**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS**

MARYLYN SETSUKO ARAI

**Síntese e caracterização de nanopartículas emissoras de
luz por conversão ascendente de energia (UCNPS)
funcionalizadas para uso em aplicações biológicas**

**São Carlos
2018**

MARYLYN SETSUKO ARAI

Síntese e caracterização de nanopartículas emissoras de luz por conversão ascendente de energia (UCNPS) funcionalizadas para uso em aplicações biológicas

Versão Corrigida

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.

Orientador(a): Dra Andrea S. S. de Camargo

**São Carlos
2018**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

AA659s Arai, Marylyn
 Síntese e caracterização de nanopartículas
emissoras de luz por conversão ascendente de energia
(UCNPS) funcionalizadas para uso em aplicações
biológicas / Marylyn Arai; orientadora Andrea de
Camargo; coorientador Malte Gruener. São Carlos, 2018.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
em Ciência e Engenharia de Materiais e Área de
Concentração em Desenvolvimento, Caracterização e
Aplicação de Materiais -- Escola de Engenharia de São
Carlos da Universidade de São Paulo, 2018.

1. Agentes teranósticos. 2. Nanopartículas
emissoras de luz por conversão ascendente de energia.
3. Fotossensibilizador. 4. Fotoinativação de bactérias.
I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharela **MARYLYN SETSUKO ARAI**.

Título da dissertação: "Síntese e caracterização de nanopartículas emissoras de luz por conversão ascendente de energia (UCNPs), funcionalizadas para uso em aplicações biológicas".

Data da defesa: 21/09/2018.

Comissão Julgadora:

Resultado:

Profa. Associada **Andréa Simone Stucchi de Camargo Alvarez Bernardez**

(Orientadora)

(Instituto de Física de São Carlos/IFSC)

Aprovada

Prof. Dr. **José Maurício Almeida Caiut**

(Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras de Ribeirão Preto/FFCLRP-USP)

Aprovada

Prof. Dr. **Eduardo José Nassar**

(Universidade de Franca/UNIFRAN)

Aprovada

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais:

Prof. Associado **Rafael Salomão**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Associado **Luís Fernando Costa Alberto**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria e José, por todo o apoio em todas as minhas decisões, por sempre me incentivarem a ser uma pessoa melhor e por serem os maiores encorajadores de todas as minhas conquistas. Por serem tão atenciosos, por sempre pensarem em formas de fazer essa caminhada muito mais leve e por todo trabalho árduo para me proporcionar a chance de chegar até aqui.

À minha irmã, Evelin, por todo amor e companheirismo e ao meu cunhado, Jonatas, obrigada por sempre estarem prontos a ajudar e por todos os momentos de alegria que compartilhamos.

Ao meu namorado André, por todo o apoio e compreensão e por fazer a minha vida em São Carlos muito mais fácil e feliz, assim como à minha amiga, Karina, que morou comigo durante todos esses anos e com quem sempre pude contar.

À Prof. Dra. Andrea de Camargo, por me acolher em seu grupo, pela ajuda e por me dar a chance de aprender tantas coisas novas.

Ao Dr. Malte Grüner, que mais que um co-orientador, se tornou um amigo, agradeço por compartilhar seu projeto comigo, por toda a sua paciência, por sempre estar presente e disposto a compartilhar seu conhecimento e por me apresentar essa área que me fez ficar mais apaixonada pela ciência.

A todo o grupo do Laboratório de Espectroscopia de Materiais Funcionais (LEMAF), pela companhia no laboratório, pela ajuda e dicas durante as reuniões de grupo, especialmente à Tássia, Raquel e Maria, pelos momentos de lazer e descontração e por fazerem meus dias mais fáceis.

À Dra. Mariana Carreira e à Dra. Natália Inada, pela colaboração nos testes biológicos do projeto e por sempre estarem dispostas a ajudar.

À Universidade de São Paulo (USP), à Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) e ao Instituto de Física de São Carlos (IFSC) pela oportunidade de realizar esse mestrado.

A CAPES pelo suporte financeiro.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, professores, técnicos, funcionários e colegas.

Muito obrigada.

ARAI, M. S. **Síntese e caracterização de nanopartículas emissoras de luz por conversão ascendente de energia (UCNPS) funcionalizadas para uso em aplicações biológicas** [dissertação] – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

RESUMO

As nanopartículas emissoras de luz por conversão ascendente de energia (UCNPs) têm atraído grande interesse nos últimos anos devido à sua versatilidade e capacidade de converter radiação menos energética em fótons de maior energia. Quando combinadas com outras moléculas, as UCNPs podem ser empregadas em um grande número de bioaplicações e, apesar de encontrar um de seus maiores usos na terapia fotodinâmica (PDT) de células cancerígenas, os mesmos princípios podem ser empregados na fotoinativação de bactérias (PDI). Nos últimos 20 anos a resistência bacteriana têm se tornado um dos maiores problemas de saúde pública e novas estratégias precisam ser desenvolvidas para superar esse desafio. Nesse trabalho, nós apresentamos a síntese e caracterização de nanopartículas de NaYF_4 dopadas com Yb^{3+} (20%) e Er^{3+} (2%) e funcionalizadas para uso em PDI. As UCNPs foram sintetizadas utilizando-se o método de co-precipitação e foram revestidas com uma camada de sílica mesoporosa (mSiO_2) visando o aumento da dispersibilidade em água, o incremento da área superficial e a possibilidade de funcionalizações, e a diminuição da citotoxicidade do material. As UCNP@mSiO_2 foram decoradas com moléculas orgânicas e com o fotossensibilizador (PS) ftalocianina de silício (SiPc) para estudo de sua interação e efeito bactericida contra cepas bacterianas Gram positivas e negativas. Diferentes abordagens foram utilizadas em busca de nanopartículas com as melhores propriedades: tamanho, forma, geração de oxigênio singlete e estabilidade em solução aquosa. Verificou-se que a transferência de energia entre as UCNPs e as SiPc em sua superfície é muito dependente do tipo de funcionalização realizada e da extensão com que as moléculas de PS adentram os poros da sílica. O material final apresentou toxicidade na ausência de luz contra a bactéria *E. coli*, enquanto a viabilidade das cepas de *S. aureus* não foi afetada no escuro. A excitação direta da SiPc nas nanopartículas levou a completa erradicação da *E. coli* e um drástico decréscimo no número de unidades formadoras de colônia (CFU) da *S. aureus* de até sete ordens de magnitude. Com esse estudo demonstramos diferentes estratégias para sintetizar e potencializar o uso das UCNPs como agentes teranósticos, principalmente para uso em PDI.

PALAVRAS CHAVE: Materiais teranósticos. Fotoinativação de bactérias. Ftalocianinas de silício. Oxigênio Singlete.

ARAI, M. S. **Síntese e caracterização de nanopartículas emissoras de luz por conversão ascendente de energia (UCNPS) funcionalizadas para uso em aplicações biológicas** [dissertação] – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

ABSTRACT

Lanthanide-doped upconverting nanoparticles (UCNPs) that emit high-energy photons upon excitation by low-energy near infrared (NIR) light, have garnered great interest in recent years due to their versatility. These nanoparticles combined to other molecules can be used for a broad range of bio-applications as theranostic agents, for bioimaging, drug and gene delivery and photodynamic therapy (PDT) applications. Although phototherapy is commonly used in the treatment of cancer, the same principles can be applied for the inactivation of bacteria (PDI). In the last twenty years bacterial resistance against antibiotics has become a critical public health issue and new strategies are needed to overcome this challenge. Herein, we describe the synthesis, detailed characterization and application of functionalized NaYF₄: Yb (20%), Er (2%) UCNPs for use in PDT and especially for PDI. The UCNPs are produced using the co-precipitation method and covered with a mesoporous silica shell to enhance the dispersibility in water, increase the surface area and grant functionalization possibility and to decrease cytotoxicity. The nanoparticles were decorated with different molecules and functionalized with the photosensitizer (PS) silicon phthalocyanine (SiPc) to study interaction and enhance the bactericidal effect against Gram positive (+) and Gram negative (-) bacteria. Different approaches were used to identify the best particles concerning the shape, size, photophysical properties, generation of singlet oxygen and stability in water. It was verified that the energy transfer (FRET) efficiency from the UCNP towards SiPc depended on the surface functionalization and resulting encapsulation depths of the PS into the mesoporous silica. Functionalized UCNPs displayed dark toxicity towards Gram (-) *E. coli* while Gram (+) *S. aureus* viability was not decreased in the dark. Directly exciting the PS on the UNCP led to complete eradication of *E. coli* and a drastic decrease of colony forming units of *S. aureus* of up to seven orders of magnitude. Through this study we demonstrate different strategies to synthesize and potentialize the use of UCNPs as theranostic agents, mainly for use in PDI.

KEYWORDS: Theranostic Materials. Photodynamic inactivation of bacteria. Silicon Phtalocyanine. Singlet Oxygen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema geral dos processos de UC. (a) Absorção de estado excitado, (b) transferência de energia e (c) avalanche de fótons. As flechas pontilhadas, tracejadas, pontilhadas/tracejadas e cheias representam excitação por fóton, transferência de energia não radiativa, relaxação cruzada e processos de emissão, respectivamente.	5
Figura 2. Diagrama de níveis de energia para os íons Yb^{3+} e Er^{3+} . Setas cheias indicam transições radiativas e setas tracejadas indicam processos de transferência de energia não radiativos.	7
Figura 3. Diagrama esquemático de formação do $^1\text{O}_2$ através da ativação do fotossensibilizador.	10
Figura 4. (a) Estrutura geral de uma ftalocianina onde M representa o átomo metálico, R os substituintes dos anéis e X os ligantes axiais. Estruturas das ftalocianinas de silício empregadas nesse trabalho (b) 2,9,16,23-tetra-terc-butil-29H,31H-di-hidroxi-ftalocianina de silício e (c) ftalocianina de silício com ligante axial contendo grupamento azida.	11
Figura 5. Janela biológica óptica – Espectro de absorção dos principais cromóforos dos tecidos biológicos.	13
Figura 6. UCNP dopada com Yb^{3+} e Er^{3+} e funcionalizada com ftalocianinas de silício. Processos envolvidos na obtenção de bioimagem e terapia fotodinâmica.	13
Figura 7. Representação esquemática do arranjo das membranas de bactérias (A) Gram positivas e (B) Gram negativas.	17
Figura 8. Esquema da formação fotoinduzida do endoperóxido de ABMDMA através da interação com $^1\text{O}_2$	23
Figura 9. Imagens obtidas por MEV e distribuição de tamanhos das UCNPs produzidas variando-se o tempo e a temperatura de síntese.	26
Figura 10. Imagens das UCNPs sintetizadas a 140 °C por 2 h. Parte superior: MEV, parte inferior: MET.	26
Figura 11. (A) Estrutura cúbica para o sistema NaREF_4 . (B) Comparação entre o padrão de difração obtido para as UCNPs sintetizadas (superior) e o padrão calculado para o cristal cúbico de NaYF_4 (inferior).	27
Figura 12. Espectro (A) absorção das UCNPs em etanol (1 mg/ mL) e (b) UCL ($\lambda_{\text{exc}} = 978$ nm) das UCNPs em pó.	28
Figura 13. Imagens obtidas por MET das UCNP@mSiO_2	29

Figura 14. (A) Isotermas de adsorção e dessorção de N ₂ para as UCNP@mSiO ₂ e (B) distribuição do tamanho dos poros.....	29
Figura 15. Espectro de emissão (a) das UCNP@mSiO ₂ em pó e (b) comparação entre as UCNP e das UCNP@mSiO ₂ em água ($\lambda_{exc} = 978$ nm).....	30
Figura 16. Espectro de absorção normalizado das ftalocianinas de silício SiPc e SiPc(N ₃) ₂ ..	31
Figura 17. Esquema das diferentes formas de interação entre as moléculas de fotossensibilizadores e o revestimento de sílica.	31
Figura 18. Fotografia das UCNP-Ad ₁₀₀ em água após 0 min e 60 min de descanso. Concentrações (A) 1, (B) 0,5, (C) 0,25 e (D) 0,125 mg UCNP/mL.	32
Figura 19. Espectro de absorção UV-Vis (a) MB e (b) UCNP-Ad ₁₀₀ e Espectros de emissão do ABMDMA ($\lambda_{exc} = 370$ nm) após diferentes tempos de exposição das amostras (C) MB e (D) UCNP-Ad ₁₀₀ à radiação de 630 nm.....	33
Figura 20. Decaimento da emissão do ABMDMA na amostra UCNP-Ad ₁₀₀ e MB representado por um gráfico de $\ln (F/F_0)$ vs tempo.	33
Figura 21. Espectros de absorção UV-Vis dos sobrenadantes de lavagem das UCNPs funcionalizadas (a) SOB ₁₀ e (b) SOB ₆₂	34
Figura 22. (a) Espectros de emissão do ABMDMA ($\lambda_{exc} = 370$ nm) após diferentes tempos de exposição da amostra UCNP-Cov ₂₆ a radiação de 630 nm e (b) Decaimento da emissão do ABMDMA na amostra UCNP-Cov ₂₆ representado por um gráfico de $\ln (F/F_0)$ vs tempo.....	34
Figura 23. Esquema da reação de funcionalização das UCNP através do processo de cicloadição.	35
Figura 24. Diagrama esquemático das reações de acoplamento envolvendo EDC e sulfo-NHS para formação de amidas.....	36
Figura 25. (a) Espectros de emissão do ABMDMA ($\lambda_{exc} = 370$ nm) após diferentes tempos de exposição da amostra UCNP-CA ₅₅ a radiação de 630 nm e (b) Decaimento da emissão do ABMDMA na amostra UCNP- CA ₅₅ representado por um gráfico de $\ln (F/F_0)$ vs tempo.....	37
Figura 26. Representação esquemática do acoplamento entre os momentos de dipolo de transição das moléculas de fotossensibilizadores quando alinhadas de forma (a) axial e (b) lateral.....	38
Figura 27. Espectros de absorção normalizado das UCNP-Ad ₁₀₀ , UCNP-Cov ₂₆ e UCNP-CA ₅₅ e tipos de agregados formados.	38
Figura 28. (a) Espectros de emissão das UCNP@mSiO ₂ e absorção da ftalocianina de silício – sobreposição da região de 650 nm. (b) Espectros de emissão ($\lambda_{exc} = 978$ nm) das UCNP@mSiO ₂ , UCNP-Ad ₁₀₀ , UCNP-Cov ₂₆ e UCNP-CA ₅₅ em pó.	39

Figura 29. Intensidade normalizada do pico de emissão em 410 nm ($\lambda_{exc} = 370$ nm) após diferentes tempos de exposição das amostras UCNP-Ad ₁₀₀ , UCNP-Cov ₂₆ e UCNP-CA ₅₅ a radiação de 978 nm (2W).	40
Figura 30. Diagrama esquemático das moléculas de fotossensibilizador no interior dos poros - dependência com o modo de adição.	40
Figura 31. Diagrama esquemático das reações de síntese das UCNP1-6.....	43
Figura 32. Potencial zeta das UCNPs 1-6.....	44
Figura 33. Raio hidrodinâmico das UCNPs 1-6.	44
Figura 34. Espectros de absorção das UCNPs funcionalizadas (A) Normalizado em 788 nm e (B) Normalizado em 788 nm e com linha de base corrigida para banda-Q.	45
Figura 35. Intensidade normalizada do pico de emissão em 410 nm ($\lambda_{exc} = 370$ nm) após diferentes tempos de exposição das UCNP2-6 a radiação de 978 nm (1,5 W).	46
Figura 36. Imagens de microscopia confocal de fluorescência da UCNP1-6 encubadas com (A) <i>E. coli</i> e (B) <i>S. aureus</i>	47
Figura 37. Número de unidades formadoras de colônias (CFU)/ mL para (a) <i>E. coli</i> e (b) <i>S. aureus</i> incubadas com as amostras UCNP1-6 e irradiadas com LED de 660 nm por 1h.	50
Figura 38. Número de unidades formadoras de colônias (CFU)/ mL para (a) <i>E. coli</i> e (b) <i>S. aureus</i> incubadas com a amostra UCNP2 e irradiadas com laser de 978 nm por 30 min.....	52

LISTA DE SIGLAS/ ABREVIATURAS

Ac-DBCO-PEG₄: ácido PEG₄-dibenzociclooctino

ADMDMA: *9,10-anthracenediyl-bis(methylene)dimalonic acid*

AO: ácido oleico

APTES: 3-aminopropil trietoxisilano

BET: Brunauer–Emmett–Teller

BJH: Barrett–Joiner–Halenda

Ce6: clorina 6

CFU: unidades formadoras de colônias

CM: curcumina

CTAB: brometo de cetiltrimetilamônio

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DIPEA: n,n-diisopropiletilamina

DNA: ácido desoxirribonucleico

dSiO₂: camada de sílica densa

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ESA: absorção de estado excitado

(EtOH)₃N: trietanolamina

ETU: transferência de energia por conversão ascendente de energia

FRET: transferência de energia Foster

GSA: absorção do estado fundamental

ISC: cruzamentos intersistemas

LED: diodo emissor de luz

MB: azul de metileno

MeI: iodometano

MES: ácido 2-(n-morfolino) etanosulfônico

MET: microscopia eletrônica de transmissão

MEV: microscopia eletrônica de varredura

MRSA: estafilococos aureus resistente a meticilina

mSiO₂: camada de sílica mesoporosa

NIR: infravermelho próximo

PA: avalanche de fótons

Pc: ftalocianina

PDI: fotoinativação

PDT: terapia fotodinâmica

PS: fotossensibilizador

PTT: terapia fototérmica

PVP: polivinilpirrolidona

QD: pontos quânticos

RB: rosa bengala

ROS: espécies reativas de oxigênio

SiPc: ftalocianina de silício

sulfo-NHS: n-hidroxi sulfonamida

TEOS: ortosilicato de tetraetila

TFA: trifluoroacetatos

UC: conversão ascendente

UCL: luminescência por conversão ascendente de energia

UCNP: nanopartículas emissoras de luz por conversão ascendente de energia

UCNP-PS: nanopartículas emissoras de luz por conversão ascendente de energia funcionalizadas com fotossensibilizadores

ZnPc: ftalocianina de zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. MATERIAIS LUMINESCENTES	1
1.2. NANOPARTÍCULAS EMISSORAS DE LUZ POR CONVERSÃO ASCENDENTE DE ENERGIA (UCNPs)	2
1.2.1. Composição e características das UCNPs.....	2
1.2.3. Propriedades fotofísicas das UCNPs.....	6
1.2.4. Síntese	7
1.2.5. Modificações na superfície.....	8
1.3. FOTOSSENSIBILIZADORES.....	9
1.3.1. Efeito fotodinâmico	9
1.3.2. Ftalocianinas.....	11
1.4. NANOMATERIAIS TERANÓSTICOS.....	12
1.5. FENÔMENOS DE TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA.....	14
1.6. TERAPIA FOTODINÂMICA	14
1.6.1. Terapia fotodinâmica de células cancerígenas.....	14
1.6.2. Fotoinativação de bactérias.....	16
1.6.3. Uso das UCNPs em PDI	17
2. METODOLOGIA	19
2.1. MATERIAIS	19
2.2. SÍNTESE DAS UCNPs (PVP/NaYF ₄ : Yb (20%), Er (2%)).....	19
2.3. REVESTIMENTO DAS UCNPs	20
2.3.1. Síntese da camada de sílica mesoporosa - (UCNP@mSiO ₂).....	20
2.4. FUNCIONALIZAÇÃO DAS UCNPs.....	20
2.4.1. Funcionalização com grupos amino - (UCNP@mSiO ₂ - NH ₂)	20
2.4.2. Funcionalização com HOOC-TEG-COOH e HOOC-TEG-NH ₂	20
2.4.3. Permetilação	21
2.5. ADIÇÃO DO FOTOSSENSIBILIZADOR	21
2.5.1. Adsorção do fotossensibilizador SiPc - (UCNP -Adx).....	21
2.5.2. Ligação covalente do fotossensibilizador SiPc - (UCNP-Covx).....	21
2.5.3. Ciclo adição do fotossensibilizador SiPc(N ₃) ₂ - (UCNP-CCx)	22
2.6. CARACTERIZAÇÃO	22
2.7. FOTOINATIVAÇÃO DE BACTÉRIAS <i>IN VITRO</i>	24
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	25
3.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS UCNPS (NaYF ₄ , Yb (20%), Er (2%)).....	25

3.1.1.	<i>Otimização do tamanho e forma</i>	25
3.1.2.	<i>Determinação da estrutura cristalina</i>	26
3.1.3.	<i>Propriedades fotofísicas</i>	27
3.2.	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DA CAMADA DE SÍLICA MESOPOROSA - (UCNP@mSiO₂)	28
3.3.	FUNCIONALIZAÇÃO DAS UCNPs@mSiO₂	30
3.3.1.	<i>Adsorção do Fotossensibilizador SiPc (UCNP-Adx)</i>	31
3.3.2.	<i>Ligação Covalente do Fotossensibilizador SiPc (UCNP-Covx)</i>	33
3.3.3.	<i>Ciclo-adição do Fotossensibilizador SiPc(N₃)₂ (UCNP-CAx)</i>	35
3.4.	CARACTERÍSTICAS DAS UCNPs FUNCIONALIZADAS	37
3.4.1.	<i>Formação de agregados</i>	37
3.4.2.	<i>FRET da UCNPs para o fotossensibilizador</i>	39
3.4.3.	<i>Considerações gerais</i>	41
3.5.	UCNPs PARA APLICAÇÃO EM PDI	41
3.5.1.	<i>Modificação da carga superficial</i>	41
3.5.2.	<i>Propriedades Fotofísicas</i>	45
3.5.3.	<i>Interação entre as nanopartículas e bactérias</i>	46
3.5.4.	<i>Fotoinativação de bactérias in vitro</i>	48
4.	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS	55

1. INTRODUÇÃO

1.1. MATERIAIS LUMINESCENTES

Técnicas baseadas em luminescência são consideradas ferramentas poderosas na investigação de processos fundamentais em medicina, biologia, química e outras ciências, pois estão associadas a processos de detecção rápidos, confiáveis, reprodutíveis e sensíveis. Adicionalmente, há uma grande variedade de cromóforos (corantes orgânicos, complexos metal-ligante, materiais dopados com íons lantanídeos, proteínas fluorescentes, entre outros) que podem ser selecionados para os diversos tipos de aplicações que vão desde bioimageamento até a entrega controlada de fármacos.

Para que um material luminescente seja adequado para uso em aplicações biológicas é necessário que algumas condições sejam satisfeitas, entre as quais se destacam: (a) alto coeficiente de absortividade molar em determinado comprimento de onda de interesse (sem excitação simultânea da matriz biológica); (b) alto valor de rendimento quântico de luminescência; (c) grande deslocamento Stokes entre os comprimentos de onda de excitação e emissão; (d) solubilidade e estabilidade em meios hidrofílicos; (e) alta fotoestabilidade; (f) baixa toxicidade e (g) alta reprodutibilidade ^[1].

Os corantes orgânicos e proteínas fluorescentes têm sido amplamente utilizados em bioaplicações devido à alta intensidade de fluorescência, facilidade de modificação química, biocompatibilidade e baixo custo, entretanto, seus usos encontram limitações, pois estes apresentam baixa fotoestabilidade e tempos de vida de estado excitado muito curtos (ns) ^[2]. Os pontos quânticos (QD) também são materiais luminescentes extremamente versáteis e podem ser facilmente conjugados com biomoléculas para uso em aplicações biológicas, porém estes contêm metais pesados, sendo citotóxicos e quimicamente instáveis ^[3]. Além disso, os corantes orgânicos e QD atuam pelo modo convencional de conversão descendente de energia, ou seja, excitação com radiação mais energética tem como consequência a emissão de fótons de menor energia. O uso de comprimentos de onda menores para excitação (como ultravioleta e visível) resulta em consideráveis limitações, como a baixa profundidade de penetração da luz através dos tecidos, possível dano ou mesmo morte das biomoléculas causada pela exposição à radiação por um longo período e, principalmente, baixa relação

sinal-ruído devido a significativa autofluorescência das amostras biológicas ^[4]. Tais desvantagens somadas às limitações citadas anteriormente levaram ao desenvolvimento de uma nova classe de nanomateriais luminescentes chamados de nanopartículas emissoras de luz por conversão ascendente de energia.

1.2. NANOPARTÍCULAS EMISSORAS DE LUZ POR CONVERSÃO ASCENDENTE DE ENERGIA (UCNPs)

As nanopartículas emissoras de luz por conversão ascendente de energia têm emissão baseada em processos anti-Stokes, sendo capazes de converter radiação de menor energia em fótons mais energéticos. Diferente de outros processos anti-Stokes que incluem pelo menos um estado de energia virtual, nas UCNPs a conversão de fótons baseia-se em estados de energia reais e de longa duração nos orbitais f de alguns íons lantanídeos. Desse modo, tal processo pode ser desencadeado empregando-se menor energia e maior eficiência quântica pode ser obtida ^[5]. Além disso, esses materiais apresentam várias vantagens associadas à possibilidade de uso de radiação de maiores comprimentos de onda (infravermelho), destacando-se (1) a excelente relação sinal-ruído devido à ausência de autofluorescência na amostra, (2) a maior profundidade de penetração da luz através do tecido biológico, (3) a possibilidade de excitação utilizando-se lasers de baixa potência, que são compactos e mais baratos, (4) os picos estreitos de emissão, (5) a boa estabilidade física e química ^[6-8] e (6) a baixa toxicidade ^[9].

1.2.1. Composição e características das UCNPs

As UCNPs são constituídas por uma matriz cristalina hospedeira inorgânica dopada com íons metálicos que atuarão como ativadores ou sensibilizadores. Os sensibilizadores são excitados pela luz incidente e transferem energia para os ativadores a partir dos quais ocorre emissão, assim, o ativador é o centro de luminescência da nanopartícula, enquanto o sensibilizador atua no aumento da eficiência do processo ^[4].

Atualmente sabe-se que os materiais dopados com íons lantanídeos (Ln^{3+}) são os que apresentam maior eficiência na conversão ascendente de energia ^[9] sendo os mais comumente

empregados como ativadores os íons Er^{3+} , Tm^{3+} e Ho^{3+} . Nesses íons as transições 4f-4f são proibidas pela regra de paridade (Laporte), resultando em longos tempos de vida do estado excitado (μs até ms)^[10], além disso, devido a blindagem fornecida pelas camadas preenchidas $5s^2 5p^6$ mais externas aos orbitais 4f, as energias dos níveis eletrônicos dos íons Ln^{3+} são bem definidas e não variam significativamente com o ambiente químico em que esse se encontra. Como consequência os espectros dos Ln^{3+} ativos apresentam linhas relativamente estreitas em torno de comprimentos de ondas específicos.

Em princípio, a absorção desses materiais pode ser melhorada com o aumento da concentração de íons dopantes, porém, em altas concentrações, processos de transferência de energia entre íons, como é o caso da relaxação cruzada seguida de desativação não radiativa, podem ocorrer e diminuir a eficiência da luminescência^[6]. A máxima concentração possível de um dopante será, portanto, determinada pela distância entre os sítios ocupados na rede cristalina, mas na maioria dos casos a concentrações de Er^{3+} e Tm^{3+} , por exemplo, não ultrapassam 3% e 0,5%, respectivamente. Geralmente, visando aumentar a absorção, utiliza-se um dopante adicional que é chamado de sensibilizador^[11]. Yb^{3+} é o sensibilizador mais utilizado, e geralmente em altas concentrações (18-20 mol%) para sistemas contendo Er^{3+} , Tm^{3+} e Ho^{3+} ^[12].

A eficiência do processo de conversão ascendente é fortemente influenciada pelo material hospedeiro e sua estrutura cristalina, pois estes determinam a distância entre os íons dopantes e seu arranjo espacial^[13]. Sabe-se que a matriz NaYF_4 é a mais eficiente para os sistemas $\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ e $\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ ^[14]. O fato de conter flúor ao invés de oxigênio como as matrizes convencionais faz com que o sistema apresente menor energia vibracional de rede e, conseqüentemente, maiores tempos de vida são possíveis^[15]. Além disso, o íon Y^{3+} pode ser facilmente substituído pelos íons lantanídeos, devido à similaridade de raios iônicos e, dessa forma, é possível prevenir a formação de defeitos cristalinos e tensões na rede. A matriz NaYF_4 também constitui um bom exemplo da influência da estrutura cristalina, pois esta apresenta dois polimorfos a pressão ambiente: fase cúbica (α) e fase hexagonal (β)^[16], sendo que a eficiência do processo de conversão ascendente de energia é aproximadamente uma ordem de magnitude maior nos cristais β ^[17]. As matrizes cúbicas são altamente simétricas, dessa forma as transições f-f são fortemente proibidas por paridade e, portanto, a eficiência de emissão por conversão ascendente é bastante fraca. Em um hospedeiro com menor simetria, como o sistema de cristais hexagonais, a superposição orbital entre ligantes e o íon dopante é maior, propiciando assim maiores probabilidades de transição f-f^[18].

1.2.2. O processo de conversão ascendente de energia

O fenômeno de conversão ascendente (UC) foi descoberto de forma independente por Auzel e Ovsyankin e Feofilov em meados dos anos 60 ^[19] e desde então tal processo passou a ser amplamente estudado, tanto do ponto de vista teórico-fundamental, bem como das diferentes aplicações.

A conversão ascendente de fótons é um processo óptico não linear e a eficiência quântica do material empregado depende de vários fatores, que vão desde a densidade de potência do laser de excitação empregado ^[20] até o tamanho das partículas e estrutura superficial em sistemas nanoestruturados ^[21]. Na maioria dos casos o processo envolve dois fótons e pode ser descrito como uma dependência quadrática do número de fótons sobre a potência de excitação ^[22], contudo, fenômenos de conversão ascendente envolvendo três ou mais fótons também podem ocorrer ^[23].

Existem muitas revisões na literatura explicando em detalhes todos os processos envolvidos na conversão ascendente ^[24,25]. Resumidamente, os mecanismos podem ser divididos em três classes: transferência de energia por conversão ascendente (ETU), absorção de estado excitado (ESA) e avalanche de fótons (PA). Todos os mecanismos baseiam-se na absorção sequencial de dois ou mais fótons por níveis de energia metaestáveis que atuam como reservatórios de população, levando a excitação de estados de mais alta energia, a partir dos quais ocorre emissão ^[11].

A absorção de estado excitado envolve a absorção sucessiva de dois ou mais fótons por um único íon. Um diagrama de energia para um sistema simples com três níveis está apresentado na Figura 1A. O primeiro fóton absorvido leva o íon do seu estado fundamental (0) para um estado excitado intermediário (E_1) metaestável (absorção do estado fundamental, GSA). Em seguida, o segundo fóton promove este íon de E_1 para um estado mais excitado (E_2) e resulta em emissão, correspondente a transição $E_2 \rightarrow 0$ ^[6, 24]. A ESA só é observada em materiais com concentrações de dopantes tal que não haja processos de transferência de energia envolvendo o nível metaestável, uma vez que estes resultariam em perdas de população.

A ETU envolve dois íons vizinhos como mostrado na Figura 1B. O íon I, chamado sensibilizador, absorve um fóton e é excitado para o nível E_1 , em seguida, através de um

processo de transferência de energia não radiativa via interações dipolo-dipolo, o íon I relaxa de volta ao estado fundamental (0) e a energia correspondente é transferida (radiativa ou não radiativamente) a um íon II no estado fundamental, promovendo-o ao estado E_1 . Este processo é seguido de uma ESA levando o íon II ao estado emissor E_2 [24]. Alternativamente, a ETU também pode ocorrer diretamente, quando o íon II já se encontra no estado excitado E_1 . A eficiência da ETU é dependente da distância entre os íons I e II e, portanto, é maior em materiais que apresentam altas concentrações de dopantes (e menores distâncias interiônicas). A ETU é considerada o processo mais eficiente na conversão ascendente de energia [26].

Figura 1. Esquema geral dos processos de UC. (a) Absorção de estado excitado, (b) transferência de energia e (c) avalanche de fótons. As flechas pontilhadas, tracejadas, pontilhadas/tracejadas e cheias representam excitação por fóton, transferência de energia não radiativa, relaxação cruzada e processos de emissão, respectivamente.

Fonte: Adaptado de WANG *et al.*, 2009.

O terceiro processo, a avalanche de fótons, esquematicamente representando na Figura 1C, é baseado em um mecanismo não convencional, uma vez que pode produzir intensa emissão a partir do nível E_2 sem qualquer GSA ressonante. O estado excitado E_1 do íon II é preenchido por uma GSA fraca seguida por uma ESA ressonante para promover o íon para o nível emissor E_2 . Em seguida, ocorre uma transferência de energia entre o íon II excitado e um íon vizinho que ainda está no estado fundamental (íon I), desta forma ambos os íons terão seus níveis intermediários E_1 populadas. Sequencialmente, ambos os íons podem ser promovidos ao nível E_2 por ESA ressonante e o *looping* desse processo somado ao processo de relaxação cruzada causa um aumento exponencial da população de E_2 , resultando em intensa emissão. Uma característica do processo PA é que a intensidade de excitação deve ser mantida acima de certo valor limiar para permitir uma eficiente conversão ascendente [27].

A eficiência de conversão ascendente nestes três processos difere substancialmente. A ESA gera luminescência mais fraca e é apenas de interesse em cristais dopados com um único íon. Em materiais com níveis de energia intermediários e metaestáveis que podem funcionar como reservatório de população a PA é viável. Contudo, o processo PA é desvantajoso devido

à sua dependência com a potência de excitação e à sua resposta lenta devido aos numerosos ciclos de ESA e processos de relaxação cruzada. Em contraste, ETU acontece instantaneamente, independe da potência de excitação, e produz emissão de até duas ordens de magnitude maior do que ESA. Portanto, muitos materiais operando por conversão ascendente de energia, e contendo mais de um íon dopante foram desenvolvidos com base no processo de ETU [24].

1.2.3. Propriedades fotofísicas das UCNPs

Como citado anteriormente, o material mais eficiente para gerar conversão ascendente de energia é a matriz NaYF₄ dopada com os íons Yb³⁺/Er³⁺ ou Yb³⁺/Tm³⁺, sendo as concentrações em porcentagem molar de aproximadamente 20-25% Yb³⁺, 2% Er³⁺ e 0,3% Tm³⁺ [8]. Em contraste com outros lantanídeos, o Yb³⁺, que nesses sistemas atua como sensibilizador, possui um diagrama de níveis de energia relativamente simples (Figura 2) [28]. Sob excitação com radiação infravermelha em 980 nm há transição do estado ²F_{7/2} para o estado ²F_{5/2} do Yb³⁺ e a energia absorvida é transferida para os íons ativadores que se encontram nas vizinhanças através de processos não radiativos.

Considerando o sistema Yb³⁺/Er³⁺, esquematizado na Figura 2, pode-se observar que as energias dos estados ²F_{5/2} do Yb³⁺ e ⁴I_{11/2} do Er³⁺ são muito semelhantes, sendo assim uma primeira transferência de energia pode ocorrer entre estes estados mediante relaxação do Yb³⁺ para o nível fundamental ²F_{7/2} e promoção de um elétron no íon de Er³⁺ do estado fundamental para o estado excitado ⁴I_{11/2} (²F_{5/2}, ⁴I_{15/2} → ²F_{7/2}, ⁴I_{11/2}). A partir do nível ⁴I_{11/2} um segundo fóton pode ser absorvido promovendo os íons ao estado ⁴F_{7/2}. Além disso, outros processos de transferência de energia envolvendo os níveis ⁴I_{11/2} e ⁴I_{13/2}, conhecidos como “relaxações cruzadas” também podem acontecer como indicado na Figura 2 (²F_{5/2}, ⁴I_{11/2} → ²F_{7/2}, ⁴F_{7/2} e ²F_{5/2}, ⁴I_{13/2} → ²F_{7/2}, ⁴F_{9/2}). O resultado global destes processos de transferência de energia e de absorções de estado excitado é a população dos estados ⁴F_{7/2} e ⁴F_{9/2} e subsequentes emissões no verde (²H_{11/2}/⁴S_{3/2} → ⁴I_{15/2}) e vermelho (⁴F_{9/2} → ⁴I_{15/2}) [29].

Figura 2. Diagrama de níveis de energia para os íons Yb^{3+} e Er^{3+} . Setas cheias indicam transições radiativas e setas tracejadas indicam processos de transferência de energia não radiativos.

1.2.4. Síntese

Para maior eficiência na luminescência das nanopartículas três componentes principais devem ser escolhidos com cuidado durante a síntese: (1) matriz hospedeira inorgânica, e o tipo e concentração dos íons (2) ativadores e (3) sensibilizadores. Ao longo da última década muitos métodos foram desenvolvidos visando à produção de UCNPs que apresentem as melhores características ^[30]. Alguns utilizam solventes orgânicos, como a co-precipitação ^[31], decomposição térmica ^[32], síntese solvotérmica ^[33] e co-precipitação em altas temperaturas ^[29]; e outros podem ser realizados em meio aquoso, como a síntese hidrotérmica ^[34] e os processos sol-gel ^[35]. Dentre esses, os métodos mais utilizados são a decomposição térmica, as sínteses solvotérmicas e hidrotérmicas e a co-precipitação.

A decomposição térmica de precursores orgânicos como os trifluoroacetatos (TFA) metálicos é uma das abordagens mais conhecidas para a síntese controlada de nanopartículas cristalinas uniformes e de alta qualidade. A reação baseia-se na decomposição de trifluoroacetatos metálicos em um solvente não coordenante, como o 1-octadeceno, com a ajuda de um surfactante, sendo o mais usado o ácido oleico (AO), a temperaturas elevadas (entre 250 °C e 330 °C) ^[36]. Devido à pirólise de TFAs sensíveis ao ar, várias espécies de fluorocarbonos aparecem como produtos intermediários e estes são conhecidos por serem extremamente tóxicos ^[14]. Além disso, embora UCNPs monodispersas de alta qualidade possam ser obtidas por este método, as nanopartículas resultantes têm estrutura de fase cúbica

e necessitam de modificações posteriores em sua superfície, pois o uso do ácido oleico faz com que o material seja hidrofóbico ^[37].

O método solvo/hidrotérmico pode ser utilizado para produzir nanopartículas de fase cúbica ou hexagonal e, em oposição a decomposição térmica, a síntese é realizada a temperaturas abaixo de 230 °C. Esse método baseia-se num conjunto de reações químicas onde uma mistura de surfactante com precursores de terras raras irá reagir com determinados materiais metálicos e íons fluoreto em solução aquosa. No entanto, são necessários recipientes de reação especializados, as autoclaves, pois o procedimento precisa ser realizado sob certa pressão e temperatura que estão acima do ponto crítico do solvente, de forma a aumentar a solubilidade dos sólidos e acelerar as reações ^[38]. Os surfactantes mais utilizados são o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e o ácido oleico. Em muitos casos apenas água é utilizada, mas solventes orgânicos como ácido acético e etanol podem ser empregados ^[39]. A otimização dos parâmetros de síntese deste método é geralmente muito demorada uma vez que os tempos de reação são longos (até vários dias) e torna-se difícil sintetizar UCNPs de alta qualidade em termos de cristalinidade, pureza de fase e distribuição de tamanhos e forma de partícula ^[40].

A co-precipitação é um processo mais amigável para produção das UCNPs, pois há menos subprodutos tóxicos e as temperaturas necessárias durante a síntese inicial não são tão extremas ^[41]. Em um procedimento típico, adicionam-se soluções de sais dos metais terras raras em uma solução do material hospedeiro (tal como fluoreto de sódio) e há subsequente precipitação espontânea dos nanocristais a temperaturas abaixo de 200°C ^[42]. O crescimento da partícula pode ser ajustado e estabilizado pelo uso de ligantes de cobertura (*“capping ligands”*) como o di-noctadecilditiofosfato de amônio ^[41] ou por agentes quelantes como o EDTA ^[43] ou a polivinilpirrolidona (PVP). As nanopartículas sintetizadas utilizando-se PVP como agente quelante são hidrofílicas, formando soluções coloidais estáveis em água e outros solventes orgânicos polares ^[44].

1.2.5. Modificações na superfície

Uma vez que a grande maioria das UCNPs são sintetizadas utilizando-se estratégias baseadas em fases hidrofóbicas, estas não apresentam dispersibilidade intrínseca em água, e, além disso, podem ser citotóxicas. Tais fatores são determinantes para uso em aplicações

biológicas, sendo necessários métodos pós-síntese para modificações da superfície que sejam capazes de tornar as UCNPs hidrofílicas e estáveis sob condições fisiológicas. Adicionalmente, os revestimentos superficiais devem funcionar como âncoras funcionais para posterior bioconjugação e atuar na diminuição da toxicidade das nanopartículas. Existem muitos meios de realizar essas modificações ^[45,46], mas os métodos mais frequentemente utilizados são: revestimento com sílica ^[47], troca de ligantes ^[48], oxidação de ligantes ^[49], revestimento por camada ^[50] e revestimento com moléculas anfifílicas e polímeros ^[51].

A opção mais viável é o crescimento de uma camada de sílica ao redor das UCNPs, pois além de não interferir nas propriedades de luminescência das nanopartículas e ser inerte, tal revestimento leva a formação de materiais com menor toxicidade ^[52], estreita distribuição de tamanhos, maior dispersibilidade em solução aquosa ^[53] e, ademais, os grupos Si-OH podem atuar como plataformas acessíveis, facilitando a introdução de grupos funcionais através de métodos de silanização bem definidos ^[54,55]. Esses grupos podem ser facilmente introduzidos pelo uso de organosilanos, sendo os mais utilizados os aminosilanos como o 3-aminopropiltrietoxissilano (APTES). As nanopartículas amino modificadas podem ser biofuncionalizadas por adição de biomoléculas tais como biotina, ácido fólico, peptídeos, proteínas, anticorpos, entre outras ^[56].

As UCNPs podem ser revestidas com uma camada de sílica densa (@dSiO₂) pela hidrólise e policondensação controlada de precursores tais como tetraetoxissilano (TEOS) ou com uma camada de sílica mesoporosa (@mSiO₂), sendo nesse caso, necessário o uso de um surfactante que auxilie na formação dos poros, como por exemplo, o CTAB ^[57]. O revestimento das nanopartículas com mSiO₂ fornece um produto com grande área superficial que possibilita maior carregamento de múltiplos componentes como drogas anticâncer e fotossensibilizadores (PS) na superfície das UCNPs. O encapsulamento de PS no interior dos poros aumenta a estabilidade dessas moléculas e é um método eficaz para evitar que essas sejam degradadas e impedir que entrem em contato direto com células do corpo ^[58].

1.3. FOTOSSENSIBILIZADORES

1.3.1. Efeito fotodinâmico

Os fotossensibilizadores são moléculas capazes de interagir com a luz de modo a gerar espécies altamente reativas de oxigênio (ROS), como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e outras formas radicalares, tal propriedade é conhecida como efeito fotodinâmico e pode ser aplicada em diversas áreas desde a remoção de contaminantes ambientais, descontaminação de alimentos, até o tratamento de infecção e alguns tipos de câncer [59-61].

Figura 3. Diagrama esquemático de formação do $^1\text{O}_2$ através da ativação do fotossensibilizador.

Fonte: Adaptado de YIN *et al.*, 2015.

O mecanismo de ação do PS é demonstrado esquematicamente na Figura 3: ao absorver um fóton de comprimento de onda característico o PS se ativa passando de seu estado fundamental (S_0) para um estado singlete excitado S_1 a partir do qual, através de um processo de cruzamento intersistemas (ISC), pode originar um estado tripleto (T_2) de duração relativamente longa. A partir de T_2 o PS pode reagir na presença de oxigênio molecular (tripleto no estado fundamental) para dar início a dois tipos de reações fotoquímicas - Tipo I e Tipo II. As reações do Tipo I envolvem transferência de elétrons e produzem (direta ou indiretamente) ROS como os superóxidos (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroperoxila ($\text{HOO}^\bullet$). Os processos do Tipo II são mecanismos de transferência de energia que envolvem a troca de spin eletrônico entre o PS em seu estado excitado tripleto e o oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$) para dar origem a oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) [62].

Os fotossensibilizadores encontram suas principais aplicações em terapia fotodinâmica (PDT) de células cancerígenas e na fotoinativação (PDI) de microrganismos, visto que as ROS e o $^1\text{O}_2$ produzidos são espécies altamente reativas capazes de induzir a oxidação dos constituintes celulares, principalmente proteínas e lipídios, resultando em danos irreversíveis às organelas celulares e levando a morte das células. No caso das células microbianas, a

parede celular sofre a maior parte dos danos, causando a permeabilização das células, vazamento de componentes essenciais como os ácidos nucleicos e consequente morte das mesmas [63].

1.3.2. Ftalocianinas

As ftalocianinas (Pc) são fotossensibilizadores ideais para aplicação em PDT e PDI, pois apresentam altos valores de rendimento quântico de oxigênio singlete, alta fotoestabilidade, altas seções de choque de absorção na região do visível e grande disponibilidade comercial [64]. As ftalocianinas são compostas por um macrociclo aromático com quatro pirróis formando um anel central de 16 membros, como poder ser observado na estrutura geral apresentada na Figura 4A. A presença e natureza do íon metálico central (M) influencia fortemente as propriedades fotofísicas do PS: complexos com metais paramagnéticos, como Cu^{2+} , Ni^{2+} e Cr^{3+} , apresentam menores valores de tempo de vida e rendimento quântico do estado tripleto devido à maior desativação de estados excitados [65]. Geralmente os metais diamagnéticos como Zn^{2+} , Al^{3+} e Si^{4+} aumentam o cruzamento intersistemas e levam a formação de Pcs com longos tempos de vida de estado tripleto e maior eficiência [66].

Figura 4. (a) Estrutura geral de uma ftalocianina onde M representa o átomo metálico, R os substituintes dos anéis e X os ligantes axiais. Estruturas das ftalocianinas de silício empregadas nesse trabalho (b) 2,9,16,23-tetra-terc-butil-29H,31H-di-hidroxi-ftalocianina de silício e (c) ftalocianina de silício com ligante axial contendo grupamento azida.

A produção de oxigênio singlete é fortemente influenciada pelos substituintes do anel (R) e pelos ligantes axiais (X). Substituintes mais volumosos tendem a diminuir a formação dos agregados, visto que em soluções aquosas, mesmo as ftalocianinas substituídas com ligantes hidrofílicos, tendem a se aglomerar ou formar dímeros, resultando em perda da

atividade fotoquímica, devido à dissipação da energia por processos de conversão interna que levam de PS a seu estado fundamental, impedindo a formação de estados tripletos. A agregação das moléculas pode ser facilmente detectada através de espectroscopia, pois estes levam a deslocamentos batocrômicos e hipsocrômicos no espectro de absorção [67]. Uma estratégia para reduzir a formação de agregados em meios aquosos e em solventes orgânicos é a funcionalização axial do átomo central, a qual pode ser realizada quando se tem Al^{3+} , Ti^{4+} ou Si^{4+} no complexo, por exemplo [68-70].

Nesse trabalho foram utilizadas ftalocianinas de silício (SiPc) com diferentes ligantes e substituintes axiais, representadas em 4B e 4C. Em sua forma monomérica, tais PS possuem espectros de absorção característicos com um forte pico de absorção em aproximadamente 350 nm (banda Soret), um máximo fraco em torno de 600 nm e uma banda estreita e muito intensa na região do vermelho entre 680-650 nm (banda Q) [71].

1.4. NANOMATERIAIS TERANÓSTICOS

O conceito de teranóstica, utilizado para ligar os campos de diagnóstico e terapia, tem evoluído para abranger nanomateriais biocompatíveis que possuem tais componentes de forma concorrente e complementar [72]. A potencialidade diagnóstica desses materiais pode ser utilizada *in vivo* ou *ex vivo* e fornece informações sobre o estado de uma doença, sua localização, extensão, morfologia, composição química e assim por diante. A terapia é utilizada para melhorar o estado atual de uma patologia e pode ser implementada nesses materiais de diversas formas [73].

As nanopartículas emissoras de luz por conversão ascendente funcionalizadas com fotossensibilizadores (UCNP-PS) são um exemplo de nanomaterial teranóstico. As UCNPs possuem grande potencial, pois podem ser usadas para bioimageamento, atuar como agente de entrega do PS, e, além disso, são capazes de converter luz NIR em comprimentos de onda na região do visível que podem atuar na ativação das moléculas de PS.

A absorção das UCNPs dopadas com Yb^{3+} e Er^{3+} se dá em torno de 980 nm e sabe-se que comprimentos de onda na região do infravermelho próximo possuem maior penetração através da pele (fator determinante para aplicações biológicas) devido a menor absorção da luz por componentes dos tecidos, como por ser observado na janela biológica óptica mostrada na Figura 5.

Figura 5. Janela biológica óptica – Espectro de absorção dos principais cromóforos dos tecidos biológicos.

Fonte: Quiroga Soto, 2016.

A emissão das UCNPs pode ser transferida para moléculas de fotossensibilizadores em sua superfície para desencadear a geração de $^1\text{O}_2$. O Er^{3+} por exemplo, possui uma banda de emissão na região de 660 nm que é compatível com a absorção das ftalocianinas de silício. Tendo em vista esse sistema, esquematicamente ilustrado na Figura 6, um único comprimento de onda na região do NIR pode ser utilizado para excitar as UCNPs, obtendo-se emissões no verde, que podem ser utilizadas para imageamento, e no vermelho, que podem ser empregadas na ativação do PS. Adicionalmente, UCNPs e fotossensibilizadores, ainda parte de um único sistema, podem ser excitados de forma individual, aumentando-se assim a eficiência dos processos de imagem e terapia. Vale ressaltar que o processo de transferência de energia entre as nanopartículas e as moléculas de PS é muito dependente da distância em que um se encontra do outro.

Figura 6. UCNP dopada com Yb^{3+} e Er^{3+} e funcionalizada com ftalocianinas de silício. Processos envolvidos na obtenção de bioimagem e terapia fotodinâmica.

1.5. FENÔMENOS DE TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA

A excitação das moléculas de PS por emissões das UCNPs se dá através de um processo conhecido como FRET – transferência de energia ressonante Förster. Na FRET a energia é transferida de forma não radiativa entre dois cromóforos, um doador emissivo inicialmente em seu estado eletrônico excitado (UCNP) pode transferir sua energia para um cromóforo aceitador absorvente (PS), emissivo ou não, através de acoplamentos dipolo-dipolo. A eficiência desse processo é inversamente proporcional à sexta potência da distância entre o doador e o aceitador, fazendo com que esse processo seja extremamente sensível a pequenas variações desse espaço. A eficiência (η) pode ser calculada de acordo com a Equação 1, onde R_0 corresponde a distância entre o par doador-aceitador em que η é igual a 50%, conhecido como raio de Förster. Geralmente, a FRET ocorre para distâncias entre 1 e 10 nm ^[74].

$$\eta = \frac{1}{1 + \left(\frac{R_0}{r}\right)^6}$$

Equação 1

1.6. TERAPIA FOTODINÂMICA

1.6.1. Terapia fotodinâmica de células cancerígenas

A terapia fotodinâmica envolve dois componentes individuais não-tóxicos que são combinados de forma a induzir efeitos em células e tecidos. O primeiro componente é o fotossensibilizador e o segundo envolve a administração de luz de comprimentos de onda específicos que são utilizados para ativar o PS. A geração de ROS pelo PS acontece no local onde a radiação é absorvida pelas moléculas, portanto, as respostas biológicas ao fotossensibilizador são ativadas apenas nas áreas específicas do tecido que foram expostas à luz ^[75].

As ROS são extremamente reativas e possuem tempos de vida muito curtos e, por isso, somente células muito próximas à área de produção dessas espécies são diretamente afetadas pela PDT. O tempo de vida do $^1\text{O}_2$ no sistema biológico é de aproximadamente 0,04 μs e seu raio de ação é menor que 0,02 μm ^[76]. A extensão do dano e da citotoxicidade é multifatorial

e depende do tipo de PS empregado, da sua localização extracelular e intracelular, da dose de luz e da fluência utilizada, da disponibilidade de oxigênio no meio e do tempo entre a administração da droga e sua exposição à radiação, sendo todos esses fatores interdependentes.

Uma das vantagens da PDT é que o PS pode ser administrado de várias maneiras, de forma intravenosa ou por aplicação epidérmica, por exemplo, sendo importante considerar que a forma escolhida afetará a bio-distribuição do material. Como a bio-distribuição varia com o tempo, o controle do ciclo de exposição do tecido à luz é uma maneira de regular os efeitos da PDT ^[77].

1.6.1.1. Uso das UCNPs em PDT

Sabe-se que as drogas comumente utilizadas em PDT só são eficientes no tratamento de carcinomas superficiais e não de cânceres que se encontram em camadas mais profundas, devido à baixa penetração da luz visível através dos tecidos biológicos. Uma forma de reverter esse problema é a integração dos agentes PDT com as UCNPs, que atuarão como conversores de luz NIR, possibilitando a ativação dessas moléculas em tecidos mais profundos ^[78].

Zhang *et al.* (2007) foi o primeiro a publicar sobre o uso das UCNPs em PDT, encapsulando as moléculas de PS no interior da camada de sílica densa que reveste as nanopartículas ^[79]. O time de Qian desenvolveu UCNPs revestidas com sílica mesoporosa e realizou a adsorção de moléculas de ftalocianinas de zinco (ZnPc) na parte interna dos poros. Eles demonstraram que essa abordagem é muito eficiente, pois as moléculas de PS no interior da sílica mostram-se bastante estáveis ^[80]. Desde então vários artigos foram publicados utilizando estratégias semelhantes ^[81-83].

O fotossensibilizador rosa bengala (RB) foi ligado covalentemente as UCNPs através da conjugação de grupos carboxila das moléculas de RB modificadas com ácido hialurônico com grupos amina na superfície das UCNPs, por Liu *et al.* Eles descobriram que a ligação covalente entre as UCNPs e o RB melhorou significativamente a capacidade de carga de PS e a eficiência de transferência de energia das nanopartículas para as moléculas de RB ^[84].

Experimentos *in vitro* e *in vivo* envolvendo complexos UCNP-PS para o tratamento de células cancerígenas já foram publicados por diversos grupos. O primeiro experimento *in vitro* foi realizado por Wang *et al.* e foram empregadas UCNPs funcionalizadas com clorina-

e-6 (Ce6). O material obtido foi capaz de impelir a morte de células 4T1 (câncer de mama) após 30 min de irradiação com laser de 980 nm ($0,5 \text{ W. cm}^{-2}$). Os testes em animais mostraram que as UCNPs-Ce6 são capazes de induzir significativa diminuição do tumor e maior tempo de sobrevivência para os camundongos. Além disso, o grupo também demonstrou que as UCNPs injetadas nos tumores são totalmente excretadas pelos órgãos após dois meses, sem sintomas notáveis de toxicidade para os animais [85].

1.6.2. Fotoinativação de bactérias

Os mesmos princípios da PDT são válidos para o uso de complexos UCNPs-PS na inativação de bactérias, entretanto esse campo permanece pouco explorado. O uso extensivo de antibióticos tem causado aumento no número de bactérias resistentes a essas drogas (super bugs). As infecções causadas por bactéria resistentes são difíceis de tratar e têm matado milhares de pessoas por ano, chegando a valores equivalentes à soma do número de mortes causadas por AIDS, tuberculose e hepatite viral [86]. Além disso, há uma estimativa de que até 2050 mais de 10 milhões de pessoas morrerão por infecções causadas por microrganismos resistentes, número de mortes superior àquelas causadas por câncer e diabetes, por exemplo [87]. Nesse contexto, a PDT tem se mostrado uma alternativa promissora para tentar enfrentar esses desafios, sendo cada vez mais estudada.

Embora os PS sejam capazes de se ligar ao DNA, o principal alvo dessas moléculas é a membrana das bactérias [88]. O $^1\text{O}_2$ gerado ataca a parede celular de maneira não seletiva, enquanto os antibióticos “tradicionais” muitas vezes agem contra certas enzimas e são dependentes de acumulação dentro das células [89]. Dessa forma, é praticamente impossível para os organismos desenvolverem resistências contra terapia fotodinâmica [90]. No entanto, as exigências para inativação de bactérias são totalmente diferentes daquelas para células, visto que existem inúmeros tipos de cepas bacterianas.

A descoberta do médico dinamarquês Hans Christian Gram, em 1884, possibilitou a divisão das bactérias em dois grandes grupos – Gram positivas e Gram negativas, esquematicamente mostradas na Figura 7. Hans observou que o corante violeta genciana interage de forma diferente com esses dois tipos de bactérias: As Gram positivas retêm o cristal violeta devido à presença de uma espessa camada de peptidoglicano (polímero constituído por açúcares e aminoácidos que originam uma espécie de malha na região exterior à membrana celular das bactérias) em suas paredes celulares, com ácido teicóico intercalado

nas camadas. A estrutura toda pode ter uma espessura de 80 nm. Já as bactérias Gram negativas não retêm o corante, pois possuem uma camada de peptidoglicano mais fina, com 2-3 nm de espessura, um espaço periplasmático e uma membrana lipídica externa (7 nm) composta por fosfolipídios, lipoproteínas e lipopolissacarídeos ^[91].

Figura 7. Representação esquemática do arranjo das membranas de bactérias (A) Gram positivas e (B) Gram negativas.

Fonte: Adaptado de NC.com ^[104]

Em contraste com a estrutura do peptidoglicano, os lipopolissacarídeos na membrana externa de bactérias Gram negativas possuem grupos fosfato que são carregados negativamente ^[92]. As diferenças nas paredes celulares das bactérias (grupos carregados negativamente vs. grupos carregados positivamente) podem ser exploradas por interações eletrostáticas com materiais que possuem cargas superficiais diferentes ^[93-95].

1.6.3. Uso das UCNPs em PDI

Poucos trabalhos foram publicados envolvendo o uso dos complexos UCNP-PS em PDI. Ye *et al.* realizou a funcionalização das UCNPs com curcumina (CM) visando a inativação de cepas de *estafilococos aureus* (*S. aureus* – Gram positiva) resistente a meticilina (MRSA). As UCNP-CM obtidas possuem carga igual a -33,7 mV e mostraram-se muito eficientes na inibição do crescimento das MRSA após irradiação com laser de 980 nm por 30 min (0,5 W. cm⁻²), destruindo a membrana celular e levando ao vazamento do citoplasma

bacteriano. O material também mostrou seu potencial antibacteriano através do controle de pneumonia induzida em camundongos [96].

Yin *et al.* produziu UCNPs funcionalizadas com azul de metileno (MB) e decoradas com nanopartículas de CuS para uso em PDI e terapia fototérmica (PTT). O potencial zeta do material final foi de +19 mV e o mesmo foi testado em colônias de *escherichia coli* (Gram negativa) e *estafilococos aureus* utilizando-se laser de 980 nm com fluência de 1 W. cm^{-2} , durante 20 min, como fonte de irradiação. Observou-se que as nanopartículas são mais eficientes contra *s. aureus* e que o efeito sinérgico entre PDI e PTT aumenta significativamente a eficiência do sistema [97].

Recentemente, Li *et al.* sintetizou UCNPs funcionalizadas com ZnPc e recobertas com quitosana (que possui atividade antibacteriana intrínseca) com carga superficial de +24,3 mV. As UCNPs produzidas foram utilizadas na inativação de diferentes tipos de bactérias Gram positivas e Gram negativas empregando-se luz de 980 nm durante 1 h ($0,4 \text{ W. cm}^{-2}$), concluiu-se que o material é mais eficiente no combate de bactérias Gram positivas e que o uso da quitosana aumenta o potencial de ação do material [98].

A relação da carga superficial do material com o tipo de bactéria que esse será capaz de atacar de forma eficiente nem sempre é tão trivial. Sabe-se que materiais positivamente carregados tendem a ter maior afinidade por cepas Gram negativas, enquanto materiais mais negativos tendem a ser mais efetivos contra bactérias Gram positivas, entretanto, deve-se também levar em conta que a membrana externa da parede celular das bactérias Gram negativas atua como uma barreira, dificultando a entrada de drogas, enquanto a membrana porosa que circunda a parede celular das bactérias Gram positivas facilita esse processo e, na maioria das vezes, essas acabam sendo mais susceptíveis a processos de inativação fotodinâmica [98, 99].

Tendo em vista todas essas considerações, o presente trabalho teve como intuito a síntese de UCNPs, compostas por matriz de NaYF_4 dopada com Yb^{3+} e Er^{3+} , revestidas com uma camada de sílica mesoporosa e funcionalizadas com ftalocianinas de sílcio. Em busca de maiores valores de rendimento quântico de geração de $^1\text{O}_2$ em água e a obtenção de materiais com diferentes cargas superficiais, realizou-se a adição do fotossensibilizadores através de três diferentes métodos – adsorção, ligação covalente de ciclo-adição e, adicionalmente, grupos funcionais foram inseridos na superfície da mSiO_2 . As nanopartículas obtidas foram empregadas na fotoinativação de bactérias Gram positivas e Gram negativas resistentes a antibióticos.

2. METODOLOGIA

2.1. MATERIAIS

Óxido de ítrio (III) (99,99%), óxido de itérbio (III) (99,99%), polivinilpirrolidona (PVP40), tetraetoxissilano (TEOS), trietanolamina ((EtOH)₃N), n,n-diisopropiletilamina (DIPEA), 3-aminopropiltietoxissilano (APTES), fluoreto de amônio (P.A.) , hidróxido de sódio (P.A.), ácido PEG4-dibenzociclooctino (Ac-DBCO-PEG₄), hidróxido de amônio 25%, n-hidroxi sulfonamida (sulfo-NHS), ácido 2-(n-morfolino)etanosulfônico (MES), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), brometo de cetrimônio (CTAB) e iodometano (MeI) foram adquiridos da Sigma Aldrich (www.sigmaaldrich.com), óxido de érbio (III) (99,99%) da Alfa Aesar (www.alfa.com), etileno glicol (P.A.), etanol (P.A.), tolueno (P.A.) e ácido nítrico (P.A.) da Synth (www.labsynth.com.br) e ácido bis-tetraetilenoglicol propiônico (COOH-TEG-COOH) e ácido 15-amino-4,7,10,13-tetraoxipentadecanóico (COOH-TEG-NH₂) foram comprados das Iris Biotech GmbH (www.iris-biotech.de), Alemanha. Todos os reagentes foram utilizados sem purificação prévia.

2.2. SÍNTESE DAS UCNPs (PVP/NaYF₄: Yb (20%), Er (2%))

As UCNPs foram sintetizadas utilizando-se um método previamente relatado ^[100] com algumas modificações no tempo e temperatura da reação. 88 mg de Y₂O₃ (0,78 mmol), 39,4 mg de Yb₂O₃ (0,20 mmol) e 3,9 mg de Er₂O₃ (0,02 mmol) foram dissolvidos em 10 mL de HNO₃ 10%, a solução foi aquecida até 120 °C e mantida nessa temperatura até completa evaporação da água. Sob agitação, adicionou-se 10 mL de etileno glicol para dissolver os nitratos de terras raras formados (LnNO₃, Ln = 78% Y, 20% Yb e 2% Er) e em seguida 0,5569 g de PVP40 e 0,0588 g de NaCl (4 mmol) foram adicionados e a mistura foi aquecida a 80 °C até a formação de solução homogênea. 0,1482 g de NH₄F (4 mmol) foram previamente dissolvidas em 10 mL de etileno glicol a 70 °C e adicionadas a solução de LnNO₃ gota a gota. A mistura foi mantida sob agitação a 80 °C por mais 10 min e em seguida a solução foi aquecida a diferentes temperaturas (160, 140, 130 e 120 °C) por diferentes períodos de tempo (2, 1,5 e 1 h) para encontrar a melhor condição de síntese. Os produtos obtidos foram isolados por centrifugação e lavados duas vezes com etanol.

2.3. REVESTIMENTO DAS UCNPs

2.3.1. Síntese da camada de sílica mesoporosa - (UCNP@mSiO₂)

A síntese das UCNPs recobertas com uma camada de sílica mesoporosa teve como base um procedimento descrito na literatura ^[101] para nanopartículas produzidas utilizando-se ácido oleico como agente quelante. 20 mg de UCNPs foram dispersadas em 2 mL de etanol e adicionadas a 20 mL de água contendo 0,1 g de CTAB. Manteve-se a mistura sob vigorosa agitação durante 12 h, até a formação de uma solução transparente. Para a síntese da camada de sílica dissolveu-se 10 mL da solução UCNPs-CTAB em 20 mL de água contendo 3 mL de etanol e 150 µL de solução de NaOH 2M e a mistura foi aquecida até 70 °C. Após estabilização da temperatura, 200 µL de TEOS foram adicionados e a reação foi deixada sob agitação por 10 min. As nanopartículas obtidas foram centrifugadas e lavadas três vezes com etanol. Para remoção do CTAB, 20 mg do material produzido foram dispersados em 50 mL de etanol contendo 0,3 g de NH₄NO₃ e manteve-se a mistura a 60 °C por 2 h. Por fim, as UCNPs@mSiO₂ produzidas foram lavadas duas vezes com etanol e deixadas secar à temperatura ambiente.

2.4. FUNCIONALIZAÇÃO DAS UCNPs

2.4.1. Funcionalização com grupos amino - (UCNP@mSiO₂ – NH₂)

Visando à adição de grupos amino na superfície de sílica das nanopartículas 20 mg de UCNPs@mSiO₂ foram dispersadas em 50 mL de etanol e agitadas por 30 min, em seguida 500 µL de APTES e 325 µL de trietanolamina foram adicionadas à solução e a mistura foi mantida sob refluxo durante 12 h a 90 °C. As nanopartículas obtidas foram isoladas por centrifugação e lavadas três vezes com etanol.

2.4.2. Funcionalização com HOOC-TEG-COOH e HOOC-TEG-NH₂

Na primeira etapa de funcionalização 6,5 mg (0,034 mmol) de EDC, 8,85 mg de sulfo-NHS (0,0407 mmol) e 10 mg (0,034 mmol) de HOOC-TEG-COOH ou HOOC-TEG-NH₂

foram dissolvidas em 10 mL de tampão MES 0,1M (pH = 6) e ativação se deu durante 8 h a temperatura ambiente. A mistura foi então adicionada gota-a-gota a 15 mL de tampão PBS contendo 30 mg de UCNP@mSiO₂ – NH₂, o pH da solução foi ajustado para 7 utilizando-se solução de NaOH 10M e a reação foi mantida a 4 °C por 48 h sob constante agitação. O material final foi isolado por centrifugação, lavado três vezes com água e deixado secar a temperatura ambiente.

2.4.3. Permetilação

Iodometano foi utilizado para permetilar os grupos amino que se encontram na superfície da sílica mesoporosa. 20 mg de UCNP@mSiO₂ – NH₂ foram dispersadas em 50 mL de etanol e mantidas em ultrassom por 30 min. 500 µL de DIPEA e 5 mL de MeI foram adicionadas à solução e a reação foi mantida sob agitação por 12 h. Para remover o MeI em excesso, a mistura foi aquecida a 65 °C por 3h. As nanopartículas foram isoladas por centrifugação, lavadas três vezes com etanol e secas a temperatura ambiente.

2.5. ADIÇÃO DO FOTOSSENSIBILIZADOR

2.5.1. Adsorção do fotossensibilizador SiPc - (UCNP -Adx)

Para adsorção do fotossensibilizador 2,9,16,23-tetra-terc-butil-29H,31H-di-hidroxi-ftalocianina de silício na superfície das nanopartículas, 20 mg de UCNPs@mSiO₂ foram dispersadas em 20 mL de metanol contendo diferentes quantidades de SiPc (0,2 e 2,0 mg). A mistura foi mantida em banho ultrassom durante 1 h e em seguida o solvente foi evaporado a 70 °C até a obtenção de um pó azul.

2.5.2. Ligação covalente do fotossensibilizador SiPc - (UCNP-Covx)

SiPc também foi ligada covalentemente à superfície das nanopartículas dispersando-se 40 mg de UCNPs@mSiO₂ em 50 mL de tolueno contendo 0,5 mL de trietanolamina e diferentes quantidades de fotossensibilizador (0,4, e 2,5 mg). A mistura foi mantida sob refluxo a 120 °C por 10 h e o produto obtido foi isolado por centrifugação e lavado diversas vezes

com tolueno até que o sobrenadante não apresentasse mais coloração. Para determinar quanto PS se ligou às UCNPs utilizou-se o espectro de absorção do sobrenadante coletado durante as lavagens.

2.5.3. Ciclo adição do fotossensibilizador SiPc(N₃)₂ – (UCNP-CCx)

Ftalocianinas funcionalizadas com grupamentos azida (SiPc(N₃)₂) foram covalentemente ligadas às nanopartículas através de um processo de ciclo-adição em duas etapas: inicialmente 8,3 mg (0,038 mmol) de sulfo- NHS e 3,7 mg (0,019mmol) de EDC foram dissolvidos em 10 mL de tampão MES (pH = 6), em seguida, 8,6 mg (0,015 mmol) de Ac-DBCO-PEG4 foram dissolvidos em 2 mL do mesmo tampão e adicionados gota a gota à solução anterior. Após 8h em temperatura ambiente e sob constante agitação, à mistura adicionou-se 40 mg de UCNP@mSiO₂ – NH₂ dispersadas em 10 mL de tampão MES e a reação foi mantida a 4 °C por 48h. O produto foi isolado por centrifugação, lavado duas vezes com etanol e deixado secar a temperatura ambiente. Na segunda etapa as nanopartículas obtidas foram redispersadas em 55 mL de tolueno contendo 5 mg de SiPc(N₃)₂, o sistema foi mantido sob agitação à temperatura ambiente por 1h e o material obtido foi isolado e lavado diversas vezes com tolueno até que o sobrenadante não apresentasse mais coloração. A quantificação de SiPc(N₃)₂ ligado as UCNPs foi realizada utilizando-se os espectros de absorção do PS remanescente em diclorometano.

2.6. CARACTERIZAÇÃO

Morfologia. A forma e tamanho das nanopartículas foram estudados utilizando-se um microscópio eletrônico de transmissão (TEM) da marca FEI TECNAI20 e um microscópio eletrônico de varredura (SEM) da marca JEOL JEM-2100.

Estrutura cristalina. A investigação da estrutura cristalina foi realizada utilizando-se difratômetro de raios-X modelo X'PERT da Philips ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) no intervalo de 10 a 80 ° com passo de 0,02 ° e tempo de 5 s por passo.

Propriedades fotofísicas. Os espectros de excitação e emissão foram obtidos em um fluorímetro FluoroLog TCSPC da HORIBA e para estudo da fluorescência por conversão

ascendente utilizou-se como fonte de excitação um laser de 978 nm com potência de 2W. Os espectros de absorção foram obtidos através de um espectrômetro Lambda 1050 UV / Vis / NIR da marca Perkin Elmer.

Microscopia confocal de fluorescência. As imagens de microscopia confocal foram obtidas incubando as dispersões bacterianas de *E. coli* e *S. aureus* ($\text{CFU} = 1,5 \times 10^7$) com o corante 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) por 10 min e, em seguida, adicionando 20 μL das UCNPs funcionalizadas em água (2 mg/mL). Linha 1: DAPI ($\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 405 - 500 \text{ nm}$); Linha 2: SiPc ($\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 680 - 750 \text{ nm}$); Linha 3: UCL ($\lambda_{\text{exc}} = 980 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 520 - 600 \text{ nm}$).

Caracterização da superfície. O aparelho ASAP 2020 M da marca Micromeritics foi utilizado para análise de fisissorção de nitrogênio nas amostras. A área superficial e o tamanho médio dos poros foram calculados utilizando-se os métodos de BET (Brunauer–Emmett–Teller) e BJH (Barrett–Joiner–Halenda), respectivamente.

Rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_A). As medidas de rendimento quântico foram realizadas em água levando em conta as aplicações biológicas pretendidas para as nanopartículas com base em um método previamente relatado ^[102]. Simplificadamente, devido às baixas intensidades de fosforescência da transição proibida por spin $^1\text{O}_2 \rightarrow ^3\text{O}_2$ a geração de $^1\text{O}_2$ foi avaliada utilizando-se ABMDMA (9,10-anthracenediyl-bis(methylene)dimalonic acid) como monitor de fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$). Uma lâmpada de 630 nm foi utilizada para irradiar as nanopartículas e ativar o PS, azul de metileno foi utilizado como referência. A Figura 8 apresenta o esquema da formação fotoinduzida do endoperóxido de ABMDMA.

Figura 8. Esquema da formação fotoinduzida do endoperóxido de ABMDMA através da interação com $^1\text{O}_2$.

A concentração de ABMDMA é diretamente proporcional ao decaimento na intensidade de fluorescência. Fazendo-se um gráfico do logaritmo da intensidade de emissão (dividido pela intensidade em $t = 0$) versus tempo para amostra e referência e obtendo-se o

coeficiente angular das retas (m_s e m_r) é possível calcular o rendimento quântico de oxigênio singlete da amostra (Φ_{Δ}^s) através da Equação 2, onde A_R e A_s são a absorbância da referência e amostra, respectivamente, em 630 nm.

$$\frac{(1 - 10^{-A_R}) \cdot m_s}{(1 - 10^{-A_s}) \cdot m_R} = \frac{\Phi_{\Delta}^s}{\Phi_{\Delta}^R}$$

Equação 2

2.7. FOTOINATIVAÇÃO DE BACTÉRIAS *IN VITRO*

Ativação com luz de 660 nm. 100 μ L de solução bacteriana contendo aproximadamente 10^8 CFU/ mL das bactérias *S. aureus* ou *E. coli* foram misturados com 100 μ L de solução aquosa de UCNPs funcionalizadas (2 mg/mL). Após 1 h de irradiação com luz de 660 nm (108 J/ cm^2), 20 μ L de cada amostra foram plaqueados com diluição apropriada em placas de Petri contendo meio de cultura sólido. As bactérias foram cultivadas a 37 °C e após 24 h as colônias formadas foram contadas. Experimentos também foram realizados encubando as cepas com as nanopartículas na ausência de luz (controle escuro) e somente com luz (controle luz). Todas as amostras foram feitas em triplicata.

Ativação com luz de 978 nm. 100 μ L de solução bacteriana contendo aproximadamente 10^8 CFU/ mL das bactérias *S. aureus* ou *E. coli* foram adicionados a 100 μ L de solução aquosa de UCNPs funcionalizadas (2 mg/mL) e a mistura foi irradiada com laser de 976 nm com fluência de 0,4 W. cm^{-2} durante 30 min. Aliquotas de 20 μ L foram retiradas a cada 10 min e plaqueadas, com diluição apropriada, em meio sólido. Após 24 h a 37 °C as colônias formadas foram contadas. O mesmo procedimento foi realizado para os controles e todos os experimentos foram feitos em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS UCNPS (NaYF₄, Yb (20%), Er (2%))

3.1.1. Otimização do tamanho e forma

O método de co-precipitação foi utilizado para sintetizar nanopartículas compostas por uma matriz NaYF₄ dopadas com 20% Yb³⁺ e 2% Er³⁺, em porcentagem molar. Inicialmente, nitratos dos íons Ln³⁺ (Y, Yb e Er) foram preparados a partir dos óxidos desses terra-raras, que em seguida foram dissolvidos em etileno glicol e misturados com PVP, NaCl e NH₄F. PVP40 foi utilizado como agente quelante, atuando no controle do tamanho e da forma das UCNPs. Em busca das melhores condições para obtenção de partículas mais monodispersas possíveis e com diâmetro adequado para as aplicações pretendidas, a reação foi realizada diversas vezes variando-se o tempo e a temperatura.

Na Figura 9 é possível observar as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e os gráficos de distribuição de tamanhos de partículas para cada amostra. Para temperaturas de reação mais baixas (120 e 130 °C) o tamanho das UCNPs varia em um intervalo maior, obtendo-se nanopartículas que vão de 20 nm até 70 nm. Aumentando-se a temperatura para 160 °C UCNPs maiores foram sintetizadas, chegando até 90 nm, e visto que há uma etapa posterior de revestimento, deve-se optar por nanopartículas menores. A temperatura intermediária de 140 °C foi escolhida como ideal e observa-se que para maiores tempos de reação (2h) é possível obter UCNPs com tamanhos adequados, menos aglomeradas e com uma distribuição de diâmetros mais estreita.

Imagens de microscopia de varredura e de transmissão (MET) obtidas para as amostras sintetizadas a 140 °C por 2 h podem ser observadas na Figura 10. As nanopartículas obtidas apresentam-se esféricas, monodispersas e com tamanhos uniformes de cerca de 50 nm de diâmetro. A área superficial das UCNPs, obtida por fisissorção de N₂, é de 35 m²/g.

Figura 9. Imagens obtidas por MEV e distribuição de tamanhos das UCNPs produzidas variando-se o tempo e a temperatura de síntese.

Figura 10. Imagens das UCNPs sintetizadas a 140 °C por 2 h. Parte superior: MEV, parte inferior: MET.

3.1.2. Determinação da estrutura cristalina

Difratometria de raios-x foi utilizada para análise da estrutura cristalina do material. Geralmente, o uso de temperaturas mais brandas leva a formação de nanopartículas com fase cúbica (α), enquanto a fase hexagonal (β) é obtida em temperaturas acima de 300 °C. Apesar

da menor intensidade de luminescência da fase α , suas propriedades são adequadas e suficientes para uso nas aplicações pretendidas. Na fase cúbica o sistema NaREF_4 (RE: íons terra-raras) se organiza em uma estrutura de alta simetria do tipo fluorita (CaF_2), com os sítios do Ca^{2+} aleatoriamente ocupados pelos íons Na^+ e RE^{3+} , como mostrado na Figura 11A ^[103].

Em 11B é possível observar que o padrão obtido por DRX apresenta picos de difração bem definidos, indicando alta cristalinidade da amostra, além disso, suas posições e intensidades apresentam-se em concordância com o padrão calculado para a fase cúbica do cristal de NaYF_4 (JCPDS, nº 77-2042).

Figura 11. (A) Estrutura cúbica para o sistema NaREF_4 . (B) Comparação entre o padrão de difração obtido para as UCNPs sintetizadas (superior) e o padrão calculado para o cristal cúbico de NaYF_4 (inferior).

3.1.3. Propriedades fotofísicas

A absorção das UCNPs foi medida dispersando-se as nanopartículas em etanol (1 mg/mL), o espectro obtido pode ser observado na Figura 12A: as nanopartículas apresentam uma banda em aproximadamente 980 nm decorrente da absorção dos íons Ln^{3+} (principalmente o Yb^{3+}). O espectro foi normalizado e o mesmo teve a linha de base corrigida através do software DMFit para melhor visualização da banda de interesse.

Os espectros da luminescência por conversão ascendente (UCL) das nanopartículas em pó foram obtidos utilizando-se um laser de 978 nm com potência de 2W como fonte de excitação. É possível observar na Figura 12B três principais bandas: duas menos intensas na região do verde (520 nm e 545 nm) e uma banda mais intensa em 655 nm (vermelho), tais emissões são atribuídas às transições dos níveis $^2\text{H}_{11/2}$, $^4\text{S}_{3/2}$ e $^4\text{F}_{9/2}$ para o nível fundamental

$^4I_{15/2}$ dos íons Er^{3+} , respectivamente. Além da relaxação multifônon, a maior intensidade da emissão no vermelho é favorecida pelos dois mecanismos de relaxação cruzada (envolvendo os níveis $^4I_{11/2}$ e $^4I_{13/2}$) como discutido na seção 1.2.3.

Figura 12. Espectro (A) absorção das UCNPs em etanol (1 mg/ mL) e (b) UCL ($\lambda_{exc} = 978$ nm) das UCNPs em pó.

3.2. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DA CAMADA DE SÍLICA MESOPOROSA - (UCNP@mSiO₂)

Visando maiores áreas superficiais, aumento da dispersibilidade das nanopartículas em água e diminuição da toxicidade do material, as UCNPs foram revestidas com uma camada de sílica mesoporosa através da hidrólise básica do precursor de sílica TEOS e uso do surfactante CTAB. Inicialmente CTAB foi adicionado a uma solução contendo as UCNPs e o sistema foi mantido sob agitação durante 12 h. O surfactante se aproxima da camada de PVP ao redor das nanopartículas e, após adição de TEOS, a formação da camada de SiO₂ ocorre devido as interações eletrostáticas entre as espécies aniônicas de silicatos e o CTAB catiônico que se encontra no sistema UCNP-CTAB. A remoção do CTAB foi realizada por troca iônica em uma solução de etanol contendo nitrato de amônio (NH₄NO₃).

Para nosso conhecimento, não há na literatura registros de UCNPs sintetizadas com PVP que tenham sido diretamente revestidas através de tal método. O material obtido apresenta uniformidade de tamanho e forma e possui uma camada de sílica de aproximadamente 30 nm, com diâmetro total de aproximadamente 120 nm, como pode ser observado nas imagens de microscopia apresentadas na Figura 13.

Figura 13. Imagens obtidas por MET das UCNP@mSiO₂. **Figura 14.** (A) Isotermas de adsorção e dessorção de N₂ para as UCNP@mSiO₂ e (B) distribuição do tamanho dos poros.

As características superficiais das UCNP@mSiO₂ foram analisadas utilizando-se o método de fissorção de gás. Os valores obtidos para área de superfície e volume dos poros foram 486 m²/g e 0,55 cm³/g, respectivamente. As isotermas de adsorção/dessorção do N₂ são mostradas na Figura 14A e podem ser classificadas como isotermas do tipo IV, indicando a presença de mesoporos na amostra. O tamanho médio dos poros é de aproximadamente 2,4 nm, como mostrado na Figura 14B.

O espectro UCL das nanopartículas após revestimento mostra que a sílica não interfere nas propriedades fotofísicas do material, sendo possível observar todas as bandas anteriormente previstas (Figura 15). Em 15A têm-se o espectro das UCNP@mSiO₂ em pó, enquanto em 15B água foi utilizada como solvente e foi possível comparar a emissão das UCNPs com e sem revestimento. Apesar da baixa resolução, o considerável aumento na emissão das nanopartículas quando em solução aquosa demonstra a eficiência da camada de sílica em aumentar a dispersibilidade das nanopartículas nesse meio e blindar os íons

lantânídeos de forma que a interação com o solvente não resulte em aumento da probabilidade de decaimento não radiativo dos mesmos, aumentando assim a emissão global das UCNPs.

Figura 15. Espectro de emissão (a) das UCNP@mSiO₂ em pó e (b) comparação entre as UCNPs e das UCNP@mSiO₂ em água ($\lambda_{\text{exc}} = 978 \text{ nm}$).

3.3. FUNCIONALIZAÇÃO DAS UCNP@mSiO₂

As UCNP@mSiO₂ foram funcionalizadas com fotossensibilizadores do tipo ftalocianinas de silício (IV) através de três diferentes métodos: adsorção, ligação covalente diretamente à camada de sílica e ciclo-adição. A forma como o PS é adicionado influencia fortemente as propriedades do material final, sendo de nosso interesse encontrar nanopartículas com as características mais adequadas para aplicações em PDT e PDI.

Para adsorção e ligação covalente utilizou-se a 2,9,16,23-tetra-terc-butil-29H,31H-dihidroxi-ftalocianina de silício (SiPc), que possui grupos OH como ligantes axiais e anéis substituídos com terc-butilas, grupos volumosos que ajudam a evitar a formação de agregados e dímeros. Na reação de ciclo-adição 1,3-dipolar, conhecida como processo “click”, uma ftalocianina de silício com ligantes axiais que possuem grupamentos azida (SiPc(N₃)₂) foi empregada. Na Figura 16 é possível observar os espectros de absorção das moléculas utilizadas e na Figura 17 tem-se um esquema de como se dá a interação do PS com a camada de sílica das UCNP@mSiO₂ em cada uma das abordagens.

Figura 16. Espectro de absorção normalizado das ftalocianinas de silício SiPc e SiPc(N₃)₂.

Figura 17. Esquema das diferentes formas de interação entre as moléculas de fotossensibilizadores e o revestimento de sílica.

3.3.1. Adsorção do Fotossensibilizador SiPc (UCNP-Adx)

A primeira funcionalização foi realizada pela adsorção física da SiPc, nesse caso, as moléculas de PS e as UCNP@mSiO₂ são misturadas em metanol e o solvente é evaporado lentamente sob agitação constante de forma que as moléculas de PS possam adentrar os poros da sílica, onde permanecerão por forças eletrostáticas. Foram preparadas duas amostras, **UCNP-Ad₁₀** e **UCNP-Ad₁₀₀**, com concentrações de 10 e 100 mg SiPc/ g UCNP, respectivamente. As nanopartículas obtidas mostraram-se estáveis em solução aquosa por um longo período de tempo mesmo em maiores concentrações como mostrado na Figura 18, e nenhum vazamento da droga do interior dos poros foi detectado.

Figura 18. Fotografia das UCNP-Ad₁₀₀ em água após 0 min e 60 min de descanso. Concentrações (A) 1, (B) 0,5, (C) 0,25 e (D) 0,125 mg UCNP/mL.

O rendimento quântico de $^1\text{O}_2$ da UCNP-Ad₁₀₀, ou seja, a capacidade do sistema em converter a radiação absorvida em moléculas de oxigênio singlete, foi calculado utilizando-se água como solvente através de uma medida indireta onde a molécula de ABMDMA é empregada como monitor de fluorescência e o corante azul de metileno como referência. O PS na superfície da nanopartícula foi ativado diretamente pelo uso de radiação de 630 nm, mas vale lembrar que qualquer outro comprimento de onda na região de 600 – 700 nm poderia ter sido utilizado para ativação da SiPc (Figura 16).

Inicialmente mediu-se a absorbância da solução de MB para obter o valor de sua absorção em 630 nm e, em seguida, ABMDMA foi adicionado e o sistema foi irradiado durante 1 min, coletando-se o espectro de emissão do monitor na região de 400 a 520 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 370 \text{ nm}$) a cada 10 s. O $^1\text{O}_2$ produzido pelo MB causa diminuição da fluorescência do ABMDMA, pois leva a formação do seu endoperóxido não emissivo (Figura 8). O mesmo procedimento foi realizado para a amostra UCNP-Ad₁₀₀ e os espectros de absorção e emissão obtidos são mostrados na Figura 19. A absorção da SiPc adsorvidas apresenta-se bastante alargado devido a formação de agregados na superfície das nanopartículas, que serão discutidos nas próximas seções.

Para o cálculo de Φ_{Δ} é necessário representar o decaimento do ABMDMA em gráficos de $\ln(F/F_0)$ vs tempo, como mostrado na Figura 20, onde F e F_0 correspondem as áreas dos espectros de emissão do ABMDMA no tempo x e no tempo zero, e encontrar seus coeficientes angulares. Conhecendo-se os valores das absorbâncias, dos coeficientes angulares das retas e sabendo que $\Phi_{\Delta} = 0,52$ para o MB, calculou-se o Φ_{Δ} para a UCNP-Ad₁₀₀ através da Equação 2, obtendo-se um valor igual a $0,15 \pm 0,03$.

Figura 19. Espectro de absorção UV-Vis (a) MB e (b) UCPN-Ad₁₀₀ e Espectros de emissão do ABMDMA (λ_{exc} = 370 nm) após diferentes tempos de exposição das amostras (C) MB e (D) UCPN-Ad₁₀₀ à radiação de 630 nm.

Figura 20. Decaimento da emissão do ABMDMA na amostra UCPN-Ad₁₀₀ e MB representado por um gráfico de $\ln(F/F_0)$ vs tempo.

3.3.2. Ligação Covalente do Fotossensibilizador SiPc (UCNP-Covx)

A ligação covalente da SiPc à superfície da UCPN@mSiO₂ foi realizada através da condensação dos grupos OH do fotossensibilizador aos grupos silanóis (Si-OH) na camada de sílica, mantendo-se os reagentes em tolueno e sob refluxo durante 12 h. Duas concentrações iniciais de SiPc (10 e 62 mg/ g) foram utilizadas e através do solvente coletado nas lavagens do produto final foi possível quantificar quanto PS se ligou às nanopartículas. Os espectros de

absorção dos sobrenadantes das duas amostras, **SOB₁₀** e **SOB₆₂** estão representados nas figuras 21A e 21B, respectivamente.

O coeficiente de absortividade molar da SiPc em 680 nm é igual à aproximadamente $2,7 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, assim, conhecendo-se os valores das absorbâncias das amostras (Figura 21) é possível encontrar o número de mols de SiPc que não reagiu através da Lei de Lambert-Beer ($A = l.\epsilon.c$). De acordo com os cálculos, a concentração de SiPc que se ligou às UCNPs foi de 5 mg/ g (**UCNP-Cov₅**) e 26 mg/ g (**UCNP-Cov₂₆**) para as concentrações iniciais de 10 e 62 mg de SiPc/ g UCNP, respectivamente.

Figura 21. Espectros de absorção UV-Vis dos sobrenadantes de lavagem das UCNPs funcionalizadas (a) SOB₁₀ e (b) SOB₆₂

O rendimento quântico de oxigênio singlete da amostra **UCNP-Cov₂₆** foi medido utilizando-se o mesmo procedimento descrito na seção anterior, obtendo-se um valor de $0,05 \pm 0,03$. Na Figura 22 observa-se e os espectros de emissão do ABMDMA após diferentes tempos de irradiação e a reta de $\ln(F/F_0)$ vs tempo obtida.

Figura 22. (a) Espectros de emissão do ABMDMA ($\lambda_{exc} = 370 \text{ nm}$) após diferentes tempos de exposição da amostra UCN-Cov₂₆ a radiação de 630 nm e (b) Decaimento da emissão do ABMDMA na amostra UCN-Cov₂₆ representado por um gráfico de $\ln(F/F_0)$ vs tempo.

3.3.3. Ciclo-adição do Fotossensibilizador SiPc(N₃)₂ (UCNP-CAx)

A adição da SiPc(N₃)₂ à superfície das nanopartículas se deu através de uma reação de ciclo-adição 1,3-dipolar com anel octino. Ressalta-se que, para nosso conhecimento, não há na literatura relatos de reações desse tipo para funcionalização de UCNPs. Todo o processo para obtenção das UCNP-CAx encontra-se esquematicamente ilustrado na Figura 23: inicialmente, as UCNP@mSiO₂ foram funcionalizadas com grupos -NH₂ através da reação, sob refluxo, das nanopartículas com o aminosilano APTES durante 12 h. A segunda etapa envolve a inicial ativação da molécula de Ac-DBCO-PEG₄, utilizando-se EDC e sulfo-NHS, em tampão MES, para que em seguida, através da formação de uma amida, o Ac-DBCO-PEG₄ se ligue aos grupos amina na superfície do material. Finalmente, a adição do fotossensibilizador ocorre por uma reação de ciclo-adição entre o anel octino do Ac-DBCO-PEG₄ e as azidas da SiPc(N₃)₂ com consequente formação de um anel triazol.

Figura 23. Esquema da reação de funcionalização das UCNP através do processo de ciclo-adição.

O EDC é uma carbodiimida comumente utilizada como agente de reticulação que atua se ligando aos grupos carboxilas dos ácidos para dar origem a O-acilisoureia, um intermediário bastante instável e susceptível à hidrólise quando em solução aquosa. Para aumentar a eficiência do processo utiliza-se sulfo-NHS, que reage com a O-acilisoureia

formando um novo intermediário semi-estável, o éster de NHS, o qual é capaz de levar a formação de amidas de forma mais eficiente ^[105]. As reações envolvidas nesses processos encontram-se esquematicamente ilustradas na Figura 25.

A concentração inicial de fotossensibilizador utilizado foi de 125 mg/g, as moléculas de PS que não se ligaram as nanopartículas foram coletadas através de lavagens do produto com tolueno. Para quantificação, realizou-se a secagem do tolueno, solubilização da SiPc(N₃)₂ remanescente em diclorometado e medida de absorbância da solução. Sabendo-se que a absorvidade molar da SiPc(N₃)₂ é igual a $2,96 \times 10^5 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ em 668 nm, calculou-se a concentração de PS que se ligou as UCNPs, sendo essa igual a 55 mg/g (UCNP-CA₅₅).

Figura 24. Diagrama esquemático das reações de acoplamento envolvendo EDC e sulfo-NHS para formação de amidas.

Fonte: Adaptado de TermoFisher.com ^[105].

O rendimento quântico de ¹O₂ foi medido excitando-se o sistema com luz de 630 nm como nos casos anteriores e o valor encontrado foi de $0,26 \pm 0,03$. Na Figura 25 é possível observar os espectros de emissão do ABMDMA e a curva de $\ln(F/F_0)$ vs tempo.

Figura 25. (a) Espectros de emissão do ABMDMA ($\lambda_{exc} = 370$ nm) após diferentes tempos de exposição da amostra UCNP-CA₅₅ a radiação de 630 nm e (b) Decaimento da emissão do ABMDMA na amostra UCNP-CA₅₅ representado por um gráfico de $\ln(F/F_0)$ vs tempo.

3.4. CARACTERÍSTICAS DAS UCNPs FUNCIONALIZADAS

3.4.1. Formação de agregados

O grau de agregação e os tipos de agregados formados pelo PS na superfície das nanopartículas podem ser estudados através dos espectros de absorção dos materiais produzidos. Um aumento na absorção entre 600-750 nm (banda Q) pode ser interpretado como a formação de agregados do tipo H e do tipo J de fotossensibilizadores. Os agregados do tipo H ocorrem quando as duas moléculas estão dispostas de forma axial e seus momentos de dipolo podem estar paralelos ou antiparalelos (Figura 26A). No alinhamento paralelo, os momentos de dipolo se repelem induzindo a desestabilização do estado excitado S_1 para energias maiores (S_2). Esta conformação é permitida e leva ao aparecimento de uma banda de absorção intensa em menores comprimentos de onda do que aqueles observados para a forma monomérica do PS. Na conformação antiparalela os momentos de dipolo se cancelam e levam a formação de um estado excitado (S_1), estabilizado em relação à S_1 devido à atração entre as moléculas, porém, proibido, não podendo ser observado no espectro de absorção (se não há momento de dipolo de transição resultante não é possível que ocorra absorção de luz).

Os agregados do tipo J são formados pelo acoplamento lateral das moléculas e da mesma forma os momentos de dipolo de transição podem se somar ou se cancelar (Figura 26B). Quando dois dipolos apontam na mesma direção as forças atrativas estabilizam o estado excitado levando a formação de S_1 e absorção passa a ocorrer em comprimentos de onda

maiores em relação ao monômero. Quando os dipolos apontam para direções opostas a repulsão induz a formação de um estado de maior energia $S_{2'}$, proibido^[106, 107].

Figura 26. Representação esquemática do acoplamento entre os momentos de dipolo de transição das moléculas de fotossensibilizadores quando alinhadas de forma (a) axial e (b) lateral.

Observando os espectros de absorção das UCNPs funcionalizadas, mostrado na Figura 27, pode-se fazer uma análise de como o modo de adição do PS influencia o grau de agregação. Para a **UCNP-Ad₁₀₀** as moléculas encontram-se muito mais agregadas, pois, além da maior concentração, o PS é depositado na superfície de sílica sem qualquer seletividade de sítio de ligação, ao contrário do que ocorre para os outros dois sistemas. Quando a SiPc se liga de forma covalente a ligação ocorre somente em locais específicos onde há a presença de grupos silanóis. Apesar da formação de menor número de agregados é possível observar sutis deslocamentos, principalmente na região do vermelho devido ao acoplamento lateral das moléculas. Adicionalmente, conclui-se que o uso do processo “click” para a adição da SiPc(N_3)₂ contribui para que o PS se mantenha em sua forma monomérica, pois o uso do Ac-DBCO-PEG₄ como âncora faz com que as moléculas fiquem mais afastadas umas das outras.

Figura 27. Espectros de absorção normalizado das UCNP-Ad₁₀₀, UCNP-Cov₂₆ e UCNP-CA₅₅ e tipos de agregados formados.

O maior valor de Φ_{Δ} para a **UCNP-CC₅₅** (26% comparado com 15% para **UCNP-Ad₁₀₀** e 5% para **UCNP-Cov₂₅**) pode ser explicado pelo menor número de agregados, pois estes influenciam fortemente a eficiência dos fotossensibilizadores na geração de $^1\text{O}_2$, visto que o aumento do número de moléculas acopladas leva à diminuição da transferência de energia entre a forma excitada do PS e o $^3\text{O}_2$ devido a maior chance de dissipação de energia por processos vibracionais não radiativos.

3.4.2. FRET da UCNPs para o fotossensibilizador

A emissão das UCNPs na região do vermelho se encontra na mesma faixa de comprimentos de onda de absorção das ftalocianinas de silício (Figura 28A), assim, parte da luminescência das nanopartículas pode ser transferida para as moléculas de PS em sua superfície, causando diminuição da emissão das UCNPs em 650 nm, como pode ser observado nos espectros das UCNPs em pó antes e após a funcionalização apresentados na Figura 28B.

Figura 28. (a) Espectros de emissão das UCNPs@mSiO₂ e absorção da ftalocianina de silício – sobreposição da região de 650 nm. (b) Espectros de emissão ($\lambda_{\text{exc}} = 978$ nm) das UCNPs@mSiO₂, UCNPs-Ad₁₀₀, UCNPs-Cov₂₅ e UCNPs-CA₅₅ em pó.

A molécula de ABMDMA foi utilizada para monitorar a geração de oxigênio singleto, em solução aquosa (0,1 mg/ mL), quando o PS é ativado através da emissão das nanopartículas. As amostras foram submetidas à irradiação com laser de 978 nm (2 W) por diferentes períodos de tempos e o espectro de emissão do ABMDMA foi coletado a cada 5 min analisando-se o decréscimo do pico em 410 nm, como mostrado na Figura 29.

Figura 29. Intensidade normalizada do pico de emissão em 410 nm ($\lambda_{exc} = 370$ nm) após diferentes tempos de exposição das amostras UCNP-Ad₁₀₀, UCNP-Cov₂₆ e UCNP-CA₅₅ a radiação de 978 nm (2W).

O maior decaimento na emissão do ABMDMA ocorre para a **UCNP-Ad₁₀₀**, seguida da **UCNP-Cov₂₆** e nenhum decaimento foi detectado para a **UCNP-CA₅₅**, tais observações podem ser justificadas, pois a FRET é muito dependente da distância entre os cromóforos e acredita-se que as moléculas adsorvidas conseguem ir mais fundo nos interstícios da sílica, encontrando-se mais próximas das UCNPs. A Figura 30 traz um diagrama esquemático de distribuição do PS para cada um dos sistemas. Acredita-se que na **UCNP-Cov₂₆**, as primeiras moléculas de SiPc a se ligar a @mSiO₂ acabam bloqueando a passagem das demais, fazendo com que essas se acumulem mais na superfície do material e fiquem além de determinada distância crítica que possibilita a FRET, dessa forma, uma menor quantidade de fotossensibilizadores pode ser ativada pela emissão das nanopartículas e consequentemente menos ¹O₂ é gerado.

Figura 30. Diagrama esquemático das moléculas de fotossensibilizador no interior dos poros - dependência com o modo de adição.

Nenhum decréscimo significativo de emissão foi identificado para a **UCNP-CA₅₅**, indicando que nesse sistema não há FRET entre a UCNP e a SiPc(N₃)₂. Infere-se que, em

solução, devido à presença da molécula de ancoragem, o PS encontra-se a uma distância suficientemente grande da nanopartícula emissora de luz, evitando a transferência de energia.

3.4.3. Considerações gerais

Com base nessas análises pode-se concluir que o rendimento quântico de oxigênio singlete quando o PS é ativado diretamente por comprimentos de onda entre 600 – 700 nm varia de acordo com sua concentração e o seu grau de agregação na superfície da sílica mesoporosa. Já a ativação indireta das ftalocianinas pela emissão das UCNPs é muito dependente da distância que as moléculas se encontram da nanopartícula no interior do revestimento.

Utilizando abordagens diferentes para a funcionalização das nanopartículas foi possível criar três sistemas teranósticos com propriedades distintas. As **UCNP-Ad₁₀₀** e **UCNP-Cov₂₆** podem ter seus processos de imagem e terapia ativados pelo uso de um único comprimento de onda na região do infravermelho próximo, que possui alta penetração no tecido, entretanto a eficiência na produção de $^1\text{O}_2$ é menor. Já **UCNP-CA₅₅**, apesar da ausência de FRET, possui características interessantes, visto que o sistema pode ser ativado individualmente dependendo da aplicação pretendida, ou seja, quando as nanopartículas são irradiadas com luz NIR toda a emissão das UCNPs podem ser utilizadas para imageamento e, adicionalmente, o PS pode ser ativado em um segundo processo por comprimentos de onda entre 600 – 700 nm, apresentando alto valor de Φ_Δ .

Por suas propriedades duais, alta eficiência no processo de transferência de energia, bom valor de Φ_Δ e facilidade de síntese, o método de adsorção foi escolhido para ser utilizado em novos experimentos de funcionalização da camada de sílica visando à obtenção de materiais com diferentes cargas superficiais para uso em PDI de bactérias Gram positivas e Gram negativas.

3.5. UCNPs PARA APLICAÇÃO EM PDI

3.5.1. Modificação da carga superficial

Visando a obtenção de nanopartículas com diferentes cargas superficiais para uso em testes de interação com bactérias, as **UCNP-Ad₁₀₀** foram decoradas com moléculas contendo grupos funcionais variados.

Além das UCNPs sem revestimento (**UCNP1**) e da **UCNP-Ad₁₀₀** (agora chamada de **UCNP2**), outros quatro sistemas foram sintetizados (**UCNP3-6**) e um diagrama esquemático das reações de modificação pode ser observado na Figura 31. Os novos grupos foram introduzidos por reações das UCNPs@mSiO₂ com APTES ou acoplamento das moléculas HOOC-TEG-COOH/HOOC-TEG-NH₂ através de suas ativações utilizando EDC/NHS seguidas, em alguns casos, de permetilação. Para assegurar a mesma quantidade de PS na superfície do material (100 mg SiPc/g UCNPs), a adsorção da ftalocianina foi realizada como última etapa.

A **UCNP3** contém em sua superfície grupos -NH₂ advindos da reação entre os grupos silanóis na superfície da @mSiO₂ e o aminosilano APTES. Através do uso de iodeto de metila, as aminas primárias na superfície das nanopartículas foram metiladas para formar aminas quaternárias (-N(CH₃)₃⁺) e dar origem à **UCNP4**.

As UCNPs contendo -NH₂ também foram utilizadas como base para a síntese das **UCNP5** e **UCNP6**. Nesses sistemas EDC e sulfo-NHS foram empregados na ativação dos grupos -COOH das moléculas HOOC-TEG-COOH e HOOC-TEG-NH₂ que, em seguida, através da formação de amidas, se ligaram as nanopartículas em uma reação muito semelhante à anteriormente descrita para o Ac-DBCO-PEG₄. Iodeto de metila também foi utilizado na síntese da **UCNP6** levando formação de grupos -TEG-N(CH₃)₃⁺ na superfície do material.

Figura 31. Diagrama esquemático das reações de síntese das UCNP1-6.

O sucesso nas modificações superficiais foi acompanhado de mudanças nos valores de potencial zeta e raio hidrodinâmico dos materiais finais, como pode ser observado nos gráficos da Figura 32 e 33.

O potencial zeta em água diminuiu de +33,5 mV (UCNP1) para -6,6 mV após a formação da camada de sílica mesoporosa (UCNP2), aumentando novamente para +32,3 mV após a reação com APTES (UCNP3) e para +39,0 mV após a permetilação com iodometano (UCNP4). As UCNP5 e UCNP6 possuem cargas superficiais em torno de +20 mV, pois a presença de grupos NH₂ que não participaram das reações de formação de amidas faz com que a carga das nanopartículas se mantenha bastante positiva.

Figura 32. Potencial zeta das UCNPs 1-6

Figura 33. Raio hidrodinâmico das UCNPs 1-6.

Os valores dos raios hidrodinâmicos foram obtidos em solução aquosa através de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e mostram que as UCNP tendem a formar agregados com tamanhos variados, mas que se tornam maiores com a adição de grupos funcionais de cadeias mais longas. O raio de 105 nm medido para **UCNP1** passa a 190 nm após a formação da camada de sílica mesoporosa (**UCNP2**) e a 220 e 255 nm após funcionalizações com aminas primárias e quaternárias, **UCNP3** e **4**, respectivamente. Os maiores agregados foram observados para as **UCNP5** (458-2669 nm) e **UCNP6** (342 nm) provavelmente devido à

formação de ligações de hidrogênio entre as longas cadeias de tetraetileno glicol (TEG) de partículas vizinhas.

3.5.2. Propriedades Fotofísicas

A mesma quantidade de SiPc foi adicionada à superfície das nanopartículas (**UCNP2-6**) após as etapas de modificação de superfície, sendo assim, os espectros de emissão possuem o mesmo perfil (Figura 34) entretanto, devido a presença dos grupos funcionais o fotossensibilizador tende a se agregar de forma diferente em cada amostra, como pode ser observado em detalhes na Figura 34B. A presença de grupos mais volumosos diminuiu o espaço disponível no interior dos poros e faz com que as SiPc comecem a se empilhar formando agregados do tipo H e aumentando a absorção das nanopartículas em menores comprimentos de onda, como pode ser observado de forma mais pronunciada para as **UCNP5** e **UCNP6**. O PS também tende a formar agregados laterais (tipo J – deslocamentos no vermelho) devido às interações entre os grupos Si-OH axiais das ftalocianinas e a superfície de sílica.

Figura 34. Espectros de absorção das UCNP's funcionalizadas (A) Normalizado em 788 nm e (B) Normalizado em 788 nm e com linha de base corrigida para banda-Q.

A eficiência da transferência de energia entre a UCNP e as SiPc em sua superfície foi medida através da geração de $^1\text{O}_2$ e seu monitoramento com ABMDMA. As amostras **UCNP2-6**, em solução aquosa ($c = 0,25 \text{ mg/mL}$), foram irradiadas com laser de 978 nm (1,5 W) por 30 min e as curvas de decaimento de emissão do ABMDMA em 410 nm podem ser observadas na Figura 35. Como a FRET é muito dependente da distância entre os cromóforos, a transferência de energia é muito maior para os sistemas que possuem grupos funcionais

menores, como as **UCNP2** e **UCNP3**, pois a SiPc é capaz de adentrar mais os poros. Para as **UCNP5** e **UCNP6** a ativação do PS e consequente geração de $^1\text{O}_2$ é menor, pois os interstícios encontram-se parcialmente bloqueados. Já para **UCNP4**, acredita-se que a formação das aminas quaternárias muito próximas à camada de sílica impossibilitou a passagem das moléculas de ftalocianinas, fazendo com que essas se mantivessem mais próximas à superfície externa da nanopartícula e longe o suficiente da UCNP no interior do sistema de forma a evitar a ocorrência de FRET.

Figura 35. Intensidade normalizada do pico de emissão em 410 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 370$ nm) após diferentes tempos de exposição das UCNP2-6 a radiação de 978 nm (1,5 W).

3.5.3. Interação entre as nanopartículas e bactérias

As interações entre as **UCNPs 1-6** e bactérias Gram positivas e Gram negativas foi investigada utilizando-se microscopia confocal de fluorescência e as imagens obtidas podem ser observadas na Figura 36A (*E. coli*) e 36B (*S. aureus*). As bactérias foram marcadas usando o corante DAPI, que possui emissão em aproximadamente 488 nm (azul), e as nanopartículas podem ser visualizadas através das moléculas de PS em sua superfície (emissão vermelha) e da UCL das UCNPs (emissão verde). Todas as amostras exibem propriedades de luminescência por conversão ascendente e é possível observar que as nanopartículas tendem a formar agregados de tamanhos variados que interagem de forma diferentes com as bactérias.

A co-localização das nanopartículas e da *E. coli* que pode ser observada para as **UCNP3**, **UCNP4**, **UCNP5** e **UCNP6** indica que estas tendem a interagir de forma efetiva. Já a **UCNP2** aparenta ser um pouco menos atraída pela bactéria e a amostra **UCNP1** não

mostrou nenhum tipo de interação – em 1D pode-se ver a falta de co-localização entre os sistemas. Aparentemente, o aumento da área de superfície através da formação do revestimento de sílica mesoporosa aumenta o potencial de interação das UCNPs com *E. coli*, apesar do potencial zeta da **UCNP2** ser ligeiramente negativo.

Figura 36. Imagens de microscopia confocal de fluorescência da UCNP1-6 encubadas com (A) *E. coli* e (B) *S. aureus*.

Todas as amostras são capazes de interagir com *S. aureus*, como pode ser observado em 36B, entretanto a interação das bactérias com a **UCNP2** não é tão efetiva quanto com as demais. Pode-se concluir que a adição de novos grupos funcionais à superfície das UCNPs contribui para o aumento da ligação entre essas e as bactérias Gram positivas e Gram negativas, entretanto, há um grande número de fatores que podem desempenhar um papel importante nesse processo e devem ser levados em conta: interações eletrostáticas, interações locais entre moléculas na superfície das nanopartículas e proteínas de membrana, ligação de hidrogênio, grau de agregação de partículas em meio aquoso, pH de solução, substâncias dissolvidas e porosidade do material.

3.5.4. Fotoinativação de bactérias *in vitro*

Para avaliar a eficiência do material produzido na fotoinativação de bactérias, testes foram realizados *in vitro*, através da irradiação das amostras com luz de 660 nm, para ativação direta da SiPc, e de 978 nm para ativação da UCNP e consequente transferência de energia para o fotossensibilizador.

3.5.4.1. Ativação direta do fotossensibilizador

No experimento de fotoinativação das bactérias com ativação direta da SiPc, 100 μL de solução bacteriana ($\sim 10^8$ CFU/ mL) foram incubadas com 100 μL das **UCNP1-6** em água destilada (2 mg/ mL) em placas de cultivo de 96 poços. O sistema, sob agitação constante, foi irradiado utilizando-se um LED de 660 nm durante 1 h, sem incubação prévia. Foram realizados experimentos de controle no escuro, incubando as nanopartículas com as bactérias na ausência de luz e também de controle só com luz, onde as soluções bacterianas foram irradiadas sem a droga. Aliquotas de 20 μL foram retiradas de cada poço, diluídas em eppendorfs, plaqueadas em meio de cultura sólido e após 24 h as bactérias remanescentes foram quantificadas através da contagem de unidades formadoras de colônias (CFU) nas placas de Petri. Ressalta-se que todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

Os resultados obtidos para as bactérias *S. aureus* e *E. coli* encontram-se nos gráficos da Figura 37. Em 37A é possível observar que as UCNPs sem revestimento e funcionalizações (**UCNP1**) apresentam toxicidade contra *E. coli* na ausência de radiação e são capazes de reduzir o número de CFU em aproximadamente 2 ordens de magnitude após 1 h de incubação. A toxicidade no escuro aumenta para 5 ordens de magnitude de redução das CFU quando as UCNPs com revestimento de sílica e funcionalização com $-\text{NH}_2$ e $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ são empregadas (**UCNP2**, **3** e **4**) e diminui novamente para 3 ordens de magnitude para as nanopartículas contendo os grupos TEG-COOH (**UCNP5**) e TEG- $\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ (**UCNP6**). Quando incubadas durante 1 h com cepas de *S. aureus* nenhuma amostra apresentou toxicidade na ausência de irradiação, como pode ser observado em 37B. Destaca-se que a diferença de ação das UCNPs na ausência de luz contra a *E. coli* e *S. aureus* permite uma discriminação prática entre as duas cepas bacterianas.

Após irradiação, a *E. coli* foi completamente erradicada por todas as amostras, exceto pela **UCNP5**, que se mostrou menos fototóxica, provavelmente devido à formação de grandes agregados em solução aquosa, como observado no gráfico da Figura 33, levando a uma

diminuição de 7 ordens de magnitude das CFU. O efeito sinérgico entre a toxicidade intrínseca das nanopartículas e a toxicidade fotoinduzida do PS faz dessas UCNPs poderosos agentes contra a *E. coli*. Adicionalmente, todas as amostras mostraram-se muito eficientes na fotoinativação da bactéria *S. aureus* com reduções de CFU variando entre 6 e 7 ordens de magnitude. Acredita-se que o melhor resultado obtido para **UCNP4**, relaciona-se as conclusões anteriores de que nesse sistema, devido à presença de grupos volumosos próximos a camada de sílica, o PS se encontra mais na superfície da nanopartícula e, portanto, mais próximo à bactéria, possuindo maior raio de ação.

Figura 37. Número de unidades formadoras de colônias (CFU)/ mL para (a) *E. coli* e (b) *S. aureus* incubadas com as amostras UCNP1-6 e irradiadas com LED de 660 nm por 1h.

A toxicidade contra as bactérias é dependente de várias características das partículas como tamanho, forma, hidrofiliabilidade, porosidade, carga superficial, entre outras; dessa forma, não é trivial apontar uma única causa para a toxicidade no escuro das UCNPs quando combinadas com a *E. coli*. Entretanto, destaca-se que a toxicidade intrínseca é aumentada pela formação da camada de sílica mesoporosa, visto que essa leva a uma maior interação das nanopartículas com as bactérias, como anteriormente observado nas imagens de microscopia confocal. As características promissoras de erradicação contra a *E. coli*, somadas a drástica foto-redução da *S. aureus* demonstram que a engenharia de superfície realizada nas nanopartículas pode levar a formação de agentes PDI cada vez mais eficientes.

3.5.4.2. Ativação indireta do fotossensibilizador

Visto que a eficiência da transferência de energia entre as UCNPs e a SiPc varia muito de acordo com o tipo de funcionalização da superfície da nanopartícula, testes de fototoxicidade induzidas por um laser de 978 nm foram realizados somente para a amostra **UCNP2**, a qual mostrou a maior taxa de geração de $^1\text{O}_2$ *via* FRET. Nesse experimento, 1,5 mL de suspensão bacteriana ($\sim 10^8$ CFU/ mL) foram tratados com 1,5 mL de **UCNP2** em solução aquosa ($c = 2$ mg/mL) e o sistema foi irradiado com laser (fluência 400 mW/cm²) por 30 min. Alíquotas de 20 μL foram retiradas a cada 10 min, diluídas e plaqueadas em meio de cultura sólida para posterior contagem após 24 h.

Os resultados obtidos para as bactérias *E. coli* e *S. aureus* podem ser observados nos gráficos da Figura 38. Como visto anteriormente, a amostra apresenta toxicidade no escuro para *E. coli* e um decréscimo de aproximadamente cinco ordens de magnitude de CFU foi observado (37A). Adicionalmente, a FRET desencadeada pela UCL foi capaz de matar duas ordens de magnitude de CFU após 30 min de irradiação.

Figura 38. Número de unidades formadoras de colônias (CFU)/ mL para (a) *E. coli* e (b) *S. aureus* incubadas com a amostra UCNP2 e irradiadas com laser de 978 nm por 30 min.

Como mostrado em 38B, nenhum efeito de redução foi detectado para a *S. aureus* nesse experimento. Vale lembrar que essa cepa bacteriana também se mostrou menos sensível a fotooxidação pelas UCNPs quando o PS foi diretamente excitado (seis a sete ordens de magnitude de redução comparados a completa erradicação da *E. coli*), indicando maior limiar de resistência contra o ¹O₂. As bactérias Gram positivas, como a *S. aureus*, possuem uma camada adicional de peptidoglicano (Figura 7) ao redor de sua membrana que fornece maior proteção e pode atuar evitando que pequenas quantidades de ¹O₂ danifiquem a integridade da célula bacteriana e acabem inativando a bactéria. Além disso, apesar de ter sido avaliada como a amostra mais eficiente na geração de ¹O₂ quando ativada pelo laser, é importante levar em conta que na **UCNP2** as moléculas de PS por se encontrarem mais próximas da UCNP do centro do material estarão mais distantes da bactéria, e, levando-se em conta o raio de ação das ROS, acredita-se que boa parte dos agentes oxidantes produzidos não alcance o microrganismo, levando a baixas taxas de inativação.

Tendo em vista todas essas considerações, é importante ter em mente que são muitos os fatores que atuam sobre os resultados desse tipo de experimento: desde a estrutura da bactéria estudada e o tipo de droga empregada, como anteriormente discutido, até as condições experimentais – tempo de incubação e irradiação, potência da fonte de luz, concentração do material, entre outras. Dessa forma, os experimentos realizados até aqui foram só uma prova de que esse material possui grande potencial de aplicação, entretanto acredita-se que uma série de outros experimentos poderia ser realizada em busca de condições ótimas que possam demonstrar toda a real capacidade das UCNPs produzidas.

4. CONCLUSÃO

Foram produzidas nanopartículas emissoras de luz por conversão ascendente de energia funcionalizadas com fotossensibilizadores para uso como agentes teranósticos. Através das análises das **UCNP-Ad₁₀₀**, **-Cov₂₅** e **-CA₅₅** foi possível observar que o modo de adição da molécula de SiPc possui grande influência nas propriedades finais do material. A **UCNP-CA₅₅** apresentou os maiores valores de Φ_{Δ} quando o PS é diretamente excitado devido ao menor grau de agregação das moléculas de PS. As **UCNP-Ad₁₀₀** e **UCNP-Cov₂₅** possuem propriedades duais e nesses sistemas a SiPc pode ser excitada tanto diretamente quanto por FRET com as UCNPs. A eficiência da FRET é muito dependente da distância a SiPc e as UCNPs no interior da camada de sílica e pode ser ajustada, tornando-se uma ferramenta que permite separar ou utilizar conjuntamente os processos de terapia e diagnóstico, dependendo da aplicação pretendida. Tomando como base a amostra obtida por adsorção, outros cinco novos sistemas foram produzidos decorando a superfície de sílica com diferentes grupos funcionais (**UCNP 2- 6**) e estes foram empregados com testes de interação e desativação de bactérias. As nanopartículas produzidas possuem capacidades promissoras contra cepas Gram positivas e Gram negativas, sendo capazes de causar diminuição de CFU de até sete ordens de magnitude para a *S. aureus* e levar a completa erradicação da *E. coli* quando o PS é diretamente ativado em testes *in vitro*. A toxicidade das nanopartículas na ausência de luz somadas ao processo de fotooxidação desencadeado quando o sistema é irradiado com luz NIR levou a uma diminuição de seis ordens de magnitude de CFU da *E. coli*. Acredita-se que o potencial dos materiais produzidos ainda pode ser amplamente explorado em experimentos de diagnóstico, PDT de células cancerígenas e testes *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- 1 RESCH-GENGER, U. et al. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. **Nature methods**, v. 5, n. 9, p. 763, 2008.
- 2 SMITH, A. M.; GAO, X.; NIE, S. Quantum dot nanocrystals for in vivo molecular and cellular imaging. **Photochemistry and photobiology**, v. 80, n. 3, p. 377-385, 2004.
- 3 CHANG, E. et al. Evaluation of quantum dot cytotoxicity based on intracellular uptake. **Small**, v. 2, n. 12, p. 1412-1417, 2006.
- 4 WANG, M. et al. Upconversion nanoparticles: synthesis, surface modification and biological applications. **Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine**, v. 7, n. 6, p. 710-729, 2011.
- 5 AUZEL, F. Upconversion processes in coupled ion systems. **Journal of Luminescence**, v. 45, n. 1-6, p. 341-345, 1990.
- 6 WANG, F.; LIU, X. Recent advances in the chemistry of lanthanide-doped upconversion nanocrystals. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 4, p. 976-989, 2009.
- 7 VETRONE, F.; CAPOBIANCO, J. A. Lanthanide-doped fluoride nanoparticles: luminescence, upconversion, and biological applications. **International Journal of Nanotechnology**, v. 5, n. 9-12, p. 1306-1339, 2008.
- 8 WANG, F. et al. Upconversion nanoparticles in biological labeling, imaging, and therapy. **Analyst**, v. 135, n. 8, p. 1839-1854, 2010.
- 9 WANG, F.; LIU, X. Multicolor tuning of lanthanide-doped nanoparticles by single wavelength excitation. **Accounts of Chemical Research**, v. 47, n. 4, p. 1378-1385, 2014.
- 10 BÜNZLI, J.-C. G. Lanthanide luminescence for biomedical analyses and imaging. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 5, p. 2729-2755, 2010.
- 11 HAASE, M.; SCHÄFER, H. Upconverting nanoparticles. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 26, p. 5808-5829, 2011.
- 12 WANG, G.; PENG, Q.; LI, Y. Lanthanide-doped nanocrystals: synthesis, optical-magnetic properties, and applications. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 5, p. 322-332, 2011.
- 13 AEBISCHER, A. et al. Structural and spectroscopic characterization of active sites in a family of light-emitting sodium lanthanide tetrafluorides. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, n. 17, p. 2802-2806, 2006.
- 14 BOYER, J.-C.; CUCCIA, L. A.; CAPOBIANCO, J. A. Synthesis of colloidal upconverting NaYF₄: Er³⁺/Yb³⁺ and Tm³⁺/Yb³⁺ monodisperse nanocrystals. **Nano Letters**, v. 7, n. 3, p. 847-852, 2007.

- 15 RENERO-LECUNA, C. et al. Origin of the high upconversion green luminescence efficiency in β -NaYF₄: 2% Er³⁺, 20% Yb³⁺. **Chemistry of Materials**, v. 23, n. 15, p. 3442-3448, 2011.
- 16 THOMA, R. E.; INSLEY, H.; HEBERT, G. M. The Sodium fluoride-lanthanide trifluoride systems. **Inorganic Chemistry**, v. 5, n. 7, p. 1222-1229, 1966.
- 17 KRÄMER, K. W. et al. Hexagonal sodium yttrium fluoride based green and blue emitting upconversion phosphors. **Chemistry of Materials**, v. 16, n. 7, p. 1244-1251, 2004.
- 18 KLIER, D. T.; KUMKE, M. U. Analysing the effect of the crystal structure on upconversion luminescence in Yb³⁺, Er³⁺-co-doped NaYF₄ nanomaterials. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 3, n. 42, p. 11228-11238, 2015.
- 19 SUYVER, J. F. et al. Novel materials doped with trivalent lanthanides and transition metal ions showing near-infrared to visible photon upconversion. **Optical Materials**, v. 27, n. 6, p. 1111-1130, 2005.
- 20 XU, C. T. et al. High-resolution fluorescence diffuse optical tomography developed with nonlinear upconverting nanoparticles. **ACS Nano**, v. 6, n. 6, p. 4788-4795, 2012.
- 21 BOYER, J.-C.; VAN VEGGEL, F. C. Absolute quantum yield measurements of colloidal NaYF₄: Er³⁺, Yb³⁺ upconverting nanoparticles. **Nanoscale**, v. 2, n. 8, p. 1417-1419, 2010.
- 22 POLLNAU, M. et al. Power dependence of upconversion luminescence in lanthanide and transition-metal-ion systems. **Physical Review B**, v. 61, n. 5, p. 3337, 2000.
- 23 SONG, F. et al. Three-photon phenomena in the upconversion luminescence of erbium–ytterbium-codoped phosphate glass. **Applied Physics Letters**, v. 79, n. 12, p. 1748-1750, 2001.
- 24 AUZEL, F. Upconversion and anti-stokes processes with f and d ions in solids. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 1, p. 139-174, 2004.
- 25 GAMELIN, D. R.; GÜDEL, H. U. Design of luminescent inorganic materials: new photophysical processes studied by optical spectroscopy. **Accounts of Chemical Research**, v. 33, n. 4, p. 235-242, 2000.
- 26 HEER, S. et al. Highly efficient multicolour upconversion emission in transparent colloids of lanthanide-doped NaYF₄ nanocrystals. **Advanced Materials**, v. 16, n. 23-24, p. 2102-2105, 2004.
- 27 JOUBERT, M.-F. Photon avalanche upconversion in rare earth laser materials. **Optical Materials**, v. 11, n. 2-3, p. 181-203, 1999.
- 28 ROCHA, J. et al. Luminescent multifunctional lanthanides-based metal–organic frameworks. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 2, p. 926-940, 2011.

- 29 LIU, Y. et al. Lanthanide-doped luminescent nanoprobe: controlled synthesis, optical spectroscopy, and bioapplications. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 16, p. 6924-6958, 2013.
- 30 GAINER, C. F.; ROMANOWSKI, M. A Review of synthetic methods for the production of upconverting lanthanide nanoparticles. **Journal of Innovative Optical Health Sciences**, v. 7, n. 2, p. 1330007, 2014.
- 31 WANG, L. et al. Fluorescence resonant energy transfer biosensor based on upconversion-luminescent nanoparticles. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 37, p. 6054-6057, 2005.
- 32 KUMAR, R. et al. Combined optical and MR bioimaging using rare earth ion doped NaYF₄ nanocrystals. **Advanced Functional Materials**, v. 19, n. 6, p. 853-859, 2009.
- 33 RHEE, H.-W. et al. Selective fluorescent chemosensor for the bacterial alarmone (p) ppGpp. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 3, p. 784-785, 2008.
- 34 YANG, L. W. et al. White emission by frequency up-conversion in Yb³⁺-Ho³⁺-Tm³⁺ triply doped hexagonal NaYF₄ nanorods. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 44, p. 18995-18999, 2009.
- 35 PATRA, A. et al. Upconversion in Er³⁺: ZrO₂ nanocrystals. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 106, n. 8, p. 1909-1912, 2002.
- 36 QIAN, H.-S.; ZHANG, Y. Synthesis of hexagonal-phase core-shell NaYF₄ nanocrystals with tunable upconversion fluorescence. **Langmuir**, v. 24, n. 21, p. 12123-12125, 2008.
- 37 BOYER, J.-C. et al. Synthesis of colloidal upconverting NaYF₄ nanocrystals doped with Er³⁺, Yb³⁺ and Tm³⁺, Yb³⁺ via thermal decomposition of lanthanide trifluoroacetate precursors. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 23, p. 7444-7445, 2006.
- 38 WANG, F. et al. Synthesis of polyethylenimine/NaYF₄ nanoparticles with upconversion fluorescence. **Nanotechnology**, v. 17, n. 23, p. 5786, 2006.
- 39 LIU, C.; CHEN, D. Controlled synthesis of hexagon shaped lanthanide-doped LaF₃ nanoplates with multicolor upconversion fluorescence. **Journal of Materials Chemistry**, v. 17, n. 37, p. 3875-3880, 2007.
- 40 JIN, J. et al. Polymer-coated NaYF₄: Yb³⁺, Er³⁺ upconversion nanoparticles for charge-dependent cellular imaging. **ACS Nano**, v. 5, n. 10, p. 7838-7847, 2011.
- 41 YI, G.-S.; CHOW, G.-M. Colloidal LaF₃: Yb, Er, LaF₃: Yb, Ho and LaF₃: Yb, Tm nanocrystals with multicolor upconversion fluorescence. **Journal of Materials Chemistry**, v. 15, n. 41, p. 4460-4464, 2005.
- 42 HEER, S. et al. Blue, green, and red upconversion emission from lanthanide-doped LuPO₄ and YbPO₄ nanocrystals in a transparent colloidal solution. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 42, n. 27, p. 3179-3182, 2003.

- 43 YI, G. et al. Synthesis, characterization, and biological application of size-controlled nanocrystalline NaYF₄: Yb, Er infrared-to-visible up-conversion phosphors. **Nano Letters**, v. 4, n. 11, p. 2191-2196, 2004.
- 44 LI, Z.; ZHANG, Y. Monodisperse silica-coated polyvinylpyrrolidone/NaYF₄ nanocrystals with multicolor upconversion fluorescence emission. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, n. 46, p. 7732-7735, 2006.
- 45 ERATHODIYIL, N.; YING, J. Y. Functionalization of inorganic nanoparticles for bioimaging applications. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 10, p. 925-935, 2011.
- 46 GU, Z. et al. Recent advances in design and fabrication of upconversion nanoparticles and their safe theranostic applications. **Advanced materials**, v. 25, n. 28, p. 3758-3779, 2013.
- 47 SIVAKUMAR, S.; DIAMANTE, P. R.; VAN VEGGEL, F. C. Silica-coated Ln³⁺-doped LaF₃ nanoparticles as robust down-and upconverting biolabels. **Chemistry-A European Journal**, v. 12, n. 22, p. 5878-5884, 2006.
- 48 KONG, W. et al. A General strategy for ligand exchange on upconversion nanoparticles. **Inorganic chemistry**, v. 56, n. 2, p. 872-877, 2017.
- 49 CHEN, Z. et al. Versatile synthesis strategy for carboxylic acid- functionalized upconverting nanophosphors as biological labels. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 10, p. 3023-3029, 2008.
- 50 YI, G.-S.; CHOW, G.-M. Water-soluble NaYF₄: Yb, Er (Tm)/NaYF₄/polymer core/shell/shell nanoparticles with significant enhancement of upconversion fluorescence. **Chemistry of Materials**, v. 19, n. 3, p. 341-343, 2007.
- 51 KAMIMURA, M. et al. Design of poly (ethylene glycol)/streptavidin coimmobilized upconversion nanophosphors and their application to fluorescence biolabeling. **Langmuir**, v. 24, n. 16, p. 8864-8870, 2008.
- 52 YI, G. et al. Synthesis, characterization, and biological application of size-controlled nanocrystalline NaYF₄: Yb, Er infrared-to-visible up-conversion phosphors. **Nano Letters**, v. 4, n. 11, p. 2191-2196, 2004.
- 53 JALIL, R. A.; ZHANG, Y. Biocompatibility of silica coated NaYF₄ upconversion fluorescent nanocrystals. **Biomaterials**, v. 29, n. 30, p. 4122-4128, 2008.
- 54 GAI, S. et al. Synthesis of magnetic, up-conversion luminescent, and mesoporous core-shell-structured nanocomposites as drug carriers. **Advanced Functional Materials**, v. 20, n. 7, p. 1166-1172, 2010.
- 55 WILHELM, S. et al. Multicolor upconversion nanoparticles for protein conjugation. **Theranostics**, v. 3, n. 4, p. 239, 2013.

- 56 SEDLMEIER, A.; GORRIS, H. H. Surface modification and characterization of photon-upconverting nanoparticles for bioanalytical applications. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 6, p. 1526-1560, 2015.
- 57 GORELIKOV, I.; MATSUURA, N. Single-step coating of mesoporous silica on cetyltrimethyl ammonium bromide-capped nanoparticles. **Nano Letters**, v. 8, n. 1, p. 369-373, 2008.
- 58 IDRIS, N. M. et al. In vivo photodynamic therapy using upconversion nanoparticles as remote-controlled nanotransducers. **Nature Medicine**, v. 18, n. 10, p. 1580, 2012.
- 59 RENGIFO-HERRERA, J. A. et al. A Comparison of solar photocatalytic inactivation of waterborne E. coli using Tris (2, 2'-bipyridine) ruthenium (II), Rose Bengal, and TiO₂. **Journal of Solar Energy Engineering**, v. 129, n. 1, p. 135-140, 2007.
- 60 BUCHOVEC, I.; PASKEVICIUTE, E.; LUKSIENE, Z. Photosensitization-based inactivation of food pathogen *Listeria monocytogenes* in vitro and on the surface of packaging material. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 99, n. 1, p. 9-14, 2010.
- 61 STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D.; BRÜCKNER, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v. 54, n. 17, p. 4151-4202, 1998.
- 62 ALMEIDA, R. D. et al. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1704, n. 2, p. 59-86, 2004.
- 63 DEROSA, M. C.; CRUTCHLEY, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 233, p. 351-371, 2002.
- 64 LEANNE B, J. et al. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. **Metal-Based Drugs**, 2008. Doi: 10.1155/2008/276109.
- 65 CHAN, W.-S. et al. Photosensitising activity of phthalocyanine dyes screened against tissue culture cells. **Photochemistry and Photobiology**, v. 45, n. S1, p. 757-761, 1987.
- 66 GULDI, D. M. et al. Influence of large metal cations on the photophysical properties of texaphyrin, a rigid aromatic chromophore. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 34, p. 8289-8298, 2000.
- 67 DARWENT, J. R. et al. Metal phthalocyanines and porphyrins as photosensitizers for reduction of water to hydrogen. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 44, n. 1, p. 83-126, 1982.
- 68 BRASSEUR, N. et al. Water-soluble aluminium phthalocyanine-polymer conjugates for PDT: photodynamic activities and pharmacokinetics in tumour-bearing mice. **British Journal of Cancer**, v. 80, n. 10, p. 1533, 1999.

- 69 BARTHEL, M. et al. An Easy route for the synthesis of new axially substituted titanium (IV) phthalocyanines. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2002, n. 22, p. 3756-3762, 2002.
- 70 GRÜNER, M. C. et al. Axially decorated SiIV-phthalocyanines bearing mannose-or ammonium-conjugated siloxanes: comparative bacterial labelling and photodynamic inactivation. **Photochemistry and Photobiology**, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1111/php.12881>.
- 71 ALLEN, C. M.; SHARMAN, W. M.; VAN LIER, J. E. Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 5, n. 2, p. 161-169, 2001.
- 72 CHEN, X. et al. Accounts of chemical research. **Theranostic Nanomedicine**, v. 44, n. 10, p. 841-841, 2011.
- 73 JOKERST, J. V.; GAMBHIR, S. S. Molecular imaging with theranostic nanoparticles. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 10, p. 1050-1060, 2011.
- 74 MUHR, V. et al. Particle-size-dependent förster resonance energy transfer from upconversion nanoparticles to organic dyes. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 9, p. 4868-4874, 2017.
- 75 DOUGHERTY, T. J. et al. Photodynamic therapy. **JNCI: journal of the national cancer institute**, v. 90, n. 12, p. 889-905, 1998.
- 76 MOAN, J.; BERG, K. The Photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. **Photochemistry and Photobiology**, v. 53, n. 4, p. 549-553, 1991.
- 77 DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 380-387, 2003.
- 78 LIU, J.-N.; BU, W.-B.; SHI, J.-L. Silica coated upconversion nanoparticles: a versatile platform for the development of efficient theranostics. **Accounts of Chemical Research**, v. 48, n. 7, p. 1797-1805, 2015.
- 79 ZHANG, P. et al. Versatile photosensitizers for photodynamic therapy at infrared excitation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 15, p. 4526-4527, 2007.
- 80 QIAN, H. S. et al. Mesoporous-silica-coated up-conversion fluorescent nanoparticles for photodynamic therapy. **Small**, v. 5, n. 20, p. 2285-2290, 2009.
- 81 CHEN, F. et al. A Uniform sub-50 nm-sized magnetic/upconversion fluorescent bimodal imaging agent capable of generating singlet oxygen by using a 980 nm laser. **Chemistry-a European journal**, v. 18, n. 23, p. 7082-7090, 2012.

- 82 ZHAO, Z. et al. Multifunctional core-shell upconverting nanoparticles for imaging and photodynamic therapy of liver cancer cells. **Chemistry – an Asian journal**, v. 7, n. 4, p. 830-837, 2012.
- 83 QIAO, X.-F. et al. Triple-functional core-shell structured upconversion luminescent nanoparticles covalently grafted with photosensitizer for luminescent, magnetic resonance imaging and photodynamic therapy in vitro. **Nanoscale**, v. 4, n. 15, p. 4611-4623, 2012.
- 84 LIU, K. et al. Covalently assembled NIR nanoplatfrom for simultaneous fluorescence imaging and photodynamic therapy of cancer cells. **ACS Nano**, v. 6, n. 5, p. 4054-4062, 2012.
- 85 WANG, C. et al. Near-infrared light induced in vivo photodynamic therapy of cancer based on upconversion nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 26, p. 6145-6154, 2011.
- 86 BOUCHER, H. W.; COREY, G. R. Epidemiology of methicillin-resistant staphylococcus aureus. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. Suppl. 5, p. S344-S349, 2008.
- 87 O'NEILL, J. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. [S.l.:s.n.], 2014. The Review on Antimicrobial Resistance: tackling drug-resistant infections globally.
- 88 METTATH, S.; MUNSON, B. R.; PANDEY, R. K. DNA Interaction and photocleavage properties of porphyrins containing cationic substituents at the peripheral position. **Bioconjugate Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 94-102, 1999.
- 89 WINCKLER, K. D. Special section: focus on anti-microbial photodynamic therapy (PDT). **Journal Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 86, n. 1, p. 43-44, 2006.
- 90 TAVARES, A. et al. Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. **Marine Drugs**, v. 8, n. 1, p. 91-105, 2010.
- 91 GRAM, C. Ueber die isolirte farbung der schizomyceten in schnitt-und trockenpreparaten. **Fortschritte der Medicin**, v. 2, p. 185-189, 1884.
- 92 MAISCH, T. et al. Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 10, p. 907-917, 2004.
- 93 MERCHAT, M. et al. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 32, n. 3, p. 153-157, 1996.
- 94 ASLAM, B. B. et al. Photobactericidal materials based on porphyrins and phthalocyanines. **Journal of Materials Chemistry**, v. 3, n. 3, p. 323-324, 1993.
- 95 BANFI, S. et al. Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: an in vitro study on gram negative and gram positive bacteria. **Journal of photochemistry and photobiology B: biology**, v. 85, n. 1, p. 28-38, 2006.

- 96 YE, Y.; LI, Y.; FANG, F. Upconversion nanoparticles conjugated with curcumin as a photosensitizer to inhibit methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in lung under near infrared light. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 5157, 2014.
- 97 YIN, M. et al. Multifunctional upconverting nanoparticles for near-infrared triggered and synergistic antibacterial resistance therapy. **Chemical Communications**, v. 50, n. 72, p. 10488-10490, 2014.
- 98 WU, M.-C. et al. Graphene-based photothermal agent for rapid and effective killing of bacteria. **ACS Nano**, v. 7, n. 2, p. 1281-1290, 2013.
- 99 TAYLOR, P. W.; STAPLETON, P. D.; LUZIO, J. P. New ways to treat bacterial infections. **Drug Discovery Today**, v. 7, n. 21, p. 1086-1091, 2002.
- 100 IDRIS, N. M. et al. Tracking transplanted cells in live animal using upconversion fluorescent nanoparticles. **Biomaterials**, v. 30, n. 28, p. 5104-5113, 2009.
- 101 LI, C. et al. Upconversion nanoparticles for sensitive and in-depth detection of Cu^{2+} ions. **Nanoscale**, v. 4, n. 19, p. 6065-6071, 2012.
- 102 GRÜNER, M. et al. Selective inactivation of resistant gram-positive pathogens with a light-driven hybrid nanomaterial. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 37, p. 20965-20971, 2015.
- 103 WANG, F. et al. Simultaneous phase and size control of upconversion nanocrystals through lanthanide doping. **Nature**, v. 463, n. 7284, p. 1061, 2010.
- 104 NC.COM. **Bactéria**. Disponível em: <natechertack.com/medicine/id/bactéria.html>. Acesso em: 15 de Junho de 2018.
- 105 ThermoFisher.com. **EDC Chemistry**. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/>. Acesso em: 20 de Junho de 2018.
- 106 JELLEY, Edwin E. Spectral absorption and fluorescence of dyes in the molecular state. **Nature**, v. 138, n. 3502, p. 1009, 1936.
- 107 SCHEIBE, G. Lichtabsorption und Energiefortleitung bei lockeren Komplexen organischer Farbstoffe. **Zeitschrift für Elektrochemie und angewandte physikalische Chemie**, v. 47, n. 1, p. 73-80, 1941.