

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

ALEXIA MARQUES SILVA

Complexos rutênio-ftalocianinas conjugados à superfície amino-funcionalizada de nanopartículas de conversão ascendente de óxido de ítrio dopado com Er³⁺ e Yb³⁺. Caracterização química, fotoquímica e fotobiológica

Ribeirão Preto

2019

ALEXIA MARQUES SILVA

Complexos rutênio-ftalocianinas conjugados à superfície amino-funcionalizada de nanopartículas de conversão ascendente de óxido de ítrio dopado com Er^{3+} e Yb^{3+} . Caracterização química, fotoquímica e fotobiológica

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Química e Física Biológica

Orientador(a): Prof. Dr. Roberto Santana da Silva

Ribeirão Preto

2019

SILVA, A. M.	Complexos rutênio-ftalocianinas conjugados à superfície amino-funcionalizada de nanopartículas de conversão ascendente de óxido de ítrio dopado com Er^{3+} e Yb^{3+}. Caracterização química, fotoquímica e fotobiológica		MESTRADO FCFRPUSP 2019
--------------	---	--	------------------------------

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.

Silva, Alexia Marques

Complexos rutênio-ftalocianinas conjugados à superfície amino-funcionalizada de nanopartículas de conversão ascendente de óxido de ítrio dopado com Er^{3+} e Yb^{3+} . Caracterização química, fotoquímica e fotobiológica.

Ribeirão Preto, 2019.

136 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química e Física Biológica.

Orientador: Da Silva, Roberto Santana

1. Rutênio-Ftalocianinas. 2. Terras raras. 3. Terapia Fotodinâmica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Alexia Marques Silva

“Complexos rutênio-ftalocianinas conjugados à superfície amino-funcionalizada de nanopartículas de conversão ascendente de óxido de ítrio dopado com Er^{3+} e Yb^{3+} . Caracterização química, fotoquímica e fotobiológica.”

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Química e Física Biológica

Aprovado(a) em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

**À minha família,
Por me mostrar que o caminho mais
fácil nem sempre é o melhor,
Por me apoiar em seguir meus sonhos e
me mostrar que nenhum obstáculo é
insuperável.
À vocês, mais esta conquista.**

Agradecimentos

À Deus e àqueles que me acompanham, iluminando meus caminhos e minhas batalhas com sua luz divina.

Aos meu pais, Alexandra e Carlos, que durante toda a minha vida se dedicaram em me proporcionar tudo que houvesse de encantador na caminhada do conhecimento. Eu sei que vocês abriram mão de muitas conquistas pessoais para que eu pudesse ter as minhas, e não seria a pessoa que eu sou hoje sem vocês.

Aos meus irmãos, Pedro Henrique e Ana Luiza. Meus esforços são para que vocês tenham orgulho de mim, assim como eu me orgulho de vocês, cada vez mais, dia após dia.

Ao meu companheiro de todas as horas, Dyego. Obrigada por me lembrar sempre que no final de todos os espinhos da roseira há uma linda rosa na qual eu encontrarei meu conforto e que nunca me deixará sozinha.

Aos meus queridos avós, Ruth e Edinaldo, à minha tia Hellen e aos meus primos, Laura e Arthur, pelas risadas no fim de tarde dos dias difíceis, recarregando as energias.

À todos vocês, por escutarem todas as aulas sobre temas que vocês não conheciam, pelo abraço em hora oportuna, por acreditarem que eu poderia realizar todos os planos que tracei, muito obrigada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Santana da Silva, o 'Chefe', que nunca acreditou que qualquer projeto seria impossível para mim. Obrigada pela confiança de desenvolver um trabalho tão belo. Obrigada por me guiar nesta jornada, a qual espero terminar podendo ainda compartilhar com você as experiências extraordinárias às quais você me guia. Obrigada por 'me pegar pra criar no laboratório', atendendo ao sonho de uma pequena cientista. É esta confiança que me impulsiona à frente.

À minha co-orientadora, Rogéria Rocha Gonçalves, querida capitã. Obrigada pelo acolhimento espetacular do *Mater Lumen*. Sem você este trabalho não teria sido possível. Agradeço imensamente pelo mar de conhecimento no qual me foi possível nadar e pelas inúmeras novas descobertas realizadas (sejam elas de técnicas, resultados, conversas ou diferentes culturas). Você é um exemplo que me foi dado de presente, aquele que olho quando me lembro que é cedo demais para me cansar, sabendo onde posso chegar.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Química Bioinorgânica. Amigos de longa data que me lembraram diariamente que eu podia ir além. Laisa, obrigada por todas as broncas e puxões de orelha, com certeza sou mais 'durona' agora. Juliana,

por todas as discussões em momentos nos quais eu me sentia no escuro, obrigada por me mostrar a luz. Tássia, obrigada por ser tão companheira. Loyanne, obrigada por toda a paciência com cada detalhe do desenvolvimento deste trabalho. Kelly, obrigada por cada ajudinha nos passos para atingir sempre um resultado satisfatório. Jacqueline e Laena, obrigada pelo tempo disponível para várias discussões sobre novas e desconhecidas etapas. Renatinha, obrigada por tudo o que já passamos, nestes longos anos de amizade e de companheirismo. Junior, Rafaella, Phamilla, Ana, Ju Prandini, Leandro. Todos vocês têm momentos maravilhosos no meu crescer como pesquisadora. A vocês, o meu muito obrigada.

Ao grupo de pesquisa Mater Lumen: Diego, Vitor, Victor, Felipe, Hayra, Lucas, Leonardo, Denis, Carol, Karmel. Obrigada pelos cafézinhos, pelos momentos de descontração e pelos momentos de discussão. Luiz, Caixeta, Mateus, Rafael e Fernanda: muito obrigada por participarem tão ativamente e me ajudarem em todas as dúvidas sobre essa área tão linda e até então desconhecida para mim, a química de materiais fotônicos.

A todos os professores que passaram na minha vida. A formação de um profissional requer um cuidado, uma delicadeza, que apenas estes nobres personagens são capazes de atender. Em especial, obrigada Andrea Junqueira por, junto com o Prof. Roberto, adotar uma pequena cientista.

Ao Prof. Dr. Joaquim Coutinho Netto (*in memoriam*), por ser o primeiro a me ensinar que existia um lugar onde meus sonhos poderiam se tornar realidade, a Universidade de São Paulo. Sou eternamente grata por ter entregue aquela faísca de curiosidade à criança que aprendeu a sonhar.

Meu agradecimento também à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto e à Universidade de São Paulo, grandes incentivadoras da pesquisa no Brasil.

Ao CNPq e à FAPESP, pelo suporte financeiro referente ao processo 2017/04099-2.

O cientista não se faz sozinho. Sua caminhada é repleta de pequenas participações que em algum momento se fazem papel principal em sua formação. Muito obrigada a todos vocês que se dispuseram a fazer parte desta aventura comigo.

RESUMO

SILVA, A. M. Complexos rutênio-ftalocianinas conjugados à superfície amino-funcionalizada de nanopartículas de conversão ascendente de óxido de ítrio dopado com Er^{3+} e Yb^{3+} . Caracterização química, fotoquímica e fotobiológica. 2019. 136 p. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2019.

Estudos em terapia fotodinâmica (TFD) se baseiam na utilização do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) como espécie reativa, porém a característica hipóxica de neoplasias de pequeno porte constitui-se uma grande barreira para o sucesso da TFD como terapia efetiva na fase clínica. Uma nova possibilidade é utilizar compostos que liberem fotoquimicamente óxido nítrico (NO), molécula que possui características singulares que lhe permitem uma interação diferente com sistemas biológicos e, ainda, desencadear uma ação citotóxica através da reação com o ânion superóxido (O_2^-), presente no meio biológico, formando outros radicais. Além da produção das espécies reativas de oxigênio (ROS), a TFD também visa o tratamento localizado de neoplasias, ativando compostos fotossensibilizadores por estímulos luminosos em pequenas regiões, por exemplo. Uma vez que a penetração da radiação responsável pela ativação destes compostos é baixa, a conjugação deles à partículas de conversão ascendente possibilita a utilização de radiação com maior poder de penetração e posteriormente ativação do fotossensibilizador, que produz $^1\text{O}_2$ e libera NO. Para este trabalho, utilizaram-se como fotossensibilizadores ftalocianinas **[Ru(PC-R)]** (KTC) e **[Ru(NO)(PC-R)]** (KTC(NO)), sendo (PC-R) ftalocianina modificada pela terminação em ácidos carboxílicos, ambas produtoras de oxigênio singlete e a última também fonte de liberação de óxido nítrico. O material para conversão ascendente escolhido foi óxido de ítrio dopado com érbio e itérbio ($\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}$) em forma de partículas, recobertas com tetraetoxissilano (TEOS) e funcionalizadas com (3-aminopropil)tri-etoxissilano (APTES). Propôs-se a imobilização das ftalocianinas de rutênio na superfície das partículas de conversão ascendente através de adsorção ou de ligação covalente entre as terminações carboxílicas dos complexos e os grupos amino resultantes da funcionalização com APTES. A partir da análise estrutural feita das partículas de conversão ascendente, por difratometria de Raios-X em pó, verificou-se a fase cristalina do material após tratamento térmico. A espectroscopia de fotoluminescência mostrou a emissão em 660 nm do material após excitação em 980 nm, pelo fenômeno de conversão ascendente. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho confirma o recobrimento com TEOS e posterior funcionalização com APTES. As micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) mostram a formação de partículas independentes, bem como os estágios de cristalização e recobrimento das mesmas. A modificação da superfície foi, ainda, confirmada pela modificação do potencial zeta e do ponto de carga zero. Espectroscopia eletrônica na região do UV-visível confirma a presença de ftalocianina de rutênio na superfície das partículas. Ensaio preliminares de viabilidade celular em células de linhagens não tumorais, acompanhadas por microscopia óptica, demonstram toxicidade baixa e também uma tendência à aglomeração do sistema formado ao redor das células.

Palavras-chave: Rutênio-ftalocianina; oxigênio singlete; nanopartícula de conversão ascendente.

ABSTRACT

SILVA. A. M. Ruthenium-phthalocyanine complexes conjugated to amino-functionalized surface of Er^{3+} and Yb^{3+} doped yttrium oxide upconverting nanoparticles. Chemical, photochemical and photobiological characterization. 2019. 136 p. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Photodynamic therapy (PDT) studies are based on singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) production as reactive species, but the hypoxic characteristic of small size neoplasms are a big barrier for the effectiveness of PDT in clinic tests. A new potentiality is to use complexes that can photochemically release nitric oxide (NO), which owns remarkable characteristics in biological environment and can cause a cytotoxic action through a reaction with superoxide anion (O_2^-), that can be found in biological medium, forming other radicals. Besides the oxygen reactive species (ORS) production, PDT can also be used to targeted treatment of neoplasms, once the activation of photossensitizers (PS) is through luminous stimulus in a pontual way. Once the depth reached in tissue by the light used in PDT is not large, the coupling of PS to upconverting nanoparticles allows the use of higher penetration radiation, activating the PS in deeper regions, producing singlet oxygen and releasing NO. In this work, the phototossensitizer were the ruthenium phthalocyanines **[Ru(PC-R)]** (KTC) and **[Ru(NO)(PC-R)]** (KTC(NO)), where (PC-R) is a carboxylic terminated phthalocyanine. Boht can produce singlet oxygen and the last can also release nitric oxide. The upconverting material was Er^{3+} and Yb^{3+} doped yttrium oxide in nanoparticle shape, covered by tetraethyl orthosilicate (TEOS) na functionalized by (3-aminopropyl)triethoxysilane) (APTES) in order to obtain amino terminations over the surface. The complex immobilization in the nanoparticle surface was proposed by adsorption and covalent bond between the carboxylic complex termination and nanoparticle's surface aminogroup. The structural analysis was made by X-rays difratometry and showed the crystalline phase of material after thermic treatment. The photoluminescence spectroscopy showed the 660nm light emission from nanoparticles after 980 nm irradiation (up conversion phenomenon). Infrared vibrational spectroscopy corroborate TEOS overlay and APTES functionalization. Micrographies obtained from electronic transmission microscopy (ETM) showed independente particles as well as he crystallization, coverage and functionalization steps. Zero charge point confirms the surface modification. Preliminary celular viability assays, followed by optical microscopy demonstrated the low toxicity in healthy cells and a propensity of the system to accumulate around neoplastic cells.

Keywords: ruthenium-phthalocyanine; singlet oxygen; upconversion nanoparticle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cronologia da linha de pesquisa de Bioatividade de Compostos de Coordenação, supervisionado pelo Professor Dr. Roberto Santana da Silva.	25
Figura 2. Gráficos de incidência e mortalidade mundiais de câncer, elencados por tipos de câncer mais incidentes e suas respectivas taxas de mortalidade, incidência de novos casos de câncer por país e taxa de mortalidade por câncer por país.....	28
Figura 3. Processo de ‘humanização’ dos anticorpos monoclonais. O prefixo indica a origem do anticorpo e o sufixo ‘mab’ significa <i>Monoclonal AntiBodies</i> . (a) <i>o</i> – retirado de rato; (b) <i>i</i> - retirado de primata e <i>xi</i> – anticorpo quimérico; (c) <i>zu</i> – anticorpo humanizado; (d) <i>u</i> – anticorpo humano.....	31
Figura 4. Estrutura dos primeiros compostos fotoativos conhecidos: (A) Psoraleno e (B) laranja de acridina.....	33
Figura 5. Histórico do desenvolvimento da Terapia Fotodinâmica.....	34
Figura 6. Representação esquemática do tratamento por terapia fotodinâmica.	35
Figura 7. Diagrama de Jablonski.	37
Figura 8. Estrutura dos fotossensibilizadores porfirina, clorina e bacterioclorina.	43
Figura 9. (A) Estrutura do fotossensibilizador Photofrin®. (B) Embalagem comercial do Photofrin®.	44
Figura 10. Distribuição esquemática dos fotossensibilizadores derivados de porfirina.....	45
Figura 11. Estrutura do fotossensibilizador de 2ª geração Foscan®.	46
Figura 12. (A) Estrutura dos isômeros da Verteporfina. (B) Visudyne®.....	46
Figura 13. (A) Estrutura da mono-L-aspartil clorina e6. (B) Estrutura da HPPH.	47
Figura 14. (A) Estrutura da Padeliporfina. (B) Tookad®.	48
Figura 15. (A) Estrutura do Ácido 5-Aminolevulínico e da Protoporfirina-IX. (B) Levulan®.....	49
Figura 16. (A) Estrutura dos fotossensibilizadores derivados do Ácido 5-Aminolevulínico: Metil-5-aminolevulinato, hexil-5-aminolevulinato e benzil-5-aminolevulinato. (B) Metvix®. (C) Hexvix®.....	50
Figura 17. Estrutura dos precursores das ftalocianinas de ferro e magnésio.	51

Figura 18. (A) Pigmento Phthalo Alpha Blue, metalada com Cu-II. (B) Pigmento Phthalo Green, ftalocianina metalada com Cu-II e cloro (Cl) substituindo os hidrogênios (H) dos anéis benzênicos.....	52
Figura 19. Estrutura da ftalocianina base livre (H ₂ Pc) e da ftalocianina metalada (MPc).....	53
Figura 20. Complexos de Platina utilizados em quimioterapia.....	54
Figura 21. Estrutura dos complexos de rutênio NAMI-A, KP1019 e TLD-1433.....	56
Figura 22. Estrutura dos fotossensibilizadores Photosens® e Pc4.....	57
Figura 23. Configurações eletrônicas dos elementos terras raras.....	60
Figura 24. Diagrama de transferência de energia pelo processo de conversão ascendente do íon Yb ³⁺ para íon Er ³⁺ . Espectro eletromagnético representando a absorção e emissão do par de íons lantanídeos.....	61
Figura 25. Ilustração da hipótese do trabalho desenvolvido.....	63
Figura 26. Representação da penetração da luz no tecido.....	64
Figura 27. Estruturas das ftalocianinas utilizadas: (A) K ₄ [RuCl ₂ {PC-(COO-) ₄ }] (KTC) e (B) K ₄ [(NO)Cl{PC-(COO-) ₄ }] (KTC(NO)).....	65
Figura 28. Ilustração da aplicação do tratamento nas placas de 96 poços....	79
Figura 29. Irradiador de LED em 940 nm utilizado para irradiação das placas de 96 poços.....	79
Figura 30. Esquema de aplicação do tratamento para obtenção de imagens.....	81
Figura 31. Esquema da sequência de síntese de NCAF.....	81
Figura 32. Estrutura do TEOS.....	83
Figura 33. Esquema de funcionalização da superfície de NCAF com APTES.....	83
Figura 34. Esquema de funcionalização da superfície de NCAF com APTES	83
Figura 35. Difractogramas de Raios-X das partículas de Y ₂ O ₃ :Er/Yb, Y ₂ O ₃ :Er/Yb@TEOS e Y ₂ O ₃ :Er/Yb@TEOS@APTES comparados com o padrão da base de dados (JCPDS 01-074-0553).....	85
Figura 36. Representação da cela unitária da fase cúbica e das simetrias C ₂ e S ₆ do Y ₂ O ₃	86
Figura 37. Espectros de FTIR obtidos para (A) Y(OH)CO ₃ :Er/Yb; (B) Y ₂ O ₃ :Er/Yb; (C) Y ₂ O ₃ :Er/Yb@TEOS; (D) Y ₂ O ₃ :Er/Yb@TEOS@APTES.....	87

Figura 38. Modos vibracionais do carbonato.	88
Figura 39. Termogravimetria da amostra de $Y(OH)CO_3:Er/Yb$. Em verde observa-se a variação da massa com o aumento da temperatura e, em azul, o fluxo de calor durante a análise.	89
Figura 40. Espectro de emissão por conversão ascendente da amostra $Y_2O_3:Er/Yb$ com excitação fixada em 980 nm, variando a potência do <i>laser</i> de 50 a 400 mW.	91
Figura 41. Sobreposição dos espectros de emissão do $Y_2O_3:Er/Yb$ ($\lambda_{ex.} = 980$ nm) e de absorção da ftalocianina de rutênio.	92
Figura 42. Comparação entre os espectros de emissão das amostras (A) $Y_2O_3:Er/Yb$, (B) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS$ e (C) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$, com excitação em 980 nm e potência do laser a 450 mW.	93
Figura 43. Diagramas de cromaticidade das amostras (A) $Y_2O_3:Er/Yb$, (B) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS$ e (C) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$	93
Figura 44. Curvas do log da área dos picos em função do log da potência utilizada da amostra $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$	94
Figura 45. Esquema simplificado do processo de conversão ascendente para o par de íons terra rara érbio (Er^{3+}) e Itérbio (Yb^{3+}). As setas sólida representam absorção e emissão de fótons; as setas duplas, transferência de energia e as setas pequenas, processos assistidos por fónon.	96
Figura 46. Micrografias das amostras (a) $Y(OH)CO_3:Er/Yb$, (b) $Y_2O_3:Er/Yb$, (c) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS$ e (d) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$	97
Figura 47. Histograma da distribuição de tamanhos das nanopartículas de $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$	98
Figura 48. Titulação potenciométrica para obtenção dos potenciais de carga zero das amostras $Y_2O_3:Er/Yb$, $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS$ e $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$	100
Figura 49. Sólidos obtidos após imobilização dos complexos RuPC-R à superfície de NCAF.	101
Figura 50. Espectro de FTIR de (A) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$, (B) KTC e (C) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC$	102
Figura 51. Espectro de FTIR de (A) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$, (B) KTC(NO) e (C) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO)$	104

Figura 52. Estruturas propostas para as Rutênio-ftalocianinas imobilizadas em NCAF: Estruturas tridimensionais (A) KTC(NO) e (B) KTC e diagramas de superfície (C) KTC(NO) e (D) KTC.	106
Figura 53. Espectros de absorção eletrônica obtidos em suspensão em nujol. (A) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$; (B) KTC; (C) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC$	108
Figura 54. Espectros de absorção eletrônica obtidos em pastilhas de KBr. (A) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO)$; (B) KTC(NO).	109
Figura 55. Esquema da reação entre a sonda SOSG e o oxigênio singlete para formação do SOSG-EP.....	110
Figura 56. Espectro de fluorescência da sonda SOSG-EP após irradiação do sistema conjugado $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC$ em 940 nm.....	111
Figura 57. Processo de identificação de NO pela sonda DAF-2 DA.	112
Figura 58. Espectro de emissão de fluorescência da sonda DAF-2 DA (a) antes da irradiação do sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO)$ a 377 nm e (B) após a irradiação do sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO)$ a 377 nm.....	113
Figura 59. Ensaio preliminar do efeito citotóxico em células L929 para $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$ e $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO)$ em diferentes concentrações, após 4 horas de incubação, na ausência e presença de estímulo luminoso.....	11514
Figura 60. Ensaio preliminar do efeito citotóxico em células L929 para $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$ e $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO)$ em diferentes concentrações, após 4 horas de incubação, na ausência e presença de estímulo luminoso.....	1175
Figura 61. Imagens obtidas durante o ensaio de viabilidade celular para (A) controle, (B) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$ após 4 horas de incubação, lavado com PBS, (C) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO)$ após 4 horas de incubação, lavado com PBS e (D) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO)$ aplicado imediatamente.....	117
Figura 62. Reação de identificação de grupos amino pelo métodos de Kaiser.	118
Figura 63. Representação dos compostos oriundos da reação da sonda DPBF com o oxigênio singlete.	120

Figura 64. Espectro vibracional de espalhamento Raman obtido para as amostra (A) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS$, (B) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$ e (C) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO)$ 122

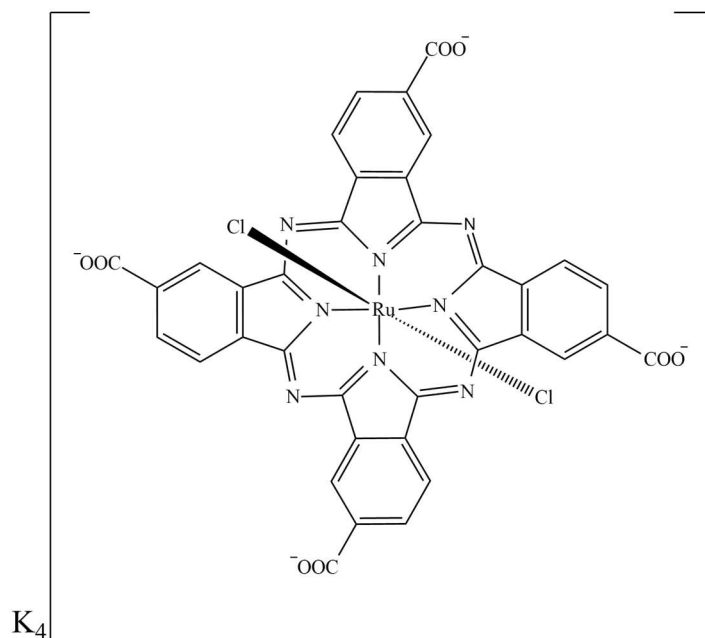
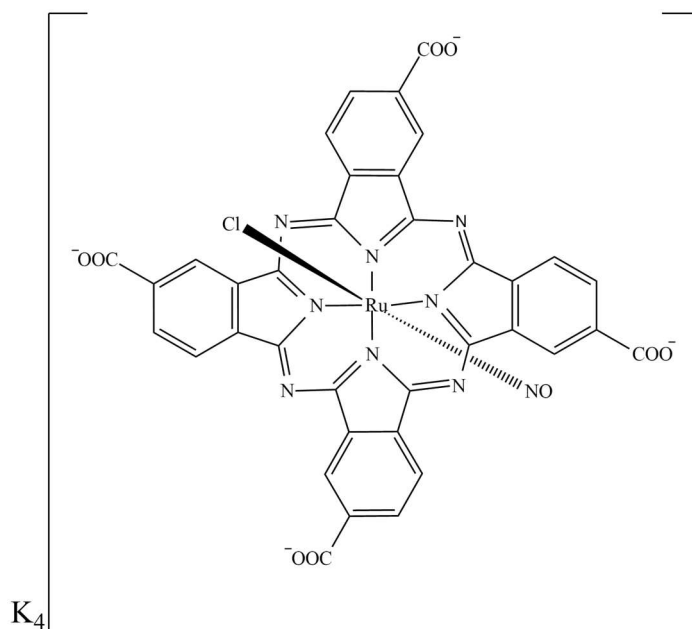
LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reagente utilizados na síntese e caracterização de NCAF e do sistema NCAF-RuPc.....	67
Tabela 2. Reagentes utilizados para cultivo de células.....	68
Tabela 3. Materiais utilizados para caracterização e ensaios de viabilidade celular.....	68
Tabela 4. Concentrações obtidas para determinação do potencial zeta e ponto de carga zero.....	73
Tabela 5. Concentrações obtidas para determinação do potencial zeta.....	75
Tabela 6. Proposta de atribuição das bandas ao espectro vibracional do Y(OH)CO ₃ :Er/Yb (ZHANG <i>et al.</i> , 2009a).....	88
Tabela 7. Proposta de atribuição de bandas ao espectro vibracional do Y ₂ O ₃ :Er/Yb@TEOS (RAHMAN <i>et al.</i> , 2009).....	90
Tabela 8. Proposta de atribuição de bandas ao espectro vibracional do Y ₂ O ₃ :Er/Yb@TEOS@APTES (RAHMAN <i>et al.</i> , 2009; BINI <i>et al.</i> , 2012).....	90
Tabela 9. Valores de n determinados segundo a Lei de Potência.....	95
Tabela 10. Potencial zeta e pH de carga zero para as amostras Y ₂ O ₃ :Er/Yb, Y ₂ O ₃ :Er/Yb@TEOS e Y ₂ O ₃ :Er/Yb@TEOS@APTES.....	98
Tabela 11. Proposta de atribuição de bandas ao espectro vibracional da RuPc KTC (RAMOS, 2016).....	102
Tabela 12. Proposta de atribuição de bandas ao espectro vibracional do sistema Y ₂ O ₃ :Er/Yb@TEOS@APTES@ KTC.....	103
Tabela 13. Proposta de atribuição de bandas ao espectro vibracional da rutênio ftalocianina KTC(NO) (RAMOS, 2016).....	104
Tabela 14. Proposta de atribuição de bandas vibracionais ao espectro vibracional do sistema Y ₂ O ₃ :Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO).....	105
Tabela 15. Valores obtidos para o potencial zeta dos sistemas Y ₂ O ₃ :Er/Yb@TEOS@APTES@KTC e Y ₂ O ₃ :Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO).....	106

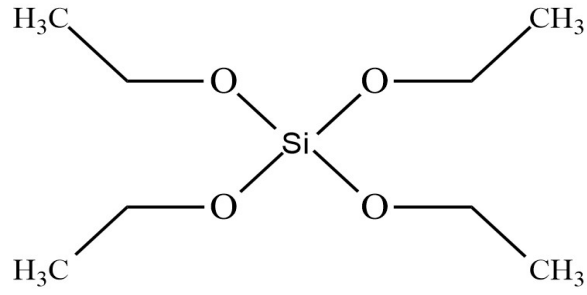
LISTA DE ABREVIÇÕES

TEOS	Tetraetilortossilicato
APTES	(3-aminopropil)trietoxissilano
RuPc	Rutênio Ftalocinina
DAF 2	4,5-Diaminofluoresceína
DAF-2 DA	4,5-Diaminofluoresceína Diacetato
DAF-2 T	Triazofluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPBF	1,3-Difenilbenzofurano
ERON	Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ERN	Espécies Reativa de Nitrogênio
FS	Fotossensibilizador
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
LED	Light-Emitting Diode
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
PBS	Phosphate Buffer Solution (Solução fosfatosalina tamponada)
Pc	Ftalocianina
RPMI	Roswell Park Memorial Institute – meio de cultura
TFD	Terapia Fotodinâmica
NHS	N-hidroxisuccinimida
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
DMF	Dimetilformamida
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
PCZ	Ponto de Carga Zero
NCAF	Nanopartículas de Conversão Ascendente Funcionalizadas
NO	Óxido Nítrico
DR-X	Difratometria de Raios-X
FTIR	Fourier Transformed Infra Red

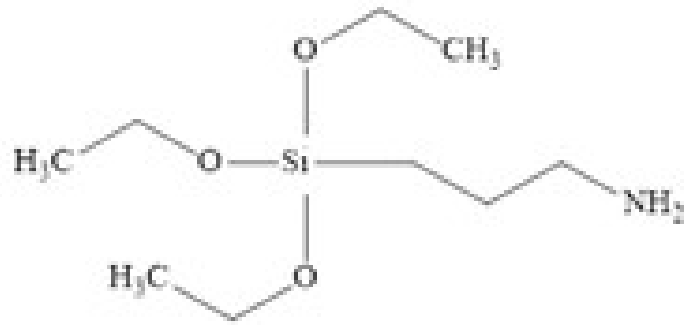
LISTA DE ESTRUTURAS

 $K_4[RuCl_2\{Pc-(COO^-)_4\}] - KTC$  $K_4[Ru(NO)Cl\{Pc-(COO^-)_4\}] - KTC(NO)$ 

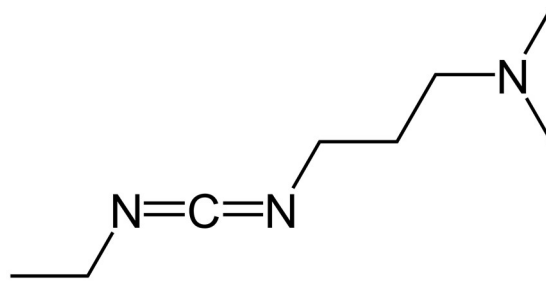
Tetraetilortossilicato – TEOS



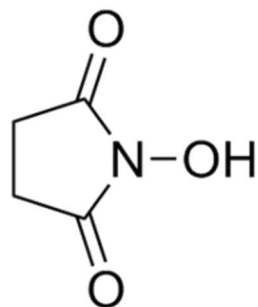
(3-Aminopropil)trietoxissilano - APTES



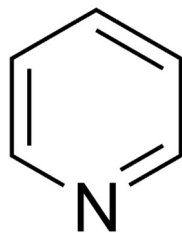
1-etil-3-(3-diaminopropil)carbodiimida



N-hidroxissuccinimida



Piridina



Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XVI
LISTA DE ABREVIACÕES	XVII
LISTA DE ESTRUTURAS	XVIII
1. Introdução	25
2. Revisão Bibliográfica	27
2.1. Aspectos Gerais do Câncer.....	27
2.2. Tratamentos clássicos	28
2.3. Inovações no tratamento de câncer	30
2.4. Terapia Fotodinâmica (TFD)	32
2.4.1. Histórico da Terapia Fotodinâmica	32
2.4.2. Mecanismos de ação.....	35
2.4.3. Espécies Reativas em Terapia Fotodinâmica	38
2.4.3.1. Importância biológica do óxido nítrico	39
2.4.4. Fotossensibilizadores	41
2.4.4.1. Características de um fotossensibilizador ideal	41
2.4.4.2. Fotossensibilizadores utilizados em TFD.....	43
2.5. Ftalocianinas.....	50
2.5.1. Histórico	51
2.5.2. Estrutura e propriedades	52
2.5.3. Ftalocianinas como fotossensibilizadores.....	53
2.6. Metais utilizados com fins terapêuticos	54
2.7. Ftalocianinas e Terapia Fotodinâmica.....	56
2.8. Materiais fotônicos dopados com Terras raras.....	58
2.8.1. Luminescência.....	58
2.8.2. Terras raras.....	59
2.8.3. Conversão Ascendente de Energia (<i>Upconversion</i>)	60
2.9. Nanopartículas de óxido de ítrio.....	62
3. Hipótese	63
4. Objetivos	64
4.1. Objetivo Geral	64
4.2. Objetivos Específicos.....	66
5. Materiais e Métodos	66
5.1. Materiais	66
5.2. Síntese das nanopartículas de $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$ (NCAF)	69

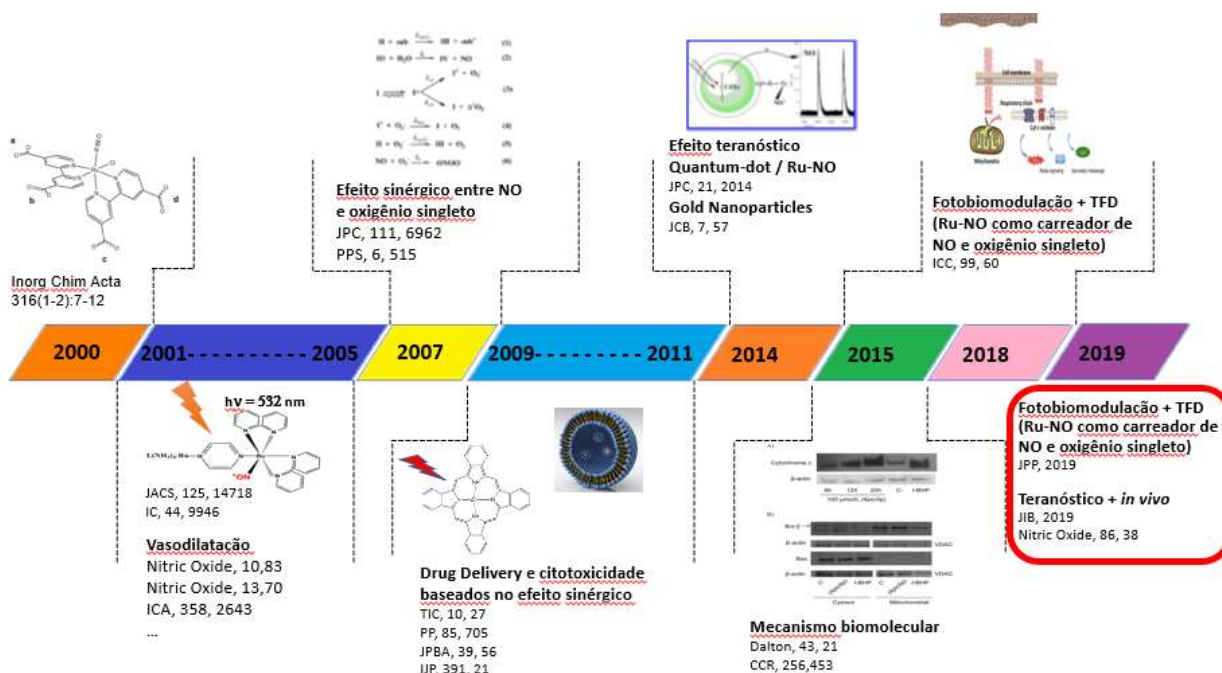
5.2.1. Síntese de hidrocarbonato de ítrio dopado com terras raras.....	69
5.2.2. Obtenção de óxido de ítrio dopado com terras raras.....	70
5.2.3. Recobrimento das nanopartículas de óxido de ítrio com sílica	70
5.2.4. Funcionalização das nanopartículas de óxido de ítrio com amino grupos	71
5.3. Caracterização das partículas de $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$	71
5.3.1. Difratometria de Raios-X.....	71
5.3.2. Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	72
5.3.3. Espectroscopia de Fotoluminescência (conversão ascendente).....	72
5.3.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	72
5.3.5. Determinação do ponto de cara zero (PCZ) e potencial zeta	72
5.4. Síntese do sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@RuPc-R$	74
5.5. Caracterização do sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@RuPc-R$	75
5.5.1. Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	75
5.5.2. Determinação do potencial zeta	75
5.5.3. Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível	75
5.6. Identificação de produção de oxigênio singleto	76
5.7. Identificação de liberação de NO	76
5.8. Ensaio de viabilidade celular	77
5.8.1. Linhagens celulares	77
5.8.2. Cultivo das células	77
5.8.3. Determinação do número de células para os ensaios de viabilidade celular	77
5.8.4. Avaliação da viabilidade celular pelo método MTT	78
5.8.5. Avaliação da localização celular por microscopia óptica	80
6. Resultados e discussão.....	81
6.1. Síntese de $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$	81
6.2. Caracterização de $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$	84
6.2.1. Difratometria de Raios-X.....	84
6.2.2. Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	86
6.2.3. Espectroscopia de Fotoluminescência (Conversão Ascendente).....	91
6.2.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	96
6.2.5. Determinação do ponto de carga zero e potencial zeta.....	98
6.3. Síntese do sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@RuPc$	100
6.4. Caracterização do sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@RuPc$	101

6.4.1. Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	101
6.4.2. Determinação do potencial zeta	105
6.4.3. Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível	107
6.5. Determinação indireta da produção de $^1\text{O}_2$	109
6.6. Detecção da liberação de óxido nítrico por método indireto.....	111
6.7. Ensaio de viabilidade celular	113
6.8. Avaliação da localização celular por microscopia óptica	117
7. Dificuldades encontradas.....	118
7.1. Quantificação de grupos amino na superfície da nanopartícula.	118
7.2. Estudo da produção de oxigênio singleto	119
7.3. Quantificação de NO	120
7.4. Espectroscopia vibracional de espalhamento RAMAN	121
8. Considerações Finais e Perspectivas futuras.....	122
9. Bibliografia	124

1. Introdução

A dissertação aqui apresentada vem em complemento ao trabalho desenvolvido pelo grupo a partir dos anos 2000, quando o primeiro artigo relacionado a sistemas liberadores de óxido nítrico fora publicado (TOGNILO *et al.*, 2001). Desde então, vários relatos científicos foram desenvolvidos pela equipe do Prof. Dr. Roberto Santana da Silva, envolvendo aspectos químicos, cinéticos, fotoquímicos e fotobiológicos de compostos doadores de NO, tendo como base o íon metálico Ru (II) e (III). Embora avanços no que tange a ensaios pré-clínicos tenham sido observados, ao longo deste período, a relação entre sistemas fotoinduzidos, com potencial aplicação clínica, carece ainda de melhor aprofundamento. Neste contexto, o trabalho aqui apresentado visa colaborar.

Figura 1. Cronologia da linha de pesquisa de Bioatividade de Compostos de Coordenação, supervisionado pelo Professor Dr. Roberto Santana da Silva.



Fonte: autora.

Para tanto, o sistema constituído de Rutênio-Ftalocianinas/Óxido de ítrio dopado com terras raras foi desenvolvido em nosso trabalho e tem como ponto fundamental a transferência de energia fotoinduzida, a partir da irradiação do óxido dopado com terras raras na região do infravermelho próximo, e deste para as

ftalocianinas de rutênio, culminando na produção de oxigênio singleto e, em um dos casos, liberação de NO.

Por se tratar de um tópico novo, mesmo em nível científico mundial, a revisão bibliográfica fora feita minuciosamente, tentando discutir o estado da arte. Posteriormente, discutiu-se aspectos experimentais envolvendo as três partes nas quais a dissertação se fundamenta: complexos rutênio-ftalocianinas; Óxido de ítrio dopado com terras raras com superfície modificada; transferência de energia fotoinduzida.

Aspectos teóricos e experimentais são discutidos no intuito de qualificar o sistema como promissor em relação à possível aplicação clínica.

2. Revisão Bibliográfica

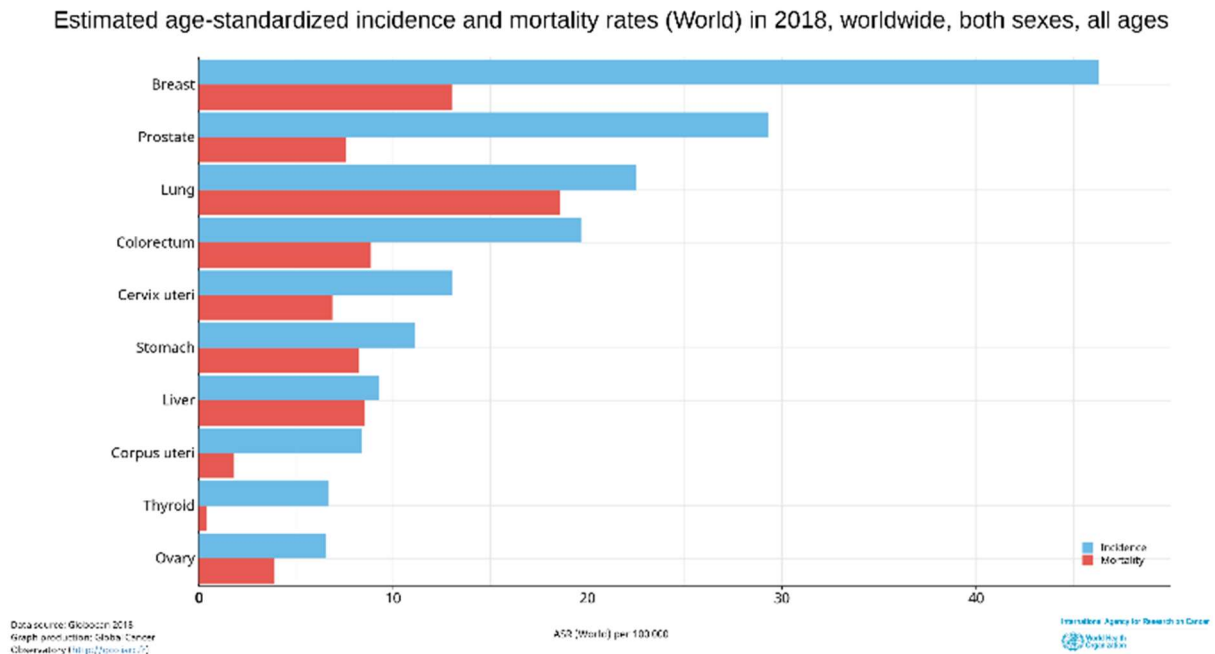
2.1. Aspectos Gerais do Câncer

Câncer é o termo utilizado para designar um conjunto de doenças que se caracterizam pelo crescimento exacerbado de células, podendo invadir tecidos adjacentes ou até mesmo se espalhar por órgãos (WHO, 2018). Ainda de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2018 a estimativa de mortes atribuídas foi de 2,6 milhões de pessoas em todo o mundo e as maiores incidências de novos casos são de câncer de mama e de próstata, respectivamente. Porém, o câncer com a maior taxa de mortalidade é o câncer de pulmão, o qual pode ser agravado por diversos fatores, tais como o tabagismo em países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos e a poluição, associada aos países desenvolvidos, como mostra os gráficos do *Global Observatory of Cancer* (GCO), órgão que acompanha o quadro do câncer no mundo pela *International Agency for Research in Cancer* (IARC), também pertencente à OMS. (Figura 2). É interessante frisar que a mortalidade não é, necessariamente, diretamente proporcional à incidência de câncer nos países. Isso ocorre, principalmente, devido aos diferentes estágios dos avanços nos tratamentos disponíveis para a população, bem como o nível de desenvolvimento em que se encontra o país.

No Brasil, as estatísticas apresentadas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) apontam que, entre os homens, 68 mil novos casos de câncer de próstata foram registrados, seguido por quase 19 mil novos casos de câncer de traqueia, brônquio e pulmão. Entre as mulheres, quase 60 mil novos casos de câncer de mama surgiram, seguido por 19 mil novos casos de câncer de cólon e reto (INCA, 2019).

As neoplasias podem ser definidas como proliferações desorganizadas de células que apresentam características como taxa de divisão alterada, capacidade migratória e adesiva a partir da membrana celular e metabolismo diferenciado das demais células (MARKERT, 1968). As células neoplásicas possuem perfis de expressão de genes que diferem das células saudáveis, além de processos de sinalização e diferenciação celular específicos, expressão de determinadas proteínas que favoreçam o desenvolvimento de neoplasias e até mesmo mecanismos que utilizam de células tronco para a geração e rápida proliferação de tecidos tumorais (ZHANG *et al.*, 1997).(REYA *et al.*, 2001; DWIVEDI *et al.*, 2019).

Figura 2. Gráficos de incidência e mortalidade mundiais de câncer, elencados por tipos de câncer mais incidentes e suas respectivas taxas de mortalidade, incidência de novos casos de câncer por país e taxa de mortalidade por câncer por país.



Fonte: Global Cancer Observatory (GCO). Disponível em <<https://gco.iarc.fr/today/home>>. Data de Acesso: 30 de março de 2019.

2.2. Tratamentos clássicos

Os tratamentos clássicos utilizados no combate às neoplasias são a quimioterapia, a radioterapia e a cirurgia (MURTHY *et al.*, 2015; TIDY *et al.*, 2016; LE GRAZIE *et al.*, 2017). A quimioterapia é um tratamento à base de fármacos citotóxicos que atuam em diversas etapas do processo de divisão celular, sendo o principal alvo do tratamento as células neoplásicas, que possuem uma deficiência no controle da proliferação, a qual ocorre de forma acelerada e descontrolada (ALMEIDA *et al.*, 2005). Entretanto, a quimioterapia também afeta células normais desencadeando uma série de efeitos colaterais como diarreia, vômito, úlceras, boca seca e queda de cabelo, além de consequências na saúde psicológica do paciente, como quadros de ansiedade, delírios e mudanças de humor (KURKJIAN *et al.*, 2017; LORUSSO *et al.*, 2017; GARCÍA-CHÍAS *et al.*, 2019).

A radioterapia induz morte celular por ação de radiações ionizantes, que pode ser eletromagnética, raios X ou gama, e particulada, partículas α e β , prótons e nêutrons. Sobre este método de tratamento, ainda são feitas diversas investigações acerca de mecanismos de ação e modos de melhorar sua eficácia no tecido tumoral (CHEN e KUO, 2017), incluindo o estudo de produção de espécies reativas de oxigênio. Entretanto, o dano causado primeiramente a região localizada do tumor se estende ao período posterior ao tratamento, causando reação inflamatória local como cistite, dermatite e retinite, pneumonia, fibrose pulmonar, hematúria e infertilidade (BARKER *et al.*, 2015). Estudos recentes também mostram que a resposta imunossupressora do tecido a radioterapia relaciona-se com a recorrência da doença se este for o único tratamento utilizado para alguns tipos de câncer, como linfomas (ZITVOGEL e KROEMER, 2015). Isto ocorre devido à resistência a radiação de tipos celulares determinantes para a sinalização de células que agem na resposta imunológica contra as células cancerosas (células de Langerhan, que estimulam a produção dos linfócitos T).

A cirurgia é utilizada para a retirada de tecidos neoplásicos localizados, e não é indicada para casos de metástase. Esses tratamentos clássicos são demorados e causam desgaste e sofrimento ao paciente (SIBATA *et al.*, 2000) (OCHSNER, 1997). Para que a cirurgia seja uma opção de tratamento, uma série de fatores, correspondentes ao tipo de câncer a ser tratado, envolvendo o tumor deve se enquadrar em determinados critérios para que seja considerado elegível ao procedimento, como tamanho do tecido canceroso, idade do paciente, doenças preexistentes e condições físicas (SONGUN *et al.*, 2010; GOLSHAN *et al.*, 2015). O tratamento cirúrgico, apesar de não submeter o paciente aos efeitos colaterais da radioterapia e quimioterapia, pode deixar sequelas permanentes, como disfunção urinária (câncer de reto), perda de forma de membros superiores (câncer de mama e pescoço), dificuldades de mastigar e engolir e desfiguração do rosto (câncer de cabeça e pescoço) e perda da função sexual (FOWLER JR *et al.*, 1995; ARNAUD *et al.*, 2004; LANGE *et al.*, 2008; KAWECKI e KRAJEWSKI, 2014). Apesar de todas as dificuldades causadas na qualidade de vida das pessoas submetidas a este tratamento, para o câncer de mama, por exemplo, a mastectomia vem sendo utilizada como forma de prevenção de reincidência de tumor na outra mama após o tratamento (TUTTLE *et al.*, 2007).

A tendência diante dos estudos das últimas décadas é a busca por tratamentos que melhorem a qualidade de vida dos pacientes e que tenham maior eficácia, reduzindo o tempo de tratamento, os efeitos colaterais causados aos pacientes e diminuindo o risco de reincidência da doença.

2.3. Inovações no tratamento de câncer

A utilização de novas tecnologias para o tratamento de câncer possibilitou o desenvolvimento de terapias mais confortáveis para os milhões de pacientes que sofrem com esta doença.

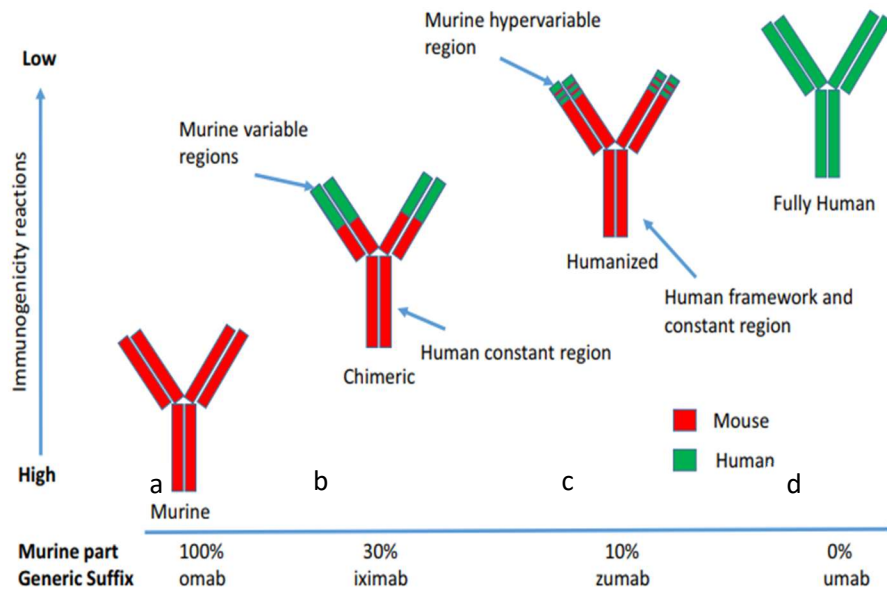
A imunoterapia já é utilizada como o eixo central de tratamento para diversos tipos de câncer, como leucemia e câncer de mama. Proteínas com resposta imunológica específica ao tumor são utilizadas como terapia auxiliar a outros métodos (DOUGAN e DRANOFF, 2009). A base da imunoterapia é a chamada imunomodulação, na qual as células do sistema imunológico, em grande parte linfócitos T, são utilizadas para causar uma resposta imunológica para as células tumorais. Seus principais agentes são os anticorpos monoclonais. Estes possuem a capacidade de ativar ou inibir determinadas moléculas do sistema imunológico e, através de avanços na engenharia genética, causarem respostas imunológicas específicas ao tecido tumoral (WEINER *et al.*, 2010). Eles podem causar cardiopatias, hemorragias, complicações na região tumoral, hipertensão, alterações na tireoide e um tipo de anemia autoimune (HANSEL *et al.*, 2010).

Outras adversidades eram encontradas em relação à origem dos anticorpos, num primeiro momento extraídos de ratos, e, posteriormente, 'humanizados'. Após este procedimento houve o melhoramento da resposta imune e a redução das reações imunológicas contra anticorpos de outra espécie (Figura 3)(SINGH *et al.*, 2018). Atualmente, nos Estados Unidos mais de 20 anticorpos monoclonais já são aprovados no tratamento de tumores.

A característica dos anticorpos monoclonais de se ligarem especificamente a antígenos das células tumorais (KÖHLER e MILSTEIN, 1975) traz a ideia central da terapia-alvo, que pode interferir no tecido tumoral de diferentes formas, sempre utilizando suas características divergentes em relação aos tecidos saudáveis. Pró-drogas que se ativam com a ligação à moléculas específicas da célula tumoral são promissoras na busca da redução dos efeitos colaterais da quimioterapia, pois podem

agir sobre a regulação de diversos processo celulares, tendo como principal alvo a divisão celular (PÉREZ-HERRERO e FERNÁNDEZ-MEDARDE, 2015).

Figura 3. Processo de ‘humanização’ dos anticorpos monoclonais. O prefixo indica a origem do anticorpo e o sufixo ‘mab’ significa *Monoclonal AntiBodies*. (a) *o* – retirado de rato; (b) *i* – retirado de primata e *xi* – anticorpo quimérico; (c) *zu* – anticorpo humanizado; (d) *u* – anticorpo humano.



Fonte: Adaptado de (SINGH *et al.*, 2018).

Ainda é possível projetar diferentes alvos, como a angiogênese, responsável pelo desenvolvimento da vascularização do tecido tumoral e a vascularização já formada do tumor, responsável pela nutrição do tumor (BELLOU *et al.*, 2013; ZHAO e ADJEI, 2015). Estas vias de crescimento tumoral podem ser combatidas com o chamada quimioterapia “metronômica” (referente ao metrônomo, ferramenta musical que indica compasso, frequência), método que administra baixas doses de drogas quimioterápicas de forma frequente (semanal e até diariamente). Este tipo de administração permite que a droga aja especificamente na angiogênese e impede as células epiteliais da vascularização de se recuperarem, uma vez que o sangue do paciente sempre contém uma pequena dose da droga, mas sem efeitos colaterais significativos (MAITI, 2014).

O epigenoma, responsável pela regulação da expressão de genes, também pode ser utilizado como alvo. É possível contornar mecanismos de resistência das células cancerosas a partir de modificações na expressão dos genes que atribuem

essa característica ao tecido tumoral, identificado pelo epigenoma (JONES *et al.*, 2016). Outra opção da terapia-alvo é a utilização do órgão atingido pelo câncer como alvo para a terapia, uma vez que podem ter receptores específicos (BRANNON-PEPPAS e BLANCHETTE, 2012).

Para câncer de mama e próstata é possível fazer uso da terapia hormonal, na qual a manipulação de hormônios andrógenos é responsável pela redução do crescimento tumoral (CAPPER *et al.*, 2016). Para o câncer de próstata avançado, a privação dos hormônios testosterona e diidrotestosterona pode propiciar uma sobrevida de até 4 anos, em associação a outros métodos de tratamento (HARRIS *et al.*, 2009). Para o câncer de mama, progesterona pode ser utilizado como modulador da atividade de receptores de estrogênio (Er α), inibindo a proliferação do tecido tumoral que possua células que sejam Er α positivas (MOHAMMED *et al.*, 2015).

A ativação de quimioterápicos localmente na região do tumor é uma maneira de reduzir os efeitos colaterais. Isto pode ser feito por funcionalização de agentes quimioterápicos para liberação ou ativação local (ZONG *et al.*, 2015; POLÁKOVÁ *et al.*, 2019), agentes quimioterápicos ativados por reações redox pela característica redutora do ambiente tumoral (ZHANG e SADLER, 2017) ou ativação de compostos fotossensíveis através de estímulos luminosos. A este último mecanismo dá-se o nome de Terapia Fotodinâmica.

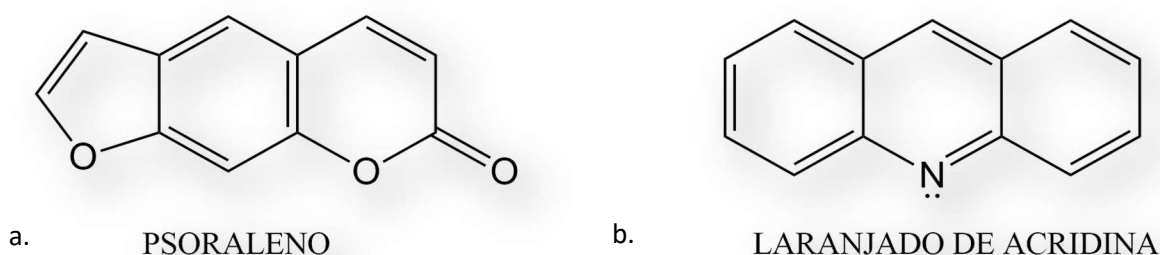
2.4. Terapia Fotodinâmica (TFD)

2.4.1. Histórico da Terapia Fotodinâmica

Os primeiros registros da utilização de luz como tratamento foram feitos na Índia, em 1400 a. C., com a utilização de plantas para a cura do vitiligo através do uso de sementes pretas. Posteriormente, descobriu-se que a origem da semente era a planta *Psoralea corylifolia*, cuja utilização causava a pigmentação das áreas afetadas pela doença (FITZPATRICK e PATHAK, 1959). Estudos mostraram que a pigmentação era causada pelo composto fotoativo psoraleno (Figura 4(A)), utilizado também para tratamento de psoríase quando associado a radiação ultravioleta (ASIM e AHMED, 2013). O psoraleno também pode ser utilizado na produção de vacinas e tratamento de câncer, além de possuir a propriedade de interagir com o DNA (HEARST, 1981).

A luz e seu efeito terapêutico tornaram-se objetos de estudo científico no início do século 20, mais de 3.000 anos após os relatos indianos. Em Munique, Oscar Raab observou notável aumento na toxicidade da acridina em paramécio quando em presença de luz de forma acidental, após um raio ocorrer no decorrer de uma das replicatas, a qual resultou na maior taxa de morte do protozoário e indicou que a luz afetava a atividade do laranja de acridina (Figura 4(B)) (RAAB, 1900). Anos mais tarde, o orientador de Raab, Herman Von Tappeiner, identificou que a presença de oxigênio era necessária para que houvesse o processo de fotossensibilização e nomeou de 'terapia fotodinâmica' esta interação entre luz, oxigênio e composto fotossensibilizador (FS) (ACKROYD *et al.*, 2001).

Figura 4. Estrutura dos primeiros compostos fotoativos conhecidos: (A) Psoraleno e (B) laranja de acridina.



Fonte: autora.

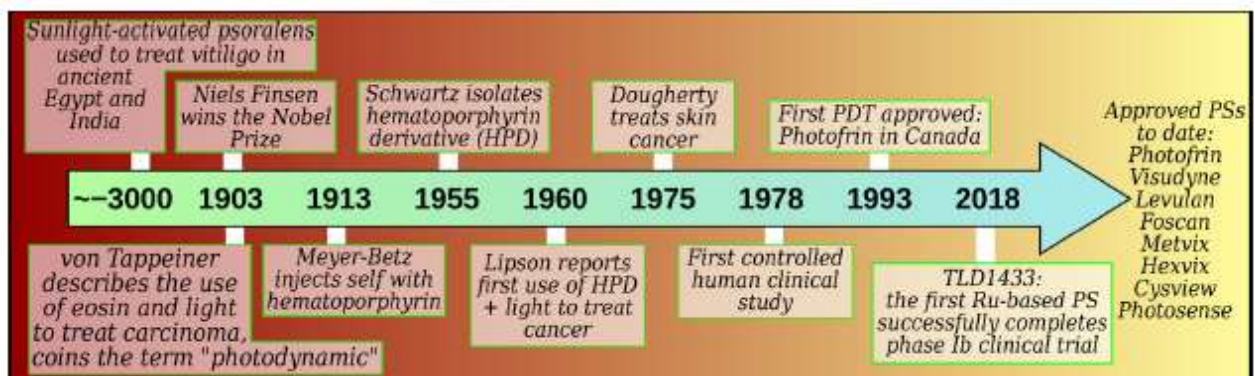
Nos anos 20, Policard observou fluorescência no tecido tumoral e o atribuiu ao acúmulo de porfirinas endógenas neste tecido (POLICARD, 1924). Entre os anos 40 e 70, diversos foram os estudos demonstrando maneiras de utilizar porfirinas e moléculas que pudessem ser ativadas por luz para a identificação de tumores (FIGGE *et al.*, 1948; RASSMUSSEN-TAXDAL *et al.*, 1955; WINKELMAN, 1962; WINKELMAN, 1967). Concomitantemente, estudou-se a possibilidade da utilização do tratamento de tumores por compostos ativados por luz, como a hematoporfirina (LIPSON *et al.*, 1961).

Além da descoberta das diferentes propriedades dos promissores compostos ativados por luz, também fez-se importante desvendar a causa de tamanha toxicidade às células tumorais. Na década de 70, Weishaupt identificou o oxigênio singlete (1O_2) como a espécie tóxica ao tecido tumoral gerada após a irradiação dos fotossensibilizadores, previamente incorporados e acumulados no tecido doente (WEISHAUPT *et al.*, 1976).

Inicialmente, a descoberta da fluoresceína como fotossensibilizador deu margem à estudos utilizando-a como geradora de oxigênio singleto, porém fatores como baixo rendimento de $^1\text{O}_2$ e baixa penetração no tecido se fizeram limitações para sua utilização (DOUGHERTY, 1974). Estas dificuldades foram resolvidas com o estudo aprofundado da hematoporfirina previamente como fotossensibilizador, separando suas frações fotossensíveis e purificando-as, até a aprovação de sua utilização clínica nos Estados Unidos, sob o nome de Photofrin® (DOUGHERTY, 1996). Desde então, a pesquisa acerca de novos fotossensibilizadores, novas propriedades e maior alcance no tratamento de diferentes doenças alavancou, unindo diversas áreas da ciência como Química, Ciências Farmacêuticas e Medicina. Além disso, apresenta diferentes classes de moléculas como candidatos à fotossensibilizadores, tais como complexos metálicos, clorinas, porfirinas, ftalocianinas, produtos naturais, bem como uma grande contribuição da nanotecnologia no desenvolvimento de sistemas que possibilitem máximo aproveitamento das muitas vantagens da terapia fotodinâmica (MACDONALD e DOUGHERTY, 2001; ABRAHAMSE e HAMBLIN, 2016).

Desde a aprovação do Photofrin® como fotossensibilizador, o conhecimento do desenvolvimento da terapia fotodinâmica se fez importante na busca de compostos que sanassem ou reduzissem consideravelmente as desvantagens desta técnica, que apenas nos últimos vinte anos passou a ser aproveitada clinicamente (Figura 5).

Figura 5. Histórico do desenvolvimento da Terapia Fotodinâmica.



Fonte: (MONRO *et al.*, 2018).

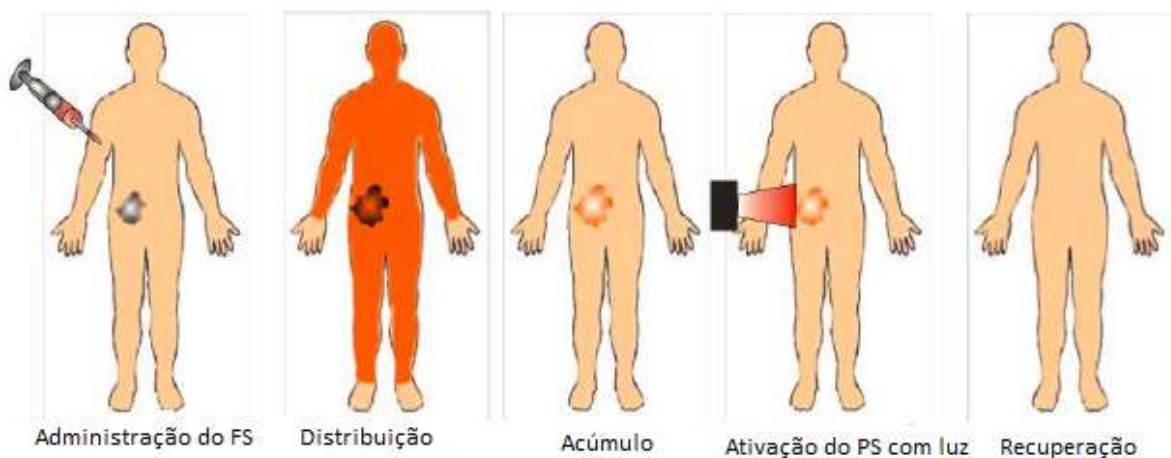
2.4.2. Mecanismos de ação

A Terapia Fotodinâmica (TFD) se dá pela interação entre um composto fotossensível, chamado fotossensibilizador, e a luz. Como resultado, observa-se a ocorrência de uma série de reações fotoquímicas e fotobiológicas no ambiente biológico ao qual a terapia fora aplicada, em muitos casos causando danos irreversíveis ao tecido submetido ao tratamento (DOUGHERTY *et al.*, 1998).

O primeiro passo da terapia fotodinâmica é a administração do fármaco fotossensível e não tóxico ao paciente. É necessário que haja um período de incubação para que o acúmulo do composto no tecido tumoral seja satisfatório para a TFD, bem como maior do que em outros órgãos, como fígado, pâncreas, estômago e pulmão (CASTANO *et al.*, 2005). Em busca de aumentar a especificidade do fotossensibilizador para o tecido tumoral e a eficiência da TFD, a administração do fármaco diretamente no tumor é uma alternativa que possui bons resultados, quando o quadro é adequado (BARAN e FOSTER, 2016; AHN *et al.*, 2017).

Posteriormente, a região a ser tratada é submetida a uma dose de luz com energia adequada para a ativação do fármaco, na faixa de 600 a 850 nm, chamada janela terapêutica (Figura 6). A partir da irradiação da molécula, a ação da TFD baseia-se nos mecanismos de absorção e transferência de energia, resultando em processos fotofísicos e fotoquímicos que culminam na toxicidade ao tecido (MROZ *et al.*, 2011).

Figura 6. Representação esquemática do tratamento por terapia fotodinâmica.



Fonte: Adaptado de (MROZ *et al.*, 2011).

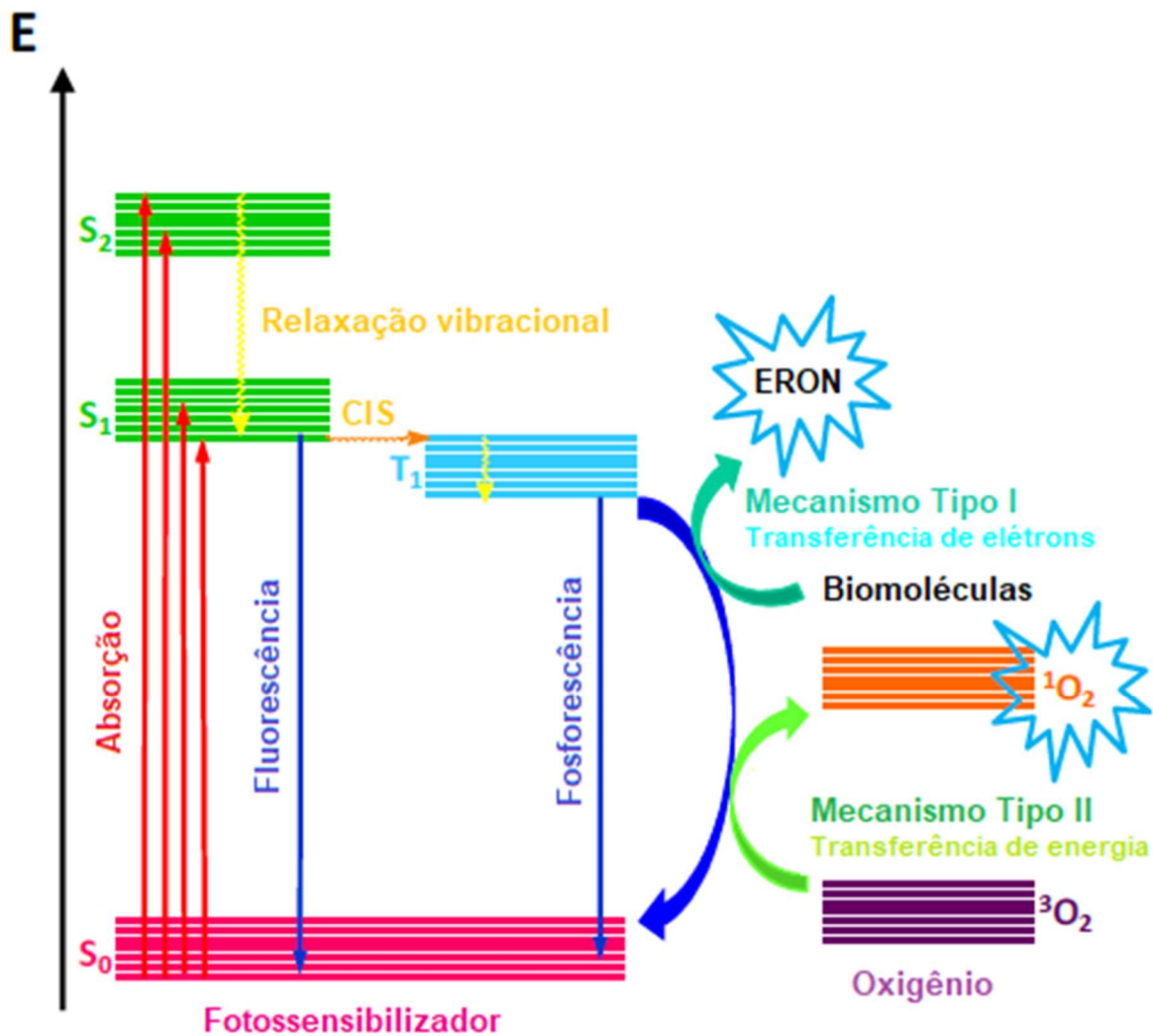
Primeiramente, o fotossensibilizador (FS) encontra-se em seu estado fundamental singlete (S_0), caracterizado pela presença de dois elétrons de spin opostos no orbital de menor energia. Ao absorver um fóton com a energia adequada, um dos elétrons sofre uma transição para um orbital de energia maior, configuração chamada de estado excitado singlete (S_n), FS^* . Para retornar ao seu estado de menor energia ($S_1 \rightarrow S_0$; $FS^* \rightarrow FS$), o fotossensibilizador pode sofrer processos radiativos de emissão de fluorescência ou conversão interna, processos de relaxação não-radiativos na qual a energia é dissipada na forma de calor. A fluorescência do fotossensibilizador pode auxiliar na identificação e delimitação do tecido tumoral (CARBINATTO *et al.*, 2016).

Outra possibilidade é a ocorrência do cruzamento intersistema. Neste processo ocorre a inversão do spin do elétron que está no orbital de maior energia, passando para o estado excitado tripleto (T_1), o qual possui uma configuração de energia discretamente menor que a do estado S_1 . Devido a esta diferença energética, o tempo de vida do estado T_1 é maior do que o estado S_1 . Para retornar do estado T_1 para o estado S_0 , o elétron deve sofrer uma nova inversão no spin e pode fazê-lo através da emissão de fosforescência ou desencadeando reações fotoquímicas que ocorrem por mecanismos distintos, conhecidos como Mecanismo Tipo I e Mecanismo Tipo II, representados pelo diagrama de Jablonski (Figura 7)(CASTANO *et al.*, 2005).

No Mecanismo Tipo I, ocorre a transferência de elétrons entre o fotossensibilizador em seu estado excitado (T_1 ou S_1) e substratos presentes no meio biológico, formando íons radicais. Estes podem reagir com o oxigênio molecular disponível na região, resultado na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}) são exemplos de ERO, que devido a sua alta reatividade e produção constante no ambiente celular podem oxidar diversas biomoléculas e causar danos a mecanismos essenciais para a reprodução celular (DIXON e STOCKWELL, 2014).

No Mecanismo Tipo II ocorre transferência de energia do fotossensibilizador em seu estado T_1 diretamente para o oxigênio molecular presente no tecido, o qual possui o estado fundamental tripleto (3O_2). O fotossensibilizador então retorna a S_1 e o 3O_2 é excitado, ocasionando a inversão do spin de um elétron e sua transferência para um orbital de maior energia, formando o oxigênio singlete, 1O_2 . Esta espécie é citotóxica e extremamente reativa, podendo reagir com diversos substratos disponíveis (DEROSA e CRUTCHLEY, 2002; AGOSTINIS *et al.*, 2011).

Figura 7. Diagrama de Jablonski.



Fonte: Adaptado de (FERREIRA *et al.*, 2017).

Uma vez que o Mecanismo Tipo I exige uma combinação favorável de uma série de fatores (disponibilidade de substrato e de oxigênio, por exemplo), a geração de ERO's é mais simples através do Mecanismo Tipo II, cuja eficiência da produção de ¹O₂ está associada ao tempo de vida do estado T₁ e à concentração de oxigênio molecular disponível no tecido.

Além dos Mecanismos Tipo I e II, estudos ainda indicam um terceiro mecanismo, conhecido como Tipo I Modificado (do inglês, Modified Type I – MTO) ou

Mecanismo Tipo III. Neste processo ocorre uma transferência de elétrons do fotossensibilizador em seu estado T_1 para biomoléculas e radicais disponíveis no ambiente submetido ao tratamento (ZHU *et al.*, 2007; KNOLL e TURRO, 2015).

A morte celular como consequência da terapia fotodinâmica pode acontecer por diferentes mecanismos, como apoptose, necrose e autofagismo. Cada mecanismo é desencadeado pela sinalização ou ativação de determinados receptores e possui diferentes etapas. A via de morte celular depende de fatores como o tipo de célula tumoral e qual alvo celular que sofre alteração (sinalização, inibição, destruição) (WYLD *et al.*, 2001; BUYTAERT *et al.*, 2007; MROZ *et al.*, 2011).

2.4.3. Espécies Reativas em Terapia Fotodinâmica

Independente de qual mecanismo ocorra, a geração de espécies reativas de oxigênio é o principal objetivo da TFD. Em células cancerosas, os níveis de produção de ERO são consideravelmente elevados em relação aos tecidos saudáveis, até mesmo quando adjacentes ao tecido tumoral. A esta característica credita-se o dano extenso causado pelo câncer, pois ela auxilia no processo metastático através da danificação de inibidores de proteínas que facilitam a distribuição das células cancerosas (TOYOKUNI *et al.*, 1995).

A regulação da concentração destas espécies reativas nas células relaciona-se à expressão de proteínas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD). Incluindo a redução da expressão desta enzima, dano ao DNA mitocondrial e defeitos na cadeia respiratória da mitocôndria são mecanismos que causam o acúmulo de ERO nas células. Além destes, inflamações crônicas também causam o aumento de ERO e, conseqüentemente, favorecem o desenvolvimento de tumores. O acúmulo destas espécies causa respostas biológicas, tais como: adaptação, na qual o organismo utiliza de mecanismos para se defender ao estresse oxidativo e manter a funcionalidade da célula; promoção do crescimento celular através de sinalização por mecanismos redox ou pela perda da função regulatória da proteína p53 após sua oxidação; dano no DNA e instabilidade genética causados pela alta reatividade de espécies de oxigênio com o DNA mitocondrial e, possivelmente, DNA nuclear, associada à baixa possibilidade de reparo nas células tumorais, causando um acúmulo de danos no DNA deste tecido; alteração na sensibilidade à drogas por diversos mecanismos de inibição de receptores e hipersensibilização das células; dano e morte celular através de diversos mecanismos de oxidação. Este último é

explorado como o de maior potencial terapêutico e ocorre por mecanismos de necrose, apoptose ou autofagismo. (PELICANO *et al.*, 2004; MROZ *et al.*, 2011).

Por outro lado, em tumores sólidos ocorre a hipoxia, ou seja, baixas concentrações de oxigênio, fator que reduz a eficiência da terapia fotodinâmica, uma vez que prejudica a formação de ERO. A vascularização do tecido tumoral é desenvolvida de forma desorganizada, criando uma rede comprometida de vasos que não são aptos a transportar $^3\text{O}_2$ de maneira coesa pelo tecido rapidamente desenvolvido, criando regiões em que a concentração de oxigênio é extremamente baixa e até mesmo regiões de necrose em tumores sólidos (HOCKEL e VAUPEL, 2001; VAN STRATEN *et al.*, 2017).

O desafio no aprimoramento desta técnica é atingir os dois objetivos: superar a deficiência de oxigênio do tecido tumoral e produzir espécies radicalares em quantidade superior à que a célula tumoral consiga manter sua funcionalidade. Utilizar a característica hipóxica do tecido tumoral é um caminho terapêutico no qual se desenvolvem novos fotossensibilizadores que possuem a propriedade de se ativarem ou serem específicos para ambientes de hipóxia (DENNY, 2010; WILSON e HAY, 2011; PHILLIPS, 2016). É possível também modular a produção de oxigênio utilizando sistemas que associem fotossensibilizadores à complexos geradores de oxigênio a partir da reação com peróxido de hidrogênio endógeno (ZHU *et al.*, 2016).

Outras propostas visam a independência entre a eficiência da terapia fotodinâmica e a concentração de oxigênio no tecido. Assim, outros radicais são utilizados, como as espécies reativas de nitrogênio (ERN) que, assim como as ERO, podem atuar como estimulante do desenvolvimento tumoral ou como agente tóxico à células cancerosas (WISEMAN e HALLIWELL, 1996; OHSHIMA, 2003). Dentre os radicais de nitrogênio, peroxinitrito (ONOO^-) e o radical dióxido de nitrogênio (NO_2^\cdot), destaca-se o radical óxido nítrico (NO^\cdot), cujas características ímpares permitem que ele seja uma opção promissora no desenvolvimento da PDT.

2.4.3.1. Importância biológica do óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) apresenta surpreendente onipresença em seres vivos. É a única molécula endógena conhecida que reúne as propriedades de neurotransmissor, de mediador constitutivo e indutível e de agente citotóxico. Ela possui ação na regulação da pressão arterial, no sistema imunológico e nas atividades do cérebro, fígado, pâncreas, útero e pulmões (CULOTTA e KOSHLAND

JR, 1992);(WINK *et al.*, 1998; RICHTER-ADDO *et al.*, 2002)

A molécula de NO é a menor molécula classificada como mensageiro nos processos biológicos. Nessa função o NO, não depende de transportadores específicos nem de canais de passagem intracelulares. Ele difunde-se pela célula, com a mesma facilidade em meio hidrofílico e em meio lipofílico. Sua ação fisiológica depende muito mais de suas propriedades físico-químicas do que de sua conformação espacial.

Atribuem-se as ações bioquímicas do óxido nítrico à diversidade de suas espécies, ou seja, a espécie NO^+ (íon nitrosônio), que é formada pela retirada do elétron desemparelhado no orbital π^* , e a espécie NO^- (ânion nitróxido), que é formada pela adição de um elétron ao orbital. O ânion nitróxido é isoeletrônico ao gás oxigênio (O_2) e pode existir no estado singleto, de maior energia ou no estado tripleto, de menor energia. O íon nitrosônio é isoeletrônico ao monóxido de carbono (CO) e reage rapidamente com água e outros nucleófilos (WINK *et al.*, 1993).

O NO também atua em carcinogênese, progressão tumoral e na terapia do câncer dependendo da variedade de condições no meio intracelular, como tipo de célula alvo, concentração de NO e a presença de outras espécies radicalares (WELLER, 2003; CHIANG, *et al.*, 2005). Ao mesmo tempo em que altas concentrações de NO promovem o efeito tumorocida (morte celular), mecanismos de proteção celular antiapoptose (efeito tumorogênico) mediado pelo NO vêm sendo estudados, mas ainda não foram totalmente elucidados (WINK *et al.*, 2008). Sob influência citotóxica do NO, dentre as hipóteses para elucidação dos mecanismos que envolvem o processo de apoptose ocasionado pelo NO destacam-se: indução da expressão de Bcl-2 que é um inibidor do processo de ativação das caspases, inativação de enzimas que reparam o DNA e indução do fator de transcrição p53 (CALSGRIERSON e ORMEROD, 2004; LECHNER *et al.*, 2005; SINGH e GUPTA, 2011).

Em 1998, GUPTA e colaboradores demonstraram a produção de NO durante o processo de fotossensibilização de células com tumor utilizando-se uma ftalocianina como sensibilizador. O mecanismo de formação do NO durante a terapia fotodinâmica foi explicado com base no fato de que a TFD resulta em um aumento rápido e significativo da atividade da isoforma da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS ou NOS1), que é dependente do Ca^{2+} presente nos tecidos cerebrais e neuronais (GUPTA *et al.*, 1998). Estas descobertas trouxeram interesse no estudo da química e

bioquímica do NO levando ao desenvolvimento de novas drogas que possam agir em diversas áreas da medicina.

Devido à extrema instabilidade das moléculas de NO em meio biológico e seu curto tempo de meia vida (aproximadamente 5 segundos), torna-se difícil o estudo de seus efeitos fisiológicos. Assim, existe um grande interesse em compostos químicos que possam servir de pró-drogas para a liberação controlada do NO nos sistemas biológicos. Esses compostos devem apresentar algumas propriedades características como ser de fácil preparação em uma forma pura e estável, de preferência hidrossolúveis, gerar NO quantitativamente, e os produtos resultantes da saída do NO devem ser compostos inertes e atóxicos, facilmente metabolizados pelo organismo (SAUAIA *et al.*, 2003; DA SILVA *et al.*, 2015). Na projeção de complexos que possam carrear óxido nítrico à células-alvo, a liberação deste pode ocorrer como resposta a reações redox com moléculas e espécies do meio biológico, como o radical superóxido, ou, ainda, como foto-liberação após irradiação em comprimentos de onda com energia adequada (SORTINO, 2010; FRANCO *et al.*, 2014; DE LIMA *et al.*, 2017).

Aproveitando a resposta positiva do NO a estímulos luminosos, além de uma ampla experiência na síntese de complexos que comportem e liberem esta molécula, o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Roberto Santana da Silva, nos últimos anos, utilizou da associação de óxido nítrico à moléculas fotossensibilizadoras e produtoras de oxigênio singleto obtendo, dentre outros resultados, uma ação sinérgica entre as duas espécies reativas (NEGRI, 2015; RAMOS, 2016; NEGRI *et al.*, 2017; MARTINS, 2018; MÁXIMO e SILVA, 2018).

2.4.4. Fotossensibilizadores

Fotossensibilizador é o nome dado a substâncias que possuem a propriedade de causar sensibilidade à luz a outras substâncias que não possuem esta característica. Na terapia fotodinâmica, o fotossensibilizador é o composto responsável por iniciar uma sucessão de processos (vide Item **2.4.2.**) a partir da interação dele com a luz, em um local determinado (tumor).

2.4.4.1. Características de um fotossensibilizador ideal

Um bom fotossensibilizador deve ser um composto puro, de preferência em sua forma monomérica, de fácil fabricação e baixo custo, e estável quando estocado

(GOMES *et al.*, 2018). Sua toxicidade no escuro deve ser nula e sua eliminação de tecidos saudáveis, rápida (SAAVEDRA *et al.*, 2014). A concentração e posterior eliminação do fotossensibilizador nos tecidos não cancerosos se relaciona diretamente com a especificidade com fármaco para com os tecidos tumorais a serem tratados, realçando a importância desta característica.

A estabilidade do composto deve se manter durante o decorrer do tratamento. A degradação do fármaco pela terapia fotodinâmica, ou seja, fotodegradação, pode ocorrer por mecanismos mediados por oxigênio singlete, independente de oxigênio ou ainda por outros mecanismos (WIDENGREN e RIGLER, 1996). Estudos mostram que, mesmo que a fotodegradação ocorra, a própria ação da TFD causa a redução do fluxo sanguíneo na região tumoral e adjacente, reduzindo a concentração de oxigênio no tecido e, conseqüentemente, a taxa de fotodegradação (WANG *et al.*, 2009). Apesar de a estabilidade do fotossensibilizador ser elencada como critério de idealidade, este processo pode auxiliar na inativação do fármaco em regiões saudáveis próximas à região tratada, protegendo-as dos efeitos TFD (MANG *et al.*, 1987).

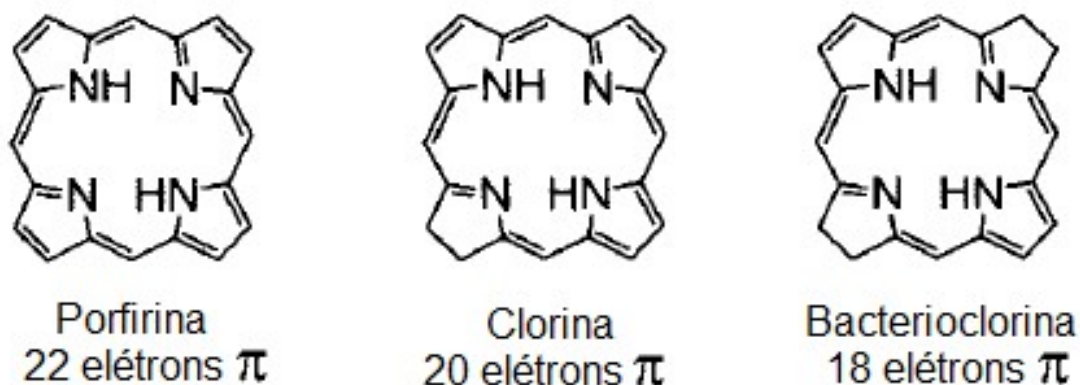
A droga deve absorver luz entre 600 e 800 nm, uma vez que esta faixa do espectro fornece energia suficiente para que o oxigênio em seu estado tripleto seja excitado ao seu estado singlete (DETTY *et al.*, 2004). A efetividade da terapia fotodinâmica também está associada ao rendimento quântico¹ do fotossensibilizador, pois é um dos fatores determinantes para a concentração de oxigênio singlete produzido, e, conseqüentemente, para a toxicidade na região tratada (MACDONALD e DOUGHERTY, 2001). Anteriormente acreditava-se que quanto maior o intervalo entre a administração do fármaco e a aplicação de luz (cerca de 4 dias), melhor a eficiência da TFD e a eliminação do fotossensibilizador do organismo. Porém, dados mostram que o dano causado pela TFD é maior quando este intervalo (do inglês, *drug-light interval*, DLI) é menor, uma vez que o fármaco ainda está presente na corrente sanguínea e causa danos significativos à vascularização (CHEN *et al.*, 2002).

Estas últimas características são facilmente encontradas nas porfirinas, clorinas e bacterioclorinas, moléculas que possuem em comum a estrutura parental do anel tetrapirrólico, se diferenciando pelo número de elétrons π deslocalizados na estrutura aromática (Figura 8). Estes compostos foram amplamente estudados como

¹ Rendimento quântico de oxigênio singlete pode ser definido como o número de moléculas de $^1\text{O}_2$ produzidas por fóton absorvido pelo fotossensibilizador.

fotossensibilizadores e são utilizados como base para a confecção de novos compostos candidatos a fotossensibilizadores, de modo a melhorar sua eficiência (ABRAHAMSE e HAMBLIN, 2016; MAZZONE *et al.*, 2016; CUI *et al.*, 2019).

Figura 8. Estrutura dos fotossensibilizadores porfirina, clorina e bacterioclorina.



Fonte: Adaptado de (MACDONALD e DOUGHERTY, 2001).

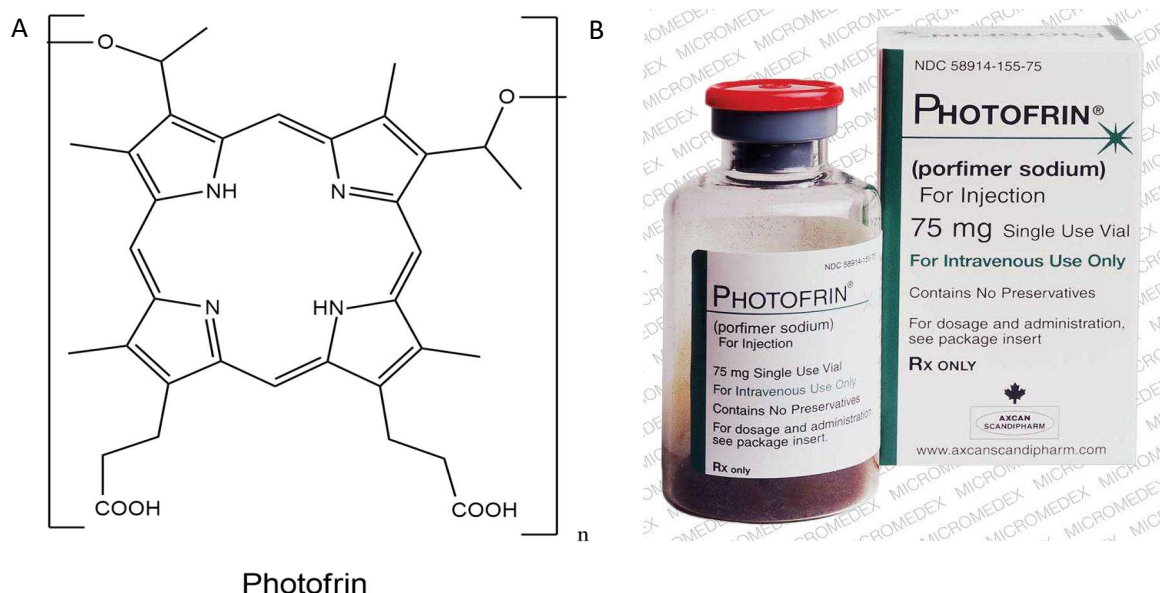
2.4.4.2. Fotossensibilizadores utilizados em TFD

Os fotossensibilizadores possuem uma classificação de acordo com a evolução no desenvolvimento deste tipo de composto, sendo eles de 1ª, 2ª ou 3ª geração. Os fotossensibilizadores de 1ª geração são os derivados de hematoporfirina (do inglês, *Hematoporphyrin derivative* – HpD) que, após intenso processo de purificação, originaram o primeiro fotossensibilizador aprovado para uso clínico, o Photofrin® (Figura 9) (DOUGHERTY, 1996). Além de ser uma mistura de oligômeros, este fotossensibilizador possui baixa absorção na região de 630 nm, na qual há baixa penetração na pele, baixa solubilidade em solventes polares e causam grande fotossensibilidade devido ao alto acúmulo na pele do paciente após sua aplicação, o qual deve manter-se em abrigo do sol por até seis semanas após o tratamento (MACDONALD e DOUGHERTY, 2001; NAYAK, 2005).

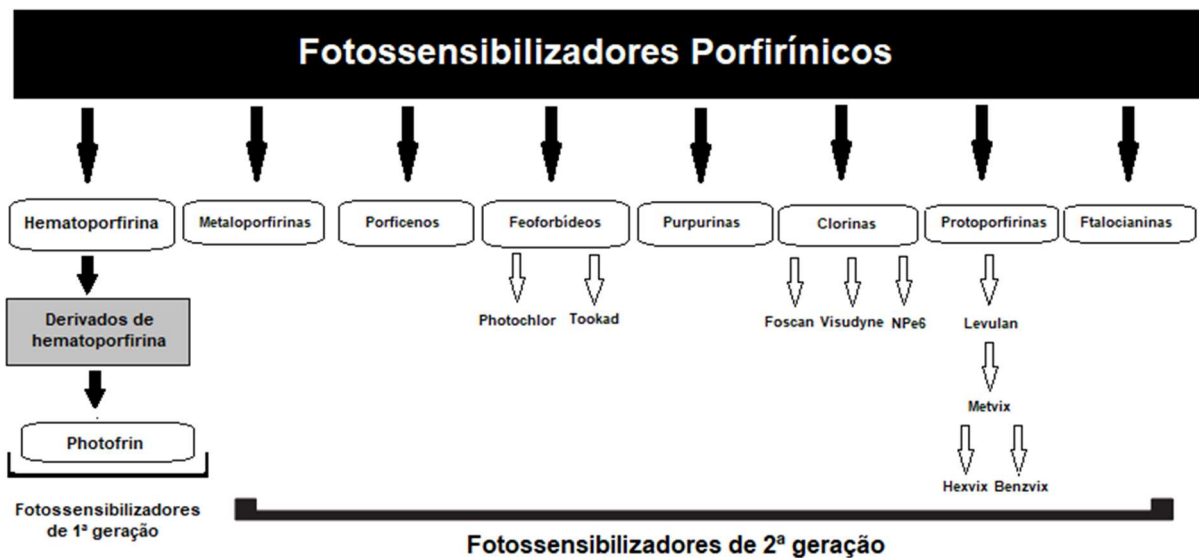
Uma vez que o desenvolvimento de novos tratamentos para o câncer, dentre eles a terapia fotodinâmica, busca melhorar tanto eficiência quanto a qualidade de vida do paciente em tratamento, as melhorias necessárias ao Photofrin® estimularam o desenvolvimento de novos compostos. Assim, surgiram os fotossensibilizadores de

2ª geração (Figura 10), os quais são mais puros, absorvem luz em maiores comprimentos de onda, permitindo maior penetração na pele, e causam menos fotossensibilidade pacientes (O'CONNOR *et al.*, 2009). Os principais fotossensibilizadores de segunda geração são moléculas derivadas da porfirina, com modificações em sua periferia ou em seu centro, tais como metaloporfirinas, purpurinas, clorinas, protoporfirinas, e ftalocianinas (ZHANG *et al.*, 2018). Fotossensibilizadores não derivados da porfirina não serão abordados. Apesar da gama de novos compostos estudados, apenas alguns deles foram aprovados para uso clínico (GOMES *et al.*, 2018).

Figura 9. (A) Estrutura do fotossensibilizador Photofrin®. (B) Embalagem comercial do Photofrin®.

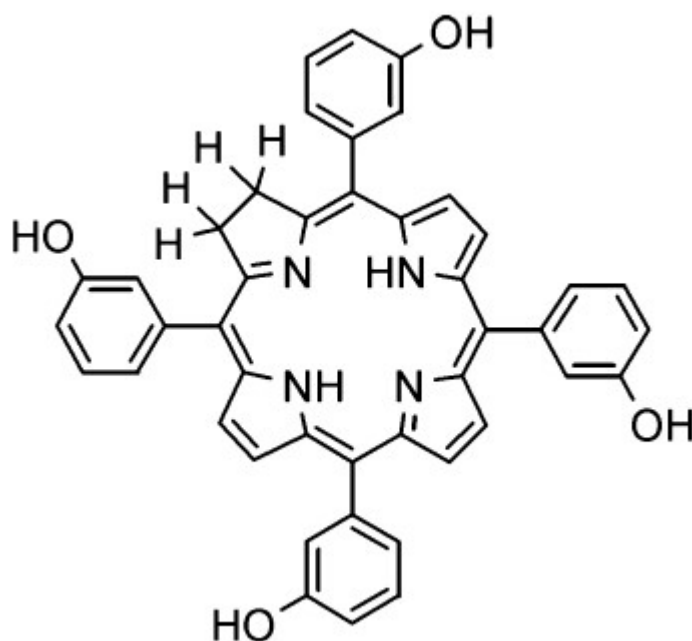


Fonte: (A) Adaptado de (ABRAHAMSE e HAMBLIN, 2016). (B) disponível em <https://www.baptistjax.com/health-library/drug-images/photofrin> (Data de acesso: 04/06/2019).

Figura 10. Distribuição esquemática dos fotossensibilizadores derivados de porfirina.

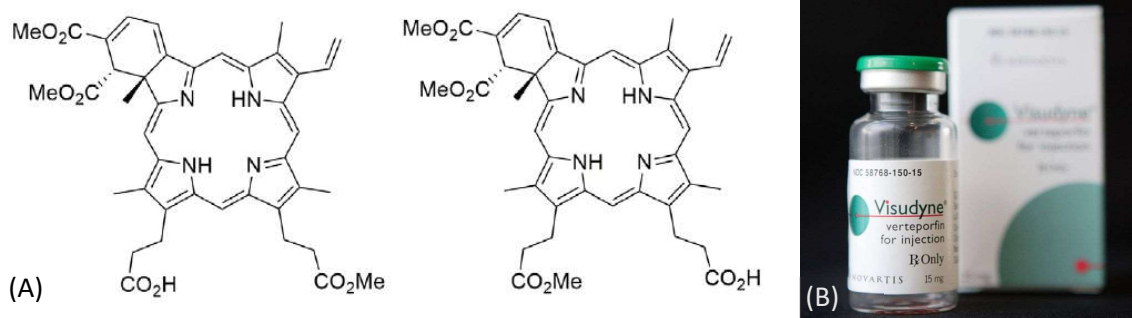
Fonte: Adaptado de (O'CONNOR *et al.*, 2009).

Foscan® ([5,10,15,20-tetraquis(*m*-hidroxifenil)clorina]), uma clorina conhecida também pelos nomes Temoporfin e *m*THPC, é sintetizado a partir da redução diimida da [5,10,15,20-tetra(*m*-hidroxifenil)porfirina] (*m*THPP) (BONNETT *et al.*, 1989), resultando em um composto com absorção máxima em 650 nm. Estudos clínicos comprovaram sua eficácia no tratamento de câncer de pele, câncer gastrointestinal e de esôfago, câncer no cérebro, próstata, pâncreas, mama, dentro outras malignidades ginecológicas e urológicas (SENIGE e BRANDT, 2011). Os efeitos colaterais observados para este fotossensibilizador são fotossensibilidade em até semanas posteriores à administração do medicamento, de modo dependente à dose aplicada e, em alguns casos, dor leve a moderada no local tratado (BETZ *et al.*, 2008).

Figura 11. Estrutura do fotossensibilizador de 2ª geração Foscan®.

Fonte: Adaptado de (SENGE e BRANDT, 2011).

A Verteporfina (Figura 12), de nome comercial Visudyne®, é uma mistura de dois isômeros. Com a estrutura parental da clorina, é utilizada para tratamento oftalmológico de degeneração macular relacionada à idade, neovascularização coroidal secundária e suspeita de histoplasmose ocular (PARODI *et al.*, 2016). O composto, que absorve luz entre 680 e 695 nm, causa a redução de vasos anormais, que poderiam levar à cegueira (SCHMIDT-ERFURTH e HASAN, 2000).

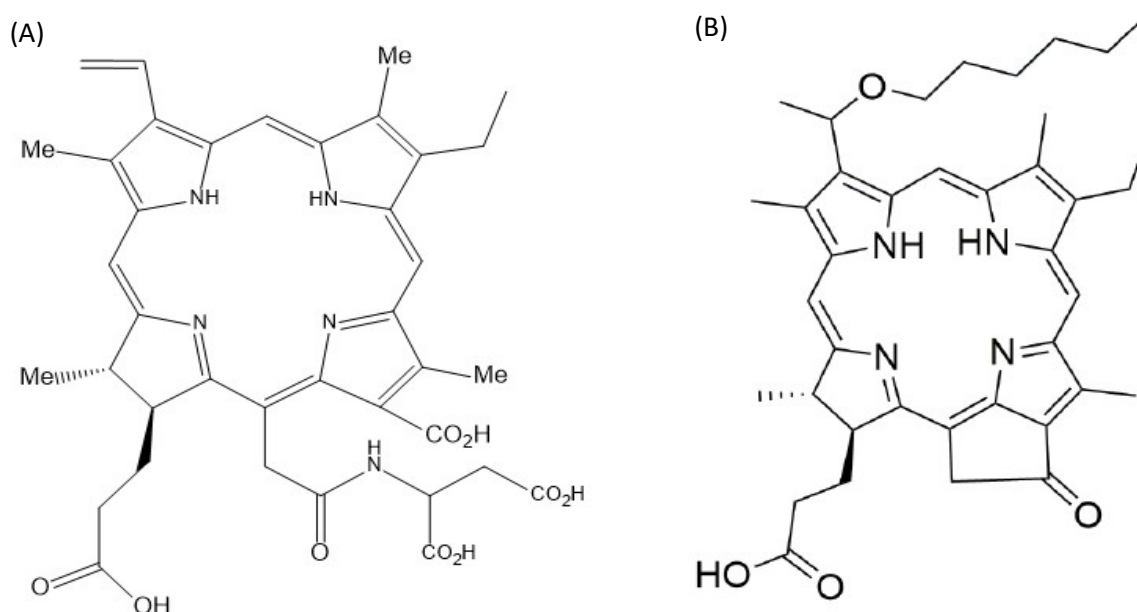
Figura 12. (A) Estrutura dos isômeros da Verteporfina. (B) Visudyne®.

Fonte: (A)(GOMES *et al.*, 2018). (B) Disponível em

<<https://www.theglobeandmail.com/globe-investor/valeant-buying-visudyne-treatment-for-blindness-from-qlt/article4563025/>>, (Data de acesso: 04/06/2019).

A mono-L-aspartil-clorina e6 (Figura 13A) é um fotossensibilizador de segunda geração comercializado sob diversos nomes, como NPe6, Apoptosin, Laserphyrin (aprovado no Japão), Talaporfin sodium, LS11 e Litx (GOMES *et al.*, 2018). Derivado de clorina, apresenta picos de absorção em 400 e 664 nm, sendo a última banda a de absorção máxima, em uma região que favorece maior penetração da luz no tecido (SPIKES e BOMMER, 1993; ALLISON *et al.*, 2004). É indicada para tratamento de câncer no fígado, cérebro e pulmão, e o tempo entre a administração e a irradiação do tecido é de 4 horas e a fotossensibilidade causada pelo composto de 2 a 3 semanas (KASUYA *et al.*, 2010; ALLISON *et al.*, 2011; MIKI *et al.*, 2012; MIKI *et al.*, 2015).

Figura 13. (A) Estrutura da mono-L-aspartil clorina e6. (B) Estrutura da HPPH.

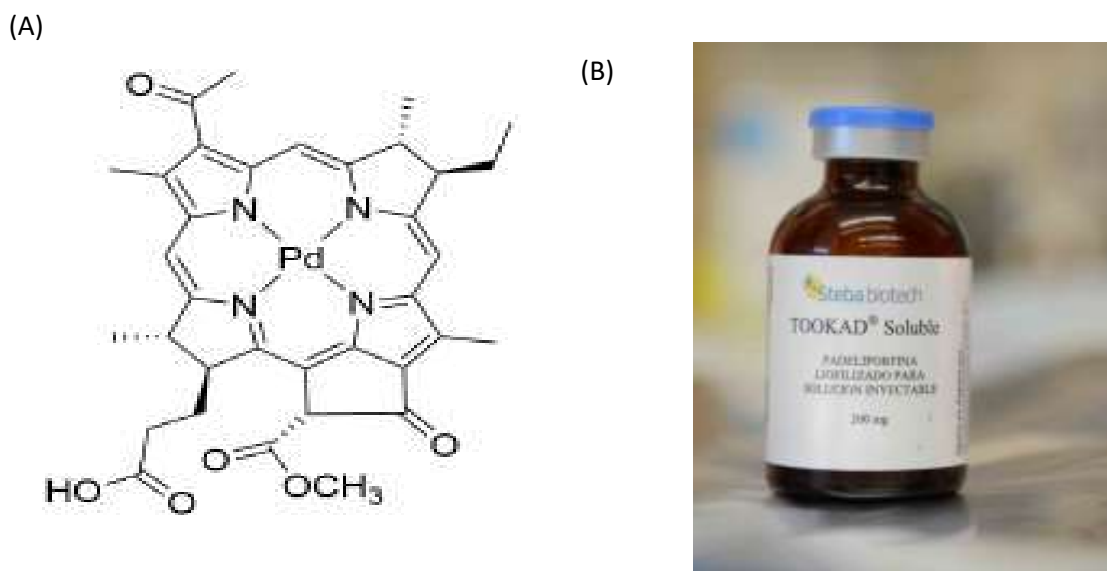


Fonte: Adaptado de (GOMES *et al.*, 2018).

A 2-(1-Hexyloxyetil)-2-devinil pirophorbide-a (Figura 13B), é conhecida comercialmente como Photochlor[®], tem seu máximo de absorção em 665 nm e apresenta fotossensibilidade em até 1 semana após sua administração, porém com leve irritação cutânea apenas (BELLNIER *et al.*, 2006). Estudos clínicos apontam para seu uso em tratamento de câncer de esôfago, pulmão e carcinoma basocelular (BELLNIER *et al.*, 2003).

Um derivado da bacterioclorofila-a, a padeliporfina, é uma bacterioclorina com um centro metálico de paládio (PdII) (Figura 14A). Com o nome comercial de Tookad[®] (Figura 14B), seu máximo de absorção em 763 nm, e sua fonte de irradiação é luz xenon (KOUKINOVA *et al.*, 2003). É indicado para tratamento de câncer de próstata e as condições adequadas de tratamento estão sob estudo e os efeitos colaterais do tratamento (dor ou dificuldade de urinar, retenção urinária, dor no períneo e constipação) foram associados aos procedimentos técnicos do estudo (AZZOUZI *et al.*, 2013).

Figura 14. (A) Estrutura da Padeliporfina. (B) Tookad[®].

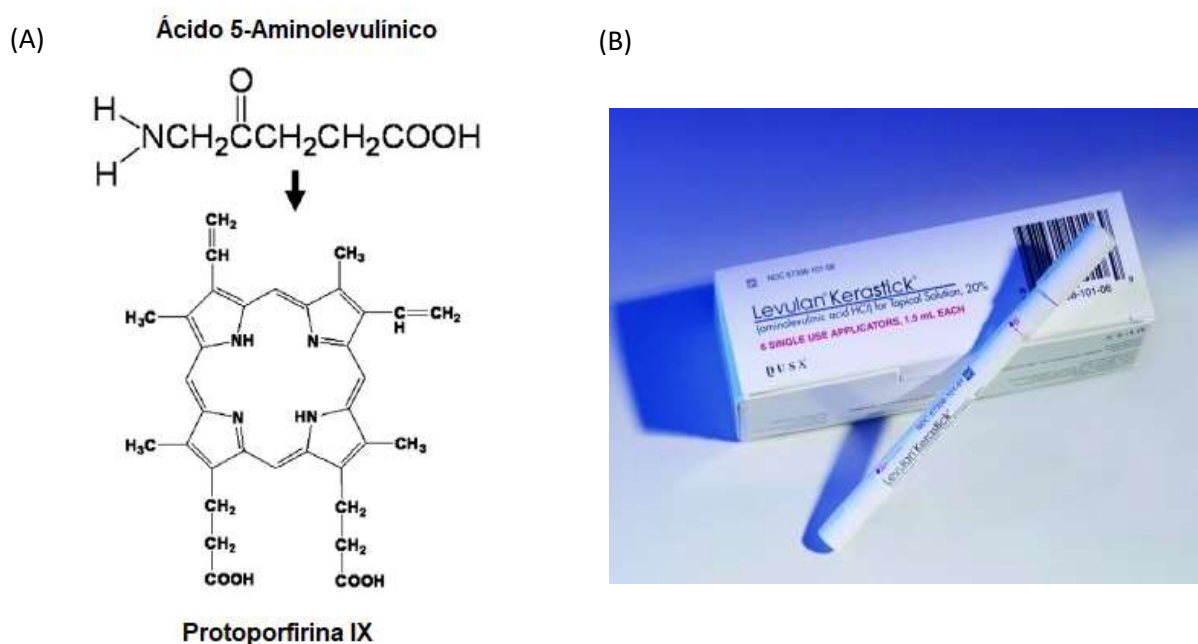


Fonte: (A) (GOMES *et al.*, 2018). (B) Tookad[®], disponível em <https://www.newswise.com/articles/tookad-invented-at-the-weizmann-institute-of-science-gains-european-approval-for-prostate-cancer>.

Levulan[®] é o nome comercial dado ao ácido 5-aminolevulínico (ALA), um aminoácido endógeno sintetizado na mitocôndria a partir da glicina e da succinil-Coenzima A. O metabólito do ALA após administração na célula tumoral é a protoporfirina IX (PpIX), considerada um fotossensibilizador endógeno (ISHIZUKA *et al.*, 2011). O espectro de absorção da PpIX mostra a absorção máxima em 410 nm, seguido por picos de menor absorção em 510, 540, 80 e 635 nm, característica que permite irradiação de diversas fontes de luz (O'CONNOR *et al.*, 2009). A principal indicação de uso do Levulan[®] é para aplicação tópica em tratamento de hidradenite

supurativa, hiperplasia das glândulas sebáceas e acne moderada a severa (GOLD, 2009). Os principais efeitos colaterais observados após a administração do ALA são neurotoxicidade e dor no local de aplicação, sendo o primeiro causado, na verdade, pela PpIX e o segundo, uma consequência, já que a interação dos nervos com a porfirina ocorre apenas localmente (KRAMMER e PLAETZER, 2008).

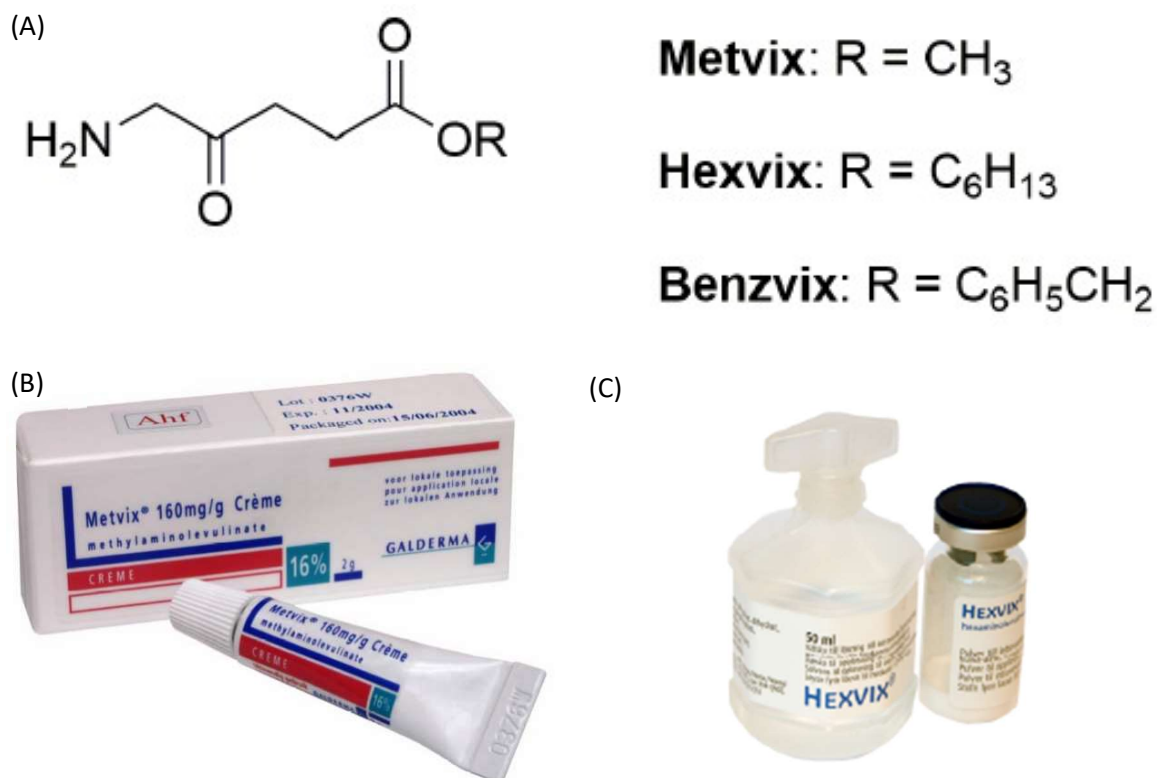
Figura 15. (A) Estrutura do Ácido 5-Aminolevulínico e da Protoporfirina-IX. (B) Levulan®.



Fonte: adaptado de (ISHIZUKA *et al.*, 2011). (B) Embalagem comercial do ALA, Levulan® (GOLD, 2009).

Alquil-ésteres do ALA (Figura 16 A) também são indicados para tratamento em doenças relacionadas a pele e alguns tipos de câncer, podendo agir no diagnóstico e tratamento. Ativado em 630nm, o Metvix® (metil-5-aminolevulinato) (Figura 16 B) é indicado para queratose actínica, carcinoma basocelular superficial e nodular (MORTON, 2003). O hexil-ALA (Figura 16 C), de nome comercial Hexvix®, é aprovado para uso em diagnóstico de câncer de bexiga e câncer cervical advindo de infecção por HPV, utilizando-se da chamada cistosocopia de luz azul (do inglês, *blue-light cystoscopy*), uma vez que absorve na região de 380 a 450 nm (HILLEMANN *et al.*, 2015). Ainda em preparação para o processo de aprovação, o Benzvix®, Benzil-ALA, é indicado para tratamento de tumores gastrointestinais (KRAMMER e PLAETZER, 2008).

Figura 16. (A) Estrutura dos fotossensibilizadores derivados do Ácido 5-Aminolevulinico: Metil-5-aminolevulinato, hexil-5-aminolevulinato e benzil-5-aminolevulinato. (B) Metvix®. (C) Hexvix®.



Fonte: (A) Adaptado de (GOMES *et al.*, 2018) (B) Adaptado de (GOLD, 2009) (C) Disponível em < <https://www.hexvix.com/hexvix-blue-light-cystoscopy/>> (Data de acesso: 04/06/2019).

Além dos derivados das estruturas clássicas – porfirina, clorina e bacterioclorina – desenvolvidos como fotossensibilizadores, nos últimos anos o estudo acerca do desenvolvimento de novos fotossensibilizadores se estendeu à novas classes de compostos, tendo como objetivo a redução dos efeitos colaterais e melhora na eficiência da técnica.

2.5. Ftalocianinas

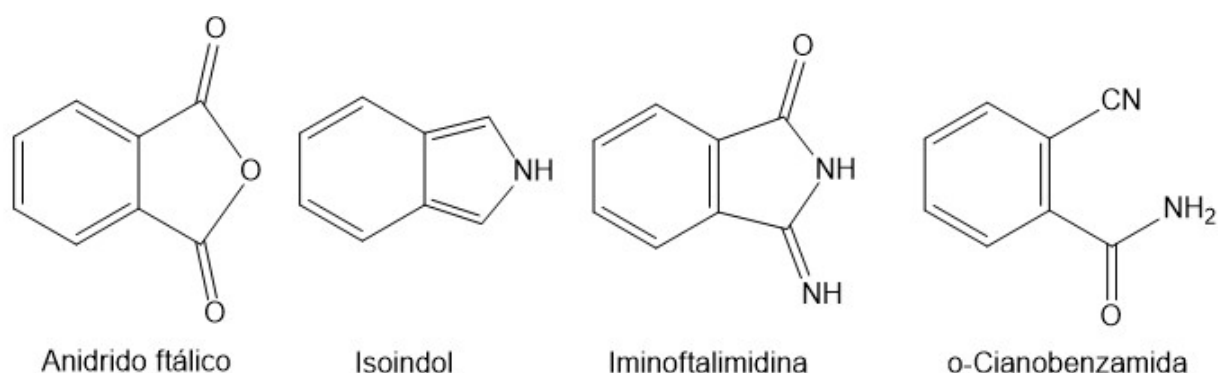
Primeiramente utilizadas como corantes, as ftalocianinas constituem uma classe de moléculas que permite diversas modificações, tanto em sua estrutura quanto em suas propriedades fotoquímicas e fotofísicas, característica de grande interesse para aplicação em terapia fotodinâmica.

2.5.1. Histórico

Em 1928, durante a produção industrial de ftaloimida na fábrica de corantes escocesa *Messrs. Scottish Dyes, Ltda*, a qual consiste na reação entre anidrido ftálico e amônia em um recipiente de ferro, percebeu-se a presença de um sólido azul intenso insolúvel. Posteriormente, tal sólido foi identificado como ftalocianina de ferro (LINSTEAD, 1934). O pigmento azul foi comparado à outro, obtido em 1907 por Braun e Tcherniac, após o aquecimento de orto-cianobenzamida. Os sólidos apresentavam a mesma cor azul intensa, mesma estabilidade e eram insolúveis, mas diferiam no resultado da reação com ácido sulfúrico, pois o metal utilizado foi magnésio. A formação de ftalocianina a partir da o-cianobenzamida se explica pela isomerização desta em seu ponto de fusão, formando a iminoftaloimidina, derivado do isoindol (Figura 16) (BYRNE *et al.*, 1934).

A série de estudos realizados por Linstead entre 1934 e 1937 foram fundamentais para o conhecimento das características desta nova molécula e, também, pelo seu nome, devido ao seu precursor anidrido ftálico (*ftalo*) e pela sua cor azul-esverdeada (*ciano*). Além disso, utilizando-se da técnica de difração de Raios-X, foi elucidada a estrutura geométrica da base livre de ftalocianina como sendo planar (LINSTEAD e ROBERTSON, 1936; LEVER, 1965).

Figura 17. Estrutura dos precursores das ftalocianinas de ferro e magnésio.

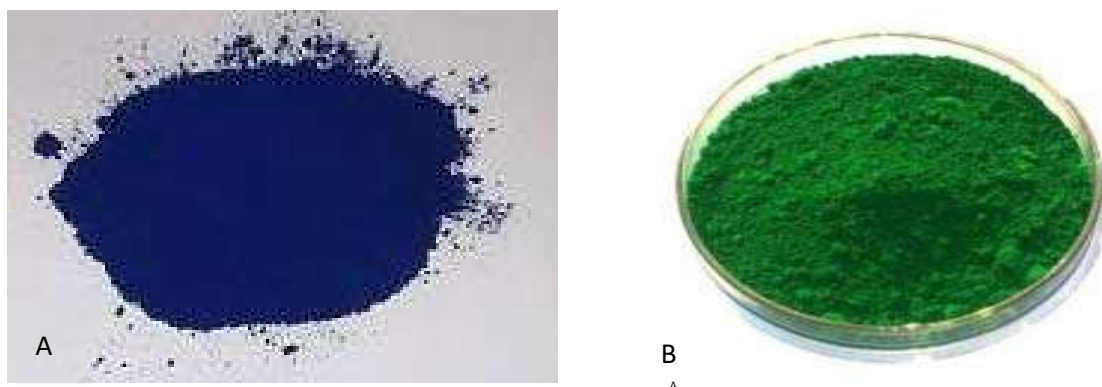


Fonte: autora.

Durante muitos anos, as ftalocianinas foram utilizadas como pigmentos em escala industrial, na produção de tintas para impressoras convencionais, impressoras a laser e também na indústria têxtil, podendo gerar pigmentos que variam do verde ao azul, dependendo, principalmente, do metal ao qual ela está coordenada (Figura 18)

(GREGORY, 2012). No entanto, com o desenvolvimento de estudos acerca de suas propriedades, outras aplicações viáveis às ftalocianinas foram descobertas, como células fotovoltaicas, células solares, produção de nanomateriais (nanotubos) e eletrocatalise (SAUER *et al.*, 1990; ARGUELLO *et al.*, 2008; JUNG *et al.*, 2010).

Figura 18. (A) Pigmento Phthalo Alpha Blue, metalada com Cu-II. (B) Pigmento Phthalo Green, ftalocianina metalada com Cu-II e cloro (Cl) substituindo os hidrogênios (H) dos anéis benzênicos.



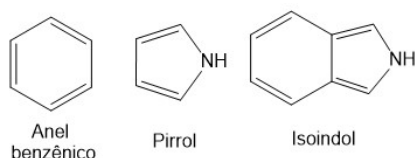
Fonte: Disponível em <<http://www.kakdiyachemicals.com/color-pigments.htm>>, data de acesso: 09/06/2019.

2.5.2. Estrutura e propriedades

As ftalocianinas (PC's) são constituídas por um policiclo aromático formado por quatro unidades isoindol², as quais são ligadas por átomos de nitrogênio, chamadas de pontes 'aza'. Seus quatro nitrogênios centrais advindos das unidades pirrônicas possibilitam a coordenação de um metal ao centro da molécula, criando uma vasta gama de complexos viáveis, chamados metaloftalocianinas (MPc) (VAN LIER e SPIKES, 2007).

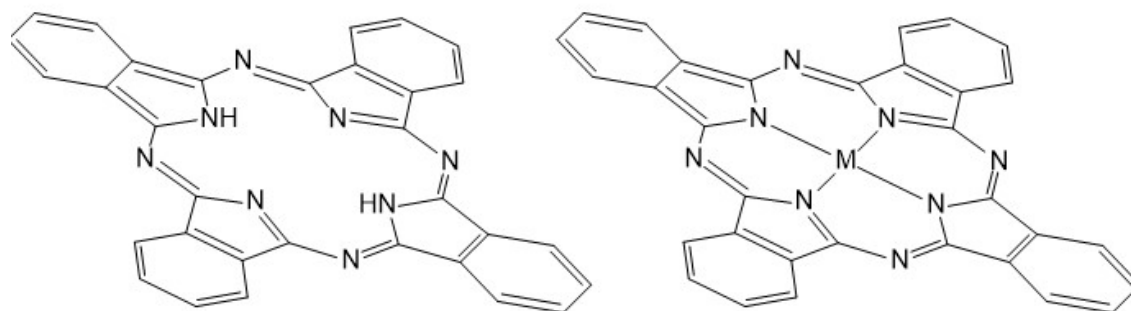
A molécula de ftalocianina apresenta características importantes como alta estabilidade e propriedades químicas e espectroscópicas de grande interesse para fotossensibilizadores em Terapia Fotodinâmica, que resultam em baixa toxicidade e

² Isoindol: o isoindol é uma molécula constituída por um anel benzênico fundido à uma unidade de pirrol.



boa absorção na janela terapêutica (DE LA TORRE *et al.*, 2004). Sua estrutura planar, devido as unidades isoindol e os nitrogênios das pontes 'aza', possui alta densidade eletrônica, uma vez que conta com 18 elétrons π conjugados. Como consequência, possui um espectro de absorção particular, com uma banda entre 300 e 400 nm, chamada banda B ou Soret, e uma intensa banda entre 600 e 700 nm ($\lambda_{\text{máx}} \sim 670$ nm), chamada banda Q. Esta última é atribuída à transição permitida do orbital HOMO para o orbital LUMO (π - π^*) e possui alto coeficiente de extinção molar (ϵ), fato que colabora para a absorção adequada na janela terapêutica (OUGH e STILLMAN, 1994; SAKAMOTO e OHNO-OKUMURA, 2009). As metalofalocianinas apresentam, ainda, um ombro próximo a 600 nm (VAN LIER e SPIKES, 2007).

Figura 19. Estrutura da ftalocianina base livre (H_2Pc) e da ftalocianina metalada (MPc).



Fonte: autora

2.5.3. Ftalocianinas como fotossensibilizadores

As propriedades de absorção da ftalocianina a caracterizam como um bom fotossensibilizador. Em seu espectro de absorção, apesar de absorver intensamente na janela terapêutica, as ftalocianinas apresentam pouca ou nenhuma absorção na região de 400 a 600 nm, na qual a intensidade da luz solar é maior. Assim, a fotossensibilidade na pele após a administração do fotossensibilizador é reduzida (LI *et al.*, 2017). O rendimento quântico das ftalocianina metaladas recebem pouca influência dos ligantes substituídos, mas são fortemente dependentes do centro metálico utilizado. Metais com camadas d incompletas são suscetíveis à maior cruzamento intersistema do estado excitado para o estado fundamental, resultando em maior rendimento de estado tripleto, com tempos de vida de duração da ordem de nanossegundos, enquanto metais com a camada d completa atingem tempos de vida de tripleto da ordem de microssegundos (ALLEN *et al.*, 2001; TEDESCO *et al.*,

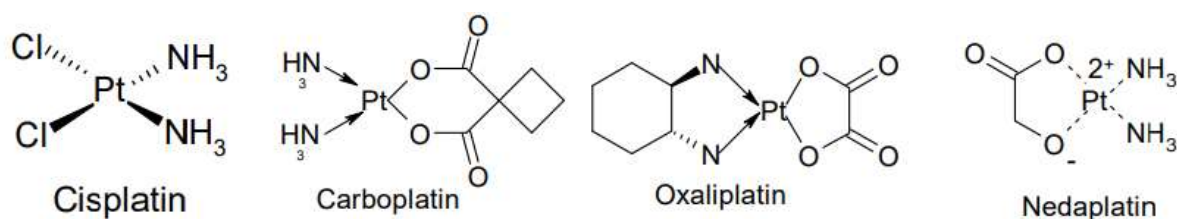
2003).

A baixa solubilidade das ftalocianinas é um dos maiores obstáculos em seu estudo, solucionado a partir da adição de grupos polares à periferia da molécula ou grupos carregados em posição axial no centro metálico (MOREIRA *et al.*, 2008). Outra dificuldade encontrada ao trabalhar com ftalocianinas é a agregação que as moléculas sofrem, devido à sua estrutura planar associada ao seu extenso sistema π conjugado. A formação de dímeros ou agregados maiores modifica propriedades fotoquímicas e espectroscópicas, como deslocamento da banda Q e até mesmo redução do tempo de vida no estado excitado, resultando em menor rendimento quântico e produção de oxigênio singleto (ALLEN *et al.*, 2001; MOREIRA *et al.*, 2008). A diminuição da taxa de agregação pode ser alcançada pela substituição de ligante na ftalocianina, de modo a causar um impedimento estérico de agregação ou pelo centro metálico utilizado (LO *et al.*, 2003; CLAESSENS *et al.*, 2008). Tão importante quanto o estudo sobre as propriedades das ftalocianinas, a utilização terapêutica dos metais será brevemente abordada.

2.6. Metais utilizados com fins terapêuticos

Na quimioterapia, um dos tratamentos clássicos do câncer, complexos metálicos já são utilizados clinicamente. Com seu potencial descoberto em meados da década de 60, a Platina (II) foi o primeiro metal a ser utilizado em complexos para tratamento de câncer, com a cis-platina e seus derivados, carboplatina, oxaliplatina e nedaplatina (Figura 20) (ALI *et al.*, 2013). Nas últimas décadas, no entanto, além do desenvolvimento de novas técnicas de tratamento, novos metais também entraram na área terapêutica. Geralmente os metais utilizados são do bloco 'd', que abrange do grupo 3 ao grupo 12, tais como Zinco (II), Ouro, Cobre, Irídio, Ósmio, Molibdênio, Ródio e Rutênio (NDAGI *et al.*, 2017).

Figura 20. Complexos de Platina utilizados em quimioterapia.



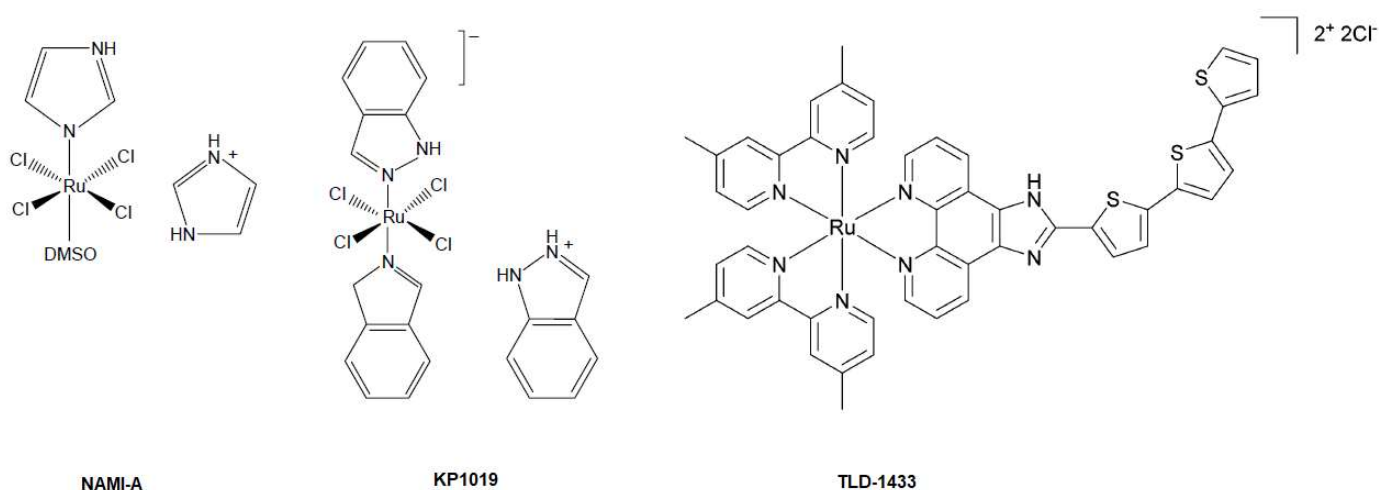
Adaptado de (ALI *et al.*, 2013).

O metal de interesse para este trabalho é o Rutênio, localizado no grupo 8 e 5º período da tabela periódica, numa região onde estão os metais considerados do 'grupo da platina' (Ru, Rh, Pd, Ag, Os, Ir, Pt e Au). Este metal possui três características fundamentais para seu potencial terapêutico (ALLARDYCE e DYSON, 2001):

- i. Taxa de troca de ligantes: esta característica é fundamental para que o complexo aplicado no tratamento possa interagir com espécies do meio biológico sem ser degradado, além de proporcionar interações que sejam eficientes o bastante para que haja ação terapêutica;
- ii. Estados de oxidação acessíveis: os estados de oxidação Ru (II), Ru (III) e Ru (IV) são todos acessíveis em ambiente fisiológico na forma de complexos hexacoordenados de geometria octaédrica, dentre os quais os de Ru(III) são os mais inertes. A disponibilidade destes estados de oxidação possibilita que complexos de rutênio sejam ativados por reações redox pertinentes aos locais de interesse, aumentando a sua eficiência terapêutica.
- iii. Semelhança ao Ferro: o rutênio se localiza no mesmo grupo do ferro, porém um período abaixo. Devido à proximidade de suas propriedades, o rutênio pode se ligar às proteínas responsáveis pelo transporte do ferro, facilitando assim seu transporte em meio biológico.

O estudo acerca dos complexos de rutênio, suas propriedades e aplicações se iniciaram concomitantemente aos estudos com platina (CLARKE e FORD, 1970; MEYER e GODWIN, 1971), chegando à complexos que podem agir de diversas maneiras em meio biológico e, mais ainda, podem ser carreadores de espécies reativas, como o óxido nítrico e utilizados como fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica (FORD e LAVERMAN, 2005). Alguns destes complexos, designados ao tratamento de câncer, já estão em fase clínica de estudo, como o NAMI-A, KP1019 e TLD-1433 (Figura 21) (ALESSIO *et al.*, 2004; HARTINGER *et al.*, 2008; JAKUBASZEK *et al.*, 2018).

Figura 21. Estrutura dos complexos de rutênio NAMI-A, KP1019 e TLD-1433.



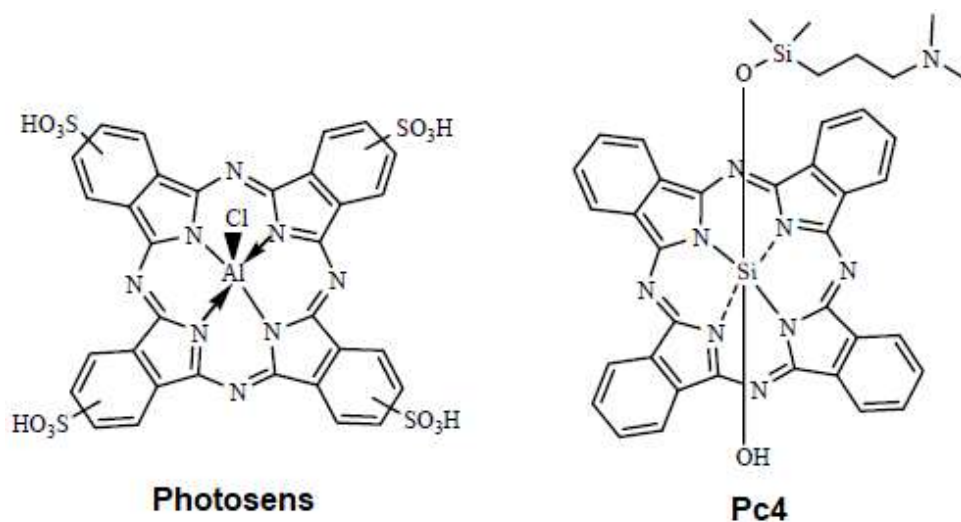
Fonte: (NDAGI *et al.*, 2017) e (JAKUBASZEK *et al.*, 2018).

2.7. Ftalocianinas e Terapia Fotodinâmica

As ftalocianinas utilizadas na terapia fotodinâmica atualmente são a Pc4 e o Photosens[®]. A Pc4 é uma ftalocianina coordenada ao silício (Si) (Figura 21) que absorve em 675 nm e passou pela Fase I de testes clínicos para tratamento de queratose actínica, doença de Bowen, câncer de pele e micoses fungoides (ORMOND e FREEMAN, 2013). O Photosens[®] é uma mistura de ftalocianinas de alumínio mono, di, tri e tetrasulfonada (Figura 22), com um cloro coordenado na posição axial do alumínio cujo máximo de absorção se dá em 676 nm. Na Rússia, este fotossensibilizador é utilizado para tratamento de estômago, pele, boca e mama. Apesar dos bons resultados obtidos, após sua administração, os pacientes

apresentaram fotossensibilidade por várias semanas (ORMOND e FREEMAN, 2013; CHILAKAMARTHI e GIRIBABU, 2017).

Figura 22. Estrutura dos fotossensibilizadores Photosens® e Pc4.



Fonte: (ORMOND e FREEMAN, 2013).

Apesar de ainda não ter alcançado a fase dos testes clínicos, diversas ftalocianinas de zinco já demonstraram potencial como fotossensibilizador (LI *et al.*, 2017). Ftalocianinas de rutênio são utilizadas em materiais para célula solar e também como potenciais fotossensibilizadores (CLAESSENS *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2017). Além de potenciais fotossensibilizadores *per se*, as metaloftalocianinas também são utilizadas na tentativa de sobrepor uma das principais limitações da terapia fotodinâmica: a penetração da luz no tecido. Apesar de absorverem em uma região de considerável penetração (600-700 nm), a irradiação do composto deve ser feita localmente e o paciente sofre com a fotossensibilidade. Além disso, a redução da taxa de recorrência também se faz um grande objetivos dos estudos em andamento, principalmente porque está vinculada à penetração de luz em quantidade inadequada no tecido, culminando na erradicação parcial do tumor dependendo da localização deste (VAN STRATEN *et al.*, 2017).

Uma das alternativas sugeridas para sanar este problema é a imobilização de fotossensibilizadores em nanopartículas que absorvam em maiores comprimentos de onda e emitam em menores comprimentos de onda, fenômeno da luminescência chamado conversão ascendente (do inglês, *upconversion*) (XIA *et al.*, 2014; CALIXTO *et al.*, 2016).

2.8. Materiais fotônicos dopados com Terras raras

Materiais fotônicos dopados com terras raras constitui-se de material que apresenta propriedades opticamente ativas quando irradiadas na região do visível/infravermelho próximo. Aplicações diversas são relacionadas no campo da fotônica, incluindo lasers e amplificadores de fibras óticas (MARTINS e ISOLANI, 2005). As características fotofísicas, propriedades óticas destes sistemas e a reconhecida atoxicidade de sílicas mesoporosas, podem ser de interesse na química medicinal, haja vista que estes materiais podem ser preparados em escala de dimensões nanométricas, o que possibilitaria o uso destes sistemas em diagnóstico por imagem. Devido a suas características únicas como sondas luminescentes tais como bandas finas de emissão e absorção, alto rendimento quântico, tempo de vida da fluorescência e alta fotoestabilidade (GONÇALVES, 2001), materiais dopados com lantanídeos são promissores para utilização em terapia fotodinâmica.

2.8.1. Luminescência

Luminescência é um fenômeno no qual se observa a emissão de luz a partir da matéria, sem que ela seja termicamente excitada (radiação de corpo negro). O termo foi utilizado pela primeira vez pelo físico alemão Eilhardt Wiedemann, em 1888, em referência à palavra *Lumen*, do latim, que significa luz (VIRK, 2015). Existem vários tipos de luminescência, diferenciadas pela forma com a qual a matéria é excitada, tais como fotoluminescência (fótons), eletroluminescência (elétrons), sonoluminescência (som), quimioluminescência (reações químicas), bioluminescência (emissão por seres vivos), triboluminescência (atrito), dentre outras.

Para os compostos orgânicos, como os fotossensibilizadores, utilizam-se os termos fluorescência e fosforescência para o fenômeno de emissão de luz após a absorção de um fóton. A fluorescência ocorre quando o elétron decai do estado excitado para o estado fundamental de mesma multiplicidade, ou seja, $\Delta S=0$, através de um processo radiativo, sendo a energia do fóton emitido menor do que a energia do fóton absorvido (VALEUR, 2003). A fosforescência é definida como uma transição entre o estado excitado e o estado fundamental de diferentes multiplicidades, ou seja, $\Delta S \neq 0$, através de um processo radiativo (BARYSHNIKOV *et al.*, 2017). Uma vez que a fluorescência advém de uma transição permitida pelas regras de seleção, possui tempos de vida da ordem de 10^{-7} e 10^{-9} s, enquanto a fosforescência, que é

caracterizada por uma transição proibida, possui tempo de vida entre 10^{-4} e 10^1 s.

Para compostos inorgânicos, utiliza-se apenas o termo luminescência para fenômenos de emissão de luz, caracterizados também pela excitação dos elétrons do material a um estado excitado, seguido pelo retorno ao estado fundamental, mais estável.

2.8.2. Terras raras

Os elementos conhecidos como terras raras são aqueles de número atômico entre 57 e 71, chamados de lantanídeos ou metais de transição interna, e incluem ainda o ítrio ($Z=39$) e o escândio ($Z=21$), localizados no grupo 3, principalmente nos períodos 6 e 7. A configuração eletrônica dos elementos terras raras caracteriza-se pelo semipreenchimento da subcamada $4f^n$ de acordo com [Xenônio] $4f^{n-1}5d^16s^2$, sendo n entre 1 e 7, ou pelo preenchimento da camada $4f^n$ de acordo com [Xenônio] $4f^n 6s^2$, sendo n entre 8 e 14 (Figura 23) (HENDERSON, 1984).

Em relação às características espectroscópicas dos íons terras raras, suas bandas de emissão e absorção são extremamente finas, uma vez que as transições mais exploradas são as intraconfiguracionais $f-f$. Isso ocorre devido à blindagem dos orbitais $4f$ pelos elétrons $5s$ e $5p$ (MALTA, 1982). Devido às pequenas perturbações advindas do campo ligante sofridas pelos elétrons $4f$, as transições eletrônicas dos elementos terras raras podem ser atribuídas com base no diagrama de níveis de energia de Dieke (Figura 23) (DIEKE, 1968).

Figura 23. Configurações eletrônicas dos elementos terras raras.

Atomic No.	Atomic weight	Symbol	Configuration			
			0	+1	+2	+3
57	138.9055	La	[Xe]5d ¹ 6s ²	[Xe]5d ²	[Xe]5d ¹	[Xe]4f ⁰
58	140.12	Ce	[Xe]4f ¹ 5d ¹ 6s ²	[Xe]4f ¹ 5d ¹ 6s ¹	[Xe]4f ²	[Xe]4f ¹
59	140.9077	Pr	[Xe]4f ³ 6s ²	[Xe]4f ³ 6s ¹	[Xe]4f ³	[Xe]4f ²
60	144.24	Nd	[Xe]4f ⁴ 6s ²	[Xe]4f ⁴ 6s ¹	[Xe]4f ⁴	[Xe]4f ³
61	(145)	Pm	[Xe]4f ⁵ 6s ²	[Xe]4f ⁵ 6s ¹	[Xe]4f ⁵	[Xe]4f ⁴
62	150.4	Sm	[Xe]4f ⁶ 6s ²	[Xe]4f ⁶ 6s ¹	[Xe]4f ⁶	[Xe]4f ⁵
63	151.96	Eu	[Xe]4f ⁷ 6s ²	[Xe]4f ⁷ 6s ¹	[Xe]4f ⁷	[Xe]4f ⁶
64	157.25	Gd	[Xe]4f ⁷ 5d ¹ 6s ²	[Xe]4f ⁷ 5d ¹ 6s ¹	[Xe]4f ⁷ 5d ¹	[Xe]4f ⁷
65	158.9254	Tb	[Xe]4f ⁹ 6s ²	[Xe]4f ⁹ 6s ¹	[Xe]4f ⁹	[Xe]4f ⁸
66	162.50	Dy	[Xe]4f ¹⁰ 6s ²	[Xe]4f ¹⁰ 6s ¹	[Xe]4f ¹⁰	[Xe]4f ⁹
67	164.9304	Ho	[Xe]4f ¹¹ 6s ²	[Xe]4f ¹¹ 6s ¹	[Xe]4f ¹¹	[Xe]4f ¹⁰
68	167.26	Er	[Xe]4f ¹² 6s ²	[Xe]4f ¹² 6s ¹	[Xe]4f ¹²	[Xe]4f ¹¹
69	168.9342	Tm	[Xe]4f ¹³ 6s ²	[Xe]4f ¹³ 6s ¹	[Xe]4f ¹³	[Xe]4f ¹²
70	173.04	Yb	[Xe]4f ¹⁴ 6s ²	[Xe]4f ¹⁴ 6s ¹	[Xe]4f ¹⁴	[Xe]4f ¹³
71	174.97	Lu	[Xe]4f ¹⁴ 5d ¹ 6s ²	[Xe]4f ¹⁴ 6s ²	[Xe]4f ¹⁴ 6s ¹	[Xe]4f ¹⁴

[Xe] = configuration of xenon: 1s²2s²2p⁶3s²3p⁶3d¹⁰4s²4p⁶4d¹⁰5s²5p⁶.

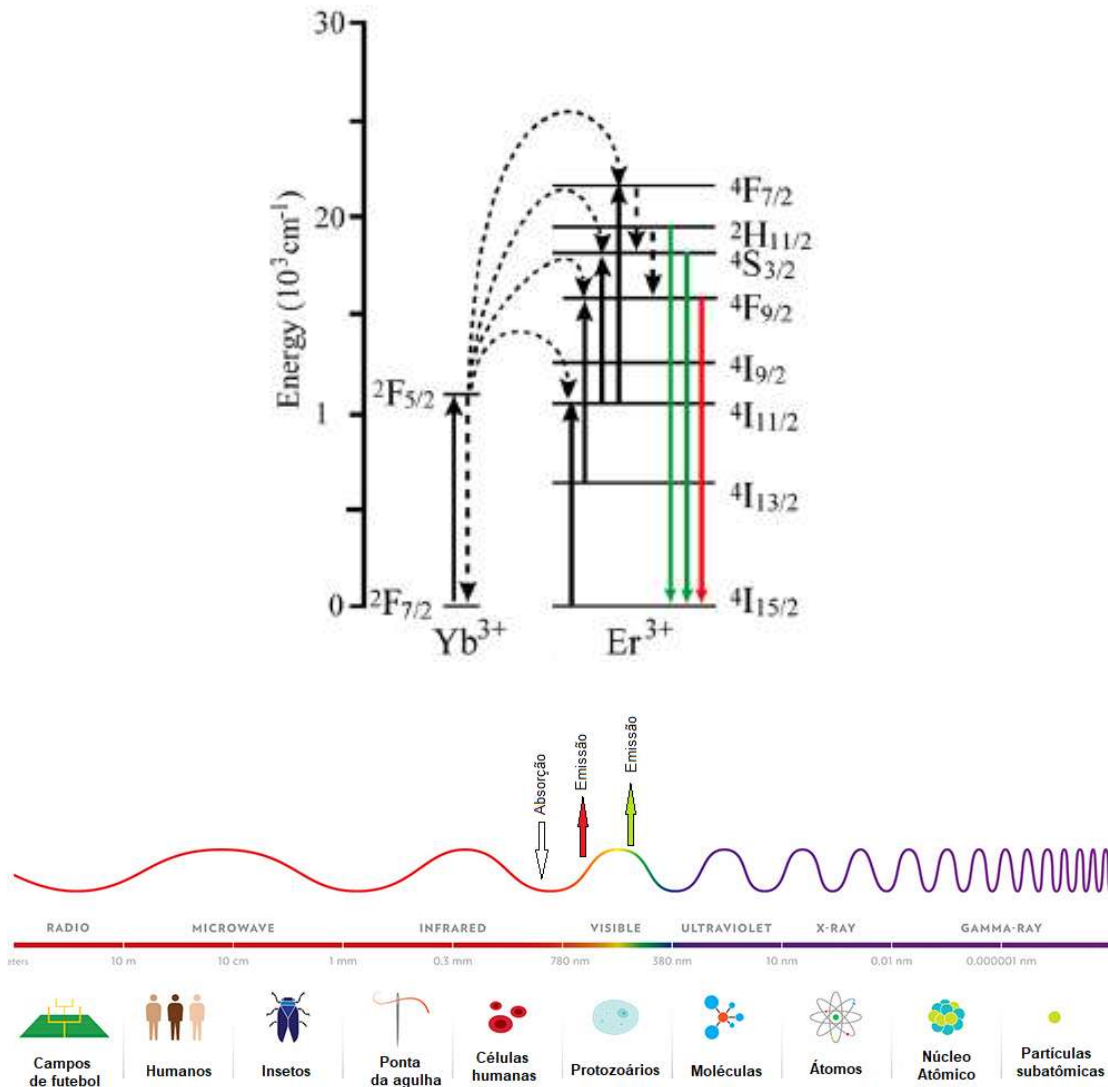
Fonte: (HENDERSON, 1984).

2.8.3. Conversão Ascendente de Energia (*Upconversion*)

A transferência de energia entre íons terras raras pode ocorrer entre dois íons iguais ou entre dois íons diferentes. O íon que é excitado por um fóton e transfere a energia para o outro íon é chamado de íons sensibilizador, e o íon que recebe energia e emite luz é chamado de íon ativador. Geralmente, o fóton emitido possui menor energia do que o fóton absorvido, de acordo com a 'Lei de Stokes'.

No processo de conversão ascendente, ocorre a absorção de um fóton de menor energia (maior comprimento de onda) pelo íon sensibilizador e a emissão de um fóton de maior energia (menor comprimento de onda) pelo íon ativador, o que caracteriza uma emissão anti-Stokes (ZHOU *et al.*, 2014). Para este trabalho, o par de íons terras raras escolhido foi Érbio e Itérbio (Er³⁺ e Yb³⁺), no qual ocorre a absorção em 980 nm, na região do infravermelho próximo, pelo íon Yb³⁺ (sensibilizador) e emissão em 430 nm e 660 nm, na região do verde e do vermelho, pelo íon Er³⁺ (ativador), sendo a primeira emissão responsável pela obtenção de imagens e a segunda, pela ativação do fotossensibilizador. O diagrama de transferência de energia para este par de íons é mostrado na Figura 24.

Figura 24. Diagrama de transferência de energia pelo processo de conversão ascendente do íon Yb^{3+} para íon Er^{3+} . Espectro eletromagnético representando a absorção e emissão do par de íons lantanídeos.



Fonte: (ZHOU *et al.*, 2014). Espectro eletromagnético adaptado de < https://www.123rf.com/photo_81668842_stock-vector-electromagnetic-spectrum-diagram-.html>. Data de acesso: 10/06/2019.

O processo de conversão ascendente de energia pode ocorrer por dois mecanismos (AUZEL e PELLÉ, 1996; JOUBERT, 1999; AUZEL, 2004; DE MAYRINCK *et al.*, 2015): Absorção no estado excitado (do inglês, *Excited State Absorption – ESA*) e conversão ascendente por transferência de energia (do inglês,

Energy Transfer Upconversion – ETU).

No mecanismo ESA, há a absorção de um fóton no estado fundamental populando estado $^4I_{11/2}$ e, posteriormente, uma nova absorção ocorre, populando o estado $^4F_{7/2}$. Ocorre então o decaimento não radiativo para os estados $^2H_{11/2}$ e $^4S_{3/2}$ e posterior emissão em 532 e 547 nm, correspondentes às transições $^2H_{11/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$ e $^4S_{3/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$, respectivamente. Caso o decaimento não radiativo ocorra para o estado $^4F_{9/2}$, a emissão será no vermelho, em 660 nm, devido à transição $^4F_{9/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$.

No mecanismo ETU, há duas possibilidades. Na primeira, íons Er^{3+} populam o estado $^4I_{11/2}$ e, por transferência de energia, um íon retorna ao estado fundamental $^4I_{15/2}$ e o outro é excitado ao estado $^4F_{7/2}$. Na segunda, os íons Yb^{3+} vão ao estado $^2F_{5/2}$ e os íons Er^{3+} ao estado $^4I_{11/2}$. Há então a transferência de energia dos íons Yb^{3+} para os íons Er^{3+} , que vão ao estado $^4F_{7/2}$. A partir daí, em ambas as possibilidades ocorre o decaimento não radiativo dos íons Er^{3+} aos estados $^2H_{11/2}$ e $^4S_{3/2}$, emitindo no verde, e até o estado $^4F_{9/2}$, emitindo no vermelho.

2.9. Nanopartículas de óxido de ítrio

Para a utilização do mecanismo de conversão ascendente, há o interesse em um material que possua alta estabilidade química e baixa energia de fónon³ como matriz. Escolheu-se o óxido de ítrio (Y_2O_3) como matriz para a formação das nanopartículas, sendo uma de suas características mais interessantes a alta solubilidade de íons terras raras, possibilitando a co-dopagem da matriz com íons terra rara, Er^{3+} e Yb^{3+} , adicionando ao material a ocorrência de conversão ascendente de energia (ZHENG *et al.*, 2006). Dentre diversas rotas de síntese para o óxido de ítrio, a busca por controle da morfologia e do tamanho da partícula formada traz opções como spray pirólise, combustão, síntese hidrotérmica e, utilizada neste trabalho, precipitação homogênea. (MISHRA *et al.*, 2013; ENGLADE-FRANKLIN *et al.*, 2014).

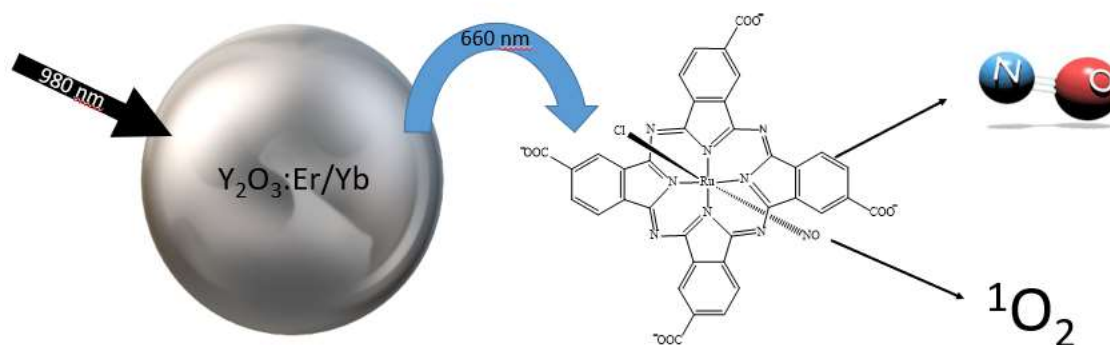
O recobrimento do $Y_2O_3:Er/Yb$ com sílica permite que a nanopartícula seja funcionalizada com moléculas que auxiliam sua interação com moléculas biológicas ou outras espécies químicas para diferentes aplicações. Além disso, a sílica é um material de baixo custo, opticamente transparente, ou seja, não interfere na absorção ou emissão da nanopartícula e é estável, formando as chamadas partículas *core@shell* (FENG *et al.*, 2003).

³ Energia atribuída à vibração da rede formada pelas ligações dos átomos constituintes do material.

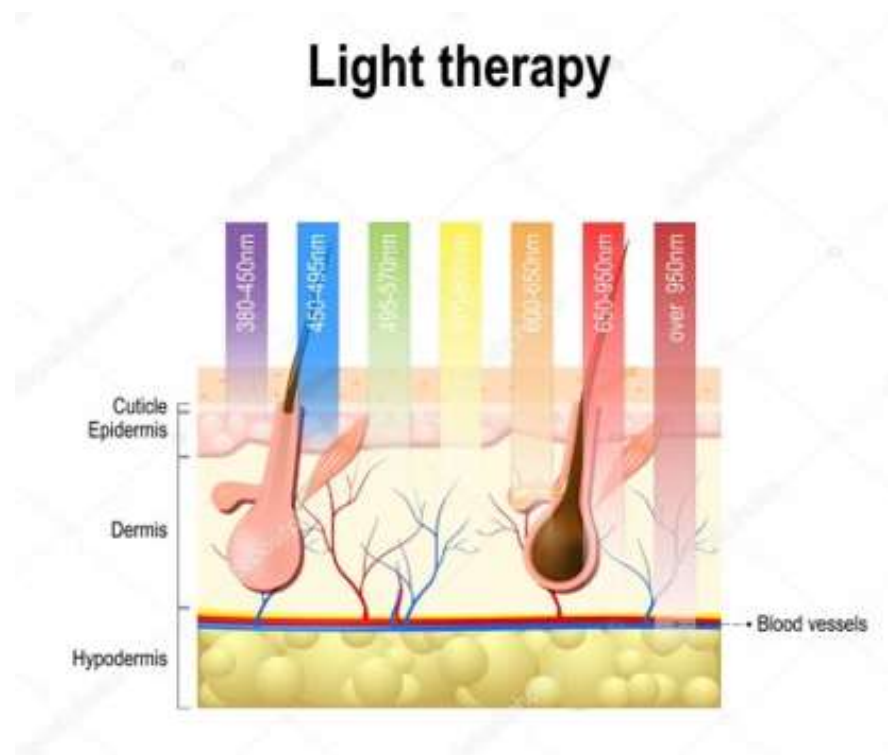
3. Hipótese

A hipótese deste trabalho baseia-se na associação de componentes de diferentes áreas (materiais fotônicos, fotossensibilizadores e complexos de rutênio) em prol da confecção de um sistema capaz de absorver radiação no infravermelho próximo (980 nm). A irradiação neste comprimento de onda possui alta penetrabilidade no tecido a qual pode transferir esta energia, por meio do mecanismo de conversão ascendente, para o fotossensibilizador - ftalocianina de rutênio - que absorve na região do vermelho (660 nm). A ativação do fotossensibilizador terá como consequência a produção de oxigênio singlete *in situ*, além de, no caso da ftalocianina de rutênio com NO coordenado, a liberação de óxido nítrico de forma concomitante (Figura 25). Além de possibilitar o tratamento de forma local, poupando tecidos saudáveis, este sistema transpõe uma das limitações da TFD em relação à penetrabilidade da luz no tecido biológico (Figura 26), uma vez que, ainda que na região do vermelho a penetrabilidade chegue a 10 mm, a radiação na região do infravermelho próximo pode atingir 50 mm em alguns tecidos (STOLIK *et al.*, 2000).

Figura 25. Ilustração da hipótese do trabalho desenvolvido.



Fonte: autora.

Figura 26. Representação da penetração da luz no tecido.

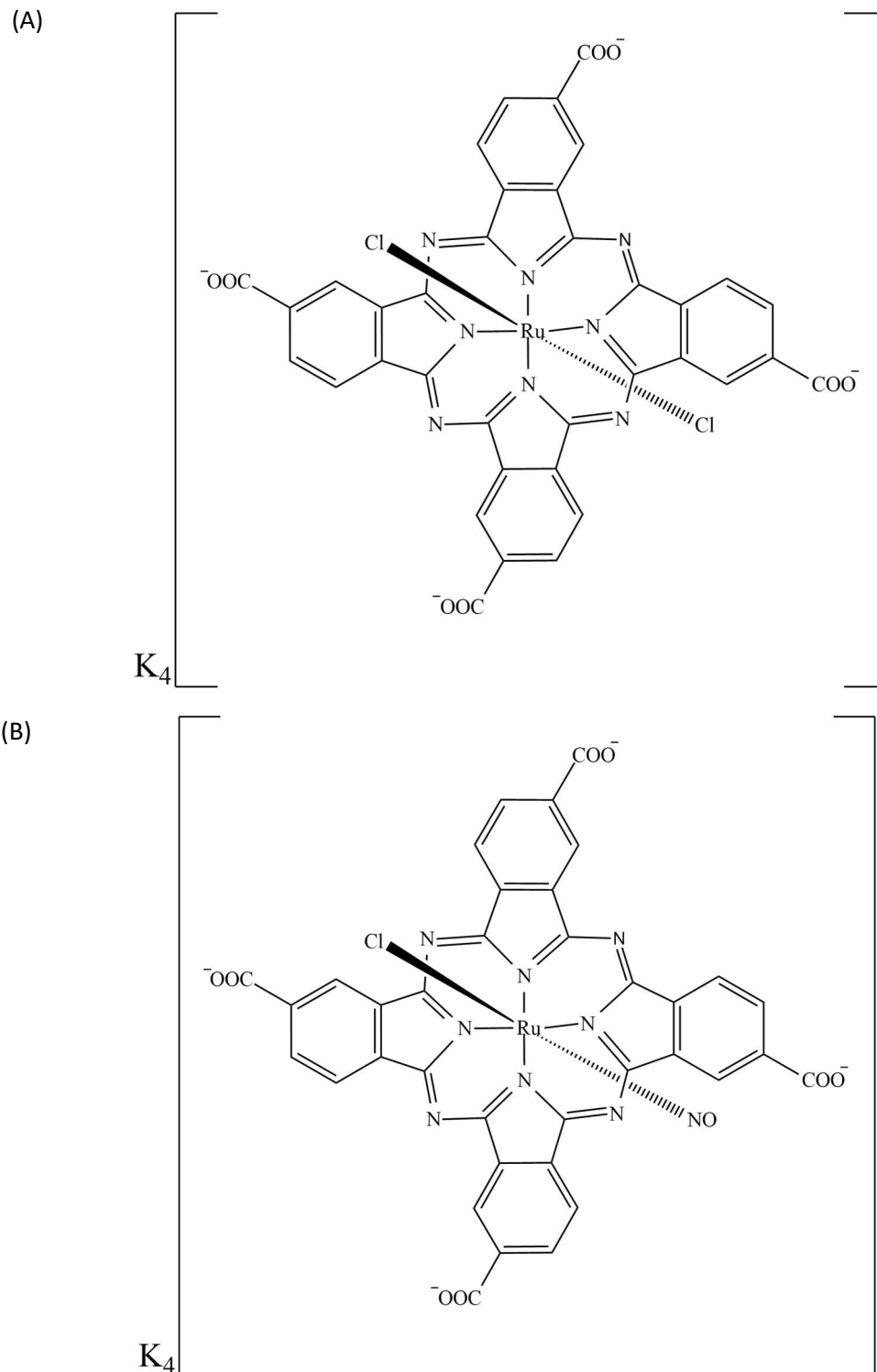
Fonte: Disponível em: <<https://www.pacificplasticsurgerygroup.com/non-surgical-procedures-san-francisco/led-light-therapy/>>. Data de Acesso: 25/07/2019.

4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral

Avaliar transferência de energia do sistema contendo rutênio-ftalocianinas imobilizadas na superfície das partículas de conversão ascendente para a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON), utilizando os complexos $K_4[(NO)Cl\{PC-(COO^-)_4\}]$ (KTC(NO)) e $K_4[RuCl_2\{PC-(COO^-)_4\}]$ (KTC) (Figura 27) e material para conversão ascendente formado por óxido de ítrio recoberto com tetraetoxissilano (TEOS) e funcionalizado com (3-aminopropil)trietoxissilano (APTES), $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$.

Figura 27. Estruturas das ftalocianinas utilizadas: (A) $K_4[RuCl_2\{PC-(COO^-)_4\}]$ (KTC) e (B) $K_4[(NO)Cl\{PC-(COO^-)_4\}]$ (KTC(NO)).



Fonte: autora.

4.2. Objetivos Específicos

- a) Síntese de nanopartículas de conversão ascendente de superfície funcionalizada (NCAF), $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$, e seus precursores $Y(OH)CO_3:Er/Yb$, $Y_2O_3:Er/Yb$, $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS$;
- b) Caracterização do material obtido em A por espectroscopia de fluorescência, espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difração de raios-X em pó (DR-X) e microscopia eletrônica de transmissão (MET);
- c) Imobilização das rutênio-ftalocianinas na superfície por ligação covalente ou adsorção dos complexos à NCAF obtida, formando o sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@RuPC-R$;
- d) Caracterização do tipo de imobilização por espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR);
- e) Estudo qualitativo de produção de 1O_2 e liberação de NO;
- f) Estudo da viabilidade celular nas linhagens celulares tumoral metastática (B16F10 – Melanoma murino) e não-tumoral (L929 – Fibroblasto murino) quando submetidas ao tratamento com o sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@RuPC-R$, avaliando a influência do tempo de irradiação em 980 nm e a concentração dos sistemas testados, através do ensaio colorimétrico do sal [Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio] (MTT);
- g) Obtenção de imagens das células durante o estudo de viabilidade celular pelo microscópio óptico.

5. Materiais e Métodos

5.1. Materiais

Os reagentes utilizados para síntese e caracterização da NCAF e do sistema NCAF-RuPc são listados na Tabela 1. Na Tabela 2 são listados os reagentes utilizados para os ensaios de viabilidade celular. Na Tabela 3 estão listados os materiais utilizados para os ensaios de viabilidade celular e caracterização.

Tabela 1. Reagente utilizados na síntese e caracterização de NCAF e do sistema NCAF-RuPc.

REAGENTE	PROCEDÊNCIA
1-etil-3-(3-dietilaminopropil)-carbodiimida (EDC)	Sigma-Aldrich®
3-Aminopropil Trietoxissilano (APTES)	Aldrich®
4-Amino-5-metilanimino-2',7'-difluoresceína acetato (DAF-FM)	Invitrogen™
Álcool Etílico (Etanol)	Synth®
Brometo de Potássio (KBr)	Sigma®
Dimetilformamida (DMF)	Synth®
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Synth®
Hidróxido de Amônio (NH ₄ OH)	Cinética®
N-hidroxi-succinimida (NHS)	Sigma-Aldrich®
Nitrato de Ítrio hexahidratado (N ₃ O ₉ Y.6H ₂ O)	Aldrich®
Óxido de Érbio (Er ₂ O ₃)	Aldrich®
Óxido de Itérbio (Yb ₂ O ₃)	Aldrich®
Piridina	Aldrich®
<i>Singlet Oxygen Sensor Green</i> (SOSG)	Invitrogen™
Tetraetilortossilicato (TEOS)	Fluka
Uréia (CH ₄ N ₂ O)	Cinética®

Tabela 2. Reagentes utilizados para cultivo de células.

REAGENTE	PROCEDÊNCIA
Meio de cultura RPMI 1640 com <i>phenol red</i>	GIBCO®
Meio de cultura RPMI 1640 sem <i>phenol red</i>	GIBCO®
Solução tampão fosfato-salino (PBS) P4417	Sigma®
Solução Tripsina-EDTA 10X, 0,5% tripsina, 0,2% EDTA.	Sigma-Aldrich®
Solução antibiótico (100X) 10.000 unidades de penicilina, 10 mg de estreptomicina, 25 µg de anfotericina B por mL.	Sigma-Aldrich®
Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (<i>MTT – Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide</i>)	Sigma-Aldrich®
Soro fetal bovino (SFB)	GIBCO®

Tabela 3. Materiais utilizados para caracterização e ensaios de viabilidade celular.

MATERIAL	MODELO/MARCA
Célula capilar curva de policarbonato, com eletrodos de Be/Cu banhados a ouro (determinação de PCZ).	DTS 1070/Malvern®
Placa para cultura celular de 96 poços	KASVI K12-96
Placa para cultura células de 6 poços	KASVI K12-006
Garrafas para cultura celular de 75 cm ²	KASVI K11-250
Sistema de filtração à vácuo 0,22 µm	KASVI K15-1500

Tabela 3. – Continuação.

Câmara de Neubauer		Hirschmann
	0,1-10 μL	
Ponteiras tipo universal	0-200 μL	CralPlast
	200-1000 μL	

5.2. Síntese das nanopartículas de $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}@\text{TEOS}@\text{APTES}$ (NCAF)

As nanopartículas de óxido de ítrio dopadas com érbio e itérbio ($\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}$) foram sintetizadas com a contribuição do grupo de pesquisa da Prof.^a Dr.^a Rogéria Rocha Gonçalves, no Laboratório de Materiais Luminescentes Micro e Nanoestruturados – *Mater Lumen*, do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP). A síntese e recobrimento das nanopartículas foram previamente desenvolvidas pelo Dr. Rafael Ramiro Pereira durante seu projeto de doutorado e foram reproduzidas neste trabalho (PEREIRA, 2016).

Soluções de $\text{Er}(\text{NO}_3)_3$ e YbCl_3 foram obtidas dissolvendo os óxidos das terras raras em HNO_3 e HCl e evaporando o excesso de ácido de modo que o pH fosse 2 e o volume final da solução estoque foi ajustado para que a concentração final de terra rara fosse próximo à $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$. Da mesma forma, obteve-se uma solução estoque de $\text{Y}(\text{NO}_3)_3$ $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$.

5.2.1. Síntese de hidrocarbonato de ítrio dopado com terras raras

Para a síntese das nanopartículas, o primeiro precursor a ser sintetizado é o hidroxicarbonato de ítrio co-dopado com Er^{3+} e Yb^{3+} , $\text{Y}(\text{OH})\text{CO}_3:\text{Er}/\text{Yb}$. A concentração de Y^{3+} no frasco reacional foi de $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ e a dopagem com íons terra rara, em % molar, foi de 1,5% de Yb^{3+} e 0,5% de Er^{3+} . A dimensão das nanopartículas é influenciada pela concentração de ureia utilizada e, uma vez que foram obtidos resultados por volta de 150 nm de diâmetro com a concentração de ureia a $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$, esta foi a concentração escolhida para este trabalho, pois este diâmetro pode

permitir a interação com a membrana celular em ensaios futuros. O volume final utilizado no frasco reacional foi de 252 mL, e as quantidades dos reagentes descritas acima, salvo a ureia, foram obtidas de acordo com diluição das soluções estoque adequadas para este volume.

Uma massa de 30,27 g de ureia foi dissolvida previamente, sob aquecimento abaixo dos 70°C, em 100 mL de água deionizada. Após sua total dissolução, todos os reagentes foram adicionados ao frasco reacional, completou-se o volume para 252 mL com água deionizada e este foi mantido sob aquecimento de 80°C por 2 horas, sem agitação. Após este período, o sobrenadante foi retirado e o sólido branco obtido foi transferido para tubos plásticos de fundo cônico de 15 mL, nos quais foi lavado com água e posteriormente colocado para centrifugar a 3600 rpm por 15 minutos, em uma centrífuga *CentriBio (Modelo 80-2B)*. Este processo foi repetido por 3 vezes e o sólido foi, então, ressuspensão em etanol e colocado para secar em um cadinho de cerâmica a 60°C por 12 horas. A massa de $Y(OH)CO_3:Er/Yb$ obtida para esta rota é de cerca de 160 mg.

5.2.2. Obtenção de óxido de ítrio dopado com terras raras

Após a secagem do $Y(OH)CO_3:Er/Yb$ obtido, este foi tratado a 900°C por 2 horas, sob atmosfera comum. A rampa de aquecimento utilizada no forno foi de 5°C/min. O sólido branco resultante deste procedimento é o $Y_2O_3:Er/Yb$. (PEREIRA, 2016). Após a determinação dos parâmetros de reação, devido à quantidade que o estudo demandava, a síntese foi feita em escala 10 vezes maior, utilizando frascos de 1 L, com as devidas adaptações em relação à quantidade de cada reagente a ser utilizada. A massa final obtida de $Y_2O_3:Er/Yb$ foi de 1695 mg.

5.2.3. Recobrimento das nanopartículas de óxido de ítrio com sílica

Para o recobrimento do óxido de ítrio com sílica, utilizou-se o tetraetilortossilicato (TEOS) como alcóxido precursor da sílica. Utilizou-se 1600 mg de $Y_2O_3:Er/Yb$, os quais foram divididos em 5 frascos de 500 mL contendo 320 mg de $Y_2O_3:Er/Yb$ suspensos em 200 mL de etanol, mantidos em banho de ultrassom por 30 minutos. Após este período, a cada frasco adicionou-se 21,25 mL de NH_4OH 27%, sob agitação e, posteriormente, uma solução de 316,8 µL de TEOS em 30 mL de etanol foi gotejada de 5 em 5 mL. A reação ocorreu durante 1 hora, sob agitação e

sem aquecimento. Ao término deste período, a suspensão foi centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos e as partículas lavadas com água destilada 4 vezes e ressuspensas em etanol para secagem em estufa a 70°C por 12 horas. (Pereira, 2016). O material aqui formado é chamado $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS$, e a massa obtida foi de 1580 mg.

5.2.4. Funcionalização das nanopartículas de óxido de ítrio com amino grupos

A funcionalização de $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS$ foi feita com o objetivo de adicionar um grupo funcional amino ($-NH_2$) à superfície das nanopartículas, visando facilitar a imobilização das ftalocianinas de rutênio com terminação em grupos carboxílicos (COOH). Para tanto, utilizou-se o 3-aminopropil-trietoxisilano (APTES).

Para a funcionalização da partícula com APTES, utilizou-se proporções molares de APTES:TEOS de 1:2 (RAHMAN *et al.*, 2009). Da massa de $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS$ obtida, 1500 mg foram divididos em 3 balões de 250 mL, resultando em 500 mg suspensos em 100 mL de dimetilformamida (DMF), seca previamente em peneira molecular. A suspensão foi colocada sob fluxo de argônio por 15 minutos para que se obtivesse atmosfera inerte. Adicionou-se então, 277 μ L de APTES e 277 μ L de piridina e a reação foi mantida sob agitação e aquecida a 90°C em grafite por 24 horas. A suspensão foi então centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos e o sólido branco obtido foi lavado duas vezes com tolueno e duas vezes com etanol, sendo ressuspensão no último e colocado para secar em estufa a 70°C por 12 horas. Obteve-se o sólido $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$. (CIUFFI *et al.*, 2000).

5.3. Caracterização das partículas de $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$

5.3.1. Difractometria de Raios-X

Os difratogramas foram obtidos a partir de um difratômetro Siemens-Bruker D5005 com radiação de cobre $k\alpha$, com $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$, monocromador de grafite com passo de 0,02/s numa faixa de 2θ entre 5 e 80°.

5.3.2. Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros vibracionais foram obtidos em pastilhas de KBr previamente seco em estufa a 300°C por 3 horas. A faixa de varredura foi de 340 a 4000 cm^{-1} , utilizando um espectrofotômetro *Shimadzu IR Prestige-21*, com resolução de 1 cm^{-1} .

5.3.3. Espectroscopia de Fotoluminescência (conversão ascendente)

Os espectros de emissão das partículas de conversão ascendente foram obtidos numa faixa de potência entre 50 e 450 mV, e excitação fixada em 980 nm e varredura de 500 a 700 nm. Os espectros foram obtidos no espectrofluorímetro *Fluorog SPEX F2121*, utilizando lâmpada de xenônio *EG & GFX*, livre de O_3 , fotomultiplicadora *Hamamatsu R928* e monocromadores de excitação e de emissão duplos, disponível do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (DQ – FFCLRP).

5.3.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As micrografias foram obtidas utilizando o microscópio eletrônico de transmissão *JOEL JEM-100CX II 100Kv*, disponível na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP). A análise do tamanho das nanopartículas foi realizada utilizando o programa *ImageJ*.

5.3.5. Determinação do ponto de cara zero (PCZ) e potencial zeta

Foi feita uma suspensão de 1,34 mg das nanopartículas de $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}@\text{TEOS}@\text{APTES}$ em 55 mL de água deionizada, de concentração 24,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Após 1 hora no banho de ultrassom *Unique UltraClear 1400*, foi realizada uma diluição seriada da suspensão obtida, adicionando-se 20mL desta a 20mL de água deionizada, sendo este processo repetido por 3 vezes. As concentrações obtidas são mostradas na Tabela 4. O mesmo foi realizado com 2 mg das partículas de $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}$ e 2 mg de partículas $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}@\text{TEOS}$.

Tabela 4. Concentrações obtidas para determinação do potencial zeta e ponto de carga zero.

Diluição	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)		
	$\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}$	$\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}@TEOS$	$\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}@TEOS@APTES$
S1	36,36	36,36	24,30
S2	18,18	18,18	12,15
S3	9,10	9,10	6,07
S4	4,54	4,54	3,07

Para a determinação do potencial zeta foram feitas novas diluições com as suspensões obtidas para que se pudesse otimizar as condições e atingir os melhores parâmetros para que fosse realizada a titulação potenciométrica para determinação do ponto de carga zero. Assim, utilizou-se uma solução de KCl $0,0010 \text{ mol.L}^{-1}$ recém preparada para otimizar a condutividade da suspensão. Após diversos testes, as melhores suspensões obtidas foram:

- $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}$: 400 μL de S1 em 1600 μL de KCl $0,001 \text{ mol.L}^{-1}$;
- $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}@TEOS$: 400 μL de S1 em 1600 μL de KCl $0,001 \text{ mol.L}^{-1}$;
- $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}@TEOS@APTES$: 400 μL de S2 em 1600 μL de KCl $0,001 \text{ mol.L}^{-1}$.

Assim, após a obtenção do potencial zeta, preparou-se 30 mL da diluição ótima das amostras para a realização da titulação potenciométrica. Utilizou-se ácido clorídrico $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$ e NaOH $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$ e $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$, sendo o pH inicial 2 e o final 8 (BINI *et al.*, 2012). Os valores e a titulação potenciométrica foram obtidos pelo *Zetasizer Nano-Z Malvern modelo ZEN2600*, com laser He Ne de 4 mW em 632,8 nm.

As medidas de potencial zeta e a titulação potenciométrica para a determinação do ponto de carga zero foram realizadas com o auxílio do grupo da Prof.^a Dr.^a Priscyla Daniely Marcato Gaspari, no Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica – NanoBiolab, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), com a colaboração da aluna de doutorado Letícia Bueno.

5.4. Síntese do sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@RuPc-R$

Para a síntese do sistema proposto, utilizou-se duas ftalocianinas de rutênio tetrassubstituídas: $K_4[Ru(NO)Cl\{PC-(COO^-)_4\}]$ (KTC(NO)) e $K_6[RuCl_2\{PC-(COO^-)_4\}]$ (KTC), além das nanopartículas $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$ em ambos os casos. As ftalocianinas utilizadas foram sintetizadas por técnica de micro-ondas no Laboratório de Transformações Químicas – L201, da Universidade Federal do ABC, com auxílio do Prof. Dr. Anderson Orzari Ribeiro e do Dr. Francisco Batista Nascimento, para os estudos de caracterização química e biológica desenvolvidas pela Dra. Loyanne Carla Barbosa Ramos durante seu doutorado no grupo (RAMOS, 2016).

Quando utilizada a KTC, optou-se pela adsorção do complexo na superfície das nanopartículas, uma vez que a ftalocianina utilizada não é solúvel em dimetilsulfóxido (DMSO), solvente utilizado na reação de acoplamento por ligação covalente do complexo de rutênio à nanopartícula, realizou-se a adsorção em água deionizada. 100 mg de nanopartículas foram suspensas em 30 mL de água deionizada e, após 15 minutos no banho de ultrassom, adicionou-se a esta suspensão uma solução de 25 mg de KTC em 10 mL de água deionizada. A mistura foi deixada sob agitação, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 24 horas. Após este período, a suspensão foi centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos e lavada com água até que o sobrenadante ficasse incolor. Então, as nanopartículas resultantes foram lavadas com etanol e colocadas no dessecador.

Quando utilizada a KTC-NO, 14 mg do complexo foram dissolvidas em 10 mL de DMSO previamente seco em peneira molecular, e a solução foi deixada por 5 minutos em banho de ultrassom para garantir total dissolução e posteriormente colocada sob agitação, com adição de mesma proporção m/m em relação à ftalocianina de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e de N-hidroxi-succinimida (NHS). Esta mistura foi mantida sob agitação por 2 horas à temperatura ambiente. (XIA *et al.*, 2014). Após este período, adicionou-se uma suspensão de 100 mg de nanopartículas em DMSO, deixadas em banho de ultrassom por 30 minutos, à solução de ftalocianina, e a reação ocorreu por 24 horas à temperatura ambiente, sob agitação e ao abrigo da luz. Então, o meio reacional foi centrifugado e as partículas resultantes foram lavadas com DMSO até que o sobrenadante ficasse incolor. Então, elas foram lavadas com etanol e colocadas no dessecador, ao abrigo da luz.

5.5. Caracterização do sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@RuPc-R$

5.5.1. Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Vide Item 5.3.2.

5.5.2. Determinação do potencial zeta

Para as amostras $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC$ e $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO)$, a suspensão inicial foi feita com 2 mg de amostra em 60 mL de água deionizada, e a diluição seriada foi feita da mesma maneira descrita no item 5.3.5. As concentrações obtidas são mostradas na Tabela 5. Para o sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC$, preparou-se uma solução de 500 μ L da suspensão S3 em 1500 μ L de KCl 0,001 mol.L⁻¹ ($C_{SZ} = 2,08 \mu\text{g/mL}$). Para o sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO)$, preparou-se uma solução de 400 μ L da suspensão S1 em 1600 μ L de KCl 0,001 mol.L⁻¹ ($C_{SZ} = 6,6 \mu\text{g/mL}$). Estas Soluções são as soluções Zeta (SZ).

Tabela 5. Concentrações obtidas para determinação do potencial zeta.

Diluição	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	
	$Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC$	$Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO)$
S1	33,33	33,33
S2	16,67	16,67
S3	8,33	8,33
S4	4,17	4,17
SZ	2,08	6,60

5.5.3. Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível

Os espectros eletrônicos de absorção foram obtidos no espectrofotômetro *Agilent 8453*, Na região de 200 a 800 nm. Foram utilizados dois diferentes métodos para a realização da análise.

No primeiro, foi preparada uma emulsão em nujol, a qual foi espalhada como um filme sobre uma lâmina de quartzo. No segundo, em estado sólido, foram preparadas pastilhas de KBr da mesma forma que para o FTIR. Estas também foram afixadas na lâmina de quartzo, com caminho óptico de 1 cm.

5.6. Identificação de produção de oxigênio singlete

Para a detecção de produção do oxigênio singlete, utilizou-se a sonda *Singlet Oxygen Sensor Green* (SOSG). Uma suspensão de 2,41 mg do sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC$ em 500 μ L de DMSO seco foi preparada, ao abrigo da luz. Adicionou-se 10 μ L de uma solução 4 μ M de SOSG à suspensão do sistema, e a cubeta contendo a mistura foi irradiada a 940 nm por 1 hora e o espectro de emissão foi obtido. Em seguida, deixou-se a suspensão sob irradiação por mais duas vezes no tempo de 30 minutos. O comprimento de onda de excitação no fluorímetro foi de 488 nm, e os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos entre 500 e 700nm, com uma fenda de 5,5.

5.7. Identificação de liberação de NO

A análise da produção de NO por fluorescência foi avaliada para o sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO)$ por meio do uso de DAF-2DA (4,5-Diaminofluoresceínadiacetato). O objetivo principal deste ensaio não é quantificar o NO liberado, mas sim identificar a presença de NO na ftalocianina utilizada, uma vez que o mesmo não foi observado nos espectros de FTIR e sua quantificação por eletrodo sensível é inviável devido à natureza insolúvel do sistema formado com as nanopartículas. Para o ensaio, 1,70 mg de $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO)$ foi dissolvido em água deionizada e a solução foi colocada em banho de ultrassom por 5 minutos. Adicionou-se 1 μ L de uma solução 5mM de DAF e a amostra foi irradiada por 20 minutos em 377 nm, e os espectros de emissão de fluorescência foram coletados entre 510 e 700 nm, com fenda de 5,5.

5.8. Ensaio de viabilidade celular

5.8.1. Linhagens celulares

Para a realização dos testes preliminares de viabilidade celular, foram utilizadas as linhagens B16F10 (*Mus musculus*; melanoma murino); A549 (Adenocarcinoma de pulmão humano; e L-929 (Fibroblasto *Mus musculus*).

5.8.2. Cultivo das células

Todas as linhagens foram cultivada em meio RPMI com '*phenol red*'. O meio RPMI-1640 (23400-021; GIBCO® - *Life Technologies*) foi dissolvido em 0,9 L de água deionizada autoclavada, com adição de 1,5 g de bicarbonato de sódio e teve seu pH ajustado para 7,4. Então, foi suplementado com 80mL de Soro Fetal Bovino (10%v/v) (GIBCO® - *ThermoFischer*) e 10 mL da solução antibiótica/antimicótica (1%v/v) (A5955-Sigma-Aldrich®), previamente descongelados em banho-maria *Cientec CT 245-9*, a 37°C e o volume foi completado para 1,0 L. O meio completo foi esterilizado por filtração em sistema à vácuo de 0,22 µm (KASVI K15-1500). A solução de tampão fosfato foi preparada adicionando-se 4 pastilhas salinas (P4417, Sigma® - *Life Technologies*) a 800mL de água deionizada e autoclavada, sendo posteriormente esterilizada por filtração a vácuo.

As células foram cultivadas em garrafas para cultura celular de 75 cm² no meio preparado e mantidas a 37°C, 5,0% (v/v) de CO₂ em atmosfera úmida, em estufa (*Serie II 3110 Water Jacketed* - Thermo Scientific), com troca de meio em média a cada 2 dias.

5.8.3. Determinação do número de células para os ensaios de viabilidade celular

Ao atingir aproximadamente 90 % de confluência nas garrafas de cultura, as células foram soltas da parede da garrafa após a retirada do meio, adicionando a solução de Tripsina/EDTA (59418C, *Sigma Aldrich*®), então as garrafas foram mantidas na estufa por 5 minutos e após esse período avaliou-se com auxílio do microscópio se as mesmas encontravam-se de fato soltas, sendo possível observar turvação do meio referente ao desprendimento das células que se encontravam aderidas. A suspensão celular obtida foi recolhida, adicionou-se 5 mL de meio de

cultivo RPMI1640 completo e as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1000 rpm em centrífuga *KC4 Kindly*. Após esse processo o sobrenadante foi descartado, um novo meio adicionado e as células suspensas novamente.

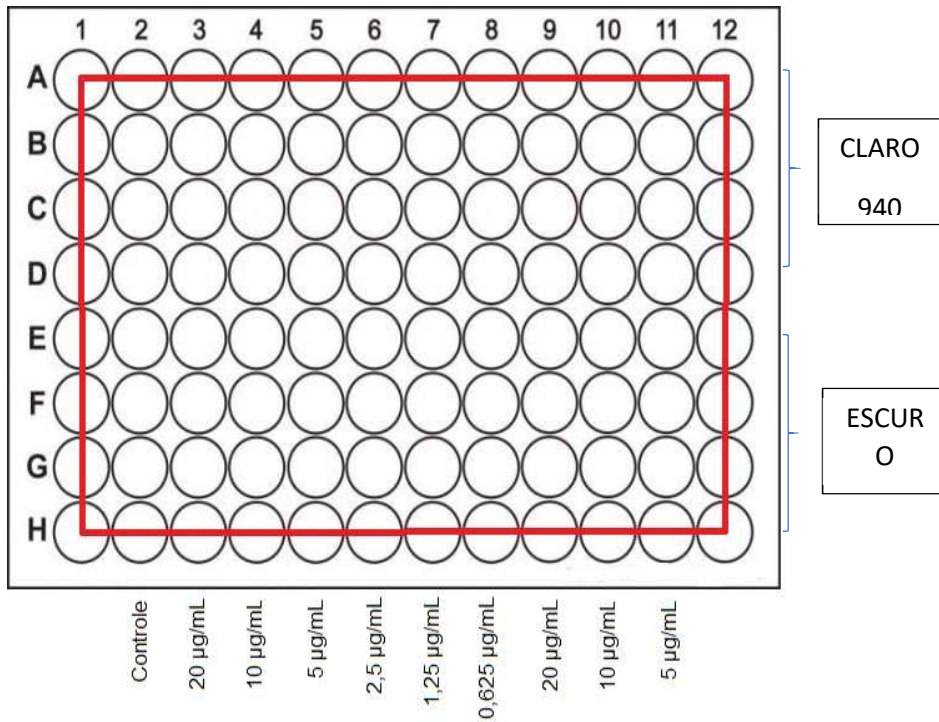
As células foram contadas em microscópio invertido, com o auxílio da câmara de Neubauer. Após a contagem, calculou-se a densidade celular da amostra através da Equação 1.

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{\sum \text{n}^{\circ} \text{ de células}}{4} \times 10^4 \times \text{Fator de Diluição} \quad (1)$$

5.8.4. Avaliação da viabilidade celular pelo método MTT

Após a determinação do número de células viáveis, estas foram aplicadas em placas de 96 poços (KASVI K-12-096), com concentração de $0,75 \times 10^{-5}$ células/poço, e estas placas foram mantidas em estufa por 24 horas para adesão. Após este período, o meio RPMI foi retirado e adicionou-se o tratamento seguindo o método de diluição seriada. Foram preparadas suspensões para tratamento contendo a NCAF livre e O sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO)$, em concentrações obtidas por diluição seriada a partir de $20 \mu\text{g/mL}$ em um volume inicial total de $100 \mu\text{L}$, obtendo-se os valores de 20, 10, 5, 2,5, 1,25 e $0,625 \mu\text{g/mL}$, repetindo as 3 primeiras ou as 3 últimas concentrações nas colunas restantes (Figura 28). Nos poços das extremidades não foi adicionado tratamento. Após 4 horas de incubação, o meio com o tratamento foi retirado, os poços foram lavados com PBS e adicionou-se meio RPMI sem vermelho fenol. Então, as placas foram irradiadas a 940 nm por *LED* durante 20 minutos e colocadas novamente na estufa por 20 horas. Para cada placa, a irradiação ocorreu em apenas 3 dos 6 poços com o tratamento de mesma concentração. A irradiação foi realizada com irradiador de LED (*Light Emitting Diode*), sendo os LED's distribuídos na forma da placa de 96 poços.

Figura 28. Ilustração da aplicação do tratamento nas placas de 96



Fonte: autora

Figura 29. Irradiador de LED em 940 nm utilizado para irradiação



Fonte: autora.

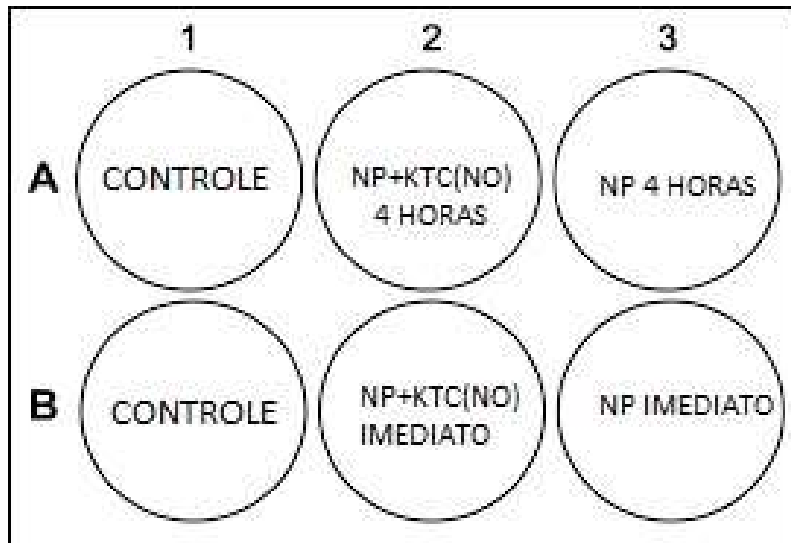
Passado este período, o meio foi retirado e adicionou-se 90µL do RPMI sem vermelho fenol e 10µL de uma solução do sal [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio] (MTT; C = 5 mg/1,0mL de PBS) e as placas foram mantidas em estufa por 3 horas. (MOSMANN, 1983). Em seguida, este conteúdo foi removido e adicionou-se 100µL de DMSO para total solubilização do sal formado e, após 1 hora, foi feita a leitura das placas em leitor de Elisa (*Biotek – Sinergy HT*). Todos os procedimentos de manipulação das células foi realizado em bancada de fluxo laminar (Pachane Pa 300Eco). Para o cálculo da porcentagem de células viáveis utilizou-se a Equação 2, sabendo que trata-se de controle as células que passaram por procedimento idêntico ao descrito acima mas sem a adição do sistema ou da partícula livre, adicionando-se apenas o meio quando neste caso.

$$\% \text{ de células viáveis} = \frac{\text{absorbância do tratado}}{\text{absorbância do controle}} \times 100 \quad (2)$$

5.8.5. Avaliação da localização celular por microscopia óptica

A obtenção de imagens das células após o tratamento com o sistema $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}@\text{TEOS}@\text{APTES}@\text{KTC}(\text{NO})$ e com NCAF foi realizada utilizando o microscópio *Nikon Eclipse Ti (TI-FL)*. A concentração de células em cada poço foi de 2×10^{-4} células/mL, sendo que em cada poço são aplicados 6 mL da suspensão de células. As placas foram incubadas por 24 horas para adesão das células. Após este período, aplicou-se 1,9 mL de meio RPMI sem 'phenol red' e 100 µL da solução estoque de 200µg/mL da suspensão de $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}@\text{TEOS}@\text{APTES}@\text{KTC}(\text{NO})$ e da suspensão de NCAF. Após 4 horas de incubação, o meio de todos os poços foi retirado e, nos poços restante, adicionou-se a mesma quantidade descrita anteriormente. Imediatamente após esta aplicação, o meio de todos os poços foi retirado e estes foram lavados com PBS 3 vezes, para que se retirasse toda a suspensão contendo nanopartículas que não estivessem aderidas às células. A disposição de aplicação do tratamento é mostrada na Figura 30.

Figura 30. Esquema de aplicação do tratamento para obtenção de imagens.



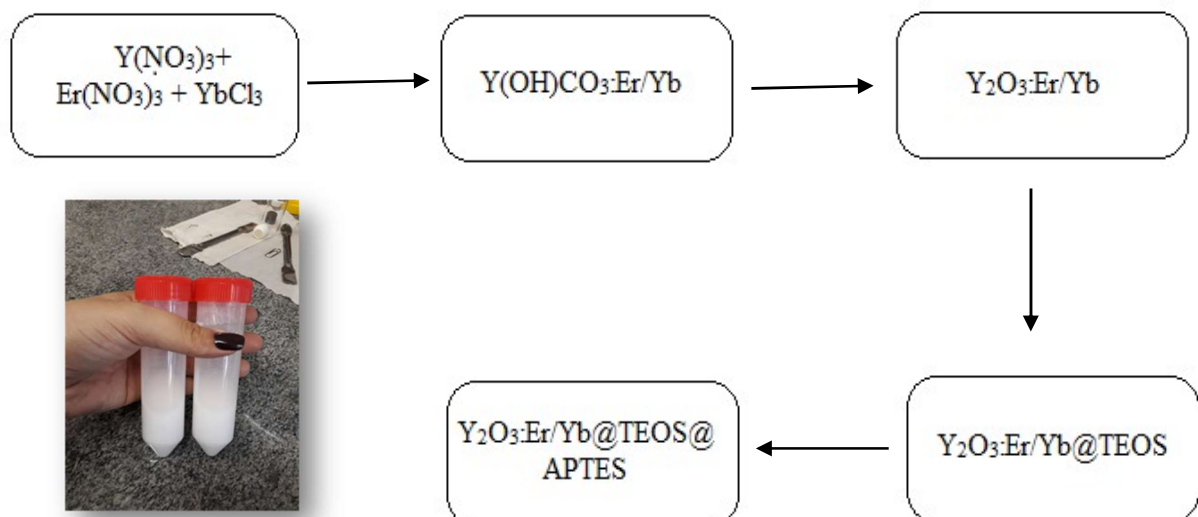
Fonte: autora.

6. Resultados e discussão

6.1. Síntese de $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$

O produto obtido pelo procedimento de síntese descrito no item 5.2, demonstrada na Figura 31, foi um sólido levemente amarelado. Para que houvesse quantidade suficiente para realizar todos os testes e reações de conjugação com os complexos de rutênio, após a ampliação da escala de síntese foi obtida uma massa final de 1,430 g.

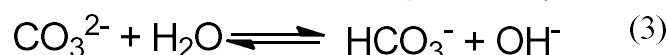
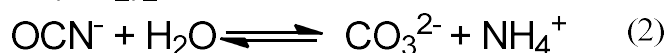
Figura 31. Esquema da sequência de síntese de NCAF.



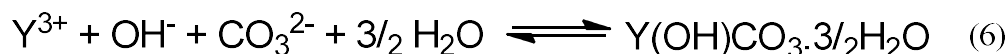
Fonte: autora.

A síntese das nanopartículas de óxido de ítrio dopadas com érbio e itérbio foram preparadas pelo método de precipitação homogênea, com auxílio da decomposição térmica da ureia, que ocorre à 80°C, para que haja precipitação, conforme mostra as equações abaixo (SOHN *et al.*, 2004).

- Decomposição da ureia



- Precipitação



- Reação global



A técnica de recobrimento utilizada foi o método de Stöber (GREEN *et al.*, 2003), no qual a formação da cobertura de sílica se dá através da hidrólise e condensação de precursores alcóxidos como, por exemplo, o tetraetilortossilicato ou tetraetoxissilano (TEOS) (Figura 32). Neste processo, são formados grupos silanóis e, após a condensação, a formação da rede de sílica (CHATTERJEE *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2014). As reações de hidrólise do TEOS em meio básico e de condensação do monômero hidrolisado são mostradas nas equações químicas 8 e 9.

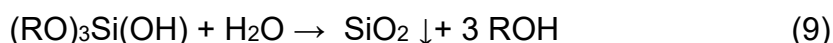
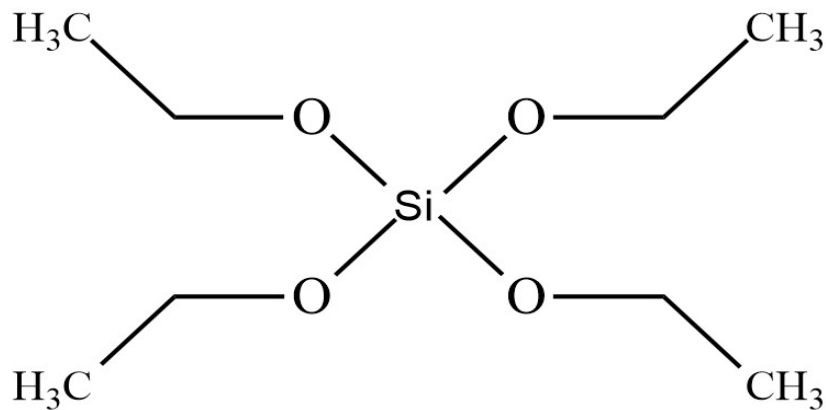


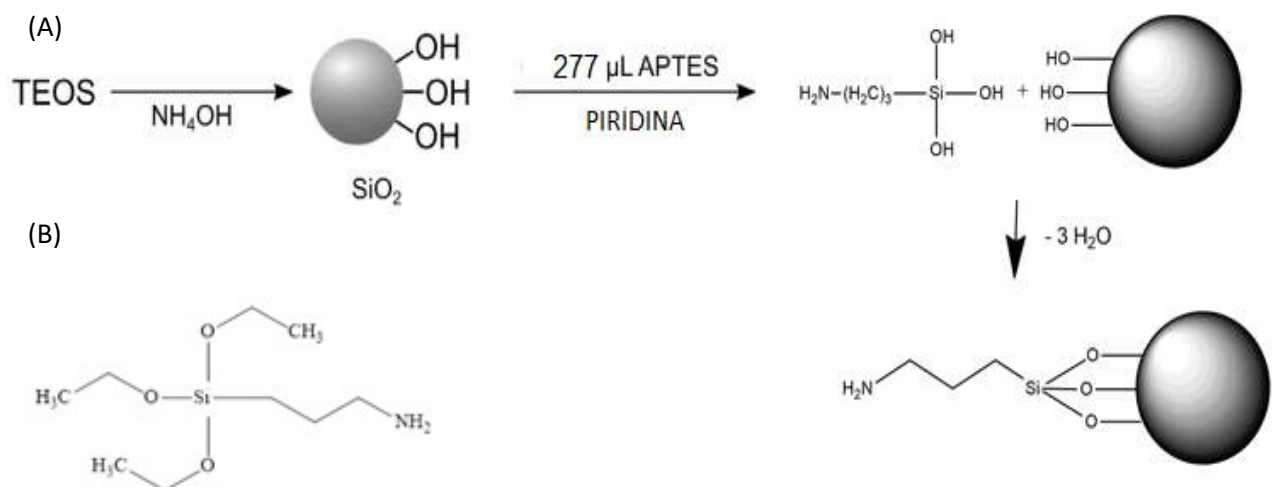
Figura 32. Estrutura do TEOS.



Fonte: autora.

Uma das vias utilizadas para a imobilização da RuPc na superfície da NCAF tinha como objetivo fazê-la através de uma ligação covalente. Uma vez que a ftalocianina utilizada possui terminações em grupos carboxílicos, utilizou-se grupos amino para funcionalizar a superfície das nanopartículas, com (3-aminopropil)triétoxissilano (APTES). A piridina foi utilizada para basificar o meio e ativar os grupos silanóis que reagem com o APTES. Para cada 3 grupos silanol, 1 APTES é ancorado na superfície da nanopartícula, conforme ilustrado na Figura 33 (MUNGUÍA-CORTÉS *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Figura 33. Esquema de funcionalização da superfície de NCAF com APTES.



Fonte: (A) Adaptado de (OLIVEIRA *et al.*, 2017). (B) Autora.

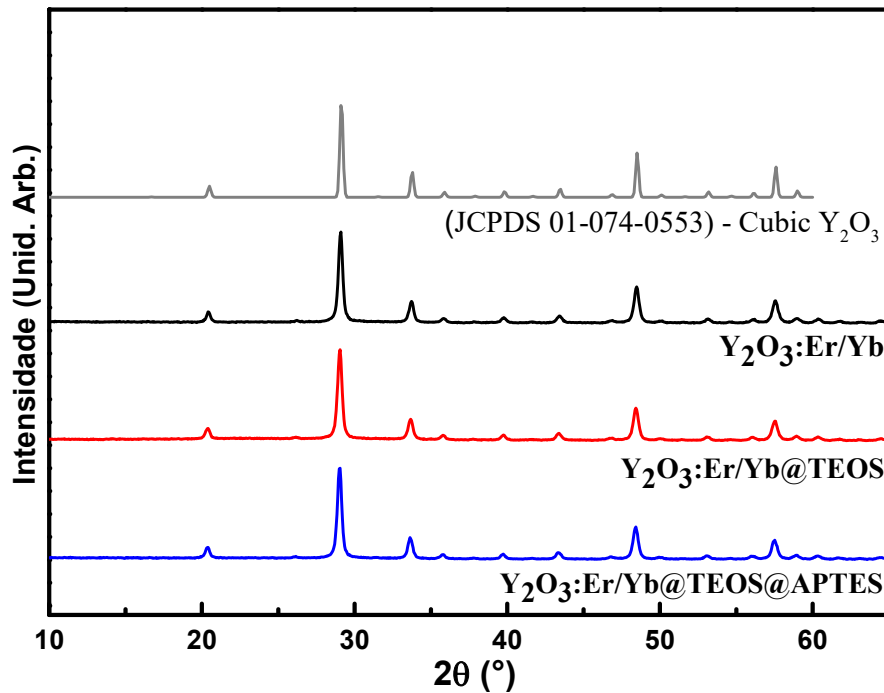
6.2. Caracterização de $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$

6.2.1. Difractometria de Raios-X

A técnica de difração de Raios-X em pó consiste na passagem de um feixe de raios-X monocromático de comprimento de onda de 154 pm (uma vez que utilizou-se radiação de cobre) pela amostra, enquanto o detector é movido em diferentes direções, medindo a intensidade de difração do material em diferentes ângulos. Os picos de difração formam um padrão, ou difratograma, característico para o material constituinte da amostra, podendo ser comparado com uma base de dados. Nesta análise, é possível extrair informações acerca da estrutura do material obtido, como a efetividade do tratamento térmico e a cela unitária da rede cristalina do material.

O hidroxicarbonato de ítrio não foi submetido a esta análise, porém está descrito na literatura que quando utilizado como precursor $Y(NO_3)_3$ em solução ácida, as nanopartículas de $Y(OH)CO_3$ possui fase cristalina ortorrômbica (PEREIRA, 2016). O perfil dos picos nos difratogramas obtidos para as amostras $Y_2O_3:Er/Yb$, $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS$ e $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$ indicam que o material sintetizado e tratado termicamente a $900^\circ C$ possui característica cristalina, pois são estreitos e bem definidos, e esta característica foi mantida ao longo dos processos de recobrimento e funcionalização. Não se nota diferença significativas nos picos dos difratogramas para as partículas tratadas, recobertas ou funcionalizadas, como observado na Figura 35, devido ao caráter amorfo do material utilizado para recobrimento (TEOS) e funcionalização (APTES) das nanopartículas. Apesar de formarem uma camada sobre as nanopartículas cristalinas, a quantidade de material amorfo em relação à quantidade de material cristalino é muito pequena, fato que contribui para que o possível ruído causado pelo recobrimento das nanopartículas seja insignificante em relação aos picos bem definidos do óxido de ítrio cristalino.

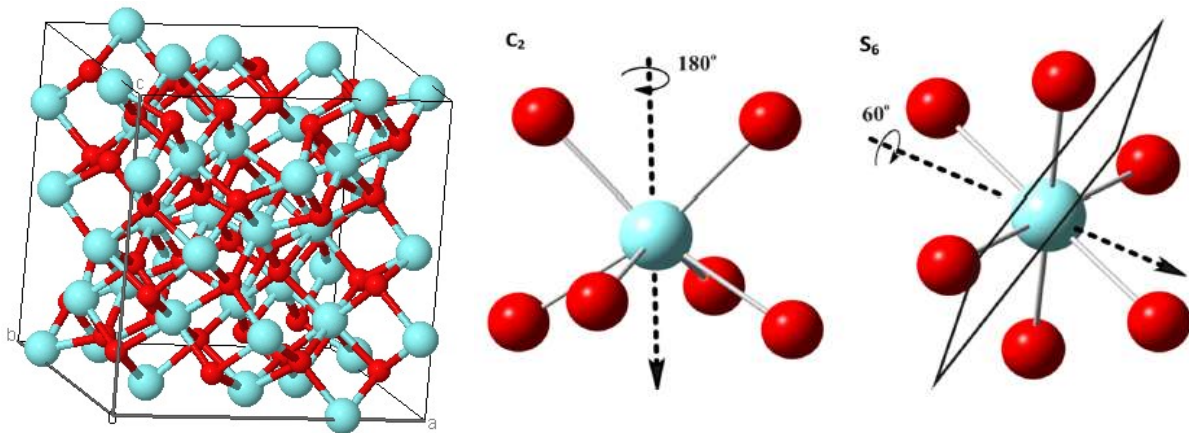
Figura 35. Difratomogramas de Raios-X das partículas de $Y_2O_3:Er/Yb$, $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS$ e $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$ comparados com o padrão da base de dados (JCPDS 01-074-0553).



Fonte: autora.

A partir do difratogramas, foi possível concluir que o tratamento térmico do hidroxicarbonato de ítrio resulta na cristalização em fase cúbica do óxido de ítrio cúbico sendo seu grupo espacial Ia-3 com parâmetro de rede de 10.604 Å, uma vez que a comparação com o difratograma padrão da fase cúbica (JCPDS 01-074-0553) e o da amostra sintetizada possuem picos nas mesmas regiões características. A cela unitária da fase cúbica é mostrada na Figura 36. Nesta configuração, o Y_2O_3 possui 32 íons Y^{3+} de número de coordenação 6 em dois sítios de simetria: 24 em simetria C_2 e 8 em simetria S_6 (Figura 36) (DE MAYRINCK *et al.*, 2015).

Figura 36. Representação da célula unitária da fase cúbica e das simetrias C_2 e S_6 do Y_2O_3 .

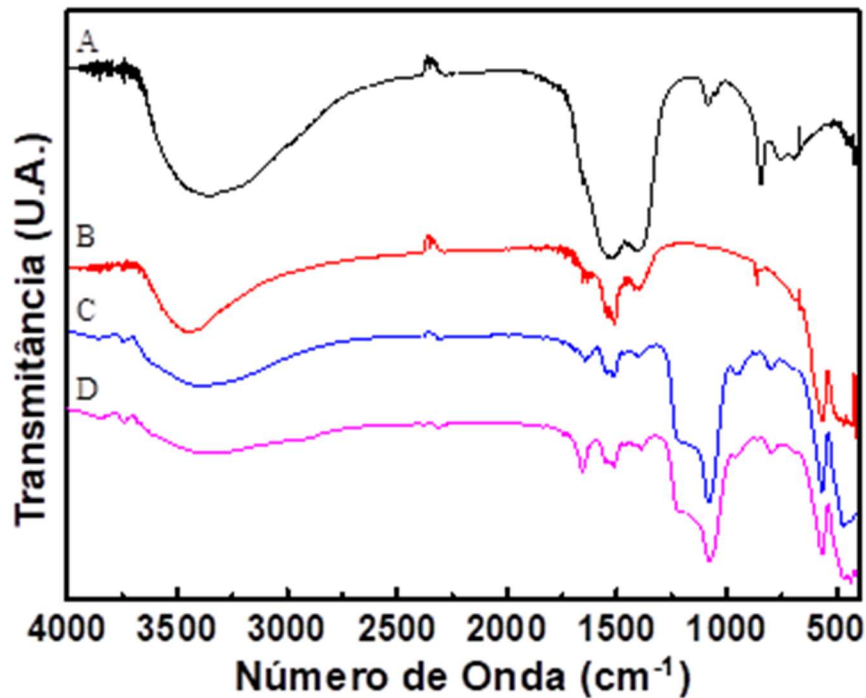


Fonte: adaptado de (DE MAYRINCK *et al.*, 2015).

6.2.2. Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR obtidos para as amostras de $Y(OH)CO_3:Er/Yb$, $Y_2O_3:Er/Yb$, $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS$ e $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$ são mostrados na Figura 37. A radiação na região do infravermelho provoca diferentes vibrações nas moléculas, características dos grupos funcionais, o que permite observar características de composição e estrutura química e compará-las com o objetivo da rota de síntese realizada. Assim, esta técnica se torna fundamental para o acompanhamento da modificação tanto da estrutura cristalina da nanopartícula, uma vez que há mudança em sua composição química para tanto, quanto da modificação da superfície da mesma.

Figura 37. Espectros de FTIR obtidos para (A) $\text{Y(OH)CO}_3\text{:Er/Yb}$; (B) $\text{Y}_2\text{O}_3\text{:Er/Yb}$; (C) $\text{Y}_2\text{O}_3\text{:Er/Yb@TEOS}$; (D) $\text{Y}_2\text{O}_3\text{:Er/Yb@TEOS@APTES}$.



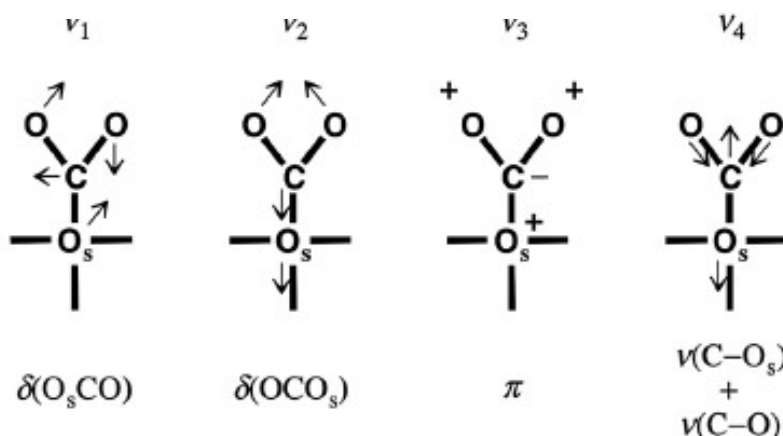
Fonte: autora.

No espectro do $\text{Y(OH)CO}_3\text{:Er/Yb}$ (A) observa-se bandas alargadas características de modos vibracionais de grupos hidróxi. Apesar de aparecerem em torno de 3600 cm^{-1} , as bandas de estiramento da ligação O-H podem sofrer deslocamento de até 200 cm^{-1} quando estão em estruturas de hidroxicarbonato (CARO *et al.*, 1972). A deformação do grupo OH aparece em uma região na qual também estão as bandas características de diferentes modos vibracionais do CO_3^{2-} (ZHANG *et al.*, 2009b; LIN *et al.*, 2014). As bandas do carbonato são atribuídas a diferentes modos vibracionais deste grupo, quando ligados ao metal por apenas um dos átomos de oxigênio, conforme mostrado na Figura 38. As atribuições das bandas do $\text{Y(OH)CO}_3\text{:Er/Yb}$ são mostradas na Tabela 6.

Tabela 6. Proposta de atribuição das bandas ao espectro vibracional do $Y(OH)CO_3:Er/Yb$ (ZHANG *et al.*, 2009a).

Grupo funcional	Modos vibracionais e respectivas bandas (cm^{-1})					
	v1	v2	v3	v4	v(OH)	δ
CO_3^{2-}	1143	895	1443	743		
	(1093-869)	(845)	(1446-1558)	(765-684)		
OH					3400	1560

() – Valores encontrados na literatura de referência. .

Figura 38. Modos vibracionais do carbonato.

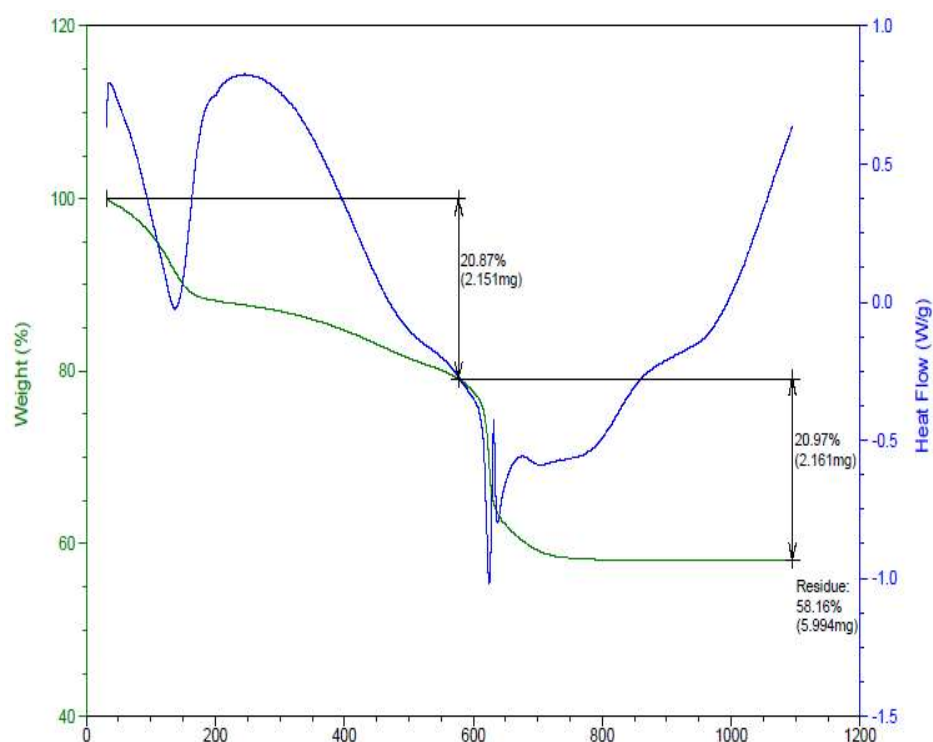
Fonte: (SEIFERTH *et al.*, 1999).

No espectro do óxido de ítrio (B), observa-se a redução das bandas em 3400 cm^{-1} , 1560 cm^{-1} e 1443 cm^{-1} como resultado do tratamento térmico do $Y(OH)CO_3:Er/Yb$. Este, realizado a 900°C propiciaria, a princípio, a saída dos grupos $-OH$, bem como dos grupos carbonato na forma de CO_2 . Na região entre 450 e 600 cm^{-1} são observadas bandas atribuídas aos osciladores YO , atribuídas ao óxido formado (DAVOLOS *et al.*, 2003).

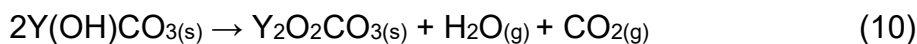
A termogravimetria do hidroxicarbonato de ítrio (Figura 39) mostra a evolução deste material durante o tratamento térmico até a formação do material final desta etapa, $Y_2O_3:Er/Yb$. Nesta análise, observou-se uma perda de $41,77\%$ da massa inicial da amostra. Observa-se que o primeiro platô de redução de massa de $20,87\%$ ocorre com maior evidência por volta de 100°C , o que indica saída dos grupos $-OH$ em forma de água. O platô posterior, em 600°C , mostra uma nova redução de $20,97\%$ de massa, temperatura em que ocorre a saída do CO_2 . Na temperatura de 900° , utilizada para o tratamento, observa-se que a massa da amostra já está estável, indicando a possível

conversão do hidroxicarbonato a óxido de ítrio. A literatura reporta que a porcentagem de massa que indica a saída dos grupos OH e CO_3^{2-} é cerca de 34%, de acordo com equações químicas teóricas propostas (10 e 11). Uma vez que a amostra não fora conservada em dessecador, acredita-se que possa ter absorvido água da atmosfera. Portanto, a termogravimetria corrobora os resultados obtidos pelo espectro vibracional (KHACHATOURIAN *et al.*, 2015).

Figura 39. Termogravimetria da amostra de $\text{Y}(\text{OH})\text{CO}_3:\text{Er}/\text{Yb}$. Em verde observa-se a variação da massa com o aumento da temperatura e, em azul, o fluxo de calor durante a análise.



Fonte: autora.



Na obtenção das nanopartículas *core-shell* compostas por $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}@\text{TEOS}$ (C), observou-se alterações no espectro vibracional consistentes com a modificação da superfície com grupos silanóis, decorrentes dos recobrimento com TEOS (Tabela 7) (FRANCISCO e GUSHIKEM, 2002; CANNAS *et al.*, 2010).

Tabela 7. Proposta de atribuição de bandas ao espectro vibracional do $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS$ (RAHMAN *et al.*, 2009).

Modos vibracionais e respectivas bandas (cm⁻¹)			
$\nu(\text{Si-CH}_2)$	$\nu(\text{Si-OH})$	$\nu(\text{Si-O-Si})$	$\delta(\text{Si-O-Si})$
		800 (795)	
2900-3000 (2970)	3000-3500 (3450)	1250 – 1084	465 (460)
1394 (1384)	1084 (1100)	(1200-110)	
	957 (957)	1090 (1090)	

Para a amostra funcionalizada $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$ (D), nota-se o aparecimento de uma banda em 1658 cm^{-1} , atribuída à vibrações angulares da amina alifática N-H. A banda fracamente observada em 2930 cm^{-1} é atribuída à estiramentos Si-CH₂, grupo presente tanto no APTES quanto no TEOS, porém a banda é observada quando ambos estão juntos, em sílica modificada, por exemplo. A banda larga na região de 3400 cm^{-1} é atribuída a uma sobreposição da banda de estiramentos de grupos silanóis a banda de vibração de ligações C-H e N-H (RAHMAN *et al.*, 2009). As atribuições são mostradas na Tabela 8.

Tabela 8. Proposta de atribuição de bandas ao espectro vibracional do $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$ (RAHMAN *et al.*, 2009; BINI *et al.*, 2012).

Grupo funcional	Modos vibracionais e respectivas bandas (cm⁻¹)	
	$\nu(\text{N-H})$	$\nu(\text{Si-NH}_2)$
APTES	1658 (1616)	2930 (2850-2950)
	3400 (3400)	

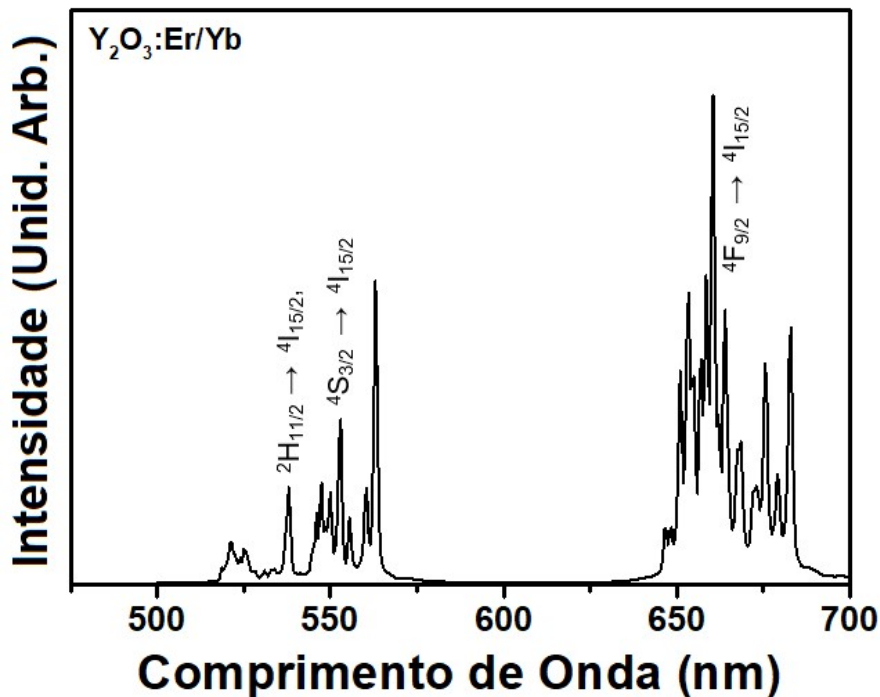
Na literatura é reportada a síntese de nanopartículas obtidas utilizando TEOS e APTES como matriz, podendo, ainda, utilizar-se de terras raras para que as propriedades fotônicas deste material sejam manipuladas (RAHMAN *et al.*, 2009; LECHEVALLIER *et al.*, 2012). Nestes casos, as bandas correspondentes aos modos vibracionais do APTES são mais pronunciadas uma vez que o APTES é parte constituinte da matriz e sua proporção molar será maior em relação ao TEOS, por

exemplo, do que a proporção utilizada no trabalho aqui desenvolvido. No espectro obtido para a amostra de $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$ (Figura 37), observa-se mudanças sutis nas regiões características para atribuição ao grupamento amina, pois, além da proporção molar ser menor observa-se, no esquema da Figura 33, que para cada grupo amina são necessários 3 grupos Si-O, que é um excelente oscilador ativo no infravermelho.

6.2.3. Espectroscopia de Fotoluminescência (Conversão Ascendente)

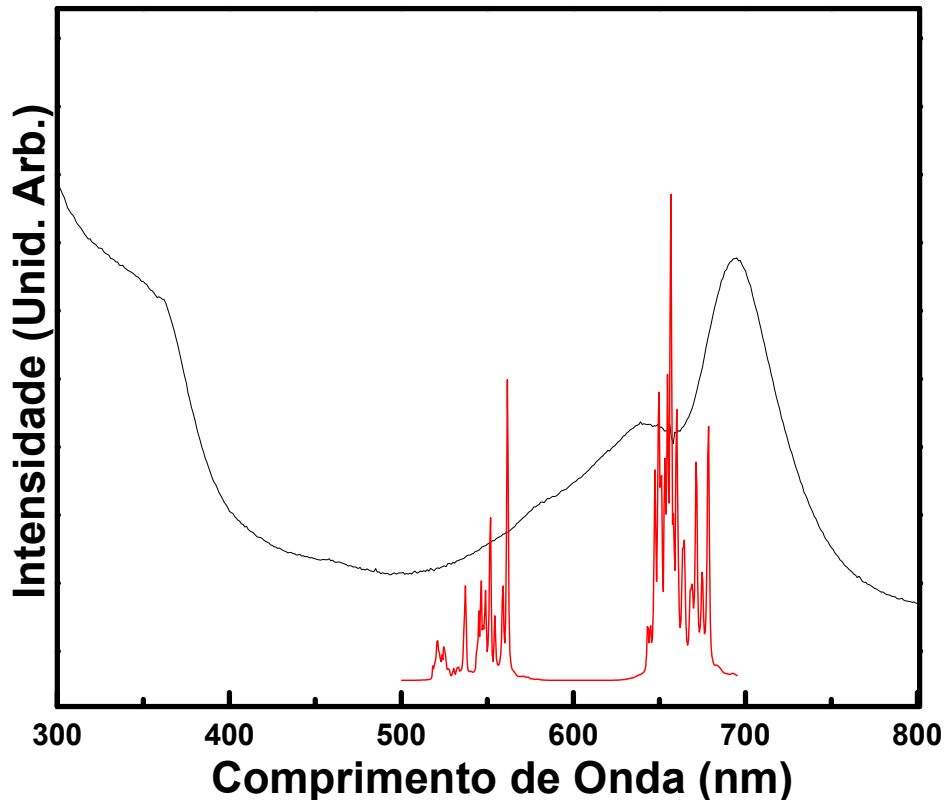
A Figura 40 mostra o espectro de emissão obtido para a amostra $Y_2O_3:Er/Yb$, no qual as transições $^2H_{11/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$, $^4S_{3/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$ e $^4F_{9/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$ são atribuídas aos máximos em 538 nm, 547 nm (região do verde) e 660 nm (região do vermelho), respectivamente. É importante ressaltar que a emissão no vermelho da partícula sintetizada ocorre no mesmo comprimento de onda da absorção das ftalocianinas utilizadas neste trabalho, fato que contribui para a expectativa da ocorrência de transferência de energia entre a nanopartícula e a ftalocianina, resultando na ativação do fotossensibilizador (Figura 41).

Figura 40. Espectro de emissão por conversão ascendente da amostra $Y_2O_3:Er/Yb$ com excitação fixada em 980 nm, variando a potência do *laser* de 50 a 400 mW.



Fonte: autora.

Figura 41. Sobreposição dos espectros de emissão do $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}$ ($\lambda_{\text{ex.}} = 980 \text{ nm}$) e de absorção da ftalocianina de rutênio.

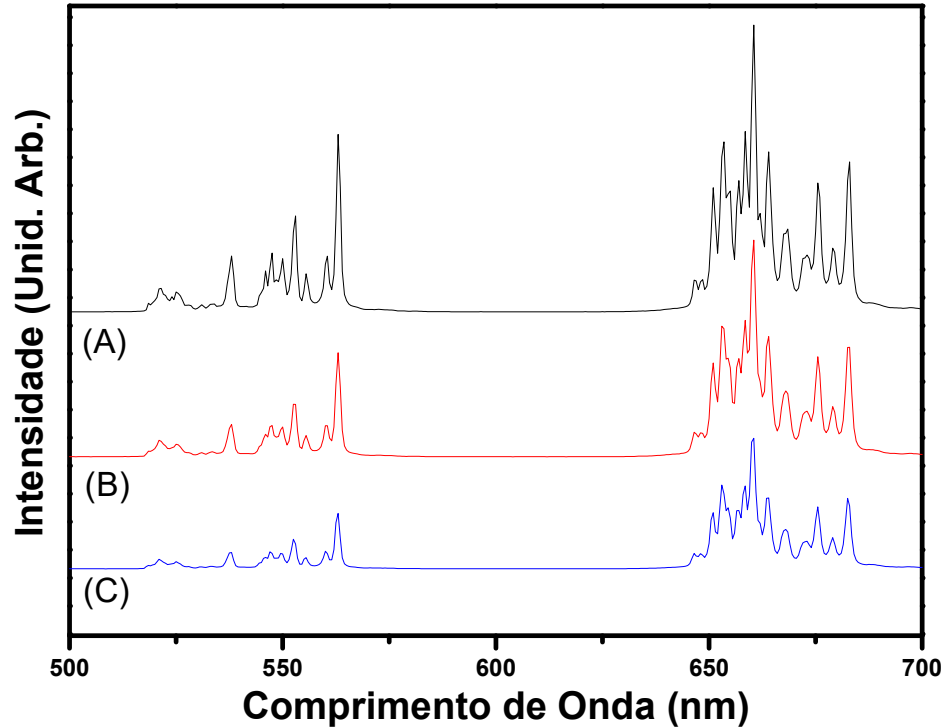


Fonte: autora.

O perfil de emissão para $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}$ e $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}@\text{TEOS}$ foi o mesmo, sem deslocamento ou surgimento de novas bandas, como mostra a Figura 42, apenas ocorrendo uma diminuição na intensidade da emissão, devido ao fato de o recobrimento com material amorfo suprimir a luminescência do óxido de ítrio cristalino.

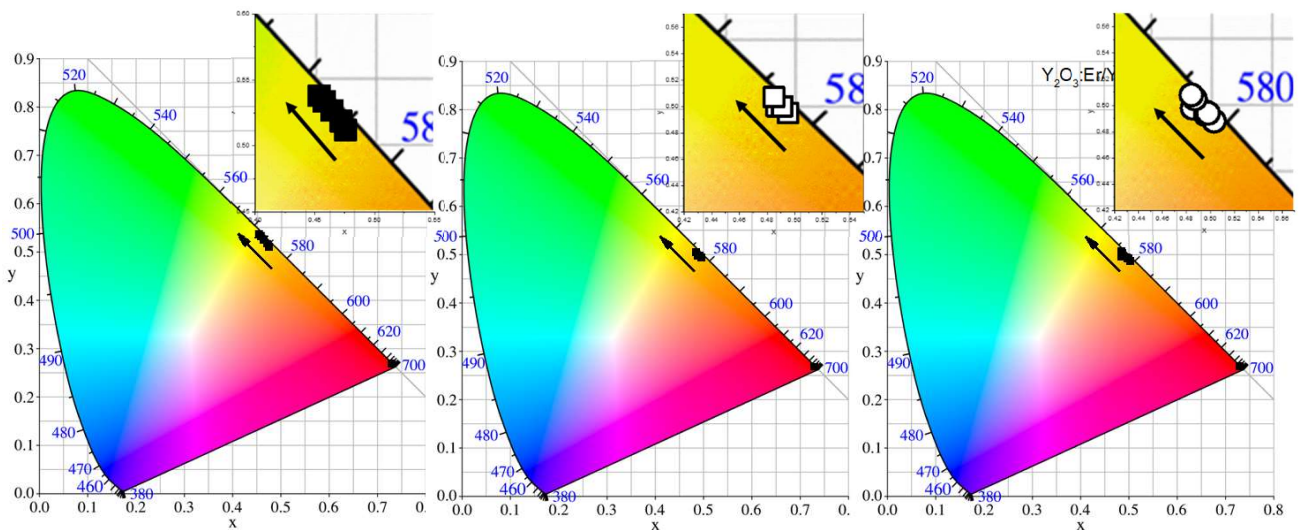
A característica da cor observada na emissão das nanopartículas é representada pelo diagrama de cromaticidade (Figura 43), que mostra a tendência de emissão de acordo com um diagrama de cores, a partir dos espectros de emissão da amostra. As amostras apresentaram a mesma tendência de emitir uma cor laranja, devido à emissão no vermelho e no verde simultaneamente.

Figura 42. Comparação entre os espectros de emissão das amostras (A) $Y_2O_3:Er/Yb$, (B) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS$ e (C) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$, com excitação em 980 nm e potência do laser a 450 mW.



Fonte: autora.

Figura 43. Diagramas de cromaticidade das amostras (A) $Y_2O_3:Er/Yb$, (B) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS$ e (C) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$.



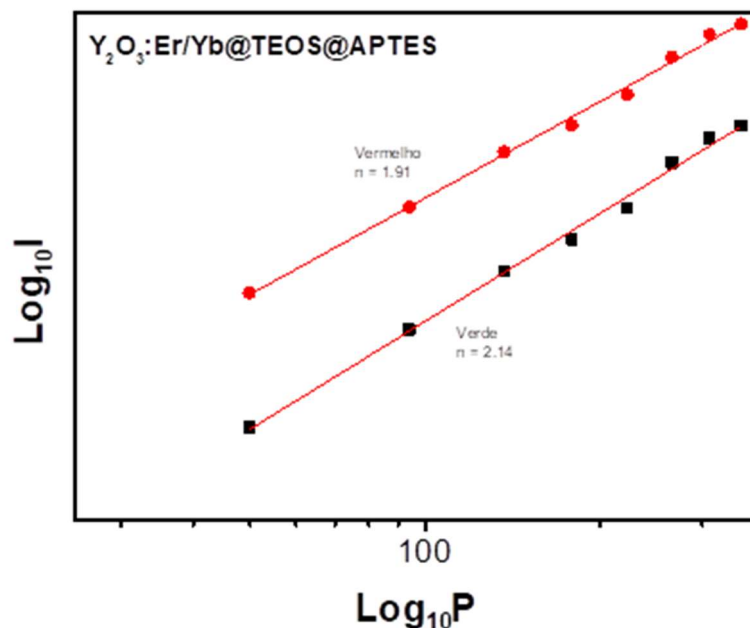
Fonte: autora.

A relação entre o processo de conversão ascendente por absorção sequencial de fótons e a potência do *laser* de bombeio pode revelar por qual mecanismo este processo acontece, o qual pode ser por conversão ascendente por transferência de energia (do inglês, *Energy-Transfer Upconversion*, ETU) ou absorção no estado excitado (do inglês, *Excited State Absorption*, ESA), os quais já foram explicados no item 2.8.3. Para tanto, esta relação é feita utilizando a proporção encontrada entre a intensidade de luminescência da amostra (**I**) e a potência do *laser* de bombeio (**P**), sendo **n** o número de fótons envolvidos no processo de conversão ascendente, como de acordo com a relação mostrada em (12) (POLLNAU *et al.*, 2000).

$$I \propto P^n \quad (12)$$

A partir desta relação, **n** pode ser obtido graficamente pelo coeficiente angular da equação da reta do gráfico log-log da área dos picos de emissão (**I**) em função da potência do *laser* de bombeio (**P**) (Figura 44). O valor de **n** foi determinado para todas as amostras de nanopartículas sintetizadas ($Y_2O_3:Er/Yb$, $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS$ e $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$) na região do verde e do vermelho, e seus valores estão na Tabela 9.

Figura 44. Curvas do log da área dos picos em função do log da potência utilizada da amostra $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$.



Fonte: autora.

Tabela 9. Valores de n determinados segundo a Lei de Potência.

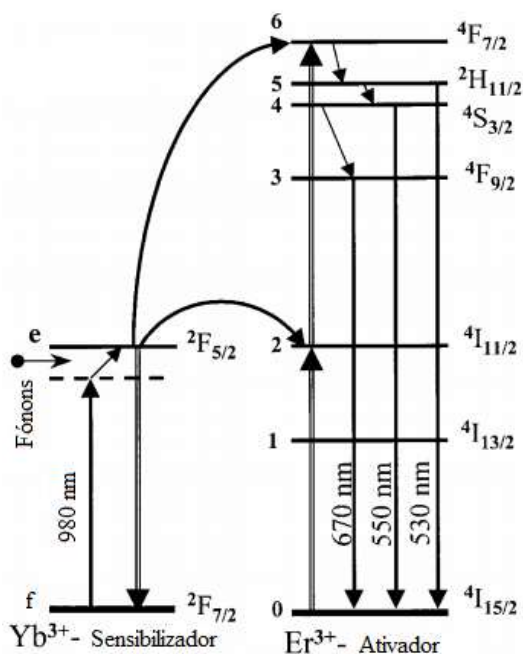
Região	Amostra	N
Verde	Y ₂ O ₃ :Er/Yb	1,83
	Y ₂ O ₃ :Er/Yb@TEOS	1,85
	Y ₂ O ₃ :Er/Yb@TEOS@APTES	1,91
Vermelho	Y ₂ O ₃ :Er/Yb	2,04
	Y ₂ O ₃ :Er/Yb@TEOS	2,06
	Y ₂ O ₃ :Er/Yb@TEOS@APTES	2,14

O coeficiente angular próximo a 2 para todas as amostras demonstra que o processo ocorrido envolve a absorção de 2 fótons. O recobrimento e funcionalização da nanopartícula com TEOS e APTES, respectivamente, não causaram nenhuma modificação na conversão ascendente de energia, uma vez que esta ocorre entre os íons terras raras que se encontram na matriz da nanopartícula, que não foi modificada.

Os espectros de emissão das nanopartículas de óxido de ítrio dopadas com érbio e itérbio apresentam características de ambos os processos de conversão ascendente, ETU e ESA, o que nos permite concluir que ambos contribuem para que haja absorção e emissão de fótons.

A luminescência do par de íons terras raras Er³⁺ e Yb³⁺ se dá por um mecanismo anti-Stokes assistido por fônons (Figura 45). Após a irradiação em 980 nm, o íon Yb³⁺, íon sensibilizador, é excitado de seu estado fundamental ²F_{7/2} a seu estado excitado ²F_{5/2}. Então, ocorre a transferência de energia do estado excitado do Yb³⁺ para o Er³⁺, íon ativador, o qual é excitado de seu estado fundamental ⁴I_{15/2} para seu estado excitado ⁴I_{11/2} e, posteriormente, para um estado excitado acima, ⁴F_{7/2}, através de uma transferência de energia subsequente. Por decaimentos não radiativos assistidos por fónon, os estados ²H_{11/2}, ⁴S_{3/2} e ⁴F_{9/2} são populados e seu decaimento radiativo resulta nas emissões em 530 nm, 550 nm e em 670 nm, respectivamente, sendo esta última a região de interesse para este trabalho, como já mostrado na Figura 41 (GOLDNER e PELLÉ, 1993; DA SILVA *et al.*, 2000).

Figura 45. Esquema simplificado do processo de conversão ascendente para o par de íons terra rara érbio (Er^{3+}) e Ítérbio (Yb^{3+}). As setas sólidas representam absorção e emissão de fótons; as setas duplas, transferência de energia e as setas pequenas, processos assistidos por fónon.



Fonte: Adaptado de (DA SILVA *et al.*, 2000)

6.2.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MET) permite que se observe as modificações morfológicas ocorridas após as etapas subsequentes de síntese das nanopartículas de $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}$, $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}@\text{TEOS}$ e $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}@\text{TEOS}@\text{APTES}$ (Figura 46).

Na micrografia da amostra $\text{Y}(\text{OH})\text{CO}_3:\text{Er}/\text{Yb}$, Figura 46 (a), confirma-se a formação de partículas esféricas e não agregadas, fator importante para o sucesso das etapas posteriores. Após o tratamento térmico a 900°C , nota-se, na micrografia da amostra $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}$, Figura 46 (b), a formação de regiões cristalinas nas partículas. A cristalinidade da matriz é uma característica que permite que o material tenha uma boa emissão de luminescência em regiões determinadas, já que o material amorfo possui um perfil de emissão de bandas alargadas. Na micrografia apresentada na Figura 46 (c), referente às partículas já recobertas com TEOS, $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}@\text{TEOS}$, e na Figura 46 (d), referente às partículas funcionalizadas com APTES, $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}@\text{TEOS}@\text{APTES}$, observa-se a formação de uma camada nas

extremidades das partículas, que não possui a mesma aparência do material cristalino no centro da partícula. De fato, não há diferenças significativas entre as micrografias (c) e (d). A partir das micrografias, foi possível, ainda, fazer uma estimativa da distribuição de tamanhos das partículas, distribuídos de forma homogênea entre 150 e 250 nm (Figura 47).

Figura 46. Micrografias das amostras (a) $Y(OH)CO_3:Er/Yb$, (b) $Y_2O_3:Er/Yb$, (c) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS$ e (d) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$.

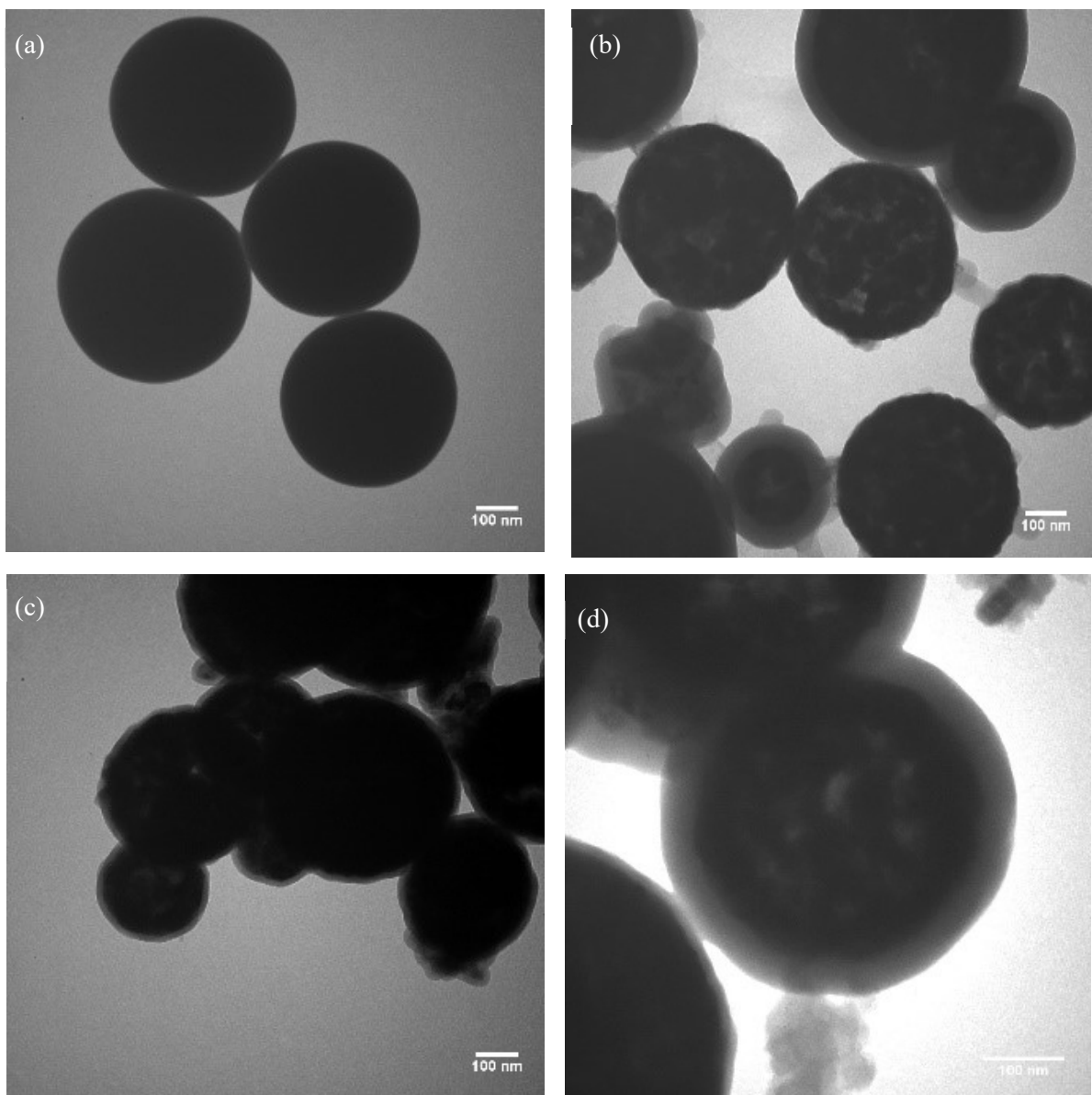
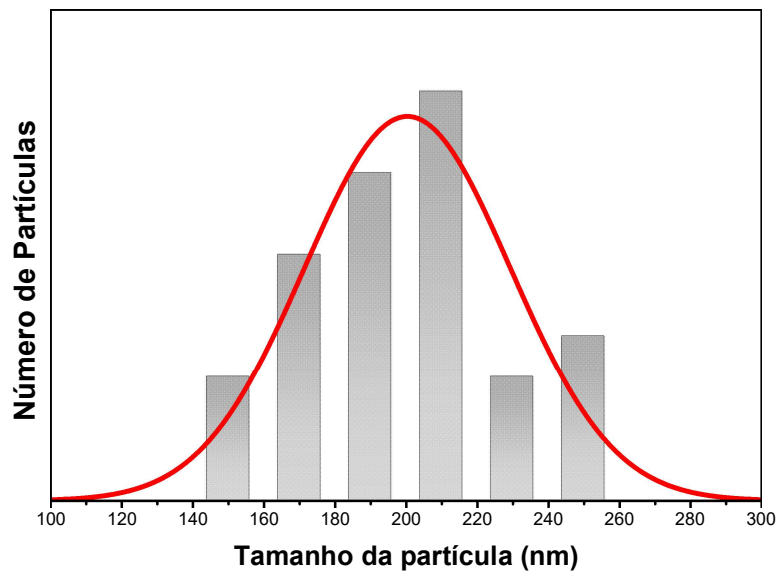


Figura 47. Histograma da distribuição de tamanhos das nanopartículas de $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$.



Fonte: autora.

6.2.5. Determinação do ponto de carga zero e potencial zeta

Os valores de potencial zeta e potencial de carga zero (PCZ) obtidos para as amostras $Y_2O_3:Er/Yb$, $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS$ e $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$ são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Potencial zeta e pH de carga zero para as amostras $Y_2O_3:Er/Yb$, $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS$ e $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$.

Amostra	Potencial Zeta (mV)	Condutividade (mS)	pH _{PCZ}
$Y_2O_3:Er/Yb$	4,23	0,120	4,35
$Y_2O_3:Er/Yb@TEOS$	-21,5	0,121	3,88
$Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$	-8,02	0,129	3,87

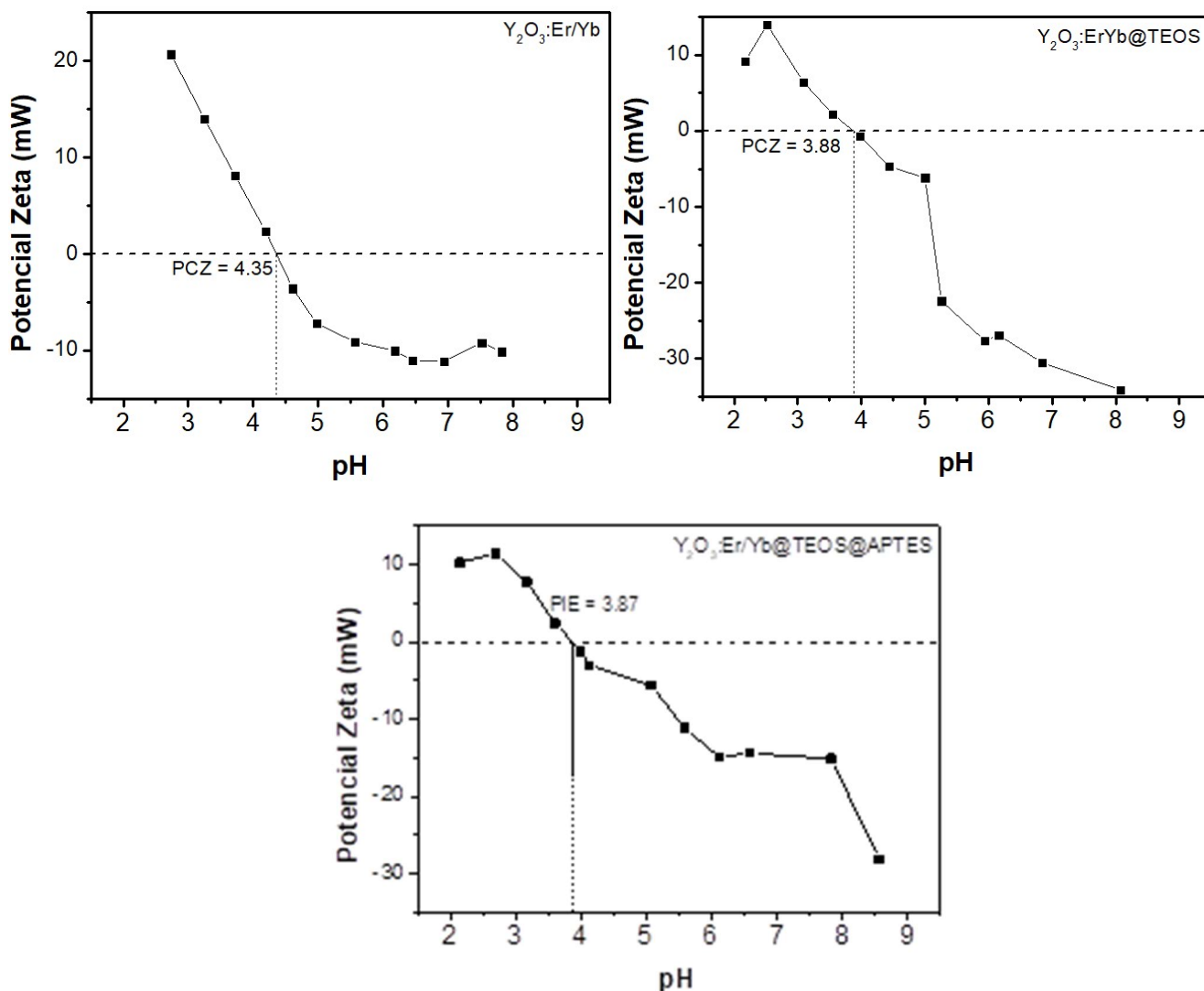
Uma vez que o potencial zeta demonstra a energia da interação entre as superfícies das nanopartículas, o valor positivo indica maior tendência à agregação, enquanto os valores negativos indicam que as nanopartículas encontram-se

desagregadas e propícias para modificações em sua superfície. Sendo assim, as nanopartículas de $Y_2O_3:Er/Yb$, que não possuem modificação alguma em sua superfície, possuem a maior tendência à agregação. As nanopartículas de $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS$ e $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$, por sua vez, apresentam valores de potencial zeta negativos, o que demonstra que a modificação da superfície colabora para que a interação entre nanopartículas seja reduzida. Assim, além de utilizada para ancorar moléculas à superfície de NCAF, a funcionalização da superfície também pode ser utilizada como ferramenta para a obtenção de nanopartículas isoladas umas das outras.

Ao analisar os valores obtidos para as amostras de $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS$ e $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$, observa-se que a nanopartícula funcionalizada com grupos amino obteve um valor maior de potencial zeta em relação à nanopartícula recoberta apenas com sílica. Este valor de zeta indica que as partículas já funcionalizadas apresentam maior agregação, atribuída à potencialização da interação pela ocorrência de ligações de hidrogênio pela inserção do grupo amino.

A Figura 48 mostra as curvas obtidas pela titulação potenciométrica das amostras para obtenção do ponto de carga zero, ou seja, pH em que a carga da superfície da nanopartícula é zero. Os valores de PCZ para as amostras $Y_2O_3:Er/Yb$, $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS$ e $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$ apresentam um perfil decrescente, e corrobora com a tendência observada na literatura, de que a modificação da superfície por amino grupos é confirmada com a redução do pH em que se encontra o PCZ em relação à amostra anterior, sem funcionalização (BINI *et al.*, 2012; PEREIRA, 2016).

Figura 48. Titulação potenciométrica para obtenção dos potenciais de carga zero das amostras $Y_2O_3:Er/Yb$, $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS$ e $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$.



Fonte: autora.

6.3. Síntese do sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@RuPc$

Foram realizadas duas rotas para que se chegasse ao sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@RuPc$. A primeira delas, utilizando a ftalocianina KTC, foi realizada sob condições que favoreceriam a adsorção da rutênio ftalocianina na superfície da NCAF, uma vez que a KTC não é solúvel em água. A segunda rota foi feita sob condições que favoreceriam a ligação covalente entre a rutênio ftalocianina KTC(NO), pois, além de ser solúvel em água assim como os catalisadores da reação (NHS e EDC), imaginou-se que seria necessário uma transferência de energia mais

efetiva entre a NCAF e KTC(NO) para que houvesse, além de produção de oxigênio singlete, liberação de NO.

Na Figura 49 é possível observar a diferença de cor entre o $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$, o sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO)$ e o sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC$.

Figura 49. Sólidos obtidos após imobilização dos complexos RuPC-R à superfície de NCAF.



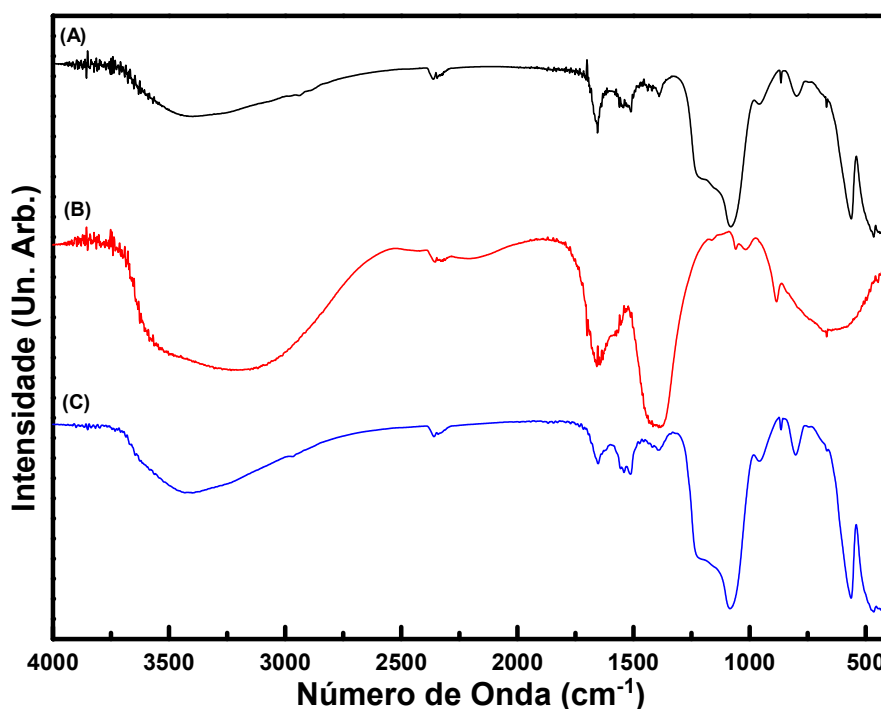
Fonte: autora.

6.4. Caracterização do sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@RuPc$

6.4.1. Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros vibracionais do sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC$ são mostrados na Figura 50.

Figura 50. Espectro de FTIR de (A) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$, (B) KTC e (C) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC$.



Fonte: autora.

Ao espectro vibracional de $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$ a atribuição foi feita no item 6.2.2, Tabela 8. Em (B) é mostrado o espectro vibracional da KTC, e em (C) é mostrado o espectro vibracional do sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC$. A atribuição das bandas vibracionais da KTC é mostrada na Tabela 11, e a atribuição do sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC$, na Tabela 12.

Tabela 11. Proposta de atribuição de bandas ao espectro vibracional da RuPc KTC (RAMOS, 2016).

Modos vibracionais e respectivas bandas (cm^{-1})						
$\nu(N-H)$	$\nu(C-H)$	$\nu(C=O)$	$\nu(C=C)$ (anel aromático)	ν isoindol	ν pirrol	$\delta(C-H)$
3000-3500 (3327-3474)	3000-3500 (3158)	1657 e 1698 (1658 e 1700)	1565 _(sh) (1560)	1400 (1402)	1384 (1378)	1058 (1056)

Na região de 3000-3500 cm^{-1} observa-se uma banda alargada, atribuída à sobreposição das bandas vibracionais referentes aos grupos N-H e C-H. Na região de 1440 a 1370 cm^{-1} , a intensa banda observada é atribuída à sobreposição das bandas de estiramento do grupo isoindol e do grupo pirrol (RAMOS, 2016).

Tabela 12. Proposta de atribuição de bandas ao espectro vibracional do sistema $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}@\text{TEOS}@\text{APTES}@\text{KTC}$.

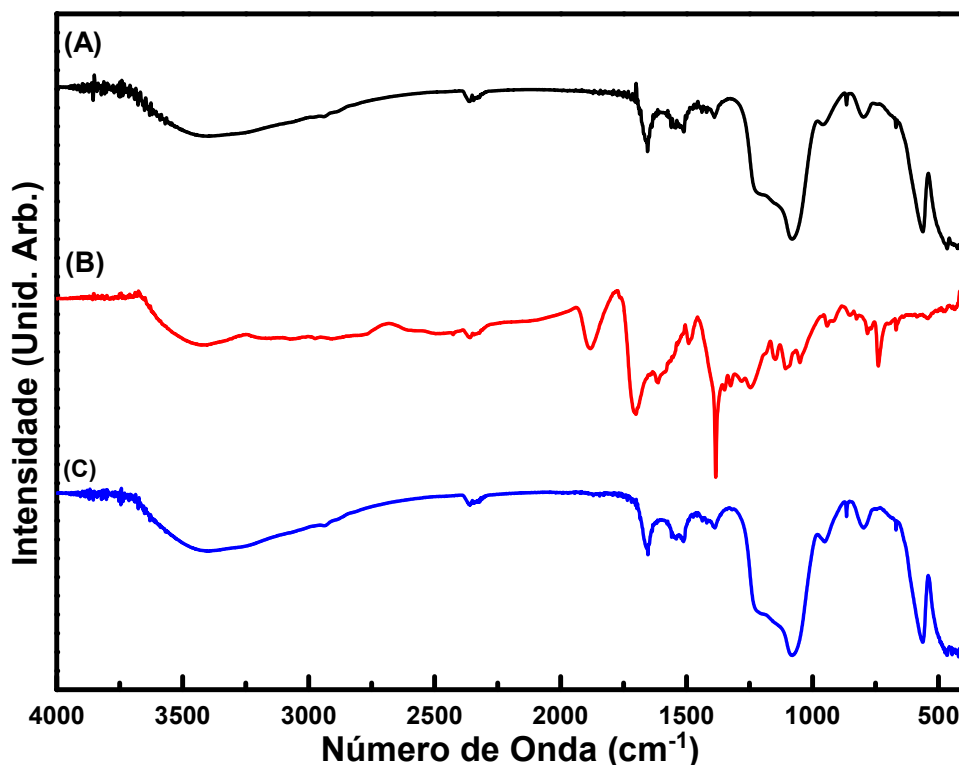
Modos vibracionais e respectivas bandas (cm^{-1})							
$\nu(\text{N-H})$	$\nu(\text{Si-NH}_2)$	$\nu(\text{Si-OH})$	ν (Si-O-Si)	$\nu(\text{C=O})$	ν isoindol	ν pirrol	$\delta(\text{C-H})$
		3000-3500					3000-
3000-3500	2930	(3400)	1079	1565	1405	1390	3500
(3327-3474)	(2850-	1222 (1100)	(1080)	(1560)	(1402)	(1378)	(3450)
1658 (1616)	2950)	956 (950)					1058
							(1056)

Na região de 1650 cm^{-1} , observa-se alargamento da banda atribuída ao estiramento dos grupos N-H do APTES, causado pela contribuição do estiramento do grupo C=O dos ácidos carboxílicos terminais da KTC. Em 1405 e 1390 cm^{-1} observa-se bandas referentes ao estiramento dos grupos isoindol e pirrol, respectivamente, ambos presentes apenas na KTC. Ainda se observa a banda alargada na região de 3000-3500 cm^{-1} devido à sobreposição do estiramento característicos de bons osciladores, N-H, C-H e O-H. O estiramento dos grupamentos hidroxilas aparecem pois a ligação do APTES não acontece, obrigatoriamente, em todos os grupos Si-OH, que são excelentes osciladores no infravermelho.

As bandas referentes à rutênio ftalocianina, apesar de discretas, corroboram a hipótese de que a KTC foi adsorvida à superfície de NCAF, uma vez que não se encontram bandas características da formação de ligação amida entre amino grupos da NCAF e os ácidos carboxílicos terminais da KTC.

A Figura 51 mostra os espectros vibracionais do sistema $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}@\text{TEOS}@\text{APTES}@\text{KTC}(\text{NO})$.

Figura 51. Espectro de FTIR de (A) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$, (B) KTC(NO) e (C) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO)$.



Fonte: autora.

A atribuição das bandas para os espectros da rutênio-ftalocianina KTC(NO) e para sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO)$ são feitas na Tabela 13 e na Tabela 14, respectivamente.

Tabela 13. Proposta de atribuição de bandas ao espectro vibracional da rutênio ftalocianina KTC(NO) (RAMOS, 2016).

Modos vibracionais e respectivas bandas (cm^{-1})				
$\nu(N-H)$	$\nu(NO)$	$\nu(C=O)$	ν isoindol	ν pirrol
3000-3500 (3055-3313)	1884	1701 (1706)	1489 (1497)	1382 (1378)
1658 (1616)	(1887)	1612 (1616)		

Em relação à KTC, a rutênio-ftalocianina KTC(NO) apresenta uma banda significativa em 1884 cm^{-1} , referente ao estiramento do grupo N-O.

Tabela 14. Proposta de atribuição de bandas vibracionais ao espectro vibracional do sistema $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}@\text{TEOS}@\text{APTES}@\text{KTC}(\text{NO})$.

Modos vibracionais e respectivas bandas (cm^{-1})						
$\nu(\text{N-H})$	$\nu(\text{Si-NH}_2)$	$\nu(\text{Si-OH})$	ν (Si-O-Si)	ν isoindol	ν pirrol	$\delta(\text{C-H})$
3000-3500 (3327-3474)	2931 (2850- 2950)	3000-3500 (3400)	1081 (1080)	1405 (1402)	1390 (1378)	3000-3500 (3450)
1655 (1616)		1210 (1100) 951 (950)				1058 (1056)

No espectro vibracional do sistema $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}@\text{TEOS}@\text{APTES}@\text{KTC}(\text{NO})$ são observadas, principalmente, as bandas atribuídas às nanopartículas. Na região em que se encontram as bandas características do estiramento do isoindol e do pirrol, de 1390 a 1400 cm^{-1} , observa-se um discreto alargamento da pequena banda já presente no espectro de NCAF. A fraca banda em 2931 cm^{-1} , atribuída ao estiramento do grupo Si-NH_2 , ainda é observada, porém, devido à proporção $\text{KTC}(\text{NO})/\text{NCAF}$, não é possível afirmar se houve ou não ligação covalente, uma vez que não se observa bandas atribuídas à ligação amídica que se formaria neste caso. A falta de bandas características da KTC(NO) é atribuída à intensidade das bandas dos osciladores Si-OH e Si-O-Si, que são excelentes osciladores no infravermelho, somado à quantidade de rutênio-ftalocianina em relação à quantidade de sílica na superfície da nanopartícula, que favorece o resultado obtido. A cor da nanopartícula após ser submetida à rota reacional para imobilização da KTC(NO) por ligação covalente indica a imobilização da KTC(NO) à superfície das NCAF, ainda que não se saiba por qual mecanismo.

6.4.2. Determinação do potencial zeta

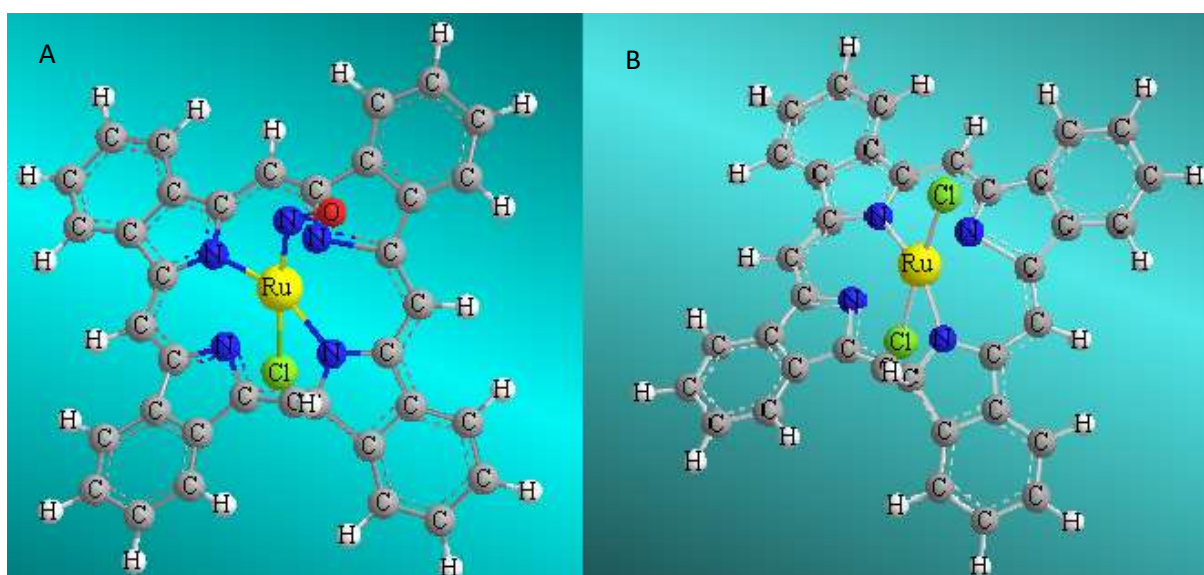
Após os testes para determinação do potencial zeta descritos no item **6.2.5.**, os valores para o potencial zeta obtidos são mostrados na Tabela 15.

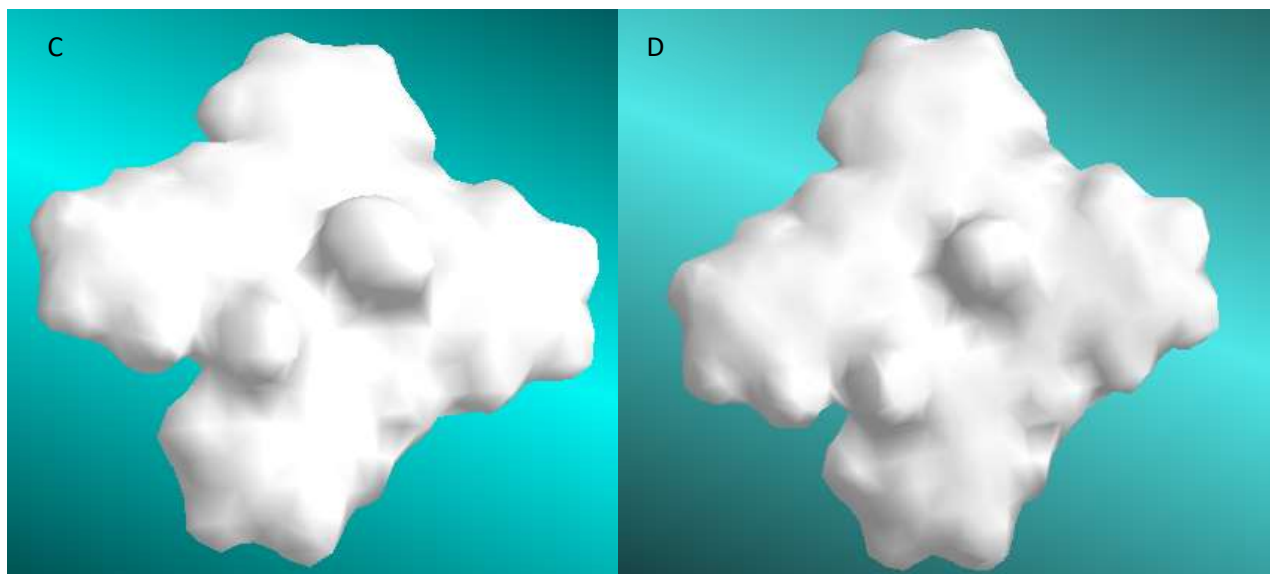
Tabela 15. Valores obtidos para o potencial zeta dos sistemas $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC$ e $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO)$.

Sistema	Potencial Zeta (mV)
$Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC$	21,3
$Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO)$	-6,38

A diferença no valor do zeta para os sistemas com diferentes ftalocianinas pode indicar diferentes comportamentos em solução de acordo com as características de cada ftalocianina. O valor positivo indica que o sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC$ possui maior tendência a se agregar quando em solução, enquanto as interações entre as nanopartículas com KTC(NO) em sua superfície são minimizadas. Uma vez que a diferença entre os dois sistemas é a substituição de um cloro por um NO como ligante axial da ftalocianina imobilizada (Figura 52), a diferença, ainda que sutil, na eletronegatividade dos ligantes pode ter causado diferença densidade de carga da superfície do sistema, resultando na diferença significativa de potencial zeta (PRIMO *et al.*, 2008).

Figura 52. Estruturas propostas para as Rutênio-ftalocianinas imobilizadas em NCAF: Estruturas tridimensionais (A) KTC(NO) e (B) KTC e diagramas de superfície (C) KTC(NO) e (D) KTC.





Fonte: autora.

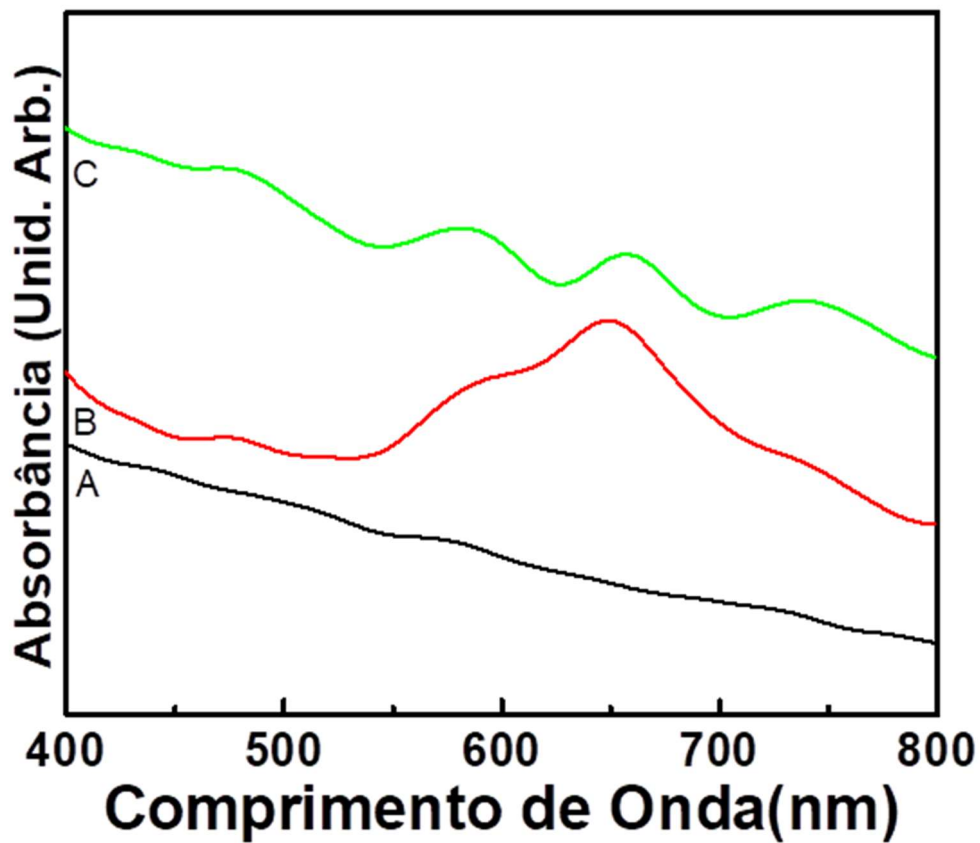
6.4.3. Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível

Os espectros obtido em nujol demonstram, qualitativamente, que há a presença dos complexos rutênio-ftalocianina na superfície da nanopartícula (Figura 53). Ainda que, nos espectros em que a KTC está imobilizada em NCAF, a intensidade relativa das bandas seja menor, observa-se o mesmo padrão, sem deslocamentos. Assim, corroborando com os resultados obtidos com a técnica de FTIR e com a proposta de síntese do sistema, nos quais propõe-se a imobilização da KTC por adsorção à nanopartícula.

Para a ftalocianina com o grupo nitrosilo, a análise por espectroscopia eletrônica de absorção foi realizada utilizando pastilhas de KBr como dispersante do sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO)$ e da $KTC(NO)$ (Figura 54). No espectro eletrônico do sistema $RuPc-NCAF$ é possível observar uma leve banda na região de 707 nm, enquanto no espectro eletrônico da $KTC(NO)$ esta banda se apresenta em 717 nm, caracterizando um deslocamento hipsocrômico. Esta banda, conhecida como banda Q, é atribuída à transição eletrônica do orbital HOMO (do inglês, *Highest Occupied Molecular Orbital*) para o orbital LUMO (do inglês, *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*), $\pi \rightarrow \pi^*$. O ombro atribuído à coordenação do NO na posição axial do rutênio hexacoordenado se observa na mesma proporção do ruído da linha de base, causado pela análise feita em estado sólido. Ainda não foi possível concluir a forma pela qual a ftalocianina foi imobilizada na superfície da nanopartícula,

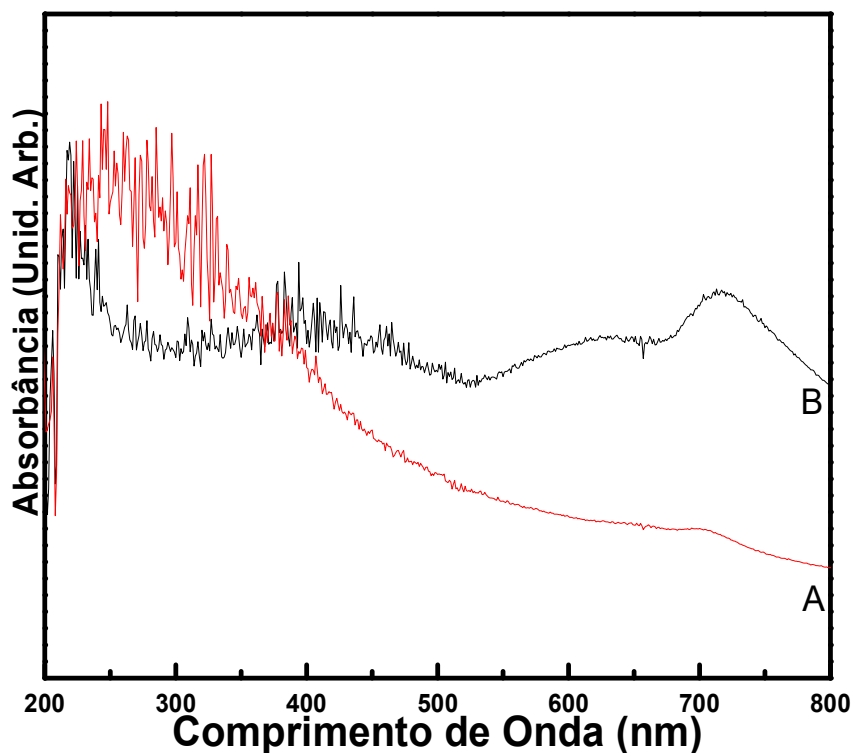
ainda que se acredite que esta tenha sido feita por adsorção, por não se observar novas bandas ou modificações significativas nas bandas de absorção do complexo de rutênio.

Figura 53. Espectros de absorção eletrônica obtidos em suspensão em nujol. (A) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$; (B) KTC; (C) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC$.



Fonte: autora.

Figura 54. Espectros de absorção eletrônica obtidos em pastilhas de KBr. (A) $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}@TEOS@APTES@KTC(\text{NO})$; (B) $\text{KTC}(\text{NO})$.

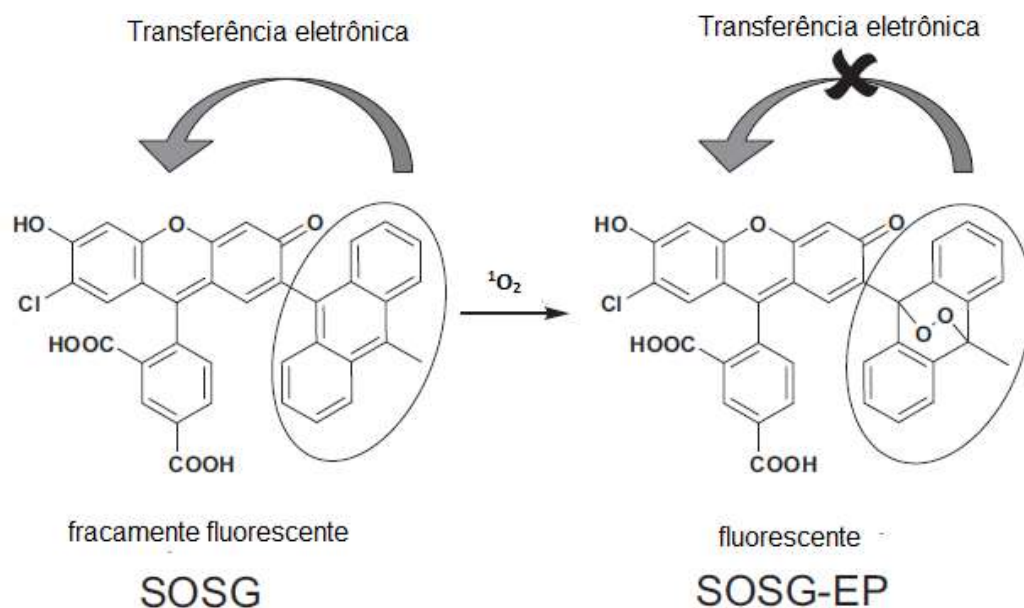


Fonte: autora.

6.5. Determinação indireta da produção de $^1\text{O}_2$

O ensaio qualitativo de produção de oxigênio pela rutênio-ftalocianina KTC foi realizado de forma indireta, utilizando a sonda *Singlet Oxygen Sensor Green* (SOSG). A molécula de SOSG tem sua fluorescência suprimida por uma transferência eletrônica intramolecular. Porém, a reação com o oxigênio singleto tem como produto o SOSG na forma de endoperóxido (SOSG-EP), no qual a transferência eletrônica é impedida após a quebra da conjugação no grupo antraceno para a ligação com a molécula de oxigênio (Figura 55), fazendo com que a molécula formada seja fortemente fluorescente (GOLLMER *et al.*, 2011).

Figura 55. Esquema da reação entre a sonda SOSG e o oxigênio singleto para formação do SOSG-EP.

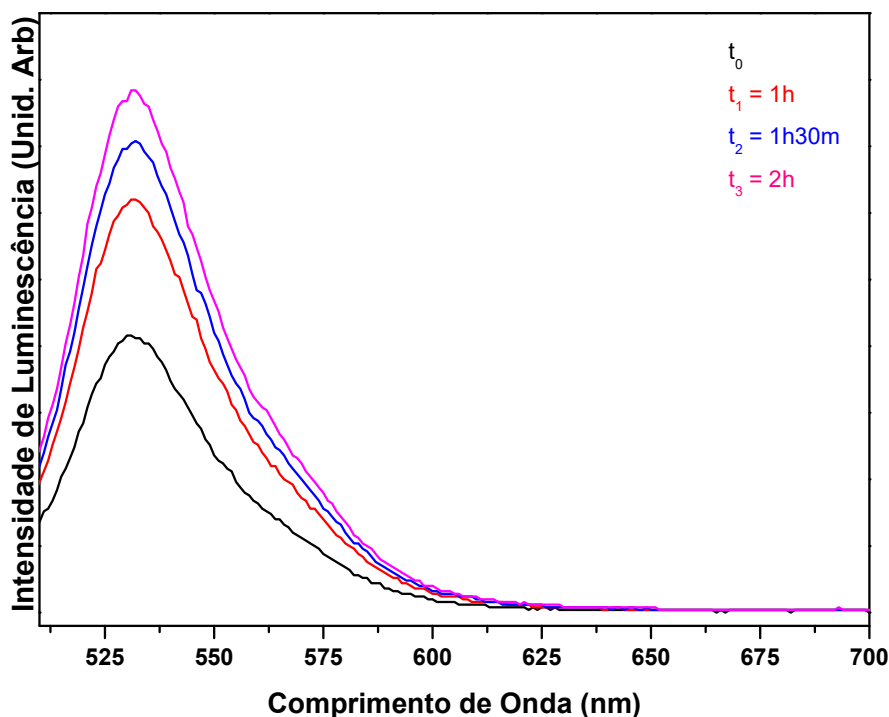


Fonte: adaptado de (GOLLMER *et al.*, 2011).

A irradiação da suspensão contendo o sistema e a sonda foi realizada com a mesma placa de irradiação utilizada nos ensaios biológicos, composta por 96 LED's que emitem em 940 nm, afim de compreender se a energia utilizada na irradiação em ensaios biológicos seria suficiente para que não houvesse prejuízo na produção de 1O_2 .

O ensaio qualitativo de produção de oxigênio singleto mostrou que a produção de oxigênio singleto pelo sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC$ ocorre de forma linear em relação ao tempo de irradiação da suspensão, quando observado o crescimento da banda de luminescência da sonda SOSG, com máximo em 532 nm (Figura 56). A fluorescência em t_0 é atribuída à sonda antes de reagir com o oxigênio singleto.

Figura 56. Espectro de fluorescência da sonda SOSG-EP após irradiação do sistema conjugado $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}@\text{TEOS}@\text{APTES}@\text{KTC}$ em 940 nm.



Fonte: autora.

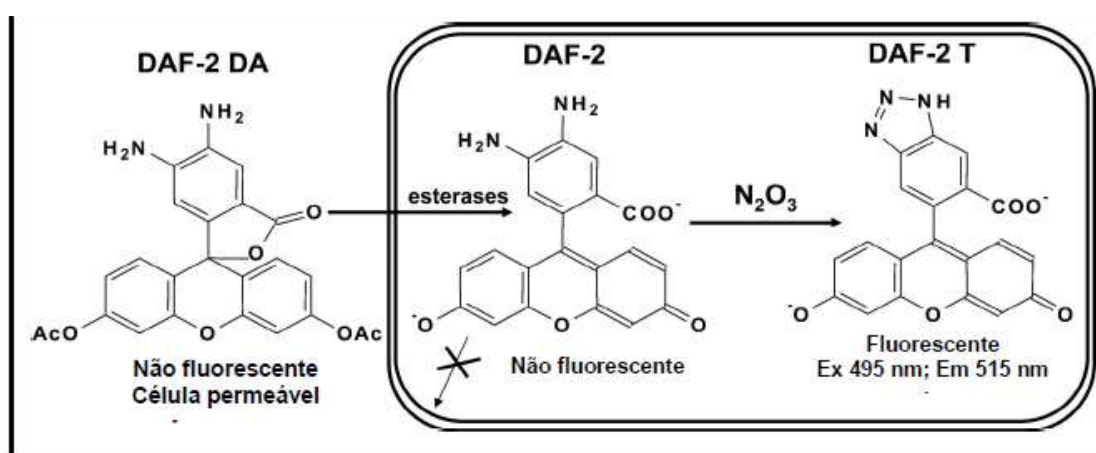
A produção de oxigênio singlete pela rutênio-ftalocianina KTC livre fora observada após irradiação em 660 nm, comprimento de onda no qual está localizado o máximo de absorção da ftalocianina (RAMOS, 2016). Assim, a detecção da produção de oxigênio singlete após irradiação do sistema $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}@\text{TEOS}@\text{APTES}@\text{KTC}$ confirma a transferência de energia da NCAF para a ftalocianina imobilizada em sua superfície, mesmo que por adsorção, principal objetivo deste trabalho.

6.6. Detecção da liberação de óxido nítrico por método indireto

A detecção da liberação de óxido nítrico foi realizado para que se pudesse confirmar que a rutênio-ftalocianina $\text{KTC}(\text{NO})$ se manteve coordenada ao rutênio após a rota de imobilização da mesma na superfície de NCAF, dada a característica lábil do ligante. Assim, utilizou-se a irradiação no comprimento de onda no qual ocorre a liberação de óxido nítrico, 377 nm em maior proporção, face se tratar de TCML (Transição de Carga Metal-Ligante) $d\pi \text{Ru}(\text{II}) \rightarrow \pi^* (\text{NO}^+)$.

Para a confirmação da liberação do NO, utilizou-se o método indireto de fluorescência pela sonda DAF-2 DA (4,5-Diaminofluoresceína diacetato), uma sonda permeável à membrana celular, que ao adentrar o citoplasma das células é hidrolisada por esterases, liberando o DAF-2 (4,5-Diaminofluoresceína), que em pH fisiológico (7,4), não apresenta fluorescência. Contudo quando na presença de NO esse composto é convertido à DAF-2T (triazolofluoresceína), que é fluorescente, como mostrado no esquema da Figura 57.

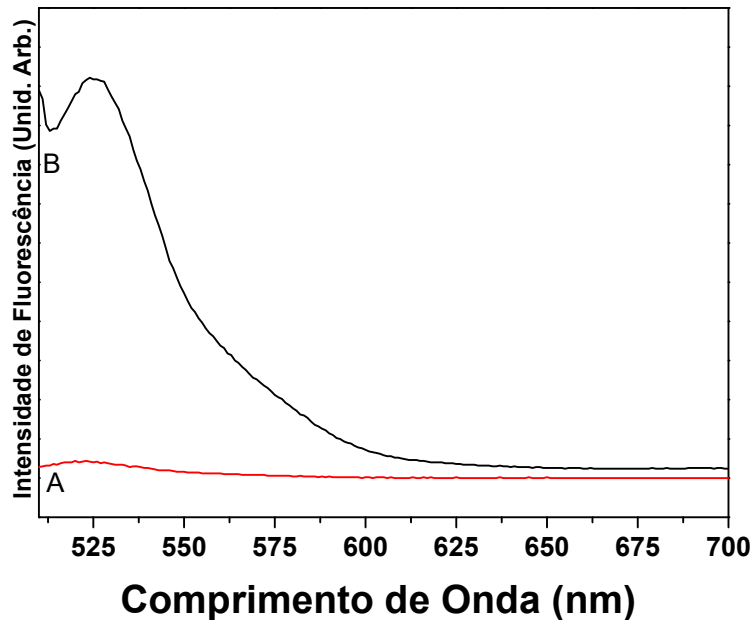
Figura 57. Processo de identificação de NO pela sonda DAF-2 DA.



Fonte: (Ramos, 2016).

Na Figura 58 é possível observar o surgimento de uma banda de emissão em 525 nm, característica da espécie DAF-2 T, confirmando que a rutênio-ftalocianina ainda possui o óxido nítrico coordenado ao rutênio central.

Figura 58. Espectro de emissão de fluorescência da sonda DAF-2 DA (A) antes da irradiação do sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO)$ a 377 nm e (B) após a irradiação do sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO)$ a 377 nm



Fonte: autora.

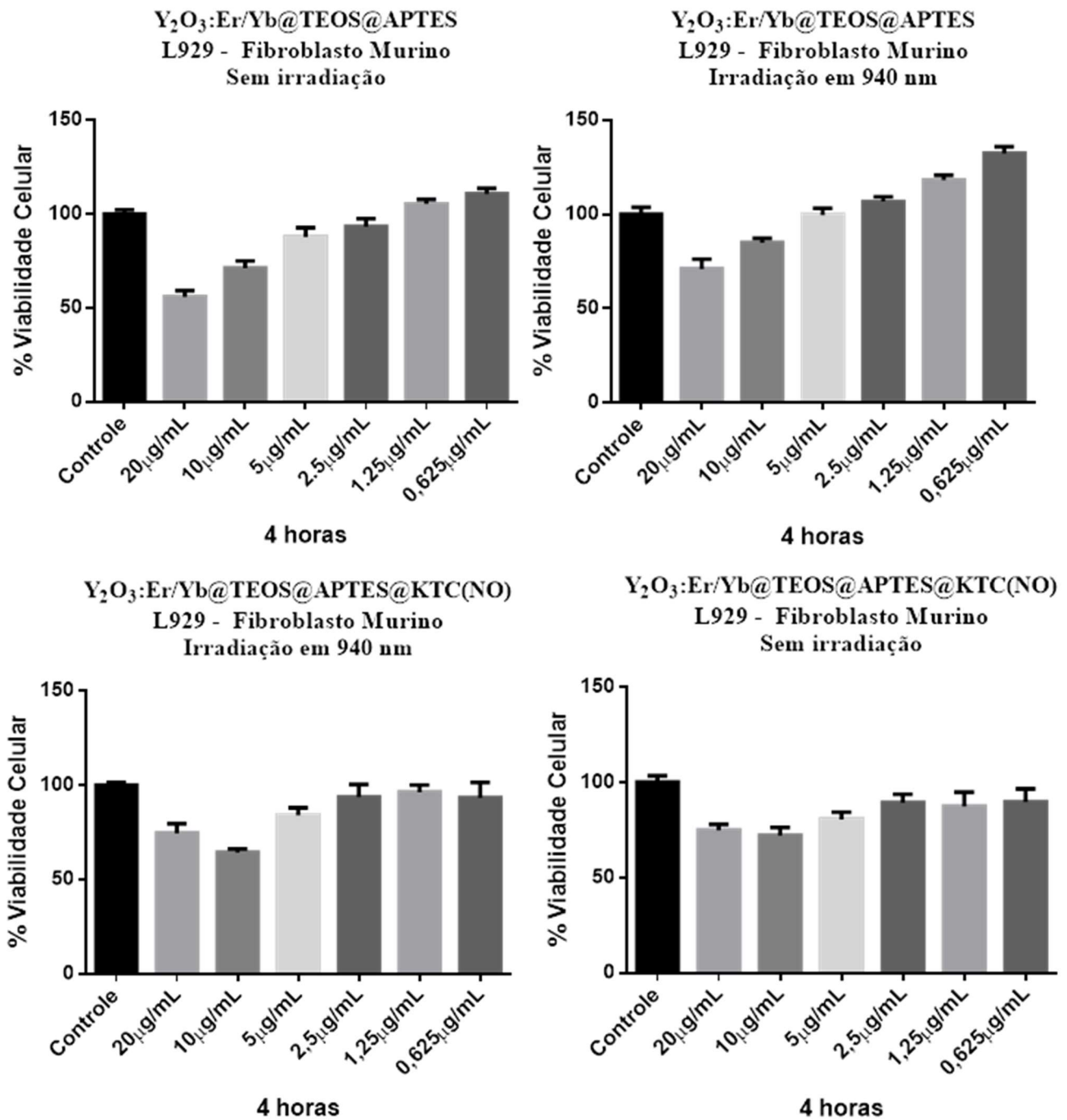
6.7. Ensaio de viabilidade celular

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados com caráter preliminar, com o objetivo de testar o método de aplicação de um tratamento em suspensão às células, bem como o andamento do ensaio em relação à resistência das células às nanopartículas. Além disso, realizou-se uma breve comparação, ainda que qualitativa, sobre os resultados obtidos para linhagens não tumorais e tumorais, e suas respectivas respostas ao tratamento sob irradiação em 940 nm ou sem irradiação. Para todos os ensaios, a dose de irradiação de $3,97 \text{ J/cm}^2$ foi calculada de acordo com a equação 13, na qual I representa a irradiância em J/s.cm^2 e t o tempo de irradiação em segundos, considerando que a irradiância total da placa é $3,31 \text{ mJ/cm}^2$.

$$\text{Dose} = I \times t$$

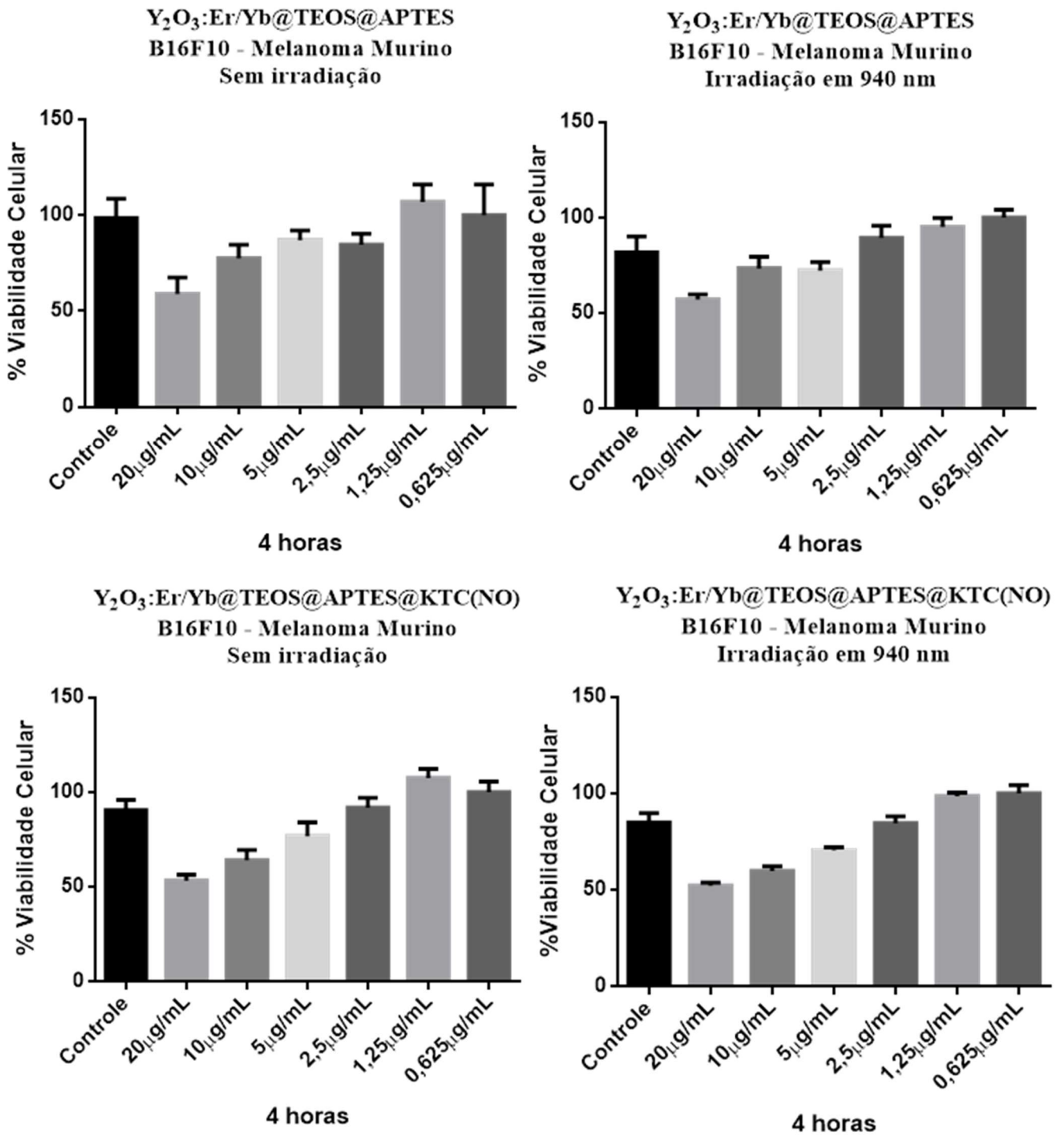
(13)

Figura 59. Ensaio preliminar do efeito citotóxico em células L929 para $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}@\text{TEOS}@\text{APTES}$ e $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}@\text{TEOS}@\text{APTES}@\text{KTC}(\text{NO})$ em diferentes concentrações, após 4 horas de incubação, na ausência e presença de estímulo luminoso.



Fonte: autora.

Figura 60. Ensaio preliminar do efeito citotóxico em células B16F10 para $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$ e $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO)$ em diferentes concentrações, após 4 horas de incubação, na ausência e presença de estímulo luminoso



Fonte: autora.

Na Figura 59 são apresentados os resultados preliminares de viabilidade celular para a linhagem não tumoral, L929 – fibroblasto murino. Para o tratamento contendo apenas a nanopartícula $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$, observa-se aumento na viabilidade celular principalmente para a concentração de $20\mu g/mL$. Este pode ser um indicativo que, em maiores concentrações, a presença da nanopartícula já é suficiente para causar morte, mas não impede a recuperação da célula. Quando aplicado o tratamento contendo o sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO)$, não se observa alterações significativas na viabilidade celular dos ensaios em ausência e presença de irradiação, salvo na concentração de $10\mu g/mL$, na qual se nota redução de 72% para 62%.

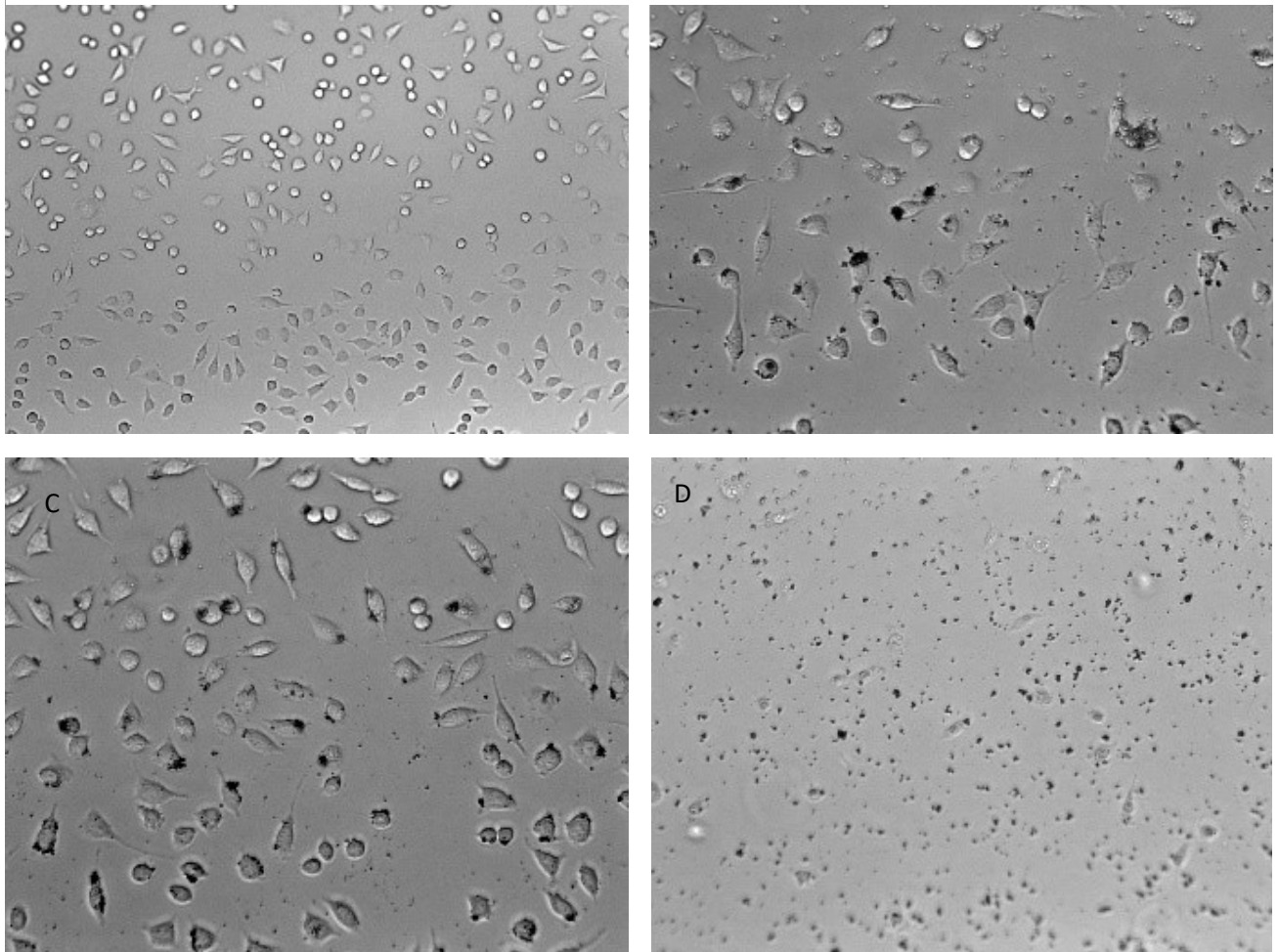
Na Figura 60 são apresentados os resultados preliminares de viabilidade celular para a linhagem tumoral, B16F10 – melanoma murino. Para o tratamento apenas com a nanopartícula de $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$, a concentração na qual se observou redução de viabilidade celular significativa foi a concentração de $5\mu g/mL$, que teve uma redução de 87% para 72% após a irradiação em 940 nm. Para o tratamento com o sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO)$, para as concentrações de 10 a $5\mu g/mL$ observou-se uma redução de até 5% na viabilidade celular.

Comparando-se os resultados nas linhagens tumoral e não-tumoral, principalmente quando tratadas com o sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO)$, observa-se uma redução da viabilidade celular foi até 20% maior para a linhagem tumoral, principalmente nas concentrações entre 20 e $5\mu g/mL$. Em concentrações menores, o efeito citotóxico do tratamento não foi observado e, por vezes, mostrou-se proliferativo. A partir destes resultados, é possível desenvolver o estudo citotóxico do sistema sintetizado, do qual se espera que o efeito seja maior em linhagens tumorais. Além disso, ao compará-lo com estudos contendo também o sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC$, espera-se que seja observada diferenças referentes ao tipo de espécie reativa liberada no meio celular, sendo elas apenas 1O_2 ou, além desta, NO.

6.8. Avaliação da localização celular por microscopia óptica

A idealização do sistema discutido nesta dissertação vem ao encontro de uma aplicação clínica atual, que busca a integração entre a imagem e a terapia. O termo 'teranóstico' é a visão geral desta aplicação. Considerando-se as várias possibilidades encontradas com o desenvolvimento destas nanopartículas, a imagem nos parece ser *suigeneris* desta feita, valendo-se de análise de imagem por confocal, foi possível detectar aspectos relacionados a sublocalização celular das nanopartículas (Figura 61).

Figura 61. Imagens obtidas durante o ensaio de viabilidade celular para (A) controle, (B) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$ após 4 horas de incubação, lavado com PBS, (C) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO)$ após 4 horas de incubação, lavado com PBS e (D) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO)$ aplicado imediatamente.



Fonte: autora.

Na imagem do controle, não foi aplicado nenhum tipo de tratamento. Nas imagens B e C observa-se a concentração do material aplicado ao redor das células, mas sem adentrá-las, aparentemente. Uma vez que os poços foram lavados duas vezes com PBS, acredita-se que as partículas, tanto livres quanto com a rutênio-ftalocianina, tenham se imobilizado na superfície da célula, por um mecanismo ainda não elucidado.

É notável a diferença na disposição das partículas quando as imagens B e C são comparadas à imagem D, na qual a aplicação do tratamento com o sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO)$ fora feita imediatamente antes a obtenção das imagens. Nesta, observa-se que não há acúmulo de material ao redor das células e que as partículas estão dispersas no meio de maneira uniforme.

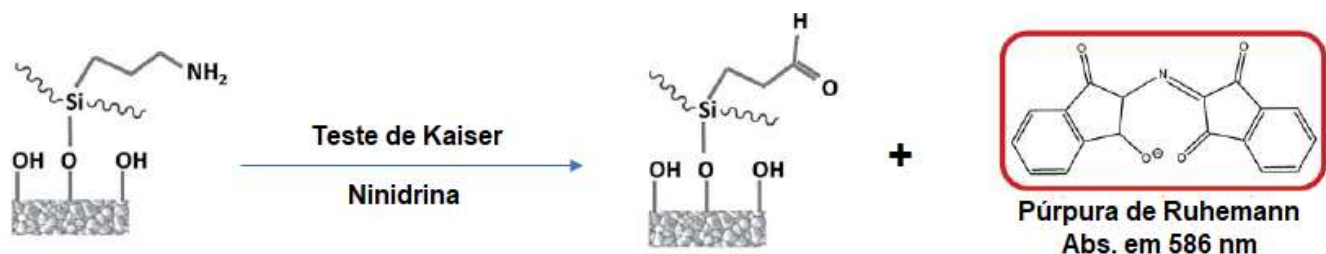
A partir destes resultados é possível direcionar estudos acerca da sublocalização celular dos tratamentos utilizados, com enfoque nos tipos de proteínas de membrana que possibilitariam esta ancoragem.

7. Dificuldades encontradas

7.1. Quantificação de grupos amino na superfície da nanopartícula.

A quantificação de grupos amino se baseia no chamado Teste de Kaiser, na qual ocorre a reação entre a ninidrina e os grupos amino presentes, resultando em um produto roxo, chamado Púrpura de Ruhemann. (Figura 62).

Figura 62. Reação de identificação de grupos amino pelo método de Kaiser.



Fonte: adaptado de (POLI *et al.*, 2014).

Foi feita uma curva analítica utilizando APTES e ninidrina (*Sigma-Aldrich*, 99%). Foi feita uma solução estoque de ninidrina de concentração $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ e uma solução estoque de APTES de concentração $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. Em tubos falcon de 15 mL colocou-se 1 mL da solução estoque de ninidrina, obtendo-se uma concentração de $0,33 \text{ mol.L}^{-1}$, volumes da solução de APTES de modo a obter uma faixa de concentrações entre 10^{-4} e $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ e completou-se o volume para 6 mL com etanol. Para a amostra $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}/\text{Yb}@TEOS@APTES$, adicionou-se ao tubo falcon 1 mL da solução estoque de ninidrina, 2,5 mg da amostra, completou-se o volume para 6 mL com etanol e a suspensão foi colocada em banho de ultrassom por 15 minutos. Os tubos foram colocados em banho-maria a 65°C por 1 hora e após este período as soluções foram analisadas por espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível ($\lambda_{\text{max}} = 586 \text{ nm}$)(POLI *et al.*, 2014).

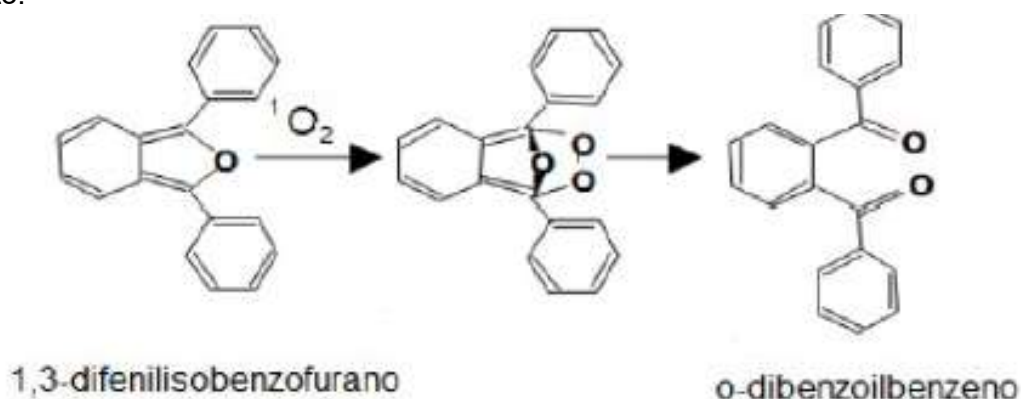
Após o procedimento descrito acima, muitas amostras tiveram seus volumes acertados para 6 mL novamente para que se realizasse as leituras em 586 nm sem que houvesse erro experimental causado pela evaporação do etanol durante o aquecimento. Ainda assim, os espectros obtidos não mostraram uma relação linear entre a concentração de APTES utilizado nas amostras para a construção da curva analítica e a absorvância destas no comprimento de onda indicado. Atribui-se este fato à utilização do APTES como padrão para construção da curva analítica, uma vez que a literatura reporta o teste de Kaiser com aminas lineares, como hexilamina, e o APTES apresenta outros grupos em sua estrutura, que também poderiam reagir com a ninidrina, formando subprodutos e prejudicando o resultado.

Posteriormente, repetiu-se o teste com butilamina. Porém, após o aquecimento, obteve-se uma solução amarelada, sem absorção na região desejada. O resultado inesperado foi atribuído à natureza da butilamina, pois uma vez que todos os reagentes utilizados foram os mesmos da tentativa anterior. Assim, acredita-se que a butilamina estivesse contaminada.

7.2. Estudo da produção de oxigênio singlete

Para a identificação da produção de oxigênio singlete realizou-se um experimento com a sonda 1,3 – difenilisobenzofurano (DPBF), o qual possui uma banda de absorção em 417 nm. O DPBF reage com o oxigênio singlete (Figura 63) gerado pela ftalocianina, levando à diminuição de sua banda característica.

Figura 63. Representação dos compostos oriundos da reação da sonda DPBF com o oxigênio singleto.



Fonte: adaptado de (CAINE *et al.*, 2002).

Em uma solução contendo 2,5 mg do sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC$, adicionou-se 10 μ L de uma solução estoque de DPBF (8,00 mM), com espectros realizados antes e após a adição da sonda. Então, a suspensão foi irradiada em 940 nm por 30 segundos, 1 minuto, 5 minutos e 10 minutos, com um espectro ao final de cada tempo de irradiação, sem que houvesse observação de redução da banda em 417 nm.

Uma vez que a ftalocianina imobilizada na superfície da nanopartícula se encontra em quantidade muito pequena, o fator limitante deste experimento se encontra na sensibilidade da técnica para detecção de oxigênio singleto. Por isso, optou-se pela utilização da sonda SOSG, mais sensível, a partir da qual se obteve um resultado satisfatório, que corroborou com o objetivo proposto pelo trabalho.

7.3. Quantificação de NO

Um dos equipamentos utilizados para quantificação da liberação de óxido nítrico é o sensor seletivo para NO amINO-700 (Innovative Instruments), com sensibilidade na faixa de 150 a 250 pA/nM a 20 mM. Este equipamento é capaz de quantificar o NO liberado através da alteração na corrente que passa pelo sensor, e é ideal para quantificações realizadas em solução. Para o sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO)$ obtém-se uma suspensão, o que dificulta a estabilização da linha de base da corrente. Para que se pudesse confirmar a presença de NO no sistema, uma vez que sua banda característica não foi observada no

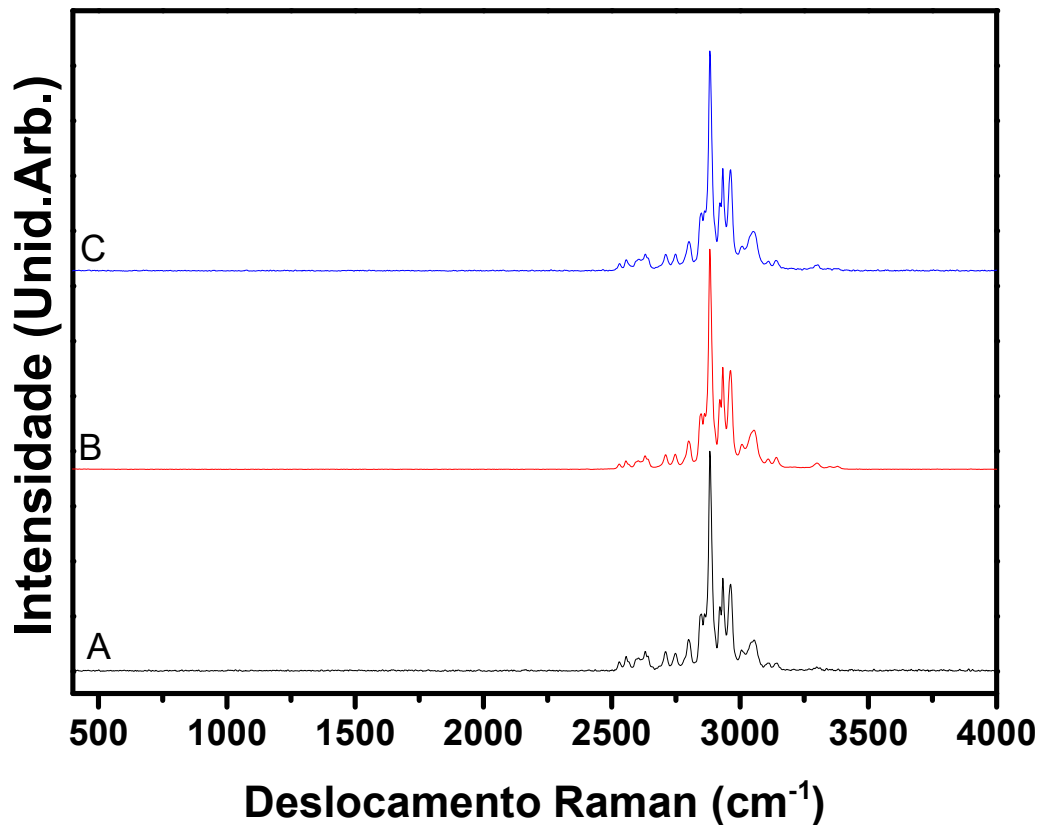
espectro vibracional, utilizou-se o método indireto de fluorescência com a sonda DAF-2 DA, geralmente utilizado para obtenção de imagens em meio celular por microscopia confocal.

7.4. Espectroscopia vibracional de espalhamento RAMAN

Uma vez que não foi possível observar bandas importantes para caracterização do sistema $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO_3)$, esta dificuldade foi atribuída ao fato de a sílica e os grupamentos amino serem excelentes osciladores no infravermelho. Buscando contornar este empecilho e utilizar uma técnica de extrema importância para caracterização do sistema sintetizado, foram realizadas análises por FT-RAMAN no Laboratório Multiusuários no Instituto de Química da Unesp de Araraquara, com o auxílio do técnico Alberto Alcício. A análise foi realizada com espectrômetro Raman RAMII (*Bruker*), que tem como fonte de excitação laser de 1064 nm, detector de Germânio e faixa de leitura de 1500 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 0,07 cm^{-1} .

A matriz da nanopartícula, por ser dopada com Er^{3+} e Yb^{3+} é excitada na mesma região, e as bandas observadas na análise são atribuídas à fluorescência da matriz, que, devido à sua intensidade, acabam por tornar as bandas de interesse, que deveriam ser observadas na região de 600 cm^{-1} , reduzidas à escala de ruído novamente.

Figura 64. Espectro vibracional de espalhamento Raman obtido para as amostra (A) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS$, (B) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES$ e (C) $Y_2O_3:Er/Yb@TEOS@APTES@KTC(NO)$.



Fonte: autora.

8. Considerações Finais e Perspectivas futuras

No âmbito de provar o conceito de transferência de energia de materiais fotônicos para o fotossensibilizador afim de produzir oxigênio singleto e liberar óxido nítrico, o sistema desenvolvido obteve sucesso, haja vista a produção de oxigênio singleto após a irradiação em 940 nm, considerando que a única espécie produtora de oxigênio singleto no sistema é a ftalocianina de rutênio, que absorve em 660 nm. Além disso, o fato de ensaios preliminares em meio celular demonstrarem uma tendência do sistema a se acumular ao redor das células, principalmente das células tumorais, indica que é possível trabalhar em propriedades estruturais com o intuito de aumentar a especificidade do material e, assim, do tratamento.

Futuramente, melhorias no sistema, como a diminuição do tamanho da partícula, poderão facilitar a caracterização da forma pela qual as ftalocianinas estão

imobilizadas na superfície das nanopartículas, pois assim se modifica a proporção de rutênio ftalocianina em relação à nanopartícula, principalmente em se tratando da sílica, excelente oscilador no infravermelho, que constitui-se a principal técnica de caracterização do sistema NCAF-RuPc formado. Além disso, métodos de quantificação direta de rendimento quântico de oxigênio singleto, como medidas de fosforescência serão de extrema importância para estudar a eficiência e potencial terapêutico do novo sistema obtido (MARI *et al.*, 2017).

9. Bibliografia

ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 4, p. 347-364, 2016.

ACKROYD, R. et al. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochemistry and photobiology**, v. 74, n. 5, p. 656-669, 2001.

AGOSTINIS, P. et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 4, p. 250-281, 2011.

AHN, M.-Y. et al. Intratumoral photodynamic therapy with newly synthesized Pheophorbide a in murine oral cancer. **Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics**, v. 25, n. 2, p. 295-304, 2017.

ALESSIO, E. et al. Ruthenium antimetastatic agents. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 15, p. 1525-1535, 2004.

ALI, I. et al. Platinum compounds: a hope for future cancer chemotherapy. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 13, n. 2, p. 296-306, 2013.

ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J. Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects. **Platinum Metals Review**, v. 45, n. 2, p. 62-69, 2001.

ALLEN, C. M.; SHARMAN, W. M.; VAN LIER, J. E. Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 5, n. 02, p. 161-169, 2001.

ALLISON, R. et al. Photodynamic therapy (PDT) for lung cancer. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 8, n. 3, p. 231-239, 2011.

ALLISON, R. R. et al. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 1, n. 1, p. 27-42, 2004.

ALMEIDA, V. D. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-29, 2005.

ARGUELLO, J. et al. Electrocatalytic applications of a sol-gel derived cobalt phthalocyanine-dispersed carbon-ceramic electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 617, n. 1, p. 45-52, 2008.

ARNAUD, S. et al. Patients' and surgeons' perspectives on axillary surgery for breast cancer. **European Journal of Surgical Oncology (EJSO)**, v. 30, n. 7, p. 735-743, 2004.

ASIM, S. A.; AHMED, S. Psoralen-ultraviolet a treatment with Psoralen-ultraviolet B therapy in the treatment of psoriasis. **Pakistan journal of medical sciences**, v. 29, n. 3, p. 758, 2013.

AUZEL, F. Upconversion and anti-stokes processes with f and d ions in solids. **Chemical reviews**, v. 104, n. 1, p. 139-174, 2004.

AUZEL, F.; PELLÉ, F. Concentration and excitation effects in multiphonon non-radiative transitions of rare-earth ions. **Journal of luminescence**, v. 69, n. 5-6, p. 249-255, 1996.

AZZOUZI, A. R. et al. **TOOKAD®** Soluble vascular-targeted photodynamic (VTP) therapy: determination of optimal treatment conditions and assessment of effects in patients with localised prostate cancer. **BJU international**, v. 112, n. 6, p. 766-774, 2013.

BARAN, T. M.; FOSTER, T. H. Intratumor photosensitizer injection for photodynamic therapy: Pre-clinical experience with methylene blue, Pc 4, and Photofrin. *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XXV*, 2016, International Society for Optics and Photonics. p.969418.

BARKER, H. E. et al. The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. **Nature reviews Cancer**, v. 15, n. 7, p. 409, 2015.

BARYSHNIKOV, G.; MINAEV, B.; ÅGREN, H. Theory and calculation of the phosphorescence phenomenon. **Chemical reviews**, v. 117, n. 9, p. 6500-6537, 2017.

BELLNIER, D. A. et al. Population pharmacokinetics of the photodynamic therapy agent 2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a in cancer patients. **Cancer research**, v. 63, n. 8, p. 1806-1813, 2003.

BELLNIER, D. A. et al. Mild skin photosensitivity in cancer patients following injection of Photochlor (2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a; HPPH) for photodynamic therapy. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 57, n. 1, p. 40-45, 2006.

BELLOU, S. et al. Anti-angiogenesis in cancer therapy: Hercules and hydra. **Cancer letters**, v. 338, n. 2, p. 219-228, 2013.

BETZ, C. S. et al. Optimization of treatment parameters for Foscan®-PDT of basal cell carcinomas. **Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery**, v. 40, n. 5, p. 300-311, 2008.

BINI, R. A. et al. Synthesis and functionalization of magnetite nanoparticles with different amino-functional alkoxy silanes. **Journal of magnetism and magnetic materials**, v. 324, n. 4, p. 534-539, 2012.

BONNETT, R.; BERENBAUM, M.; EFAMOL HOLDINGS PLC., U. Preparation of dihydro and tetrahydro derivatives of porphyrins for cancer phototherapy. **Eur. Pat. Appl**, 1989.

BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 206-212, 2012.

BUYTAERT, E.; DEWAELE, M.; AGOSTINIS, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1776, n. 1, p. 86-107, 2007.

BYRNE, G.; LINSTED, R.; LOWE, A. 213. Phthalocyanines. Part II. The preparation of phthalocyanine and some metallic derivatives from o-cyanobenzamide and phthalimide. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 1017-1022, 1934.

- CAINE, M. A. et al. The inhibition of triphenylmethane primary dye fading in carbonless copying paper systems by singlet oxygen quenching bis (dithiocarbamate) nickel (II) complexes. **Dyes and pigments**, v. 52, n. 1, p. 55-65, 2002.
- CALIXTO, G. et al. Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: a review. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 342, 2016.
- CALS-GRIERSON, M.-M.; ORMEROD, A. Nitric oxide function in the skin. **Nitric oxide**, v. 10, n. 4, p. 179-193, 2004.
- CANNAS, C. et al. CoFe₂O₄ and CoFe₂O₄/SiO₂ core/shell nanoparticles: magnetic and spectroscopic study. **Chemistry of Materials**, v. 22, n. 11, p. 3353-3361, 2010.
- CAPPER, C. P.; RAE, J. M.; AUCHUS, R. J. The metabolism, analysis, and targeting of steroid hormones in breast and prostate cancer. **Hormones and Cancer**, v. 7, n. 3, p. 149-164, 2016.
- CARBINATTO, F. M. et al. Evaluation of PpIX formation in Cervical Intraepithelial Neoplasia I (CIN) using widefield fluorescence images. Optics and Biophotonics in Low-Resource Settings II, 2016, International Society for Optics and Photonics. p.96990Z.
- CARO, P.; SAWYER, J.; EVNING, L. The infrared spectra of rare earth carbonates. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy**, v. 28, n. 6, p. 1167-1173, 1972.
- CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part three—photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 2, n. 2, p. 91-106, 2005.
- CHATTERJEE, D. K.; RUFAlHAH, A. J.; ZHANG, Y. Upconversion fluorescence imaging of cells and small animals using lanthanide doped nanocrystals. **Biomaterials**, v. 29, n. 7, p. 937-943, 2008.
- CHEN, B.; ROSKAMS, T.; DE WITTE, P. A. Antivascular Tumor Eradication by Hypericin-mediated Photodynamic Therapy¶. **Photochemistry and photobiology**, v. 76, n. 5, p. 509-513, 2002.
- CHEN, H. H.; KUO, M. T. Improving radiotherapy in cancer treatment: promises and challenges. **Oncotarget**, v. 8, n. 37, p. 62742, 2017.
- CHILAKAMARTHI, U.; GIRIBABU, L. Photodynamic therapy: past, present and future. **The Chemical Record**, v. 17, n. 8, p. 775-802, 2017.
- CIUFFI, K. J. et al. Synthesis of fluorinated metalloporphyrinosilica imprinted with templates through sol-gel process. **Journal of non-crystalline solids**, v. 273, n. 1-3, p. 100-108, 2000.
- CLAESSENS, C. G.; HAHN, U.; TORRES, T. Phthalocyanines: From outstanding electronic properties to emerging applications. **The Chemical Record**, v. 8, n. 2, p. 75-97, 2008.
- CLARKE, R. E.; FORD, P. C. Benzonitrile and acetonitrile complexes of ruthenium amines. **Inorganic chemistry**, v. 9, n. 2, p. 227-235, 1970.
- CUI, X. et al. Water-soluble sulfonate porphyrin functionalized hyaluronic acid with comb-like structure: Potential photosensitizers for photodynamic therapy. **Dyes and Pigments**, v. 164, p. 237-243, 2019.

- CULOTTA, E.; KOSHLAND JR, D. E. NO news is good news. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1862-1866, 1992.
- DA SILVA, C. et al. Thermal effect on multiphonon-assisted anti-Stokes excited upconversion fluorescence emission in Yb³⁺-sensitized Er³⁺-doped optical fiber. **Applied Physics B**, v. 70, n. 2, p. 185-188, 2000.
- DA SILVA, R. S.; DE LIMA, R. G.; DE PAULA MACHADO, S. Design, reactivity, and biological activity of ruthenium nitrosyl complexes. In: (Ed.). **Advances in Inorganic Chemistry**: Elsevier, v.67, 2015. p.265-294. ISBN 0898-8838.
- DAVOLOS, M. R. et al. Solvothermal method to obtain europium-doped yttrium oxide. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 171, n. 1-2, p. 268-272, 2003.
- DE LA TORRE, G. et al. Role of structural factors in the nonlinear optical properties of phthalocyanines and related compounds. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 9, p. 3723-3750, 2004.
- DE LIMA, R. G. et al. Ultradeformable liposome loaded with zinc phthalocyanine and [Ru (NH₂)(tpy) NO] ³⁺ for photodynamic therapy by topical application. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 2017.
- DE MAYRINCK, C. et al. Spherical-shaped Y₂O₃: Eu³⁺ nanoparticles with intense photoluminescence emission. **Ceramics International**, v. 41, n. 1, p. 1189-1195, 2015.
- DENNY, W. A. Hypoxia-activated prodrugs in cancer therapy: progress to the clinic. **Future Oncology**, v. 6, n. 3, p. 419-428, 2010.
- DEROSA, M. C.; CRUTCHLEY, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 233, p. 351-371, 2002.
- DETTY, M. R.; GIBSON, S. L.; WAGNER, S. J. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Journal of medicinal chemistry**, v. 47, n. 16, p. 3897-3915, 2004.
- DIEKE, G. H. Spectra and Energy Levels of Rare Earth Ions in Crystals. 1968.
- DIXON, S. J.; STOCKWELL, B. R. The role of iron and reactive oxygen species in cell death. **Nature chemical biology**, v. 10, n. 1, p. 9, 2014.
- DOUGAN, M.; DRANOFF, G. Immune therapy for cancer. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 83-117, 2009.
- DOUGHERTY, T. J. Activated dyes as antitumor agents. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 52, n. 4, p. 1333-1336, 1974.
- _____. A brief history of clinical photodynamic therapy development at Roswell Park Cancer Institute. **Journal of clinical laser medicine & surgery**, v. 14, n. 5, p. 219-221, 1996.
- DOUGHERTY, T. J. et al. Photodynamic therapy. **JNCI: Journal of the national cancer institute**, v. 90, n. 12, p. 889-905, 1998.
- DWIVEDI, S. et al. Molecular Diagnosis in Ovarian Carcinoma. In: (Ed.). **Molecular Diagnostics in Cancer Patients**: Springer, 2019. p.323-341.

- ENGLADE-FRANKLIN, L. E. et al. Surface-directed synthesis of erbium-doped yttrium oxide nanoparticles within organosilane zeptoliter containers. **ACS applied materials & interfaces**, v. 6, n. 18, p. 15942-15949, 2014.
- FENG, J. et al. Functionalized europium oxide nanoparticles used as a fluorescent label in an immunoassay for atrazine. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 19, p. 5282-5286, 2003.
- FERREIRA, J. T. et al. PEG-containing ruthenium phthalocyanines as photosensitizers for photodynamic therapy: synthesis, characterization and in vitro evaluation. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, n. 29, p. 5862-5869, 2017.
- FIGGE, F. H.; WEILAND, G. S.; MANGANIELLO, L. O. Cancer detection and therapy. Affinity of neoplastic, embryonic, and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 68, n. 3, p. 640-641, 1948.
- FITZPATRICK, T. B.; PATHAK, M. Part IV: Basic Considerations of the Psoralens: Historical Aspects of Methoxsalen and Other Furocoumarins. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 32, n. 2, p. 229-231, 1959.
- FORD, P. C.; LAVERMAN, L. E. Reaction mechanisms relevant to the formation of iron and ruthenium nitric oxide complexes. **Coordination chemistry reviews**, v. 249, n. 3-4, p. 391-403, 2005.
- FOWLER JR, F. J. et al. Effect of radical prostatectomy for prostate cancer on patient quality of life: results from a Medicare survey. **Urology**, v. 45, n. 6, p. 1007-1015, 1995.
- FRANCISCO, M. S. P.; GUSHIKEM, Y. Synthesis and characterization of SiO₂-Nb₂O₅ systems prepared by the sol-gel method: structural stability studies. **Journal of Materials Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 2552-2558, 2002.
- FRANCO, L. P. et al. Photoreactivity of a Quantum Dot-Ruthenium Nitrosyl Conjugate. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 118, n. 51, p. 12184-12191, 2014.
- GARCÍA-CHÍAS, B. et al. Prevalence of oral side effects of chemotherapy and its relationship with periodontal risk: a cross sectional study. **Supportive Care in Cancer**, p. 1-12, 2019.
- GOLD, M. H. Therapeutic and Aesthetic Uses of Photodynamic Therapy Part five of a five-part series: ALA-PDT and MAL-PDT What Makes Them Different. **The Journal of clinical and aesthetic dermatology**, v. 2, n. 2, p. 44, 2009.
- GOLDNER, P.; PELLÉ, F. Site selection and up-conversion studies in erbium and ytterbium doped CsCdBr₃. **Journal of luminescence**, v. 55, n. 4, p. 197-207, 1993.
- GOLLMER, A. et al. Singlet Oxygen Sensor Green®: photochemical behavior in solution and in a mammalian cell. **Photochemistry and photobiology**, v. 87, n. 3, p. 671-679, 2011.
- GOLSHAN, M. et al. Impact of neoadjuvant chemotherapy in stage II-III triple negative breast cancer on eligibility for breast-conserving surgery and breast conservation rates: surgical results from CALGB 40603 (Alliance). **Annals of surgery**, v. 262, n. 3, p. 434, 2015.
- GOMES, A. T.; NEVES, M. G.; CAVALEIRO, J. A. Cancer, photodynamic therapy and porphyrin-type derivatives. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 1, p. 993-1026, 2018.

- GREEN, D. et al. Size, volume fraction, and nucleation of Stober silica nanoparticles. **Journal of colloid and interface science**, v. 266, n. 2, p. 346-358, 2003.
- GREGORY, P. Industrial applications of phthalocyanines. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, 2012.
- GUPTA, S.; AHMAD, N.; MUKHTAR, H. Involvement of Nitric Oxide during Phthalocyanine (Pc4) Photodynamic Therapy-mediated Apoptosis. **Cancer research**, v. 58, n. 9, p. 1785-1788, 1998.
- HANSEL, T. T. et al. The safety and side effects of monoclonal antibodies. **Nature reviews Drug discovery**, v. 9, n. 4, p. 325, 2010.
- HARRIS, W. P. et al. Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. **Nature Reviews Urology**, v. 6, n. 2, p. 76, 2009.
- HARTINGER, C. G. et al. KP1019, a new redox-active anticancer agent—Preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients. **Chemistry & biodiversity**, v. 5, n. 10, p. 2140-2155, 2008.
- HEARST, J. E. Psoralen photochemistry. **Annual review of biophysics and bioengineering**, v. 10, n. 1, p. 69-86, 1981.
- HENDERSON, P. General geochemical properties and abundances of the rare earth elements. In: (Ed.). **Developments in geochemistry**: Elsevier, v.2, 1984. p.1-32. ISBN 0921-3198.
- HILLEMANN, P.; EINSTEIN, M. H.; IVERSEN, O. E. Topical hexaminolevulinic acid photodynamic therapy for the treatment of persistent human papilloma virus infections and cervical intraepithelial neoplasia. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 24, n. 2, p. 273-281, 2015.
- HOCKEL, M.; VAUPEL, P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, n. 4, p. 266-276, 2001.
- ISHIZUKA, M. et al. Novel development of 5-aminolevulinic acid (ALA) in cancer diagnoses and therapy. **International immunopharmacology**, v. 11, n. 3, p. 358-365, 2011.
- JAKUBASZEK, M. et al. Mechanisms of action of Ru (II) polypyridyl complexes in living cells upon light irradiation. **Chemical Communications**, v. 54, n. 93, p. 13040-13059, 2018.
- JONES, P. A.; ISSA, J.-P. J.; BAYLIN, S. Targeting the cancer epigenome for therapy. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 10, p. 630, 2016.
- JOUBERT, M.-F. Photon avalanche upconversion in rare earth laser materials. **Optical materials**, v. 11, n. 2-3, p. 181-203, 1999.
- JUNG, J. S. et al. Rectangular nanotubes of copper phthalocyanine: Application to a single nanotube transistor. **Chemistry of Materials**, v. 22, n. 7, p. 2219-2225, 2010.
- KASUYA, K. et al. Novel photodynamic therapy against biliary tract carcinoma using mono-l-aspartyl chlorine e6: basic evaluation for its feasibility and efficacy. **Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences**, v. 17, n. 3, p. 313-321, 2010.

KAWECKI, A.; KRAJEWSKI, R. Follow-up in patients treated for head and neck cancer. **memo-Magazine of European Medical Oncology**, v. 7, n. 2, p. 87-91, 2014.

KHACHATOURIAN, A. M. et al. Microwave assisted synthesis of monodispersed Y₂O₃ and Y₂O₃: Eu³⁺ particles. **Ceramics International**, v. 41, n. 2, p. 2006-2014, 2015.

KNOLL, J. D.; TURRO, C. Control and utilization of ruthenium and rhodium metal complex excited states for photoactivated cancer therapy. **Coordination chemistry reviews**, v. 282, p. 110-126, 2015.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **nature**, v. 256, n. 5517, p. 495, 1975.

KOUDINOVA, N. V. et al. Photodynamic therapy with Pd-bacteriopheophorbide (TOOKAD): Successful in vivo treatment of human prostatic small cell carcinoma xenografts. **International journal of cancer**, v. 104, n. 6, p. 782-789, 2003.

KRAMMER, B.; PLAETZER, K. ALA and its clinical impact, from bench to bedside. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 7, n. 3, p. 283-289, 2008.

KURKJIAN, N. et al. Chemotherapy, immunotherapy, and psychotropic use in cancer patients: A review of psychiatric side effects. **Psychiatric Annals**, v. 47, n. 4, p. 200-205, 2017.

LANGE, M. et al. Urinary dysfunction after rectal cancer treatment is mainly caused by surgery. **British Journal of Surgery: Incorporating European Journal of Surgery and Swiss Surgery**, v. 95, n. 8, p. 1020-1028, 2008.

LE GRAZIE, M. et al. Chemotherapy for hepatocellular carcinoma: The present and the future. **World journal of hepatology**, v. 9, n. 21, p. 907, 2017.

LECHEVALLIER, S. V. et al. APTES-modified RE₂O₃: Eu³⁺ luminescent beads: structure and properties. **Langmuir**, v. 28, n. 8, p. 3962-3971, 2012.

LECHNER, M.; LIRK, P.; RIEDER, J. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. *Seminars in cancer biology*, 2005, Elsevier. p.277-289.

LEVER, A. P. The phthalocyanines. In: (Ed.). **Advances in Inorganic Chemistry and Radiochemistry**: Elsevier, v.7, 1965. p.27-114. ISBN 0065-2792.

LI, X. et al. Phthalocyanines as medicinal photosensitizers: Developments in the last five years. **Coordination Chemistry Reviews**, 2017.

LIN, J.; ZHENG, Y.; WANG, Q. Slow release realized in 40 min? Assembly of lanthanide hydroxycarbonates and oxycarbonates based on multiple irradiations. **Journal of nanoparticle research**, v. 16, n. 8, p. 2552, 2014.

LINSTEAD, R. 212. Phthalocyanines. Part I. A new type of synthetic colouring matters. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 1016-1017, 1934.

LINSTEAD, R.; ROBERTSON, J. M. 383. The stereochemistry of metallic phthalocyanines. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 1736-1738, 1936.

LIPSON, R. L.; BALDES, E. J.; OLSEN, A. M. The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 26, n. 1, p. 1-11, 1961.

LO, P.-C. et al. Preparation and photophysical properties of halogenated silicon (IV) phthalocyanines substituted axially with poly (ethylene glycol) chains. **Tetrahedron letters**, v. 44, n. 9, p. 1967-1970, 2003.

LORUSSO, D. et al. Patients' perception of chemotherapy side effects: Expectations, doctor-patient communication and impact on quality of life-An Italian survey. **European journal of cancer care**, v. 26, n. 2, p. e12618, 2017.

MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 5, n. 02, p. 105-129, 2001.

MAITI, R. Metronomic chemotherapy. **Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics**, v. 5, n. 3, p. 186, 2014.

MALTA, O. Theoretical crystal-field parameters for the YOCl: Eu³⁺ system. A simple overlap model. **Chemical Physics Letters**, v. 88, n. 3, p. 353-356, 1982.

MANG, T. S. et al. Photobleaching of porphyrins used in photodynamic therapy and implications for therapy. **Photochemistry and photobiology**, v. 45, n. 4, p. 501-506, 1987.

MARI, C.; RUBBIANI, R.; GASSER, G. Biological evaluation of nitrile containing Ru (II) polypyridyl complexes as potential photodynamic therapy agents. **Inorganica Chimica Acta**, v. 454, p. 21-26, 2017.

MARKERT, C. L. Neoplasia: a disease of cell differentiation. **Cancer research**, v. 28, n. 9, p. 1908-1914, 1968.

MARTINS, T. J. **Complexos rutênio-ftalocianinas como candidatos a fotossensibilizadores: estudos fotoquímicos, fotofísicos, fotobiológicos e avaliação do efeito teranóstico da interação com pontos quânticos**. 2018. Universidade de São Paulo

MÁXIMO, L. N. C.; SILVA, R. S. D. Avaliação da interação entre pontos quânticos e complexos de rutênio. Aspectos fotofísicos e fotoquímicos relacionados à produção de óxido nítrico. 2018.

MAZZONE, G. et al. Can expanded bacteriochlorins act as photosensitizers in photodynamic therapy? Good news from density functional theory computations. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 288, 2016.

MEYER, T. J.; GODWIN, J. B. Preparation of ruthenium nitrosyl complexes containing 2, 2'-bipyridine and 1, 10-phenanthroline. **Inorganic Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 471-474, 1971.

MIKI, Y. et al. Photodynamic therapy using talaporfin sodium induces concentration-dependent programmed necroptosis in human glioblastoma T98G cells. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 6, p. 1739-1745, August 01 2015.

MIKI, Y. et al. Photodynamic therapy in combination with talaporfin sodium induces mitochondrial apoptotic cell death accompanied with necrosis in glioma cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, p. b12-00567, 2012.

- MISHRA, K. et al. Frequency upconversion in Er³⁺ doped Y₂O₃ nanophosphor: Yb³⁺ sensitization and tailoring effect of Li⁺ ion. **Materials Research Bulletin**, v. 48, n. 10, p. 4307-4313, 2013.
- MOHAMMED, H. et al. Progesterone receptor modulates ER α action in breast cancer. **Nature**, v. 523, n. 7560, p. 313, 2015.
- MONRO, S. et al. Transition metal complexes and photodynamic therapy from a tumor-centered approach: Challenges, opportunities, and highlights from the development of TLD1433. **Chemical reviews**, v. 119, n. 2, p. 797-828, 2018.
- MOREIRA, L. M. et al. Photodynamic therapy: porphyrins and phthalocyanines as photosensitizers. **Australian journal of chemistry**, v. 61, n. 10, p. 741-754, 2008.
- MORTON, C. Methyl aminolevulinate (Metvix[®]) photodynamic therapy-practical pearls. **Journal of dermatological treatment**, v. 14, n. sup3, p. 23-26, 2003.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MROZ, P. et al. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. **Cancers**, v. 3, n. 2, p. 2516-2539, 2011.
- MUNGUÍA-CORTÉS, L. et al. APTES-Functionalization of SBA-15 Using Ethanol or Toluene: Textural Characterization and Sorption Performance of Carbon Dioxide. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 61, n. 4, p. 273-281, 2017.
- MURTHY, R. et al. Electron beam radiotherapy for the management of recurrent extensive ocular surface squamous neoplasia with orbital extension. **Indian journal of ophthalmology**, v. 63, n. 8, p. 672, 2015.
- NAYAK, C. S. Photodynamic therapy in dermatology. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, v. 71, n. 3, p. 155, 2005.
- NDAGI, U.; MHLONGO, N.; SOLIMAN, M. E. Metal complexes in cancer therapy—an update from drug design perspective. **Drug design, development and therapy**, v. 11, p. 599, 2017.
- NEGRI, L. B. **Complexos rutênio-ftalocianinas como fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica. Aspectos fotoquímicos e fotobiológicos**. 2015. Universidade de São Paulo
- NEGRI, L. B. et al. Nitric oxide derivative ruthenium compounds as NO-based chemotherapeutic and phototherapeutic agents. In: (Ed.). **Nitric Oxide Donors**: Elsevier, 2017. p.1-24.
- O'CONNOR, A. E.; GALLAGHER, W. M.; BYRNE, A. T. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. **Photochemistry and photobiology**, v. 85, n. 5, p. 1053-1074, 2009.
- OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 39, n. 1, p. 1-18, 1997.
- OHSHIMA, H. Genetic and epigenetic damage induced by reactive nitrogen species: implications in carcinogenesis. **Toxicology letters**, v. 140, p. 99-104, 2003.

- OLIVEIRA, L. F. D. et al. Tailored silica nanoparticles surface to increase drug load and enhance bactericidal response. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 9, p. 1715-1724, 2017.
- ORMOND, A.; FREEMAN, H. Dye sensitizers for photodynamic therapy. **Materials**, v. 6, n. 3, p. 817-840, 2013.
- OUGH, E. A.; STILLMAN, M. J. Analysis of the absorption and magnetic circular dichroism spectra of iron (II) phthalocyanine. **Inorganic Chemistry**, v. 33, n. 3, p. 573-583, 1994.
- PARODI, M. B. et al. Photosensitizers and Photodynamic Therapy: Verteporfin. In: (Ed.). **Retinal Pharmacotherapeutics**: Karger Publishers, v.55, 2016. p.330-336.
- PELICANO, H.; CARNEY, D.; HUANG, P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. **Drug resistance updates**, v. 7, n. 2, p. 97-110, 2004.
- PEREIRA, R. R. "Estudo morfológico, estrutural e espectroscópico de nanopartículas luminescentes a base de YOHCO_3 , Y_2O_3 , Y_2SiO_5 dopadas com Terras Raras com e sem recobrimento de SiO_2 ". 2016. 161 Departamento de Química - FFCLRP, Universidade de São Paulo
- PÉREZ-HERRERO, E.; FERNÁNDEZ-MEDARDE, A. Advanced targeted therapies in cancer: drug nanocarriers, the future of chemotherapy. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 93, p. 52-79, 2015.
- PHILLIPS, R. M. Targeting the hypoxic fraction of tumours using hypoxia-activated prodrugs. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 77, n. 3, p. 441-457, 2016.
- POLÁKOVÁ, L. et al. Electrospun nanofibers for local anticancer therapy: Review of in vivo activity. **International journal of pharmaceutics**, 2019.
- POLI, E. et al. Efficient quantification of primary amine functions grafted onto apatite ceramics by using two UV-Vis spectrophotometric methods. **Analytical Methods**, v. 6, n. 24, p. 9622-9627, 2014.
- POLICARD, A. A study on the available aspects of experimental tumours examined by Wood's light. **Comptes Rendus Des Seances De La Societe De Biologie Et De Ses Filiales**, v. 91, n. Pt. 2, p. 1423-1424, 1924.
- POLLNAU, M. et al. Power dependence of upconversion luminescence in lanthanide and transition-metal-ion systems. **Physical Review B**, v. 61, n. 5, p. 3337, 2000.
- PRIMO, F. L. et al. In vitro studies of cutaneous retention of magnetic nanoemulsion loaded with zinc phthalocyanine for synergic use in skin cancer treatment. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 320, n. 14, p. e211-e214, 2008.
- RAAB, O. On the effect of fluorescent substances on infusoria. **Z Biol**, v. 39, p. 524-6, 1900.
- RAHMAN, I.; JAFARZADEH, M.; SIPAUT, C. Synthesis of organo-functionalized nanosilica via a co-condensation modification using γ -aminopropyltriethoxysilane (APTES). **Ceramics International**, v. 35, n. 5, p. 1883-1888, 2009.
- RAMOS, L. C. B. **Avaliação do efeito sinérgico de óxido nítrico e oxigênio singlete produzido por complexos rutênio-ftalocianinas em células tumorais: estudos fotoquímicos, fotofísicos e medida**

de atividade citotóxica in vitro. 2016. 194 Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo

RASSMUSSEN-TAXDAL, D.; WARD, G. E.; FIGGE, F. H. Fluorescence of human lymphatic and cancer tissues following high doses of intravenous hematoporphyrin. **Cancer**, v. 8, n. 1, p. 78-81, 1955.

REYA, T. et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **nature**, v. 414, n. 6859, p. 105, 2001.

RICHTER-ADDO, G. B.; LEGZDINS, P.; BURSTYN, J. **Introduction: nitric oxide chemistry:** ACS Publications 2002.

SAAVEDRA, R. et al. Modulation of biodistribution, pharmacokinetics, and photosensitivity with the delivery vehicle of a bacteriochlorin photosensitizer for photodynamic therapy. **ChemMedChem**, v. 9, n. 2, p. 390-398, 2014.

SAKAMOTO, K.; OHNO-OKUMURA, E. Syntheses and functional properties of phthalocyanines. **Materials**, v. 2, n. 3, p. 1127-1179, 2009.

SAUAIA, M. G. et al. Photoinduced NO release by visible light irradiation from pyrazine-bridged nitrosyl ruthenium complexes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 48, p. 14718-14719, 2003.

SAUER, T.; CASERI, W.; WEGNER, G. Novel phthalocyanine polymers for applications in optical devices. **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v. 183, n. 1, p. 387-402, 1990.

SCHMIDT-ERFURTH, U.; HASAN, T. Mechanisms of action of photodynamic therapy with verteporfin for the treatment of age-related macular degeneration. **Survey of ophthalmology**, v. 45, n. 3, p. 195-214, 2000.

SEIFERTH, O. et al. IR investigations of CO₂ adsorption on chromia surfaces: Cr₂O₃ (0001)/Cr (110) versus polycrystalline α -Cr₂O₃. **Surface science**, v. 421, n. 1-2, p. 176-190, 1999.

SENGE, M. O.; BRANDT, J. C. Temoporfin (Foscan[®], 5, 10, 15, 20-tetra (m-hydroxyphenyl) chlorin)—a second-generation photosensitizer. **Photochemistry and photobiology**, v. 87, n. 6, p. 1240-1296, 2011.

SIBATA, C. et al. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 8, p. 869-880, 2000.

SINGH, S.; GUPTA, A. K. Nitric oxide: role in tumour biology and iNOS/NO-based anticancer therapies. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 67, n. 6, p. 1211-1224, 2011.

SINGH, S. et al. Monoclonal antibodies: a review. **Current clinical pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 85-99, 2018.

SOHN, S. et al. Synthesis and characterization of near-monodisperse yttria particles by homogeneous precipitation method. **Powder Technology**, v. 142, n. 2-3, p. 136-153, 2004.

SONGUN, I. et al. Surgical treatment of gastric cancer: 15-year follow-up results of the randomised nationwide Dutch D1D2 trial. **The lancet oncology**, v. 11, n. 5, p. 439-449, 2010.

SORTINO, S. Light-controlled nitric oxide delivering molecular assemblies. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 8, p. 2903-2913, 2010.

SPIKES, J. D.; BOMMER, J. C. Photosensitizing properties of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6): a candidate sensitizer for the photodynamic therapy of tumors. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 17, n. 2, p. 135-143, 1993.

STOLIK, S. et al. Measurement of the penetration depths of red and near infrared light in human "ex vivo" tissues. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 57, n. 2-3, p. 90-93, 2000.

TEDESCO, A. C.; ROTTA, J. C.; LUNARDI, C. N. Synthesis, Photophysical and Photochemical Aspects of Phthalocyanines for Photodynamic Therapy. **Current Organic Chemistry**, v. 7, n. 2, p. 187-196, // 2003.

TIDY, J. et al. Chemotherapy for resistant or recurrent gestational trophoblastic neoplasia. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 1, 2016.

TOGNILOLO, V.; DA SILVA, R. S.; TEDESCO, A. C. Photo-induced nitric oxide release from chlorobis (2, 2'-bipyridine) nitrosylruthenium (II) in aqueous solution. **Inorganica Chimica Acta**, v. 316, n. 1-2, p. 7-12, 2001.

TOYOKUNI, S. et al. Persistent oxidative stress in cancer. **FEBS letters**, v. 358, n. 1, p. 1-3, 1995.

TUTTLE, T. M. et al. Increasing use of contralateral prophylactic mastectomy for breast cancer patients: a trend toward more aggressive surgical treatment. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 33, p. 5203-5209, 2007.

VALEUR, B. Molecular fluorescence. **digital Encyclopedia of Applied Physics**, p. 477-531, 2003.

VAN LIER, J. E.; SPIKES, J. D. The chemistry, photophysics and photosensitizing properties of phthalocyanines. Ciba Foundation Symposium 146-Photosensitizing Compounds: Their Chemistry, Biology and Clinical Use: Photosensitizing Compounds: Their Chemistry, Biology and Clinical Use: Ciba Foundation Symposium 146, 2007, Wiley Online Library. p.17-39.

VAN STRATEN, D. et al. Oncologic photodynamic therapy: basic principles, current clinical status and future directions. **Cancers**, v. 9, n. 2, p. 19, 2017.

VIRK, H. S. History of luminescence from ancient to modern times. Defect and Diffusion Forum, 2015, Trans Tech Publ. p.1-13.

WANG, K. K. H. et al. Simulations of measured photobleaching kinetics in human basal cell carcinomas suggest blood flow reductions during ALA-PDT. **Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery**, v. 41, n. 9, p. 686-696, 2009.

WANG, S. et al. Synthesis of magnetite-silica core-shell nanoparticles via direct silicon oxidation. **Journal of colloid and interface science**, v. 432, p. 43-46, 2014.

WEINER, L. M.; SURANA, R.; WANG, S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 5, p. 317, 2010.

WEISHAUPT, K. R.; GOMER, C. J.; DOUGHERTY, T. J. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor. **Cancer research**, v. 36, n. 7 Part 1, p. 2326-2329, 1976.

WIDENGREN, J.; RIGLER, R. Mechanisms of photobleaching investigated by fluorescence correlation spectroscopy. **Bioimaging**, v. 4, n. 3, p. 149-157, 1996.

WILSON, W. R.; HAY, M. P. Targeting hypoxia in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 6, p. 393, 2011.

WINK, D. A. et al. The cytotoxicity of nitroxyl: possible implications for the pathophysiological role of NO. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 351, n. 1, p. 66-74, 1998.

WINK, D. A. et al. The reemergence of nitric oxide and cancer. **Nitric oxide: biology and chemistry/official journal of the Nitric Oxide Society**, v. 19, n. 2, p. 65, 2008.

WINKELMAN, J. The distribution of tetraphenylporphinesulfonate in the tumor-bearing rat. **Cancer Research**, v. 22, n. 5 Part 1, p. 589-596, 1962.

WINKELMAN, J. Metabolic studies on the accumulation of tetraphenylporphinesulfonate in tumors. **Experientia**, v. 23, n. 11, p. 949-950, 1967.

WISEMAN, H.; HALLIWELL, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. **Biochemical Journal**, v. 313, n. Pt 1, p. 17, 1996.

WYLD, L.; REED, M.; BROWN, N. Differential cell death response to photodynamic therapy is dependent on dose and cell type. **British journal of cancer**, v. 84, n. 10, p. 1384, 2001.

XIA, L. et al. An upconversion nanoparticle–zinc phthalocyanine based nanophotosensitizer for photodynamic therapy. **Biomaterials**, v. 35, n. 13, p. 4146-4156, 2014.

ZHANG, J. et al. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. **Acta pharmaceutica sinica B**, v. 8, n. 2, p. 137-146, 2018.

ZHANG, L. et al. Gene expression profiles in normal and cancer cells. **Science**, v. 276, n. 5316, p. 1268-1272, 1997.

ZHANG, P.; SADLER, P. J. Redox-active metal complexes for anticancer therapy. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2017, n. 12, p. 1541-1548, 2017.

ZHANG, Y. et al. Synthesis, characterization and formation mechanism of dumbbell-like YOHCO₃ and rod-like Y₂(CO₃)₃·2.5 H₂O. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 474, n. 1-2, p. 598-604, 2009a.

_____. Synthesis, characterization and formation mechanism of dumbbell-like YOHCO₃ and rod-like Y₂(CO₃)₃·2.5 H₂O. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 474, n. 1, p. 598-604, 2009b.

ZHAO, Y.; ADJEI, A. A. Targeting angiogenesis in cancer therapy: moving beyond vascular endothelial growth factor. **The oncologist**, v. 20, n. 6, p. 660-673, 2015.

ZHENG, J. et al. Native point defects in yttria and relevance to its use as a high-dielectric-constant gate oxide material: First-principles study. **Physical Review B**, v. 73, n. 10, p. 104101, 2006.

ZHOU, J. et al. Upconversion luminescent materials: advances and applications. **Chemical reviews**, v. 115, n. 1, p. 395-465, 2014.

ZHU, T. C. et al. Macroscopic modeling of the singlet oxygen production during PDT. *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XVI*, 2007, International Society for Optics and Photonics. p.642708.

ZHU, W. et al. Modulation of hypoxia in solid tumor microenvironment with MnO₂ nanoparticles to enhance photodynamic therapy. **Advanced Functional Materials**, v. 26, n. 30, p. 5490-5498, 2016.

ZITVOGEL, L.; KROEMER, G. Subversion of anticancer immunosurveillance by radiotherapy. **Nature immunology**, v. 16, n. 10, p. 1005, 2015.

ZONG, S. et al. The use of cisplatin-loaded mucoadhesive nanofibers for local chemotherapy of cervical cancers in mice. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 93, p. 127-135, 2015.