UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Aldo Aparicio Acosta

**"Síntese e caracterização de nanopartículas de silício para uso
como veiculadores de oligopeptídeos ciclo-RGDfV para tratamento
de câncer"**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**"Síntese e caracterização de nanopartículas de silício para uso como
veiculadores de oligopeptídeos ciclo-RGDfV para tratamento de câncer"**

"Versão corrigida"

Aluno: Aldo Aparicio Acosta

Orientador: Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco

**Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e
Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das
exigências para a obtenção do título de Doutor em
Ciências, Área: QUÍMICA.**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Acosta, Aldo Aparicio

Síntese e caracterização de nanopartículas de silício para uso como veiculadores de oligopeptídeos ciclo-RGDfV para tratamento de câncer. Ribeirão Preto, 2015.

111 f. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Química.

Orientador: Tedesco, Antonio Claudio.

1. Nanopartículas de silício. 2. Fotoluminescência. 3. Nanotecnologia. 4. Eletroporação. 5. Câncer.

Dedico este trabalho aos meus pais Valentin German Aparicio Cerrillo e Amparo Acosta de Aparicio por todo o amor dedicado à família e pelo apoio constante para a realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco pela oportunidade de fazer parte do seu grupo, pela compreensão e pelo esforço para a conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos do laboratório Daniela, Gisele, Gilson, Fernando, Hugo, Leonardo, Patrícia, Andrielle, Olímpia, Graciely, Nayara, Marta, Ítalo, Emanuel e em especial a André e Maryanne, pela oportunidade da convivência agradável, pelo carinho e companheirismo no ambiente de trabalho.

A Eleni pela companhia, compreensão e carinho em todos esses anos da pós-graduação.

A Rodrigo Silva do Laboratório de MEV pela amizade e paciência nas análises das amostras de silício.

Ao pessoal da área de Mecânica e Eletrônica da Oficina de Precisão pela prontidão no serviço.

Aos professores Erenilton P. Oliveira da disciplina de Química de Materiais e Iouri Borissevitch da disciplina de Espectroscopia de Absorção e Fluorescência pelo valioso aprendizado.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado e apoio financeiro.

A Deus pela presença constante em minha vida.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

Acosta, A. A. **“Síntese e caracterização de nanopartículas de silício para uso como veiculadores de oligopeptídeos cyclo-RGDfV para tratamento de câncer”**. 2015. 108 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2015.

Nanopartículas luminescentes de silício poroso (NPSi) foram projetadas e preparadas por métodos de corrosão eletroquímica seguidos de ultrasonicação, em substratos de silício tipo-p, dopados com boro e com resistividades que variam de 10-20 e 1-10 Ωcm em soluções eletrolíticas compostas por ácido fluorídrico (HF) em etanol absoluto ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$). As condições de processamento envolvem a variação da densidade de corrente “**J**”, tempo de anodização “**t**” e o controle da concentração do HF. Técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de absorção UV-Vis, espectroscopia de fluorescência, difração de raios-X e medidas de potencial zeta e tamanho de partícula foram usados para investigar as propriedades morfológicas e ópticas do material resultante. Nanopartículas com diâmetros de até 150 nm foram obtidos após filtração através de filtros de membrana. A oxidação química em soluções de peróxido de hidrogênio e ácido sulfúrico permitiu a obtenção de nanopartículas com emissão de fluorescência na região verde (532 nm), vermelho (630 e 650 nm) e infravermelho próximo (862 e 980 nm) do espectro eletromagnético. A associação de NPSi com RGDfV foi estudada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton (^1H -RMN). Um aumento na distribuição do tamanho e a intensidade de fluorescência foi observado após a funcionalização com RGDfV. Os efeitos citotóxicos do RGDfV e NPSi foram confirmados por ensaios de viabilidade celular pelo método MTT usando células de melanoma murino B16-F10 como modelo biológico. Estudos iniciais de internalização de PcCfAI por eletroporação foram realizados para futuros estudos de transfecção de moléculas de interferência (siRNA).

Palavras chave: Nanopartículas de silício, Fotoluminescência, Nanotecnologia, Eletroporação, Câncer.

ABSTRACT

Acosta, A. A. "**Síntese e caracterização de nanopartículas de silício para uso como veiculadores de oligopeptídeos cyclo-RGDfV para tratamento de câncer**". 2015. 108 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2015.

Luminescent porous silicon nanoparticles (NPSi) were synthesized by electrochemical etching followed by ultra-sonication of 1-10 and 10-20 ohm.cm resistive p-type silicon wafers in electrolytic solutions composed by hydrofluoric acid (HF) in absolute ethanol (C₂H₅OH), by changing current density (*J*), etching time (*t*) and HF concentration. Scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction, dynamic light scattering (DLS), zetasize measurement, UV-Vis absorption spectroscopy and fluorescence spectroscopy were used to investigate the morphological and optical properties of the resulting material. Nanoparticles with diameter up to 150 nm were obtained after filtered through filtration membrane. The chemical oxidation in oxidizing solutions composed by hydrogen peroxide in sulfuric acid allowed the isolation of nanoparticles with fluorescence properties as expected, with emission in green (532 nm), red (630 and 650 nm) and near infrared (862 and 980 nm) region of the electromagnetic spectrum. The association of NPSi with RGDfV was studied by nuclear magnetic resonance spectroscopy (H-NMR). The increase on size distribution and fluorescence intensity was observed after functionalization with RGDfV. The cytotoxicity effects of RGDfV and NPSi was confirmed by MTT assays using B16-F10 melanoma murine cells, as a biological model. Initial studies of internalization PcCIAI by electroporation were performed for future studies of transfection of interfering molecules (siRNA).

Keywords: Porous silicon nanoparticles, Photoluminescence, Nanotechnology, Electroporation, Cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espectro de absorção e de emissão de fotoluminescência de quantum dots de CdSe-ZnS.....	6
Figura 2. Mecanismo de dissolução do silício e formação do silício poroso, proposto por Lehmann e Gösele.....	14
Figura 3. Espectro de absorção infravermelho do silício poroso recém-formado mostrando a presença de grupos Si-H _n	16
Figura 4. Espectro de refletância de estruturas de multicamada de silício poroso.....	19
Figura 5. Esquema representativo da célula dentro de um campo elétrico.....	23
Figura 6. Esquema representativo das formas de pulso de decaimento exponencial (a) e pulso de onda quadrada (b).....	24
Figura 7. Esquema da célula eletroquímica utilizada para obtenção de filmes de silício poroso.....	31
Figura 8. Equipamentos de eletroporação (gerador de pulsos, osciloscópio e placa com eletrodos).....	36
Figura 9. Imagens de MEV de superfície (a) superfície de silício não modificada, (b) superposição de macro, meso e microporos após o processamento eletroquímico.....	42
Figura 10. Imagens de MEV (a) e (b) superfícies que sofreram o efeito do estresse capilar, (c) e (d) filmes de silício poroso homogêneos obtidos eliminando o estresse capilar em c-Si tipo-p, <100> e $\rho=1-10 \Omega.cm$, mostrando a espessura do filme formado.....	43

Figura 11. (a), (b) mostram as imagens de MEV de NPSi obtidos com c-Si tipo-p, <100> e $\rho=1-10 \Omega.cm$	48
Figura 12. Espectro de microanálise de nanopartículas de silício por EDX.....	49
Figura 13. Representação esquemática das células unitárias dos cristalitos de silício (a,b) e estrutura do tipo diamante do silício cristalino (c).....	49
Figura 14. Padrão de difração de raios-X para a determinação do tamanho dos nanocristais de silício poroso obtidas por processo eletroquímico.....	50
Figura 15. Espectros de absorção de soluções aquosas contendo NPSi, obtidos a partir de silício tipo-p com $\rho = 10-20 \Omega.cm$. Faixa de concentração de 120,00 a 84,73 $\mu g/ml$	51
Figura 16. Variação da intensidade de fluorescência em função da concentração de NPSi em água, obtidas a partir de substratos de silício com $\rho = 10-20 \Omega.cm$. $\lambda_{exc} = 230nm$. Faixa de concentração de 120,00 a 71,19 $\mu g/ml$	52
Figura 17. Variação a intensidade de fluorescência em função da concentração de NPSi em água, obtidas a partir de substratos de silício com $\rho = 10-20 \Omega.cm$ e excitadas em 450 nm. Faixa de concentração de 120,00 a 65,26 $\mu g/ml$	52
Figura 18. Espectros de absorção de soluções aquosas de NPSi obtidos a partir de silício tipo-p com $\rho=1-10 \Omega.cm$. Faixa de concentração de 120,00 a 84,73 $\mu g/ml$	54
Figura 19. (a) Espectro de excitação com $\lambda_{em}= 532 nm$. (b) Variação da intensidade de fluorescência em função da concentração de NPSi em água ($\rho = 1-10 \Omega.cm$, $\lambda_{exc} = 230 nm$, faixa de concentração de 120,00 a 84,73 $\mu g/ml$).....	55

Figura 20. (a) Espectro de excitação com $\lambda_{em} = 862$ nm. (b) Espectro de emissão de fluorescência de NPSi obtidas pela excitação em 575 nm. Faixa de concentração de 120,00 a 84,73 $\mu\text{g/ml}$	56
Figura 21. (a) Espectro de excitação com $\lambda_{em} = 980$ nm. (b) Espectro de emissão de fluorescência de NPSi obtidas pela excitação em 655 nm. Faixa de concentração de 120,00 a 84,73 $\mu\text{g/ml}$	57
Figura 22. Distribuição do tamanho de partículas avaliada a cada 15 dias para soluções coloidais de NPSi em água.....	59
Figura 23. Distribuição do índice de polidispersividade, Pdl, em função do tempo avaliada a cada 15 dias para NPSi em água.....	60
Figura 24. Distribuição do potencial Zeta avaliada a cada 15 dias para NPSi em água.....	61
Figura 25. Representação esquemática da superfície da nanopartícula de silício poroso recém-obtido com superfície altamente positiva formando uma dupla camada elétrica com moléculas de água e uma camada difusa com cargas negativas.....	63
Figura 26. Molécula do ciclo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val).....	64
Figura 27. Espectros de fluorescência de nanopartículas de silício poroso funcionalizadas com RGDfV e excitados em 230 nm. As curvas (a) e (b) representam antes e depois da funcionalização, respectivamente.....	66
Figura 28. Espectros de fluorescência de nanopartículas de silício poroso funcionalizadas com RGDfV e excitados em 575 nm. As curvas (a) e (b) representam antes e depois da funcionalização, respectivamente.....	66
Figura 29. Espectros de RMN de NPSi (parte superior), RGDfV (centro) e NPSi-RGDfV (parte inferior).....	68
Figura 30. Espectros de RMN de NPSi (parte superior), RGDfV (centro) e NPSi-RGDfV (parte inferior).....	69

Figura 31. Ensaio de MTT mostrando o efeito da concentração das NPSi na viabilidade celular para um tempo de incubação de 3 horas. CT é o controle só células. Não há, estatisticamente, diferenças em relação ao controle.....71

Figura 32. Ensaio de MTT do efeito da concentração do RGDfV na viabilidade celular para um tempo de incubação de 3 horas. CT é o controle só células e PBS é o tampão no qual os aptâmeors são diluídos. *, *** Diferença estatística comparada ao controle, $p < 0,05$72

Figura 33. Efeitos do RGDfV no crescimento de células de melanoma murino B16-F10. Células de controle não tratadas (a), células tratadas com 10 $\mu\text{g/ml}$ (b) e com 20 $\mu\text{g/ml}$ (c). As células foram incubadas durante 24 horas com o agente inibidor.....73

Figura 34. Ensaio de MTT mostrando o efeito da concentração de NPSi funcionalizadas com RGDfV na viabilidade celular para um tempo de incubação de 3 horas. CT é o controle e PBS é o tampão onde o aptâmero é dissolvido. ** Diferença estatística comparada ao controle, $p < 0,05$74

Figura 35. Ensaio de MTT mostrando o efeito da concentração de NPSi funcionalizadas com RGDfV na viabilidade celular para um tempo de incubação de 24 horas. CT é o controle só células e PBS é o tampão onde o aptâmero é dissolvido. **, *** Diferença estatística comparada ao controle, $p < 0,05$75

Figura 36. Esquema representativo do perfil da seqüência de pulsos de eletroporação.....77

Figura 37. (a) e (c) Espectros de emissão de fluorescência da PcCIAI incorporadas em células B16-F10 nas condições experimentais (A) e (B) respectivamente. (b) e (d) Ensaios de MTT mostrando o efeito do campo elétrico e concentração NEPCIAI na viabilidade celular, realizadas nas condições experimentais (A) e (B), respectivamente, não há, estatisticamente, diferenças em relação ao controle.....80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições de eletroporação.....	38
Tabela 2. Tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial zeta antes e depois do processo de funcionalização.....	67

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ω	Ohms
ρ	Resistividade
(100), <100>	Orientação cristalográfica 100
μA	Microampers
$(\text{Fe})_2\text{SiH}_2$	Difenilsilano
μg	Micrograma
μM	Micromolar
B16-F10	Linhagem celular de melanoma murino
Bi_2S_3	Sulfeto de bismuto
C=C	Grupo cromóforo etileno
C=O	Grupo cromóforo cetona
CDs	Sulfeto de cádmio
CdSe	Seleneto de cádmio
CdSe-ZnS	Quantum dots de seleneto de cádmio
CT, CT1, CT2	Controle
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de cobre penta hidratado
D_2O	Água deuterada
DDS	Drug Delivery Systems (sistemas de veiculação de fármacos)
DLS	Dynamic light scattering (espalhamento de luz dinâmico)
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfoxido
E	Campo elétrico
e^-	Elétron
EDX, EDS	Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy
ETA	Acetato de etila
F^-	Íon fluoreto
Fe_2O_3	Óxido de ferro
GaAs	Arseneto de gálio

GFP	Green fluorescent protein
h^+	Holes, lacunas, buracos, portadores de carga positiva
H^+	Íon de hidrogênio
$H_2\uparrow$	Hidrogênio gasoso
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
H_2SiF_6	Ácido hexafluorossilícico
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
$H_3Si-SiH_3$	Disilano
HBSS	Solução salina balanceada de Hank`s
HF	Ácido fluorídrico
HNO_3	Ácido nítrico
H-RMN	Ressonância magnética nuclear do próton
Hz	Hertz
I	Intensidade de corrente
InAs	Arseneto de índio
J	Densidade de corrente
K_2CrO_4	Cromato de potássio
KHz	Kilohertz
KOH	Hidróxido de potássio
LED	Light Emitting Diode (diodo emissor de luz)
M	Molaridade
mA	Miliampers
MeCN	Acetonitrila
MEMS	Sistemas microeletromecânicos
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg	Miligrama
MHz	Megahertz
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
mV	Milivolts
NaOH	Hidróxido de sódio
NE, NE1, NE2	Nanoemulsão

NE-PcClAl, NEPc1, NEPc2	Nanoemulsão associado à ftalocianina de cloro alumínio
NH ₄ F	Fluoreto de amônio
NH ₄ OH	Hidróxido de amônio
NO ₂	Grupo cromóforo nitro
NPSi	Nanopartículas de silício
OH ⁻	Íon oxidrilo ou hidroxilo
PBS	Solução de tampão fosfato
PcClAl	Ftalocianina de cloro alumínio
Pdi	Índice de polidispersividade
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
PLGA	<i>poly-D,L-lactic-co-glycolic acid</i>
PTFE	Politetrafluoroetileno (Teflon)
PVD	Physical vapor deposition
PVP	N-Vinil-2-pirrolidona
QC	Confinamento quântico
Qds	Quantum dots
RGDfV, cyclo-RGDfV	Cyclo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)
rpm	Revoluções por minuto
SFB	Soro fetal bovino
Si	Silício
Si(OH) ₄	Ácido ortosilícico
SiH ₄	Silano
SiO ₂	Óxido de silício
Si-OH	Silanol
siRNA	Small interfering RNA (moléculas de RNA de interferência)
SP	Silício poroso
t, τ	Tempo
THF	Tetrahidrofurano
V	Voltagem, diferencia de potencial, tensão
V _o	Voltagem inicial
ZnS	Sulfeto de zinco

SUMÁRIO

Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
Lista de figuras.....	viii
Lista de tabelas.....	xii
Lista de siglas e abreviaturas.....	xiii
Sumário.....	xvi
Introdução.....	1
CAPÍTULO I.....	4
REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	4
1.1 Nanomateriais para aplicações biomédicas.....	4
1.1.1 Lipossomas e nanocápsulas.....	4
1.1.2 Nanopartículas magnéticas.....	5
1.1.3 Quantum dots.....	6
1.1.4 Nanotubos de carbono.....	7
1.1.5 Polímeros biocompatíveis.....	9
1.1.6 O silício.....	11
1.1.7 Nanopartículas de silício.....	16
1.2 Funcionalização de NPSi.....	21
1.3 Eletroporação.....	23
CAPÍTULO II.....	26
OBJETIVOS.....	26
CAPÍTULO III.....	27
PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	27
3.1 Materiais e equipamentos.....	27
3.2 Método de obtenção de nanopartículas de silício.....	29
3.2.1 Limpeza e preparação dos substratos de silício monocristalino.....	29
3.2.2 Formação dos filmes de silício poroso.....	31
3.2.3 Oxidação química.....	31
3.2.4 Fragmentação dos filmes de silício poroso por ultrassom.....	31
3.3 Caracterização de nanopartículas de silício poroso.....	32
3.3.1 Espectroscopia de absorção UV-Vis.....	32
3.3.2 Espectroscopia de fluorescência.....	32

3.3.3 Espalhamento de luz dinâmico.....	33
3.3.4 Microscopia eletrônica de varredura.....	33
3.3.5 Difração de raios-X.....	33
3.3.6 Ressonância magnética nuclear.....	34
3.4 Funcionalização de nanopartículas de silício com RGDfV.....	34
3.5 Análises de citotoxicidade <i>in vitro</i> para NPSi, RGDfV e NPSi-RGDfV.....	35
3.6 Métodos para estudos iniciais de eletroporação.....	36
3.6.1 Estabelecimento de parâmetros de eletroporação.....	37
3.6.2 Internalização da PcCIAI por eletroporação e ensaios de MTT.....	38
CAPÍTULO IV.....	40
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1 Obtenção de nanopartículas de silício poroso.....	40
4.2 Caracterização de nanopartículas de silício poroso.....	47
4.2.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	47
4.2.2 Difração de raios-X.....	49
4.2.3 Espectroscopia de Absorção e de Emissão de Fluorescência.....	50
4.2.3.1 NPSi obtidas a partir de silício tipo-p com $\rho = 10\text{-}20 \Omega\cdot\text{cm}$	51
4.2.3.2 NPSi obtidas a partir de silício tipo-p com $\rho = 1\text{-}10 \Omega\cdot\text{cm}$	53
4.2.4 Medida da estabilidade de NPSi em solução aquosa por espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	58
4.3 Funcionalização de nanopartículas de silício com RGDfV.....	63
4.4 Ensaios de citotoxicidade de NPSi, RGDfV e NPSi-RGDfV.....	70
4.4.1 Citotoxicidade de NPSi.....	70
4.4.2 Citotoxicidade do RGDfV.....	71
4.4.3 Citotoxicidade das nanopartículas funcionalizadas (NPSi-RGDfV).....	73
4.5 Estudos iniciais de internalização de PcCIAI por eletroporação.....	76
4.5.1 Parâmetros de eletroporação.....	76
4.5.2 Internalização da PcCIAI e Viabilidade celular.....	78
CONCLUSÕES.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

Introdução

O progresso da nanotecnologia nos últimos anos gerou um grande impacto no campo da pesquisa atual com foco em aplicações biomédicas de novos materiais. O melhoramento no tratamento do câncer e o desenvolvimento de novas formulações para tratamento ou diagnóstico precoce, com efeitos colaterais reduzidos, em comparação com os protocolos clássicos da quimio e radioterapias é também um dos objetivos da nanotecnologia aplicados à saúde. As nanopartículas atuando como sistemas de entrega e liberação controladas, conhecidas como DDS (Drug Delivery Systems), usadas em protocolos de terapia fotodinâmica e já em ensaio clínico em todo o mundo e no Brasil, indicam claramente que a nanotecnologia aplicada ao tratamento de doenças como o câncer e outras doenças não neoplásicas estão sendo intensamente estudados e com excelentes resultados (TEDESCO et al., 2003; SIQUEIRA-MOURA et al., 2010; SIMIONI et al., 2012; PRIMO et al., 2008; MARANHO et al., 2009; FALQUEIRO et al., 2011; BOLFARINI et al., 2014). Os resultados destas aplicações biomédicas são bastante alentadores. Muitas destas aplicações da nanotecnologia à saúde ainda estão longe de atingir o uso prático, mas a intensa pesquisa nesta área aumenta a esperança. Novas aplicações biomédicas em um futuro próximo para o diagnóstico e tratamento (CHOI et al., 2008), são uma realidade.

A indústria farmacêutica tem encontrado alguns problemas relacionados com os processos de produção e melhoramento de protocolos para a obtenção e desenvolvimento de fármacos como produtos comerciais. Muitas moléculas lipofílicas e hidrofílicas não podem ser administradas por via oral ou intranasal devido às suas limitadas propriedades farmacocinéticas tais como absorção, distribuição, efeitos e vias de excreção que são causadas por uma baixa solubilidade dos compostos ativos, dissolução do fármaco no lúmen intestinal, propriedades de permeação restritas no tracto gastrointestinal, bem como o grande metabolismo intestinal e hepático (BRAYDEN, 2003). Além disso, manter o efeito terapêutico em um nível constante (entre as doses tóxicas ou subdoses como classicamente demonstrado pelas injeções e comprimidos) tornou-se um fator importante para controlar a frequência de administração, quando uma liberação do fármaco rápida ou imediata é necessária. Muitos compostos baseados em peptídeos, proteínas e

ácidos nucleicos vêm sendo usados para tratamentos médicos com alta efetividade para uma ampla variedade de doenças tais como falta ou deficiência de proteínas, presença de genes defeituosos e deficiência de genes específicos, etc. Esses tipos de compostos possuem faixas de concentração terapêuticas limitadas entre as doses tóxicas e concentrações terapêuticas na corrente sanguínea, um comportamento clássico na administração de fármacos em geral normalmente usado para esses ativos. Portanto, desafios e esforços na pesquisa para sistemas de veiculação de fármacos com maior especificidade e com liberação controlada, que mantenham a atividade nas doses apropriadas, vêm crescendo nas últimas décadas com o desenvolvimento da nanotecnologia farmacêutica. Ao mesmo tempo há também um grande interesse no estudo e desenvolvimento de agentes de contraste óptico para aplicações *in vivo*, aumentando as propriedades de diagnóstico precoce de algumas substâncias durante o tratamento de algumas patologias, permitindo assim uma rápida e reprodutível quantificação (CHOI et al., 2008; KILPELAINEN et al., 2009). Neste contexto, a nanotecnologia oferece um grande potencial para o desenvolvimento de sistemas de veiculação de fármacos (DDS) com elevada especificidade, minimizando efeitos colaterais devidos à concentração (CHOI et al., 2009; SALONEN et al., 2008).

Desde a descoberta da fotoluminescência em silício poroso (SP) por Canham nos anos 90' (CANHAM, 1990), muitos esforços tanto teóricos como experimentais têm sido realizados como intuito de compreender de forma detalhada o surgimento da fotoluminescência nesse material. O interesse da fotoluminescência tanto em filmes porosos quanto em suspensões coloidais, visa sua aplicação nas diversas áreas da ciência e da tecnologia tais como a optoeletrônica, a nanobiotecnologia e a medicina. A fotoluminescência ultravioleta e visível do silício poroso vem sendo intensamente estudada devido as suas aplicações potenciais em dispositivos biomédicos e fotônicos (WANG et al., 2004; SLOWING et al., 2006; SCHWARTZ et al., 2005; SALONEN et al., 2008; PARK et al., 2009; NAVEAS et al., 2012; LI e RUCKENSTEIN, 2004; DUBEY e GAUTAM, 2011; CUNIN et al., 2002; CANHAM, 1995; BELOMOIN et al., 2002; ANGLIN et al., 2008). A principal característica deste material é sua vasta gama de emissão fotoluminescente, que cobre regiões desde o infravermelho próximo (1100-1500 nm) até o ultravioleta (~350 nm), um

comportamento atribuído aos efeitos de confinamento quântico que ocorrem em nanomateriais de silício poroso(BISI et al., 2000; GHOSH e SHIRAHATA, 2014).

O cyclo-RGDfV é um aptâmero antagonista das integrinas $\alpha v\beta 3$ e foi escolhido como composto modelo por suas excelentes propriedades antitumorais(AGUZZI et al., 2004; AROSIO et al., 2011; BELVISI et al., 2005; CAPELLO et al., 2006; CHATTERJEE et al., 2001; PATEL et al., 2011; TAGA et al., 2002). Essas integrinas são receptores transmembranares que participam na interação entre células e o tecido que o rodeia, com as outras células ou com a matriz extracelular(BROOKS et al., 1994; SEFTOR et al., 1992). As proteínas da matriz extracelular contêm a sequência RGD que reconhece receptores envolvidos nas interações célula-matriz. Peptídeos sintéticos que possuem a sequência RGD na sua estrutura se ligam a esses receptores, inibindo, assim, a adesão celular. A atividade antitumoral de diferentes peptídeos contendo a sequência RGD na sua estrutura também foi testada em estudos e tratamentos clínicos envolvendo glioblastoma multiforme(CHATTERJEE et al., 2000). Os estudos mostraram uma toxicidade mínima e potencial atividade antitumoral desse tipo de peptídeos devido à sua capacidade de se ligar competitivamente com receptores de integrinas $\alpha v\beta 3$ e $\alpha v\beta 5$.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRAFICA

Neste capítulo, abordamos os aspectos mais importantes relacionados à nanomateriais amplamente estudados e suas aplicações no campo da nanotecnologia e nanomedicina. Adicionalmente é apresentada uma revisão sucinta sobre os princípios da eletroporação como técnica de transfecção para estudos *in vitro*.

1.1 Nanomateriais para aplicações biomédicas

O uso de nanomateriais na área biomédica como agentes terapêuticos e de diagnóstico é de grande interesse devido as suas propriedades particulares tais como uma grande capacidade de transportar fármacos em meios biológicos, propriedades magnéticas, propriedades de fotoluminescência ou emissão Raman. Atualmente são desenvolvidos sistemas de fácil preparação com grande capacidade de veiculação de fármacos tais como agentes quimioterápicos, genes, ácidos nucléicos, proteínas e peptídeos para a pesquisa na área biomédica ou para aplicação clínica no tratamento e diagnóstico de doenças graves como deficiência hormonal e câncer (TORCHILIN, 2005). Tais estudos e diagnósticos são realizados por meio de técnicas sofisticadas como imagem por ressonância magnética, fluorescência, espectroscopia Raman, dentre outras. Essas técnicas são usadas aproveitando sistemas de veiculação de fácil captura e eliminação pelo organismo tais como lipossomas, nanocápsulas, nanopartículas magnéticas, nanopartículas de semicondutores, nanotubos de carbono, etc, (TORCHILIN, 2005; GODEFROO et al., 2008; GAO et al., 2004; LEE et al., 2007; LIU et al., 2008; KIM et al., 2007; LARSON et al., 2003; BREMER e WEISSLEDER, 2001), associados a anticorpos específicos ou polímeros protetores que conferem a esses nanomateriais maior especificidade e biocompatibilidade.

1.1.1 Lipossomas e nanocápsulas

O potencial de lipossomas e nanocápsulas como veiculadores de fármacos no uso do tratamento de câncer por terapia fotodinâmica têm mostrado uma boa eficácia. Um exemplo muito bom consiste em formulações de lipossomas e

nanocápsulas contendo baixas concentrações de ftalocianinas de cloro alumínio como DDS. Essas formulações vêm sendo há alguns anos estudadas para avaliar os efeitos fotodinâmicos das mesmas em células de melanoma humano, tendo-se observado efeitos apoptóticos nas células, após a irradiação com luz visível assistida por um laser de baixa energia(BARBUGLI et al., 2010).

Por outro lado, o uso de lipossomas livres e encapsulados com agentes antitumorais e proteínas têm sido estudados *in vivo* para avaliar sua ação farmacocinética e antitumoral em células cancerígenas em modelos de animais, uma vez que enzimas encapsuladas em lipossomas têm mostrado uma menor toxicidade e maior eficácia antitumoral do que as enzimas livres(GABIZON et al., 2012; GASPAR et al., 1996). A capacidade dos lipossomas na veiculação de segmentos de DNA *in vivo* sem a ajuda de agentes de transfecção tem se mostrado também muito eficiente e com baixas toxicidades, avaliadas a partir de resultados de expressão gênica(MATSUURA et al., 2003).

1.1.2 Nanopartículas magnéticas

Outro campo de estudo promissor se baseia nas propriedades de superparamagnetismo de nanopartículas de óxido de ferro conjugadas com anticorpos monoclonais apropriados e associados com elementos paramagnéticos tais como Mn, Ni e Co(LEE et al., 2007), com resultados sensivelmente favoráveis para nanopartículas de ferro dopadas com manganês. Esses sistemas têm sido utilizados em estudos de detecção de tumores por imagem de ressonância magnética.

Nanopartículas de óxido de ferro são usadas atualmente como agentes de contraste de uso clínico(ARTEMOV et al., 2003; GLEICH et al., 2008). Estudos realizados em células de câncer de mama com nanopartículas de ferro disponíveis comercialmente e funcionalizadas com anticorpos de membrana específicos têm demonstrado tratar-se de um excelente agente de contraste. Através do controle do tamanho, cristalinidade, estequiometria e spin magnético das nanopartículas de óxido de ferro funcionalizados com anticorpos específicos, vem sendo testado à aplicabilidade desses sistemas *in vitro* e *in vivo* como agentes de contraste por

imagem para a detecção de células cancerígenas e tumores com uma alta sensibilidade e resolução (ARTEMOV et al., 2003; RAHMER et al., 2012).

1.1.3 Quantum dots

Os pontos quânticos ou quantum dots são estruturas esféricas que apresentam confinamento quântico tridimensional, com um raio maior que o parâmetro de rede do material semiconductor do qual está feito e sendo da ordem do rio de Bohr dos portadores fotoexcitados (REIMANN e MANNINEN, 2002). Os quantum dots podem ser classificados em diferentes tipos baseado na sua composição e na sua estrutura. Eles apresentam um perfil de espectro de absorção amplo e característico, com estreitos picos de emissão de fotoluminescência (BORISSEVITCH et al., 2013; MEDINTZ et al., 2005). Quando compostos do mesmo material, os quantum dots podem emitir luz de quaisquer comprimentos de onda unicamente mudando o tamanho da sua nanopartícula (Figura 1) (MEDINTZ et al., 2005; YOFFE, 2001).

Figura 1. Espectro de absorção e de emissão de fotoluminescência de quantum dots de CdSe-ZnS (MEDINTZ et al., 2005).

Nanopartículas de confinamento ou quantum dots (Qds) de semicondutores tais como CdSe-ZnS, adequadamente funcionalizadas e com propriedades

fotoluminescentes, também são usadas como DDS. Esses Qds recobertos e encapsulados dentro de sistemas protetores e biocompatíveis como o polietilenoglicol (PEG), com capacidade de transportar fármacos associado a biomarcadores específicos, podem ser usados como sondas fluorescentes (GAO et al., 2004). Ao contrário das moléculas orgânicas que geralmente precisam de uma marcação adicional para sua monitoração, os quantum dots apresentam estreitos espectros de emissão de fluorescência, com elevada fotoestabilidade e em uma ampla faixa espectral que cobre regiões desde o visível até o infravermelho próximo. Essas propriedades permitem seu uso para monitoramento por imagem ou métodos espectroscópicos em tempo real e com boa resolução, permitindo assim o reconhecimento de locais específicos nas células e em estudos *in vitro* e *in vivo* (DERFUS et al., 2007; BALLOU et al., 2004; GAO et al., 2004).

Estudos de biodistribuição, toxicidade celular, farmacocinética e absorção não específica foram realizados *in vivo*, pela injeção subcutânea de quantum dots de CdSe-ZnS associado a anticorpos específicos que permitem uma rápida ligação e reconhecimento dos tumores (GAO et al., 2004; LARSON et al., 2003). Os mesmos estudos foram realizados aproveitando as propriedades de retenção e permeação dos tumores para sua detecção por imagem. Embora trabalhos recentes tenham demonstrado a biocompatibilidade de quantum dots de CdSe, ainda existem questões a serem resolvidas em relação à incorporação de metais pesados potencialmente tóxicos dentro dos sistemas vivos (DERFUS et al., 2004; GAO et al., 2004; LARSON et al., 2003).

1.1.4 Nanotubos de carbono

Materiais novos que apresentam longos períodos de permanência no organismo devido processos de retenção pelo sistema mononuclear fagocitário têm sido usados para estudos *in vitro* e *in vivo*. A injeção de formulações contendo nanotubos de carbono em animais de laboratório permitiram a obtenção de dados sobre o tempo de circulação na corrente sanguínea, assim como sua biodistribuição, aproveitando os sinais Raman intrínsecos desse material.

Estudos do sinal Raman na faixa de 1570 a 1620 cm^{-1} , de nanotubos de carbono funcionalizados com moléculas associadas que os tornam solúveis e

biocompatíveis têm sido utilizados em modelos de ratos (estudos *in vivo*) e em células cancerígenas (estudos *in vitro*). Esses nanotubos de carbono mostraram ser eficazes na sua capacidade de veicular fármacos anticâncer e na sua detecção dentro do organismo, mesmo depois de serem eliminados por excreção através da urina e das fezes, com uma distribuição entre vários órgãos após análise de necropsia e histopatologia(LIU et al., 2008; CHERUKURI et al., 2006). Do mesmo modo, foi possível detectar as nanopartículas de carbono em análise de sangue devido à permanência do sinal Raman desse material que mostra ser insensível a determinados tipos de ligações não covalentes e à presença de solventes(FEAZELL et al., 2007; LIU et al., 2008).

Por outro lado, estudos realizados sobre a toxicidade dos nanotubos de carbono em modelos de ratos têm mostrado um comportamento comparável à toxicidade gerada pelo asbesto com uma alta incidência de inflamações e formação de granulomas(WADHWA et al., 2011; POLAND et al., 2008), o que leva a novos estudos com o propósito de torná-los biocompatíveis.

Os nanotubos de carbono, pontos quânticos, nanopartículas de ouro e nanopartículas de sulfeto de bismuto têm demonstrado potencial aplicação para o monitoramento por imagem(DERFUS et al., 2004; GAO et al., 2004; LIU et al., 2008; KIM et al., 2007; BALLOU et al., 2004; RABIN et al., 2006). As propriedades de emissão de fluorescência, Raman, superparamagnetismo, ressonância plasmônica de superfície, elevados coeficientes de absorção de raios-X e longos períodos de circulação deram a estes materiais a vantagem sobre outros agentes de contraste convencionais, como por exemplo, o iodo que é usado em tomografia computadorizada raios-X.

Embora o iodo seja usado amplamente na medicina, ele apresenta desvantagens tais como não especificidade, sinais de curta duração e fácil eliminação pelo organismo através dos rins o que leva a uma relativa toxicidade, limitando, assim, o seu uso prolongado(KRAUSE, 1999). Ao contrário disso, nanopartículas de ouro ou nanopartículas de sulfeto de bismuto funcionalizadas com polímeros biocompatíveis como polietilenoglicol (PEG) e N-Vinil-2-pirrolidona (PVP), por exemplo, têm sido usadas em estudos *in vivo* como excelentes agentes de

contraste(KIM et al., 2007; RABIN et al., 2006). Os resultados desses estudos mostraram maior tempo de permanência na circulação na corrente sanguínea por causa do recobrimento com polímeros biocompatíveis e maior poder de atenuação dos raios-X do que o iodo associado a maior resolução e maior flexibilidade nos diagnósticos por imagem(BALLOU et al., 2004; KIM et al., 2007).

1.1.5 Polímeros biocompatíveis

O uso de polímeros como agentes protetores e biocompatíveis tem diminuído os níveis de absorção não específica e melhorado os tempos de permanência na circulação. Os subprodutos de degradação de algumas formulações é uma preocupação, sendo objeto de intensos estudos(SOENEN et al., 2014; AMBROSONE et al., 2012; RABIN et al., 2006; KRAUSE, 1999).

A capacidade de permeação e filtração dos nanomateriais pelos órgãos do sistema mononuclear fagocitário (fígado, pulmão, baço e rins) depende da sua forma e do seu tamanho. Um dos parâmetros críticos para o desenvolvimento de agentes terapêuticos e de diagnóstico é o tamanho hidrodinâmico dos nanomateriais. A vascularização nos mamíferos apresenta poros com tamanho próximo de 5 nm, assim substâncias com diâmetros < 5.5 nm podem ser facilmente eliminadas do organismo e são consideradas muito pequenas para sua funcionalização com moléculas de maior tamanho. A filtração renal pode reduzir o tempo de permanência dos nanomateriais dentro do organismo reduzindo dessa forma sua ação terapêutica. Ao contrário disso, substâncias com tamanhos na faixa de 20-200 nm são retidas pelo organismo e ocasionam a permanência prolongada dessas substâncias no fluxo sanguíneo(CHOI et al., 2007a; CHOI et al., 2009; PAN et al., 2007; PARK et al., 2009). Esse comportamento tem sido observado em ensaios *in vivo* especialmente pela maior acumulação nos tumores e tecidos doentes, o que tem levado a uma maior atividade farmacológica das formulações e uma melhor resolução no monitoramento por imagem nos tecidos afetados(PARK et al., 2009; CHOI et al., 2007a).

A encapsulação de moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas com polímeros biodegradáveis tem sido usada como uma boa estratégia para aplicações

terapêuticas *in vivo* e em estudos *in vitro*(SOENEN et al., 2014; SENGUPTA et al., 2005; PARK et al., 2009; PAN et al., 2007; KIM et al., 2007; FAROKHZAD et al., 2006). Alguns polímeros biodegradáveis e estáveis em meios biológicos como o PLGA (das siglas em inglês *poly-D,L-lactic-co-glycolic acid*) têm sido aprovados para uso clínico e desenvolvido para veiculação de fármacos.

Nanopartículas de PLGA conjugadas com agentes quimioterápicos e recobertos com um envelope de fosfolipídios foram observados como sendo preferencialmente absorvidos por células e tumores causados por melanoma B16/F10 e câncer de pulmão, onde os agentes terapêuticos são liberados em forma sequencial(SEN GUPTA et al., 2005). Esses polímeros têm sido usados também para aplicações terapêuticas *in vivo* no tratamento de câncer de próstata em modelos animais. Um bom exemplo foi a utilização de nanopartículas formadas de PLGA conjugados com quimioterápicos e aptâmeros que reconhecem antígenos específicos nos domínios extracelulares de células de câncer de próstata. Após uma simples injeção intratumoral das formulações em ratos do tipo “nude”, foram observados elevados níveis de eficácia e baixos níveis de toxicidade comparado com as nanopartículas sem associação com aptâmeros(FAROKHZAD et al., 2006). Esses estudos têm demonstrado o reconhecimento celular, a liberação sequencial e a degradação em produtos inofensivos de nanopartículas funcionalizadas com PLGA associadas a agentes terapêuticos, diminuindo dessa forma os efeitos colaterais devido à absorção não específica(FAROKHZAD et al., 2006; SENGUPTA et al., 2005).

Conforme observado na seção acima, a conjugação da superfície dos nanomateriais com biomarcadores específicos (anticorpos e aptâmeros) ou grupos funcionais adequados leva a uma melhor compreensão do mecanismo de ação *in vivo*. Tendo em vista todas essas estratégias descritas acima, fica claro que o campo da nanobiotecnologia oferece grandes possibilidades para o desenvolvimento de nanomateriais para tratamento e diagnóstico de doenças.

1.1.6 O silício

O silício é o elemento não metálico com propriedades semicondutoras mais abundantes que existe na natureza, ocupando o segundo lugar após o oxigênio e está presente na litosfera em forma de óxido de silício, SiO_2 , fazendo parte da composição de todos os silicatos como o quartzo, areia, granito, feldspatos, zeolitas e argilas (KONDRATYEVA e GOLUBEVA, 2014; GREBENNIKOV, 2014; NARDI et al., 2008). Na forma de dióxido de silício é o componente principal de materiais refratários como vidro, cerâmicas e cimentos.

O silício também é usado na indústria metalúrgica junto com outros elementos como ferro, carbono, manganês, tungstênio, vanádio, níquel e cromo para a obtenção de ligas metálicas de alta dureza, resistentes à tensão, abrasão e corrosão e com novas propriedades (NOVAK et al., 2010; CAVA et al., 2011; BHURE e MAHAPATRO, 2010). É utilizado na indústria química para a fabricação de vários tipos de compostos em forma de polímeros plásticos como silicones, vernizes, lubrificantes, adesivos, etc. (MCLAUGHLIN et al., 2007; BAR-MEIR et al., 2003).

Com propriedades intermediárias entre o carbono e o germânio, desde o início de sua descoberta, tem gerado interesse quanto à sua aplicação no campo tecnológico (CHAPIN et al., 1954; GOETZBERGER e HEBLING, 2000). As diversas propriedades que o silício apresenta, em especial a piezeletricidade e propriedades semicondutoras, deram a esse material o lugar mais importante entre os elementos químicos utilizados na indústria eletrônica. Hoje em dia é impossível pensar o mundo da eletrônica sem o silício, pois devido as suas propriedades semicondutoras é utilizado como componente principal dos circuitos integrados.

São inúmeras as pesquisas realizadas sobre o silício e que se justifica pela enorme quantidade de aplicações na sua forma amorfa, cristalina ou nanoestruturada, especialmente no âmbito da eletrônica e optoeletrônica, na fabricação de células fotovoltaicas para conversão de luz em eletricidade, guias de onda, sensores químicos, sistemas microeletromecânicos (MEMS), filtros ópticos, detectores de radiação fotodiodos, LEDs, lasers e dispositivos baseados em cristais

fotônicos(FENZL et al., 2014; WYLLIE et al., 2004; ARGENTIERI et al., 2011; GONCHAR et al., 2011; FANG et al., 2006; URDANETA et al., 2011).

O silício na forma cristalina ou amorfa não é considerado um material muito interessante para aplicações ópticas, magnéticas ou como material para aplicações biomédicas. No entanto, na sua forma nanoestruturada as propriedades mudam dramaticamente comparado à sua forma compacta e é dessa forma que as aplicações nanotecnológicas surgem de forma ainda mais interessante. O silício nanoestruturado pode ser comparado como uma complexa estrutura esponjosa, devido à presença de uma rede de poros de dimensões micrométricas e nanométricas formada por nanocristais de silício em forma desordenada e interconectados por pontes de silício ou de SiO_2 (dióxido de silício). As propriedades ópticas como o índice de refração e o coeficiente de absorção são menores do que as do silício na sua forma compacta ou cristalina. O silício nanoestruturado, quando obtido de forma controlada, especialmente por processos de corrosão eletroquímicos, leva à formação dos nanocristais de silício, onde os fenômenos de confinamento quântico começam a se manifestar de forma intensa. Assim, o silício nanoestruturado obtido por processos eletroquímicos é conhecido como “Silício Poroso” (SP)(BISI et al., 2000; ACOSTA, A. A., 2009; CANHAM, 1990; CANHAM e SLINGER, 1997; ANGLIN et al., 2008; GRANITZER e RUMPF, 2010).

Os processos eletroquímicos permitem a obtenção de silício poroso em uma reação de anodização da qual faz parte um substrato de silício monocristalino como eletrodo de trabalho e um contraeletrodo de platina, em meio de soluções eletrolíticas formadas por concentrações variáveis de ácido fluorídrico (HF) em solventes orgânicos tais como etanol, metanol, acetonitrila (MeCN), dimetilformamida (DMF), dimetilsulfoxido (DMSO), tetrahidrofurano (THF), N-propanol, dioxano ou acetato de etilo (ETA)(CHAZALVIEL et al., 2000; SUGITA et al., 2013; FOLL et al., 2002; SAFI et al., 2002; KIMURA et al., 2002; GRANITZER e RUMPF, 2010; CANHAM, 1990; BISI et al., 2000). As soluções eletrolíticas são preparadas com soluções aquosas de ácido fluorídrico de 40 a 48% (v/v).

No processo eletroquímico, um fluxo de elétrons proveniente de uma fonte de corrente contínua é forçado a passar através da interface silício-eletrólito com a

formação de pequenas microcavidades distribuídas aleatoriamente os quais vão crescendo em tamanho e profundidade, dependendo da densidade da corrente e o tempo de anodização. Durante a reação, duas lacunas (portadores de carga) do substrato de silício são consumidas provocando, assim, a dissolução de um átomo de silício.

Existem vários modelos de mecanismos que descrevem o processo de dissolução do silício em reações eletroquímicas os quais variam dependendo do tipo de silício, concentração de HF, tipo de solventes orgânicos utilizados, o pH do meio, a presença de sais e agentes oxidantes tais como HNO₃, H₂O₂, NaOH, NH₄OH, KOH, K₂CrO₄ e NH₄F (KOLASINSKI, 2005; KIMURA et al., 2002; SAFI et al., 2002; HUANCA, D. R., 2010). As equações químicas que resumem o processo de formação de poros e a dissolução ou eletropolimento do silício em meio de HF assim como o mecanismo de reação propostos por Lehmann e Gösele (BISI et al., 2000; LEHMANN e GOSELE, 1991) é mostrado a seguir (ver Figura 2):

Onde “ h^+ ” são os portadores de cargas positivas (também conhecidos como holes, buracos ou lacunas), “ e^- ” os elétrons e $\lambda=2$ ou 4 é o número de cargas trocadas durante a reação.

Figura 2. Mecanismo de dissolução do silício e formação do silício poroso, proposto por Lehmann e Gösele (BISI et al., 2000; LEHMANN e GÖSELE, 1991).

As características ópticas e estruturais do silício poroso são influenciadas pela densidade de corrente, concentração de eletrólito, temperatura, tempo de anodização, orientação cristalográfica, resistividade do substrato, iluminação sobre

amostra, processos de enxágüe e secagem(KORDAS et al., 2004; SETZU et al., 1998; AMATO et al., 1996; CULLIS et al., 1997).

Independentemente do tipo de substrato e concentração de HF utilizado na formação do silício poroso (SP), bem como a espessura do filme formado, variam linearmente com a densidade da corrente de anodização. A porosidade varia de forma logarítmica para concentrações de HF inferiores a 15%. Nessas condições, a superfície interna do SP é tão grande que pode alcançar valores de 800 a 1000 m²/cm³ e podem conter uma enorme quantidade de impurezas provenientes dos eletrólitos utilizados no processo de anodização, por causa do contato com o ar do ambiente(BISI et al., 2000).

Em condições experimentais bem controladas, as propriedades ópticas e elétricas são dependentes do conteúdo de impurezas que possam permanecer na superfície do SP. As espécies químicas que mais são encontradas na superfície do SP são carbono, flúor, oxigênio, e hidrogênio. A espécie química frequentemente encontrada em filmes de SP recém-formado é o hidrogênio que aparece como subproduto principal dos processos eletroquímicos onde o HF é utilizado. A superfície do silício poroso é quase completamente coberta por hidrogênio em forma de grupos silano (-Si-H_x onde x=1, 2, 3), os quais permanecem muito tempo antes de serem substituídos pelo oxigênio via processos de oxidação química, térmica, eletroquímica ou por causa do contato com o oxigênio do meio ambiente. Estudos realizados utilizando técnicas de espectroscopia de absorção no infravermelho mostram a presença desses grupos na superfície do SP(BISI et al., 2000; BLEY et al., 1996; OGATA et al., 2000; YZAMBART et al., 2012; ZOUBIR et al., 1995). Um exemplo típico desse tipo de estudo é mostrado na Figura 3, onde as linhas espectrais que correspondem aos grupos O_x-Si-H ao redor de 2200-2250cm⁻¹ e Si-O-Si ao redor de 1650 cm⁻¹ não estão presentes na amostra de silício poroso de 50% de porosidade e 89 µm de espessura.

Figura 3. Espectro de absorção infravermelho do silício poroso recém-formado mostrando a presença de grupos Si-H_n (BISI et al., 2000)

1.1.7 Nanopartículas de silício

O desenvolvimento de novos materiais para aplicações biomédicas é um dos objetivos mais importantes no progresso da nanotecnologia na atualidade. Por exemplo, dispositivos baseados em semicondutores de silício foram usados por muito tempo para aplicações *in vitro*, no entanto, a biocompatibilidade desse tipo de silício tem limitado sua utilização *in vivo* devido principalmente à presença de índio, arsênio e alumínio usados como impurezas na fabricação de silício tipo-p e tipo-n. Especial atenção tem sido dada a esses elementos por causa dos seus efeitos negativos na expressão gênica e na viabilidade de células em estudos *in vitro* e em estudos relacionados aos efeitos de exposição a essas substâncias na manipulação de semicondutores, especialmente quando inalado. Para que os dispositivos desenvolvidos com silício possam ser utilizados como sensores biológicos, sem causar efeitos nocivos, é necessário o uso de embalagens de proteção biocompatíveis que evitam o contato direto com esses elementos traços, de modo especial, o índio e o arsênio, cujos efeitos inflamatórios e carcinogênicos são comprovados (BUSTAMANTE et al., 1997; TANAKA, 2004).

Para aplicações *in vitro* e *in vivo*, as nanopartículas de silício poroso se apresentam como alternativas atrativas em relação aos nanomateriais baseados em metais pesados como cádmio, selênio, prata ou bismuto. Embora seja possível diminuir a toxicidade destes materiais usando coberturas biocompatíveis como nos material a base de ZnS, a toxicidade deles ainda é preocupante como mostram os estudos de citotoxicidade de Derfus e colaboradores (DERFUS et al., 2004). O silício é um elemento traço comumente encontrado no organismo especialmente em tecidos como unhas e cabelos. Ao mesmo tempo, fármacos contendo silício na sua composição são administrados em seres humanos uma vez que o silício degradado sob a forma de ácido ortosilícico, Si(OH)_4 é eficientemente eliminado através dos rins. É por causa de sua baixa toxicidade que este material apresenta vantagens sobre outros tipos de semicondutores, tais como os materiais a base de arseneto de gálio (GaAs) e o arseneto de índio (InAs) que apresentam elevada toxicidade, conforme relatam os estudos de citotoxicidade *in vitro* e *in vivo* (POPPELWELL et al., 1998; DERFUS et al., 2004; BAYLISS et al., 1999).

O silício na sua forma cristalina é um material que domina o mercado da produção de dispositivos eletrônicos de semicondutor devido basicamente à sua abundância como matéria prima, maturidade tecnológica, baixo custo e elevada densidade de integração. Na sua forma nanoestruturada, esse material tem gerado inúmeras aplicações no campo da nanotecnologia e são intensamente estudados, especialmente após a descoberta por Canham e colaboradores em 1990 das propriedades de luminescência e eletroluminescência (CANHAM, 1990) em contraste com nanomateriais baseados em Au, CdSe, CdS, Bi_2S_3 , Fe_2O_3 e nanotubos de carbono. As propriedades surpreendentes do silício, nas quais o mesmo foi catalogado como um material biocompatível, são observadas somente no silício na sua forma porosa. Obtido eletroquimicamente a partir de substratos dopados com elementos não tóxicos como o fósforo e o boro, o silício poroso tem demonstrado consideráveis aplicações biológicas devido as suas propriedades ópticas e a sua biocompatibilidade. A capacidade do silício poroso ser um material não tóxico e servir como uma plataforma para o crescimento de células foi avaliada a partir dados de viabilidade celular em termos de respiração e integridade de membrana segundo trabalhos de Canham e Bayliss (BAYLISS et al., 1999; CANHAM, 1990; CANHAM, 1995).

Recentemente, o uso de nanomateriais à base de silício têm sido testado com o intuito de avaliar sua capacidade no transporte de fármacos, acumulação e degradação *in vitro* e *in vivo* através do monitoramento de sua fluorescência no infravermelho-próximo. Células HeLa e modelos de ratos vêm sendo usados para esses estudos(PARK et al., 2009). Pela injeção intravenosa de formulações contendo nanopartículas de silício, foi observado um acúmulo principalmente em órgãos do sistema mononuclear fagocitário como o fígado e o baço, porém, completamente excretados no intervalo de uma semana a um mês. O mecanismo de eliminação das nanopartículas foi atribuído à degradação em ácido silícico solúvel seguido pela excreção. Do mesmo modo, não foram observados efeitos tóxicos importantes em estudos histopatológicos do fígado, baço e rins em relação ao controle, sugerindo que as nanopartículas de silício poroso são nanomateriais inorgânicos biocompatíveis e não tóxicos(PARK et al., 2009; JAGANATHAN e GODIN, 2012). O efeito na redução da proliferação de células tronco e células cancerígenas, cultivadas sobre superfícies de silício poroso com porosidade em torno 10 a 100 nm, também tem sido estudado(OSMINKINA et al., 2011). Embora os estudos realizados para avaliar a toxicidade desse material tenham mostrado resultados satisfatórios, a avaliação sobre a exposição a grandes concentrações, efeitos da geometria, área superficial e reatividade da superfície da nanopartículas ainda não foram resolvidos(JAGANATHAN e GODIN, 2012; OSMINKINA et al., 2011).

Atualmente, é possível a produção de estruturas fotônicas de dimensões micrométricas com a ajuda de técnicas de fotolitografia ou simples processos de anodização eletroquímicos, nos quais o índice de refração varia sinusoidalmente, resultando em espelhos com alta refletividade e com linha espectral estreita e bem definida, localizada em quaisquer regiões do espectro entre o ultravioleta visível e infravermelho(CUNIN et al., 2002; HUANCA et al., 2008). A qualidade dessas linhas espectrais depende muito dos processos de oxidação, espessura e numero de camadas das estruturas fotônicas, podendo ser mais estreitas do que as obtidas com moléculas ou quantum dots de metais pesados que apresentem espectros mais limitados (ver Figura 4)

Figura 4. Espectro de refletância de estruturas de multicamada de silício poroso (a) (CUNIN et al., 2002) e (b) (HUANCA et al., 2008).

Dessa forma, o silício poroso é o único material até agora conhecido, cujas linhas espectrais podem ser usadas para sua identificação em uma faixa tão grande de comprimento de onda (CUNIN et al., 2002; LEHMANN et al., 2001). A fluorescência e a refletância observada desse tipo de estruturas tem inspirado sua aplicação em dispositivos fotônicos, filtros de luz com características superiores aos filtros convencionais, nanocompósitos, sensores químico-ópticos baseados em quenching da fluorescência, nanopartículas como agentes de contraste por imagem e na veiculação de fármacos, etc. Através do controle dos parâmetros de obtenção, é possível a obtenção de estruturas microporosas, mesoporosas e macroporosas tanto durante sua fabricação quanto depois (SONG e SAILOR, 1999; SCHWARTZ et al., 2005; MATTEI e VALENTINI, 2003). Apesar disso, o silício poroso não permite um fácil controle da distribuição de tamanhos dos poros, apresentando sempre uma superposição de micro, meso e macro estruturas e consequentemente uma ampla distribuição de tamanhos de partículas. Por outro lado, a superfície do silício poroso apresenta uma elevada reatividade que possibilita sua conjugação com uma grande variedade de moléculas com atividade biológica para veiculação até alvos intracelulares.

Dependendo da forma, do tamanho e da reatividade das paredes dos poros os quais podem ser controlados durante sua fabricação, uma grande área superficial específica pode ser obtida com capacidade de adsorção de uma grande quantidade

de substâncias em uma pequena porção da matriz porosa(SONG e SAILOR, 1999; SCHWARTZ et al., 2005; ANGLIN et al., 2008). Através do controle do tamanho dos poros e uma funcionalização adequada da sua superfície, taxas de dissolução e liberação controlada da ordem de 114 a 207 mg/24 h para 23 a 34 % em peso de fármaco adsorvido, respectivamente, podem ser obtidas nos processos de veiculação(HORCAJADA et al., 2004). No entanto, a quantificação dos fármacos associados não é tão simples assim, sendo necessários vários métodos de quantificação diferentes para sua comparação e standardização. Dessa forma, alguns compostos podem ser mais facilmente carregados do que outros, especialmente quando o comportamento da veiculação é afetado pelos grupos funcionais na superfície da nanopartículas (SALONEN et al., 2008; SCHWARTZ et al., 2005).

Após a descoberta da fotoluminescência do silício poroso, nanopartículas de silício foram obtidas por diferentes métodos; alguns deles são propícios para aplicações biológicas e outras no campo da microeletrônica e optoeletrônica. Nanopartículas de silício podem também ser obtidas por processos de decomposição de disilano ($\text{H}_3\text{Si-SiH}_3$) a elevadas temperaturas. Apesar de o processo permitir a obtenção de nanopartículas com elevada intensidade de fluorescência (em 650, 750 e 1000 nm), o rendimento que alcança o processo é inferior a 10 mg de nanopartículas por 24 horas de funcionamento do reator(LITTAU et al., 1993). Processos supercríticos também têm sido usados para a obtenção de nanopartículas de silício com boa qualidade de emissão no UV-Vis a partir de difenilsilano ($(\text{Fe})_2\text{SiH}_2$) a temperaturas de 500 °C e pressões de 345 bar. Porém, o rendimento encontrado no processo não supera os 5 % (< 1,4 mg)(HOLMES et al., 2001). Os métodos de obtenção por plasma, por exemplo, apresentam um alto rendimento de nanopartículas com diâmetros inferiores a 5 nm em poucos milissegundos a partir de precursores como o silano (SiH_4). Entretanto, as propriedades ópticas são muito limitadas, necessitando de uma oxidação térmica adicional para sua otimização(MANGOLINI e KORTSHAGEN, 2007). Outro método de obtenção de nanopartículas de silício com alto rendimento é a pirólise do silano induzida por laser(LI et al., 2003). Como no método de plasma, o método por laser leva à obtenção de uma grande quantidade de nanopartículas de silício (20-200 mg/h), no entanto, com baixa fotoluminescência, e necessidade de processos de oxidação térmica e corrosão com HF para seu melhoramento.

Por outro lado, o processo eletroquímico é um processo de fácil manuseio e de baixo custo que permite a obtenção de nanopartículas de silício com amplo espectro de luminescência a partir de substratos de silício cristalino. Embora o método eletroquímico não seja um método de alto rendimento como os métodos assistidos por laser ou plasma, o mesmo permite um controle dos parâmetros de processo mais facilmente. Pelo controle da densidade de corrente, tempo de anodização e composição das soluções eletrolíticas é possível a obtenção de filmes de silício poroso com espessura definida e opticamente homogêneas a partir dos quais podem ser obtidos nanopartículas com uma faixa de tamanhos definidos e com fotoluminescência intensa(WANG et al., 2004; PARK et al., 2009; KOLASINSKI, 2005; HEINRICH et al., 1992).

1.2 Funcionalização de NPSi

As nanopartículas de silício poroso funcionalizadas são excelentes materiais aptos à veiculação de fármacos até os sítios alvo no interior das células, mas para consegui-lo é importante conhecer o mecanismo de absorção celular dessas nanopartículas funcionalizadas. A funcionalização das superfícies de nanopartículas de silício poroso pode ser obtida diretamente com as moléculas de interesse ou por meio de outras substâncias que servem como pontes para a ancoragem final dos agentes ativos. As estratégias de funcionalização são diversas e dependem muito da natureza molecular dos agentes ativos a serem conjugados.

A criação de grupos funcionais na superfície das nanopartículas tem sido reportada como a via mais efetiva para a ancoragem de agentes de interesse biológico. Tais métodos, em geral, exigem a formação de ligações covalentes entre os grupos funcionais e os agentes ativos. As reações de hidrossililação termicamente assistidas (100-200 °C) ou catalisadas por luz ultravioleta são comumente usadas devido à facilidade de formação de ligações entre grupos funcionais orgânicos como os alquenos e alquinos com a superfície das nanopartículas de silício passivadas com hidrogênio. Reações de hidrossililação foram usadas para a formação de grupos carboxila na superfície de nanopartículas de silício para a conjugação com biomoléculas e também para monitoramento por

imagem, mostrando resultados satisfatórios em relação à preservação da fotoluminescência das nanopartículas(ROGOZHINA et al., 2006).

Por meio de reações de múltiplas etapas que envolvem hidrossililação assistida por luz ultravioleta foram covalentemente ancoradas moléculas de streptavidina em superfícies de nanopartículas de silício(CHOI et al., 2008). Nesses experimentos foi possível a manutenção das propriedades da streptavidina de se ligar a biotina e ao mesmo tempo a preservação da fotoluminescência das nanopartículas no complexo. Usando a mesma estratégia de hidrossililação assistido por luz UV, foram criadas ligações covalentes com diversas moléculas orgânicas e grupos funcionais derivados dos alquenos na superfície de nanopartículas de silício com manutenção da fotoluminescência das nanopartículas(HUA et al., 2005).

Embora os métodos de funcionalização usando reações de hidrossililação tenham mostrado resultados eficientes, pouco se relata sobre a permanência dos resíduos dos agentes de funcionalização na superfície das nanopartículas ou das reações que podem levar à perda da atividade biológica de biomoléculas, especialmente se forem de natureza proteica como enzimas, peptídeos ou ácidos nucléicos. A inativação quando absorvidas, pode ser causada por reações provocadas pela própria superfície da nanopartículas ou por causa dos agentes de funcionalização presentes no meio; eles podem causar a desnaturação, hibridização, quebra de ligações ou substituição de grupos dentro da própria molécula de interesse, como mostram os estudos realizados por Voicu e colaboradores (VOICU et al., 2004; BOUKHERROUB, 2005) para imobilização de DNA e peptídeos sobre superfícies de silício. Ao mesmo tempo, a eficiência de absorção de nanopartículas por células pode ser regulada pelo tipo de agente de funcionalização usado. Alguns favorecem a absorção mais do que outros, especialmente se os agentes de funcionalização são mais hidrofílicos, biocompatíveis e não tóxicos.

Estudos realizados para avaliar o mecanismo e a eficiência de absorção por endocitose de nanopartículas funcionalizadas, por células cancerígenas, mostraram repostas diferentes no processo de absorção e dependem do tipo de agente funcionalizante para um mesmo tipo de nanopartícula(SLOWING et al., 2006). Com o mesmo propósito, foram estudados também o efeito da forma e o tamanho no mecanismo de absorção e distribuição de nanopartículas de sílica e de silício poroso

em células tumorais, usando como estratégia a injeção direta no local do tumor de soluções coloidais dessas substâncias. Esses estudos permitem a criação de métodos para veiculação de fármacos, dependendo dos tipos e formas dos nanomateriais e para determinados tipos de doenças. Para o câncer, por exemplo, é aproveitado o aumento da permeabilidade dos tumores associado a efeitos de retenção onde as nanopartículas podem se acumular(DECUZZI et al., 2010; SLOWING et al., 2006).

1.3 Eletroporação

A eletroporação é uma valiosa e efetiva alternativa comparada com outros métodos de transfecção físicos e químicos(WEAVER e CHIZMADZHEV, 1996). Esta técnica é usada para a introdução de nucleotídeos, DNA e RNA, proteínas, carboidratos, corantes, e partículas virais dentro de células de bactérias, plantas, fungos, e células de animais; sendo esta técnica uma poderosa ferramenta para avaliação da expressão gênica(LAMBREVA et al., 2004; RABUSSAY et al., 2002; TONEGUZZO et al., 1986). Um campo elétrico permeabiliza a membrana celular temporariamente, permitindo assim a absorção de moléculas a partir do meio(MELIKOV et al., 2001; KOTULSKA et al., 2007; SPUGNINI et al., 2007). A Figura 5 mostra um esquema representativo da ação do campo elétrico na célula durante a eletroporação.

Figura 5. Esquema representativo da célula dentro de um campo elétrico. [Fonte: Autoria própria].

Para os estudos *in vitro* e *in vivo*, a técnica de eletroporação permite a escolha dos tipos e formas de onda dos pulsos de corrente e a configuração do

sistema (SPUGNINI et al., 2007; KISHIDA et al., 2004). As formas de onda quadradas e exponenciais permitem ótimas condições de eletroporação para uma grande variedade de células eucarióticas e procarióticas. Ambos os tipos de pulsos de onda quadrada e exponencial são usados efetivamente para a eletroporação e eletrofusão de células. A forma da onda de eletroporação pode ter um efeito significativo na eficiência de transformação para diferentes tipos de células, sendo que uma sequência de pulsos de onda quadrada apresenta melhores resultados do que um único pulso (TRAITCHEVA e BERG, 2010; SPUGNINI et al., 2007; OKAMOTO et al., 1992).

O esquema da Figura 6 (a) e (b) mostra um pulso de corrente com decaimento exponencial e um pulso de onda quadrada, respectivamente. No pulso com decaimento exponencial (Figura 6 (a)), um capacitor carregado até a voltagem V_0 é descarregado dentro das células, cujo valor decai exponencialmente ao longo do tempo. O tempo requerido para que a voltagem inicial atinja o valor V_0/e é referido como um tempo constante, τ , que representa a largura ou duração do pulso, ou seja, o tempo em que as células são submetidas à descarga.

Figura 6. Esquema representativo das formas de pulso de decaimento exponencial (a) e pulso de onda quadrada (b). [Fonte: Autoria própria]

Por outro lado, a Figura 6 (b) mostra o esquema de um pulso de onda quadrada, cuja geração é possível truncando o pulso de um capacitor após sua descarga dentro de uma amostra. Nesse tipo de pulso, a largura do pulso t é o tempo em que as células são submetidas à descarga. Uma pequena queda na voltagem inicial V_0 ocorre em todos os tipos de equipamentos que geram ondas

quadradas e seu valor é conhecido como queda do pulso V_t (medida como uma porcentagem da voltagem inicial)(LIU e BERGAN, 2001).

Baseado nessa descrição, a técnica de eletroporação pode ser usada no campo da nanomedicina como uma ferramenta fundamental para aumentar a eficiência na veiculação e administração de fármacos. Existe um interesse em particular para o uso dessa técnica em estudos de internalização de moléculas de interferência (siRNA) associados a nanopartículas de silício fluorescentes (NPSi). A associação dessas duas substâncias permitirá o monitoramento por imagem da presença das NPSi em ambiente celular, aproveitando as propriedades fotoluminescentes das nanopartículas e ao mesmo tempo permitirá avaliar a redução da proliferação celular causada pelas moléculas de siRNA (cuja atividade está baseada na sua capacidade de supressão da expressão gênica). Nesse sentido, a técnica de eletroporação promete ser um meio eficaz para a internalização das moléculas de interferência em experimentos *in vivo* e *in vitro*.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um sistema veiculador de fármacos desenvolvido a base de nanopartículas de silício poroso fotoluminescentes a serem funcionalizados com aptâmeros do tipo cyclo-RGDfV que apresentam uma atividade antitumoral, focando a sua aplicação em estudos de diagnóstico e tratamento do câncer.

Os objetivos específicos:

- a) Síntese de nanopartículas de silício por métodos eletroquímicos.
- b) Caracterização mediante métodos de espectroscopia de absorção e de emissão de fluorescência, potencial zeta, microscopia eletrônica de varredura, difração de raios-X e ressonância magnética nuclear.
- c) Ensaio de biocompatibilidade *in vitro* pelo método de MTT para nanopartículas de silício poroso (NPSi).
- d) Conjugação das nanopartículas de silício poroso com Cyclo-RGDfV.
- e) Ensaio de citotoxicidade *in vitro* pelo método de MTT para Cyclo-RGDfV.
- f) Ensaio de citotoxicidade *in vitro* pelo método de MTT para NPSi-Cyclo-RGDfV.
- g) Avaliar e definir parâmetros elétricos de eletroporação para internalização de moléculas de PcCIAI (estudos iniciais para transfecção mediadas por nanopartículas de silício associado a moléculas de interferência (siRNA)).

CAPÍTULO III

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

São apresentados abaixo os materiais e métodos mais importantes utilizados durante o desenvolvimento deste trabalho, tanto na etapa de obtenção das nanopartículas quanto na etapa da sua caracterização. Além disso, são apresentadas a descrição em forma detalhada da metodologia de obtenção das NPSi, sua caracterização e sua aplicação em ensaios de citotoxicidade *in vitro*. Também são apresentados os métodos para estudos iniciais de eletroporação, definição de parâmetros elétricos de eletroporação, estudos de internalização de PcCIAI por eletroporação e viabilidade celular pelo método de MTT.

3.1 Materiais e equipamentos

Materiais	Equipamentos
<ul style="list-style-type: none"> • Ácido fluorídrico 40% (p.a., ISO, Sigma-Aldrich) • Ácido sulfúrico 96% (p.a., ISO, Panreac) • Hidróxido de amônio (p.a., J. T. Baker) • Peróxido de hidrogênio 30% (p.a. ISO, Merck) • Etanol absoluto, (p.a., J. T. Baker) • N-Pentano (p.a., J. T. Baker) • Metanol, (p.a., J. T. Baker) • Nitrogênio • Água Milli-Q ($\rho=18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) • Filtro de membrana de $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ (Millipore) • Lâminas de silício monocristalino, tipo-p (Silicon Valley) 	<ul style="list-style-type: none"> • Espectrofotômetro de absorção UV-Vis • Fluorímetro (Fluorolog 3 Jovin Ivon-SPEX) • Espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer da Malvern Instruments) • Célula eletroquímica de PTFE • Fonte de corrente contínua modulável de 10-300 Volts, 4-400 mA e 75 Watts (BIO-RAD PowerPac™ Basic Power Supply) • Eletrodos de platina (fio de platina) • Equipamento de ultrassom (Branson 1510 ultrasonic cleaner 40 KHz) • pH-metro modelo QX1500 PLUS da Qualxtron. • Leitor de microplacas modelo ELISA

<p>Microelectronics, Inc.)</p> <p>$\rho_1=1-10 \Omega.cm$</p> <p>$\rho_2=10-20 \Omega.cm$</p> <ul style="list-style-type: none"> • Linhagem celular metastática B16-F10 C57BL-6J • Cyclo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val) (98% HPLC, ENZO Life Sciences), • Dimetilsulfóxido (DMSO), (p.a., J. T. Baker) • Solução Tampão fosfato pH=7,21 • Solução de sulfato de cobre 0,5 M ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$ puriss. p.a. Sigma-Aldrich); • Meio de cultura celular RPMI 1640 com red fenol (Gibco-Invitrogen); • Meio de cultura celular RPMI 1640 sem fenol (Gibco-Invitrogen); • Soro fetal bovino (Sigma-Aldrich); • Solução salina balanceada de Hank's (HBSS, Sigma-Aldrich). • Solução de Anfoterecina (Gibco-Invitrogen); • Solução de antibiótico penicilina e estreptomicina (Gibco-Invitrogen); • Solução de Tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich); • Solução de nanoemulsão (NE) 5 μM; <p>Solução de nanoemulsão associado a ftalocianina (NE-PcClAl) 5 μM;</p>	<p>VERSAmax (Molecular Devices) e Safire² (TECAN)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Software de processamento de dados "Igor pro 6 da WaveMetrics • Software estatístico "Prisma 3.0" • Microscópio eletrônico de varredura (ZEISS EVO 50) • Difratorômetro de raios-X • Espectrômetro de RMN-H • Sputter Coater baltec SCD-500 para deposição física de ouro. • Fonte de corrente continua pulsada de onda quadrada (sistema de estimulação epidérmica modelo TriaSystem); • Osciloscópio digital de dois canais modelo Tektronix TDS340A de 100 MHz; • Circuito de 24 eletrodos de Pt para placas de cultura de 24 poços;
---	--

3.2 Método de obtenção de nanopartículas de silício

O processo experimental para a obtenção de nanopartículas de silício poroso envolve quatro etapas fundamentais: (1) Limpeza inicial dos substratos de silício, (2) Formação dos filmes de silício poroso, (3) Oxidação química e (4) Fragmentação dos filmes de silício poroso por ultrassom. Cada etapa envolve um controle rigoroso dos parâmetros de processamento, cujos padrões estão dentro dos limites aceitáveis da tecnologia do silício ((Sailor, 2012); REINHARDT e WERNER, 2008; GRANITZER e RUMPF, 2010; ACOSTA, A. A., 2009). Os detalhes de cada etapa serão mostrados a seguir.

3.2.1 Limpeza e preparação dos substratos de silício monocristalino

A formação de filmes porosos em superfícies de silício monocristalino requer como condição indispensável à limpeza inicial da superfície desse material seguindo procedimentos que obedecem a critérios bem estabelecidos pela indústria dos semicondutores (QIN e LI, 2003; (VIRGINIA SEMICONDUCTOR, 2003); REINHARDT e WERNER, 2008; KERN, 1990). Cada etapa no processo de limpeza foi adaptada para atender a nossa necessidade em particular e não foi necessário o uso de ambientes com atmosfera controlada. As etapas são sucintamente mostradas a seguir:

- Lavar o substrato de silício durante 20 minutos em uma mistura de ácido sulfúrico (H_2SO_4) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na proporção de 3:1 (v/v) a 110 °C;
- Enxaguar várias vezes com água Milli-Q ($\rho = 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$);
- Deixar o substrato de silício mergulhado em água Milli-Q durante 15 min;
- Enxaguar com jato de água Milli-Q durante 5 min;
- Lavar durante 15 minutos em uma mistura de água milli-Q, hidróxido de amônio (NH_4OH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na proporção de 5:1:1 (v/v/v), respectivamente a 75 °C;
- Enxaguar várias vezes com água Milli-Q;
- Deixar o substrato de silício mergulhado em água Milli-Q durante 15 min;
- Enxaguar com jato de água Milli-Q durante 5 min;

- Lavar em solução de ácido fluorídrico (HF) 40 % e água na proporção de 1:1 (v/v) para a remoção do dióxido de silício (SiO_2) formado no processo.
- Enxaguar várias vezes com água Milli-Q;
- Deixar o substrato de silício mergulhado em água Milli-Q durante 15 min;
- Enxaguar com jato de água Milli-Q durante 5 min;
- Secar com jatos de nitrogênio gasoso.

Após esse processo, as lâminas de silício estão prontas para serem montadas na célula eletroquímica.

3.2.2 Formação dos filmes de silício poroso

Nesta etapa tem-se a obtenção de filmes de silício poroso a partir de substratos de silício cristalino, previamente, limpos. Para isso, dois lotes de lâminas de silício tipo-p dopados com Boro, com resistividades de 1-10 e 10-20 Ωcm e orientação cristalográfica (100), adquiridas da Silicon Valley Microelectronics, Inc., USA, foram montadas em célula eletroquímica, conforme mostrado no esquema da Figura 7. A célula eletroquímica foi usinada, na oficina de precisão da FFCLRP-USP, em material de PTFE (Teflon) e baseado num desenho que atende às necessidades experimentais. Uma vez montadas, as lâminas de silício foram submetidas a processo de anodização, usando como eletrólito uma solução aquosa de HF 40 % em etanol absoluto na proporção de 1:3 (v/v), com densidade de corrente $J = 78,53 \text{ mA/cm}^2$ ($I=150\text{mA}$), durante três horas. Os filmes porosos formados no processo de anodização foram lavados primeiro com etanol anidro e segundo com uma mistura de etanol e água na proporção de 1:1 (v/v) repetidas vezes até a completa eliminação de resíduos de HF. Na sequência foram mergulhados em água Milli-Q durante 1 hora para a total eliminação de possíveis resíduos de HF e etanol que ficam aderidos na estrutura porosa devido aos fenômenos de capilaridade. Ao término do processo, as lâminas estão prontas para a oxidação química.

Célula eletroquímica para obter PSi

Figura 7. Esquema da célula eletroquímica utilizada para obtenção de filmes de silício poroso.

3.2.3 Oxidação química

A oxidação dos substratos de silício poroso é feito em uma solução de H_2SO_4 de 98 % e H_2O_2 de 30 % na proporção de 1:3 (v/v) a 110 °C durante 30 minutos. Após esse processo, os substratos são esfriados até a temperatura ambiente, lavados e enxaguados com água Mili-Q até a completa eliminação de resíduos de ácido sulfúrico. Logo após são mergulhados em água Milli-Q durante 30 minutos e enxaguados mais uma vez. Ao término desta etapa, os substratos de silício poroso estão prontos para serem submetidos à ação do ultrassom, durante 3 horas consecutivas num equipamento de ultrassom de 40 KHz modelo Branson 1510 da Branson®.

3.2.4 Fragmentação dos filmes de silício poroso por ultrassom

A obtenção das nanopartículas propriamente ditas a partir dos filmes de silício poroso envolve processos de fratura mecânica, sendo que o processo ultrassônico é

o mais apropriado para nosso caso, pois permite a obtenção de nanopartículas de alta pureza. Os filmes de silício poroso foram sonicados durante 3 horas consecutivas num equipamento de ultrassom de 40 KHz modelo Branson 1510 da Branson®®, seguidos de procedimentos de centrifugação a 3000 rpm durante 20 min e enxágue com água Milli-Q. Esta operação de centrifugação e enxágue se repete por três vezes consecutivas para garantir a eliminação de possíveis formas solúveis do SiO₂. Finalmente é filtrado através de filtros de membrana (Millipore) com diâmetro de poro de 0,22 µm para a eliminação de partículas macroscópicas. A suspensão coloidal resultante é armazenada durante uma semana para a total ativação da fotoluminescência das nanopartículas.

3.3 Caracterização de nanopartículas de silício poroso

3.3.1 Espectroscopia de absorção UV-Vis

A caracterização das nanopartículas de silício poroso foi realizada inicialmente por espectroscópica de absorção. Para as isso foram usados 3 ml de uma solução coloidal com densidade de 1.2 mg/ml de nanopartículas de silício poroso. Os espectros de absorção foram obtidos usando um espectrômetro UV-Vis modelo Perkin Elmer UV-Vis Lambda 20 de feixe duplo na faixa de 190-820 nm.

3.3.2 Espectroscopia de fluorescência

As amostras foram então analisadas por espectroscopia de fluorescência em um fluorímetro modelo Fluorolog 3 Jovin Ivon-SPEX com sensibilidade na faixa de 190-1000 nm, com fonte de excitação de lâmpada de xenônio de 450 Watts, através de uma abertura de 10 nm. As amostras foram excitadas em 230, 450, 575 e 655 nm com emissões em 532 e 630nm, 650 nm, 862 nm e 980 nm, respectivamente. As medidas de fluorescência e absorbância foram realizadas usando cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico a 25 °C. Os dados obtidos das medições de absorbância e fluorescência foram analisados usando o software “**Igor pro 6**” da WaveMetrics.

3.3.3 Espalhamento de luz dinâmico

Usando-se a técnica de espalhamento de luz dinâmico foi possível determinar também o tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersividade (Pdl) e potencial Zeta das nanopartículas. Para isso foi usado um equipamento de DLS modelo “ZetaSizer da Malvern Instruments”. Para as medições de potencial Zeta e tamanho de partícula foi usada uma cubeta capilar de poliestireno e uma cubeta de poliestireno de 1 cm de caminho óptico respectivamente. Para as medições foram usadas 1 ml de suspensão coloidal com densidade de 1.2 mg/ml a 25 °C.

3.3.4 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia das nanopartículas e a característica estrutural dos filmes de silício poroso foram analisadas usando técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), em um equipamento modelo “SEM Carl Zeiss AG-EVO® Series 50” no modo de detecção de elétrons secundários. As nanopartículas foram depositadas em suportes de alumínio e em lâminas de silício cristalino por evaporação a partir de suspensões coloidais em uma estufa a temperatura de 50°C. Tanto os substratos de silício poroso quanto as nanopartículas foram recobertos com uma fina camada de ouro em um equipamento de deposição física de vapor (PVD) Sputter Coater baltec SCD 500 durante 100 s, para melhorar a condutividade elétrica do silício. A composição elementar das nanopartículas de silício poroso também foi analisada, usando o MEV, pela técnica de EDS (Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy).

3.3.5 Difração de raios-X

A determinação do tamanho dos nanocristais de silício foi realizada usando difração de raios-X em um difratômetro de raios-X D5005X-Bruker AXS do laboratório multiusuário do Departamento de Química da FFCLRP-USP a temperatura de 25°C, ângulo de incidência de 2θ e variação de 20° até 70°, incremento de 0,020° e tempo de integração de 1s. As análises foram realizadas pelo método do pó, para o qual as suspensões coloidais foram evaporadas até obter as nanopartículas em fase sólida. A determinação do tamanho dos nanocristais a

partir dos difratogramas foi possível usando a fórmula de Scherrer, descrito por Cullity e Patterson (Cullity, 1978) (PATTERSON, 1939)

$$\tau = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta}$$

Onde τ é o tamanho médio dos nanocristais, $K \sim 1,00$ é uma constante adimensional que varia com a forma real do nanocristal, λ é o comprimento de onda do raio-X incidente, β é a linha de ampliação na metade da intensidade máxima e θ é o ângulo de Bragg.

3.3.6 Ressonância magnética nuclear

Para a determinação de quais espécies químicas estão presentes na superfície das nanopartículas de silício, foram realizados estudos de espectroscopia de ressonância magnética nuclear do próton (H-RMN) usando um equipamento modelo Bruker de 500 e 300 MHz do laboratório multiusuário do Departamento de Química da FFCLRP-USP. Para isso foram usadas amostras de 450 μ L de soluções coloidais de nanopartículas de silício na presença de água deuterada (D_2O). Por outro lado, após a funcionalização das nanopartículas com RGDfV foram realizadas também medições por ressonância magnética para determinar o grau de interação entre eles, através da interpretação das possíveis substituições ou deslocamentos de grupos orgânicos da molécula de RGDfV. Do mesmo modo, as medições de ressonância das nanopartículas funcionalizadas foram realizadas em meio de D_2O .

3.4 Funcionalização de nanopartículas de silício com RGDfV

As nanopartículas de silício foram funcionalizadas com o agente inibidor de adesão celular RGDfV (ENZO Life Sciences), misturando soluções aquosas de nanopartículas de silício recém obtidas com soluções de RGDfV em tampão fosfato (PBS) com pH 7,21 a 25 °C, iluminadas com luz UV de 354 nm durante 20 min para favorecer possíveis reações catalíticas e sendo a mistura a seguir incubada por 24 horas para permitir a quimissorção e fisissorção das moléculas. Durante este processo e depois de incubadas as amostras foram armazenadas em frasco escuro para evitar a interação com a luz.

3.5 Análises de citotoxicidade *in vitro* para NPSi, RGDfV e NPSi-RGDfV

A citotoxicidade das nanopartículas de silício, do agente inibidor RGDfV e a associação das duas substâncias foram avaliadas usando o ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Chemicom)(MOSMANN, 1983). Para esses experimentos de citotoxicidade que envolvem RGDfV e nanopartículas de silício, uma linhagem celular metastática de melanoma murino B16-F10 provenientes de camundongos C57BL-6J foram descongeladas e cultivadas em meio de RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal bovino (SFB), 250 µl de anfotericina e 1000 µl de penicilina e mantidos a 37 °C com 5 % CO₂ em ar em uma incubadora umidificada. O ensaio de citotoxicidade usando RGDfV em células B16-F10 foi usado como um modelo de teste para avaliar a capacidade de inibição do crescimento celular com base na sua especificidade por integrinas $\alpha\beta 3$. Depois de crescidas as células foram repicadas e cultivadas usando como meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal bovino (FBS), 250 µl de anfotericina e 1000 µl de penicilina e mantidos a 37 °C com 5 % CO₂ em ar em uma incubadora umidificada. Após os dois processos prévios, as células ficaram prontas para serem usadas nos experimentos. Uma densidade inicial de 1×10^4 células/poço foram adicionadas em placas de cultura de 96 poços para os ensaios de citotoxicidade antes de adicionar as nanopartículas e o RGDfV. O sistema foi mantido a 37 °C em uma incubadora umidificada e oxigenada com ar ao 5 % de CO₂ durante 24 horas. Depois disso o meio foi retirado e substituído por soluções de nanopartículas e RGDfV separadamente, em uma faixa de concentrações de 1-20 µg/ml e incubadas novamente durante 3 horas na ausência de luz. Passadas as 3 horas, o meio de cultura foi retirado e as células foram enxaguadas com uma solução salina balanceada de Hank's (HBSS) para seguidamente adicionarmos uma nova solução de RPMI 1640 suplementada com 10 % de FBS, 250 µl anfotericina e 1000 µl de penicilina e submetidas a um período de incubação adicional de 24 horas. Passado esse tempo, o meio de cultura foi removido e foi adicionado imediatamente 30 µl de uma solução de 5 mg/ml de MTT, 170 µl de RPMI sem fenol red, incubado-se o sistema por mais 4 horas. Depois das 4 horas o meio foi removido e adicionado 200 µl de álcool isopropílico a cada poço e mantido durante 2 horas em ausência de luz e em temperatura ambiente para

facilitar a solubilização dos cristais de formazam. Finalmente, depois de uma ligeira agitação das soluções nas placas, as absorbâncias de cada poço foram lidas em 560 nm descontando-se a absorbância basal de 690 nm, numa leitora de placa do tipo ELISA marca VERSAmax da Molecular Devices e Safire² da TECAN. O software estatístico “Prisma 3.0” para Windows foi usado para a análise dos dados coletados.

3.6 Métodos para estudos iniciais de eletroporação

O intuito desta etapa experimental foi avaliar a eficiência de incorporação por eletroporação de moléculas de ftalocianina de cloro alumínio (PcCIAI) em linhagem celular de melanoma murino B16-F10. Utilizando o sistema de eletroporação mostrado na Figura 8, foi possível avaliar tanto o comportamento da eletroporação quanto a viabilidade celular num único experimento.

Figura 8. Equipamentos de eletroporação (gerador de pulsos, osciloscópio e placa com eletrodos). [Fonte: Autoria própria].

Os resultados desta técnica foram avaliadas analisando as curvas de emissão de fluorescência da PcCIAI e a viabilidade celular pelo método de MTT com e sem eletroporação. Utilizando formulações de nanoemulsão associada à PcCIAI foi

elaborado um método experimental que compreende grupos de controle (CT), nanoemulsão (NE) e nanoemulsão associada a ftalocianina (NE-PcCIAs) as quais foram submetidos à ação de um campo elétrico gerado por uma sequência de pulsos de corrente elétrica. O sistema de eletroporação é composto por um circuito de 24 eletrodos montados em série, uma fonte de corrente contínua pulsada com inversão de polaridade e um osciloscópio para o monitoramento dos pulsos de corrente aplicados. Os pulsos elétricos aplicados na eletroporação foram fornecidos pelo sistema de estimulação epidérmica TriaSystem. Este gerador de pulsos foi adaptado ao experimento com a finalidade de aplicar de uma vez só uma seqüência de pulsos de corrente de onda quadrada com duração de 50 ms cada uma em uma placa de cultura de células de 24 poços. Os pulsos de corrente são descarregados nas células através dos eletrodos nas placas de cultura. Dessa forma cada poço na placa de cultura funciona como uma cubeta de eletroporação composta de dois eletrodos separados a uma distância de 1 cm.

3.6.1 Estabelecimento de parâmetros de eletroporação

A eficiência de funcionamento do sistema de eletroporação foi inicialmente testada monitorando as características elétricas em termos de quantidade de carga elétrica que atravessa a solução (intensidade de corrente, I), diferença de potencial (V), campo elétrico (E), frequência de pulsos e tempo de duração dos pulsos de corrente. Para a avaliação do funcionamento do sistema foi inicialmente usado uma solução de sulfato de cobre 0,5 M distribuídos numa placa de cultura de 24 poços, sendo que cada poço representa uma cubeta de eletroporação individual. A solução de CuSO_4 , cuja condutividade elétrica é garantida, permitiu avaliar a variação do perfil da seqüência de pulos e a diminuição da diferença de potencial e campo elétrico no sistema todo. Os mesmos parâmetros elétricos também foram avaliados inicialmente usando como soluções de teste, meio de cultura de células RPMI 1640 suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB), 250 μL de anfotericina e 1000 μL de penicilina, com a finalidade de estabelecer os valores de corrente, frequência de pulso e tempo mais apropriados para a execução dos experimentos *in vitro*.

Para os testes de simulação foram selecionados valores de intensidade de corrente e frequência dentro de uma faixa de 4,0 a 500,00 μA e 0,5 a 500,00 Hz, respectivamente. O mesmo equipamento permitiu também configurar o tempo de duração da sequência de pulsos (tempo de eletroporação). Após a realização dos testes de simulação, foram estabelecidas duas condições experimentais, as quais foram resumidas na tabela 1. Após os testes de simulação foram estabelecidas duas condições experimentais (A e B) para a avaliação da técnica de eletroporação usada. Estas se resumem em (A) intensidade de corrente $I = 500 \mu\text{A}$, diferença de potencial $V = 31,00 \text{ Volts}$, frequência de pulsos $F = 10 \text{ Hz}$ e tempo $t = 10 \text{ min}$; e (B) intensidade de corrente $I = 100 \mu\text{A}$, diferença de potencial $V = 16,33 \text{ Volts}$, frequência de pulsos $F = 10 \text{ Hz}$ e tempo $t = 10 \text{ min}$. Os valores de voltagem foram obtidos a partir dos picos máximos da cada pulso, observadas no osciloscópio. As condições experimentais estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições de eletroporação

Condições de eletroporação	Intensidade de corrente (μA)	Diferença de potencial (Volts)	Frequência (Hz)	Tempo (min)
A	500	31,00	10	10
B	100	16,33	10	10

3.6.2 Internalização da PcCIAI por eletroporação e ensaios de MTT

Os estudos de viabilidade celular foram avaliados pelo método de MTT, através da avaliação da morte celular causada pela intensidade de campo elétrico aplicado e pela presença de PcCIAI incorporada nas células. Para esse experimento, uma linhagem celular metastática de melanoma murino B16-F10 provenientes de camundongos C57BL-6J foi cultivada em meio de RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal bovino (SFB), 250 μl de anfotericina e 1000 μl de penicilina e mantida a 37 °C com 5 % CO_2 em ar em uma incubadora umidificada. Uma densidade inicial de 1×10^5 células/poço foram adicionadas em triplicata em placas de cultura de 24 poços para o ensaio antes de adicionar as formulações e antes de realizar a eletroporação. O sistema foi mantido a 37 °C em uma incubadora umidificada e oxigenada com ar e 5 % de CO_2 durante 24 horas. Depois disso, o meio foi retirado e substituído por soluções de 5 μM de nanoemulsão (NE) e 5 μM de NE-PcCIAI por separado e em seguida realizado a

eletroporação. Após a eletroporação, as células foram incubadas novamente durante 3 horas na ausência de luz. Passadas as 3 horas, o meio de cultura foi retirado e as células foram enxaguadas com uma solução salina balanceada de Hank's (HBSS) para seguidamente adicionarmos uma nova solução de RPMI 1640 sem fenol e realizar as medidas de fluorescência numa leitora de placas do tipo ELISA, marca Safire² da TECAN. Depois disso, o RPMI 1640 sem fenol foi retirado e substituído com meio RPMI 1640 com fenol red suplementada com 10 % de FBS, 250 µl anfotericina e 1000 µl de penicilina e submetidas a um período de incubação adicional de 24 horas. Passado esse tempo, o meio de cultura foi removido e foi adicionado imediatamente 80 µl de uma solução de 5 mg/ml de MTT, 420 µl de RPMI sem fenol red, incubado-se o sistema por mais 4 horas. Depois das 4 horas, o meio foi removido e adicionado 500 µl de álcool isopropílico a cada poço e mantido durante 2 horas na ausência de luz a temperatura ambiente para facilitar a solubilização dos cristais de formazan. Finalmente, depois de uma ligeira agitação das soluções nas placas, as absorbâncias de cada poço foram lidas em 560 nm descontando-se a absorbância basal de 690 nm, numa leitora de placa do tipo ELISA marca Safire² da TECAN. O software estatístico "Prisma 3.0" para Windows foi usado para a análise dos dados coletados.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão apresentados os resultados experimentais e as discussões obtidas durante o desenvolvimento deste trabalho. Primeiramente, serão discutidos e analisados os resultados referentes ao estudo dos efeitos da densidade de corrente e concentração do eletrólito na formação dos filmes porosos. Em seguida, serão apresentadas as principais contribuições destes estudos para o trabalho, no qual é discutido o mecanismo de obtenção de NPSi fluorescentes a partir de substratos de silício cristalino de baixa resistividade, com o uso de uma fonte de corrente constante, fornecida por um sistema PowerPact™ Basic da BIORAD. Logo adiante, serão apresentados e analisados os resultados dos processos de caracterização das NPSi. Depois serão apresentados e analisados os resultados de citotoxicidade das NPSi e do RGDfV. Por último, serão apresentados os resultados experimentais dos estudos iniciais de internalização da PcCIAI por eletroporação e seus efeitos sobre a viabilidade celular, como um estudo inicial para a transfecção de moléculas de interferência.

4.1 Obtenção de nanopartículas de silício poroso

Para a obtenção de nanopartículas de silício a partir de filmes de silício poroso foi usado o método eletroquímico, uma vez que permite fácil controle dos parâmetros de processamento como a densidade de corrente, tempo de anodização e concentração das soluções eletrolíticas. Além disso, este é um processo de baixo custo que permite fácil escalonamento na produção de filmes de silício porosos opticamente ativos. As propriedades ópticas do silício poroso são mantidas unicamente sob condições estritas de limpeza, conforme descrito no item 3.2.1, pag. 28. Procedimentos estritos de limpeza são de uso frequente na indústria dos semicondutores, sendo sua importância descrita por vários autores. A presença de contaminantes pode causar efeitos indesejados na obtenção de filmes porosos de boa qualidade e consequentemente nas propriedades ópticas das futuras nanopartículas. A célula eletroquímica foi montada com os substratos de silício previamente limpos segundo o procedimento de limpeza descrito anteriormente na

seção 2.2.1. Um procedimento indispensável nesta etapa foi a limpeza final do substrato com uma solução de HF/H₂O na proporção de 1:1, antes de colocá-lo dentro da célula eletroquímica. Esse procedimento garante um bom contato ôhmico entre o eletrodo de platina e o substrato de silício e entre o substrato de silício e a solução eletrolítica. A etapa de montagem não pode demorar muito em ambiente atmosférico, pois a superfície das lâminas de silício lavadas com HF são muito reativas e são susceptíveis à contaminação imediata pelo oxigênio do ar e especialmente pela poeira. Após a montagem, as amostras de silício poroso foram obtidas na ausência da luz pelo fato de os substratos de silício usados ser do tipo-p e não possuir portadores de carga positiva ou buracos promovidos pela absorção de luz (BISI et al., 2000).

Usando substratos de silício monocristalino tipo-p, com orientação cristalográfica <100> e duas faixas de resistividade diferentes (1-10 e 10-20 $\Omega\cdot\text{cm}$), foram obtidos filmes de silício poroso com uma distribuição de tamanho de poro variável desde microporos ($\leq 2\text{nm}$) a mesoporos (2-50nm), em conformidade com a classificação de tamanhos de poros estabelecidos pela IUPAC. Ao término do processo eletroquímico foram obtidos filmes de silício poroso com uma espessura aproximada de 3 μm , avaliados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A caracterização dos substratos de silício poroso por técnicas de MEV no modo de elétrons secundários, nos permite observar a morfologia dos substratos de silício não modificados e modificados eletroquimicamente. Antes do processamento do material, a superfície é completamente lisa e não apresenta nenhuma modificação (Figura 9 (a)). Depois do processamento, Figura 9 (b) as superfícies dos substratos de silício apresentam, geralmente, a sobreposição de estruturas microporosas, mesoporosas e macroporosas.

Figura 9. Imagens de MEV de superfície (a) superfície de silício não modificada, (b) superposição de macro, meso e microporos após o processamento eletroquímico.

Nas Figuras 10 (a) e (b) são mostradas as imagens de MEV dos filmes de silício poroso antes e após o processamento eletroquímico. Nessas figuras pode ser observado o efeito do estresse capilar causado por mudança na tensão superficial. Esse estresse gerado nos procedimentos de lavagem e secagem contribui para o desprendimento dos filmes porosos do substrato de silício. Um processo controlado que permite a obtenção de filmes bem homogêneos, onde foi eliminado o efeito de estresse causado pela evaporação de solventes pode ser observado na Figura 10 (c) e (d).

Figura 10. Imagens de MEV (a) e (b) superfícies que sofreram o efeito do estresse capilar, (c) e (d) filmes de silício poroso homogêneos obtidos eliminando o estresse capilar em c-Si tipo-p, $\langle 100 \rangle$ e $\rho = 1-10 \, \Omega \cdot \text{cm}$, mostrando a espessura do filme formado.

O uso de etanol nos processos de obtenção de filmes de silício poroso tem como finalidade a diminuição da tensão superficial das soluções eletrolíticas e favorecer a eliminação de hidrogênio gasoso gerado nas reações, que pode causar mau contato na interface solução-eletródo, gerando gradientes de concentração na solução. Para superar esse inconveniente, foi construído um agitador mecânico, cujo braço de Teflon fica imerso na solução eletrolítica e garante a eliminação do hidrogênio gasoso produzido na reação. O uso de sistemas que permitem o fluxo contínuo das soluções eletrolíticas também pode ajudar a superar esse inconveniente. Por outro lado, foi observado um efeito negativo no processo de obtenção dos filmes porosos ao usar agitação magnética. Nessas condições, há a formação de um padrão de porosidade, cuja organização e concentração de poros segue o sentido da agitação magnética. O campo magnético gerado ao redor da célula eletroquímica pode levar à formação de poros não totalmente verticais e com

pouca profundidade devido ao fluxo ineficiente de elétrons entre o eletrodo de platina e o substrato de silício. Esses efeitos serão motivo de estudos posteriores.

Um fator importante no processo de obtenção de filmes de silício poroso é a etapa final de enxágue e secagem das amostras, especialmente para filmes altamente porosos (microporosos). Após a formação dos filmes porosos, quando os eletrólitos e os solventes de enxágue evaporam, foi observada a quebra sistemática dos filmes porosos nos substratos de silício. Esse fenômeno é de difícil controle e é a principal causa da perda de material nos processos de obtenção de nanopartículas, levando a baixos rendimentos em termos de processo. Um exemplo disso foi mostrado na Figura 10 (a) e (b), onde são vistas regiões com maior concentração de camadas porosas e regiões onde se observa o desprendimento de camadas porosas do substrato de silício. A origem desse fenômeno é atribuída ao elevado estresse capilar causado pela evaporação dos solventes desde os poros. Diversos métodos foram propostos como o intuito de diminuir ou eliminar o estresse capilar (BISI et al., 2000). Um dos métodos mais amplamente utilizados é o uso de solventes com baixa tensão superficial como o pentano, nos processos de secagem. O pentano é de fácil manipulação e não reage com o silício. Outros métodos mais sofisticados e caros são os métodos de secagem supercríticos, liofilização e métodos que envolvem taxas de evaporação lentas. Para os nossos propósitos, foi usado o pentano como solvente para a secagem final, no entanto, por ser o pentano um solvente imiscível em água, foi preciso usar como solventes intermediários o etanol e metanol nas etapas de enxágue, por isso foi preciso eliminar totalmente os resíduos de HF e reduzir a concentração de água que fica absorvida nos poros. A presença de água nos poros é considerada a principal causa do estresse capilar.

As características estruturais dos filmes de silício poroso tais como a porosidade e profundidade dos poros, dependem principalmente da densidade da corrente (continua ou pulsada) aplicada, da composição das soluções eletrolíticas (ou seja, das proporções entre o HF e o etanol), iluminação, tempo de anodização, campo magnético externo, cristalinidade, orientação cristalográfica e resistividade do material. Todos esses parâmetros influenciam a formação dos filmes de silício poroso e conseqüentemente definem as características ópticas desse material.

Devido ao fato de a superfície dos filmes de silício poroso recém obtidos ser passivada, majoritariamente, por átomos de hidrogênio, ela apresenta um caráter altamente hidrofóbico e reativo. Essa característica da superfície do silício poroso exigiu o uso de reagentes de alta pureza, >99 %, pois os átomos de hidrogênio da superfície podem sofrer substituição por substâncias contaminantes introduzidas, intencionalmente, nos processos de manuseio ou armazenagem ou por meio da adsorção física ou química de uma grande variedade de substâncias presentes nas soluções eletrolíticas. Essas substâncias podem ter como origem os próprios reagentes e subprodutos das reações químicas que acontecem no processo eletroquímico e incluem grupos orgânicos, metais pesados, compostos moleculares, materiais iônicos e espécies atômicas ou elementares, tais como o oxigênio, sódio, flúor, cloro, etc., tal como mostram os estudos realizados por (BISI et al., 2000; BURIÁK, 2006; PARK et al., 2009; REINHARDT e KERN, 2008).

Antes da obtenção das nanopartículas, os filmes de silício poroso foram quimicamente oxidados em uma solução oxidante formada por H_2SO_4 e H_2O_2 , a 110°C durante 15 minutos. A oxidação química foi realizada com a finalidade de promover uma oxidação parcial das estruturas porosas pela formação de uma fina camada de SiO_2 que protege o filme de uma oxidação posterior, evita a reação com contaminantes, contribui com a estabilidade estrutural (evitando a quebra e o desprendimento dos filmes porosos) e favorece a ativação das propriedades fotoluminescentes do silício poroso. Diversos métodos de oxidação tem sido propostos nos trabalhos de (ANGLIN et al., 2008) para a estabilização mecânica e óptica do silício poroso. Após o processo de oxidação, os substratos de silício poroso foram lavados e enxaguados com água Milli-Q até a completa eliminação de ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio, e armazenadas em água Milli-Q por 24 horas para permitir a difusão das espécies químicas desde o interior dos poros até o meio aquoso, favorecendo assim a completa eliminação de resíduos. Após esta etapa, os substratos de silício poroso estão prontos para serem submetidos a ultrasonicação. A potência do ultrassom produz cavitação que induz a vibração necessária para fragmentar a estrutura porosa e levar ao desprendimento das nanopartículas. Para isso foi usado um equipamento de ultrassom de 40 KHz modelo Branson 1510, onde os substratos de silício poroso sofrem fratura mecânica, dando lugar, assim, à liberação de nanocristais de silício com uma distribuição de

tamanhos bem heterogênea. O uso do ultrassom é uma etapa muito importante do trabalho, pois permite a obtenção de nanopartículas de elevada pureza. Um fato importante observado, nessa etapa, foi que quanto maior o tempo de ultrasonicação, maior a quantidade de nanopartículas desprendidas do filme poroso. A ultrasonicação dura em torno de 3 a 4 horas, tempo necessário para a fragmentação de quase a totalidade da estrutura porosa e a liberação das suas nanopartículas.

Após o processo de fragmentação mecânica, as suspensões coloidais de nanopartículas de silício, foram submetidas a centrifugação a 3000 rpm durante 20 min por três vezes consecutivas e enxaguadas em cada etapa com água Milli-Q para a eliminação de formas solúveis de silício. O ácido ortosilícico, $\text{Si}(\text{OH})_4$, é a forma solúvel do dióxido de silício e pode ser encontrado em meios aquosos ácidos e neutros conforme foram observado por((Sailor, 2012)). Após centrifugação as nanopartículas foram novamente suspensas em meio aquoso e filtradas empregando filmes de membrana com diâmetro de poros de 0,22 μm . A filtração garante a separação de partículas com diâmetros maiores que 220 nm e permite sua aplicação para os ensaios *in vitro*.

A quantidade de nanopartículas obtidas pelo método eletroquímico pode variar dependendo das condições de trabalho, em geral, da concentração dos reagentes, densidade da corrente e tempo de anodização, principalmente. De modo geral, foi possível obter maior quantidade de nanopartículas para tempos de anodização e sonicação maiores, pois quanto maior o tempo de anodização, maior a espessura do filme poroso obtido e conseqüentemente maior a quantidade de nanopartículas desprendidas pelos filmes porosos na sonicação. É preciso também lembrar que quanto maior foi o tempo de contato dos substratos de silício poroso com o eletrólito (HF/etanol), maior foi a possibilidade de dissolução e eletropolimento. O uso de uma densidade de corrente acima de 100 mA/cm^2 (que corresponde aproximadamente 200 mA da corrente fornecida ao sistema) e tempos de anodização acima de 3 horas, para concentrações de eletrólitos na proporção de 1:3 de HF em etanol, levou à perfuração e completa eliminação do substrato de silício na região de anodização, fato este que indica que o eletropolimento foi seguido pela dissolução do material. Esse fenômeno foi também observado nas etapas de padronização do método.

Após vários experimentos para a obtenção de nanopartículas de silício, foram estabelecidas as condições ótimas do processo sem o eletropolimento e sem a dissolução do material. Essas condições consistem em tempos de anodização de 3 horas, densidade de corrente $J = 78,53 \text{ mA/cm}^2$ ($I = 150 \text{ mA}$) e concentração de eletrólitos na proporção de 1:3 (v/v) de HF em etanol. Essas condições permitiram a obtenção de aproximadamente 1,2 mg de nanopartículas de silício por substrato após 4 horas de sonicação. Ao final dessa etapa, as nanopartículas foram suspensas em água e armazenadas para caracterização e ensaios *in vitro*.

4.2 Caracterização de nanopartículas de silício poroso

4.2.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As nanopartículas de silício (NPSi) foram caracterizadas por MEV no modo de elétrons secundários, ou seja, devido aos elétrons refletidos, cuja origem é altamente dependente de pequenas inclinações da amostra. Devido à relativa condutividade elétrica do material, a técnica de MEV foi suficiente para sua caracterização substituindo dessa forma o uso de MET. Nas imagens da Figura 11 (a) (aumento de 20 mil vezes) e 11 (b) (aumento de 100 mil vezes), podem ser observados os agregados de nanopartículas, formados após a evaporação do solvente. As nanopartículas depositadas sobre superfície de silício cristalino foram metalizadas com ouro para melhorar a condutividade elétrica nas medições por MEV. O aumento de 100 mil vezes permite observar as nanopartículas dispostas em uma organização periódica, com tamanhos que oscilam entre 50 nm e 25 nm, ou menos (Figura 11 (b)). Devido ao limite de sensibilidade do MEV usado, não foi possível observar mais detalhes sobre a forma e tamanho reais das nanopartículas.

Figura 11. (a), (b) mostram as imagens de MEV de NPSi obtidos com c-Si tipo-p, $\langle 100 \rangle$ e $\rho=1-10 \, \Omega \cdot \text{cm}$.

Pelo recurso de microanálise da MEV denominada espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDX ou EDS, dos termos em inglês Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy), foi possível determinar a composição elementar das nanopartículas de silício poroso. Na Figura 12, é possível observar o espectro de microanálise por EDX que mostra claramente a composição das nanopartículas de silício, preferencialmente contendo silício elementar (Si) e alguns outros elementos contaminantes como o cobre (Cu), carbono (C), oxigênio (O), cálcio (Ca), magnésio (Mg), ouro (Au, do recobrimento) e alumínio (Al, muito provavelmente do porta amostras).

Figura 12. Espectro de microanálise de nanopartículas de silício por EDX

4.2.2 Difração de raios-X

Com o intuito de determinar o tamanho verdadeiro das nanopartículas de silício, foram realizadas análises por difração de raios-X. Utilizando os difratogramas de raios-X, foi possível estimar o tamanho das nanopartículas através da equação de Scherrer (PATTERSON, 1939) (Cullity, B. D., 1978). Os resultados mostraram nanopartículas de silício com tamanhos de 31,6 nm de diâmetro, estrutura cristalina cúbica, rede de “Bravais” CFC (cúbica de face centrada) com arestas $a = 5,43088$; $b = 5,43088$; $c = 5,43088$; ângulos internos $\alpha = 90,000$; $\beta = 90,000$; $\gamma = 90,000$ e orientação cristalográfica (100). As Figuras 13 (a) e 13 (b) mostram as representações esquemáticas da célula unitária que os nanocristais de silício podem apresentar. Elas estão formadas por uma estrutura cúbica de face centrada com suas arestas e ângulos internos todos equivalentes; é mostrada também uma representação esquemática da estrutura de rede cúbica do tipo diamante que o silício adota (Figura 13 (c)).

Figura 13. Representação esquemática das células unitárias dos cristalitos de silício (a,b) e estrutura do tipo diamante do silício cristalino (c).

O tamanho das nanopartículas de silício obtidas a partir dos difratogramas de raios-X (Figura 14), coincide com as dimensões observadas nas imagens de MEV (Figura 11 (b)). Embora o limite de resolução de 100 000 vezes do equipamento de MEV não permita ver com detalhes o tamanho das nanopartículas, foi possível estimar, por meio da escala da imagem, que o tamanho das nanopartículas oscila em torno de 20 a 30 nm.

Figura 14. Padrão de difração de raios-X para a determinação do tamanho dos nanocristais de silício poroso obtidas por processo eletroquímico.

4.2.3 Espectroscopia de Absorção e de Emissão de Fluorescência

As medidas de absorção e emissão de fluorescência foram realizadas com a finalidade de avaliar as características ópticas das NPSi, obtidas a partir de dois tipos de substratos de silício tipo-p com resistividades de 1-10 e 10-20 Ω .cm. Tanto a região de emissão como o comprimento de onda de excitação foram definidos com base nos resultados obtidos nos processos de caracterização das NPSi. Nessa etapa foram avaliados a faixa de emissão e o comprimento de onda de excitação por meio da varredura em comprimentos de onda de excitação que vão desde 200 até 900 nm e encontrando desta forma os principais comprimentos de onda de excitação.

4.2.3.1 NPSi obtidas a partir de silício tipo-p com ρ de 10-20 $\Omega\cdot\text{cm}$

As medidas diretas de espectroscopia de absorção UV-Vis não permitiram observar picos de absorção similares aos observados para moléculas orgânicas ou inorgânicas, cujas absorvidades molares possuem valores constantes e de elevada ordem de grandeza. As soluções contendo nanopartículas de silício com tamanho hidrodinâmico médio de 150 nm apresentam um amplo espectro de absorção, com um perfil de absorbância semelhante ao de nanopartículas de semicondutores, conhecidos como quantum dots (QDs), tais como CdSe-ZnS(GAO et al., 2004; LARSON et al., 2003; BORISSEVITCH et al., 2013).

O perfil dos espectros de absorção das soluções coloidais das NPSi pode ser observado na Figura 15. As curvas *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, indicam que a diminuição da concentração das nanopartículas induz uma diminuição da intensidade. A forma dos espectros de absorção das soluções coloidais NPSi são similares aos observados por(CHOI et al., 2007b; WANG et al., 2004; HEINRICH et al., 1992; PARK et al., 2009; ECKHOFF et al., 2005).

Figura 15. Espectros de absorção de soluções aquosas contendo NPSi, obtidos a partir de silício tipo-p com $\rho = 10\text{-}20 \Omega\cdot\text{cm}$. Faixa de concentração de 120,00 a 84,73 $\mu\text{g/ml}$.

Por outro lado, as medidas de emissão de fluorescência foram realizadas excitando as amostras com uma fonte de luz contínua (lâmpada de xenônio de 450 Watts de potência), através de uma abertura de 10 nm. Dentre os vários comprimentos de onda de excitação avaliados, foram escolhidos os comprimentos de onda de 230 e 450 nm. A excitação em 270 nm não mostrou nenhum sinal nas medidas de emissão. Por outro lado, excitação em 230 nm permitiu observar a emissão de fluorescência na faixa de 500-850nm com um pico de emissão máxima centrado em 630 nm (Figura 16). O pico de emissão centrado em 700 nm corresponde ao sinal Raman do solvente. Nessa figura, as curvas *a, b, c, d, e, f, g*, refere-se à diminuição da intensidade de fluorescência em função da concentração de nanopartículas no meio aquoso, numa faixa de concentração de 120,00 a 71,19 $\mu\text{g/ml}$.

Figura 16. Variação da intensidade de fluorescência em função da concentração de NPSi em água, obtidas a partir de substratos de silício com $\rho = 10\text{-}20 \Omega.\text{cm}$. $\lambda_{\text{exc}} = 230\text{nm}$. Faixa de concentração de 120,00 a 71,19 $\mu\text{g/ml}$.

Os espectros de emissão das amostras foram também obtidos com excitação fixa em 450 nm, Figura 17. Neste caso, a banda de emissão aparece centrada em 650 nm, com um deslocamento de 20 nm para regiões de mais baixa energia em relação ao caso anterior (Figura 16). Também é possível observar que a intensidade de fluorescência alcança valores muito mais baixos quando comparada com as amostras que foram excitadas em 230 nm. As curvas *a, b, c, d, e, f, g, h*

apresentadas na Figura 17 representam a diminuição da intensidade de fluorescência para uma faixa de concentração de NPSi de 120,00 a 65,26 $\mu\text{g/ml}$.

Figura 17. Variação a intensidade de fluorescência em função da concentração de NPSi em água, obtidas a partir de substratos de silício com $\rho = 10\text{-}20 \Omega\cdot\text{cm}$ e excitadas em 450 nm. Faixa de concentração de 120,00 a 65,26 $\mu\text{g/ml}$.

4.2.3.2 NPSi obtidas a partir de silício tipo-p com ρ de 1-10 $\Omega\cdot\text{cm}$

Os espectros de absorção de NPSi obtidas a partir de substratos de silício tipo-p com resistividade de 1-10 $\Omega\cdot\text{cm}$, medidas nas mesmas condições anteriores, podem ser observados na Figura 18. As soluções incolores dessas nanopartículas também apresentaram um amplo espectro de absorção, com um perfil típico de nanopartículas de semicondutores. Diversas pesquisas sobre quantum dots de CdSe-ZnS mostram espectros de absorção com picos característicos em determinadas regiões do espectro e que estão relacionados com o tamanho das suas nanopartículas. Nesse tipo de substâncias cada pico de absorção é atribuído também ao tamanho das nanopartículas e a emissão pode acontecer em regiões muito afastadas aos comprimentos de onda de excitação (MICHALET et al., 2005). Nos espectros de absorção obtidos com as nanopartículas de silício (Figura 18), podem ser observados picos de absorção máxima centrados em 275, 485, 575 e 655 nm.

Figura 18. Espectros de absorção de soluções aquosas de NPSi obtidos a partir de silício tipo-p com $\rho=1-10 \Omega.\text{cm}$. Faixa de concentração de 120,00 a 84,73 $\mu\text{g/ml}$.

Baseado nos picos de absorção máxima, os espectros de emissão de fluorescência deste tipo de NPSi foram obtidos excitando as amostras em 230, 575 e 655 nm. Analogamente ao caso das NPSi obtidas a partir de substratos de silício com resistividade de 10-20 $\Omega.\text{cm}$., não foi observado nenhuma emissão na excitação em 275nm. A excitação em 485 nm também não apresentou nenhum sinal de emissão. Por outro lado, o resultado da análise mostrou que a excitação em 230 nm apresenta um pico de emissão bem definido em 532 nm (Figura 19 (b)), onde as curvas a, b, c, d, e, representam a diminuição da concentração das nanopartículas na solução para uma faixa de concentração de 120,00 a 84,73 $\mu\text{g/ml}$. O espectro de excitação que corresponde à emissão em 532 nm é mostrado na Figura 19 (a).

Figura 19. (a) Espectro de excitação com $\lambda_{em} = 532$ nm. (b) Variação da intensidade de fluorescência em função da concentração de NPSi em água ($\rho = 1-10 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}$, $\lambda_{exc} = 230$ nm, faixa de concentração de 120,00 a 84,73 $\mu\text{g/ml}$).

Quando as soluções coloidais foram excitadas em 575 nm, foi confirmada a emissão de fluorescência em um único pico localizado em 862 nm (Figura 20 (b)). Semelhante aos casos anteriores foi possível observar a diminuição da intensidade de fluorescência em função da concentração das nanopartículas na solução. O espectro de excitação que corresponde à emissão em 862 nm é mostrado na Figura 20 (a).

(a)

(b)

Figura 20. (a) Espectro de excitação com $\lambda_{em} = 862$ nm. (b) Espectro de emissão de fluorescência de NPSi obtidas pela excitação em 575 nm. Faixa de concentração de 120,00 a 84,73 $\mu\text{g/ml}$.

Finalmente, a excitação das NPSi em 655 nm permitiu observar a emissão de fluorescência em 980 nm (Figura 21 (b)). Do mesmo modo foi possível observar o espectro de excitação relativo a esse comprimento de onda de emissão (Figura 21 (a)).

Figura 21. (a) Espectro de excitação com $\lambda_{em} = 980$ nm. (b) Espectro de emissão de fluorescência de NPSi obtidas pela excitação em 655 nm. Faixa de concentração de 120,00 a 84,73 $\mu\text{g/ml}$.

A emissão da fluorescência das NPSi em regiões do infravermelho próximo podem ser atribuídas à presença de nanopartículas com diâmetros menores a 5 nm que coexistem nas soluções coloidais e que devem sua emissão a fenômenos de confinamento quântico. A emissão em regiões próximas ao infravermelho (830nm) foi também observada por (GUPTA e WIGGERS, 2009) em nanopartículas de silício usando uma fonte de excitação laser de 532 nm. Essas nanopartículas

apresentaram uma média de tamanho de 25 nm, medidas por MET, obtidas por processo de pirólise de silano (SiH_4). Por outro lado, (GU et al., 2012) mostraram resultados da emissão fotoluminescente em 800 nm sob excitação com luz UV de 370 nm de NPSi com tamanho hidrodinâmico de 130 nm, medidas por técnicas de DLS e obtidas por processos eletroquímicos. Pesquisas demonstram que as nanopartículas de silício possuem a capacidade de emissão em varias regiões do espectro eletromagnético, desde o visível até o infravermelho, dependendo do grau de substituição dos átomos de hidrogênio da superfície pelo oxigênio, tamanho de partícula e método de obtenção (GHOSH e SHIRAHATA, 2014; WOLKIN et al., 1999). Nesse sentido, o método de anodização eletroquímica para a produção de nanopartículas de silício, usualmente não permite um fino controle de tamanhos de partícula, resultando na mistura de tamanhos e por tanto na sobreposição das emissões de fotoluminescência.

A fotoluminescência das nanopartículas de silício poroso, ao contrario de substâncias orgânicas como quinina, rodamina, GFP, fluoresceína, etc., não depende da presença de grupos cromóforos como $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}=\text{O}$ ou NO_2 na sua estrutura, mas sim diretamente do tamanho da partícula e das características físicas e químicas da sua superfície, as quais são objeto de intensos estudos para explicar as propriedades ópticas desse material, especialmente, relacionados à sua fotoluminescência UV-Vis e Infravermelho. A primeira e mais favorável explicação para a fotoluminescência (PL) em nanopartículas de silício poroso é o modelo de confinamento Quântico (QC) em cristais de silício de dimensões nanométricas.

4.2.4 Medida da estabilidade de NPSi em solução aquosa por espalhamento de luz dinâmico (DLS)

As propriedades de dispersão, tamanho de partícula e potencial Zeta das nanopartículas de silício poroso foram avaliados para três alíquotas (A, B e C) de uma suspensão coloidal de nanopartículas de silício poroso em fase aquosa. As medidas foram obtidas utilizando a técnica de espalhamento de luz dinâmica em um equipamento ZetaSizer da Malvern Instruments. A partir dos dados coletados nas medições de tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial Zeta, foi construído um gráfico comparativo da variação do tamanho das nanopartículas em

função do tempo registrada a cada 15 dias (ver Figura 22). Os dados foram obtidos durante 90 dias para três amostras idênticas isoladas do mesmo lote de preparação.

Figura 22. Distribuição do tamanho de partículas avaliada a cada 15 dias para soluções coloidais de NPSi em água.

As medidas realizadas após os primeiros 30 dias sugerem que não houve uma variação significativa do tamanho das nanopartículas devido aos processos de agregação ou floculação, mostrando uma estabilização do tamanho da nanopartículas em torno de 150nm. A diferença entre o tamanho de nanopartículas recém-preparadas e as armazenadas ao longo do tempo pode ser atribuída aos processos de agregação ou a processos de oxidação da sua superfície, tal como mostram os estudos realizados por (YANG et al., 2005; BAHRUJI et al., 2009) ou através dos estudos de microscopia eletrônica de alta resolução para a caracterização estrutural de nanopartículas de silício, conforme mostrado por (HOFMEISTER et al., 1999) . As superfícies não oxidadas apresentam grupos silano (Si-Hn) em maior proporção do que as superfícies oxidadas. A oxidação da superfície das nanopartículas de silício leva à substituição dos grupos silano (Si-Hn) por grupos silanol (Si-OH) e grupos SiO_2 em proporções variáveis. Existem diversas reações que podem ser usadas para a substituição dos grupos silano da superfície das nanopartículas. Essas substituições, em geral, podem acontecer por meio de ligações de diversos grupos químicos através do oxigênio e do carbono ligados ao silício (SONG e SAILOR, 1999). O oxigênio atmosférico dissolvido na água é considerado como o principal agente na oxidação da superfície das nanopartículas armazenadas.

A oxidação das nanopartículas de silício é um processo espontâneo e pode ocorrer quando as nanopartículas entram em contato com o oxigênio, por causa de agentes oxidantes químicos como H_2SO_4 , e H_2O_2 , ou por reações de fotoativação. As reações de fotoativação induzida pelas próprias nanopartículas podem acontecer sob iluminação e a temperatura ambiente dentro de um curto período de tempo no qual as nanopartículas entram em contato com a água, formando assim uma fina camada de óxido uniforme ao redor das nanopartículas por meio de mecanismos que incluem eliminação de hidrogênio, e formação de compostos solúveis de silício como o ácido silício, como já foram observadas por (BAHRUJI et al., 2009; LOCKWOOD et al., 2011; OSTRAAT et al., 2005). Esse processo de oxidação fotoquímica pode ser intensificado pela iluminação com luz UV-Vis na faixa de 325 a 514 nm, irradiação com laser, pelo aumentando do pH ou concentração do oxigênio. O aumento progressivo no número de átomos de oxigênio na superfície das nanopartículas leva a um ligeiro aumento do tamanho das nanopartículas e à diminuição do núcleo de silício das nanopartículas por causa da oxidação. O resultado disso induz também a variação da intensidade e o deslocamento das bandas de fotoluminescência (LEDOUX et al., 2000; LOCKWOOD et al., 2011).

As medidas de índice de polidispersividade (Pdl) em função do tempo de armazenamento mostram valores de Pdl dentro dos limites aceitáveis para o estudo por técnica de espalhamento de luz dinâmico, ou seja $> 0,05$ e $< 0,7$. Ao observarmos a Figura 23, podemos ver um aumento no valor do Pdl. Esse comportamento coincide também com o relativo aumento do tamanho das nanopartículas.

Figura 23. Distribuição do índice de polidispersividade, Pdl, em função do tempo avaliada a cada 15 dias para NPSi em água.

Em relação ao potencial Zeta, o gráfico da Figura 24 mostra a variação do potencial Zeta em função do tempo. Neste gráfico podemos observar que o potencial Zeta das nanopartículas tende a ficar menos negativo conforme passa o tempo de armazenamento, chegando a valores próximos de -2,5 mV após os 90 dias.

Figura 24. Distribuição do potencial Zeta avaliada a cada 15 dias para NPSi em água.

A teoria do potencial Zeta estabelece valores entre -25 mV e +25 mV (ou seja valores mais positivos do que -25 mV e mais negativos do que +25 mV) como sendo próprios de suspensões coloidais com baixa estabilidade, de acordo com os parâmetros estabelecidos na literatura. Uma observação inicial, na Figura 24, sugere que as suspensões coloidais deste material apresentam uma baixa estabilidade (ou seja, existe uma tendência à agregação e floculação). As amostras recém-obtidas apresentaram valores de potencial Zeta próximos de -20 mV (medida realizada no primeiro dia), que sugere uma relativa estabilidade das suspensões coloidais. Conforme passa o tempo de armazenamento, podemos observar uma variação no valor do potencial Zeta, ou seja, valores mais positivos do que -25 mV que sugerem uma clara instabilidade das soluções coloidais.

A interpretação dos valores mais negativos do que -25 mV no potencial Zeta pode estar relacionada com a diminuição das cargas positivas na superfície das nanopartículas e que podemos relacionar com a diminuição do número de cargas

positivas conferidas pelos grupos silano (Si-H_n) da superfície. Outro ponto de vista a ser considerado é que quanto maior o número de átomos de hidrogênio substituíveis na superfície, menor será a diferença de potencial registrado (ou seja, valores mais negativos do que -25 mV) e maior a estabilidade das soluções coloidais. Partículas com superfícies substituídas com mesmo tipo de cargas apresentam uma grande repulsão entre si e asseguram uma resistência à agregação e floculação, conferindo uma maior estabilidade às soluções coloidais. Esse comportamento só é coerente ao observarmos o primeiro dia de medida, com a obtenção de um valor de potencial Zeta próximo de -20 mV. À medida que os átomos de hidrogênio são substituídos por átomos de oxigênio (devidos a processos de oxidação), o potencial Zeta irá adquirindo valores menos negativos, ou seja, acima de -20 mV, o qual significa uma diminuição na estabilidade das soluções coloidais, porém uma estabilização da superfície em termos de reatividade química, pelo incremento do número de grupos silanol (Si-OH). Nesse sentido, embora a estabilidade das soluções coloidais diminua, uma melhora nas propriedades ópticas do material é adquirida pelo aumento na intensidade de fluorescência causado pelos processos de oxidação superficial das nanopartículas. Assim, nanopartículas com superfícies positivamente carregadas (nanopartículas de silício poroso recém-obtidas) apresentaram um valor de potencial Zeta negativo, pois um acúmulo de cargas negativas está associado à nanopartícula, criando uma dupla camada elétrica e uma camada difusa na qual ainda persistem cargas, majoritariamente, negativas (ver esquema da Figura 25).

Figura 25. Representação esquemática da superfície da nanopartícula de silício poroso recém-obtido com superfície altamente positiva formando uma dupla camada elétrica com moléculas de água e uma camada difusa com cargas negativas [Fonte: Autoria própria].

4.3 Funcionalização de nanopartículas de silício com RGDfV

Nesta seção descrevemos as mudanças espectrais da emissão de fluorescência e ressonância magnética nuclear das NPSi, causadas pela interação com a molécula de ciclo-RGDfV (Figura 26). Ao mesmo tempo são determinadas, também, as mudanças no potencial Zeta, tamanho hidrodinâmico e índice de polidispersividade das nanopartículas funcionalizadas. Para esse propósito foram escolhidas as nanopartículas obtidas a partir de substratos de silício com resistividade de 1-10 Ωcm , porque eles apresentam maior intensidade de fluorescência e bandas na região da janela fototerapêutica (região onde os sistemas biológicos não apresentam autofluorescência).

Figura 26. Molécula do ciclo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val). [Fonte: ENZO Life Ciencias]

Os filmes de silício poroso obtidos foram os precursores para a obtenção das nanopartículas de silício e eles mostram um elevado caráter hidrofóbico e conseqüentemente as NPSi recém obtidas também apresentam essa hidrofobicidade. Após o tratamento de oxidação, os grupos silano (Si-H) da superfície das nanopartículas são convertidos em grupos silanol (Si-OH) (JARVIS et al., 2008). Após a oxidação a concentração dos grupos silanol aumenta, dando à superfície da nanopartícula um caráter hidrofílico que melhorou sua solubilidade em meios aquosos e permitiu a interação eletrostática com outras substâncias do meio. É conhecido que a superfície das nanopartículas é susceptível à funcionalização com vários grupos químicos e oferece opções de estabilização e bioconjugação que facilita seu uso na área biomédica. A funcionalização das nanopartículas de silício poroso está baseada na possibilidade de substituir os átomos de hidrogênio e oxigênio, principalmente, adsorvidos na sua superfície após sua formação. As superfícies das nanopartículas de silício poroso com terminações de átomos de hidrogênio provêm de uma plataforma ideal para derivações química posteriores e funcionalizações com biomoléculas. A conjugação das NPSi com RGDfV é também baseado nesse princípio; embora o método usado, neste trabalho, sugira que as forças de interação eletrostáticas entre o RGDfV e a superfície das nanopartículas

seja mais predominante. Os estudos de ressonância magnética nuclear (NMR) podem nos ajudar a elucidar quais grupos foram responsáveis pelas interações entre as nanopartículas e o fármaco.

Os métodos de funcionalização incluem vários procedimentos que variam drasticamente um do outro, dependendo da finalidade desejada. Assim são considerados processos secos e processos úmidos (HERINO, 2000; TEYSSOT et al., 2002). Os processos úmidos são aqueles que envolvem qualquer impregnação simples em fase líquida e são considerados bastante eficazes porque em princípio não há um grande problema para o transporte de massa e a difusão é facilitada pelos solventes. Nesse sentido, o processo de funcionalização seguido neste trabalho foi aquele que envolve a junção de ambos os componentes em fase aquosa. O RGDfV é solúvel em dimetil sulfoxido (DMSO) e em solução tampão fosfato (PBS) 0,1 M, já as NPSi são solúveis em água. Devido à relativa toxicidade do DMSO em experimentos biológicos, escolhemos o PBS para preparar o meio para o processo de funcionalização. Para facilitar a solubilidade do RGDfV, mantivemos o pH constante durante as medidas de fluorescência o que permite seu uso em estudos *in vitro*, foi preparada uma solução tampão (PBS pH 7.21). Depois disso, uma nova solução, nas proporções de 1:2 (V/V) de solução coloidal de NPSi e PBS pH 7.21, foi preparada, para obter as nanopartículas funcionalizadas (NPSi-RGDfV).

Estudos de fluorescência e ressonância magnética nuclear foram realizados para as soluções contendo as nanopartículas funcionalizadas. Os resultados desses estudos são discutidos separadamente nas seções seguintes. Para os estudos de fluorescência foram escolhidos dois comprimentos de onda de excitação (230 e 575 nm), os mesmos que foram usados na caracterização das nanopartículas não funcionalizadas. A excitação das nanopartículas livres e funcionalizadas em 230 nm causou uma emissão característica em 532 nm. No entanto, a fluorescência das nanopartículas funcionalizadas observado foi mais intensa do que as das nanopartículas livres (ver Figura 27, curva em amarelo).

Figura 27. Espectros de fluorescência de nanopartículas de silício poroso funcionalizadas com RGDfV e excitados em 230 nm. As curvas (a) e (b) representam **antes** e **depois** da funcionalização, respectivamente.

Por outro lado, a excitação em 575 nm antes e depois da funcionalização com RGDfV causa a emissão em 862 nm (ver Figura 28). Nesse espectro, pode ser observado novamente o aumento da intensidade de fluorescência após a funcionalização com RGDfV, o que é esperado.

Figura 28. Espectros de fluorescência de nanopartículas de silício poroso funcionalizadas com RGDfV e excitados em 575 nm. As curvas (a) e (b) representam **antes** e **depois** da funcionalização, respectivamente.

O aumento na fluorescência das nanopartículas funcionalizadas sugere a adsorção do RGDfV na superfície das nanopartículas. A adsorção do RGDfV na

superfície das nanopartículas pode acontecer por interações mediadas por forças de atração eletrostática ou pela substituição dos grupos terminais hidrogênio ou oxigênio da superfície das nanopartículas pelo RGDfV em reações catalíticas. Um comportamento similar no aumento da intensidade de fotoluminescência de nanopartículas de silício foi observado por (GUPTA e WIGGERS, 2009) quando as nanopartículas foram funcionalizadas com alfa-olefeinas.

Devido ao aumento na intensidade de fluorescência, foi necessário medir o tamanho hidrodinâmico e o potencial zeta das NPSi antes e depois de funcionalizar. As medições feitas com o ZetaSizer da Malvern, mostrou que após a funcionalização a distribuição do tamanho das nanopartículas aumenta alcançando tamanhos de partículas de até 349,6 nm de diâmetro, com índice de polidispersividade de 0,40 e potencial zeta de -23,88 mV, como é mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial zeta antes e depois do processo de funcionalização.

	Antes de funcionalizar	Depois de funcionalizar
Tamanho (nm)	151,73	349,6
Índice de Polidispersividade (IPd)	0,23	0,40
Potencial Zeta (mV)	-22,83	-23,88

As análises de espalhamento de luz dinâmica mostram que a distribuição de tamanho das nanopartículas foi em torno de 151,73 nm antes da conjugação com o aptâmero é cerca de 349,6 nm depois da sua conjugação. O aumento no tamanho das nanopartículas de 151,73 até 349,6 nm indica que a adsorção dos RGDfV na superfície ocorreu de forma efetiva.

A interação das NPSi com RGDfV também foi analisada através da interpretação dos espectros de ressonância magnética nuclear, obtidas antes e depois da interação das duas substâncias. Nas figuras 29 e 30 são observados os espectros de RMN das NPSi, do RGDfV e da associação das NPSi com RGDfV, nas regiões de 0,3 a 4,5 ppm e de 6,8 a 8,5 ppm, respectivamente. Nelas podem ser observados com detalhes a contribuição dos picos das espécies químicas da superfície das nanopartículas, das moléculas do RGDfV e também pode ser

observado, principalmente, a diminuição da intensidade, deslocamento, surgimento e desaparecimento de alguns grupos químicos da molécula de RGDfV quando ela está associada com às nanopartículas.

Figura 29. Espectros de RMN de NPSi (parte superior), RGDfV (centro) e NPSi-RGDfV (parte inferior)

Na figura 29 (parte superior), podem ser observados picos localizados em 3.5 ppm e 1.0 ppm que correspondem a grupos -CH_2 e -CH_3 respectivamente na superfície das NPSi e que permanecem quando estão associados com RGDfV. Esses grupos provavelmente são resíduos de grupos químicos do etanol (usado no processo de obtenção das nanopartículas) e que podem ter se ligado quimicamente à superfície das nanopartículas durante reações eletrocatalíticas. Na mesma figura

pode ser observado o desaparecimento de um grupo químico da molécula de RGDfV, localizado em 0,5 ppm e o deslocamento para esquerda de outros dois grupos localizados na região entre 2,3 a 2,6 ppm, ambos também pertencentes à molécula de RGDfV, logo após a associação com as NPSi (ver Figura 29 centro).

Por outro lado, na Figura 30, pode ser visto o deslocamento à esquerda de um grupo químico localizado em 7,88 ppm (parte central) e o surgimento de um grupo químico localizado em 7,06 ppm e na região entre 8,0 e 8,1 ppm (ver parte inferior da Figura 30) que não pertence à molécula de RGDfV, logo após a associação com as NPSi. No geral, pode ser observado uma mudança no perfil dos espectros de RMN da molécula de RGDfV após a funcionalização com as NPSi, o que sugere que a interação entre estas duas substâncias acontece efetivamente.

Figura 30. Espectros de RMN de NPSi (parte superior), RGDfV (centro) e NPSi-RGDfV (parte inferior).

4.4 Ensaios de citotoxicidade de NPSi, RGDfV e NPSi-RGDfV

Nesta seção, discutiremos os efeitos citotóxicos do aptâmero (RGDfV) e das nanopartículas de silício (NPSi) antes e após da associação dos mesmos através das nanopartículas (NPSi-RGDfV) pelo ensaio de viabilidade celular clássico MTT. O ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT mostrou ser apropriado para avaliar espectrofotometricamente o número total de células em função da atividade mitocondrial de células vivas. Um aumento ou uma diminuição no número de células resulta na mudança da quantidade de formazan produzido, indicando, assim, o grau de citotoxicidade.

4.4.1 Citotoxicidade de NPSi

Os ensaios de citotoxicidade das NPSi, foram realizados usando células do carcinoma murino B16-F10. Esta linhagem proveniente de camundongos C57BL–6J é altamente tumorigênica e com capacidade metastática, foram cultivadas seguindo a metodologia descrita anteriormente (seção 1.5). Assim, foi possível observar os possíveis efeitos tóxicos causados pela concentração ou por efeitos diretos associados ao metabolismo deste material. Estudos realizados com macrófagos usando grandes quantidades de NPSi (cerca de 200 ug/ml) mostraram que esse material foi biocompatível(CHOI et al., 2009). A Figura 31 mostra os histogramas da análise qualitativa da viabilidade celular em função da concentração das nanopartículas com uma média de tamanho de partícula de 100 a 150 nm. Os resultados deste experimento sugerem que não há efeitos tóxicos significativos nas concentrações usadas. A falta de toxicidade deste material foi interessante neste estudo, porque mostra a possibilidade do seu uso como biomarcadores e veiculadores de fármacos simultaneamente.

Figura 31. Ensaio de MTT mostrando o efeito da concentração das NPSi na viabilidade celular para um tempo de incubação de 3 horas. CT é o controle só células. Não há, estatisticamente, diferenças em relação ao controle.

4.4.2 Citotoxicidade do RGDfV

O RGDfV é um peptídeo cíclico com sequência de aminoácidos Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val, e foi adotado neste trabalho como um ativo modelo por ser um antagonista de receptores de membrana celular $\alpha\beta3$. O RGDfV usado em nossos experimentos nos permitiu avaliar os efeitos citotóxicos em células de melanoma murino. Com esse intuito, os ensaios de citotoxicidade foram realizados usando células B16-F10 de melanoma murino e utilizando o método MTT, através da quantificação de processos de morte celular (como descrito anteriormente). Utilizando placas de cultura de 96 poços, foram cultivadas as células com RPMI 1640 como meio de cultura, seguindo os protocolos padrão de laboratório (Plaqueamento, incubação, reação com MTT e leitura em 690 nm e 560 nm no leitor de Elisa). O procedimento de plaqueamento foi executado pela quantificação de células em câmara de Neubauer, tendo adotado o valor de 10 mil células por poço. A incubação das células foi realizada na presença do RGDfV, agente inibidor da adesão celular que causa apoptose em células que expressam níveis elevados de integrinas $\alpha\beta3$. As linhagens celulares B16-F10 derivadas de camundongos C57BL-6J possuem uma capacidade altamente tumorigênica e metastática. Estas células superexpressam essas proteínas integrinas na superfície da membrana celular e são conhecidas por estar envolvidas em vários processos celulares importantes, incluindo à angiogênese, migração celular e crescimento de tumores (RAMOS et al., 1990). Os resultados apresentados aqui sugerem que o RGDfV causa efeitos tóxicos

significativos em células que expressam estas integrinas $\alpha\beta 3$. A capacidade do RGDfV de inibir o crescimento de células B16-F10 é mostrado nos histogramas da figura 32.

Figura 32. Ensaio de MTT do efeito da concentração do RGDfV na viabilidade celular para um tempo de incubação de 3 horas. CT é o controle só células e PBS é o tampão no qual os aptâmeors são diluídos. *, *** Diferença estatística comparada ao controle, $p < 0,05$.

Os resultados mostram que 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$ de RGDfV reduzem significativamente o crescimento das células B16-F10 após a incubação. Resultados semelhantes foram observados por outros autores (BROOKS et al., 1994; CHATTERJEE et al., 2000; CHATTERJEE et al., 2001; RUOSLAHTI e REED, 1994; SEFTOR et al., 1992) em estudos com RGDfV em células que expressam os mesmos tipos de integrinas (Glioblastoma multiforme e câncer de próstata). Estudos realizados por (TAGA et al., 2002; CHATTERJEE et al., 2001; AGUZZI et al., 2004) para avaliar o efeito inibidor do RGDfV mostraram resultados eficientes para 18 e 24 horas de incubação.

Para comprovar esse comportamento, foram realizados ensaios qualitativos para avaliar o efeito inibitório do RGDfV no crescimento de células B16-F10 durante 24 horas de incubação. Para confirmar nossa hipótese, foram usadas as concentrações com as quais o agente inibidor teve melhores resultados nos ensaios de MTT, ou seja, 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$. Os resultados inferidos a partir de imagens de microscopia óptica confirmaram essa hipótese (ver Figuras 33 (a), (b), e (c)).

Figura 33. Efeitos do RGDfV no crescimento de células de melanoma murino B16-F10. Células de controle não tratadas (a), células tratadas com 10 µg/ml (b) e com 20 µg/ml (c). As células foram incubadas durante 24 horas com o agente inibidor.

4.4.3 Citotoxicidade das nanopartículas funcionalizadas (NPSi-RGDfV)

Com base nas informações inferidas a partir imagens de microscopia óptica (Figura 33) e dos resultados da citotoxicidade das NPSi e do RGDfV, ambos por separado, foi realizado ensaios de citotoxicidade das “nanopartículas funcionalizadas” para tempos de incubação de 3 e 24 horas, usando a mesma linhagem de celular B16-F10 e pelo mesmo método. Cabe lembrar que os dois primeiros ensaios de citotoxicidade realizados para o RGDfV e NPSi livres, foram realizados seguindo os protocolos estabelecidos para um tempo de incubação do fármaco de 3 horas. A avaliação da citotoxicidade das nanopartículas associadas ao fármaco em função do tempo foi realizada pela necessidade de comprovar sua eficácia na redução da viabilidade celular e provar que o fator determinante neste tipo de ensaio é o tempo de incubação. Os resultados obtidos a partir das imagens de microscopia óptica sugeriram que um tempo de incubação de 24 horas favorece

significativamente na redução da viabilidade celular para concentrações de RGDfV de 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$ (ver imagens da figura 33). Na Figura 34 é possível observar os histogramas da viabilidade celular em função da concentração de “nanopartículas funcionalizadas” para um tempo de incubação de 3 horas. De acordo com o gráfico da figura 34, pode-se afirmar que existe um efeito significativo da inibição do crescimento celular apenas na concentração de 20 $\mu\text{g/ml}$ (com uma viabilidade celular de 66% $\pm$ 16,35). Na concentração de 1 $\mu\text{g/ml}$ houve um aumento na viabilidade celular chegando a 156% $\pm$ 21,49. Esse comportamento foi observado repetidamente nos ensaios de citotoxicidade realizados para o fármaco não funcionalizado, sugerindo que nessa concentração há um aumento na proliferação celular, devido provavelmente à resistência das células ao efeito tóxico do cyclo-RGDfV. A Figura 34 mostra também que para concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$ não é possível observar uma diferença estatística em relação ao controle.

Figura 34. Ensaio de MTT mostrando o efeito da concentração de NPSi funcionalizadas com RGDfV na viabilidade celular para um tempo de incubação de 3 horas. CT é o controle e PBS é o tampão onde o aptâmero é dissolvido. ** Diferença estatística comparada ao controle, $p < 0,05$.

O resultado obtido para 3 horas de incubação é insatisfatório, pois mostra uma baixa eficácia na diminuição do crescimento das células metastáticas. A partir disso podemos afirmar que um fator determinante para este tipo de estudo é o tempo de incubação, como pode ser comprovado ao analisarmos a Figura 35 na qual podem ser observados os histogramas da viabilidade celular em função da concentração crescente de nanopartículas funcionalizadas para um tempo de incubação de 24 horas.

Figura 35. Ensaio de MTT mostrando o efeito da concentração de NPSi funcionalizadas com RGDfV na viabilidade celular para um tempo de incubação de 24 horas. CT é o controle só células e PBS é o tampão onde o aptâmero é dissolvido. **, *** Diferença estatística comparada ao controle, $p < 0,05$.

Na figura 35, utilizando o tempo de incubação de 24 horas e nas mesmas condições do gráfico anterior (Figura 34, ensaio para 3 horas), podemos observar uma redução da viabilidade celular já nas concentrações de 1 µg/ml, com uma viabilidade celular de $54 \% \pm 1,04$. Para concentrações de 5, 10 e 20 µg/ml houve uma pronunciada redução na viabilidade celular porém não houve uma diferença estatística significativa entre si.

Comparando os gráficos dos ensaios de MTT para 3 e 24 horas de incubação, podemos concluir que há um pronunciado efeito tóxico da associação das nanopartículas com o cyclo-RGDfV durante o tempo de incubação de 24 horas, sendo esta uma condição importante a ser mantida nos futuros experimentos relacionados à utilização do RGDfV para a redução de viabilidade celular de linhagens B16-F10 de melanoma murino. Podemos também observar que para tempos de incubação de 24 horas não há uma diferença significativa entre a utilização de 5, 10 ou 20 µg/ml de NPSi-RGDfV para conseguir uma significativa diminuição na viabilidade celular, podendo-se estabelecer a concentração de 5 µg/ml como uma concentração ideal. Esta última observação foi importante, pois nos permitiu utilizar uma baixa concentração do RGDfV nos experimentos para obter uma redução da viabilidade celular satisfatória, diminuindo assim os efeitos colaterais devidos à concentração. Cabe lembrar também que o efeito tóxico

observado, nestes ensaios, deve ser inteiramente relacionado ao RGDfV e não às nanopartículas de silício poroso, pois como já foi demonstrado, anteriormente, nos experimentos de biocompatibilidade as nanopartículas de silício, não possuem efeitos tóxicos significativos na viabilidade celular.

4.5 Estudos iniciais de internalização de PcCIAI por eletroporação

Nesta seção discutiremos os principais resultados alcançados nos experimentos de transfecção por eletroporação de moléculas de PcCIAI em células metastáticas de melanoma murino. Esses estudos foram realizados pela necessidade de estabelecer uma metodologia e técnica para internalizar NPSi associado a moléculas de interferência (siRNA) em células cancerígenas a ser realizado em estudos posteriores. Os resultados aqui mostrados são discutidos tendo em consideração as condições e métodos experimentais usados, como por exemplo, os relacionados com os parâmetros elétricos, testes iniciais de simulação, ação do campo elétrico nas células, citotoxicidade de ftalocianina e por ultimo das informações obtidas a partir dos espectros de fluorescência das moléculas de ftalocianina internalizadas.

4.5.1 Parâmetros de eletroporação

Os parâmetros elétricos que foram estabelecidos segundo a metodologia descrita na seção 2.2.1, nos permitiram estabelecer as condições de eletroporação mais adequadas. O gerador de pulsos é predefinido para a escolha de pulsos de corrente contínua ou pulsada, sendo que os pulsos de onda quadrada são as mais indicadas para a eletroporação. Ao longo dos experimentos de simulação e durante os ensaios *in vitro*, os sinais elétricos foram monitorados com um osciloscópio. Esse osciloscópio nos permitiu observar o valor da corrente elétrica aplicada nas células em termos de uma diferença de potencial (V) em função do tempo de duração dos pulsos de corrente (t). O perfil dessas ondas pode ser observado no esquema da Figura 36. Nessa figura, uma sequência de pulsos com valor máximo de corrente do pico de 31 Volts, frequência de 10 Hz, tempo de duração de cada pulso de 50 ms e intervalo de 660 ms entre cada sequência de pulsos, foi gerado por uma corrente de 500 μ A (condição experimental A). Analogamente ao caso anterior, uma corrente de

100 μA gerou pulsos de corrente de 16,33 Volts de valor de pico máximo e com as mesmas características de frequência, tempo de duração de pulso e intervalo entre sequência de pulsos (condição experimental B). Cabe destacar que o valor da voltagem medida neste experimento não obedece exatamente à lei de Ohm, pois o valor da resistência (R) sofre flutuações por causa das reações eletroquímicas envolvidas. Dessa forma, as células foram submetidas à ação de um campo elétrico cujo vetor, módulo e direção variam simultaneamente com a variação da polaridade das cargas elétricas. A alternância nos valores do vetor do campo elétrico em positivos e negativos, durante a eletroporação, evita que reações eletroquímicas irreversíveis provoquem, entre outras coisas, mudanças na composição do meio e desnaturação de proteínas das células. A passagem da corrente elétrica num único sentido, ou seja, com uma única polaridade induz reações eletroquímicas irreversíveis que, como se sabe, levam à oxidação ou redução dos componentes de uma reação.

Figura 36. Esquema representativo do perfil da sequência de pulsos de eletroporação

4.5.2 Internalização da PcCIAI e Viabilidade celular

As moléculas de ftalocianina foram escolhidas por suas excelentes propriedades fluorescentes e por ser também de amplo estudo no laboratório de Fotobiologia e Fotomedicina do Departamento de Química da Universidade de São Paulo, onde foram realizados os experimentos.

Os resultados da viabilidade celular pelo método de MTT e a eficiência de internalização da PcCIAI nas células são inferidos a partir dos gráficos da Figura 37 (a, b, c, d) respectivamente. As Figuras 37 (a) e 37 (c) mostram os perfis das curvas de emissão de fluorescência das moléculas de PcCIAI incorporadas nas células com e sem eletroporação, nas condições experimentais (A) e (B) respectivamente. Nessas figuras podem ser observados os picos de emissão de fluorescência da PcCIAI internalizada, localizados em 680 nm do espectro eletromagnético. A partir das Figuras 37 (a) e 37 (c), podem ser inferidas as diferenças entre o método de internalização de ftalocianina usando nanoemulsão (curvas (a)) e pela técnica de eletroporação (curvas (b)), realizadas nas condições experimentais mostradas na tabela 1. Os resultados nos sugerem, inicialmente, que as nanoemulsões (NE) continuam sendo um meio altamente eficaz na incorporação de fármacos no interior das células (resultados inferidos a partir das intensidades de fluorescência). Em ambas as Figuras 37 (a) e (c), as intensidades de fluorescência são significativamente menores para os grupos que sofreram a ação do campo elétrico (curvas (b)). Embora possa ser observadas diferenças nas intensidades de fluorescência, os resultados obtidos ainda não podem ser interpretados diretamente como sendo uma comparação da eficiência de internalização de ambos os métodos, sendo necessários mais experimentos para interpretar a causa dos fenômenos envolvidos que levam a esses resultados.

Por outro lado nas Figuras 37 (b) e 37 (d) são mostrados os resultados em triplicata da viabilidade celular em função da ação do campo elétrico aplicado e concentrações de NE e NE-PcCIAI (para as condições experimentais (A) e (B)). Nessas figuras, CT2, NE2 e NEPc2 representam os grupos nos quais foram aplicados o campo elétrico na eletroporação e NE1 e NEPc1 representam os grupos

de comparação que não sofrem a ação do campo elétrico, sendo que CT1 é o controle.

Os resultados podem ser obtidos comparando o grupo de controle (CT1) com o grupo CT2 (sem formulação) que sofre a ação do campo elétrico. O mesmo grupo de controle CT1 pode ser comprado como os grupos NE2 (apenas nanoemulsão) e NEPc2 (nanoemulsões associados a ftalocianina de cloroalumínio) que sofrem também a ação do campo elétrico. Ao mesmo tempo o experimento permite comparar a viabilidade celular em relação ao controle (CT1) dos grupos que não sofrem a ação do campo elétrico, ou seja, NE1 (apenas a nanoemulsão) e NEPc1 (nanoemulsão associada a ftalocianina).

A partir das Figuras 37 (b) e 37 (d) podemos observar que para os valores de campo elétrico aplicado e concentrações de ftalocianina usadas no experimento, não foi possível observar uma diferença estatística na viabilidade celular em relação ao controle. Devido ao fato de a membrana celular ser o principal obstáculo para a internalização da ftalocianina, essa técnica de eletroporação foi usada para causar uma permeabilidade transiente da membrana celular e facilitar, dessa forma, a absorção celular desse composto.

Figura 37. (a) e (c) Espectros de emissão de fluorescência da PcCIAI incorporadas em células B16-F10 nas condições experimentais (A) e (B) respectivamente. (b) e (d) Ensaio de MTT mostrando o efeito do campo elétrico e concentração NEPcCIAI na viabilidade celular, realizadas nas condições experimentais (A) e (B), respectivamente, não há, estatisticamente, diferenças em relação ao controle.

As figuras 37 (b) e 37 (d) mostram que não há diminuição do crescimento celular causado pela internalização da PcCIAI e nem pelo campo elétrico aplicado na eletroporação. A intensidade do campo elétrico aplicado, nesse experimento, não danificou a integridade da membrana celular a ponto de causar a morte celular, garantindo, assim, sua utilização em experimentos futuros. Dessa forma, os resultados obtidos, nesse experimento, serviram como base para avaliar, futuramente, a viabilidade celular de processos de transfecção por eletroporação utilizando si-RNA associado à nanopartículas de silício poroso (NPSi). Esta etapa do trabalho deverá ser realizada *in vitro* e *in vivo*, complementando o trabalho desenvolvido.

CONCLUSÕES

- Os resultados destes estudos mostraram que o método eletroquímico seguido de oxidação química e ultrasonicação permitem obter nanopartículas com emissão de fluorescência na região verde (532 nm), vermelho (630 e 650 nm) e infravermelho próximo (862 e 980 nm) do espectro eletromagnético.
- Embora apresente heterogeneidade nos seus tamanhos, para obter as nanopartículas de silício com luminescência discreta e tamanhos definidos seria necessário a purificação por procedimentos de filtração, cromatografia ou procedimentos de centrifugação, usando gradientes de velocidade.
- É importante também a oxidação química ou a incubação das nanopartículas, em meio aquoso, para ativar sua fotoluminescência, ausente em meio orgânico.
- Para uma maior eficiência (maior rendimento) na obtenção das nanopartículas é necessário o controle mais cuidadoso nos parâmetros de processamento, particularmente os processo de enxágue, secagem e ultrasonicação dos filmes de silício poroso.
- O tamanho das nanopartículas e sua capacidade de emissão em uma região discreta do espectro são diretamente dependentes dos parâmetros de processamento (particularmente a resistividade do material, concentração do HF, tempo de anodização e a densidade de corrente).
- O aumento na intensidade de fluorescência e a variação do tamanho e o potencial zeta das nanopartículas funcionalizadas sugerem que a adsorção do RGDfV na superfície das nanopartículas estão acontecendo.
- A mudança no perfil dos espectros de RMN-H das moléculas de RGDfV, após sua associação com nanopartículas de silício, sugere que a interação entre estas duas substâncias acontece efetivamente.

- A falta de toxicidade das NPSi *in vitro* comprovada usando o método de MTT, mostra uma característica biocompatível muito importante desta substância e confirma também a possibilidade da sua aplicação em sistemas biológicos.
- Os ensaios de citotoxicidade do RGDfV pelo método MTT e as observações de microscopia óptica mostraram, efetivamente, as propriedades inibitórias do crescimento de células metastáticas deste aptâmero, especialmente, se o tempo de incubação for maior do que 3 horas.
- Comparando os ensaios de MTT para 3 e 24 horas de incubação, podemos concluir que há um pronunciado efeito citotóxico da associação das nanopartículas com o RGDfV para um tempo de incubação de 24 horas; sendo esta uma condição importante a ser mantida nos futuros experimentos relacionados à utilização desse inibidor para a redução da viabilidade celular de linhagens B16-F10.
- Os estudos iniciais de internalização de moléculas de PcCIAI por eletroporação mostraram resultados satisfatórios, inferidos a partir dos espectros de fluorescência.
- Os ensaios de viabilidade celular relacionados ao efeito do campo elétrico aplicado e à relativa toxicidade das moléculas de PcCIAI mostraram que esses dois fatores, em particular o campo elétrico aplicado na eletroporação, não causam a diminuição da viabilidade celular.
- As condições experimentais adotadas para a internalização da PcCIAI nas células sugerem que a técnica de eletroporação usada neste trabalho pode servir como uma valiosa ferramenta para a internalização de fármacos.

REFERECIA BIBLIOGRAFICA

- ACOSTA, A. A. Silício poroso funcionalizado com moléculas de azul de metileno para aplicações em sensores químicos, *Dissertação de Mestrado*, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2009.
- AGUZZI, M. S.; GIAMPIETRI, C.; DE MARCHIS, F.; PADULA, F.; GAETA, R.; RAGONE, G.; CAPOGROSSI, M. C.; FACCHIANO, A. RGDS peptide induces caspase 8 and caspase 9 activation in human endothelial cells, *Blood*, v. 103, p. 4180-4187, June 2004.
- AMATO, G.; BULLARA, V.; BRUNETTO, N.; BOARINO, L. Drying of porous silicon: A Raman, electron microscopy, and photoluminescence study, *Thin Solid Films*, v. 276, p. 204-207, Apr. 1996.
- AMBROSONE, A.; MATTERA, L.; MARCHESANO, V.; QUARTA, A.; SUSHA, A. S.; TINO, A.; ROGACH, A. L.; TORTIGLIONE, C. Mechanisms underlying toxicity induced by CdTe quantum dots determined in an invertebrate model organism, *Biomaterials*, v. 33, p. 1991-2000, Mar. 2012.
- ANGLIN, E. J.; CHENG, L. Y.; FREEMAN, W. R.; SAILOR, M. J. Porous silicon in drug delivery devices and materials, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, p. 1266-1277, Aug. 2008.
- ARGENTIERI, A.; CORSI, F.; FORESTA, M.; MARZOCCA, C.; DEL GUERRA, A. Design and characterization of CMOS multichannel front-end electronics for silicon photomultipliers, *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section A-Accelerators Spectrometers Detectors and Associated Equipment*, v. 652, p. 516-519, Oct. 2011.
- AROSIO, D.; MANZONI, L.; ARALDI, E. M. V.; SCOLASTICO, C. Cyclic RGD Functionalized Gold Nanoparticles for Tumor Targeting, *Bioconjugate Chemistry*, v. 22, p. 664-672, Apr. 2011.
- ARTEMOV, D.; MORI, N.; OKOLLIE, B.; BHUJWALLA, Z. M. MR molecular imaging of the Her-2/neu receptor in breast cancer cells using targeted iron oxide nanoparticles, *Magnetic Resonance in Medicine*, v. 49, p. 403-408, Mar. 2003.
- BAHRUJI, H.; BOWKER, M.; DAVIES, P. R. Photoactivated reaction of water with silicon nanoparticles, *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p. 8504-8510, Oct. 2009.
- BALLOU, B.; LAGERHOLM, B. C.; ERNST, L. A.; BRUCHEZ, M. P.; WAGGONER, A. S. Noninvasive imaging of quantum dots in mice, *Bioconjugate Chemistry*, v. 15, p. 79-86, Jan. 2004.
- BAR-MEIR, E.; EHERENFELD, M.; SHOENFELD, Y. Silicone gel breast implants and connective tissue disease - A comprehensive review, *Autoimmunity*, v. 36, p. 193-197, July 2003.
- BARBUGLI, P. A.; SIQUEIRA-MOURA, M. P.; ESPREAFICO, E. M.; TEDESCO, A. C. In Vitro Phototoxicity of Liposomes and Nanocapsules Containing Chloroaluminum Phthalocyanine on Human Melanoma Cell Line, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 10, p. 569-573, Jan. 2010.
- BAYLISS, S. C.; HEALD, R.; FLETCHER, D. I.; BUCKBERRY, L. D. The culture of mammalian cells on nanostructured silicon, *Advanced Materials*, v. 11, p. 318-321, Mar. 1999.

- BELOMOIN, G.; THERRIEN, J.; SMITH, A.; RAO, S.; TWESTEN, R.; CHAIEB, S.; NAYFEH, M. H.; WAGNER, L.; MITAS, L. Observation of a magic discrete family of ultrabright Si nanoparticles, *Applied Physics Letters*, v. 80, p. 841-843, Feb.2002.
- BELVISI, L.; RICCIONI, T.; MARCELLINI, M.; VESCI, L.; CHIARUCCI, I.; EFRATI, D.; POTENZA, D.; SCOLASTICO, C.; MANZONI, L.; LOMBARDO, K.; STASI, M. A.; ORLANDI, A.; CIUCCI, A.; NICO, B.; RIBATTI, D.; GIANNINI, G.; PRESTA, M.; CARMINATI, P.; PISANO, C. Biological and molecular properties of a new $\alpha(v)\beta(3)/\alpha(v)\beta(5)$ integrin antagonist, *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 4, p. 1670-1680, Nov.2005.
- BHURE, R.; MAHAPATRO, A. Silicon Based Nanocoatings on Metal Alloys and Their Role in Surface Engineering, *Silicon*, v. 2, p. 117-151, July2010.
- BISI, O.; OSSICINI, S.; PAVESI, L. Porous silicon: a quantum sponge structure for silicon based optoelectronics, *Surface Science Reports*, v. 38, p. 1-126, 2000.
- BLEY, R. A.; KAUZLARICH, S. M.; DAVIS, J. E.; LEE, H. W. H. Characterization of silicon nanoparticles prepared from porous silicon, *Chemistry of Materials*, v. 8, p. 1881-1888, Aug.1996.
- BOLFARINI, G. C.; SIQUEIRA-MOURA, M. P.; DEMETS, G. J. F.; TEDESCO, A. C. Preparation, characterization, and in vitro phototoxic effect of zinc phthalocyanine cucurbit[7]uril complex encapsulated into liposomes, *Dyes and Pigments*, v. 100, p. 162-167, Jan.2014.
- BORISSEVITCH, I. E.; PARRA, G. G.; ZAGIDULLIN, V. E.; LUKASHEV, E. P.; KNOX, P. P.; PASCHENKO, V. Z.; RUBIN, A. B. Cooperative effects in CdSe/ZnS-PEGOH quantum dot luminescence quenching by a water soluble porphyrin, *Journal of Luminescence*, v. 134, p. 83-87, Feb.2013.
- BOUKHERROUB, R. Chemical reactivity of hydrogen-terminated crystalline silicon surfaces, *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, v. 9, p. 66-72, Feb.2005.
- BRAYDEN, D. J. Novel drug delivery strategies in veterinary medicine, *Irish Veterinary Journal*, v. 56, p. 310-316, June2003.
- BREMER, C.; WEISSLEDER, R. Molecular imaging - In vivo imaging of gene expression: MR and optical technologies, *Academic Radiology*, v. 8, p. 15-23, Jan.2001.
- BROOKS, P. C.; MONTGOMERY, A. M. P.; ROSENFELD, M.; REISFELD, R. A.; HU, T. H.; KLIER, G.; CHERESH, D. A. Integrin $\alpha(V)\beta(3)$ Antagonists Promote Tumor-Regression by Inducing Apoptosis of Angiogenic Blood-Vessels, *Cell*, v. 79, p. 1157-1164, Dec.1994.
- BURIAK, J. M. High surface area silicon materials: fundamentals and new technology, *Philosophical Transactions of the Royal Society A-Mathematical Physical and Engineering Sciences*, v. 364, p. 217-225, Jan.2006.
- BUSTAMANTE, J.; DOCK, L.; VAHTER, M.; FOWLER, B.; ORRENIUS, S. The semiconductor elements arsenic and indium induce apoptosis in rat thymocytes, *Toxicology*, v. 118, p. 129-136, Mar.1997.
- CANHAM, L.; SLINGER, C. Porous silicon lights up micro-optics, *Physics World*, v. 10, p. 24, Oct.1997.

- CANHAM, L. T. Silicon Quantum Wire Array Fabrication by Electrochemical and Chemical Dissolution of Wafers, *Applied Physics Letters*, v. 57, p. 1046-1048, Sept.1990.
- CANHAM, L. T. Bioactive silicon structure fabrication through nanoetching techniques, *Advanced Materials*, v. 7, p. 1033-&, Dec.1995.
- CAPELLO, A.; KRENNING, E. P.; BERNARD, B. F.; BREEMAN, W. A. P.; ERION, J. L.; DE JONG, M. Anticancer activity of targeted proapoptotic peptides, *Journal of Nuclear Medicine*, v. 47, p. 122-129, Jan.2006.
- CAVA, R. D.; OLIVEIRA, D. P.; YONAMINE, T.; MOREIRA, J. J. A.; BOTTA, W. J.; KIMINAMI, C. S.; BOLFARINI, C. Microstructural characterization of high-silicon iron alloys produced by spray forming and co-injection of Si particles, *Journal of Alloys and Compounds*, v. 509, p. S254-S259, June2011.
- CHAPIN, D. M.; FULLER, C. S.; PEARSON, G. L. A New Silicon P-N Junction Photocell for Converting Solar Radiation Into Electrical Power, *Journal of Applied Physics*, v. 25, p. 676-677, 1954.
- CHATTERJEE, S.; BRITE, K. H.; MATSUMURA, A. Induction of apoptosis of integrin-expressing human prostate cancer cells by cyclic Arg-Gly-Asp peptides, *Clinical Cancer Research*, v. 7, p. 3006-3011, Oct.2001.
- CHATTERJEE, S.; MATSUMURA, A.; SCHRADERMEIER, J.; GILLESPIE, G. Y. Human malignant glioma therapy using anti- $\alpha(v)\beta(3)$ integrin agents, *Journal of Neuro-Oncology*, v. 46, p. 135-144, 2000.
- CHAZALVIEL, J. N.; WEHRSPHON, R. B.; OZANAM, F. Electrochemical preparation of porous semiconductors: from phenomenology to understanding, *Materials Science and Engineering B-Solid State Materials for Advanced Technology*, v. 69, p. 1-10, Jan.2000.
- CHERUKURI, P.; GANNON, C. J.; LEEUW, T. K.; SCHMIDT, H. K.; SMALLEY, R. E.; CURLEY, S. A.; WEISMAN, R. B. Mammalian pharmacokinetics of carbon nanotubes using intrinsic near-infrared fluorescence, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, p. 18882-18886, Dec.2006.
- CHOI, H. S.; LIU, W.; MISRA, P.; TANAKA, E.; ZIMMER, J. P.; IPE, B. I.; BAWENDI, M. G.; FRANGIONI, J. V. Renal clearance of quantum dots, *Nature Biotechnology*, v. 25, p. 1165-1170, Oct.2007a.
- CHOI, J.; WANG, N. S.; REIPA, V. Photoassisted tuning of silicon nanocrystal photoluminescence, *Langmuir*, v. 23, p. 3388-3394, Mar.2007b.
- CHOI, J.; WANG, N. S.; REIPA, V. Conjugation of the photoluminescent silicon nanoparticles to streptavidin, *Bioconjugate Chemistry*, v. 19, p. 680-685, Mar.2008.
- CHOI, J.; ZHANG, Q.; REIPA, V.; WANG, N. S.; STRATMEYER, M. E.; HITCHINS, V. M.; GOERING, P. L. Comparison of cytotoxic and inflammatory responses of photoluminescent silicon nanoparticles with silicon micron-sized particles in RAW 264.7 macrophages, *Journal of Applied Toxicology*, v. 29, p. 52-60, Jan.2009.
- CULLIS, A. G.; CANHAM, L. T.; CALCOTT, P. D. J. The structural and luminescence properties of porous silicon, *Journal of Applied Physics*, v. 82, p. 909-965, Aug.1997.

- CUNIN, F.; SCHMEDAKE, T. A.; LINK, J. R.; LI, Y. Y.; KOH, J.; BHATIA, S. N.; SAILOR, M. J. Biomolecular screening with encoded porous-silicon photonic crystals, *Nature Materials*, v. 1, p. 39-41, Sept.2002.
- DECUZZI, P.; GODIN, B.; TANAKA, T.; LEE, S. Y.; CHIAPPINI, C.; LIU, X.; FERRARI, M. Size and shape effects in the biodistribution of intravascularly injected particles, *Journal of Controlled Release*, v. 141, p. 320-327, Feb.2010.
- DERFUS, A. M.; CHAN, W. C. W.; BHATIA, S. N. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots, *Nano Letters*, v. 4, p. 11-18, Jan.2004.
- DERFUS, A. M.; CHEN, A. A.; MIN, D. H.; RUOSLAHTI, E.; BHATIA, S. N. Targeted quantum dot conjugates for siRNA delivery, *Bioconjugate Chemistry*, v. 18, p. 1391-1396, Sept.2007.
- DUBEY, R. S.; GAUTAM, D. K. Synthesis and characterization of porous silicon layers for 1D photonic crystal application, *Optik*, v. 122, p. 494-497, 2011.
- ECKHOFF, D. A.; SUTIN, J. D. B.; CLEGG, R. M.; GRATTON, E.; ROGOZHINA, E. V.; BRAUN, P. V. Optical characterization of ultrasmall Si nanoparticles prepared through electrochemical dispersion of bulk Si, *Journal of Physical Chemistry B*, v. 109, p. 19786-19797, Oct.2005.
- FALQUEIRO, A. M.; PRIMO, F. L.; MORAIS, P. C.; MOSINIEWICZ-SZABLEWSKA, E.; SUCHOCKI, P.; TEDESCO, A. C. Selol-loaded magnetic nanocapsules: A new approach for hyperthermia cancer therapy, *Journal of Applied Physics*, v. 109, Apr.2011.
- FANG, A. W.; PARK, H.; COHEN, O.; JONES, R.; PANICCIA, M. J.; BOWERS, J. E. Electrically pumped hybrid AlGaInAs-silicon evanescent laser, *Optics Express*, v. 14, p. 9203-9210, Oct.2006.
- FAROKHZAD, O. C.; CHENG, J. J.; TEPLY, B. A.; SHERIFI, I.; JON, S.; KANTOFF, P. W.; RICHIE, J. P.; LANGER, R. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, p. 6315-6320, Apr.2006.
- FEAZELL, R. P.; NAKAYAMA-RATCHFORD, N.; DAI, H.; LIPPARD, S. J. Soluble single-walled carbon nanotubes as longboat delivery systems for Platinum(IV) anticancer drug design, *Journal of the American Chemical Society*, v. 129, p. 8438+, July2007.
- FENZL, C.; HIRSCH, T.; WOLFBEIS, O. S. Photonic Crystals for Chemical Sensing and Biosensing, *Angewandte Chemie-International Edition*, v. 53, p. 3318-3335, Mar.2014.
- FOLL, H.; CHRISTOPHERSEN, M.; CARSTENSEN, J.; HASSE, G. Formation and application of porous silicon, *Materials Science & Engineering R-Reports*, v. 39, p. 93-141, Nov.2002.
- GABIZON, A.; SHMEEDA, H.; GRENADER, T. Pharmacological basis of pegylated liposomal doxorubicin: Impact on cancer therapy, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 45, p. 388-398, Mar.2012.
- GAO, X. H.; CUI, Y. Y.; LEVENSON, R. M.; CHUNG, L. W. K.; NIE, S. M. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots, *Nature Biotechnology*, v. 22, p. 969-976, Aug.2004.
- GASPAR, M. M.; PEREZSOLER, R.; CRUZ, M. E. M. Biological characterization of L-asparaginase liposomal formulations, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 38, p. 373-377, Aug.1996.

- GHOSH, B.; SHIRAHATA, N. Colloidal silicon quantum dots: synthesis and luminescence tuning from the near-UV to the near-IR range, *Science and Technology of Advanced Materials*, v. 15, Feb.2014.
- GLEICH, B.; WEIZENECKER, J.; BORGERT, J. Experimental results on fast 2D-encoded magnetic particle imaging, *Physics in Medicine and Biology*, v. 53, p. N81-N84, Mar.2008.
- GODEFROO, S.; HAYNE, M.; JIVANESCU, M.; STESMANS, A.; ZACHARIAS, M.; LEBEDEV, O. I.; VAN TENDELOO, G.; MOSHCHALKOV, V. V. Classification and control of the origin of photoluminescence from Si nanocrystals, *Nat Nano*, v. 3, p. 174-178, Mar.2008.
- GOETZBERGER, A.; HEBLING, C. Photovoltaic materials, past, present, future, *Solar Energy Materials and Solar Cells*, v. 62, p. 1-19, Apr.2000.
- GONCHAR, K. A.; MUSABEK, G. K.; TAURBAYEV, T. I.; TIMOSHENKO, V. Y. Enhancement of Photoluminescence and Raman Scattering in One-Dimensional Photonic Crystals Based on Porous Silicon, *Semiconductors*, v. 45, p. 614-617, May2011.
- GRANITZER, P.; RUMPF, K. Porous Silicon-A Versatile Host Material, *Materials*, v. 3, p. 943-998, Feb.2010.
- GREBENNIKOV, A. V. A-type granites and related rocks: petrogenesis and classification (vol 55, pg 1074, 2014), *Russian Geology and Geophysics*, v. 55, p. 1353, Nov.2014.
- GU, L.; RUFF, L. E.; QIN, Z. T.; CORR, M.; HEDRICK, S. M.; SAILOR, M. J. Multivalent Porous Silicon Nanoparticles Enhance the Immune Activation Potency of Agonistic CD40 Antibody, *Advanced Materials*, v. 24, p. 3981-3987, Aug.2012.
- GUPTA, A.; WIGGERS, H. Surface chemistry and photoluminescence property of functionalized silicon nanoparticles, *Physica E-Low-Dimensional Systems & Nanostructures*, v. 41, p. 1010-1014, May2009.
- HEINRICH, J. L.; CURTIS, C. L.; CREDO, G. M.; KAVANAGH, K. L.; SAILOR, M. J. Luminescent Colloidal Silicon Suspensions from Porous Silicon, *Science*, v. 255, p. 66-68, Jan.1992.
- HERINO, R. Nanocomposite materials from porous silicon, *Materials Science and Engineering B-Solid State Materials for Advanced Technology*, v. 69, p. 70-76, Jan.2000.
- HOFMEISTER, H.; HUISKEN, F.; KOHN, B. Lattice contraction in nanosized silicon particles produced by laser pyrolysis of silane, *European Physical Journal D*, v. 9, p. 137-140, Dec.1999.
- HOLMES, J. D.; ZIEGLER, K. J.; DOTY, R. C.; PELL, L. E.; JOHNSTON, K. P.; KORGEL, B. A. Highly luminescent silicon nanocrystals with discrete optical transitions, *Journal of the American Chemical Society*, v. 123, p. 3743-3748, Apr.2001.
- HORCAJADA, P.; RAMILA, A.; PEREZ-PARIENTE, J.; VALLET-REGI, M. Influence of pore size of MCM-41 matrices on drug delivery rate, *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 68, p. 105-109, Mar.2004.
- HUA, F. J.; SWIHART, M. T.; RUCKENSTEIN, E. Efficient surface grafting of luminescent silicon quantum dots by photoinitiated hydrosilylation, *Langmuir*, v. 21, p. 6054-6062, June2005.
- HUANCA, D. R. Microtubos e nanotubos de silício fabricados por processos químicos e eletroquímicos, *POLI-USP*, 2010.

- HUANCA, D. R.; RAMIREZ-FERNANDEZ, F. J.; SALCEDO, W. J. Porous silicon optical cavity structure applied to high sensitivity organic solvent sensor, *Microelectronics Journal*, v. 39, p. 499-506, Mar.2008.
- JAGANATHAN, H.; GODIN, B. Biocompatibility assessment of Si-based nano- and micro-particles, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 64, p. 1800-1819, Dec.2012.
- JARVIS, K. L.; BARNES, T. J.; PRESTIDGE, C. A. Aqueous and Thermal Oxidation of Porous Silicon Microparticles: Implications on Molecular Interactions, *Langmuir*, v. 24, p. 14222-14226, Dec.2008.
- KERN, W. The Evolution of Silicon-Wafer Cleaning Technology, *Journal of the Electrochemical Society*, v. 137, p. 1887-1892, June1990.
- KILPELAINEN, M.; RIIKONEN, J.; VLASOVA, M. A.; HUOTARI, A.; LEHTO, V. P.; SALONEN, J.; HERZIG, K. H.; JARVINEN, K. In vivo delivery of a peptide, ghrelin antagonist, with mesoporous silicon microparticles, *Journal of Controlled Release*, v. 137, p. 166-170, July2009.
- KIM, D.; PARK, S.; LEE, J. H.; JEONG, Y. Y.; JON, S. Antibiofouling polymer-coated gold nanoparticles as a contrast agent for in vivo X-ray computed tomography imaging (vol 129, pg 7661, 2007), *Journal of the American Chemical Society*, v. 129, p. 12585, Oct.2007.
- KIMURA, Y.; NEMOTO, J.; NIWANO, M. Electrochemistry on Si(100) in a hydrofluoric acid solution at cathodic potential regions, *Materials Science and Engineering B-Solid State Materials for Advanced Technology*, v. 96, p. 107-110, Nov.2002.
- KISHIDA, T.; ASADA, H.; GOJO, S.; OHASHI, S.; SHIN-YA, M.; YASUTOMI, K.; TERAUCHI, R.; TAKAHASHI, K. A.; KUBO, T.; IMANISHI, J.; MAZDA, O. Sequence-specific gene silencing in murine muscle induced by electroporation-mediated transfer of short interfering RNA, *Journal of Gene Medicine*, v. 6, p. 105-110, Jan.2004.
- KOLASINSKI, K. W. Silicon nanostructures from electroless electrochemical etching, *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, v. 9, p. 73-83, Feb.2005.
- KONDRATYEVA, L. M.; GOLUBEVA, E. M. Formation of iron minerals on zeolite matrix, *Russian Geology and Geophysics*, v. 55, p. 1387-1394, Dec.2014.
- KORDAS, K.; PAP, A. E.; BEKE, S.; LEPPAVUORI, S. Optical properties of porous silicon. Part I: Fabrication and investigation of single layers, *Optical Materials*, v. 25, p. 251-255, Apr.2004.
- KOTULSKA, M.; KUBICA, K.; KORONKIEWICZ, S.; KALINOWSKI, S. Modeling the induction of lipid membrane electroporabilization, *Bioelectrochemistry*, v. 70, p. 64-70, Jan.2007.
- KRAUSE, W. Delivery of diagnostic agents in computed tomography, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 37, p. 159-173, May1999.
- LAMBREVA, M.; GLUCK, B.; RADEVA, M.; BERG, H. Electroporation of cell membranes supporting penetration of photodynamic active macromolecular chromophore dextrans, *Bioelectrochemistry*, v. 62, p. 95-98, Apr.2004.
- LARSON, D. R.; ZIPFEL, W. R.; WILLIAMS, R. M.; CLARK, S. W.; BRUCHEZ, M. P.; WISE, F. W.; WEBB, W. W. Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo, *Science*, v. 300, p. 1434-1436, May2003.

- LEDOUX, G.; GUILLOIS, O.; PORTERAT, D.; REYNAUD, C.; HUISKEN, F.; KOHN, B.; PAILLARD, V. Photoluminescence properties of silicon nanocrystals as a function of their size, *Physical Review B*, v. 62, p. 15942-15951, Dec.2000.
- LEE, J. H.; HUH, Y. M.; JUN, Y.; SEO, J.; JANG, J.; SONG, H. T.; KIM, S.; CHO, E. J.; YOON, H. G.; SUH, J. S.; CHEON, J. Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging, *Nature Medicine*, v. 13, p. 95-99, Jan.2007.
- LEHMANN, V.; GOSELE, U. Porous Silicon Formation - A Quantum Wire Effect, *Applied Physics Letters*, v. 58, p. 856-858, Feb.1991.
- LEHMANN, V.; STENGL, R.; REISINGER, H.; DETEMPLE, R.; THEISS, W. Optical shortpass filters based on macroporous silicon, *Applied Physics Letters*, v. 78, p. 589-591, Jan.2001.
- LI, X. G.; HE, Y. Q.; TALUKDAR, S. S.; SWIHART, M. T. Process for preparing macroscopic quantities of brightly photoluminescent silicon nanoparticles with emission spanning the visible spectrum, *Langmuir*, v. 19, p. 8490-8496, Sept.2003.
- LI, Z. F.; RUCKENSTEIN, E. Water-soluble poly(acrylic acid) grafted luminescent silicon nanoparticles and their use as fluorescent biological staining labels, *Nano Letters*, v. 4, p. 1463-1467, Aug.2004.
- LITTAU, K. A.; SZAJOWSKI, P. J.; MULLER, A. J.; KORTAN, A. R.; BRUS, L. E. A Luminescent Silicon Nanocrystal Colloid Via A High-Temperature Aerosol Reaction, *Journal of Physical Chemistry*, v. 97, p. 1224-1230, Feb.1993.
- LIU, Y. Q.; BERGAN, R. Improved intracellular delivery of oligonucleotides by square wave electroporation, *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, v. 11, p. 7-14, Feb.2001.
- LIU, Z.; DAVIS, C.; CAI, W. B.; HE, L.; CHEN, X. Y.; DAI, H. J. Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, p. 1410-1415, Feb.2008.
- LOCKWOOD, R.; MCFARLANE, S.; NUNEZ, J. R. R.; WANG, X. Y.; VEINOT, J. G. C.; MELDRUM, A. Photoactivation of silicon quantum dots, *Journal of Luminescence*, v. 131, p. 1530-1535, July2011.
- MANGOLINI, L.; KORTSHAGEN, U. Plasma-assisted synthesis of silicon nanocrystal inks, *Advanced Materials*, v. 19, p. 2513-+, Sept.2007.
- MARANHO, D. S.; DE LIMA, R. G.; PRIMO, F. L.; DA SILVA, R. S.; TEDESCO, A. C. Photoinduced Nitric Oxide and Singlet Oxygen Release from ZnPC Liposome Vehicle Associated with the Nitrosyl Ruthenium Complex: Synergistic Effects in Photodynamic Therapy Application, *Photochemistry and Photobiology*, v. 85, p. 705-713, May2009.
- MATSUURA, M.; YAMAZAKI, Y.; SUGIYAMA, M.; KONDO, M.; ORI, H.; NANGO, M.; OKU, N. Polycation liposome-mediated gene transfer in vivo, *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, v. 1612, p. 136-143, June2003.
- MATTEI, G.; VALENTINI, V. In situ functional ization of porous silicon during the electrochemical formation process in ethanoic hydrofluoric acid solution, *Journal of the American Chemical Society*, v. 125, p. 9608-9609, Aug.2003.

- MCLAUGHLIN, J. K.; LIPWORTH, L.; MURPHY, D. K.; WALKER, P. S. The safety of silicone gel-filled breast implants - A review of the epidemiologic evidence, *Annals of Plastic Surgery*, v. 59, p. 569-580, Nov.2007.
- MEDINTZ, I. L.; UYEDA, H. T.; GOLDMAN, E. R.; MATTOUSSI, H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing, *Nature Materials*, v. 4, p. 435-446, June2005.
- MELIKOV, K. C.; FROLOV, V. A.; SHCHERBAKOV, A.; SAMSONOV, A. V.; CHIZMADZHEV, Y. A.; CHERNOMORDIK, L. V. Voltage-induced nonconductive pre-pores and metastable single pores in unmodified planar lipid bilayer, *Biophysical Journal*, v. 80, p. 1829-1836, Apr.2001.
- MICHALET, X.; PINAUD, F. F.; BENTOLILA, L. A.; TSAY, J. M.; DOOSE, S.; LI, J. J.; SUNDARESAN, G.; WU, A. M.; GAMBHIR, S. S.; WEISS, S. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics, *Science*, v. 307, p. 538-544, Jan.2005.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival - Application to Proliferation and Cyto-Toxicity Assays, *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.
- NARDI, L. V. S.; PLA-CID, J.; BITENCOURT, M. D.; STABEL, L. Z. Geochemistry and petrogenesis of post-collisional ultrapotassic syenites and granites from southernmost Brazil: the Piquiri Syenite Massif, *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, v. 80, p. 353-371, June2008.
- NAVEAS, N.; COSTA, V. T.; GALLACH, D.; HERNANDEZ-MONTELONGO, J.; PALMA, R. J. M.; GARCIA-RUIZ, J. P.; MANSO-SILVAN, M. Chemical stabilization of porous silicon for enhanced biofunctionalization with immunoglobulin, *Science and Technology of Advanced Materials*, v. 13, Aug.2012.
- NOVAK, P.; KNOTEK, V.; VODEROVA, M.; KUBASEK, J.; SERAK, J.; MICHALCOVA, A.; VOJTECH, D. Intermediary phases formation in Fe-Al-Si alloys during reactive sintering, *Journal of Alloys and Compounds*, v. 497, p. 90-94, May2010.
- OGATA, Y. H.; TSUBOI, T.; SAKKA, T.; NAITO, S. Oxidation of porous silicon in dry and wet environments under mild temperature conditions, *Journal of Porous Materials*, v. 7, p. 63-66, Jan.2000.
- OKAMOTO, H.; SUKEGAWA, K.; TOMATSU, S.; SUZUKI, Y.; ORII, T. Optimization of Electroporation for Transfection of Human Fibroblast Cell-Lines with Origin-Defective Sv40 Dna - Development of Human Transformed Fibroblast Cell-Lines with Mucopolysaccharidoses (I-Similar-To-Vii), *Cell Structure and Function*, v. 17, p. 123-128, Apr.1992.
- OSMINKINA, L. A.; LUCKYANOVA, E. N.; GONGALSKY, M. B.; KUDRYAVTSEV, A. A.; GAYDAROVA, A. K.; POLTAVTSEVA, R. A.; KASHKAROV, P. K.; TIMOSHENKO, V. Y.; SUKHIKH, G. T. Effects of Nanostructured Silicon on Proliferation of Stem and Cancer Cell, *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, v. 151, p. 79-83, May2011.
- OSTRAAT, M. L.; ATWATER, H. A.; FLAGAN, R. C. The feasibility of inert colloidal processing of silicon nanoparticles, *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 283, p. 414-421, Mar.2005.

- PAN, Y.; NEUSS, S.; LEIFERT, A.; FISCHLER, M.; WEN, F.; SIMON, U.; SCHMID, G.; BRANDAU, W.; JAHNEN-DECHENT, W. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles, *Small*, v. 3, p. 1941-1949, Nov.2007.
- PARK, J. H.; GU, L.; VON MALTZAHN, G.; RUOSLAHTI, E.; BHATIA, S. N.; SAILOR, M. J. Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for in vivo applications, *Nature Materials*, v. 8, p. 331-336, Apr.2009.
- PATEL, A.; TOIA, G. V.; COLLETTA, K.; BRADARIC, B. D.; CARVEY, P. M.; HENDEY, B. An angiogenic inhibitor, cyclic RGDfV, attenuates MPTP-induced dopamine neuron toxicity, *Experimental Neurology*, v. 231, p. 160-170, Sept.2011.
- PATTERSON, A. L. The Scherrer formula for x-ray particle size determination, *Physical Review*, v. 56, p. 978-982, Nov.1939.
- POLAND, C. A.; DUFFIN, R.; KINLOCH, I.; MAYNARD, A.; WALLACE, W. A. H.; SEATON, A.; STONE, V.; BROWN, S.; MACNEE, W.; DONALDSON, K. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study, *Nature Nanotechnology*, v. 3, p. 423-428, July2008.
- POPPELWELL, J. F.; KING, S. J.; DAY, J. P.; ACKRILL, P.; FIFIELD, L. K.; CRESSWELL, R. G.; DI TADA, M. L.; LIU, K. Kinetics of uptake and elimination of silicic acid by a human subject: A novel application of Si-32 and accelerator mass spectrometry, *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 69, p. 177-180, Feb.1998.
- PRIMO, F. L.; BENTLEY, M. V. L. B.; TEDESCO, A. C. Photophysical studies and in vitro skin permeation/retention of Foscan (R)/nanoemulsion (NE) applicable to photodynamic therapy skin cancer treatment, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 8, p. 340-347, Jan.2008.
- QIN, K. D.; LI, Y. C. Mechanisms of particle removal from silicon wafer surface in wet chemical cleaning process, *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 261, p. 569-574, May2003.
- RABIN, O.; PEREZ, J. M.; GRIMM, J.; WOJTKIEWICZ, G.; WEISSLEDER, R. An X-ray computed tomography imaging agent based on long-circulating bismuth sulphide nanoparticles, *Nature Materials*, v. 5, p. 118-122, Feb.2006.
- RABUSSAY, D. P.; NANDA, G. S.; GOLDFARB, P. M. Enhancing the Effectiveness of Drug-based Cancer Therapy by Electroporation (Electropermeabilization), *Technology in Cancer Research & Treatment*, v. 1, p. 71-82, Feb.2002.
- RAHMER, J.; WEIZENECKER, J.; GLEICH, B.; BORGERT, J. Analysis of a 3-D System Function Measured for Magnetic Particle Imaging, *Ieee Transactions on Medical Imaging*, v. 31, p. 1289-1299, June2012.
- RAMOS, D. M.; BERSTON, E. D.; KRAMER, R. H. Analysis of Integrin Receptors for Laminin and Type-Iv Collagen on Metastatic B16 Melanoma-Cells, *Cancer Research*, v. 50, p. 728-734, Feb.1990.
- REIMANN, S. M.; MANNINEN, M. Electronic structure of quantum dots, *Reviews of Modern Physics*, v. 74, p. 1283-1342, Oct.2002.
- REINHARDT, K. A.; WERNER, K. **Handbook of Silicon Wafer Cleaning Technology** Second Edition ed. 2008.

- REINHARDT, K. A.; KERN, W. Overview and Evolution of Silicon Wafer Cleaning Technology. In: WILLIAM ANDREW PUBLISHING. **Handbook of Silicon Wafer Cleaning Technology (2nd Edition)**. 2008.
- ROGOZHINA, E. V.; ECKHOFF, D. A.; GRATTON, E.; BRAUN, P. V. Carboxyl functionalization of ultrasmall luminescent silicon nanoparticles through thermal hydrosilylation, *Journal of Materials Chemistry*, v. 16, p. 1421-1430, Apr.2006.
- RUOSLAHTI, E.; REED, J. C. Anchorage Dependence, Integrins, and Apoptosis, *Cell*, v. 77, p. 477-478, May1994.
- SAFI, M.; CHAZALVIEL, J. N.; CHERKAoui, M.; BELAIDI, A.; GOROCHOV, O. Etching of n-type silicon in (HF plus oxidant) solutions: in situ characterisation of surface chemistry, *Electrochimica Acta*, v. 47, p. 2573-2581, June2002.
- SAILOR M. J. *Fundamentals of Porous Silicon Preparation*. First Edition ed. ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA.Published 2012 by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA. 2012.
- SALONEN, J.; KAUKONEN, A. M.; HIRVONEN, J.; LEHTO, V. P. Mesoporous silicon in drug delivery applications, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 97, p. 632-653, Feb.2008.
- SCHWARTZ, M. P.; CUNIN, F.; CHEUNG, R. W.; SAILOR, M. J. Chemical modification of silicon surfaces for biological applications, *Physica Status Solidi A-Applications and Materials Science*, v. 202, p. 1380-1384, June2005.
- SEFTOR, R. E. B.; SEFTOR, E. A.; GEHLSSEN, K. R.; STETLERSTEVENSON, W. G.; BROWN, P. D.; RUOSLAHTI, E.; HENDRIX, M. J. C. Role of the Alpha-V-Beta-3 Integrin in Human-Melanoma Cell Invasion, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 89, p. 1557-1561, Mar.1992.
- SENGUPTA, S.; EAVARONE, D.; CAPILA, I.; ZHAO, G. L.; WATSON, N.; KIZILTEPE, T.; SASISEKHARAN, R. Temporal targeting of tumour cells and neovasculature with a nanoscale delivery system, *Nature*, v. 436, p. 568-572, July2005.
- SETZU, S.; LERONDEL, G.; ROMESTAIN, R. Temperature effect on the roughness of the formation interface of p-type porous silicon, *Journal of Applied Physics*, v. 84, p. 3129-3133, Sept.1998.
- SIMIONI, A. R.; PRIMO, F. L.; TEDESCO, A. C. Silicon(IV) phthalocyanine-loaded-nanoparticles for application in photodynamic process, *Journal of Laser Applications*, v. 24, Feb.2012.
- SIQUEIRA-MOURA, M. P.; PRIMO, F. L.; PETI, A. P. F.; TEDESCO, A. C. Validated spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for determination of chloroaluminum phthalocyanine in nanocarriers, *Pharmazie*, v. 65, p. 9-14, Jan.2010.
- SLOWING, I.; TREWYN, B. G.; LIN, V. S. Y. Effect of surface functionalization of MCM-41-type mesoporous silica nanoparticles on the endocytosis by human cancer cells, *Journal of the American Chemical Society*, v. 128, p. 14792-14793, Nov.2006.
- SOENEN, S. J.; MONTENEGRO, J. M.; ABDELMONEM, A. M.; MANSHIAN, B. B.; DOAK, S. H.; PARAK, W. J.; DE SMEDT, S. C.; BRAECKMANS, K. The effect of nanoparticle degradation on poly(methacrylic acid)-coated quantum dot toxicity: The importance of particle functionality assessment in toxicology, *Acta Biomaterialia*, v. 10, p. 732-741, Feb.2014.

- SONG, J. H.; SAILOR, M. J. Chemical modification of crystalline porous silicon surfaces, *Comments on Inorganic Chemistry*, v. 21, p. 69-84, 1999.
- SPUGNINI, E. P.; ARANCIA, G.; PORRELLO, A.; COLONE, M.; FORMISANO, G.; STRINGARO, A.; CITRO, G.; MOLINARI, A. Ultrastructural modifications of cell membranes induced by "Electroporation" on melanoma xenografts, *Microscopy Research and Technique*, v. 70, p. 1041-1050, Dec.2007.
- SUGITA, T.; HIRAMATSU, K.; IKEDA, S.; MATSUMURA, M. Pore Formation in a p-Type Silicon Wafer Using a Platinum Needle Electrode with Application of Square-Wave Potential Pulses in HF Solution, *Acs Applied Materials & Interfaces*, v. 5, p. 1262-1268, Feb.2013.
- TAGA, T.; SUZUKI, A.; GONZALEZ-GOMEZ, I.; GILLES, F. H.; STINS, M.; SHIMADA, H.; BARSKY, L.; WEINBERG, K. I.; LAUG, W. E. alpha nu-integrin antagonist EMD 121974 induces apoptosis in brain tumor cells growing on vitronectin and tenascin, *International Journal of Cancer*, v. 98, p. 690-697, Apr.2002.
- TANAKA, A. Toxicity of indium arsenide, gallium arsenide, and aluminium gallium arsenide, *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 198, p. 405-411, Aug.2004.
- TEDESCO, A. C.; ROTTA, J. C. G.; LUNARDI, C. N. Synthesis, photophysical and photochemical aspects of phthalocyanines for photodynamic therapy, *Current Organic Chemistry*, v. 7, p. 187-196, Jan.2003.
- TEYSSOT, A.; FIDELIS, A.; FELLAH, S.; OZANAM, F.; CHAZALVIEL, J. N. Anodic grafting of organic groups on the silicon surface, *Electrochimica Acta*, v. 47, p. 2565-2571, June2002.
- TONEGUZZO, F.; HAYDAY, A. C.; KEATING, A. Electric Field-Mediated Dna Transfer - Transient and Stable Gene-Expression in Human and Mouse Lymphoid-Cells, *Molecular and Cellular Biology*, v. 6, p. 703-706, Feb.1986.
- TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers, *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 4, p. 145-160, Feb.2005.
- TRAITCHEVA, N.; BERG, H. Electroporation and alternating current cause membrane permeation of photodynamic cytotoxins yielding necrosis and apoptosis of cancer cells, *Bioelectrochemistry*, v. 79, p. 257-260, Oct.2010.
- URDANETA, M.; STEPANOV, P.; WEINBERG, I. N.; PALA, I.; BROCK, S. Porous silicon-based quantum dot broad spectrum radiation detector, *Journal of Instrumentation*, v. 6, Jan.2011.
- Virginia Semiconductor, I. Wet-Chemical Etching and Cleaning of Silicon 2003
- VOICU, R.; BOUKHERROUB, R.; BARTZOKA, V.; WARD, T.; WOJTYK, J. T. C.; WAYNER, D. D. M. Formation, characterization, and chemistry of undecanoic acid-terminated silicon surfaces: Patterning and immobilization of DNA, *Langmuir*, v. 20, p. 11713-11720, Dec.2004.
- WADHWA, S.; REA, C.; O'HARE, P.; MATHUR, A.; ROY, S. S.; DUNLOP, P. S. M.; BYRNE, J. A.; BURKE, G.; MEENAN, B.; MCLAUGHLIN, J. A. Comparative in vitro cytotoxicity study of carbon nanotubes and titania nanostructures on human lung epithelial cells, *Journal of Hazardous Materials*, v. 191, p. 56-61, July2011.
- WANG, L.; REIPA, V.; BLASIC, J. Silicon nanoparticles as a luminescent label to DNA, *Bioconjugate Chemistry*, v. 15, p. 409-412, Mar.2004.

- WEAVER, J. C.; CHIZMADZHEV, Y. A. Theory of electroporation: A review, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, v. 41, p. 135-160, Dec.1996.
- WOLKIN, M. V.; JORNE, J.; FAUCHET, P. M.; ALLAN, G.; DELERUE, C. Electronic states and luminescence in porous silicon quantum dots: The role of oxygen, *Physical Review Letters*, v. 82, p. 197-200, Jan.1999.
- WYLLIE, K.; RINELLA, G. A.; CAMPBELL, M.; CARBALLO, M. C.; GYS, T.; JOLLY, S.; MORITZ, M.; NEWBY, C.; PIEDIGROSSI, D.; SOMERVILLE, L. Silicon detectors and electronics for pixel hybrid photon detectors, *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section A-Accelerators Spectrometers Detectors and Associated Equipment*, v. 530, p. 82-86, Sept.2004.
- YANG, D. Q.; GILLET, J. N.; MEUNIER, M.; SACHER, E. Room temperature oxidation kinetics of Si nanoparticles in air, determined by x-ray photoelectron spectroscopy, *Journal of Applied Physics*, v. 97, Jan.2005.
- YOFFE, A. D. Semiconductor quantum dots and related systems: electronic, optical, luminescence and related properties of low dimensional systems, *Advances in Physics*, v. 50, p. 1-208, Jan.2001.
- YZAMBART, G.; FABRE, B.; LORCY, D. Multiredox Tetrathiafulvalene-Modified Oxide-Free Hydrogen-Terminated Si(100) Surfaces, *Langmuir*, v. 28, p. 3453-3459, Feb.2012.
- ZOUBIR, N. H.; VERGNAT, M.; DELATOUR, T.; BURNEAU, A.; DEDONATO, P.; BARRES, O. Natural Oxidation of Annealed Chemically Etched Porous Silicon, *Thin Solid Films*, v. 255, p. 228-230, Jan.1995.