do material, embora tenha afetado as intensidades de emissão. A caracterização relaxométrica dos sistemas revestidos com gelatina ($Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina$) indicou aumento da relaxividade, especialmente para T_2 , sugerindo uma maior interação da gelatina com as moléculas de água e potencial para aprimorar contraste em aplicações de IRM. Além disso, as NPs de $Gd_2O_3:Yb/Er$ e $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina$ se apresentaram viável em aplicações biológicas, como foi observado na análise de citotoxicidade. A análise termogravimétrica permitiu quantificar a quantidade de MTX incorporada nas nanopartículas, através do agente de acoplamento TBTU, sendo a nanossonda $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina_2_GA-MTX1$ a que demonstrou a maior DLC% indicando maior viabilidade do processo de conjugação. Resultados de DRX revelaram que o acoplamento do MTX não alterou a estrutura cristalina original, indicando estabilidade da estrutura após o processo de conjugação. O processo de acoplamento do MTX não afetou as propriedades fotofísicas do material, já que as transições características referente a emissão do Er^{3+} foram mantidas. Além disso, os dados relaxométricos mostraram que o acoplamento do MTX não afetou significativamente as relaxividades do sistema, sugerindo que a mobilidade das moléculas de água não foi prejudicada. Em resumo, o composto $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina_2_GA-MTX1$ foi escolhido como a nanossonda mais promissora para dar continuidade às aplicações planejadas, apresentando eficiência tanto no carregamento de MTX quanto na manutenção das propriedades fotofísicas e relaxométricas. Esses resultados abrem caminho para futuras pesquisas e aplicações clínicas, onde essa nanossonda funcionalizada pode ser utilizada em terapia e diagnóstico biomédico.

PESPECTIVA

Como perspectiva do presente trabalho propõem-se:

- Realizar a análise termogravimétrica para a amostra $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina1_GA$;
- Realizar as medidas de citotoxicidade para a amostra $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX1$ utilizando células saudáveis e células cancerígenas;
- Realizar a análise de MEV $Gd_2O_3:Yb/Er@Gelatina2_GA-MTX1$;
- Realizar estudo do tempo de vida de emissão para os compostos sintetizados;
- Realizar os experimentos de imagem por Ressonância Magnética (IRM) *in vivo*.

REFERÊNCIAS

AHMAD, M. Y.; AHMAD, M. W.; YUE, H.; HO, S. L.; PARK, J. A.; JUNG, K.; CHA, H.; MARASINI S.; GHAZANFARI, A.; SHUWEN LIU, S.; TEGAF AW, T.; CHAE, K.; CHANG, Y.; LEE, G. H. In Vivo Positive Magnetic Resonance Imaging Applications Of Poly(Methyl Vinyl Ether-Alt-Maleic Acid)-Coated Ultra-Small Paramagnetic Gadolinium Oxide Nanoparticles. **Molecules**, v. 25, n. 5, p. 1159, 2020.

ALBUQUERQUE, G. M.; SOUZA-SOBRINHA, I.; COIADO, S. D.; SANTOS, B. S.; FONTES, A.; PEREIRA, G. A. L.; PEREIRA, G. Quantum dots and Gd³⁺ chelates: advances and challenges towards bimodal nanoprobes for magnetic resonance and optical imaging. **Topics in Current Chemistry**, v. 379, n. 2, p. 12, 7 abr. 2021.

ALIPAL, J.; MOHD PU'AD, N. A. S.; LEE, T. C.; NAYAN, N. H.; SAHARI, N.; BASRI, H.; ABDULLAH, H. Z. A review of gelatin: properties, sources, process, applications, and commercialisation. **Materials Today: Proceedings**, v. 42, p. 240–250, 2019.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **About Colorectal Cancer**. American Cancer Society, 2020. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/types/colon-rectal-cancer/about/what-is-colorectal-cancer.htm>>. Acesso em: 20 de maio de 2023.

AMINOLROAYAEI, F.; SHAHBAZI-GAHROUEI, D.; SHAHBAZI-GAHROUEI, S.; RASOULI N. Recent Nanotheranostics Applications for Cancer Therapy And Diagnosis: A review. **Nanobiotechnol**, v. 15, n. 3, p. 247–256, 2021.

ANDRE, T.; SHIU, K.-K.; KIM, T. W.; JENSEN, B., V; JENSEN, L. H.; PUNT, C.; SMITH, D.; GARCIA-CARBONERO, R.; BENAVIDES, M.; GIBBS, P.; DE LA FOUCHARDIERE, C.; RIVERA, F.; ELEZ, E.; BENDELL, J.; LE, D. T.; YOSHINO, T.; VAN CUTSEM, E.; YANG, P.; FAROOQUI, M. Z. H.; MARINELLO, P.; DIAZ, L. A., JR. Pembrolizumab in Microsatellite-Instability–High Advanced Colorectal Cancer. **J New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 23, p. 2207-2218, 2020.

ANH, T.K., HUONG, N.T., THAO, D.T.; LIEN, P. T.; NGHIA, N. V.; PHUONG, H. T.; TOMALA, R.; MINH, L.Q. High Monodisperse Nanospheres Gd₂O₃: Yb³⁺, Er³⁺ with Strong Upconversion Emission Fabricated By Synergistic Chemical Method. **J Nanopart Res**, v. 23, v. 12, p. 264, 2021.

ANSARI, A. A.; PARCHUR, A. K.; CHEN, G. Surface modified lanthanide upconversion nanoparticles for drug delivery, cellular uptake mechanism, and current challenges in NIR-driven therapies. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 457, p. 214423, 2022.

BALALAIE, S., MAHDIDOUST, M., & ESHAGHI-NAJAFABADI, R. 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-Tetramethyluronium Tetrafluoro Borate (TBTU) as an Efficient Coupling Reagent for the Esterification of Carboxylic acids with Alcohols and Phenols at Room Temperature. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 26, n. 6, p. 1141–1144, 2008.

BELIAN, M. F. **Éteres coroa com íons lantanídeos: de compostos de coordenação a novos materiais nanoestruturados de sílica**. 2008. Tese (Doutorado em química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

BETTENCOURT-DIAS, ANA. Introduction To Lanthanide Ion Luminescence *In*: BETTENCOURT-DIAS, ANA. **Luminescence of Lanthanide Ions in Coordination Compounds and Nanomaterials**. 1. ed., West Sussex: Wiley, 2014. p. 1- 46. ISBN: 978-1119950837.

BIGI, A.; COJAZZI, G.; PANZAVOLTA, S.; RUBINI, K.; ROVERI, N. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. **Biomaterials**, v. 22, n. 8, p. 763–768, 2001.

BOTTRILL, M.; KWOK, L.; LONG, N. J. Lanthanides in magnetic resonance imaging. **Chemical Society Reviews**, n. 35, v. 6, p. 557-571, 2006.

CABEZA, L.; PERAZZOLI, G.; MESAS, C.; JIMÉNEZ-LUNA, C.; PRADOS, J.; RAMA, A. R.; MELGUIZO, C. Nanoparticles in Colorectal Cancer Therapy: Latest In Vivo Assays, Clinical Trials, and Patents. **AAPS PharmSciTech**, v. 21, n. 5, p. 178, 2020.

CARAVAN, P. Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium based MRI contrast agents. **Chemical Society Reviews**, v. 35, n. 6, p. 512, 2006.

CHATTERJEE, K.; SARKAR, S.; JAGAJJANANI RAO, K.; PARIJA, S. Core/shell nanoparticles in biomedical applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 209, p. 8–39, 2014.

CHEN, Q.; WANG, X.; CHEN, F.; ZHANG, Q.; DONG, B.; YANG, H.; LIU, G.; ZHU, Y. Functionalization of upconverted luminescent NaYF₄:Yb/Er nanocrystals by folic acid–chitosan conjugates for targeted lung cancer cell imaging. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 21, p. 7661, 2011.

CHRISTIAN, S. J. Natural fibre-reinforced noncementitious composites (biocomposites). *In*: HARRIES, K. A., SHARMA, B. **Nonconventional and Vernacular Construction Materials**:

Characterisation, Properties and Applications 1. ed. Pittsburgh: Woodhead Publishing; 2016, p. 111-126, INBN: 978-0081008713.

CISTERNA, B. A.; KAMALY, N.; CHOI, W.; TAVAKKOLI, A.; FAROKHZAD, O. C.; VILOS, C. Targeted Nanoparticles for Colorectal Cancer. **Nanomedicine**, v. 18, n. 11, p. 2443–2456, 2016.

COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIAS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE – CONITEC. Anticorpos monoclonais (bevacizumabe, cetuximabe, panitumumabe) associados à quimioterapia no tratamento de primeira linha do câncer colorretal metastático. *In: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022 Disponível em: https://docs.bvsalud.org/biblioref/2022/08/1382327/20220720_relatorio_antikorpos-monoclonais_cancer-colorretal_754_2022.pdf. Acesso em: 16 de junho de 2023.*

DA SILVA VIANA, R.; DE MASCENA COSTA, L. A.; LEAL, A. N. R.; WILLIAMS, T. M.; LUAN, L.; ZHANG, G. WANG, M.; HARMON, A. C.; DOS ANJOS, J. V.; CUETO, R.; FILHO, M. A. G.; FALCÃO, E. H. L.; VICENTE, M. G. H.; JUNIOR, S. A.; MATHIS, J. M. Surface modification strategy based on the conjugation of NaYF₄:5%Eu luminescent nanoprobe with organic aromatic compounds for application in bioimaging assays. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 21, n. 1, p. 23, 2019.

DACOSTA, M. V.; DOUGHAN, S.; HAN, Y.; KRULL, U. J. Lanthanide upconversion nanoparticles and applications in bioassays and bioimaging: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 832, p. 1-33, 2014.

DONG, H.; SUN, L.-D.; YAN, C.-H. Energy transfer in lanthanide upconversion studies for extended optical applications. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 6, p. 1608–1634, 2015.

ELISEEVA, S. V.; BÜNZLI, J.-C. G. Lanthanide luminescence for functional materials and biosciences. **Chemical Society reviews**, v. 39, n. 1, p. 189–227, 2010.

ELZOGHBY, A. O. Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: Reviewing three decades of research. **Journal of Controlled Release**, v. 172, n. 3, p. 1075–1091, 2013.

ENRICO, C. Nanotheranostics and theranostic nanomedicine for diseases and cancer treatment. *In: GRUMEZESCU, A. M. Design of Nanostructures for Theranostics Applications*. 1. ed. Elsevier, 2018. p. 41-68. ISBN: 978-0-12-813669-0

FUNKHOUSER, J. Reintroducing pharma: Theranostic Revolution. **Current Drug Discover**, v. 2, p. 17-19, 2002.

GAI, S.; YANG, P.; WANG, D.; LI, C.; NIU, N.; HE, F.; LI, X. Monodisperse $Gd_2O_3:Ln$ ($Ln = Eu^{3+}, Tb^{3+}, Dy^{3+}, Sm^{3+}, Yb^{3+}/Er^{3+}, Yb^{3+}/Tm^{3+},$ and Yb^{3+}/Ho^{3+}) nanocrystals with tunable size and multicolor luminescent properties. **CrystEngComm**, v. 13, n. 17, p. 5480, 2011.

GEORGE, A.; SANJAY, M. R.; SRISUK, R.; PARAMESWARANPILLAI, J.; SIENGCHIN, S. A comprehensive review on chemical properties and applications of biopolymers and their composites. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 154, p. 329–338, 2020.

GEORGE, A.; SHAH, P. A.; SHRIVASTAV, P. S. Natural biodegradable polymers based nano-formulations for drug delivery: A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 561, p. 244–264, 2019.

GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. C. Bases Físicas da Espectroscopia RMN. *In*: GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. C. **Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, Métodos e Aplicações**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002. p. 39-111. ISBN: 972-31-0969-7.

HUBNER, R. A.; HOULSTON, R. S. Folate and colorectal cancer prevention. **British Journal of Cancer**, v. 100, n. 2, p. 233–239, 2009.

IMPERIALE, T. F.; RANSOHOFF, D. F.; ITZKOWITZ, S. H.; LEVIN, T. R.; LAVIN, P.; LIDGARD, G. P.; AHLQUIST, D. A.; BERGER, B. M. Multitarget Stool DNA Testing for Colorectal-Cancer Screening. **J New England Journal of medicine**, v. 370, n. 14, p. 1287-1297, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Estimativa 2023. *In*: INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil) **Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2022.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Globocan 2020: Cancer Today. Cancer Fact Sheets. Global Cancer Observatory. Disponível em: https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/10_8_9-Colorectum-fact-sheet.pdf . Acesso em: 4 de abril de 2023.

KAMIŃSKA, I.; ELBAUM, D.; SIKORA, B.; KOWALIK, P.; MIKULSKI, P.; FELCYN, Z.; SAMOL, P.; WOJCIECHOWSKI, T.; MINIKAYEV, R.; PASZKOWICZ, W.; ZALESZCZYK, W.; SZEWCZYK, M.; KONOPKA, A.; GRUZEL, G. PAWLYTA, M.; DONTEN, M.; CISZAK, K.; ZAJDEL, K.; FRONTCZAK-BANIEWICZ, M.; STEOIEN, P.; ŁAPIŃSKI, M.; WILCZYŃSKI, G.; FRONC, K. Single-step synthesis of Er^{3+} and Yb^{3+} ions doped molybdate/ Gd_2O_3 core-shell nanoparticles for biomedical imaging. **Nanotechnology**. V. 29, n. 2, p. 025702, 2018.

LI, H. SONG, S.; WANG, W.; CHEM, K. In vitro photodynamic therapy based on magnetic-luminescent Gd₂O₃:Yb,Er nanoparticles with bright three-photon up-conversion fluorescence under near-infrared light. **Dalton Transactions**, v. 44, n. 36, p. 16081–16090, 2015.

LI, H.; WANG, X.; HUANG, D.; CHEN, G. Recent advances of lanthanide-doped upconversion nanoparticles for biological applications. **Nanotechnology**, v. 31, n. 7, p. 072001, 2020.

LI, X.; WANG, J.; YU, Z.; LOU, X.; ZHANG, C.; JIA, X.; JIA, G. Well-defined Gd(OH)CO₃, Gd₂O(CO₃)₂·H₂O, and Gd₂O₃ compounds with multiform morphologies and adjustable particle sizes: Synthesis, formation process, and luminescence properties. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 624, p. 126834, 2021.

LIN, J.; DING, J.; DAI, Y.; WANG, X.; WEI, J.; CHEN, Y. Antibacterial zinc oxide hybrid with gelatin coating. **Materials Science and Engineering: C**, v. 81, p. 321–326, 2017.

LIU, H.; RONG, J.; SONG, Y.; SHEN, G.; GU, W.; LIU, X. The enhancement of upconversion luminescence of Gd₂O₃:Yb/Er nanoparticles by Ca²⁺ codoping for temperature sensing at room and high temperature. **NANO**, v. 14, n. 6, 2019.

MAKSIMOVIC, V.; PAVLOVIC-POPOVIC, Z.; VUKMIROVIC, S.; CVEJIC, J.; MOORANIAN, A.; AL-SALAMI, H.; MIKOV, M.; GOLOCORBINA-KON. S. Molecular mechanism of action and pharmacokinetic properties of methotrexate. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 6, p. 4699–4708, 2020.

MATIJEVIĆ, E.; HSU, W. P. Preparation and properties of monodispersed colloidal particles of lanthanide compounds. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 118, n. 2, p. 506–523, 1987.

MENG, F.; YUN, Z.; YAN G.; WANG, G.; LIN, C. Engineering of anticancer drugs entrapped polymeric nanoparticles for the treatment of colorectal cancer therapy. **Process Biochemistry**, v. 111, p. 36-42, 2021.

MOFATEHNIA, P.; ELHAMIFAR, D.; ZIARANI, G, M. Cu-containing core–shell structured Fe₃O₄@Gelatin nanocomposite: a novel catalyst for the preparation of hexahydroquinolines. **Research on Chemical Intermediates**, v. 49, n. 3, p. 967–978, 2023.

MORTEZAZADEH, T.; GHOLIBEGLOO, E.; RIYABI, A. N.; HAGHGOO, S.; MUSA, A. E.; KHOABI M. Glucosamine Conjugated Gadolinium (III) Oxide Nanoparticles as a Novel Targeted Contrast Agent for Cancer Diagnosis in MRI. **Journal of Biomedical Physics and Engineering**, v. 10, n.1, p. 25-38, 2020.

MOZAFARI, M.; MOZTARZADEH, F. Controllable synthesis, characterization and optical properties of colloidal PbS/gelatin core-shell nanocrystals. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 351, n. 2, p. 442–448, 2010.

NOREK, M.; PEREIRA, G. A.; GERALDES, C. F. G. C.; DENKOVA, A.; ZHOU, W.; PETERS, J. A. NMR Transversal Relaxivity of Suspensions of Lanthanide Oxide Nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 28, p. 10240–10246, 2007.

ORTEGA-BERLANGA, B.; BETANCOURT-MENDIOLA, L.; ANGEL-OLARTE, C.; HERNÁNDEZ-ADAME, L.; ROSALES-MENDOZA, S.; PALESTINO, G. An Overview of Gadolinium-Based Oxide and Oxy sulfide Particles: Synthesis, Properties, and Biomedical Applications. **Crystals**, v. 11, n. 9, p. 1094. 2021.

PAIVA, D. L. LAMPMAN, G. L.; KRINZ, S. G.; VYVYAN, R. J. **Introduction to Spectroscopy**. 4. ed. Belmont: Books/Cole, CENGAGE Learning, 2001. ISBN; 970-0-495-11478-9.

PEREIRA, Giovannia Araújo de Lima. **Paramagnetic Systems as Potencial MRI Contrast Agents: Evaluation of Physical-Chemical Properties**. 2008. Tese (Doutorado em Química) - Faculdade de Ciências e Tecnologia de Coimbra, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2008

PEREIRA, Suelen Catherine Farias. **Melhoramento das Propriedades Luminescentes e Reológicas do Hidrogel G-Ln' pela Incorporação de Complexos Ln(DPA)₃**. 2019. Monografia (Trabalho de conclusão de curso) – Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

PIACENTINI, E. Encapsulation Efficiency. *In*: DRIOLI, E.; GIORNO, L. **Encyclopedia of Membranes**. 1. ed. Berlin: Springer-Verlag Berlin, 2016. p. 706–707. ISBN: 978-3662443231.

RAJORA, A.; RAVISHANKAR, D.; OSBORN, H.; GRECO, F. Impact of the enhanced permeability and retention (EPR) effect and cathepsins levels on the activity of polymer-drug conjugates. **Polymers**, v. 6, n. 8, p. 2186–2220, 2014.

ROBERTSON, A. G.; RENDINA, L. M. Gadolinium theranostics for the diagnosis and treatment of cancer. **Chemical Society Reviews**, v. 50, n. 7, p. 4231–4244, 2021.

ROHRER, M.; BAUER, H.; MINTOROVITCH, J.; REQUARDT, M.; WEINMANN, H.-J. Comparison of Magnetic Properties of MRI Contrast Media Solutions at Different Magnetic Field Strengths. **Investigative Radiology**, v. 40, n.11, p. 715–724, 2005.

SARIKHANI, A., ALAMZADEH, Z., BEIK, J. IRAJIRAD, R.; MIRRAHIMI, M.; MAHABADI, V. P.; KAMRAVA, S. K.; GHAZNAVI, H.; KHOEI, S. Ultrasmall Fe₃O₄ and Gd₂O₃ hybrid nanoparticles for T₁-weighted MR imaging of cancer. **Cancer Nanotechnology**, v. 13, n.1, p. 43, 2022.

SHAN, X.; GONG, X.; LI, J.; WEN, J.; LI, Y.; ZHANG, Z. Current approaches of nanomedicines in the market and various stage of clinical translation. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 12, n. 7, p. 3028-3048, 2022.

SILVA, C. O.; PINHO, J. O.; LOPES, J. M.; ALMEIDA, A. J.; GASPAR, M. M.; REIS, C. Current trends in cancer nanotheranostics: Metallic, polymeric, and lipid-based systems. **Pharmaceutics**, 2019. v. 11, n. 1 p. 22, 2019.

SIRIVAT, A.; PARADEE, N. Facile synthesis of gelatin-coated Fe₃O₄ nanoparticle: Effect of pH in single-step co-precipitation for cancer drug loading. **Materials & Design**, v. 181, p. 107942, 2019.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; WEST, D. M.; CROUCH, S. R. **Principios De Análise Instrumental**. 2. ed. Cengage Learning, 2015. ISBN: 978-8522116607.

SOARES, S. F., FATEIXA, S.; TRINDADE, T.; DANIEL-DA-SILVA. A. L. A versatile synthetic route towards gelatin-silica hybrids and magnetic composite colloidal nanoparticles. **Advanced Composites and Hybrid Materials**, v. 5, n. 2, p. 884–898, 2022.

SOUZA SOBRINHA, Izabel Gomes de. **Síntese e Caracterização Físico-Química de Potenciais Agentes de Contraste Bimodais Baseados Em Pontos Quânticos e Complexos de Gadolínio**. 2018. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

VALEUR, E.; BRADLEY, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 606–631, 2009.

WANG, N.; FU, Z.; WEI, Y.; SHENG, T. Investigation for the upconversion luminescence and temperature sensing mechanism based on BiPO₄: Yb³⁺, RE³⁺ (RE³⁺ = Ho³⁺, Er³⁺ and Tm³⁺). **Journal of Alloys and Compounds**, v. 772, p. 371–380, 2019.

YASMIN, R.; SHAH, M.; KHAN, S. A.; ALI, R. Gelatin nanoparticles: A potential candidate for medical applications. **Nanotechnology Reviews**, v. 6, n. 2, p. 191–207, 2017.

ZACHARIASEN, W. The Crystal Structure of the Modification C of the Sesquioxides of the Rare Earth Metals, and of Indium and Thallium. **Norsk Geologisk Tidsskrift**, v. 9, p. 310–316, 1927.

ZATORSKA, M.; ŁAZARSKI, G.; MAZIARZ, U.; WILKOSZ, N.; HONDA, T.; YUSA, S.; BEDNAR, J.; JAMRÓZ, D.; KEPCZYNSKI, M. Drug-loading capacity of polylactide-based micro- and nanoparticles – Experimental and molecular modeling study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 591, p. 120031, 2020.

ZHANG, D.; PENG, R.; LIU, W. DONOVAN, M. J.; WANG, L. ISMAIL, I. LI, J. LI, J. QU, F. TAN, W. Engineering DNA on the Surface of Upconversion Nanoparticles for Bioanalysis and Therapeutics. **American Chemical Society Nano**. v. 15, n 11, p. 17257-17274, 2021.

ZI, Y.; YANG, K.; HE, J.; WU, Z.; LIU, J.; ZHANG, W. Strategies to enhance drug delivery to solid tumors by harnessing the EPR effects and alternative targeting mechanisms. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 188, p. 11449, 2022.