

KARINA NIGOGHOSSIAN

**Membranas de celulose bacteriana contendo nanopartículas de
YVO₄:Yb³⁺:Er³⁺/Ho³⁺ para aplicações envolvendo conversão ascendente de
energia**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para a obtenção
do título de Mestra em Química.

Orientador: Prof. Dr. Sidney José Lima Ribeiro
Coorientador: Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco

Araraquara
2013

FICHA CATALOGRÁFICA

N688m	Nigoghossian, Karina Membranas de celulose bacteriana contendo nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}/\text{Ho}^{3+}$ para aplicações envolvendo conversão ascendente de energia / Karina Nigoghossian. – Araraquara : [s.n], 2013 131 f. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Sidney José Lima Ribeiro Coorientador: Antonio Claudio Tedesco 1. Química inorgânica. 2. Celulose bacteriana. 3. Nanopartículas. 4. Íons lantanídeos. I. Título.
-------	--

DADOS CURRICULARES
Karina Nigoghossian

1. Dados pessoais

Nascimento: 27 de junho de 1986.

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: São Paulo - SP

Estado Civil: solteira

Filiação: Pai: Rubens Nigoghossian Mãe: Lilian Kamagian Nigoghossian

Profissão: Farmacêutica-Bioquímica

Endereço: Rua Princesa Isabel, 246, apto. 182, Brooklin, São Paulo – SP.

Endereço profissional: Rua Prof. Francisco Degni, 55, Quitandinha, Araraquara - SP.

2. Formação acadêmica

2005 - 2011: Graduação em Farmácia-Bioquímica - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”

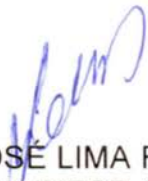
2011 - 2013: Mestrado em Química - Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”.

KARINA NIGOGHOSSIAN

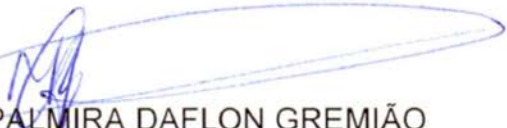
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Química.

Araraquara, 19 de dezembro de 2013.

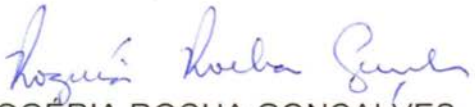
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. SIDNEY JOSÉ LIMA RIBEIRO (Orientador)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



Profª Drª MARIA PALMIRA DAFLON GREMIÃO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP / Araraquara



Profª Drª ROGÉRIA ROCHA GONÇALVES
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras / USP / Ribeirão Preto

Este trabalho é respeitosamente dedicado aos meus pais,
Lilian e Rubens.

“É na educação dos filhos que se revelam as virtudes dos pais.”
Coelho Neto

À minha querida avó, Wartuy Assadurian Kamagian (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos à FAPESP pela bolsa concedida.

Ao Instituto de Química da Unesp pelo compromisso com a qualidade da formação dos profissionais.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sidney José Lima Ribeiro, pelo incentivo e enorme contribuição para o meu desenvolvimento profissional. Sou muito grata pelas oportunidades oferecidas e pela confiança depositada desde a graduação.

À parceira e amiga Dr^a. Maristela F. S. Peres pelo companheirismo, paciência e profissionalismo. Muito obrigada pela constante preocupação e dedicação.

Ao Prof. Dr. Édison Pecoraro, que sempre esteve pronto para ajudar e me apoiou durante todo o mestrado. Obrigada pela orientação na realização de medidas de luminescência e tratamentos de dados, pela participação no exame de qualificação e pelos conselhos profissionais.

Ao Prof. Dr. Antonio C. Tedesco pela coorientação e por disponibilizar a estrutura do seu laboratório. Ao Dr. Fernando Primo por ser sempre prestativo, ter paciência com os nossos longos ensaios e pelas discussões sobre os resultados deste projeto. André, Olímpia e todos do grupo de Fotobiologia e Fotomedicina da FFCLRP – USP, pela assistência durante as visitas ao laboratório.

Ao Prof. Dr. Denis Boudreau pela orientação e confiança. Sou muito grata pela atenção e incentivo que recebi quando estive no Canadá. A todos do seu grupo de pesquisa do Centre d'optique, photonique et laser da Université Laval, que me mostraram o significado de união e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Younes Messaddeq e a Dr^a. Sandra Helena Messaddeq pelo acolhimento em Quebec. Ao Yannick pela enorme ajuda no trabalho e pela sua amizade. Igor e Mohamed, a presença de vocês também ajudou a encarar o desafio com mais leveza.

A Prof^a. Dr^a. Maria Palmira Daflon Gremião e a Prof^a. Dr^a. Rogéria Rocha Gonçalves pela participação na banca examinadora e pelas valiosas sugestões para a melhoria deste trabalho.

Aos funcionários do departamento, principalmente Serginho e Rafael, e aos demais do Instituto de Química.

Agradeço especialmente a Sybele, Silvia, César, Eliane, Hernane, Marli, Danilo, Tâmara, Denise, Gustavo, Livia, Laís e a todos os outros colegas do grupo de Materiais Fotônicos pela amizade, colaboração e todo o apoio recebido.

Ao meu companheiro Fernando (ET), por tudo o que seu amor representa na minha vida. Pela sua constante presença, tão importante nos momentos bons e ruins. Marcia, Nice e Artur, obrigada por me receberem sempre tão bem no seu lar.

Às amigas queridas Day, Sil, Pri e Josi, pessoas incríveis que tenho a sorte de ter ao meu lado. Obrigada pelo carinho e por sempre me apoiarem de forma tão espontânea. Aos amigos de Araraquara, que fazem eu gostar mais de morar nessa cidade.

À minha família, sempre presente nos meus pensamentos, pelo apoio incondicional e pelo amor que me encoraja a seguir em frente todos os dias.

"Se vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes."

Isaac Newton

RESUMO

Membranas de celulose bacteriana (CB) foram preparadas contendo nanopartículas (NPs) para conversão ascendente de energia de $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}/\text{Ho}^{3+}$ e ftalocianina de cloroalúminio (AlClPc), um fotossensibilizador utilizado na terapia fotodinâmica (TFD). As membranas obtidas foram testadas visando seu potencial para aplicação como sensibilizadoras de processos fotoativados na TFD. O desenvolvimento deste novo biomaterial baseou-se no ideal de aplicar estas membranas topicamente sobre a área a ser tratada para que ocorra a liberação do fotossensibilizador e a ativação deste possa ser feita localmente por iluminação no infravermelho, que é convertida em luz visível pelas NPs por conversão ascendente de energia. A excitação no infravermelho é vantajosa para aplicação em sistema biológico, pois permite penetração mais profunda da luz nos tecidos em comparação a luz visível. As propriedades de emissão das nanopartículas foram otimizadas, explorando as condições de síntese e diferentes concentrações relativas dos dopantes, a fim de se obter maior rendimento de conversão infravermelho-vermelho e a emissão na região de absorção/excitação do fotoativo. As NPs $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Ho}^{3+}$ (79:20:1) se mostraram mais adequadas para tal aplicação, por apresentarem maior intensidade de emissão entre 630 e 690 nm (banda de absorção da AlClPc). A CB foi produzida com diferentes características em relação à espessura e transparência, exibindo até 90 % de transmissão óptica. Os resultados mostraram a viabilidade de se incorporar o fotossensibilizador e as nanopartículas luminescentes na matriz polimérica de CB para administração do fármaco, mantendo-se as propriedades luminescentes de ambos os compostos inseridos no polímero. A eficiência de incorporação (EI) de AlClPc foi estudada para diferentes membranas. Observou-se maior EI para as membranas mais finas com menor concentração de AlClPc. Os estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro* foram realizados com células de Franz e orelhas de porco foram adotadas como modelo de pele. Após 6, 12 e 24 horas de ensaio, AlClPc ficou retida nas camadas da pele estrato córneo ($0,5 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$) e epiderme/derme ($0,3 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$). O sistema de liberação desenvolvido possui potencial para administração tópica da AlClPc sem haver a possibilidade de absorção sistêmica do fármaco, que pode causar fotossensibilização generalizada do paciente. A ativação do fotossensibilizador pela emissão no visível das NPs foi confirmada pelos espectros de emissão das NPs $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Ho}^{3+}$ na presença de AlClPc, obtidos sob excitação no infravermelho. Observou-se a banda de emissão do fotossensibilizador em 680 nm e a supressão da emissão das NPs no vermelho, indicando que ocorreu transferência de energia das NPs para o fotoativo. As propriedades fotofísicas das membranas foram analisadas também pela emissão em 1270 nm e cinética de decaimento de oxigênio singleto. A AlClPc manteve sua propriedade de gerar oxigênio singleto quando inserida na matriz polimérica de CB. A presença das NPs não mostrou causar interferência significativa na produção desta espécie citotóxica.

Palavras-chave: celulose bacteriana, nanopartículas, íons lantanídeos, terapia fotodinâmica, ftalocianina.

ABSTRACT

Bacterial cellulose membranes were prepared containing upconverting nanoparticles of $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}/\text{Ho}^{3+}$ and a photosensitizer, Aluminum phthalocyanine chloride (AlClPc). The membranes were tested aiming applications as sensitizers in photoactivated processes (photodynamic therapy - PDT). The development of this new biomaterial was based on the purpose of applying these membranes topically over the area to be treated to release of the photosensitizer and its activation will occur locally under infrared light, that will be converted in visible light by upconverting nanoparticles. Emission properties have been optimized and the material with composition (mol%) $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Ho}^{3+}$ (79:20:1) showed up adequate with highest emission at the spectral region of absorption/excitation of the photoactive (630-690nm). BC membranes production have also been optimized regarding thickness and optical transmission. Results showed that the incorporation of the photoactive molecules together with the upconverting nanoparticles is feasible. The photoactive incorporation efficiency was studied. Thinner membranes lead to higher relative efficiencies. Skin permeation and retention *in vitro* tests have been performed by using Franz cells and pigs ears as skin models. After 6, 12 and 24 hours, AlClPc was retained at the stratum corneum ($0.5 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$) and dermis/epidermis ($0.3 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$). The release system developed here presents potential for topical administration without possibility of systemic absorption that could lead to generalized photosensitization of the patient. The photosensitization through the visible upconverted emission of the nanoparticles under infrared excitation was observed. The 680 nm emission of the AlClPc together with the suppression of the red emission of the nanoparticles were clear evidence of the energy transfer process. Moreover the photophysical properties were evaluated at 1270 nm. The AlClPc oxygen generation was observed in the new membranes.

Keywords: bacterial cellulose, nanoparticles, lanthanide ions, photodynamic therapy, phthalocyanine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Janela biológica devido à absorbância reduzida no vermelho e infravermelho próximo (600-1200 nm) pelos cromóforos presentes nos tecidos.....	18
Figura 2 -	Processos de conversão ascendente envolvendo 2 fótons e valores de eficiência relativa. Transições entre níveis de energia são indicadas por linhas verticais. Setas conectando íons diferentes indicam transferência de energia. Linhas horizontais representam níveis de energia.	19
Figura 3 -	Diagrama de níveis de energia para os pares de íons lantanídeos $\text{Yb}^{3+}\text{-Er}^{3+}$ (A) e $\text{Yb}^{3+}\text{-Ho}^{3+}$ (B) e a representação esquemática para o processo APTE ou ETU.....	20
Figura 4 -	Representação esquemática do processo de conversão ascendente de energia (<i>upconversion</i>). Após excitação no infravermelho (980 nm) a nanopartícula contendo íons lantanídeos emite luz no visível (setas verde e vermelha na figura).....	21
Figura 5 -	Diagrama de Jablonski para o processo de fotoativação.....	23
Figura 6 -	Estrutura química da porfina formada por anel tetrapirrólico.....	25
Figura 7-	Estrutura de uma ftalocianina onde M é o metal central (Al, Zn, Si) e R representa possíveis substituintes (SO_3H , S_2 , F, COOH).....	26
Figura 8 -	Estrutura linear da celulose. As linhas pontilhadas esquematizam as ligações de hidrogênio possíveis.....	29
Figura 9 -	Processo para síntese das nanopartículas de YVO_4	33
Figura 10 -	Modelo de célula de difusão de Franz.....	36
Figura 11 -	Difratograma do pó obtido da síntese do ortovanadato de sódio.....	41
Figura 12 -	Espectro EDS do pó obtido da síntese do ortovanadato de sódio.....	42
Figura 13 -	Pó obtido da síntese das nanopartículas antes (A) e após tratamento térmico (B).....	42
Figura 14 -	Imagens de MEV das NPs de $\text{YVO}_4\text{:Yb}^{3+}\text{:Er}^{3+}$ antes (A) e após tratamento térmico a 800 °C por 5 minutos (B) e por 1 hora (C).....	43
Figura 15 -	Distribuição multimodal de valores de raio hidrodinâmico para as nanopartículas de YVO_4 dopadas com $\text{Yb}^{3+}\text{:Er}^{3+}$ e $\text{Yb}^{3+}\text{:Ho}^{3+}$ suspensas em água.....	43
Figura 16 -	Curva termogravimétrica para amostras de $\text{YVO}_4\text{:Yb}^{3+}\text{:Er}^{3+}$ após tratamento térmico de 1 hora (A), 5 minutos (B) e sem tratamento térmico (C).....	44

Figura 17 -	Difratograma das nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ sem tratamento térmico e após o tratamento térmico a 800 °C...	45
Figura 18 -	Difratogramas das nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Ho}^{3+}$ antes do tratamento térmico e tratadas a 600, 700, 800 °C.	46
Figura 19 -	Difratogramas das nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Ho}^{3+}$ tratadas a 600 °C por 24 e 72 horas. Pico em $2\theta=29$ relacionado à formação da fase do Y_2O_3 (*).....	46
Figura 20 -	Espectros vibracionais na região do infravermelho para as amostras de $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Ho}^{3+}$ antes do tratamento térmico e tratadas com diferentes temperaturas.....	48
Figura 21 -	Espectros de emissão (conversão ascendente, $\lambda_{\text{ex}}=980\text{nm}$) das nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ e $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Ho}^{3+}$	49
Figura 22 -	Espectros de emissão das nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ (A) e $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Ho}^{3+}$ (B) em função da potência do laser ($\lambda_{\text{ex}}=980\text{nm}$). Inseto: dependência da emissão das bandas pela potência de bombeamento.....	50
Figura 23 -	Representação esquemática para o processo de conversão ascendente de energia envolvendo o par de íons $\text{Yb}^{3+}-\text{Er}^{3+}$, no qual três fótons são absorvidos pelo Yb^{3+} e a energia transferida para o Er^{3+}	51
Figura 24 -	Espectros de emissão das nanopartículas $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Ho}^{3+}$ tratadas a diferentes temperaturas. Inseto: intensidade de emissão na região do vermelho em função da temperatura.	52
Figura 25 -	Espectros de emissão das nanopartículas de YVO_4 dopadas com 20% de Yb^{3+} e 1; 2,5 e 5% de Er^{3+} e 20% de Yb^{3+} e 1% de Ho^{3+} . Áreas das bandas de emissão em 650 nm em função da co-dopagem.....	53
Figura 26 -	Imagens de MEV das membranas de CB A3d (A) e G1d (B).....	54
Figura 27 -	Espectros eletrônicos na região do UV-Vis das diferentes CBs obtidas.....	56
Figura 28 -	Imagens de MEV das CBs incorporadas com as nanopartículas.....	57
Figura 29 -	Imagem de MEV da CB incorporada com as nanopartículas e as regiões (1 e 2) onde foram realizadas as análises por EDS.....	57
Figura 30 -	Espectro EDS da CB incorporada com as nanopartículas das regiões 1 e 2 (indicadas na Figura 29).....	58
Figura 31 -	Espectros vibracionais na região do infravermelho da celulose pura (CB) e das amostras de CB incorporadas com as nanopartículas (CB-NP).....	59
Figura 32 -	Espectros de emissão do composto CB-NP, excitado em 980 nm com diferentes potências.....	59

Figura 33 -	Membrana pura de CB úmida (A) e membranas de CB-AICIPc úmida (B) e seca (C).....	60
Figura 34 -	MEV da membrana de CB A2d incorporada com AICIPc em diferentes concentrações: A2d1 (A), A2d5 (B) e A2d10 (C).....	60
Figura 35 -	Espectros vibracionais na região do infravermelho da AICIPc, CB pura e CB incorporada com AICIPc.....	61
Figura 36 -	Espectros de emissão obtidos nas etapas de extração e homogeneização para as membranas de CB de diferentes linhagens de bactéria, com os menores tempos de crescimento (G1d e A2d) e com diferentes concentrações de AICIPc (1, 5 e 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$).....	62
Figura 37 -	Quantificação de AICIPc nas etapas de extração e homogeneização para as amostras com concentração de 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	63
Figura 38 -	Quantificação de AICIPc nas etapas de extração e homogeneização para amostras com concentrações de 5 e 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ com os menores tempos de crescimento.....	63
Figura 39 -	AICIPc retida e total para amostras com concentração de 1, 5 e 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ com os menores tempos de crescimento.....	64
Figura 40 -	Espectros de emissão da AICIPc em diferentes concentrações (0,219-1,314 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e gráfico da concentração de AICIPc vs. intensidade de emissão.....	66
Figura 41 -	Perfil de retenção cutânea nas camadas da pele: estrato córneo (EC) e epiderme/derme (E+D) para as CBs (G1d1 e A2d1), obtido no ensaio de 12 horas.....	67
Figura 42 -	Perfil de retenção cutânea nas camadas da pele: estrato córneo (EC) e epiderme/derme (E+D) para as CB G1d1, obtidos nos ensaios de 6, 12 e 24 horas.....	68
Figura 43 -	Espectros de absorção da solução de AICIPc em etanol e de emissão do compósito CB-NP.....	70
Figura 44 -	Espectros de emissão das NPs ($\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Ho}^{3+}$) e NPs na presença de AICIPc com concentrações 5, 50 e 500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	71
Figura 45 -	Espectros de emissão das CB incorporadas com NPs (suspensões a 0,04 e 0,2 %) com ou sem AICIPc (concentrações 3 e 300 μM).....	72
Figura 46 -	Perfil de decaimento do oxigênio singleto gerado nas amostras de CB-AICIPc, CB-AICIPc-NP, solução de AICIPc em etanol e padrão feoforbide-a em etanol.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela I -	Amostras de CB-AICIPc para as linhagens ATCC e GL.....	35
Tabela II -	Diâmetro médio dos cristalitos estimado pela Equação de Scherrer.....	47
Tabela III -	Medidas dos espaços intersticiais entre as fibras de celulose e espessura das membranas.....	55
Tabela IV -	Concentração de AICIPc incorporada nas CBs.....	65
Tabela V -	Razão entre emissões vermelho/verde.....	72
Tabela VI -	Tempo de vida e intensidade máxima das curvas de decaimentos.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

UCNPs - nanopartículas para conversão ascendente de energia, do inglês *Upconverting Nanoparticles*

APTE - Efeito Auzel ou *Addition de Photons par Transferts d'Energie*

ETU - Efeito Auzel ou *Energy Transfer Upconversion*

TFD - terapia fotodinâmica

FS - fotossensibilizadores

AlClPc - ftalocianina de cloroalumínio

CB - celulose bacteriana

NP - nanopartículas

DFD - diagnóstico fotodinâmico

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

MEV - microscopia eletrônica de varredura

EI - eficiência de incorporação

TT - tratamento térmico

EC - estrato córneo

E+D - epiderme/derme

τ - tempo de vida

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Materiais luminescentes para aplicações biomédicas	17
1.2 Nanopartículas para conversão ascendente de energia	18
1.3 Terapia Fotodinâmica	21
1.3.1 <i>Mecanismo de Ação</i>	23
1.3.2 <i>Fármacos fotossensibilizadores</i>	24
1.4 Sistemas de liberação de fármacos	26
1.5 Celulose bacteriana	28
2 OBJETIVOS	31
3 PARTE EXPERIMENTAL	32
3.1 Síntese das nanopartículas YVO₄	32
3.2 Preparo das membranas de celulose bacteriana	33
3.3 Incorporação das membranas de CB com AlClPc e nanopartículas	34
3.4 Eficiência de incorporação de AlClPc	35
3.5 Estudos de permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i>	36
3.6 Estudos fotofísicos	38
3.7 Equipamentos	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Nanopartículas YVO₄	41
4.1.1 <i>Caracterização do precursor ortovanadato de sódio</i>	41
4.1.2 <i>Caracterização das nanopartículas</i>	42
4.1.3 <i>Propriedades ópticas</i>	48
4.2 Caracterização das celulosas bacterianas	54
4.3 Caracterização da celulose bacteriana incorporada com nanopartículas	56
4.4 Caracterização da celulose bacteriana incorporada com AlClPc	60
4.4.1 <i>Eficiência de incorporação de AlClPc</i>	61
4.4.2 <i>Estudos de permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i></i>	65
4.5 Caracterização da celulose bacteriana incorporada com AlClPc e nanopartículas	69
4.5.1 <i>Propriedades ópticas</i>	69

<i>4.5.2 Estudos fotofísicos</i>	<i>73</i>
5 CONCLUSÕES	76
6 PERSPECTIVAS	78
REFERÊNCIAS	79
APÊNDICE A	91

1 INTRODUÇÃO

1.1 Materiais luminescentes para aplicações biomédicas

As técnicas de diagnóstico e tratamento de doenças genéticas e infecciosas vêm mostrando grande avanço, a partir do desenvolvimento de métodos ultrasensíveis, mais eficientes e menos invasivos. A nanobiofotônica contribui para este progresso com o desenvolvimento de novas modalidades de bioimageamento e terapias ativadas e monitoradas pela luz.^{1,2}

Os materiais luminescentes mais convencionais são corantes orgânicos, como a fluoresceína, a qual é amplamente utilizada na visualização do fluxo sanguíneo nos vasos da retina, coróide e íris,³ ou pontos quânticos (*quantum dots*), nanocristais de semicondutores que apresentam alta intensidade de luminescência.⁴ Estes materiais requerem fonte de excitação no ultravioleta ou visível (azul) e emitem fótons de menor energia, em processos envolvendo um único fóton. Com relação a estas características, a baixa penetração da luz nos tecidos e possíveis danos severos aos organismos vivos, como dano ao DNA e morte celular, devido a exposição prolongada a altas energias de excitação,⁵ podem ser citadas como desvantagens. Além disso, muitas amostras biológicas apresentam autofluorescência sob radiação ultravioleta ou visível, o que diminui a sensibilidade da técnica.⁶

Nos tecidos, tanto a absorção quanto o espalhamento da luz são menores na região do vermelho e infravermelho próximo. Os principais cromóforos presentes (hemoglobina e melanina) apresentam bandas de absorção mais intensas abaixo de 600 nm. A água possui absorbância significativa a partir de 1200 nm. Por estas razões, existe a chamada “janela biológica”, que abrange a região do vermelho ao infravermelho próximo e é onde há penetração mais profunda da luz nos tecidos (Figura 1).⁷

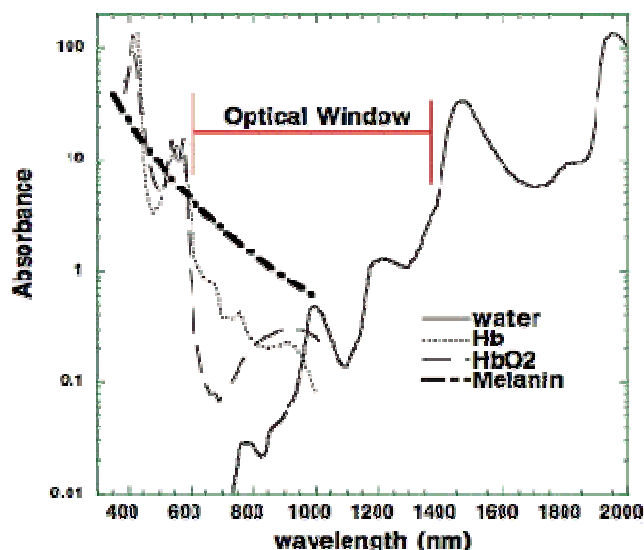


Figura 1. Janela biológica devido à absorbância reduzida no vermelho e infravermelho próximo (600-1200 nm) pelos cromóforos presentes nos tecidos.⁷

1.2 Nanopartículas para conversão ascendente de energia

Uma solução promissora para materiais luminescentes a serem aplicados em técnicas de diagnóstico e tratamento é utilizar materiais que possam ser excitados por fontes de luz com comprimento de onda situado na região da janela biológica, como é o caso de nanopartículas dopadas com íons lantanídeos que apresentam o fenômeno de conversão ascendente de energia (UCNP, do inglês *Upconverting Nanoparticles*). Estes luminóforos são capazes de emitir fótons de alta energia sob excitação no infravermelho próximo, resultante de um processo óptico não linear de conversão ascendente, no qual a absorção sequencial de dois ou mais fótons permite a emissão de um único fóton com comprimento de onda menor.⁸

A identificação do mecanismo básico para conversão ascendente de energia ou "upconversion" envolvendo íons lantanídeos foi resultado de intensa atividade de pesquisa nos anos 60. Existem vários artigos de revisão versando sobre o assunto e aquele escrito por Auzel em 2004 é utilizado aqui. François Auzel foi de fato o proponente do mecanismo aceito como o mais importante e que na literatura leva seu nome (Efeito Auzel ou APTE do francês "Addition de Photons par Transferts d'Énergie") ou ainda ETU (do inglês "Energy Transfer Upconversion").^{9, 10}

A Figura 2 mostra os principais processos envolvendo 2 fótons que podem levar a população de estados excitados e consequente observação de emissão anti-Stokes.⁹ Além do efeito APTE, a figura mostra também a absorção sequencial de 2 fótons pelo mesmo íon ("2-steps absorption"), sensibilização cooperativa ("cooperative sensitization"), luminescência cooperativa ("cooperative luminescence"), geração de segundo harmônico (second-harmonic generation - SHG) e excitação por absorção de 2 fótons (two-photon absorption excitation). A eficiência relativa (η) também é mostrada na figura. Como explicado por Auzel, a eficiência não é dada em porcentagem já que isto é feito para processos que variam linearmente com a excitação. Não é este o caso para estes processos não-lineares e, portanto, os valores de eficiência são normalizados para o fluxo incidente e dados em cm^2/W para processos de dois fótons. De maneira mais geral, para n fótons, os valores seriam dados em $(\text{cm}^2/\text{W})^{n-1}$. Como mostra a figura o efeito APTE é no mínimo 2 ordens de grandeza mais eficiente que os demais.

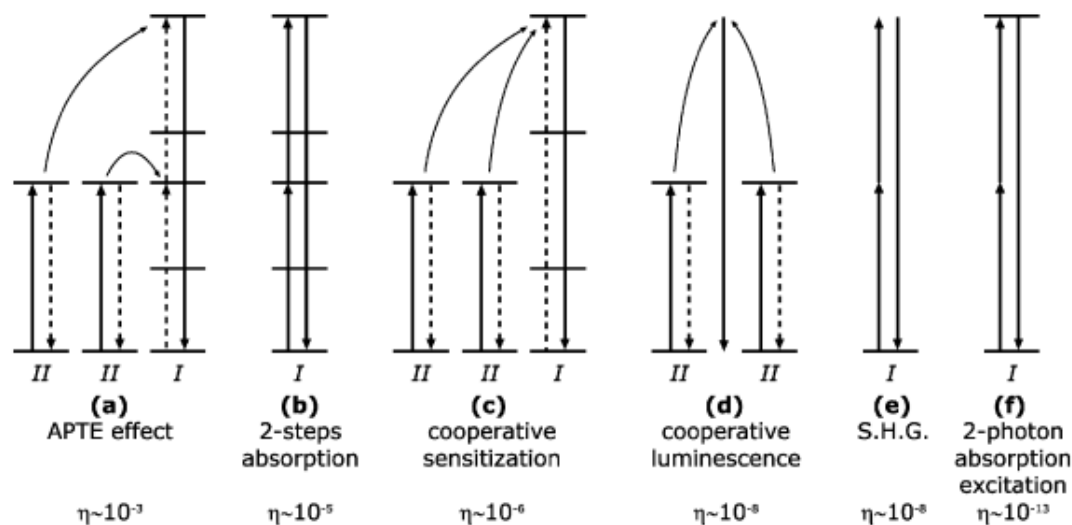


Figura 2. Processos de conversão ascendente envolvendo 2 fótons e valores de eficiência relativa. Transições entre níveis de energia são indicadas por linhas verticais. Setas conectando íons diferentes indicam transferência de energia. Linhas horizontais representam níveis de energia.⁹

As UCNPs são constituídas por uma rede cristalina (hospedeira) e um centro luminescente (ativador e sensibilizador). Fluoretos, óxidos e sulfetos de terras raras dopadas com pares e tríades de íons lantanídeos, $\text{Yb}^{3+}\text{-Ln}^{3+}$ ou $\text{Yb}^{3+}\text{-Ln}^{3+}\text{-Ln}'^{3+}$ ($\text{Ln}^{3+}, \text{Ln}'^{3+} = \text{Er}^{3+}, \text{Tm}^{3+}, \text{Tb}^{3+}, \text{Pr}^{3+}, \text{Ho}^{3+}$)¹¹ se constituem em algumas das matrizes

utilizadas. Estes materiais podem apresentar a eficiência do processo de *upconversion* alta o suficiente para ser observada a olho nu sob excitação de potência moderada.^{12, 13} A Figura 3 mostra os processos possíveis envolvendo os pares de íons lantanídeos, $\text{Yb}^{3+}\text{-Er}^{3+}$ e $\text{Yb}^{3+}\text{-Ho}^{3+}$. O estudo do processo envolvendo diferentes pares e tríades de íons lantanídeos tem permitido a observação de emissão numa ampla faixa do espectro que vai desde o UV até o IV. A disponibilidade comercial de lasers operando em torno de 800 e 980 nm (regiões de absorção de íons como Nd^{3+} , Tm^{3+} e Yb^{3+}) e com potências de alguns Watts permite aplicações variadas, entre elas a que foi explorada neste trabalho de mestrado.¹¹ A Figura 3 mostra que o íon Yb^{3+} possui apenas um nível excitado que pode facilmente ser populado por lasers operando na região de 980 nm. Portanto, a utilização de pares $\text{Yb}^{3+}\text{-Ln}^{3+}$ e tríades $\text{Yb}^{3+}\text{-Ln}^{3+}\text{-Ln}'^{3+}$ permite a observação de emissão eficiente desde o UV até a região de 800 nm com inúmeras aplicações.

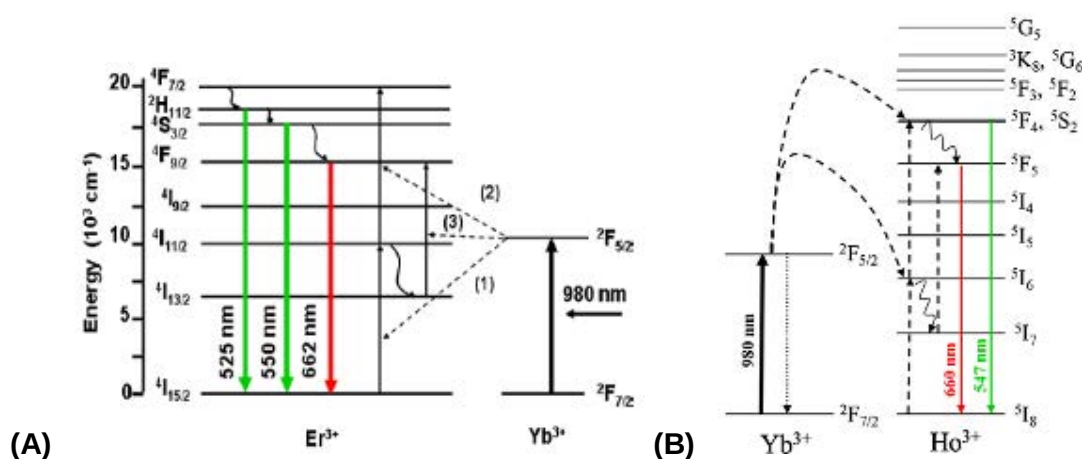


Figura 3. Diagrama de níveis de energia para os pares de íons lantanídeos $\text{Yb}^{3+}\text{-Er}^{3+}$ (A) e $\text{Yb}^{3+}\text{-Ho}^{3+}$ (B) e a representação esquemática para o processo APT e ETU.^{14, 15}

Algumas características nesses materiais são marcantes para aplicação biomédica: i) a banda de absorção em 980 nm localizada na janela terapêutica/diagnóstica, onde ocorre uma penetração da luz nos tecidos mais intensa, quando comparada à luz UV ou visível; ii) tempo de decaimento relativamente longo que pode eliminar quase completamente o ruído causado pela autofluorescência dos tecidos pela utilização de detecção resolvida no tempo.¹⁶

Além destes fatores, a radiação no infravermelho próximo é menos citotóxica comparada à radiação utilizada para excitar a maioria dos outros fluoróforos.¹⁷

As UCNPs oferecem excelentes perspectivas para o desenvolvimento de novas estratégias não-invasivas para o diagnóstico e tratamento do câncer.^{18, 19, 20} Além da aplicação em bioimageamento, as UCNPs também podem ser combinadas a fármacos quimioterápicos²¹ e a nanopartículas de ouro, direcionadas à terapia fototérmica²². Diversos estudos mostram o sucesso em utilizar UCNPs na sensibilização de algumas moléculas fotoativas usadas em terapia fotodinâmica^{6, 23, 24, 25, 26}. A capacidade de imageamento das UCNPs pode ser aproveitada para guiar os tratamentos, permitindo o monitoramento das respostas terapêuticas em tempo real.^{27, 28}

A Figura 4 esquematiza o processo em que nanopartículas de lantanídeos específicos emitem luz visível após excitação no infravermelho. Este processo foi aplicado neste trabalho para fotosensibilizar moléculas orgânicas utilizadas em terapia fotodinâmica.

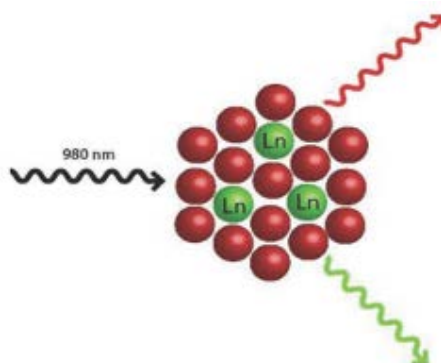


Figura 4. Representação esquemática do processo de conversão ascendente de energia (*upconversion*). Após excitação no infravermelho (980 nm) a nanopartícula contendo íons lantanídeos emite luz no visível (setas verde e vermelha na figura).¹¹

1.3 Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) é foco de intensa pesquisa nas últimas décadas como uma modalidade terapêutica emergente. Apesar do fato de ser uma técnica recente, o procedimento da TFD já está bem estabelecido e vem sendo utilizado no tratamento de doenças neoplásicas e não neoplásicas.²⁹ O procedimento clínico da TFD utiliza um composto fotossensibilizador (FS) e luz.

Câncer é a designação genérica de qualquer tumor maligno.³⁰ Caracteriza-se pelo crescimento de células de forma muito acelerada e com descontrolo no processo diferenciação e pela tendência a se espalhar para outros órgãos.³¹ É a principal causa de morte por doenças no Brasil, juntamente com doenças do aparelho circulatório, que unidas constituem o grupo de doenças crônico-degenerativas. O câncer de pele não melanoma é o mais comum e sua incidência continua a aumentar.³² As terapias tradicionais (cirurgia, quimioterapia e radioterapia) apresentam graves efeitos colaterais e eficiência limitada. A TFD destaca-se dentre as alternativas na área de oncologia por ser uma metodologia minimamente invasiva, possuir uma grande seletividade pelo tecido alvo e, portanto, não apresentar toxicidade para os locais não almejados.^{33, 34, 35} Como uma tendência na oncologia moderna para melhorar o índice terapêutico de tratamentos, a TFD pode ser combinada a outras modalidades terapêuticas que não apresentem sobreposição do efeito tóxico. Isto é possível, visto que seu mecanismo de ação é exclusivo.³⁶

O principal foco do desenvolvimento da TFD é no tratamento do câncer de pele, desde o estágio precoce até o melanoma. Entretanto, o uso da TFD em câncer de pele tipo melanoma é limitado devido a fraca penetração da luz em tecidos ricos em melanina, no comprimento de onda próprio para ativação de fármacos fotossensibilizadores usados nesta terapia. Os estudos sobre tal aplicação ainda são escassos e ainda não há indicação para o uso desta terapia, tornando imprescindíveis maiores investigações.^{37, 38}

Recentemente, a TFD vem sendo aplicada em doenças não oncológicas, que têm como característica comum ao câncer o crescimento anormal de tecidos. O tratamento ocorre por meio dos mesmos mecanismos de ação, por dano, morte, ou inviabilização celular.³³ A TFD é aplicada na inativação de microorganismos para tratamento de infecções bacterianas, fúngicas ou virais³⁹; na área dermatológica, no tratamento de acne, verrugas, fotoenvelhecimento e psoríase^{40, 41}; em oftalmologia⁴²; cardiologia⁴³; odontologia⁴⁴; e no tratamento de artrite⁴⁵.

A fotoluminescência inerente ao fármaco fotossensibilizador pode também ser utilizada para realizar imageamento por fluorescência e, assim, detectar e localizar a presença de tumores em estados iniciais de desenvolvimento, o que é normalmente chamado de diagnóstico fotodinâmico (DFD).^{27, 46, 47}

1.3.1 Mecanismo de Ação

Para a realização do tratamento com TFD, administra-se, por via tópica ou sistêmica, um fármaco fotossensível que se acumula preferencialmente em células tumorais. A destruição seletiva do tecido ocorre através da combinação do agente fotossensibilizador no tecido-alvo, uma fonte de luz no comprimento de onda compatível com o espectro de absorção do fármaco e oxigênio molecular. Quando esses elementos são combinados, ocorrem reações fotooxidativas, que resultam na formação de espécies citotóxicas de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e de radicais livres ($^{\bullet}\text{OH}$, $\text{HO}_2^{\bullet}$ e $^{\bullet}\text{O}_2^-$), os quais promovem a destruição irreversível dos tecidos tratados.^{38, 48} No diagrama de Jablonski, esquematizado na Figura 5, estão representadas de forma geral, as etapas fotoquímicas e fotofísicas envolvidas no processo de fotossensibilização de um composto após absorver radiação.

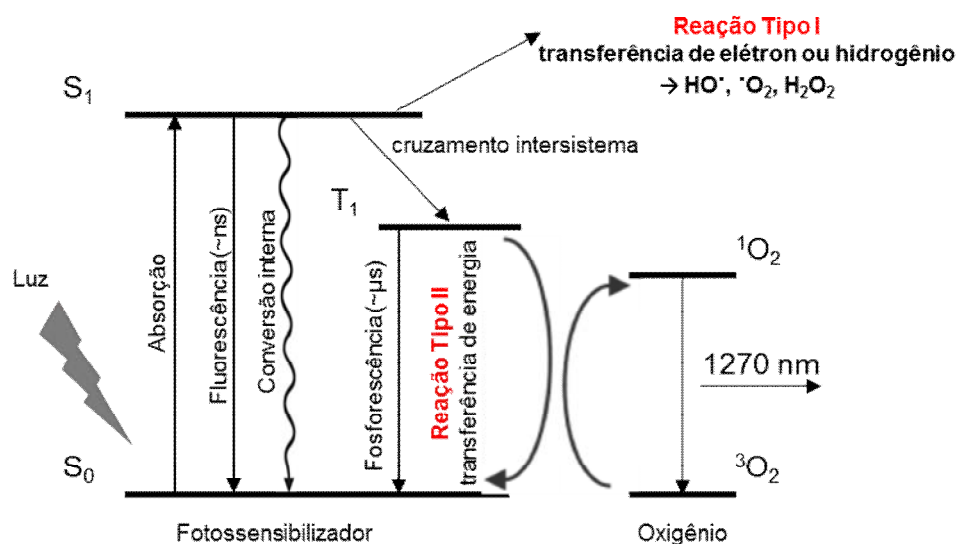


Figura 5. Diagrama de Jablonski para o processo de fotoativação.

Após a absorção de luz, o fotossensibilizador, inicialmente no estado fundamental (S_0), é ativado para um estado excitado singlete de vida curta (S_1), podendo retornar ao estado S_0 por um processo radiativo, emitindo um fóton (fluorescência) ou por conversão interna com perda de energia na forma de calor (processo não radiativo), ou ainda, via cruzamento intersistema, produzir um estado tripleto excitado de vida longa (T_1).⁴⁹ A partir deste estado, basicamente por dois

mecanismos de reação (Reações do Tipo I e II), são geradas as espécies citotóxicas, formando espécies de vida curta e altamente reativas de alta citotoxicidade, que podem provocar sérios danos à membrana celular, mitocôndrias e núcleo, levando a morte celular por apoptose ou necrose.^{50, 51}

Reações do Tipo I podem produzir radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio, como ânions superóxidos, radicais hidroxila, peróxidos de hidrogênio e etc., que são resultantes da transferência de elétrons ou hidrogênios entre a molécula do fotossensibilizador no estado excitado T_1 e moléculas biológicas. As reações do Tipo II ocorrem via transferência de energia entre o estado tripleto do fotossensibilizador e o oxigênio molecular, o qual é um tripleto no seu estado fundamental. Esta interação permitida por spin leva a formação do oxigênio singleto (1O_2). A reação do Tipo II possui mecanismo mais simples, por isso o 1O_2 é a principal espécie citotóxica na TFD.⁵² A geração desta espécie pode ser detectada pela medida da emissão do 1O_2 em 1270 nm. As espécies geradas são altamente reativas. Devido à alta citotoxicidade, podem provocar sérios danos à membrana celular, mitocôndrias e núcleo, levando a morte celular por apoptose ou necrose e, assim, ocorre a destruição do tecido alvo.³⁶

1.3.2 Fármacos fotossensibilizadores

Os agentes fotossensibilizadores (FS) são corantes orgânicos caracterizados por absorverem luz com elevada eficiência em alguma região do espectro visível e, por isso, são capazes de induzir ou participar de reações fotoquímicas.⁵³ Os FS de primeira geração são os derivados da Hematoporfirina (HpD), que é um tetrapirrol cíclico (Figura 6). A maioria dos FS apresenta estrutura em anel tetrapirrólico, semelhante à da protoporfirina, contido na hemoglobina. Dentre os derivados da HpD, o primeiro a ser utilizado clinicamente, mais conhecido e aprovado em vários países é o Photofrin II® (porfímero sódico).⁵⁴ O ácido 5-aminolevulínico (ALA) e seu derivado lipofílico, o metilaminolevulinato (MAL) são os fármacos fotossensibilizadores mais utilizados atualmente em aplicações dermatológicas da TFD. O ALA é um pró-fármaco precursor metabólico do fotossensibilizador endógeno protoporfirina IX (Pp IX), um potente agente fotossensibilizador.⁵⁵

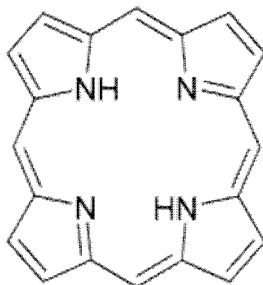


Figura 6. Estrutura química da porfirina formada por anel tetrapirrólico.

Efeitos colaterais apresentados pelos compostos derivados da HpD, como fotossensibilização de longa duração da pele e absorção em 630 nm relativamente baixa, levaram ao desenvolvimento de novas moléculas, chamadas de fotossensibilizadores de segunda e terceira geração, como as ftalocianinas, clorinas e bacterioclorinas. A vantagem desses fármacos sobre os FS de primeira geração é a absorção da luz na região entre 600 e 850 nm, onde os cromóforos biológicos normalmente não a absorvem.⁵⁶

Dentre os compostos de segunda geração, as ftalocianinas recebem destaque por apresentarem diversas vantagens: elas são eficientes geradoras de oxigênio singleto e possuem uma forte banda de absorção na faixa de 600-800 nm, dentro da janela terapêutica, ou seja, a penetração da luz no tecido (tumor) é aumentada pela ausência da interferência de cromóforos endógenos do próprio sistema biológico.^{57, 58} As ftalocianinas mimetizam as porfirinas em seu macrociclo central na estrutura cíclica tetrapirrólica. Algumas das vantagens para o emprego das ftalocianinas na TFD relacionam-se a sua seletividade pelos tecidos tumorais, baixa fototoxicidade e eficiência na produção de oxigênio singleto.⁵⁹ Entre as ftalocianinas metálicas (Figura 7), a ftalocianina de cloroalumínio (AlClPc) apresenta as propriedades fotofísicas mais favoráveis para aplicação na TFD, ou seja, longo tempo de vida dos estados excitados singleto e tripleto, que são produzidos com bons rendimentos.⁶⁰

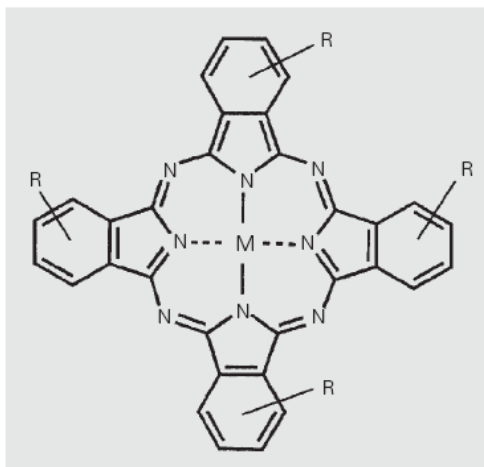


Figura 7. Estrutura de uma ftalocianina onde M é o metal central (Al, Zn, Si) e R representa possíveis substituintes (SO_3H , S_2 , F, COOH).⁶⁰

A retenção seletiva dos fotossensibilizadores em células tumorais ocorre devido a características diferenciais dos tecidos malignos, que estão relacionadas à sua alta taxa de divisão celular e, portanto, a alta demanda por oxigênio e nutrientes. O tecido maligno apresenta aumento do número e da permeabilidade dos vasos sanguíneos e a drenagem linfática diminuída. Além disso, as células malignas apresentam permeabilidade da membrana celular alterada. A metabolização da glicose para produção de energia é intensa, o que leva a alta produção de ácido lático como subproduto. Consequentemente, o pH é baixo no fluido intersticial dos tumores e este fator facilita a biodistribuição seletiva dos fotossensibilizadores.⁶¹ Porém, o principal fator que limita a sua utilização é a considerável hidrofobicidade dessas moléculas e consequente impossibilidade de administração em meio fisiológico (aquoso). Tem-se recorrido a Tecnologia Farmacêutica para desenvolver sistemas de liberação de fármacos capazes de carrear compostos hidrofóbicos em meio aquoso, possibilitando a utilização dos mesmos nesta terapêutica.⁴⁹

1.4 Sistemas de liberação de fármacos

Uma variedade de novas abordagens e protocolos terapêuticos têm emergido nos últimos anos, como consequência dos avanços no campo da nanobiotecnologia aplicada, para tratar um grande espectro de doenças. A nanotecnologia está mudando a forma de realizar a liberação do agente terapêutico e sua vetorização ao

sítio de ação. No caso da aplicação na terapêutica câncer, estas tecnologias inovadoras tendem a ser menos invasivas e mais eficazes quando comparadas com as técnicas mais convencionais de tratamento anti-tumorais: cirurgia, radioterapia e quimioterapia.^{11, 62, 63}

Um sistema de liberação de fármacos é geralmente concebido para melhorar o perfil farmacológico e terapêutico de uma molécula bioativa. Problemas associados com a administração de uma substância na forma livre, tais como baixa solubilidade nos fluidos orgânicos, limitada biodistribuição, falta de seletividade (danos aos tecidos saudáveis) e instabilidade em meio fisiológico, podem ser superados pelo uso de um carreador adequado. Deste modo, os sistemas de liberação de fármacos promovem concentração plasmática adequada ou níveis de concentração tecidual de fármacos de forma controlada e/ou sustentada, atingindo o efeito terapêutico desejado e evitando possíveis reações tóxicas inerentes ao princípio ativo. Estes sistemas podem sustentar a liberação do princípio ativo, retardar a sua liberação e/ou direcioná-lo a sítios específicos de ação (células, órgãos, microorganismos). Na terapia medicamentosa utilizando formas farmacêuticas convencionais como comprimidos, soluções, suspensões, emulsões, cápsulas, etc. torna-se impossível manter as concentrações plasmáticas de muitos fármacos em nível terapêutico por longo período de tempo. Isto porque, essas formas farmacêuticas liberam todo seu conteúdo de imediato gerando inicialmente um pico máximo de concentração plasmática que pode atingir níveis tóxicos; e logo após, uma concentração insuficiente de ação, ou seja, uma dose sub-terapêutica, o que proporciona flutuações aleatórias da biodisponibilidade do princípio ativo.⁶⁴

O desenvolvimento destes sistemas têm melhorado as propriedades terapêuticas e toxicológicas de agentes quimioterapêuticos e fotoquimioterapêuticos existentes e promoveu a implementação de novos agentes. Veículos vetorizados em TFD são formados pela ligação covalente de fotossensibilizadores a moléculas, que têm afinidade pela neoplasia ou por receptores expressados em tumores específicos.⁶⁵ Estas moléculas incluem anticorpos, peptídeos, proteínas, ácido fólico, e muitas outras.³⁶

Uma ampla variedade de biomateriais com as propriedades biológicas adequadas são oferecidos hoje como uma potencial ferramenta para ser usada como um sistema de liberação de fármacos. Atenção considerável tem sido dada para a utilização de sistemas baseados em polímeros biocompatíveis. Através da

combinação de fármacos com diferentes polímeros, sintéticos ou naturais, é possível otimizar a farmacocinética e biodistribuição dos agentes, e, por conseguinte, a eficácia e segurança da terapia são melhoradas.⁶⁶ Além disso, o polímero pode oferecer proteção contra degradação enzimática, hidrolítica e outros tipos de degradação química.⁶⁷

Sistemas poliméricos de liberação podem ser concebidos de várias formas, incluindo matrizes ou membranas, em que o ingrediente ativo é disperso ou dissolvido.^{68, 69, 70} A via de administração, a formulação do carreador, o mecanismo de liberação e as propriedades físico-químicas das moléculas de fármacos são fatores determinantes que influenciam na taxa de liberação do fármaco e devem ser considerados na escolha de um polímero apropriado para o desenvolvimento de um dispositivo de liberação.⁷¹ Além disso, as propriedades dos polímeros também precisam ser consideradas. Estes devem ser quimicamente inertes à ação do fármaco, e apresentar as características físicas apropriadas para a aplicação pretendida.⁷²

O presente trabalho estudou a administração do fotossensibilizador por via tópica. A aplicação tópica destes fármacos oferece vantagens particulares em relação a tradicional administração aplicada em TFD, sistêmica por via intravenosa, que incluem atuação direta sobre as células-alvo⁷³, melhor controle de dosagem⁷⁴, ausência do metabolismo hepático de primeira passagem, redução da incidência de toxicidade sistêmica e minimização de fotossensibilidade⁷⁵.

1.5 Celulose bacteriana

Devido a suas características peculiares, a celulose bacteriana pode funcionar como um sistema de liberação controlada de fármacos. A molécula da celulose é um homopolissacarídeo linear, não-ramificado, tendo de 10.000 a 15.000 unidades de D-glicose. Na celulose as unidades de glicose têm a configuração β , unidas por ligações glicosídicas do tipo $(\beta 1 \rightarrow 4)$.^{76, 77} Sua estrutura está apresentada na Figura 8.

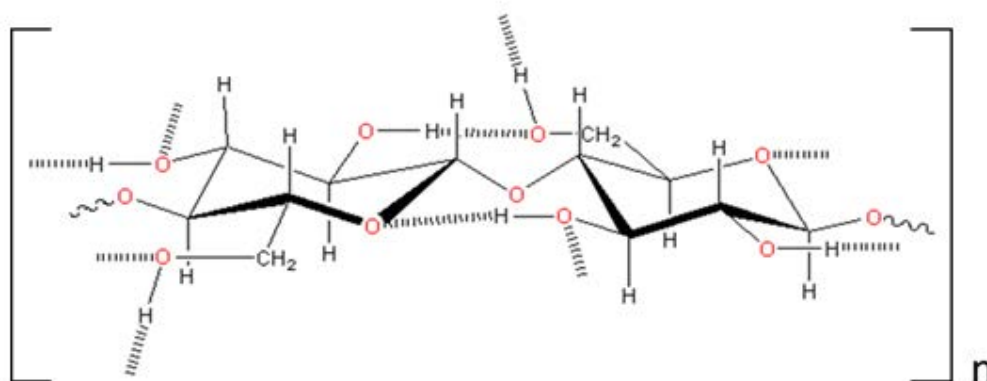


Figura 8. Estrutura linear da celulose. As linhas pontilhadas esquematizam as ligações de hidrogênio possíveis.

A celulose bacteriana é produzida pela *Gluconacetobacter sp.* e possui propriedades especiais que a diferem consideravelmente da celulose vegetal, sendo obtida como uma membrana hidratada, pura quimicamente, ou seja, livre de lignina e hemicelulose, possui boa transparência e peso molecular superior à celulose vegetal. Quando *in natura* é altamente hidratada com teor de água superior a 90%.⁷⁷

A CB possui cadeias de celulose organizadas com um arranjo estrutural tridimensional altamente cristalino (60-80%) com excelente força mecânica, devido as suas estruturas nanofibrilares que são cem vezes menores quando comparadas à celulose de planta. Devido à rede de celulose de fios nanométricos e a elevada presença de água, a CB apresenta poros em seus interstícios. Essa “malha aberta” possibilita a incorporação de compostos orgânicos/inorgânicos em sua estrutura. Essa morfologia nanométrica confere a CB grande área superficial, boa elasticidade, além de ser facilmente moldável. Além dessas propriedades, a CB também é obtida de fontes renováveis, é biodegradável, é biocompatível, não tóxica e não alergênica.^{77, 78, 79}

A CB tem provado ser um biomaterial extremamente versátil. Atualmente possui várias aplicações biomédicas⁸⁰ e, mais especificamente, em sistemas de liberação de fármacos^{81, 82}, decorrentes da sua nanoestrutura e de suas propriedades físicas e mecânicas⁸³. Diversos estudos indicam que o uso tópico da membrana de celulose como pele artificial para cobrir lesões promove a cicatrização de queimaduras e feridas crônicas, devido a características como a alta força mecânica da membrana úmida, permeabilidade substancial a líquidos e gases e

baixa irritação da pele.⁸⁴ Estas propriedades também favorecem a utilização da membrana de celulose bacteriana como sistema de liberação de fármacos. Tais membranas são particularmente vantajosas em sistemas de liberação por via tópica ou transdérmica onde existe uma demanda pela capacidade de absorver os exsudados e aderir a superfícies irregulares da pele, tais como a mucosa oral.^{85, 86, 87, 88} Além disso, o estudo de Almeida *et al.* mostrou que a pele apresenta uma boa tolerância às membranas de CB.⁸⁹ Loures mostrou que a CB pode ser impregnada com agentes terapêuticos que são liberados durante um período de dias ou semanas.⁹⁰ Como a maioria dos sistemas transdérmicos são fabricados por meio da sobreposição de diferentes materiais, um sistema composto por um número menor, ou mesmo por uma única camada, tal como o filme de CB, pode simplificar o processo de preparação e reduzir os custos de produção.⁹¹ A quitosana, quimicamente relacionada com a celulose, foi estudada em tratamentos de TFD.^{92, 93} Tendo em vista estes fatos, o desenvolvimento de novos sistemas a base de CB podem ser eficazes na liberação de AICIPc e devem permitir o seu uso clínico na TFD tópica.

2 OBJETIVOS

Tendo em vista o estado da arte apresentado no item anterior, a meta principal deste trabalho é a preparação de membranas de celulose bacteriana contendo compostos de íons lantanídeos e AlClPc. Para tanto os objetivos intermediários deste trabalho são:

- i) Preparo e caracterização nanopartículas de vanadato de ítrio dopadas com os íons Yb^{3+} - Er^{3+} e Yb^{3+} - Ho^{3+} . Variação da concentração relativa dos dopantes e otimização da síntese a fim de se obter maior rendimento de conversão infravermelho-vermelho e a emissão na região de absorção/excitação da ftalocianina de cloroalumínio (AlClPc);
- ii) Produção de celulose bacteriana (CB) otimizando as características de espessura e transparência;
- iii) Incorporação de AlClPc e/ou nanopartículas de YVO_4 em matriz polimérica de CB;
- iv) Estudo *in vitro* de permeação/retenção cutânea do fármaco incorporado nas membranas de CB com uso das células de Franz;
- v) Estudo das propriedades fotofísicas das membranas de CB incorporadas com AlClPc com ou sem nanopartículas de YVO_4 .

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Síntese das nanopátículas YVO_4

Nanopátículas de vanadato de ítrio contendo os pares Yb^{3+} - Er^{3+} ou Yb^{3+} - Ho^{3+} foram preparadas com base em trabalhos descritos na literatura ^{94, 95}.

Vanadato de sódio (Na_3VO_4) foi preparado pela reação no estado sólido entre óxido de sódio (Na_2O) e metavanadato de sódio ($NaVO_3$). Na_2O e $NaVO_3$ foram pesados na proporção 1:2 e misturados em um almofariz. A mistura foi colocada em um cadinho de platina e levada a um forno a 600 °C por 24 horas em atmosfera de nitrogênio, a uma taxa de aquecimento de 15 °C/min.

Nitrato de ítrio foi obtido a partir da reação do óxido de ítrio com ácido nítrico na proporção estequiométrica (1:6), sob aquecimento e agitação. Após a dissolução do pó, evaporou-se o ácido até atingir o pH 5,0. O preparo dos cloretos de itérbio, érbio e hólmio procedeu-se de maneira similar, porém com o uso de ácido clorídrico. Para a determinação das concentrações finais das soluções, adicionou-se 50 μ L de nitrato ou cloreto de lantanídeo a 5 mL de tampão acetato pH 6,0 e titulou-se com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 0,01 mol.L⁻¹, na presença do indicador alaranjado de xilenol.

Foram misturadas sob agitação as soluções a 1 mol.L⁻¹ de $Y(NO_3)_3$ (7,9 mL), $YbCl_3$ (2,0 mL) e $ErCl_3$ (0,1 mL) a fim de se obter a relação molar Y:Yb:Er = 79:20:1. Adicionou-se uma solução aquosa de citrato de sódio a 2 mol.L⁻¹ (5 mL) que levou à formação de um precipitado branco de citrato de lantanídeo, o qual foi mantido sob agitação por 1 hora. O precipitado foi completamente dissolvido pela adição da solução aquosa de Na_3VO_4 recém-preparada a 0,3 mol.L⁻¹ com pH entre 12,5 e 13,0 (30 mL). A solução transparente obtida foi mantida sob agitação e aquecimento a 60 °C por 45 minutos. Em seguida, a amostra foi dialisada contra água Milli-Q em membrana para diálise (Sigma-Aldrich, D9652) até a medida da condutividade da água ser igual a 0,000 μ S.cm⁻¹, o que foi atingido com 72 horas de diálise com trocas de água a cada 6 horas. A secagem das nanopátículas foi feita por liofilização. O pó obtido foi tratado termicamente a 600, 700, 800, 900 e 1000 °C por 5 ou 60 minutos.

Outras variações nas concentrações dos dopantes foram obtidas pelo mesmo procedimento, alterando apenas as quantidades de precursores (nitrato de ítrio e

cloretos de érbio ou hólmio) adicionadas. O processo de síntese das nanopartículas está ilustrado na Figura 9.

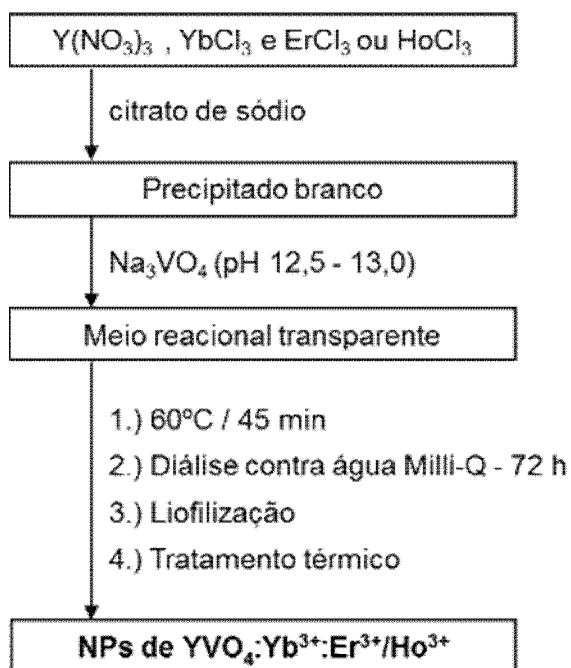


Figura 9. Processo para síntese das nanopartículas de YVO₄.

3.2 Preparo das membranas de celulose bacteriana

A celulose bacteriana (CB) foi sintetizada pelas linhagens de bactéria *Gluconacetobacter sp.* em meio de cultura a 30 °C, sob condições estáticas durante diferentes tempos de crescimento, com a finalidade de obter membranas diferentes quanto à espessura e transparência. O meio de cultura utilizado apresenta a seguinte composição básica: glicose 50 g.L⁻¹, extrato de levedura 4 g.L⁻¹, fosfato de potássio monobásico anidro 2 g.L⁻¹, sulfato de magnésio heptahidratado 0,73 g.L⁻¹ e etanol 20 g.L⁻¹.⁹⁶ As bactérias foram cultivadas nesse meio por 24 h e subsequentemente, após esse período, o frasco foi vigorosamente agitado e 10 % do meio de cultura foi retirado e inoculado em um novo meio de cultura durante 24 h, 48 h e 72 h a 30 °C.

Foram utilizadas duas linhagens de bactéria para produzir CB: uma comercial (ATCC 23760, *Gluconacetobacter xylinum*); e outra isolada no laboratório (GL) e

identificada pelo CPQBA da Unicamp. As membranas foram produzidas em dois tempos de crescimento: ATCC (2 e 3 dias) e GL (1 e 3 dias).

Para purificação das CBs obtidas, as membranas foram inicialmente lavadas com água Milli-Q e depois tratadas com NaOH 0,1 M a 80 °C por 30 minutos, para remoção das células bacterianas aderidas e outras impurezas. Em seguida foram novamente lavadas com água Milli-Q até atingir pH neutro.

As membranas puras foram armazenadas em geladeira imersas em etanol com a finalidade de favorecer a incorporação da AICIPc e nanopartículas, ambas adicionadas à CB em meio etanólico.

Para caracterizar as CBs puras, as membranas foram secas a 28 °C até atingirem massa constante.

3.3 Incorporação das membranas de CB com AICIPc e nanopartículas

Amostras das quatro diferentes membranas de CB úmidas (ATCC 2 e 3 dias; GL 1 e 3 dias) foram cortadas em pedaços de 5 x 5 cm. As membranas foram pesadas e 50% da massa (referente ao solvente) foram removidos exercendo pressão sobre a superfície, para favorecer o intumescimento com as soluções contendo AICIPc e/ou NPs, que foram adicionadas em seguida.

As membranas foram imersas em 25 mL das soluções de AICIPc em etanol nas seguintes concentrações: 1, 5 e 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e permaneceram sob agitação horizontal durante 6 horas a 25°C. As membranas foram secas a 28 °C em estufa com ventilação, até obterem massa constante.

As nanopartículas foram incorporadas na CB seguindo o mesmo procedimento. As membranas (5 x 5 cm) foram imersas em 25 mL de suspensão das NPs em etanol na concentração de 0,04 %.

Para incorporação de AICIPc e NPs na mesma membrana, as mesmas quantidades de AICIPc e NPs foram adicionadas, mantendo o volume final de 25 mL.

A Tabela I mostra as diferentes amostras obtidas de acordo com a linhagem da bactéria, tempo de crescimento e concentração de AICIPc.

Tabela I. Amostras de CB-AICIPc para as linhagens ATCC e GL.

ATCC			GL		
Amostra	Tempo de crescimento (dias)	[AICIPc] ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Amostra	Tempo de crescimento (dias)	[AICIPc] ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
<i>A2d1</i>	2	1	<i>G1d1</i>	1	1
<i>A2d5</i>	2	5	<i>G1d5</i>	1	5
<i>A2d10</i>	2	10	<i>G1d10</i>	1	10
<i>A3d1</i>	3	1	<i>G3d1</i>	3	1

3.4 Eficiência de incorporação de AICIPc

O conteúdo de AICIPc presente nas membranas de CB foi determinado por método analítico validado.⁹⁷ Primeiramente, amostras de CB-AICIPc (1 mg) foram imersas em 5 mL de acetonitrila a 60°C/15 minutos, para liberar todo o conteúdo não incorporado de AICIPc (ftalocianina livre). Após essa etapa de extração, a mesma membrana foi imersa em 5 mL de acetonitrila e homogenizada em ultra-turrax da IKA (modelo T8-Basic) a 11000 rpm por 5 minutos, para quantificar a AICIPc retida na CB. A concentração total de fármaco (T_{PC}) foi calculada pela soma dos valores encontrados nos dois passos sequenciais descritos acima: i. Extração em acetonitrila; ii. Homogeneização em ultra-turrax. Ambas concentrações foram obtidas a partir da curva padrão de calibração. A eficiência de incorporação (EI) foi calculada segundo a equação:

$$EI (\%) = T_{PC} - L_{PC} / C_{PC} \times 100 \quad (1)$$

Onde T_{PC} representa a concentração total de ftalocianina na formulação das membranas, L_{PC} a concentração de ftalocianina livre quantificada e C_{PC} a concentração teórica (concentrações incorporadas de 1, 5 e 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$).

A concentração foi estimada a partir da intensidade do pico de emissão de fluorescência em 680 nm, característico da ftalocianina de cloroalumínio, sob excitação em 615 nm. Os ensaios foram realizados em duplicata. A análise

estatística dos dados foi feita usando o software Origin Pro 8.0 pelo método one-way ANOVA ao nível de significância $p < 0,05$.

3.5 Estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro*

Experimentos de permeação e retenção cutânea foram desenvolvidos em células de difusão de Franz com controle de temperatura ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) e velocidade de agitação (300 rpm). Cada célula possui um compartimento receptor de 7 mL, uma área de $1,77\text{ cm}^2$ para a difusão da amostra, conforme ilustrado na Figura 10.

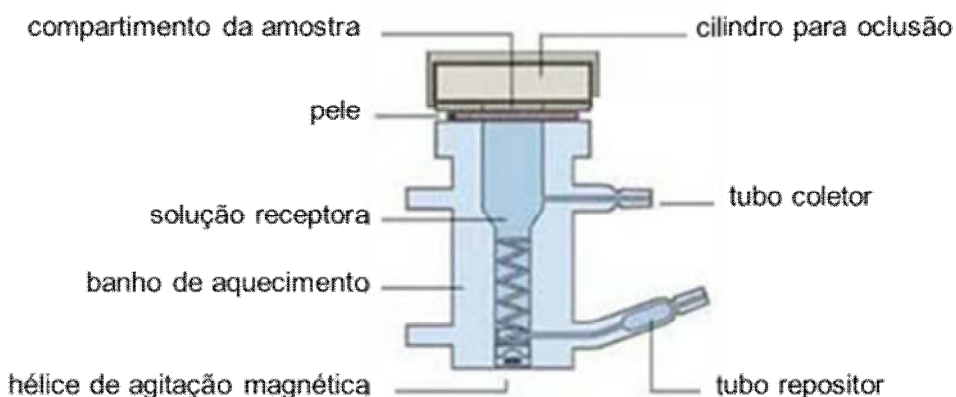


Figura 10. Modelo de célula de difusão de Franz. ⁹⁸

Orelhas de porco, usadas como modelo de pele, foram obtidas diretamente de abatedouro (Olhos d'Água Ind. e Com. de Carnes Ltda., Ipuã - SP). A parte anterior da orelha foi dissecada e o tecido gorduroso presente abaixo da derme foi removido. As peles foram aplicadas nos ensaios na forma *in natura*.

A quantificação da AICIPc foi obtida a partir da intensidade do pico de emissão de fluorescência em 680 nm, sob excitação em 615 nm. Construiu-se uma curva padrão de calibração para quantificar a AICIPc presente no meio da solução receptora - tampão fosfato salino (PBS), pH 7.4, e etanol (10% v/v). O tampão PBS foi composto por: fosfato de sódio dibásico anidro 10 mM, fosfato de potássio monobásico 2 mM, cloreto de sódio 137 mM e cloreto de potássio 2,7 mM. Foram feitas coletas de 1,5 mL da solução receptora em diversos intervalos até atingir 12

horas de ensaio. O volume meio receptor foi repostado imediatamente após cada coleta, a fim de manter o fluxo estático.

A quantidade em massa de fármaco permeado é dada pela área de tecido exposta à aplicação (1,77 cm²) e é calculada pela seguinte equação:

$$Q_{\text{real}, t} = (C_{\text{mensurado}, t}) \cdot V_r + (\sum^{n-1} C_a) \cdot V_a \quad (2)$$

Assim, a quantidade real permeada no tempo t ($Q_{\text{real}, t}$), é a concentração mensurada no tempo t ($C_{\text{mensurado}, t}$) multiplicada pelo volume da célula receptora (V_r), somada à quantidade de fármaco das coletas anteriores, ou seja, a concentração da amostra removida nos tempos anteriores à t (C_a) multiplicada pelo volume da coleta (V_a).

Após o término das coletas, também foram obtidas as concentrações de AICIPc retidas no estrato córneo (pela técnica de *tape stripping*) e na epiderme e derme (pela homogeneização da pele) em solvente acetonitrila.⁹⁷

Para extrair o estrato córneo, delimitou-se a área da pele que foi exposta ao fármaco e 15 pedaços de fita adesiva do tipo Durex (3M) de 20 mm foram aplicadas sobre a região. As fitas foram imersas em 5 mL de acetonitrila, levadas a um banho de ultra-som por 30 minutos e retiradas do meio extrator após 4 horas para as leituras.

A pele sem o estrato córneo foi triturada em homogeneizador ultra-turrax da IKA (modelo T8-Basic) em 5 mL de acetonitrila e, após 4 horas, foi centrifugada (a 5000 rpm por 15 minutos) para fazer a leitura do sobrenadante.

Os perfis de permeação da AICIPc foram estudados para as membranas G1d1 e A2d1, ambas com concentração de AICIPc igual a $4,6 \times 10^{-5}$ $\mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2}$. As membranas foram aplicadas sobre a pele e, para umedecê-las, adicionou-se 15 μL do meio receptor sobre estas. Realizou-se também um ensaio controle (sem a matriz de celulose bacteriana), aplicando sobre a pele 200 μL de solução $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de AICIPc em PBS (pH 7,4) e etanol (10% v/v). Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes, com cinco replicatas em cada um, e os resultados foram selecionados à um nível de confiança de 95%. A análise estatística dos dados foi feita usando o software Origin Pro 8.0 pelo método one-way ANOVA ao nível de significância $p < 0,05$.

3.6 Estudos fotofísicos

O estudo das propriedades fotofísicas foi realizado para as membranas de CB obtidas a partir da linhagem ATCC produzidas em 1 dia (A1d) por serem membranas mais transparentes. Estas membranas foram incorporadas com AICIPc de concentração teórica de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (A1d5) com ou sem a presença de NPs de $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Ho}^{3+}$ tratadas a 1000°C por 5 por minutos. Como referência para este estudo, avaliou-se também solução de AICIPc livre em etanol e solução etanólica de AICIPc contendo as mesmas NPs suspensas a 0,04%. Solução etanólica de feoforbide-a foi utilizada como padrão para análise do oxigênio singlete.⁹⁹ Os espectros de absorção no UV-visível foram previamente obtidos para ajustar as concentrações das amostras líquidas analisadas. A absorbância das amostras no comprimento de onda de excitação (355 nm) foi fixada em 0,3 a fim de evitar qualquer efeito de filtro interno. O software de aquisição do equipamento (Gem®, Edinburgh Analytical Instruments) foi utilizado para obtenção e análise das curvas de decaimento exponenciais. Os ajustes exponenciais foram feitos com base no processo iterativo de reconvolução dos quadrados mínimos gerada a partir do algoritmo de Marquardt (análise não linear dos quadrados mínimos).¹⁰⁰

3.7 Equipamentos

Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (FEG/MEV) foi realizada em um equipamento LEO (modelo 440) com detector OXFORD, acoplado a um detector de energia dispersiva de raios-x (EDS).

As CBs foram caracterizadas em relação à espessura das membranas em um perfilômetro FormTracer, modelo SV– CS25.

As distribuições de tamanho (diâmetro hidrodinâmico) das nanopartículas foram medidas por meio da Espectroscopia de Correlação de Fótons (PCS) em um equipamento PCS-100 Brookhaven Instruments, com goniômetro modelo BI-200SM, laser de 25 mW, comprimento de onda de 532 nm, índice de refração real 1,520 e índice de refração imaginário igual a 0,100. As medidas foram realizadas a 25°C com detector em um ângulo fixo de 90° . Cada análise durou 30 segundos e as medidas de tamanho foram expressas como a média de dez determinações.

As curvas termogravimétricas foram obtidas em um equipamento SDT da TA Instruments. Os experimentos foram realizados sob atmosfera de nitrogênio cujo fluxo foi 70 mL/min e a varredura foi feita até 900 °C com uma velocidade de 10 °C/min.

Os difratogramas de raios-X foram obtidos em difratômetro Siemens Kristalloflex modelo D5000, com filtro de níquel e radiação K_{α} de tubo de Cu ($\lambda = 1,541 \text{ \AA}$) entre os ângulos 2θ de 15 a 90°, tempo de contagem de 10 segundos e passo de 0,01.

Espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos no espectrômetro FT-IR, modelo Spectrum 2000 da Perkin Elmer, utilizando pastilhas de KBr. Trinta e duas varreduras foram realizadas na faixa de número de onda entre 4000 to 370 cm^{-1} com resolução de 2 cm^{-1} .

A espectroscopia eletrônica na região do visível foi realizada no espectrômetro de UV-Visível do modelo Varian Cary 500.

Os espectros de emissão de fluorescência das nanopartículas foram obtidos no fluorímetro Horiba Jobin Yvon (Spex Fluorolog-3), medidos à temperatura ambiente e os espectros foram corrigidos pela resposta instrumental. Como fonte de excitação das amostras, foi ligado externamente um laser de diodo operando em 980 nm. A potência máxima do laser aplicada foi de 900 mW.

A quantificação da AICIPc presente nas membranas de CB foi obtida no mesmo fluorímetro, utilizando-se lâmpada de Xe de 400 W de potência como fonte de excitação.

A caracterização das propriedades fotofísicas foi realizada em espectrofotômetro de fluorescência resolvida no tempo, modelo FL9000CD da Edinburgh Analytical Instruments. A fonte de irradiação foi um laser pulsado Nd-YAG (Continuum, Santa Clara, CA), modelo Surelite I-10, com frequências de pulsos de 8 ns, com intervalo de potência de 1 a 50 mJ por pulso. O equipamento foi ajustado para utilizar como fonte de excitação o terceiro harmônico do laser em 355 nm. Foram determinados os perfis de decaimento exponenciais com o cálculo do tempo de vida e taxa de distribuição com ajuste de frequência de 0,5 Hz e conjunto de 10 tiros sequenciais com potência de laser de aproximadamente 30 mJ. Para detecção do sinal do transiente gerado, utilizou-se um monocromador Bentham Instruments Ltda. (Livingston, UK), modelo M300, e uma fotomultiplicadora modelo Hamamatsu modelo R928P. Em estudos envolvendo a detecção do oxigênio singleto, o sinal de

fosforescência deste em 1270 nm foi identificado utilizando um fotodetector de germânio da North Coast Scientific Corporation, modelo 823. Os sinais do transiente e do oxigênio singleto gerados foram coletados utilizando-se um osciloscópio digital da Tetronix, modelo TDS 340A. As escalas do osciloscópio foram fixadas em 10 mV e 1 μ s para todas as medidas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Nanopátículas YVO_4

4.1.1 Caracterização do precursor ortovanadato de sódio

A primeira etapa da síntese das nanopartículas consistiu na obtenção do precursor ortovanadato de sódio (Na_3VO_4), preparado a partir da reação no estado sólido entre óxido de sódio (Na_2O) e metavanadato de sódio (NaVO_3) a 600 °C, por 24 horas, sob atmosfera de nitrogênio. O pó resultante desta reação foi identificado por análise por difração de raios X. A Figura 11 mostra o difratograma com os padrões difratométricos de fases referentes ao ortovanadato de sódio, Fichas JCPDS No. 28-1175 e 27-0826 disponibilizadas pelo ICDD (*International Center for Diffraction Data*). Ambas as fases foram publicadas por Barker *et al.*⁹⁴ em um trabalho que correlacionou as condições da síntese de vanadatos de sódio com padrões de difração de raios X. Dentre diversos precursores testados, apenas a reação entre Na_2O e NaVO_3 ocorre sem haver fusão. A fase JCPDS No. 28-1175 foi publicada pela primeira vez neste trabalho e sua formação foi atribuída a reação entre Na_2O e NaVO_3 em temperaturas mais baixas (315 ou 375 °C), enquanto a fase JCPDS No. 27-0826 é resultante da reação em alta temperatura (550 °C).

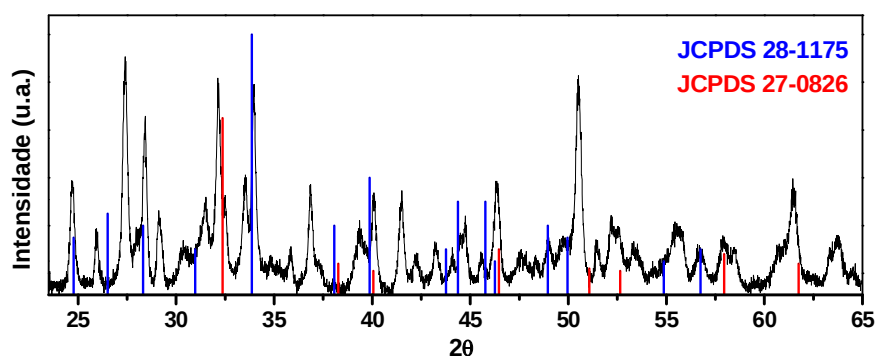


Figura 11. Difratograma do pó obtido da síntese do ortovanadato de sódio.

A espectroscopia de energia dispersiva (EDS) foi aplicada na análise elementar do produto da síntese do ortovanadato de sódio. A Figura 12 mostra o espectro EDS que confirmou a presença dos elementos da fórmula Na_3VO_4 .

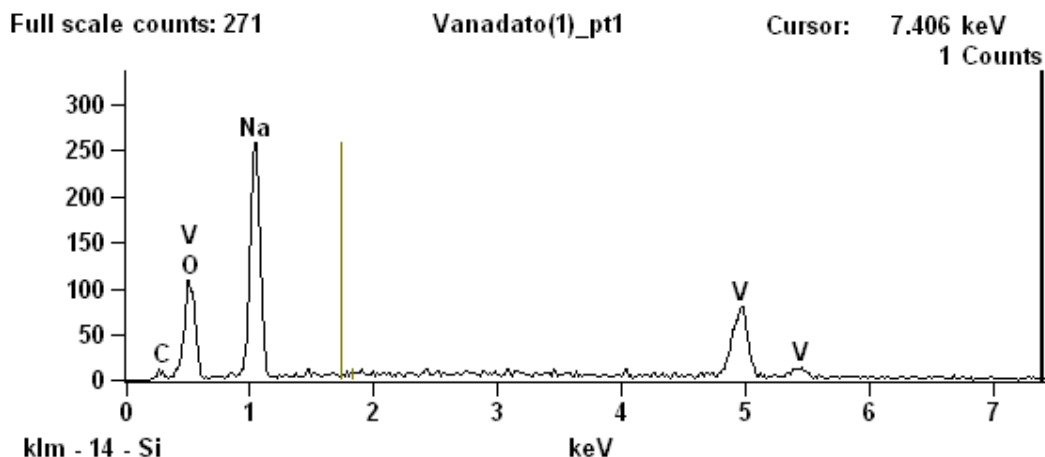


Figura 12. Espectro EDS do pó obtido da síntese do ortovanadato de sódio.

4.1.2 Caracterização das nanopartículas

As nanopartículas de YVO_4 dopadas com os íons $\text{Yb}^{3+}\text{-Er}^{3+}$ e $\text{Yb}^{3+}\text{-Ho}^{3+}$ foram obtidas na forma de pó de coloração branca após a secagem por liofilização e amarelada após tratamento térmico (TT), como mostra a Figura 13.



Figura 13. Pó obtido da síntese das nanopartículas antes (A) e após tratamento térmico (B).

A morfologia das nanopartículas foi avaliada pela microscopia eletrônica de varredura (MEV). A Figura 14 mostra as imagens das NPs de $\text{YVO}_4\text{:Yb}^{3+}\text{:Er}^{3+}$ após liofilização, sem passar pelo tratamento térmico (A) e após tratamento térmico a 800 °C por 5 minutos (B) e por 1 hora (C). Após o tratamento a 800 °C (C e D), é possível observar a mudança na superfície das partículas e estas revelaram dimensões inferiores a 100 nm juntamente com aglomerados de partículas maiores. Não foi observada diferença entre os diferentes tempos de tratamento.

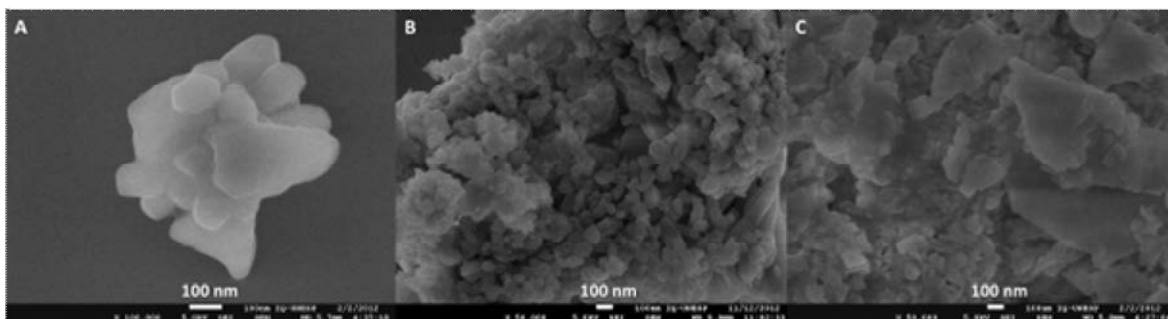


Figura 14. Imagens de MEV das NPs de $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ antes (A) e após tratamento térmico a $800\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos (B) e por 1 hora (C).

A espectroscopia de correlação de fótons foi realizada para determinar o tamanho das partículas, presentes nas soluções coloidais obtidas logo após a diálise, pelo espalhamento de luz. A Figura 15 mostra a distribuição multimodal de tamanho para as nanopartículas $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ e $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Ho}^{3+}$ suspensas em água, cujos diâmetros médios (diâmetros hidrodinâmicos) obtidos foram $13,1\text{ nm}$ e $10,5\text{ nm}$, respectivamente. Como visto nas imagens de microscopia eletrônica, essas partículas se aglomeram no processo de liofilização.

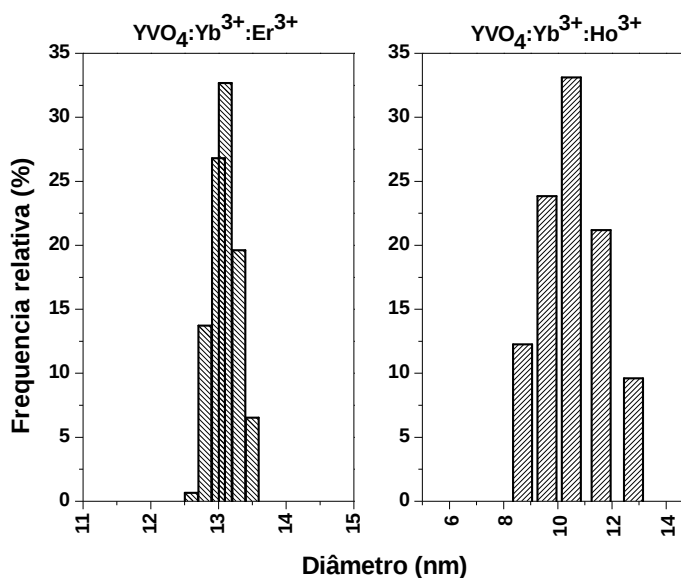


Figura 15. Distribuição multimodal de valores de raio hidrodinâmico para as nanopartículas de YVO_4 dopadas com $\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ e $\text{Yb}^{3+}:\text{Ho}^{3+}$ suspensas em água.

A análise termogravimétrica foi empregada para avaliar o perfil de decomposição térmica do material obtido. As curvas termogravimétricas apresentadas da Figura 16 comparam as amostras de $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ antes do

tratamento térmico e após tratamento a 800 °C por diferentes períodos (5 minutos e 1 hora). Os seguintes eventos térmicos foram observados nas curvas termogravimétricas: (i) Até aproximadamente 130 °C devido à perda de água relacionada à umidade dos materiais; (ii) Na curva C, ao redor de 500 °C referente à degradação da parte orgânica (citrato). Esse evento não é observado nas curvas A e B, pois as amostras tiveram a parte orgânica removida pelo tratamento térmico. A perda gradual de massa a temperaturas mais altas podem ocorrer devido a evaporação de espécies fortemente ligadas como, por exemplo, grupos OH (como presente na água).¹⁰¹ As curvas das amostras tratadas termicamente (A e B) apresentam massa praticamente constante, mostrando que o tratamento térmico aplicado é adequado para remoção da parte orgânica que recobre as partículas após o preparo e impede a observação da luminescência.

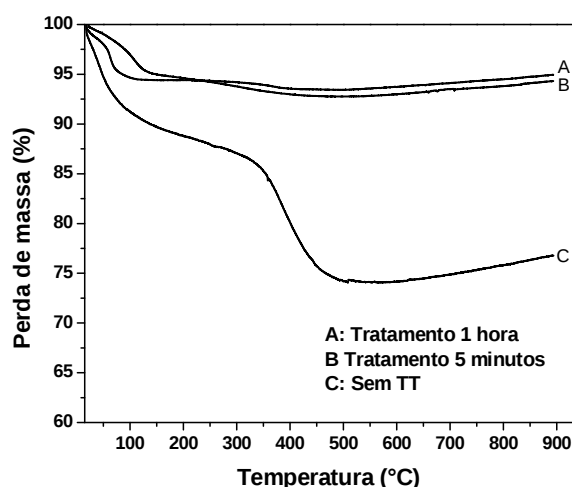


Figura 16. Curva termogravimétrica para amostras de $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ após tratamento térmico de 1 hora (A), 5 minutos (B) e sem tratamento térmico (C).

A Figura 17 mostra os difratogramas obtidos para as nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ antes e após tratamento térmico a 800 °C por 1 hora. As principais reflexões observadas são atribuídas à formação de fase cristalina tetragonal do YVO_4 (Ficha JCPDS No. 17-0341).¹⁰² A formação da fase cúbica do óxido de ítrio (Ficha JCPDS No. 41-1105) também foi observada. Um parâmetro crítico da síntese é o controle do pH (12,5-13,0) para favorecer a precipitação da fase ortovanadato pura. A reação envolve, em um primeiro passo, a precipitação cineticamente favorável do hidróxido de ítrio. Em um segundo passo, o hidróxido de ítrio reage

com o íon ortovanadato presente no meio, pela adição de ortovanadato de sódio, para a formação termodinamicamente estável do vanadato de ítrio. Em pH acima de 13 ocorre formação irreversível de hidróxido de ítrio. O precipitado não consegue reagir com o ortovanadato em condições muito alcalinas. Após a secagem forma-se o óxido de ítrio pela perda de água.¹⁰³

Considerando-se que o limite de detecção da técnica não permitiu revelar a formação de outra fase, propõe-se a substituição do íon Y^{3+} pelos íons Yb^{3+} , Er^{3+} e Ho^{3+} por não se observar nenhuma reflexão que possa ser atribuída à presença destes íons na matriz.

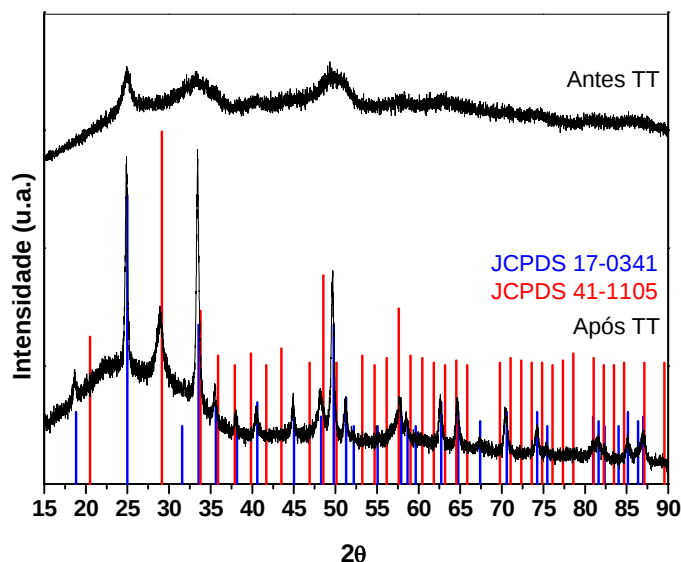


Figura 17. Difratoograma das nanopartículas de $YVO_4:Yb^{3+}:Er^{3+}$ sem tratamento térmico e após o tratamento térmico a 800 °C.

As nanopartículas de $YVO_4:Yb^{3+}:Ho^{3+}$ foram tratadas termicamente com diferentes temperaturas (600, 700 e 800 °C) por 1 hora. Os difratogramas obtidos para estas amostras estão apresentados na Figura 18. Observam-se picos com formas mais bem definidas e com maiores intensidades, indicando um aumento na cristalinidade do material à medida que aumenta a temperatura do tratamento. A formação fase cúbica do Y_2O_3 pode ter ocorrido durante tratamentos térmicos com altas temperaturas (acima de 700 °C), sendo possível observar nos difratogramas o surgimento desta segunda fase cristalina.

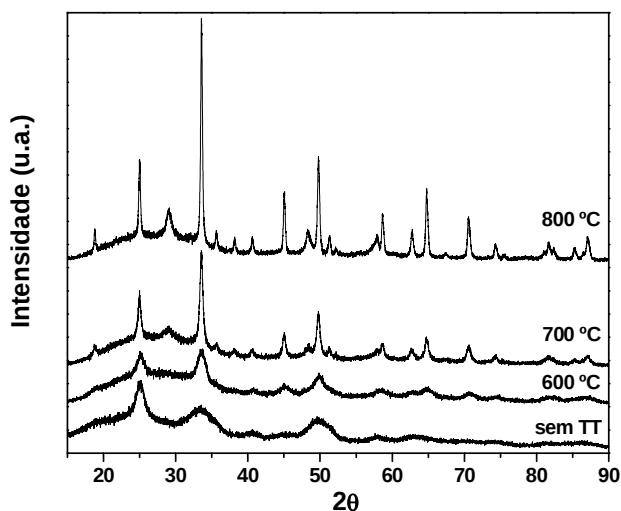


Figura 18. Difratomogramas das nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Ho}^{3+}$ antes do tratamento térmico e tratadas a 600, 700, 800 °C.

O tratamento térmico a 600 °C por 1 hora não levou a formação da fase do óxido de ítrio. O recozimento foi estendido para 24 e 72 horas a 600 °C. Os difratogramas obtidos para estas amostras estão apresentados na Figura 19. A formação da fase do Y_2O_3 (Ficha JCPDS No. 41-1105) é evidenciada pela presença clara do pico em $2\theta=29$.

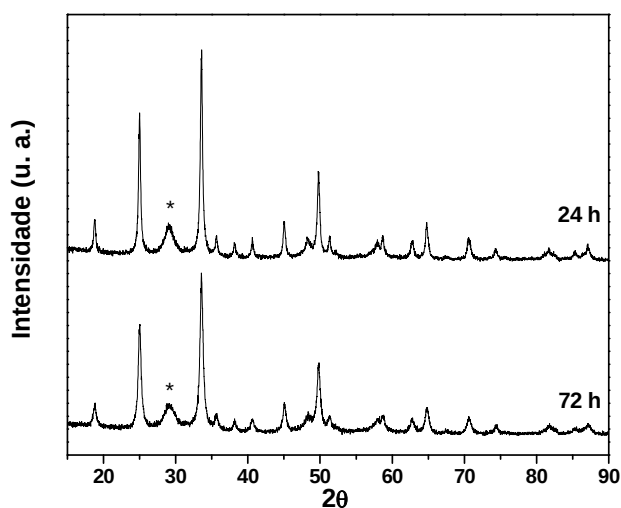


Figura 19. Difratomogramas das nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Ho}^{3+}$ tratadas a 600 °C por 24 e 72 horas. Pico em $2\theta=29$ relacionado à formação da fase do Y_2O_3 (*).

O tamanho médio dos cristalitos pode ser estimado a partir da largura dos picos de difração por intermédio da Equação de Scherrer:

$$d = k \lambda / \beta \cos \Theta \quad (3)$$

Onde d é o tamanho médio dos cristalitos; k é constante de proporcionalidade que depende da forma dos cristalitos, (0,9 quando assumida como sendo esférica); λ é o comprimento de onda da radiação eletromagnética (0,1542 nm), Θ é o ângulo de difração, β é a largura à meia altura do pico de difração (em radianos). Huignard *et al.* obteve os maiores tamanhos dos cristalitos de vanadato de ítrio no pico em $2\Theta=25$ (referente ao plano 200).¹⁰⁴ A Tabela II apresenta os diâmetros médios dos cristalitos obtidos a partir do pico em $2\Theta=25$. Nota-se um aumento do tamanho em decorrência do aumento da temperatura do tratamento térmico. Este aumento de tamanho pode estar diretamente relacionado ao efeito de coalescência entre as partículas.¹⁰⁵

Tabela II. Diâmetro médio dos cristalitos estimado pela Equação de Scherrer.

Amostra	Tratamento térmico	Diâmetro (nm)
$YVO_4:Yb^{3+}:Er^{3+}$	sem tratamento térmico	9,12
	800 °C / 1 h	28,05
$YVO_4:Yb^{3+}:Ho^{3+}$	sem tratamento térmico	6,91
	600 °C / 1 h	9,54
	700 °C / 1 h	22,54
	800 °C / 1 h	29,79

A Figura 20 mostra os espectros vibracionais na região do infravermelho para as amostras de $YVO_4:Yb^{3+}:Ho^{3+}$ tratadas com diferentes temperaturas (600, 700 e 800 °C). A banda em 792 cm^{-1} corresponde a ligação V-O do íon vanadato (VO_4^{3-}).¹⁰⁶ As bandas ao redor de 3400 e 1600 cm^{-1} ocorrem devido às vibrações de deformação e estiramento de grupos hidroxila. As bandas observadas em 1396 e 1570 cm^{-1} são respectivamente devido aos estiramentos simétrico e assimétrico dos grupos carboxilatos. Os pequenos picos em 1076 e 1256 cm^{-1} correspondem ao

estiramento da ligação C-O do citrato.¹⁰⁷ A presença de citrato na superfície das nanopartículas antes do tratamento térmico é evidenciada pelas bandas dos grupos carboxilatos com maior intensidade.

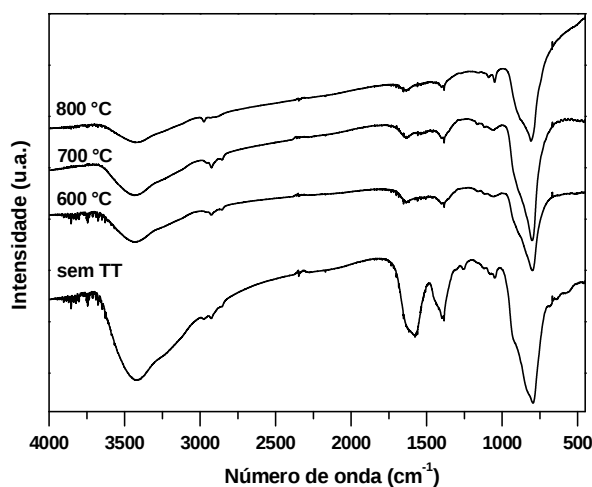


Figura 20. Espectros vibracionais na região do infravermelho para as amostras de $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Ho}^{3+}$ antes do tratamento térmico e tratadas com diferentes temperaturas.

4.1.3 Propriedades ópticas

A Figura 21 mostra os espectros de emissão (conversão ascendente) das nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ e $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Ho}^{3+}$ (79:20:1), tratadas a 600 °C por 1 hora, obtidos sob excitação no infravermelho (980nm) com potência do laser de 900 mW.

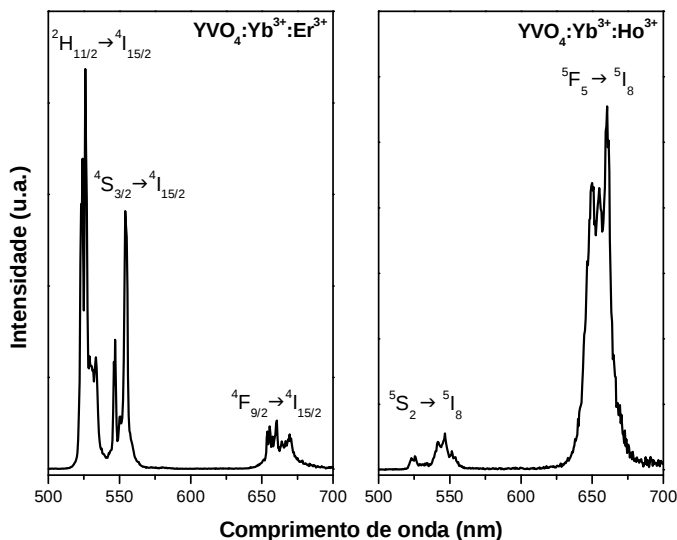


Figura 21. Espectros de emissão (conversão ascendente, $\lambda_{ex}= 980\text{nm}$) das nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ e $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Ho}^{3+}$.

O espectro de emissão das nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ é composto por picos em torno de 525 nm, 550 nm e 660 nm, que correspondem às transições do íon Er^{3+} : $^2\text{H}_{11/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$, $^4\text{S}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ e $^4\text{F}_{9/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$, respectivamente. Os espectros obtidos para as nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Ho}^{3+}$ apresentam picos próximos a 547 e 660 nm referentes às respectivas transições do íon Ho^{3+} : $^5\text{S}_2 \rightarrow ^5\text{I}_8$ e $^5\text{F}_5 \rightarrow ^5\text{I}_8$. A razão entre as áreas das emissões no verde e vermelho é de 5:1 no sistema dopado com $\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ e entre as emissões no vermelho e no verde é de 13:1 para o sistema $\text{Yb}^{3+}:\text{Ho}^{3+}$, valores semelhante aos resultados da literatura.^{108, 109} As emissões resultantes são observadas a olho nu quando as amostras são excitadas em 980 nm.

A evolução da luminescência foi avaliada em função da potência do laser. No processo de conversão ascendente de energia, a intensidade da emissão gerada (I_{CAE}) aumenta com a intensidade de bombeamento (I_{ex}) não linearmente, $I_{CAE} \propto (I_{ex})^n$, onde n corresponde ao número de fótons no infravermelho que é absorvido para a geração de um fóton emitido no visível. Este valor é deduzido a partir da inclinação da reta obtida do gráfico de $\text{Log}(I_{CAE})$ vs. $\text{Log}(I_{ex})$. O valor de n deve ser necessariamente um número inteiro, entretanto, processos não radiativos, como o efeito térmico, podem influenciar e contribuir para o decréscimo da inclinação para valores menores. A densidade da energia de excitação é alta o bastante para

promover uma alta absorção da amostra e elevar a temperatura na região irradiada, induzindo ao efeito térmico, o qual irá conduzir a menor efeito de conversão ascendente.¹¹⁰

A Figura 22 apresenta os espectros de emissão das NPs de $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ (79:20:1) e $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Ho}^{3+}$ (79:20:1) tratadas a 600 °C por 1 hora obtidos variando-se a potência de bombeamento e a dependência das áreas das bandas de emissão em função da potência do laser.

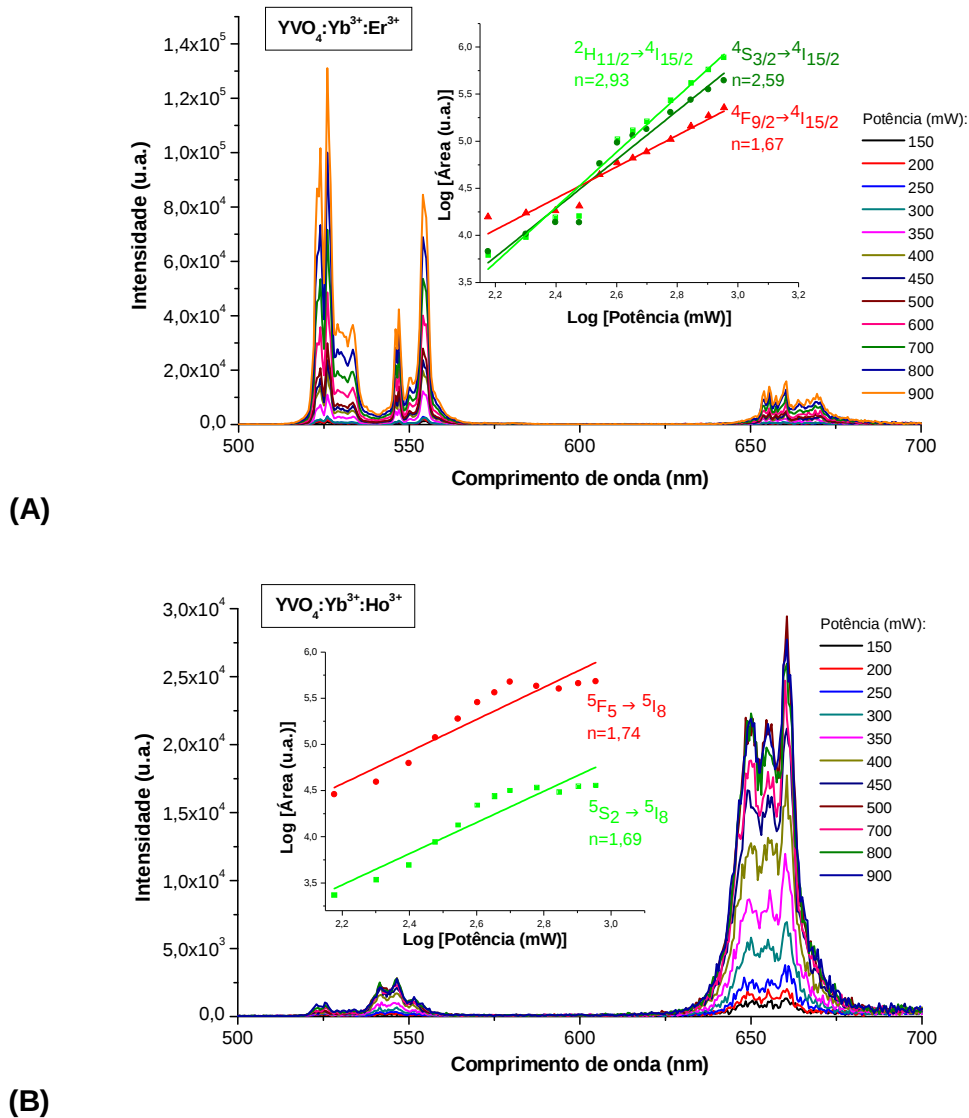


Figura 22. Espectros de emissão das nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ (A) e $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Ho}^{3+}$ (B) em função da potência do laser ($\lambda_{\text{ex}} = 980\text{nm}$). Insertos: dependência da emissão das bandas pela potência de bombeamento.

No sistema contendo $\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$, as emissões em 525 nm ($^2\text{H}_{11/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$) e 550 nm ($^4\text{S}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$) apresentaram valores de n iguais a 2,9 e 2,6, respectivamente, indicando que três fótons de excitação são absorvidos nestas transições no verde. Poucos autores observaram fenômenos envolvendo três fótons que resultam na emissão no verde em materiais co-dopados com $\text{Yb}^{3+}-\text{Er}^{3+}$.^{110, 111, 112, 113} Maiores concentrações de Yb^{3+} (10% em razão molar) tendem a ativar o processo de três fótons para popular os níveis $^2\text{H}_{11/2}$ e $^4\text{S}_{3/2}$. O mecanismo proposto está representado na Figura 23. Um terceiro fóton pode excitar o Er^{3+} do nível $^4\text{F}_{9/2}$ para o nível $^2\text{H}_{9/2}$ e, por relaxação não radiativa, chega aos níveis $^2\text{H}_{11/2}$ e $^4\text{S}_{3/2}$, dos quais resultam as emissões no verde.¹¹²

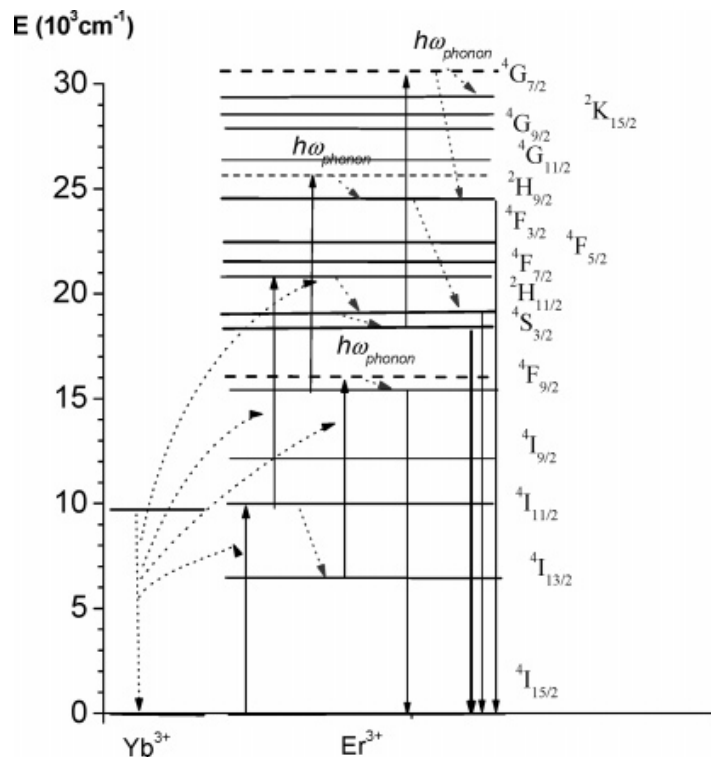


Figura 23. Representação esquemática para o processo de conversão ascendente de energia envolvendo o par de íons $\text{Yb}^{3+}-\text{Er}^{3+}$, no qual três fótons são absorvidos pelo Yb^{3+} e a energia transferida para o Er^{3+} .¹¹⁰

Constatou-se que $n = 1,7$ para a emissão do Er^{3+} em 660 nm ($^4\text{F}_{9/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$), o que sugere a absorção de 2 fótons nesta transição no vermelho, como já publicado na literatura.¹⁰⁸

As emissões do Ho^{3+} em 540 nm ($^5\text{S}_2 \rightarrow ^5\text{I}_8$) e 650 nm ($^5\text{F}_5 \rightarrow ^5\text{I}_8$) apresentaram o valor de n : 1,7. São portanto processos que envolvem 2 fótons. Estes resultados estão coerentes com a literatura.¹⁰⁹

As nanopartículas que receberam tratamento térmico por 5 minutos e 1 hora não apresentaram diferença no perfil do espectro de emissão. As nanopartículas dopadas com Ho^{3+} receberam diferentes tratamentos térmicos, a 600, 700, 800, 900 e 1000°C, por 5 minutos. Os espectros de emissão obtidos com potência do laser 980 nm fixa em 900 mW estão apresentados na Figura 24. A intensidade da emissão no vermelho foi calculada a partir da área absoluta abaixo dos picos (entre 630 e 695 nm) e avaliada em função da temperatura do tratamento. Os resultados mostram que as propriedades de emissão são modificadas pela temperatura do tratamento,¹¹⁴ conforme a equação obtida a partir da regressão linear, com coeficiente de determinação (R^2) 0,967.

$$\text{Área} = 2,95 \cdot 10^2 \times [\text{Temperatura}] - 1,39 \cdot 10^5 \quad (4)$$

O aumento na temperatura do tratamento levou a um aumento significativo na intensidade de emissão, devido ao aumento na cristalinidade, conforme mostrado anteriormente na Figura 18.¹¹⁵

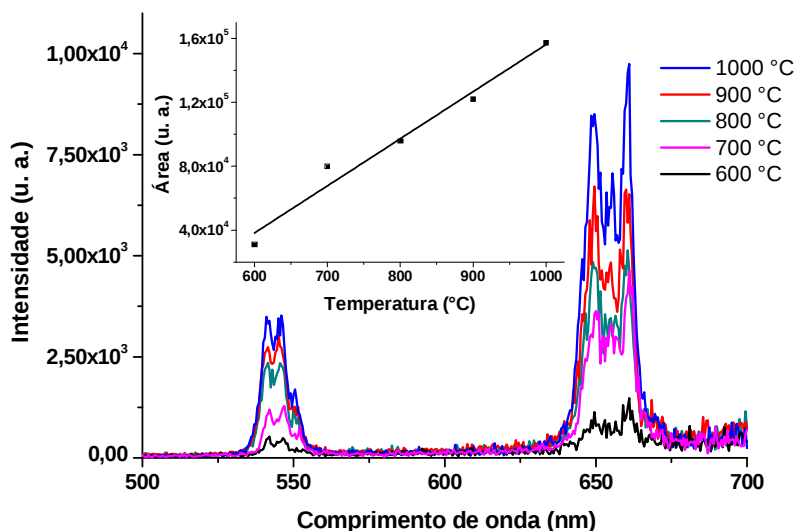


Figura 24. Espectros de emissão das nanopartículas $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Ho}^{3+}$ tratadas a diferentes temperaturas. Inserto: intensidade de emissão na região do vermelho em função da temperatura.

Nanopartículas com diferentes concentrações de dopantes foram preparadas a fim de otimizar suas propriedades de emissão. Considerando a aplicação como sensibilizador de processos fotoativados, a região de emissão de interesse é a qual corresponde a absorção do fármaco AICIPc aplicado em TFD (entre 590 e 630 nm). De acordo com a concentração relativa dos dopantes, as intensidades de emissão relativas dos componentes verde e vermelho podem ser diferentes. Isso sugere que o mecanismo de conversão ascendente de energia dependa, portanto, desta concentração relativa.¹¹⁶ Para verificar qual é a concentração de dopantes ideal, fixou-se a potência do laser em 900 mW para excitação das amostras de YVO_4 dopadas com 20% de Yb^{3+} e 1; 2,5 e 5% de Er^{3+} e também com 20% de Yb^{3+} e 1% de Ho^{3+} . Os espectros foram obtidos em condições estritamente idênticas. As áreas sob as bandas de emissão entre 630 e 690 nm foram integradas. Os espectros de emissão e as áreas das bandas de emissão em função da co-dopagem estão apresentados na Figura 25. Levando em conta estes resultados, as amostras que apresentaram maiores intensidades de emissão próxima à região entre 600 e 700 nm, são: $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ (77,5:20,0:2,5) e $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Ho}^{3+}$ (79:20:1). Contudo, as NPs $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Ho}^{3+}$ (79:20:1) se mostraram mais adequadas para a aplicação desejada, pois a emissão resultante é no vermelho.

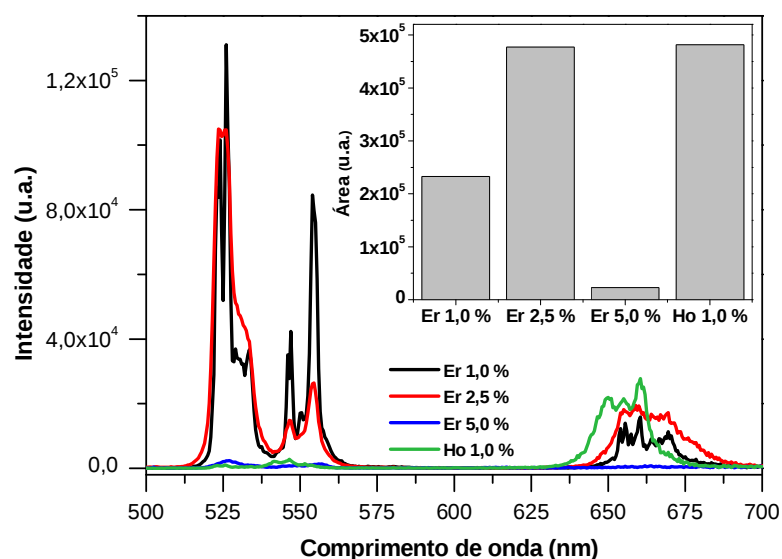


Figura 25. Espectros de emissão das nanopartículas de YVO_4 dopadas com 20% de Yb^{3+} e 1; 2,5 e 5% de Er^{3+} e 20% de Yb^{3+} e 1% de Ho^{3+} . Áreas das bandas de emissão em 650 nm em função da co-dopagem.

4.2 Caracterização das celulosas bacterianas

As membranas de CB foram obtidas com diferentes características quanto à espessura e transparência, de acordo com a linhagem da bactéria e o tempo de crescimento. A Figura 26 apresenta imagens de MEV de membranas obtidas a partir das duas diferentes linhagens de bactérias. A rede de fios nanométricos altamente interconectados forma uma “malha aberta” devido aos interstícios entre as fibras de celulose.

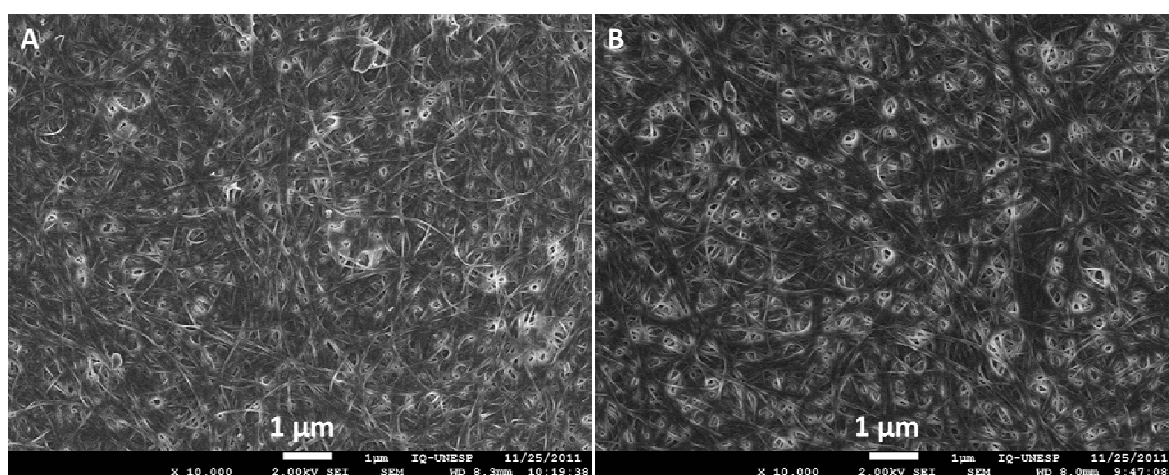


Figura 26. Imagens de MEV das membranas de CB A3d (A) e G1d (B).

Propriedades estruturais das membranas estão apresentadas na Tabela III. As medidas de espessura foram realizadas em perfilômetro. As medidas dos espaços intersticiais, ou seja, espaços vazios formados entre as nanofibrilas de celulose, foram determinadas pela microscopia eletrônica de varredura. Quanto menor é o espaço intersticial entre fibras do polímero, maior o grau de compactação das fibrilas e, portanto, menor o volume livre.

Tabela III. Medidas dos espaços intersticiais entre as fibras de celulose e espessura das membranas.

Amostra	Espaços intersticiais (nm)	Espessura (μm)
<i>G1d</i>	150,9	39,7
<i>G3d</i>	137,0	62,2
<i>A2d</i>	104,5	103,2
<i>A3d</i>	141,0	156,0

Nota-se que as membranas produzidas pela ATCC (A2d e A3d) são mais espessas devido a uma maior quantidade de fibras de celulose presente. As membranas produzidas pela linhagem GL (G1d e G3d), menos espessas e com espaços intersticiais com dimensões similares, possuem um aspecto macroscópico mais gelatinoso. Apesar da menor quantidade de fibras das membranas G1d e G3d, estas membranas mais finas possuem boa resistência mecânica.

A dimensão dos espaços intersticiais da CB considerada adequada para aplicações biomédicas varia de nanômetros a alguns micrometros. É importante que exista um volume livre suficiente para garantir trocas de gases e fluidos e manter a umidade da pele durante o tratamento.⁸⁰ Além disso, um estudo anterior mostrou que a difusão do fármaco para o ambiente externo é mais difícil quando se dá através de espaços intersticiais menores (em torno de 70 nm em comparação ao tamanho médio de 100 nm).⁸⁶ Bodhibukkana *et al.* encontrou o tamanho médio de 170 nm para membranas de CB e membranas compósitas de CB para sistemas de liberação controlada transdérmica.⁸⁵

A espectroscopia eletrônica na região do visível foi aplicada para avaliar a transmissão óptica das membranas de celulose. A Figura 27 apresenta o espectro de membranas de CB, confirmando a maior transparência para as membranas de menor espessura. Observa-se transparência semelhante entre as CBs produzidas pelas diferentes linhagens. Nota-se que as membranas produzidas pela ATCC (A2d e A3d) são mais espessas devido a uma maior quantidade de fibras de celulose presente. A alta transparência destes meios (80 a 90 % de transmissão óptica) para dispensação do fotossensibilizador favorecem a transmissão da fonte de luz de excitação.

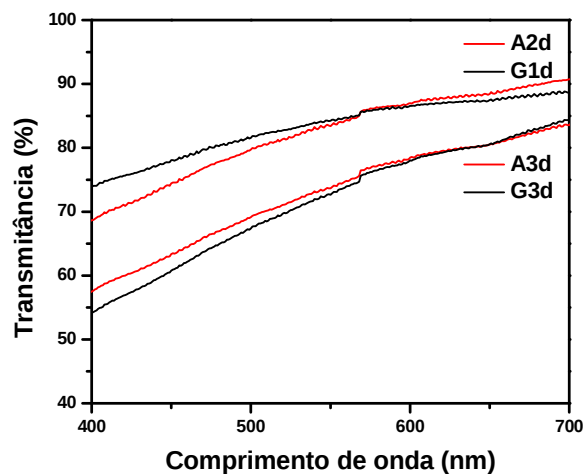


Figura 27. Espectros eletrônicos na região do UV-Vis das diferentes CBs obtidas.

4.3 Caracterização da celulose bacteriana incorporada com nanopartículas

As micrografias das CBs incorporadas com nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ são mostradas na Figura 28. As imagens revelam uma cadeia formada por nanofibrilas de celulose longas e contínuas. Nos interstícios existentes entre as fibrilas encontram-se agregados de nanopartículas bem inseridos na rede formada pela matriz de CB.

As partículas e seus aglomerados podem ser observados envoltos por fibras de celulose. É interessante observar que as membranas são macroscopicamente homogêneas, de cor branca e sem pó solto observada na superfície. Uma característica importante das membranas de CBs hidratadas diz respeito à propriedade da incorporação de partículas que acabam presas à estrutura pelas fibras de celulose nanométricas. Além disso, a estrutura nanométrica 3D leva a uma grande área superficial para estabilização das partículas.¹¹⁷

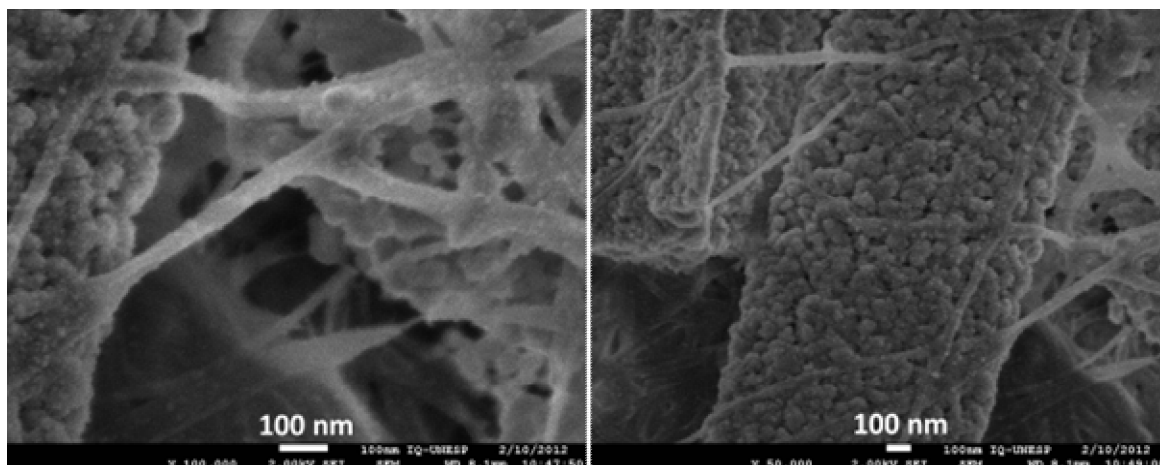


Figura 28. Imagens de MEV das CBs incorporadas com as nanopartículas.

A espectroscopia de energia dispersiva (EDS) foi realizada em duas regiões distintas do compósito, indicadas na Figura 29. Os espectros, apresentados na Figura 30, confirmam a composição química das nanopartículas (região 1) e das nanofibrilas de celulose (região 2), conforme esperado.

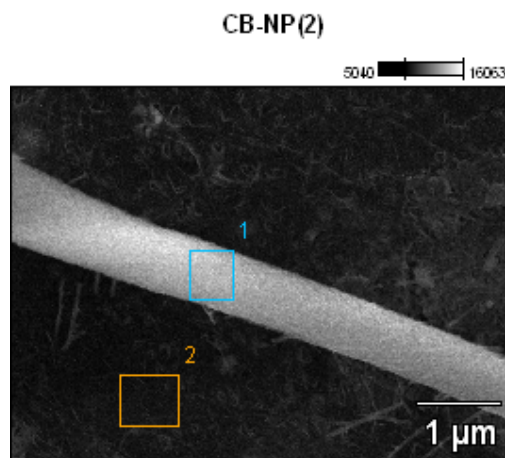


Figura 29. Imagem de MEV da CB incorporada com as nanopartículas e as regiões (1 e 2) onde foram realizadas as análises por EDS.

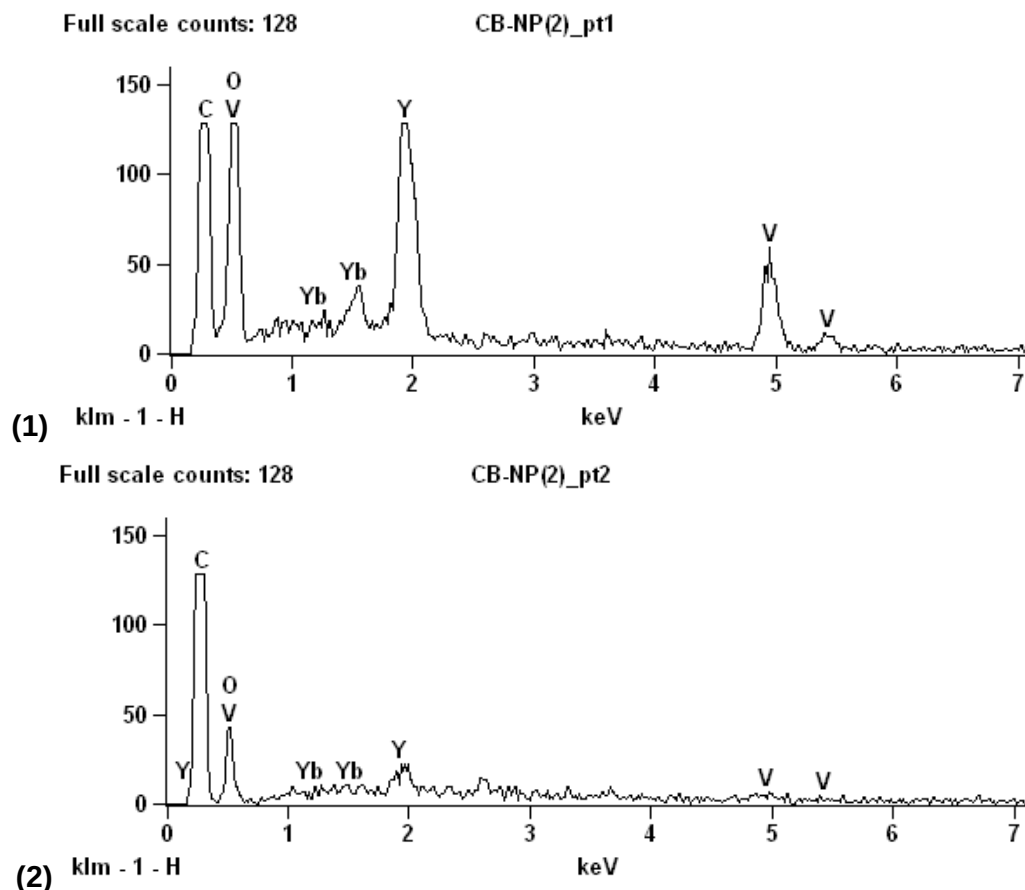


Figura 30. Espectro EDS da CB incorporada com as nanopartículas das regiões 1 e 2 (indicadas na Figura 29).

A Figura 31 apresenta o espectro vibracional do infravermelho da membrana seca de CB e do composto CB-NP. As frequências vibracionais características da celulose são observadas em 3500 a 3200 cm^{-1} (estiramento OH), 2908 cm^{-1} (estiramento CH e CH_2 dos grupos CHOH e CH_2OH), 1645 cm^{-1} (deformação angular simétrica OH da molécula de água adsorvida no polímero), $1435\text{-}1370\text{ cm}^{-1}$ (deformação angular C-OH e CH), $1160\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ (estiramento CO), $900\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ (deformação angular assimétrica no plano CH_2 e deformação angular CH) e $700\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ (deformação angular fora do plano OH).⁷⁷ As bandas em 792 cm^{-1} (corresponde à ligação V-O do íon vanadato) e em 2908 cm^{-1} (estiramento CH e CH_2 dos grupos CHOH e CH_2OH) apresentam-se com menores intensidades em relação aos espectros das nanopartículas (Figura 20) e da CB pura, respectivamente. Estas menores intensidades sugerem que há uma forte interação entre a CB e as nanopartículas.

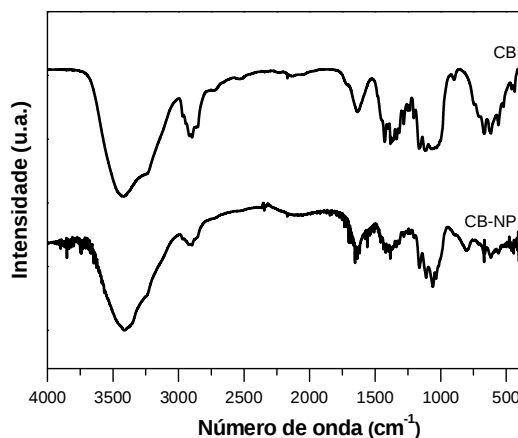


Figura 31. Espectros vibracionais na região do infravermelho da celulose pura (CB) e das amostras de CB incorporadas com as nanopartículas (CB-NP).

A membrana de CB incorporada com $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Ho}^{3+}$ foi excitada em 980 nm para obtenção das medidas de emissão, em função da potência do laser. Os espectros, mostrados na Figura 32, apresentam as emissões em 540 e 650 nm referentes às respectivas transições do íon Ho^{3+} : $^5\text{S}_2 \rightarrow ^5\text{I}_8$ e $^5\text{F}_5 \rightarrow ^5\text{I}_8$. As emissões são as mesmas observadas nos espectros das nanopartículas (Figura 22.B), porém com um decréscimo na intensidade quando incorporadas na CB. Portanto, o compósito CB-NP também apresenta propriedades de conversão de energia do infravermelho para o visível.

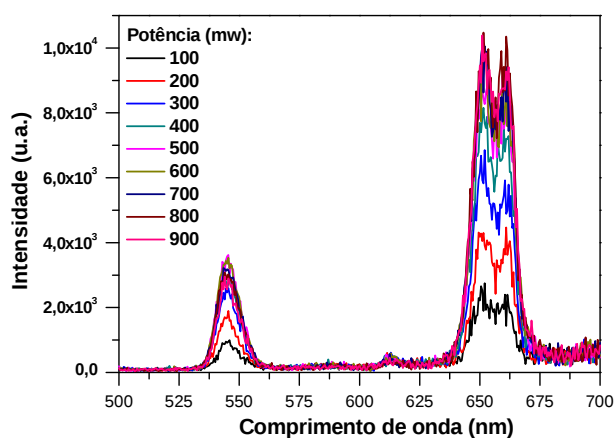


Figura 32. Espectros de emissão do compósito CB-NP, excitado em 980 nm com diferentes potências.

4.4 Caracterização da celulose bacteriana incorporada com AICIPc

A incorporação do fotossensibilizador na membrana de CB foi feita a partir da membrana pura de CB úmida (Figura 33.A), a qual foi imersa em solução de AICIPc em etanol (Figura 33.B) e, em seguida, foi seca (Figura 33.C). A coloração das membranas mudou de branca para azul após a incorporação de AICIPc.

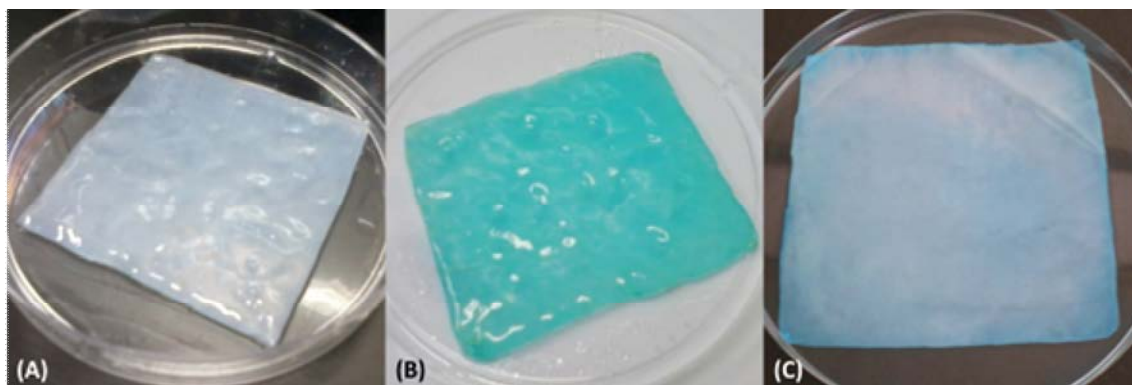


Figura 33. Membrana pura de CB úmida (A) e membranas de CB-AICIPc úmida (B) e seca (C).

A morfologia da membrana CB-AICIPc com diferentes concentrações do fotossensibilizador foi investigada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), como mostra a Figura 34. As imagens mostram a rede tridimensional de nanofibrilas, característica da CB, e a ausência de formação agregados, o que indica que não houve precipitação de AICIPc em nenhuma das concentrações incorporadas.

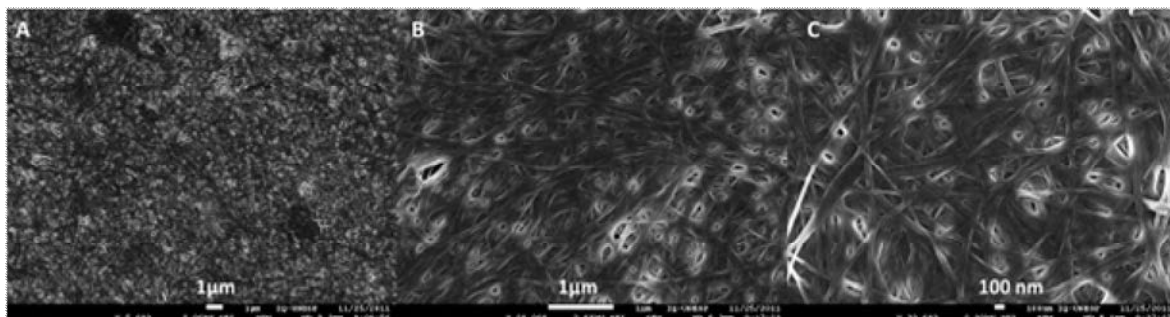


Figura 34. MEV da membrana de CB A2d incorporada com AICIPc em diferentes concentrações: A2d1 (A), A2d5 (B) e A2d10 (C).

O espectro vibracional na região do infravermelho da CB incorporada com AICIPc e os espectros da CB pura e AICIPc estão apresentados na Figura 35. As

ftalocianinas apresentam as seguintes bandas características: ao redor de 781 cm^{-1} (estiramento assimétrico N-Al-N), em 1329 cm^{-1} (estiramento N-C), em 1402 cm^{-1} (estiramentos C=C dos anéis benzênicos) e na região entre 400 e 480 cm^{-1} (estiramento Cl-Al).¹¹⁸ O espectro da membrana CB-AIClPc é formado basicamente pelo somatório das bandas presentes na CB e na ftalocianina.

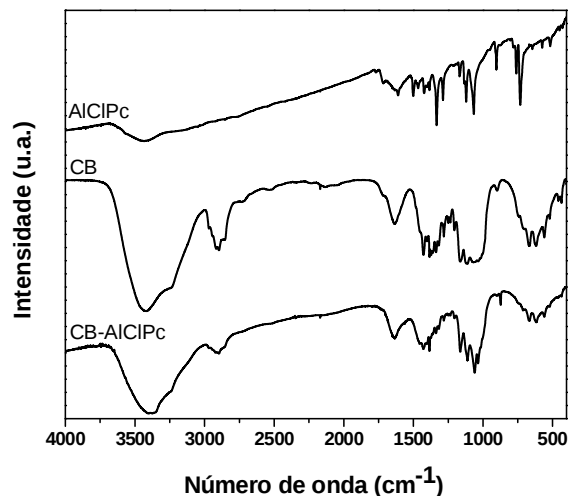


Figura 35. Espectros vibracionais na região do infravermelho da AIClPc, CB pura e CB incorporada com AIClPc.

4.4.1 Eficiência de incorporação de AIClPc

A incorporação de AIClPc feita a partir de soluções de diferentes concentrações (1 , 5 e $10\text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$) em membranas de CB com diferentes características foi estudada (Tabela I). Foi possível determinar a quantidade de fármaco incorporado nas membranas a partir de um método validado para quantificação de AIClPc em acetonitrila.⁹⁷ Para realizar o estudo da quantificação da AIClPc incorporada nas CBs, foi feita a medida da emissão em 680 nm (excitação em 615 nm) para a etapa de extração em acetonitrila, a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos, e a etapa de homogeneização em Ultra-Turrax. Os espectros de emissão obtidos nas diferentes etapas de extração (AIClPc livre) e homogeneização (AIClPc retida) para diferentes membranas estudadas estão apresentados na Figura 36.

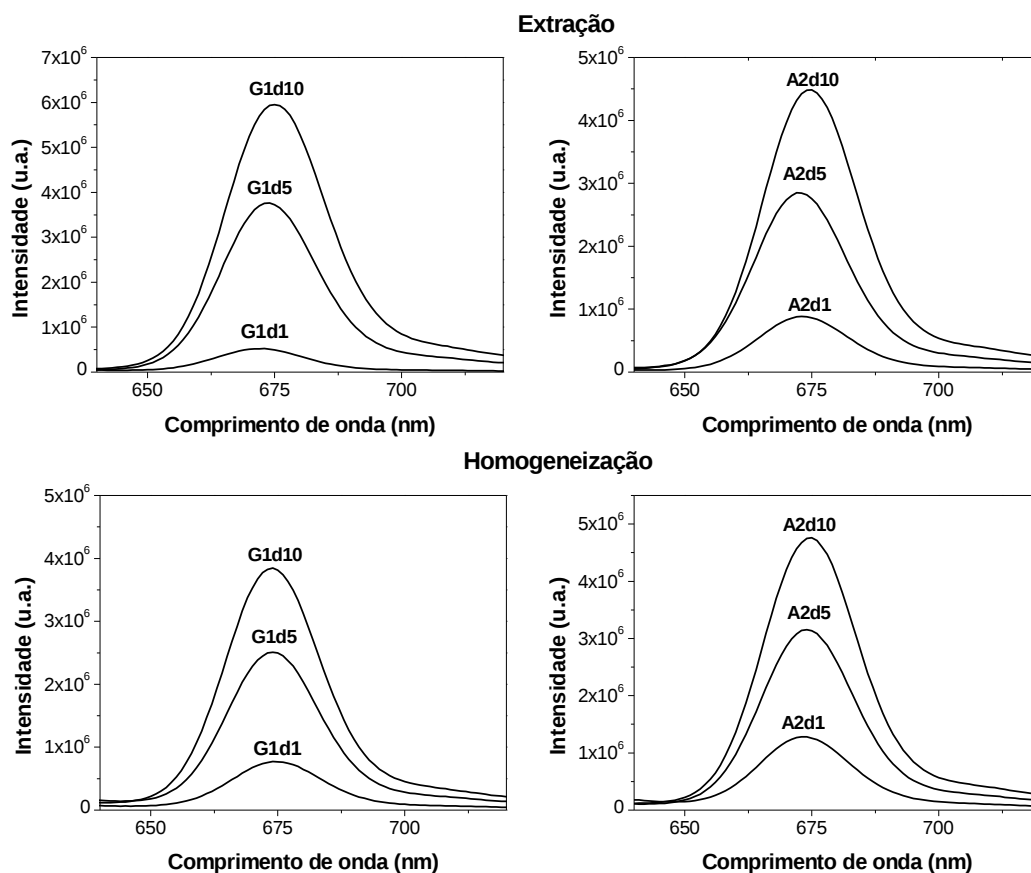


Figura 36. Espectros de emissão obtidos nas etapas de extração e homogeneização para as membranas de CB de diferentes linhagens de bactéria, com os menores tempos de crescimento (G1d e A2d) e com diferentes concentrações de AIClPc (1, 5 e 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$).

As quantificações referentes às etapas de extração e homogeneização estão representadas nas Figuras 37 e 38. A membrana A2d apresentou maiores concentrações nas etapas de extração e homogeneização para as diferentes concentrações teóricas de AIClPc (1, 5 e 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$).

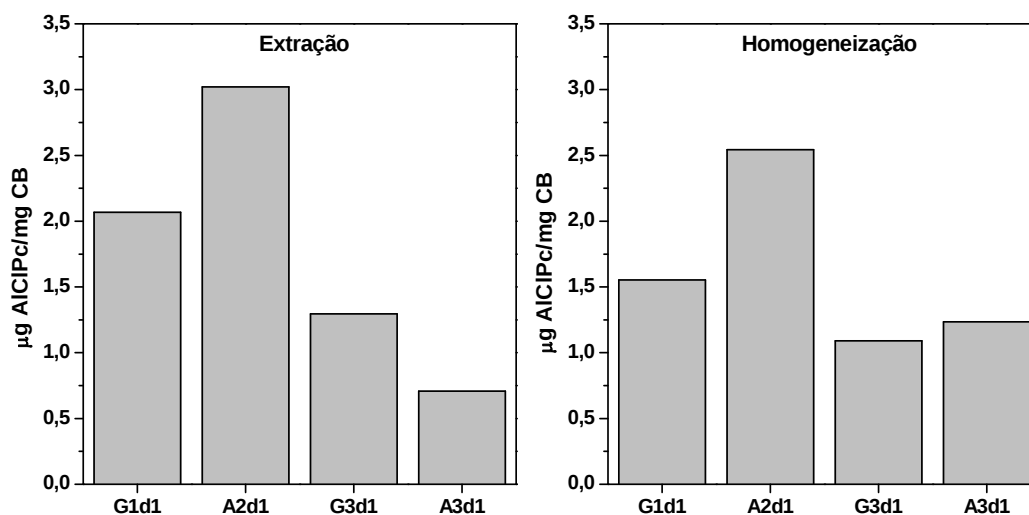


Figura 37. Quantificação de AICIPc nas etapas de extração e homogeneização para as amostras com concentração de 1 µmol.L⁻¹.

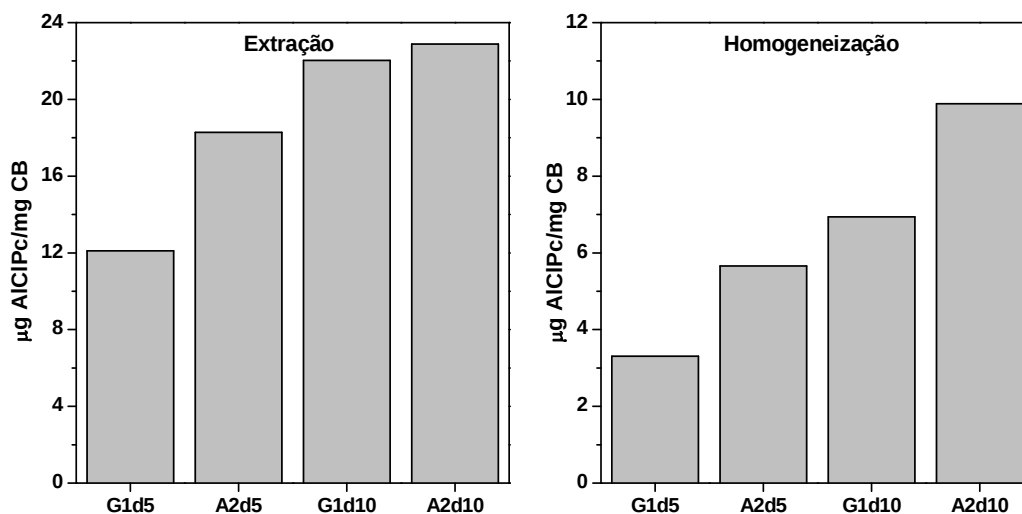


Figura 38. Quantificação de AICIPc nas etapas de extração e homogeneização para amostras com concentrações de 5 e 10 µmol.L⁻¹ com os menores tempos de crescimento.

A Figura 39 mostra a quantidade de AICIPc retida (quantificada na etapa de homogeneização) e total (soma das quantificações nas etapas de extração e homogeneização) para amostras com concentração de 1, 5 e 10 µmol.L⁻¹ com os menores tempos de crescimento (G1d e A2d). Esses tempos de crescimento, no caso da linhagem GL 1 dia e 2 dias para ATCC, foi o tempo de incubação mínimo

encontrado para obter membranas finas – com maior transparência - mas com boa resistência mecânica. O gráfico mostra que a quantidade de AICIPc retida nas fibras de celulose não aumenta proporcionalmente com o total de fármaco incorporado, portanto, membranas mais finas retêm o fármaco de forma mais eficiente.

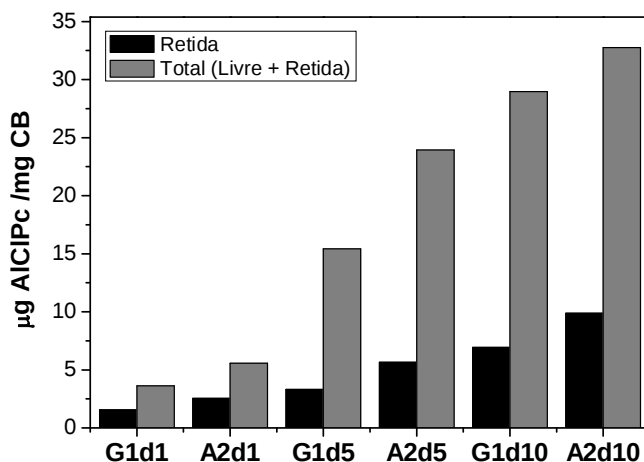


Figura 39. AICIPc retida e total para amostras com concentração de 1, 5 e 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ com os menores tempos de crescimento.

A eficiência de incorporação, apresentada na Tabela IV, foi calculada a partir da equação (1), que relaciona concentração de fármaco retida com a concentração teórica. Ao comparar as quatro diferentes CBs com mesma concentração de AICIPc ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$), nota-se que a A2d1 apresentou a maior eficiência de incorporação e maiores concentrações em ambas as etapas avaliadas. Os resultados mostram que as membranas crescidas por menores tempos e com menor concentração de fármaco (A2d1 e G1d1) apresentam maior eficiência de incorporação e, portanto, estas foram selecionadas para realizar os ensaios de permeação e retenção cutânea. A análise estatística dos dados (ANOVA) mostrou que não há diferença significativa ($p > 0,05$) no total de fármaco incorporado entre as membranas com mesma concentração de AICIPc e com tempo de crescimento semelhante.

Tabela IV. Eficiência de incorporação das diferentes membranas CB-AIClPc.

Amostra	EI (%)
<i>G1d1</i>	47,5
<i>A2d1</i>	87,4
<i>G3d1</i>	44,6
<i>A3d1</i>	41,7
<i>G1d5</i>	25,7
<i>A2d5</i>	41,8
<i>G1d10</i>	27,1
<i>A2d10</i>	34,0

As características da rede tridimensional de fibrilas que forma as membranas influenciam na interação entre o fármaco e a matriz polimérica, resultando em diferentes cinéticas de liberação, de acordo com cada biomaterial obtido. A maior quantidade de fármaco incorporada por membranas mais finas (A2d e G1d) pode ser relacionada à maior área superficial que estas apresentam. Além deste fato, uma maior quantidade de fibras de celulose é outra característica que favorece concentrações mais elevadas, tal como observado para a membrana A2d em comparação a G1d.

4.4.2 Estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro*

Para iniciar os estudos *in vitro* de permeação e retenção cutânea, fez-se necessário construir uma curva padrão de calibração para quantificar a AIClPc presente no meio da solução receptora (PBS, pH 7,4, e etanol, 10% v/v). Foram feitas diluições seriadas, com concentrações conhecidas da AIClPc, e obtiveram-se os espectros de emissão sob as mesmas condições. As curvas analíticas foram traçadas a partir das intensidades de emissão em 680 nm, em função da concentração da AIClPc. Foram obtidas cinco curvas com valores de coeficiente de correlação (R^2), superiores a 0,99. A Figura 40 apresenta a curva padrão de calibração definitiva na faixa de concentração entre 0,219-1,314 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. A equação

obtida a partir da regressão linear, com coeficiente de correlação, $R^2 = 0,991$, é a seguinte:

$$\text{Intensidade de fluorescência} = 310357 [\text{AICIPc}, \mu\text{g.mL}^{-1}] + 218237 \quad (5)$$

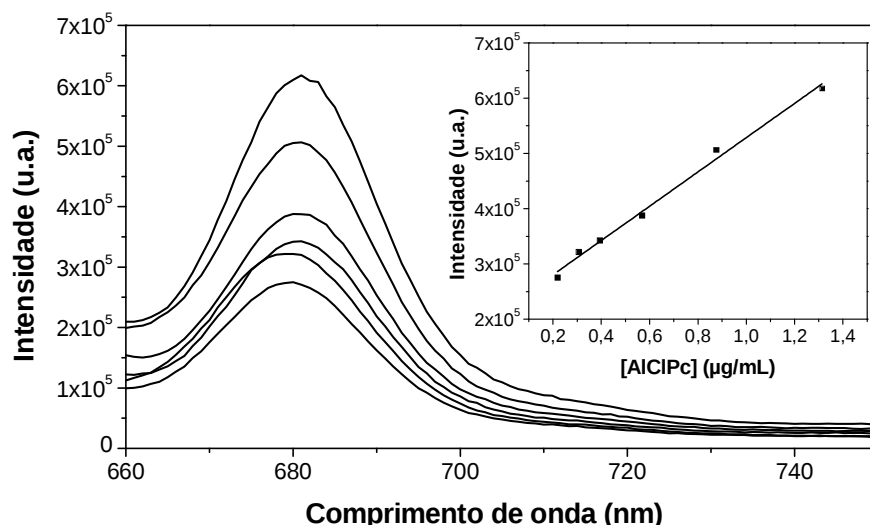


Figura 40. Espectros de emissão da AICIPc em diferentes concentrações (0,219-1,314 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e gráfico da concentração de AICIPc vs. intensidade de emissão.

As amostras foram aplicadas topicamente em condições biomiméticas no modelo animal da pele. O perfil de permeação é traçado a partir da quantificação da AICIPc presente na solução receptora e corresponde à quantidade de fármaco veiculado transdermicamente. As CBs G1d1 e A2d1 e ensaio controle (sem a matriz de celulose bacteriana) não apresentaram quantidade de AICIPc detectável pela técnica de fluorimetria na solução receptora até o período de 12 horas. A ausência de AICIPc na solução receptora pode ser considerado positiva para a aplicação tópica do fotosensibilizador, pois evita sua absorção sistêmica, que pode causar uma fotosensibilização generalizada do paciente.^{75, 119}

Neste trabalho foi estudado o perfil de retenção cutânea no estrato córneo e nas camadas profundas da pele (epiderme + derme). Após 12 horas de ensaio, as células de Franz foram desmontadas e as peles foram tratadas conforme descrito na parte experimental. Os protocolos de *tape stripping* e homogeneização do tecido remanescente permitiram determinar a quantidade de AICIPc que penetrou e que ficou retida nas camadas da pele (estrato córneo e epiderme/derme) após o ensaio.

Os perfis de retenção das amostras A2d e G1d estão ilustrados na Figura 41. As concentrações de AICIPc presentes no estrato córneo foram $0,492 \pm 0,037 \mu\text{g.cm}^{-2}$ e $0,524 \pm 0,032 \mu\text{g.cm}^{-2}$ e na epiderme e derme $0,408 \pm 0,047 \mu\text{g.cm}^{-2}$ e $0,459 \pm 0,079 \mu\text{g.cm}^{-2}$, para as membranas A2d e G1d, respectivamente. A análise estatística dos dados (ANOVA) confirmou que não existe diferença significativa ($p > 0,05$) entre os perfis de retenção das duas membranas estudadas, em ambas as camadas da pele analisadas (EC e E+D). A penetração efetiva nos tecidos é constantemente associada com a interação direta entre fármacos e estrato córneo. O estrato córneo é a camada mais externa da pele e atua como uma barreira altamente lipofílica que limita a penetração de substâncias do meio externo, bem como evita a perda de componentes internos do organismo, principalmente a água.^{120, 121} Um sistema de liberação eficaz para aplicação da TFD, por via de administração tópica, deve veicular o fotossensibilizador além do estrato córneo, fazendo com que o fármaco alcance as células malignas presentes nas camadas viáveis da epiderme.¹¹⁹

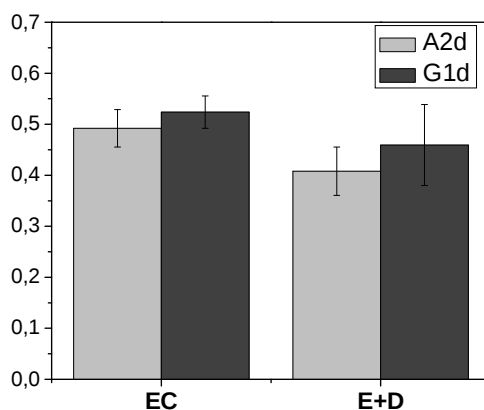


Figura 41. Perfil de retenção cutânea nas camadas da pele: estrato córneo (EC) e epiderme/derme (E+D) para as CBs (G1d1 e A2d1), obtido no ensaio de 12 horas.

O estudo da retenção da AICIPc nas camadas da pele foi realizado para a amostra G1d1 em função do tempo, com aplicação tópica de 6, 12 e 24 horas. Os ensaios não apresentaram AICIPc na solução receptora até as 24 horas de ensaio. Os perfis de retenção estão mostrados na Figura 42. As concentrações de AICIPc detectadas no estrato córneo para os diferentes tempos de ensaio são: 6 horas: $0,495 \pm 0,035 \mu\text{g.cm}^{-2}$; 12 horas: $0,524 \pm 0,032 \mu\text{g.cm}^{-2}$; e 24 horas: $0,563 \pm 0,030 \mu\text{g.cm}^{-2}$. A análise estatística mostrou que o perfil do ensaio de 12 horas não é

diferente dos demais, ou seja, não há diferença significativa entre 12 h e 6 h e entre 12 h e 24 h, e os ensaios 6 h e 24 h são diferentes. Na epiderme e derme foram quantificados: 6 horas: $0,070 \pm 0,023 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$; 12 horas: $0,459 \pm 0,079 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$; e 24 horas: $0,190 \pm 0,036 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$ (E+D). A análise estatística mostrou que há diferença significativa ($p > 0,05$) entre os perfis de retenção na epiderme e derme para os três diferentes tempos de ensaio estudados.

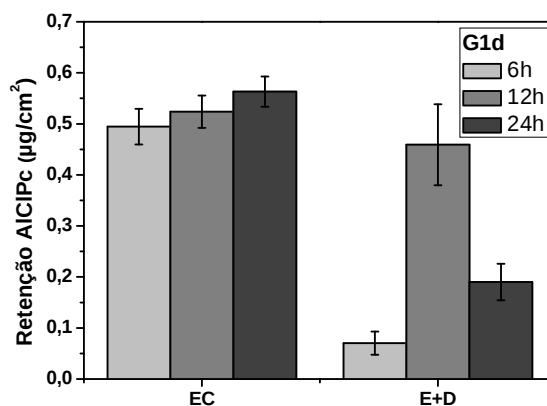


Figura 42. Perfil de retenção cutânea nas camadas da pele: estrato córneo (EC) e epiderme/derme (E+D) para as CB G1d1, obtidos nos ensaios de 6, 12 e 24 horas.

Grandes variações nos valores de retenção nas camadas mais profundas (E+D) foram observadas entre os ensaios de 6, 12 e 24 h. O uso de pele de orelha de porco como modelo de pele pode ter levado a variação nos resultados experimentais devido a enorme heterogeneidade que há entre amostras de orelhas provenientes de diferentes animais, ou mesmo em diferentes regiões de uma mesma orelha. Contudo, deve-se considerar que esta variabilidade biológica reflete a realidade e que foi possível encontrar uma retenção característica para o sistema. A pele humana como modelo ⁸⁸ seria o ideal em estudos de permeação/retenção cutânea *in vitro*. Entretanto, este material proveniente de cirurgias plásticas apresenta limitações ao seu uso como a baixa disponibilidade e a necessidade de submeter o experimento ao Comitê de Ética. ^{122, 123, 124} Como alternativa, as peles de animais, como primata, suíno, rato, porco da índia e cobra, são amplamente utilizadas. ¹²⁵ Culturas tridimensionais de células humanas ¹²⁶ também são uma opção, mas apresentam deficiência em estruturas anexas da pele, que incluem

unidades pilosebáceas, folículos capilares e glândulas sudoríparas.¹²⁷ Membranas sintéticas com tamanhos de poros definidos são igualmente empregadas em ensaios com células de Franz para reduzir a variação interensaio decorrente da variabilidade biológica do tecido da pele.¹²⁸ A pele de orelha de porco foi empregada neste trabalho considerando os fatores descritos acima. Também levou-se em conta a sua alta disponibilidade, obtenção relativamente fácil, baixo custo, por ser um subproduto da indústria de alimentos. Além de ser o modelo animal que mais se assemelha histológica e bioquimicamente ao tecido humano, depois dos primatas.¹²⁵

Estes fenômenos estudados de permeação e retenção cutânea são decisivos em TFD para tornar possível uma melhor interação do fármaco com o tecido-alvo. Antes da irradiação com o laser, é necessário que uma quantidade suficiente de fotossensibilizador penetre através do estrato córneo e se acumule nas células malignas, para promover uma resposta biológica adequada e, portanto, uma terapia eficiente. De forma geral, pode-se considerar que aproximadamente $0,5 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$ de fármaco permaneceu retida no estrato córneo e $0,3 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$ na epiderme/derme. O sistema de liberação contendo um derivado de clorina (Foscan®) desenvolvido por Primo, F. L. *et al.* promoveu uma retenção de cerca de $0,5 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$ de fármaco no estrato córneo e $0,6 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$ na epiderme/derme.¹²⁹

4.5 Caracterização da celulose bacteriana incorporada com AlClPc e nanopartículas

4.5.1 Propriedades ópticas

A presença de AlClPc nas membranas de CB também incorporadas com as nanopartículas não alterou os perfis de emissão dos íons lantanídeos. A Figura 43 apresenta uma sobreposição dos espectros de absorção da solução de AlClPc em etanol e de emissão do compósito CB-NP contendo nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Ho}^{3+}$. O espectro de absorção de AlClPc possui as principais bandas em 351 nm e 671 nm, atribuídas às conhecidas banda Soret e banda Q, normalmente observadas para ftalocianinas.⁹⁷ A banda de absorção da ftalocianina (630–695 nm) coincide com a região de emissão do íon Ho^{3+} , permitindo que a excitação do fotoativo ocorra pela emissão no visível das nanopartículas a partir de uma fonte de

excitação no infravermelho. É interessante excitar o sistema no infravermelho próximo, pois é a região onde se encontra a janela biológica (650-900 nm), que apresenta maior coeficiente de penetração nos tecidos biológicos que a radiação UV ou visível, normalmente utilizadas para excitação de luminescência. Este novo biomaterial obtido deve aumentar a eficiência do dano celular e, portanto, aumentar a resposta do tumor ao tratamento.

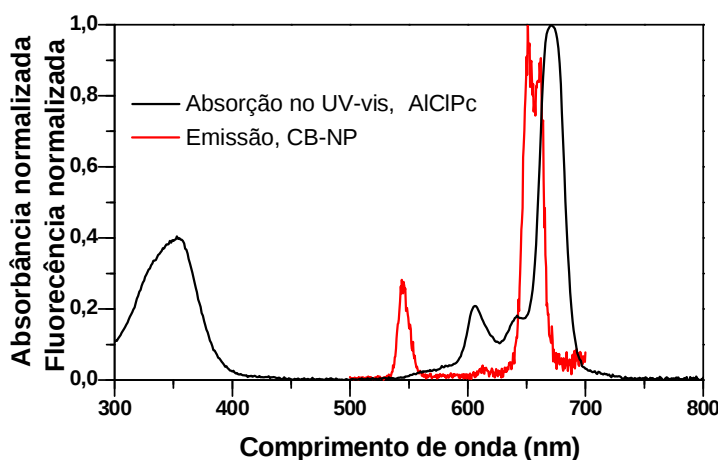


Figura 43. Espectros de absorção da solução de AlClPc em etanol e de emissão do compósito CB-NP.

O espectro de emissão, obtido sob excitação em 980 nm, das suspensões em etanol das NPs $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Ho}^{3+}$ (79:20:1, tratadas a 1000 °C por 5 minutos) está apresentado na Figura 44, assim como os espectros das NPs (com concentração fixa) na presença de AlClPc (em concentrações 5, 50 e 500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Os espectros de emissão de NPs-AlClPc apresentam a banda do fotossensibilizador em 680 nm⁹⁷, indicando que a emissão no visível das NPs ativou a emissão de AlClPc. Além disso, a comparação entre os espectros mostra que a emissão no vermelho das NPs foi suprimida pelo fotossensibilizador, devido a transferência de energia das NPs para AlClPc, enquanto a intensidade de emissão no verde é mantida.¹³⁰ Este efeito aumenta à medida em que aumenta a concentração de AlClPc. A relação entre as áreas absolutas das bandas de emissão no vermelho (630-667 nm) e no verde (530-565 nm) é de 18,5 para o espectro das NPs, ao passo que para os espectros de NPs-AlClPc esta relação é de 13,6; 4,7; e 0,6 para as concentrações 5, 50 e 500

$\mu\text{mol.L}^{-1}$ de AlClPc, respectivamente. Estes resultados mostram que a intensidade da emissão no vermelho das NPs diminui à medida em que aumenta a concentração de AlClPc, reforçando a ideia de que ocorre a supressão da emissão das NPs devido à transferência de energia para o fotossensibilizador. O controle deste estudo foi realizado pela medida dos espectros de emissão das soluções de AlClPc (5, 50 e 500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) sem NP, obtidos sob excitação em 980 nm, nos quais nenhuma banda de emissão foi observada.

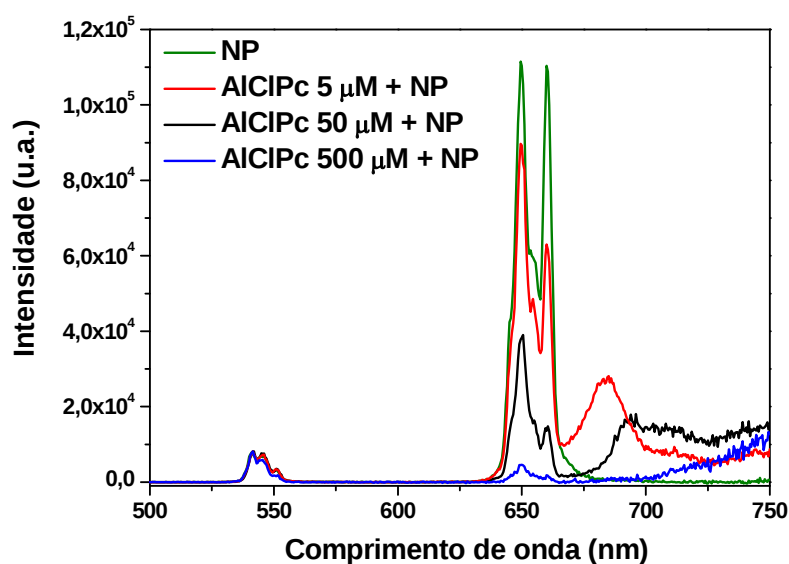


Figura 44. Espectros de emissão das NPs ($\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Ho}^{3+}$) e NPs na presença de AlClPc com concentrações 5, 50 e 500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Considerando a aplicação pretendida, a observação da emissão de ftalocianina com excitação em 980 nm é muito interessante, sugerindo a aplicação destes sistemas compostos em processos de TFD ativados por luz no infravermelho.

Membranas de CB obtidas a partir da linhagem ATCC produzidas em 1 dia (A1d), incorporadas com nanopartículas (suspensões a 0,04 e 0,2 % de $\text{YVO}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Ho}^{3+}$) com ou sem AlClPc (concentrações 3 e 300 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) foram analisadas. As medidas de emissão (excitação em 980 nm) dos compósitos CB-AlClPc-NP não apresentam a banda do fotossensibilizador em 680 nm. Entretanto, os espectros obtidos exatamente nas mesmas condições mostraram uma diminuição na emissão no vermelho com a presença ou aumento na concentração de AlClPc (Figura 45).

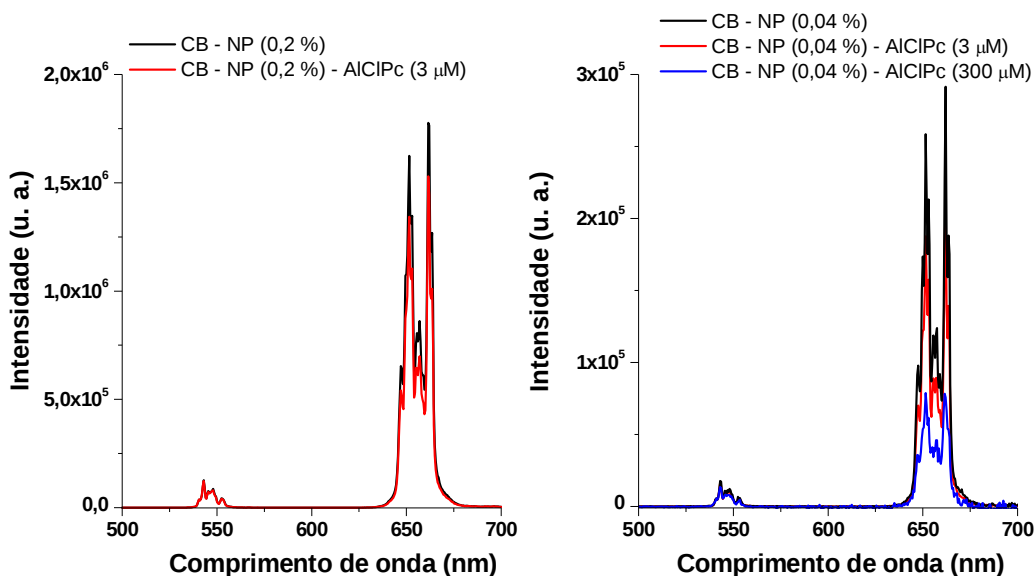


Figura 45. Espectros de emissão das CB incorporadas com NPs (suspensões a 0,04 e 0,2 %) com ou sem AICIPc (concentrações 3 e 300 μM).

A relação entre as áreas absolutas das bandas de emissão no vermelho (630-685 nm) e no verde (530-565 nm) variou conforme apresentado na Tabela V. Nota-se valores similares para CB sem AICIPc (23 %) e com a mesma concentração de AICIPc (3 μM ; 19 %). Houve uma significativa diminuição para a maior concentração de AICIPc (300 μM). Estes resultados seguiram a mesma tendência das medidas feitas em suspensão, ou seja, ocorreu uma diminuição na intensidade da emissão das NPs no vermelho possivelmente devido à transferência de energia para o fotossensibilizador.

Tabela V. Razão entre emissões vermelho/verde.

Amostra	Razão vermelho/verde
CB-NP (0,2%)	22,6
CB-NP (0,2%) – AICIPc (3 μM)	19,3
CB-NP (0,04 %)	23,1
CB-NP (0,04 %) - AICIPc (3 μM)	19,0
CB-NP (0,04 %) - AICIPc (300 μM)	10,8

4.5.2 Estudos fotofísicos

As propriedades fotofísicas das membranas CB-AICIPc (A1d5) e CB-AICIPc-NP (NP = $\text{YVO}_4\text{:Yb}^{3+}\text{:Ho}^{3+}$) foram analisadas, pela determinação dos tempos de vida do transiente tripleto e oxigênio singleto. Solução de AICIPc em etanol também foi avaliada com a finalidade de comparar o efeito do fotossensibilizador livre em solução, na presença ou não de NPs suspensas. Neste estudo, investigou-se a formação de espécies transiente tripleto e oxigênio singleto.

O transiente tripleto (T_1) é o estado excitado da molécula formado após sofrer cruzamento intersistema, como foi mostrado anteriormente no Diagrama de Jablonski (Figura 5). A análise do transiente tripleto é importante, pois a partir deste estado são geradas as espécies citotóxicas. A determinação do tempo de vida do transiente tripleto não foi possível, por causa do alto espalhamento da luz, decorrente da estrutura da CB. No entanto, foi determinada a eficiência na geração de oxigênio singleto, a principal agente citotóxico em TFD responsável pela atividade fotobiológica.¹³¹

A determinação da cinética de decaimento da luminescência do oxigênio singleto foi realizada por método espectroscópico direto, por fotólise por pulso de laser. O sistema laser Nd-YAG foi ajustado para o harmônico 355 nm para excitação. A emissão gerada pelo oxigênio singleto em 1270 nm foi captada por fotodetector de germânio. As curvas de decaimento cinético com ajustes exponenciais para CB-AICIPc, CB-AICIPc-NP, solução de AICIPc em etanol (com ou sem NPs) e padrão feoforbide-a estão apresentadas na Figura 46. Os valores de tempo de vida (τ) e intensidades máximas observadas nas curvas de decaimento estão apresentados na Tabela VI.

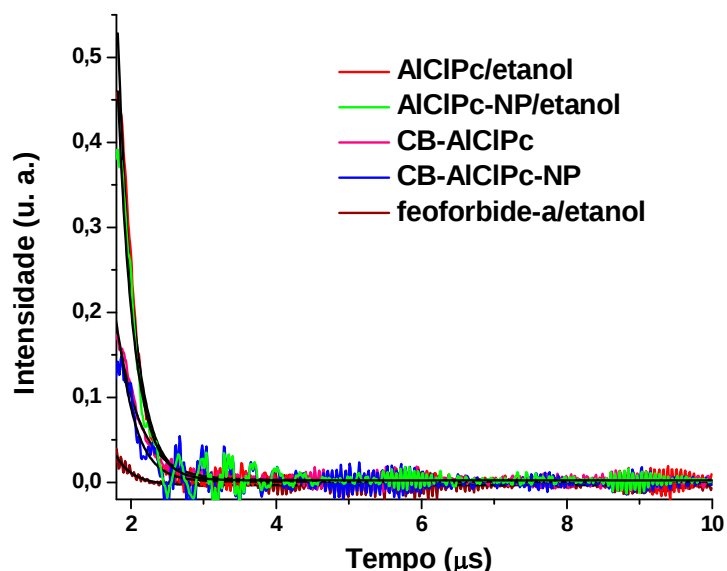


Figura 46. Perfil de decaimento do oxigênio singlete gerado nas amostras de CB-AICIPc, CB-AICIPc-NP, solução de AICIPc em etanol e padrão feoforbide-a em etanol.

Tabela VI. Tempo de vida (τ) e intensidade máxima das curvas de decaimentos.

Amostra	τ (μ s)	Intensidade	Fator de aumento
<i>feoforbide-a/etanol</i>	$0,234 \pm 0,011$	0,040	—
<i>AICIPc/etanol</i>	$0,221 \pm 0,008$	0,459	11,5
<i>AICIPc-NP/etanol</i>	$0,222 \pm 0,001$	0,392	9,8
<i>CB-AICIPc</i>	$0,325 \pm 0,002$	0,176	4,4
<i>CB-AICIPc-NP</i>	$0,236 \pm 0,003$	0,148	3,7

Ao analisar os dados, nota-se que os tempos de vida são muito próximos, exceto para a amostra CB-AICIPc, que apresentou um tempo de vida maior. Essa diferença pode ter ocorrido como consequência de um maior erro gerado na leitura por se tratar de uma amostra sólida. Estes resultados são coerentes com o trabalho de Siqueira-Moura *et al.*, que encontraram um valor similar ($0,22 \mu$ s) para nanocápsulas poliméricas contendo AICIPc.¹³²

As curvas de decaimento mostram que a intensidade é maior para as amostras que contêm AICIPc livre em solução, com aumento de aproximadamente 10 vezes em relação ao padrão feoforbide-a. Intensidades menores foram

observadas para o fotossensibilizador incorporado nas membranas, entretanto estas amostras apresentaram um aumento médio de 4 vezes em relação ao padrão feoforbide-a. Este padrão é amplamente utilizado como referência nestes ensaios espectroscópicos. É um composto derivado bacterioclorínico, que apresenta um bom rendimento na produção da espécie radicalar $^1\text{O}_2$ e estabilidade fotofísica e fotoquímica. Além desses fatores, a banda Soret, que está situada na região do ultravioleta (300-350 nm), do feoforbide-a é centrada na mesma posição daquelas dos derivados de ftalocianina, o que é essencial para esse experimento.⁹⁹

Os resultados obtidos neste ensaio sugerem que a AICIPc mantém sua propriedade de gerar oxigênio singleto quando inserida na matriz polimérica de CB. A presença das NPs não mostrou causar interferência significativa na produção desta espécie citotóxica, uma importante condição o processo de TFD.

5 CONCLUSÕES

Este trabalho explorou o potencial de um novo material compósito CB-AICIPc-NP para uso em TFD, produzido a partir de CB, como um sistema de liberação de fármacos, e nanopartículas para conversão ascendente de energia, como ativadoras do fotossensibilizador sob iluminação no infravermelho. O desenvolvimento desse novo biomaterial foi trabalhado de maneira amplamente multidisciplinar e combinou técnicas experimentais nas áreas de microbiologia, materiais, nanotecnologia, fotônica, tecnologia farmacêutica.

A síntese das nanopartículas e sua caracterização foram devidamente exploradas. Foram bem determinadas as condições de preparação das nanopartículas e a concentração de dopantes ideal para obter maior intensidade de emissão na região de interesse para fotoativação da AICIPc.

O desenvolvimento do novo compósito CB-AICIPc-NP teve início na produção das membranas de CB, feita a partir de diferentes linhagens e tempo de crescimento. Estudos das características da CB pura e da eficiência de incorporação de AICIPc permitiram selecionar a membrana com as propriedades mais adequadas para a aplicação pretendida. Os resultados mostram a viabilidade de se incorporar o fotossensibilizador (AICIPc) e as nanopartículas de YVO_4 na matriz polimérica de celulose bacteriana para administração do fármaco, mantendo-se as propriedades luminescentes de ambos os compostos inseridos no polímero. O compósito CB- $\text{YVO}_4\text{:Yb}^{3+}\text{:Er}^{3+}\text{:Ho}^{3+}$ apresentou o fenômeno de conversão ascendente de energia.

Os perfis de permeação/retenção obtidos confirmam a possibilidade de utilizar esse sistema na administração tópica do princípio ativo em TFD, sem que haja veiculação do fármaco para via transdérmica, evitando assim o efeito colateral de fotossensibilização generalizada do paciente.

A transferência de energia das NPs para o fotossensibilizador foi confirmada, o que indica que a ativação do fármaco por ser realizada indiretamente com iluminação no infravermelho próximo, onde está situada a janela biológica, por meio do processo de conversão ascendente de energia.

Os ensaios fotofísicos mostraram a capacidade das membranas CB-AICIPc e CB-AICIPc-NP de gerar oxigênio singleto, a principal espécie citotóxica no processo de TFD. Os tempos de vida observados são semelhantes ao encontrado para o padrão feoforbide-a e intensidade em torno de 4 vezes superior. A AICIPc

incorporada na CB manteve sua propriedade de gerar oxigênio singlete, sem sofrer interferência significativa pela presença das NPs.

A membrana CB-CIAIPc-NP mostrou-se eficaz como um novo biomaterial suscetível ao processo de fotoativação a ser estabelecido em processos de tratamento por via tópica de doenças neoplásicas e não-neoplásicas.

6 PERSPECTIVAS

A complementação do trabalho deverá envolver os ensaios de toxicidade e fotocitotoxicidade *in vitro*. A inibição da proliferação celular será determinada pelo ensaio colorimétrico padrão MTT. A toxicidade de diferentes concentrações da AICIPc livre ou incorporada nas membranas frente a linhagens de câncer humano será avaliada no escuro e sob duas fontes de luz: uma emitindo luz vermelha para fotoexcitação direta do fotativo e outra emitindo em 980 nm para conversão pelas nanopartículas em luz visível e consequente fotoativação.

REFERÊNCIAS

- 1 PRASAD, P. N. Fundamentals of nanobiophotonics. In: DUBOWSKI, J. J.; TANEV, S. (Ed.). **Photon-based nanoscience and nanobiotechnology**. Dordrecht: Springer, 2006. v. 239, p. 55-65.
- 2 DOANE, T. L.; BURDA, C. The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy. **Chem. Soc. Rev.**, v. 41, n. 7, p. 2885-2911, 2012.
- 3 BERKOW, J. W.; FLOWER, R. W.; ORTH, D. H.; KELLEY, J. S. **Fluorescein and indocyanine green angiography**: technique and interpretation. 2nd ed. San Francisco: The Foundation of the American Academy of Ophthalmology, 1997.
- 4 SILVA, F. O.; VIOL, L. C. S.; FERREIRA, D. L.; ALVES, J. L. A.; SCHIAVON, M. A. O estado da arte da síntese de semicondutores nanocristalinos coloidais. **Quim. Nova**, v. 33, n. 9, p. 1933-1939, 2010.
- 5 ZHOU, J.; LIU, Z.; LI, F. Upconversion nanophosphors for small-animal imaging. **Chem. Soc. Rev.**, v. 41, p. 1323-1349, 2012.
- 6 QIAN, H. S.; GUO, H. C.; HO, P. C. L.; MAHENDRAN, R.; ZHANG, Y. Mesoporous-silica-coated up-conversion fluorescent nanoparticles for photodynamic therapy. **Small**, v. 5, n. 20, p. 2285-2290, 2009.
- 7 HAMBLIN, M. R.; DEMIDOVA, T. N. Mechanisms of low level light therapy. In: HAMBLIN, M. R.; WAYNANT, R. W.; ANDERS, J. (Ed.). **Mechanisms of low level light therapy**. Bellingham: SPIE – The International Society for Optical Engineering, 2006. v. 6140, p. 614001/1-614001/12.
- 8 CHENG, L.; WANG, C.; LIU, Z. Upconversion nanoparticles and their composite nanostructures for biomedical imaging and cancer therapy. **Nanoscale**, v. 5, p. 23-37, 2013.
- 9 AUZEL, F. Upconversion and anti-stokes processes with f and d ions in solids. **Chem. Rev.**, v. 104, p.139-173, 2004.
- 10 WRIGHT, J. Up-conversion and excited-state energy transfer in rare-earth doped materials. In: FONG, F. K. (Ed.). **Radiationless processes in molecules and condensed phases**. New York: Springer, 1976. v. 15, p. 239-295.
- 11 BARRETO, J. A.; O'MALLEY, W.; KUBEIL, M.; GRAHAM, B.; STEPHAN, H.; SPICCIA, L. Nanomaterials: applications in cancer imaging and therapy. **Adv. Mater.**, v. 23, p. H18-H40, 2011.
- 12 CHEN, J.; ZHAO, J. X. Upconversion nanomaterials: synthesis, mechanism, and applications in sensing. **Sensors**, v. 12, p. 2414-2435, 2012.
- 13 CARLOS, L. D.; FERREIRA, R. A. S.; BERMUDEZ, V. Z.; RIBEIRO, S. J. L. Lanthanide-containing light-emitting organic-inorganic hybrids: a bet on the future. **Adv. Mater.**, v. 21, p. 509-534, 2009.

- 14 KASSAB, L. R. P.; BOMFIM, F. A.; MARTINELLI, J. R.; WETTER, N. U.; JAKUTIS NETO, J.; ARAÚJO, C. B. de. Energy transfer and frequency upconversion in Yb^{3+} - Er^{3+} -doped PbO-GeO_2 glass containing silver nanoparticles. **Appl. Phys. B**, v. 94, p. 239-242, 2009.
- 15 LEDEMI, Y.; MANZANI, D.; RIBEIRO, S. J. L.; MESSADDEQ, Y. Multicolor up conversion emission and color tunability in $\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}/\text{Ho}^{3+}$ triply doped heavy metal oxide glasses. **Opt. Mater.**, v. 33, p. 1916-1920, 2011.
- 16 POPOV, A. P.; BYKOV, A. V.; SOKOLOV, V. I.; LYSAK, Y. V.; NADORT, A.; PRIEZZHEV, A. V.; MYLLYLÄ, R.; ZVYAGIN, A. V. Upconversion luminophores as a novel tool for deep tissue imaging. In: STERENBORG, H. J. C. M.; VITKIN, I. A. **Novel biophotonic techniques and applications**. Munique: SPIE Press, 2011. v. 8090, p. 80900V-1-80900V-6.
- 17 FRANGIONI, J. V. *In vivo* near-infrared fluorescence imaging. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 7, p. 626-634, 2003.
- 18 WANG, M.; ABBINENI, G.; CLEVENGER, A.; MAO, C.; XU, S. Upconversion nanoparticles: synthesis, surface modification and biological applications. **Nanomedicine**, v. 7, n. 6, p. 710-729, 2011.
- 19 FUKUMORI, Y.; ICHIKAWA, H. Nanoparticles for cancer therapy and diagnosis. **Adv. Powder Technol.**, v. 17, n. 1, p. 1-28, 2006.
- 20 MINELLI, C.; LOWE, S. B.; STEVENS, M. M. Engineering nanocomposite materials for cancer therapy. **Small**, v. 6, n. 21, p. 2336-2357, 2010.
- 21 WANG, C.; CHENG, L.; LIU, Z. Drug delivery with upconversion nanoparticles for multi-functional targeted cancer cell imaging and therapy. **Biomaterials**, v. 32, p. 1110-1120, 2011.
- 22 CHENG, L.; YANG, K.; LI, Y.; CHEN, J.; WANG, C.; SHAO, M.; LEE, S. T.; LIU, Z. Facile preparation of multifunctional upconversion nanoprobe for multimodal imaging and dual-targeted photothermal therapy. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 50, p. 7385-7390, 2011.
- 23 UNGUN, B.; PRUD'HOMME, R. K.; BUDIJONO, S. J.; SHAN, J.; LIM, S. F.; JU, Y.; AUSTIN, R. Nanofabricated upconversion nanoparticles for photodynamic therapy. **Opt. Express**, v. 17, n. 1, p. 80-86, 2009.
- 24 GUO, H.; QIAN, H.; IDRIS, N. M.; ZHANG, Y. Singlet oxygen-induced apoptosis of cancer cells using upconversion fluorescent nanoparticles as a carrier of photosensitizer. **Nanomedicine**, v. 6, p. 486-495, 2010.
- 25 BECHET, D.; COULEAUD, P.; FROCHOT, C.; VIRIOT, M. L.; GUILLEMIN, F.; BARBERI-HEYOB, M. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. **Trends Biotechnol.**, v. 26, n. 11, p. 612-621, 2008.

26 ZHANG, P.; STEELANT, W.; KUMAR, M.; SCHOLFIELD, M. Versatile photosensitizers for photodynamic therapy at infrared excitation. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 129, p. 4526-4527, 2007.

27 CELLI, J. P.; SPRING, B. Q.; RIZVI, I.; EVANS, C. L.; SAMKOE, K. S.; VERMA, S.; POGUE, B. W.; HASAN, T. Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization. **Chem. Rev.**, v. 110, p. 2795-2838, 2010.

28 KIM, J.; PIAO, Y.; HYEON, T. Multifunctional nanostructured materials for multimodal imaging, and simultaneous imaging and therapy. **Chem. Soc. Rev.**, v. 38, p. 372-390, 2009.

29 DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 3, n. 5, p. 380-387, 2003.

30 FERREIRA, A. B. H. **Novo dicionário Aurélio**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1975.

31 FRANKS L. M. What is cancer? In: FRANKS, L. M.; TEICH, N. M. (Ed.). **Introduction to cellular and molecular biology of cancer**. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press, 2007. Cap. 1, p. 1-20.

32 BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2012**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2011.

33 SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Quím. Nova**, v. 25, n. 5, p. 801-807, 2002.

34 NOWIS, D.; MAKOWSKI, M.; STOKLOSA, T.; LEGAT, M.; ISSAT, T.; GOLAB, J. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. **Acta Biochim. Pol.**, v. 52, n. 2, p. 339-352, 2005.

35 HASSAN, T.; MOOR, A. C. E.; ORTEL, B. Photodynamic therapy of cancer. In: WEICHSELBAUM, R. R. **Cancer medicine**. 4th ed. Ontario: BC Decker, 2000. p. 489-502.

36 AGOSTINIS, P.; BERG, K.; CENGEL, K. A.; FOSTER, T. H.; GIROTTI, A. W.; GOLLNICK, S. O.; HAHN, S. M.; HAMBLIN, M. R.; JUZENIENE, A.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; MROZ, P.; NOWIS, D.; PIETTE, J.; WILSON, B. C.; GOLAB, J. Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA Cancer J. Clin.**, v. 61, p. 250-281, 2011.

37 WOODBURN, K. W.; FAN, Q.; KESSEL, D.; LUO, Y.; YOUNG, S. W. Photodynamic therapy of B16F10 murine melanoma with lutetium texaphyrin. **J. Invest. Dermatol.**, v. 110, n. 5, p. 746-751, 1998.

- 38 PASS, H. I. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 85, p. 443-456, 1993.
- 39 CALIN, M. A.; ION, R. M. The efficacy of photodynamic inactivation of the microorganisms using laser sources and methylene blue as sensitizer. **J. Optoelectron. Adv. M.**, v. 12, n. 1, p.141-145, 2010.
- 40 ISSA, M. C. A.; MANELA-AZULAY, M. Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation. **An. Bras. Dermatol.**, v. 85, n. 4, p. 501-511, 2010.
- 41 MITRA, A.; STABLES, G. I. Topical photodynamic therapy for non-cancerous skin conditions. **Photodiagn. Photodyn.**, v. 3, p. 116-127, 2006.
- 42 HUSAIN, D.; MILLER, J. W.; KENNEY, A. G.; MICHAUD, N.; FLOTTE, T. J.; GRAGOUDAS, E. S. Photodynamic therapy and digital angiography of experimental iris neovascularization using liposomal benzoporphyrin derivative. **Ophthalmology**, v. 104, p. 1242-1250, 1997.
- 43 WOODBURN, K. W.; FAN, Q.; KESSEL, D.; WRIGHT, M.; MODY, T. D.; HEMMI, G.; MAGDA, D.; SESSLER, J. L.; DOW, W. C.; MILLER, R. A.; YOUNG, S. W. Phototherapy of cancer and atheromatous plaque with texaphyrins. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 14, p. 343-348, 1996.
- 44 GARCEZ, A. S.; NUNEZ, S. C.; SOUZA, F. R.; KATTER, J. M.; RIBEIRO, M. S. Terapia fotodinâmica em odontologia - laser de baixa potência para redução microbiana. **Ver. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, v. 57, p. 223-226, 2003.
- 45 TRAUNER, K. B.; GANDOUR-EDWARDS, R.; BAMBERG, M.; SHORTKROFF, S.; SLEDGE, C.; HASAN, T. Photodynamic synovectomy using benzoporphyrin derivative in an antigen induced arthritis model for rheumatoid arthritis. **Photochem. Photobiol.**, v. 67, p. 133-139, 1998.
- 46 O'BRIEN, T.; THOMAS, K. Bladder cancer: photodynamic diagnosis can improve surgical outcome. **Nat. Rev. Urol.**, v. 7, p. 598-599, 2010.
- 47 BÄUMLER, W.; ABELS, C.; SZEIMIES, R. M. Fluorescence diagnosis and photodynamic therapy in dermatology. **Med. Laser Appl.**, v. 18, p. 47-56, 2003.
- 48 KURWA, H. A.; BARLOW, R. J. The role of photodynamic therapy in dermatology. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 24, p. 143-148, 1999.
- 49 KONAN, Y. N.; GURNY, R.; ALLÉMANN, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol.**, v. 66, p. 89-106, 2002.
- 50 KALKA, K.; MERK, H.; MUKHTAR, H. Photodynamic therapy in dermatology. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 42, n. 3, p. 389-413, 2000.

51 DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic inactivation of *Bacillus spores* mediated by phenothiazinium dyes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 11, p. 6918-6925, 2005.

52 OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. **J. Photochem. Photobiol.**, v. 39, p. 1-18, 1997.

53 MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Quím. Nova**, v. 23, n. 2, p. 237-243, 2000.

54 ALLISON, R. R.; DOWNIE, G. H.; CUENCA, R.; HU, X. H.; CHILDS, C. J. H.; SIBATA, C. H. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagn. Photodyn.**, v. 1, p. 27-42, 2004.

55 DE ROSA, F. S.; BENTLEY, M. V. Photodynamic therapy of skin cancers: sensitizers, clinical studies and future directives. **Pharm. Res.**, v. 17, n. 12, p. 1447-1455, 2000.

56 BONNETT, R. **Chemical aspects of photodynamic therapy**. London: Gordon and Breach, 1998. p. 64-279.

57 ISHII, K.; TAKAYANAGIA, A.; SHIMIZUA, S.; ABEA, H.; SOGAWAB, K.; KOBAYASHIA, N. *In vitro* photodynamic effects of phtalocyaninatosilicon covalently linked to 2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy radicals on cancer cells. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 38, n. 7, p. 920-927, 2005.

58 WILSON, B. C. Photodynamic therapy: light delivery and dosage for second-generation photosensitizers. In: BOCK, G.; HARNETT, S. (Ed.). **Photosensitizing compounds: their chemistry, biology and clinical use**. Chichester: Wiley Interscience, 1989. p. 60-77.

59 OWENS, J.; SMITH, R.; ROBINSON, R.; ROBINS, M. Photophysical properties of porphyrins, phthalocyanines, and benzochlorins. **Inorg. Chim. Acta.**, v. 279, p. 226-231, 1998.

60 NUNES, S. M. T.; SGUILLA, F. S.; TEDESCO, A. C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, p. 273-284, 2004.

61 TOREZAN, L. A. R. Terapia fotodinâmica em dermatologia. In: OSÓRIO, N.; TOREZAN, L. A. R. (Ed.). **Laser em dermatologia**. São Paulo: Roca, 2002. p. 121-136.

62 SEIGNEURIC, R.; MARKEY, L.; NUYTEN, D. S. A.; DUBERNET, C.; EVELO, C. T. A.; FINOT, E.; GARRIDO, C. From nanotechnology to nanomedicine: applications to cancer research. **Curr. Mol. Med.**, v. 10, p. 640-652, 2010.

- 63 WILSON, B. C. Photonic and non-photonic based nanoparticles in cancer imaging and therapeutics. In: DUBOWSKI, J. J.; TANEV, S. (Ed.). **Photon-based nanoscience and nanobiotechnology**. Dordrecht: Springer, 2006. v. 239, p. 121-157.
- 64 LEE, T. W. Y.; ROBINSON, J. R. Sistemas de liberação controlada de drogas. In: GENARO, A. R. (Ed.) **Remington: a ciência e a prática da farmácia**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap. 47, p. 931-960.
- 65 SIBANI, S. A.; McCARRON, P. A.; WOOLFSON, A. D.; DONNELLY, R. F. Photosensitiser delivery for photodynamic therapy. Part 2: systemic carrier platforms. **Expert Opin. Drug Deliv.**, v. 5, p. 1241-1254, 2008.
- 66 ERNSTING, M. J.; MURAKAMI, M.; ROY, A.; LI, S. D. Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles. **J. Controlled Release**, v. 172, n. 3, p. 782-794, 2013.
- 67 YAMAGATA, T.; MORISHITA, M.; KAVIMANDAN, N. J.; NAKAMURA, K.; FUKUOKA, Y.; TAKAYAMA, K.; PEPPAS, N. A. Characterization of insulin protection properties of complexation hydrogels in gastric and intestinal enzyme fluids. **J. Controlled Release**, v. 112, p. 343-349, 2006.
- 68 LANCER, R. Polymer-controlled drug delivery systems. **Acc. Chem. Res.**, v. 26, p. 537-542, 1993.
- 69 McHUGH, A. J. The role of polymer membrane formation in sustained release drug delivery systems. **J. Controlled Release**, v. 109, p. 211-221, 2005.
- 70 SUGIBAYASHI, K.; MORIMOTO, Y. Polymers for transdermal drug delivery systems. **J. Controlled Release**, v. 29, p. 177-185, 1994.
- 71 JAWAHAR, N.; MEYYANATHAN, S. N. Polymeric nanoparticles for drug delivery and targeting: a comprehensive review. **Int. J. Health Allied Sci.**, v. 1, p. 217-223, 2012.
- 72 RIOS, M. Polymers for controlled release: formulation follows function. **Pharm. Technol.**, v. 29, p. 42-50, 2005.
- 73 MORTON, C. A.; McKENNA, K. E.; RHODES, L. E. Guidelines for topical photodynamic therapy: update. **Brit. J. Dermatol.**, v. 159, p. 1245-1266, 2008.
- 74 TSAI, J. C.; CHEN, I. H.; WONG, T. W.; LO, Y. L. *In vitro/in vivo* correlations between transdermal delivery of 5-aminolaevulinic acid and cutaneous protoporphyrin IX accumulation and effect of formulation. **Brit. J. Dermatol.**, v. 146, p. 853-862, 2002.

- 75 KYRIAZI, M.; ALEXANDRATOU, E.; YOVA, D.; RALLIS, M.; TREBST, T. Topical photodynamic therapy of murine non-melanoma skin carcinomas with aluminum phthalocyanine chloride and a diode laser: pharmacokinetics, tumor response and cosmetic outcomes. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, v. 24, p. 87-94, 2008.
- 76 WILLIAMS, W. C.; CANNON, E. R. Alternative environmental roles for cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, p. 2448-2452, 1989.
- 77 PECORARO, E.; MANZANI, D.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Bacterial cellulose from *Glucanacetobacter xylinus*: preparation, properties and applications. In: BELGACEM, M. N.; GANDINI, A. (Ed.). **Monomers, polymers and composites from renewable resources**. Amsterdam: Elsevier, 2008. Cap. 17, p. 369-383.
- 78 KLEMM, D.; KRAMER, F.; MORITZ, S.; LINDSTRÖM, T.; ANKERFORS, M.; GRAY, D.; DORIS, A. Nanocelluloses: a new family of nature-based materials. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 50, p. 5438-5466, 2011.
- 79 KALIA, S.; DUFRESNE, A.; CHERIAN, B. M.; KAITH, B. S.; AVÉROUS, L.; NJUGUNA, J.; NASSIOPOULOS, E. Cellulose-based bio- and nanocomposites: a review. **Int. J. Polym. Sci.**, v. 2011, p. 1-35, 2011.
- 80 CZAJA, W. K.; YOUNG, D. J.; KAWECKI, M.; BROWN, R. M. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2007.
- 81 AMIN, M. C. I. M.; AHMAD, N.; HALIB, N.; AHMAD, I. Synthesis and characterization of thermo- and pH-responsive bacterial cellulose/acrylic acid hydrogels for drug delivery. **Carbohydr. Polym.**, v. 88, p. 465-473, 2012.
- 82 HAIMER, E.; WENDLAND, M.; SCHLUFTER, K.; FRANKENFELD, K.; MIETHE, P.; PTTHAST, A.; ROSENAU, T.; LIEBNER, F. Loading of bacterial cellulose aerogels with bioactive compounds by antisolvent precipitation with supercritical carbon dioxide. **Macromol. Symp.**, v. 294, n. 2, p. 64-74, 2010.
- 83 TORRES, F. G.; COMMEAUX, S.; TRONCOSO, O. P. Biocompatibility of bacterial cellulose based biomaterials. **J. Funct. Biomater.**, v. 3, p. 864-878, 2012.
- 84 LIN, W. C.; LIEN, C. C.; YEH, H. J.; YU, C. M.; HSU, S. H. Bacterial cellulose and bacterial cellulose–chitosan membranes for wound dressing applications. **Carbohydr. Polym.**, v. 94, n. 1, p. 603-611, 2013.
- 85 BODHIBUKKANA, C.; SRICHANA, T.; KAEWNOPPARAT, S.; TANGTHONG, N.; BOUKING, P.; MARTIN, G. P.; SUEDEE, R. Composite membrane of bacterially-derived cellulose and molecularly imprinted polymer for use as a transdermal enantioselective controlled-release system of racemic propranolol. **J. Controlled Release**, v. 113, p. 43-56, 2006.

- 86 HUANG, L.; CHEN, X.; NGUYEN, T. X.; TANG, H.; ZHANG, L.; YANG, G. Nano-cellulose 3D-networks as controlled-release drug carriers. **J. Mater. Chem. B**, v. 1, p. 2976-2984, 2013.
- 87 STOICA-GUZUN, A.; STROESCU, M.; TACHE, F.; ZAHARESCU, T.; GROSU, E. Effect of electron beam irradiation on bacterial cellulose membranes used as transdermal drug delivery systems. **Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. B**, v. 265, p. 434-438, 2007.
- 88 TROVATTI, E.; FREIRE, C. S.; PINTO, P. C.; ALMEIDA, I. F.; COSTA, P.; SILVESTRE, A. J.; PASCOAL NETO, C.; ROSADO, C. F. Bacterial cellulose membranes applied in topical and transdermal delivery of lidocaine hydrochloride and ibuprofen: *in vitro* diffusion studies. **Int. J. Pharm.**, v. 435, p. 83-87, 2012.
- 89 ALMEIDA, I. F.; PEREIRA, T.; SILVA, N. H. C. S.; GOMES, F. P.; SILVESTRE, A. J. D.; FREIRE, C. S. R.; SOUSALOBLO, J. M.; COSTA, P. C. Bacterial cellulose membranes as drug delivery systems: an *in vivo* skin compatibility study. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.08.008>>. Acesso em: 6 nov. 2013.
- 90 BIOSTENT PRODUTOS BIOTECNOLOGICOS LTDA. (Brasil). B. R. Loures. **Endoprosthesis process to obtain and methods used**. WO 2004/045458 A1., 17 Nov. 2003, 3 June 2004.
- 91 PADULA, C.; COLOMBO, G.; NICOLI, S.; CATELLANI, P. L.; MASSIMO, G.; SANTI, P. Bioadhesive film for the transdermal delivery of lidocaine: *in vitro* and *in vivo* behavior. **J. Controlled Release**, v. 88 p. 277-285, 2003.
- 92 SCHMITT, F.; LAGOPOULOS, L.; KAUPER, P.; ROSSI, N.; BUSO, N.; BARGE, J.; WAGNIERES, G.; LAUE, C.; WANDREY, C.; JUILLERAT-JEANNERET, L. Chitosan-based nanogels for selective delivery of photosensitizers to macrophages and improved retention in and therapy of articular joints. **J. Controlled Release**, v. 144, p. 242-250, 2010.
- 93 DROGAT, N.; GRANET, R.; LE MORVAN, C.; BÉGAUD-GRIMAUD, G.; KRAUSZ, P.; SOL, V. Chlorin-PEI-labeled cellulose nanocrystals: synthesis, characterization and potential application in PDT. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 22, p. 3648-3652, 2012.
- 94 BARKER, M. G.; HOOPER, A. J. Preparation and X-ray powder diffraction patterns of the sodium vanadates NaVO_3 , $\text{Na}_4\text{V}_2\text{O}_7$, and Na_3VO_4 . **J. Chem. Soc., Dalton Trans.**, n. 15, p. 1513-1517, 1973.
- 95 GIAUME, D.; BUISSETTE, V.; LAHLIL, K.; GACON, T.; BOILLOT, J-P.; CASANOVA, D.; BEAUREPAIRE, E.; SAUVIAT, M-P.; ALEXANDROU, A. Emission properties and applications of nanostructured luminescent oxide nanoparticles. **Prog. Solid State Ch.**, v. 33, p. 99-106, 2005.

96 BIONEXT PRODUTOS BIOTECNOLOGICOS LTDA. (Brasil). L. F. X. Farah; P. A. S. Podlech; C. R. Archanjo; L. A. Coral. **Continuous fermentation process to produce bacterial cellulosic sheets**. US 2009/0017506. 22 Dec. 2004, 15 Jan. 2009.

97 SIQUEIRA-MOURA, M. P.; PRIMO, F. L.; PETI, A. P. F.; TEDESCO, A. C. Validated spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for determination of chloroaluminum phthalocyanine in nanocarriers. **Pharmazie**, v. 65, n. 1, p. 9-14, 2010.

98 FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **SUPAC-SS CMC 7**: guidance for industry: nonsterile semisolid dosage forms: scale-up and postapproval changes: chemistry, manufacturing, and controls; *in vitro* release testing and *in vivo* bioequivalence documentation. Rockville, 1997. 40 p.

99 KRASNOVSKY, A. A. Jr.; NEVEROV, K. V.; EGOROV, S. Y.; ROEDER, B.; LEVALD, T. Photophysical studies of pheophorbide a and pheophytin a. Phosphorescence and photosensitized singlet oxygen luminescence. **J. Photochem. Photobiol. B Biol.**, v. 5, p. 245-254, 1990.

100 MARQUARDT, D. W. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. **J. Soc. Ind. Appl. Math.**, v. 11, n. 2, p. 431-441, 1963.

101 HYPPÄNEN, I.; HÖLSÄ, J.; KANKARE, J.; LASTUSAARI, M.; PIHLGREN, L. Upconversion properties of nanocrystalline $\text{ZrO}_2\text{:Yb}^{3+}$, Er^{3+} phosphors. **J. Nanomater.**, v. 2007, p. 1-8, 2007.

102 CHOI, S.; MOON, Y. M.; JUNG, H. K. Luminescent properties of PEG-added nanocrystalline $\text{YVO}_4\text{:Eu}^{3+}$ phosphor prepared by a hydrothermal method. **J. Lumin.**, v. 130, p. 549-553, 2010.

103 SCHÖFFEL, M. **Multifunctional rare earth vanadate nanoparticles**: luminescent labels, oxidant sensors and magnetic resonance imaging contrast agents. 2012. 268 f. These (Docteur en Physique) - École Polytechnique, Paris Tech, Paris, 2012.

104 HUIGNARD, A.; BUISSETTE, V.; LAURENT, G.; GACON, T.; BOILOT, J-P. Synthesis and characterizations of $\text{YVO}_4\text{:Eu}$ colloids. **Chem. Mater.**, v. 14, p. 2264-2269, 2002.

105 VORPAGEL, A. J. **Híbridos orgânico-inorgânicos siloxanos-ácidos graxos emissores de luz branca**. 2012. 79 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

106 CIMINO, N.; ARTUSO, F.; DECKER, F.; OREL, B.; VUK, A. S.; ZANONI, R. XPS and IR studies of transparent InVO_4 films upon Li charge-discharge reactions. **Solid State Ionics**, v. 165 p. 89-96, 2003.

- 107 LIN-VIEN, D.; COLTHUP, N. B.; FATELEY, W. G.; GRASSELLI, J. G. **The handbook of IR and Raman characteristic frequencies of organic molecules**. New York: Academic Press, 1991. p. 137.
- 108 MIALON, G.; TÜRKCAN, S.; DANTELLE, G.; COLLINS, D. P.; HADJIPANAYI, M.; TAYLOR, R. A.; GACON, T.; ALEXANDROU, A.; BOILOT, J. P. High up-conversion efficiency of $\text{YVO}_4\text{:Yb,Er}$ nanoparticles in water down to the single-particle level. **Phys. Chem. C**, v. 114, n. 51, p. 22449-22454, 2010.
- 109 RYBA-ROMANOWSKI, W.; GOLAB, S.; DOMINIAK-DZIK, G.; SOLARZ, P.; LUKASIEWICZ, T. Conversion of infrared radiation into red emission in $\text{YVO}_4\text{:Yb,Ho}$. **Appl. Phys. Lett.**, v. 79, n. 19, p. 3026-3028, 2001.
- 110 BAI, X.; SONG, H.; PAN, G.; LEI, Y.; WANG, T.; REN, X.; LU, S.; DONG, B.; DAI, Q.; FAN, L. Size-dependent upconversion luminescence in $\text{Er}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$ -codoped nanocrystalline yttria: saturation and thermal effects. **J. Phys. Chem. C**, v. 111, p. 13611-13617, 2007.
- 111 SONG, F.; ZHANG, G.; SHANG, M.; TAN, H.; YANG, J.; MENG, F. Three-photon phenomena in the upconversion luminescence of erbium–ytterbium-codoped phosphate glass. **Appl. Phys. Lett.**, v. 79, n. 12, p. 1748-1750, 2001.
- 112 SONG, H-W.; XIA, H-P.; SUN, B-J.; LU, S-Z.; LIU, Z-X.; YU, L-X. Upconversion luminescence dynamics in $\text{Er}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$ codoped nanocrystalline yttria. **Chin. Phys. Lett.**, v. 23, n. 2, p. 474-477, 2006.
- 113 TANIGUCHI, T.; SOGA, K.; TOKUZEN, K.; TSUJIUCHI, K.; KIDOKORO, T.; TOMITA, K.; KATSUMATA, K.; MATSUSHITA, N.; OKADA, K. NIR-excited NIR and visible luminescent properties of amphipathic $\text{YVO}_4\text{:Er}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$ nanoparticles. **J. Mater. Sci.**, v. 47, p. 2241-2247, 2012.
- 114 PSUJA, P.; HRENIAK, D.; STREK, W. Rare-earth doped nanocrystalline phosphors for field emission displays. **J. Nanomat.**, v. 2007, p. 1-7, 2007.
- 115 FADLALLA, H. M. H.; TANG, C. C.; ELSSFAH, E. M.; SHI, F. Synthesis and characterization of single crystalline YAG:Eu nano-sized powder by sol–gel method. **Mater. Chem. Phys.**, v. 109, p. 436-439, 2008.
- 116 MIALON, G. **Monocristaux $\text{YVO}_4\text{:Ln}$ à l'échelle nanométrique: mécanismes de fluorescence et "upconversion"**. 2009. 168 f. These (Docteur en Sciences des Matériaux) - École Polytechnique, Paris Tech, Paris, 2009.
- 117 BARUD, H. S.; BARRIOS, C.; REGIANI, T.; MARQUES, R. F. C.; VERELST, M.; DEXPERT-GHYS, J.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Self-supported silver nanoparticles containing bacterial cellulose membranes. **Mater. Sci. Eng. C**, v. 28, n. 4, p. 515-518, 2008.

118 CAMARGO, A. J. **Estudo químico-quântico *ab initio* e semi-empírico de compostos inorgânicos e orgânicos com possíveis aplicações tecnológicas.** 2001. 221 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

119 ROSSETTI, F. C.; LOPES, L. B.; CAROLLO, A. R. H.; THOMAZINI, J. A.; TEDESCO, A. C.; BENTLEY, M. V. L. B. A delivery system to avoid self-aggregation and to improve *in vitro* and *in vivo* skin delivery of a phthalocyanine derivative used in the photodynamic therapy. **J. Controlled Release**, v. 155, n. 3, p. 400-408, 2011.

120 BENY, M. G. Fisiologia da pele. **Cosmet. Toiletries** (Edição em Português) v. 12, p. 44-50, 2000.

121 SHAH, V. P. Skin penetration enhancers: scientific perspectives. In: HSIEH; D. S. **Drug permeation enhancement: theory and applications.** New York: Marcel Dekker, 1994. v. 62, p. 19-23.

122 SCHMOOK, F. P.; MEINGASSNER, J. G.; BILLICH, A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in *in vitro* percutaneous absorption. **Int. J. Pharm.**, v. 215, n. 1/2, p. 51-56, 2001.

123 RIGG, P. C.; BARRY, B. W. Shed snake skin and hairless mouse skin as a model membrane for human skin during permeation studies. **J. Invest. Dermatol.**, v. 94, n. 2, p. 235-240, 1990.

124 BABY, A. R.; HAROUTIOUNIAN FILHO, C. A.; SARRUF, F. D.; TAVANTE-JÚNIOR, C. R.; PINTO, C. A. S. O.; ZAGUE, V.; ARÊAS, E. P. G.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R. Estabilidade e estudo de penetração cutânea *in vitro* da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativa. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 44, n. 2, p. 233-248, 2008.

125 GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 59, p. 1152-1161, 2007.

126 PRIMO, F. L. **Processos fotodinâmicos para bioestimulação tecidual em modelo *in vitro* de pele humana empregando-se laser de baixa potência e cloro alumínio ftalocianina em nanoemulsão.** 2009. 169 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

127 NETZLAFF, F.; LEHR, C. M.; WERTZ, P. W.; SCHAEFER, U. F. The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 60, p. 167-178, 2005.

128 COULMAN, S. A.; BARROW, D.; ANSTEY, A.; GATELEY, C.; MORRISSEY, A.; WILKE, N.; ALLENDER, C.; BRAIN, K.; BIRCHALL, J. C. Minimally invasive cutaneous delivery of macromolecules and plasmid DNA via microneedles. **Curr. Drug Delivery**, v. 3, p. 65-75, 2006.

- 129 PRIMO, F. L.; MICHIELETO, L.; RODRIGUES, M. A. M.; MACAROFF, P. P.; MORAIS, P. C.; LACAVA, Z. G. M.; BENTLEY, M. V. L. B.; TEDESCO, A. C. Magnetic nanoemulsions as drug delivery system for Foscan®: skin permeation and retention *in vitro* assays for topical application in photodynamic therapy (PDT) of skin cancer. **J. Magn. Magn. Mater.**, v. 311, p. 354-357, 2007.
- 130 LIU, K.; LIU, X.; ZENG, Q.; ZHANG, Y.; TU, L.; LIU, T.; KONG, X.; WANG, Y.; CAO, F.; LAMBRECHTS, S. A. G.; AALDERS, M. C. G.; ZHANG, H. Covalently assembled NIR nanoplatfrom for simultaneous fluorescence imaging and photodynamic therapy of cancer cells. **ACS Nano**, v. 6, p. 4054-4062, 2012.
- 131 BONNETT, R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. **Chem. Soc. Rev.**, v. 24, p. 19-33, 1995.
- 132 SIQUEIRA-MOURA, M. P.; PRIMO, F. L.; ESPREAFICO, E. M.; TEDESCO, A. C. Development, characterization, and photocytotoxicity assessment on human melanoma of chloroaluminum phthalocyanine nanocapsules. **Mater. Sci. Eng. C**, v. 33, n. 3, p. 1744-1752, 2013.

APÊNDICE A

NANOPARTÍCULAS CORE-SHELL PARA CONVERSÃO ASCENDENTE PARA APLICAÇÕES EM NANOMEDICINA

Este apêndice apresenta um trabalho realizado em paralelo ao projeto de mestrado sobre a síntese de novos sistemas nanoparticulados dopados com íons lantanídeos Yb^{3+} - Er^{3+} e nanopartículas core-shell com casca mesoporosa de sílica associadas a nanopartículas de prata. A ideia de utilizar a sílica surgiu da necessidade de redispersar as nanopartículas para conversão ascendente em meio aquoso, e para facilitar a fixação do fotossensibilizador na nanoestrutura, por meio da incorporação na casca mesoporosa. As nanopartículas de Ag decorando a superfície das nanopartículas de SiO_2 foram investigadas como moduladoras da geração de oxigênio singleto, por meio da ressonância plasmônica de superfície. Este trabalho foi realizado em um estágio de 3 meses no Centre d'optique, photonique et laser da Université Laval em Québec, Canadá, sob a orientação do Prof. Denis Boudreau.

**CORE-SHELL UPCONVERTING NANOPARTICLES FOR APPLICATIONS IN
NANOMEDICINE**

Supervisor: Denis Boudreau

Centre of Optics Photonics and Lasers, Laval University, Québec, Canada

Supervisor in Brazil: Sidney José Lima Ribeiro

Institute of Chemistry- São Paulo State University-UNESP, Araraquara-SP, Brazil

FAPESP Process: 2013/01226-2

Term: March 27 to June 26, 2013

ABSTRACT

The concepts of plasmon-enhanced emission and energy transfer were applied to the upconversion nanoparticles. Potential applications of the upconversion nanoparticles concern the utilization of the visible light emitted under IR excitation in order to sensitize some photodynamic therapy (PDT) photoactive molecules. The upconversion phenomenon is advantageous for biological applications, because near IR excitation is coincident with the biological transparency in the therapeutic window, which allows deep penetration into biological tissues. A novel strategy was developed to grow silver nanoparticles in silica spheres. Core-shell nanoparticles made from solid silica spheres core and mesoporous silica shell containing metal colloids were investigated as possible carriers of singlet oxygen photosensitizer molecule, chloroaluminum phthalocyanine (CIAIPc). Mesoporous silica shell was applied as a carrier for drug storage and release applications. Photophysical and photochemical properties of silica nanoparticles loaded with CIAIPc in the presence (or not) of Ag nanoparticles were examined. The surface plasmon resonance generated by the metal nanoparticles is responsible by the increased the triplet excited-state and singlet oxygen lifetimes. Upconversion nanoparticles were prepared, consisting of a NaYF₄ matrix doped with Yb³⁺-Er³⁺. The nanoparticles presented the property of converting near-infrared (NIR) radiation into higher-energy visible light emission. The upconversion nanoparticles were coated with silica. Silica coating makes the particle soluble in ethanol or water. Structural and spectroscopic characterization of the new particles was explored. The perspective for this work is to prepare core-shell nanoparticles (YVO₄:Ln@Ag/Au@SiO₂), where Ln= Yb/Ho and Yb/Er, with Ag/Au nanoparticles decorating the surface of the oxide nanoparticles, and where SiO₂ is a thin mesoporous silica outer shell to facilitate anchoring of photosensitizer on nanoconstruct.

LIST OF FIGURES

Figure A.1.	TEM images of silica nanoparticles with different sizes.....	107
Figure A.2.	TEM images of silica spheres with silver nanoparticles prepared with different proportions of $\text{AgNO}_3/\text{NaNO}_3$: 1:1 (left) and 1:2 (right).	108
Figure A.3.	SEM images of silica spheres with silver nanoparticles prepared with different proportions of $\text{AgNO}_3/\text{NaNO}_3$: 1:1 (A and B) and 1:2 (C and D).....	109
Figure A.4.	Absorption spectra of silver nanoparticles in silica spheres for samples prepared with different ratio of $\text{AgNO}_3/\text{NaNO}_3$: 1:1 and 1:2 (w/w).....	110
Figure A.5.	Absorption spectra of silver nanoparticles in silica spheres for samples annealed for different durations (A), physical aspect of the nanoparticles redispersed in ethanol (B).....	111
Figure A.6.	N_2 adsorption/desorption isotherms of silica spheres with and without silver nanoparticles.....	112
Figure A.7.	TEM images of $\text{sSiO}_2@\text{mSiO}_2$ nanoparticles.....	113
Figure A.8.	TEM images of silver nanoparticles in $\text{sSiO}_2@\text{mSiO}_2$ particles.....	113
Figure A.9.	Absorption spectra of silver nanoparticles in $\text{sSiO}_2@\text{mSiO}_2$ particles for samples annealed for different durations (A), physical aspect of the nanoparticles redispersed in ethanol (B).....	114
Figure A.10.	Nitrogen adsorption-desorption isotherms and the corresponding pore size distribution curves for $\text{sSiO}_2@\text{mSiO}_2$ nanoparticles without silver treated for 3 and 7 hours (A and B), $\text{sSiO}_2@\text{mSiO}_2$ particles with silver nanoparticles (C and D).....	116
Figure A.11.	UV-vis absorption spectra of standard CIAIPc solutions in pyridine with different CIAIPc concentrations (0.50–3.00 $\mu\text{g/mL}$). Inset: plot of CIAIPc concentration vs. absorbance.....	117
Figure A.12.	Triplet transient decay curves and the exponential fit for free CIAIPc (A) and CIAIPc-loaded in nanoparticles: $\text{sSiO}_2@\text{mSiO}_2$ (B) and $\text{sSiO}_2@\text{mSiO}_2 + \text{Ag}$ (C).....	119

Figure A.13.	Singlet oxygen decay curves and the exponential fit for reference pheophorbide-a (A), free CIAIPc (B) and CIAIPc-loaded in nanoparticles: sSiO ₂ @mSiO ₂ (C) and sSiO ₂ @mSiO ₂ + Ag (D).....	121
Figure A.14.	TEM images of NaYF ₄ :Yb:Er nanoparticles with molar fraction Y:Yb:Er=78:18:4 and thermal treatment for 2 hours (A) and with silica shell (B). Y:Yb:Er=80:18:2 treated for 1 hour (C) and silica coated (D).....	123
Figure A.15.	Left: upconversion emission spectra of the NaYF ₄ :Yb:Er nanoparticles with different Y:Yb:Er molar fraction and duration of thermal treatment (left). Right: images of colloidal solutions in cyclohexane: without IR excitation (A) and Y:Yb:Er (78:18:4) - 300 °C/2h (B); and Y:Yb:Er (80:18:2) - 300 °C/1h (C) under exposure to 980 nm laser.....	124
Figure A.16.	Energy level diagram of Yb ³⁺ -Er ³⁺ lanthanide ions and schematic representation for APTE or ETU process.....	124
Figure A.17.	Left: upconversion emission spectra of silica coated NaYF ₄ :Yb:Er nanoparticles with different Y:Yb:Er molar fraction and duration of thermal treatment. Right: images of colloidal solutions in ethanol: without IR excitation (A) and Y:Yb:Er (78:18:4) - 300 °C/2h (B); and Y:Yb:Er (80:18:2) - 300 °C/1h (C) under exposure to 980 nm laser..	125
Figure A.18.	Absorption spectrum of CIAIPc in ethanol solution.....	126

LIST OF TABLES

Table A.I.	Surface area, pore volume and size of silica spheres with and without silver nanoparticles.....	112
Table A.II.	Surface area, pore volume and size of sSiO ₂ @mSiO ₂ nanoparticles with and without silver nanoparticles.....	115
Table A.III.	Triplet lifetimes (τ_T) for the samples.....	119
Table A.IV.	Singlet oxygen lifetimes (τ_Δ) and quantum yield (ϕ_Δ) for the samples.....	121

LIST OF ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

PDT - photodynamic therapy

CIAIPc - chloroaluminium phthalocyanine

NIR - near-infrared

TEOS - tetraethylorthosilicate

C₁₈TMS - octadecyltrimethoxysilane

TEM - transmission electron microscopy

SEM - Scanning electron microscopy

BET - Brunauer–Emmet–Teller

DMSO – dimethyl sulfoxide

τ_T - Triplet lifetime

τ_Δ - Singlet oxygen lifetime

ϕ_Δ - Singlet oxygen quantum yield

INDEX

A.1 INTRODUCTION	99
A.2 OBJECTIVES	102
A.3 EXPERIMENTAL DETAILS	102
A.3.1 Materials	102
A.3.2 Synthesis of silica nanospheres	102
A.3.3 Synthesis of silver nanoparticles in silica nanospheres	102
A.3.4 Synthesis of silver nanoparticles in solid silica core/ mesoporous silica shell nanospheres (sSiO₂@mSiO₂)	103
A.3.5 Loading ClAlPc into sSiO₂@mSiO₂	103
A.3.6 Synthesis of NaYF₄:Yb:Er nanoparticles	104
A.3.7 Silica coating of NaYF₄:Yb:Er nanoparticles	104
A.3.8 Characterization	105
A.4 RESULTS AND DISCUSSION	107
A.5 CONCLUSIONS	127
REFERENCES.....	128

A.1 INTRODUCTION

Lanthanide ions present an interesting property that refers to the process known as energy transfer upconversion with visible electromagnetic emission obtained after excitation in the infrared range. In the case of lanthanide pairs or triades upconversion emission can be relatively efficient allowing several different applications like near-IR quantum counters, display technologies and biological imaging.¹

In the case of biological applications for development of imaging and therapeutic tools, when compared to conventional fluorophores, organic dyes and quantum dots, the upconversion emission process allows sensitive detection without the usual interference from auto-fluorescence background normally found in biological tissue. Moreover, near IR excitation coincides with the optical therapeutic window, which allows deeper penetration into biological tissues.^{2, 3} Potential applications concern the utilization of the visible light emitted under IR excitation in order to sensitize some photodynamic therapy (PDT) photoactive molecules such as phthalocyanines.⁴ Photodynamic therapy is a promising treatment for a variety of neoplastic and non-neoplastic diseases that relies on the combination of light plus light-sensitive drug (called photosensitizers) to produce reactive oxygen species that can kill cancer cells or infectious microorganisms. The excited photosensitizer transfers its energy to molecular oxygen while returning to the ground state, which results in the production of reactive oxygen species and singlet oxygen.^{5, 6, 7}

In this MSc project yttrium vanadate nanoparticles, doped with the pair Yb-Ho or Yb-Er have been prepared under well known literature methods^{8, 9, 10}, in order to get emission with different colors. In this 3-month stage, sodium yttrium fluoride Yb-Er doped nanoparticles were prepared. The choice of a new matrix was due to some limitations found to disperse YVO_4 nanoparticles in water or ethanol, an important factor for biological applications. NaYF_4 matrix is one of the most commonly used and have been reported as the most efficient NIR-to-visible up-conversion material.¹¹ In this work, the $\text{NaYF}_4\text{:Yb,Er}$ nanoparticles were coated with a silica shell by using a reverse

microemulsion method ³, in order to obtain nanoparticles dispersible in aqueous media and with functional chemical groups on the surface for conjugation of biomolecules.

The exploration of novel strategies to increase the efficient excitation of the photoactive drugs used in photodynamic therapy (PDT) is an active field of research. One of the approaches to achieve this goal is the use of metal nanoparticles to enhance the photophysical properties of photoactive molecules. Collective oscillations of the electrons in the metal core (called “plasmons”) induced by a local electromagnetic field or an oscillating dipole in close proximity with the core can lead to greatly enhanced excitation of neighboring molecules, giving rise to SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering) and MEF (Metal-Enhanced Fluorescence) techniques, respectively. ^{12, 13} It is possible to enhance the singlet oxygen generation by coupling to surface plasmons that can increase the triplet yield of sensitizers, which results in more singlet oxygen generation. ^{14, 15, 16}

In the present work, the formation of silver nanoparticles in silica nanospheres was explored based on a method published in the literature applied to soda-lime silicate glass that combines chemical and thermal treatment performed in two steps: (1) metal ion introduction and (2) thermal treatment. ¹⁷ A number of studies in the literature report the successful use of mesoporous silica materials as carriers in drug delivery applications due to its properties, such as large surface area and excellent loading capacity, which allows drug storage and controlled release. ^{18, 19, 20} The traditional synthesis method consists on the simultaneous sol-gel polymerization of tetraethylorthosilicate (TEOS) and octadecyltrimethoxysilane (C₁₈TMS) followed by the removal of the organic groups. ^{21, 22}

The aim of the present study was to coat the upconversion nanoparticles with a mesoporous silica shell for loading the photosensitizer, grow silver nanoparticles on silica shell and test the enhancement of singlet oxygen production, caused by plasmon-enhanced emission and energy transfer.

A.2 OBJECTIVES

The main goal of this work was to increase the efficient excitation of the photoactive molecules, applying the concepts of plasmon-enhanced emission and energy transfer, by the preparation of nanocomposites made from upconverting nanoparticles and metal colloids to be investigated as possible carriers of singlet oxygen photosensitizer molecules.

The objectives may be summarized in:

- ✓ Formation of silver nanoparticles in silica spheres;
- ✓ Synthesis of core-shell nanoparticles made from solid silica spheres core and mesoporous silica shell, containing silver nanoparticles;
- ✓ Loading of photosensitizer on silica mesoporous shell;
- ✓ Preparation of $\text{NaYF}_4:\text{Ln}$ ($\text{Ln}=\text{Yb}/\text{Er}$) upconversion nanoparticles followed by silica coating;
- ✓ Structural and spectroscopic characterization of the new particles.

A.3 EXPERIMENTAL DETAILS

A.3.1 Materials

Silver nitrate (AgNO_3), sodium nitrate (NaNO_3) tetraethoxysilane (TEOS), octadecyltrimethoxysilane (C_{18}TMS), ammonia (NH_4OH 30%), Igepal® CO-520 (average molecular weight of 441), yttrium (III) chloride hexahydrate (YCl_3), ytterbium (III) chloride hexahydrate (YbCl_3), erbium (III) chloride hexahydrate (ErCl_3), oleic acid, octadecene, sodium hydroxide (NaOH), ammonium fluoride (NH_4F), cyclohexane, chloroaluminum phthalocyanine (ClAlPc) and phosphate buffer saline solution (PBS), all analytical grade were purchased from Sigma-Aldrich Co and used as received. Deionized water and anhydrous ethanol (EtOH) were used as dispersion media. The nanoparticles were redispersed in ethanol for recording the absorption spectra.

A.3.2 Synthesis of silica nanospheres

Silica nanospheres were obtained by the traditional Stöber method²³ with tunable particle size by varying the amount of TEOS added to fixed quantity of ethanol and ammonia. Ethanol (13.8 mL), ammonia solution (1.57 mL) and TEOS (305/407/610 μL) were mixed and rotated for 18 h at speed of 300 rpm. The nanoparticles were collected by centrifugation, washed with ethanol and water 3 times and dried in oven at 80 °C.

A.3.3 Synthesis of silver nanoparticles in silica nanospheres

Silver ion exchange was performed by adding silica nanoparticles (400 nm sized, 200 mg) in AgNO_3 (1 g) and NaNO_3 (2 g) salt bath at 360 °C for 30 min. The growth of silver nanoparticles was made by annealing the ion-exchanged samples in air, at 500

°C, varying duration. The ion exchange was also performed with a salt bath with a ratio of $\text{AgNO}_3/\text{NaNO}_3$: 1:1 (w/w).

A.3.4 Synthesis of silver nanoparticles in solid silica core/ mesoporous silica shell nanospheres ($\text{sSiO}_2@\text{mSiO}_2$)

Silica nanoparticles (150 nm sized, 80 mg) were redispersed in ethanol (14.3 mL) and water (2 mL). Ammonia solution (1 mL), TEOS (0.5 mL) and C_{18}TMS (0.2 mL) were added and the solution was rotated for 6 h at speed of 300 rpm. The nanoparticles were collected by centrifugation, washed with ethanol and water 3 times and dried at 80 °C. Silver ion exchange was performed by adding silica nanoparticles (100 mg) in AgNO_3 (1 g) and NaNO_3 (2 g) salt bath at 360 °C for 30 min. The growth of silver nanoparticles and formation of pores in the shell, by removal of organic group of C_{18}TMS , were made in one step by annealing the ion-exchanged samples in air, at 500 °C, varying duration.

Control samples without silver nanoparticles were prepared. The calcination at 500 °C was made for different durations (3 or 7 h) for formation of mesoporous silica shell.

A.3.5 Loading CIAIPc into $\text{sSiO}_2@\text{mSiO}_2$

Solid silica core / mesoporous silica shell nanospheres (100 mg) were immersed in 1 mL of a CIAIPc solution in pyridine (0.5 mg mL^{-1}) and remained for 24 hours under stirring in a vortex mixer. After this period, the nanoparticles were centrifuged and the supernatant was collected for the measurement of UV-visible absorption. A standard curve of CIAIPc in pyridine was established. The concentration of CIAIPc incorporated into $\text{sSiO}_2@\text{mSiO}_2$ nanoparticles was calculated by subtracting the measured amount from the initial concentration of CIAIPc. The nanoparticles collected by centrifugation and washed with PBS solution for three times.

A.3.6 Synthesis of NaYF₄:Yb:Er nanoparticles

The upconversion nanoparticles synthesis was based on a method that was reported previously.³ All the steps of the synthesis were performed in a Schlenk line system under a dry nitrogen atmosphere. YCl₃ (0.8 mmol), YbCl₃ (0.18 mmol), and ErCl₃ (0.02 mmol), were mixed, in order to obtain a molar fraction Y:Yb:Er = 80:18:2, and then added to 12 mL oleic acid and 15 mL octadecene. The solution was heated to 160 °C until the formation of a homogeneous solution, and then cooled to room temperature. A solution containing NaOH (2.5 mmol) and NH₄F (4 mmol) in 10 mL of methanol was slowly added into the flask and stirred for 30 min for the precipitation of amorphous NaYF₄. The solution was slowly heated to remove methanol, degassed at 100 °C for 10 min, and then heated and maintained at 300 °C for different durations (1 and 2 hours) to allow the growth of amorphous NaYF₄ nuclei. The solution was cooled naturally, nanocrystals were precipitated from the solution with acetone and washed with ethanol/water (1:1 v/v) for three times.

A.3.7 Silica coating of NaYF₄:Yb:Er nanoparticles

CO-520 (0.1 mL), cyclohexane (6 mL) and NaYF₄ nanocrystal solution in cyclohexane (4 mL, 0.01 M) were mixed and stirred for 10 min. After CO-520 (0.4 mL) and ammonia solution (0.08 mL) were added and the solution was sonicated for 20 min. TEOS (0.04 mL) was then added. The solution was stirred horizontally for two days at 600 rpm. The nanoparticles were precipitated by adding acetone, and washed with ethanol/water (1:1 v/v) twice.

A.3.8 Characterization

The nanoparticles were subjected to transmission electron microscopy (TEM) for morphological characterization in a Phillips Tecnai 12 microscope. Nanoparticle samples were prepared on carbon films supported by copper hexagonal 200 mesh grids (Canemco). Scanning electron microscopy (SEM) was performed in a Quanta FEG 400 (FEI Company) microscope. The microscopy images were processed using commercial image analysis software (IMT i-Solution).

UV-vis spectra were recorded on a Varian Cary 50 conc. spectrophotometer using a 1 cm path length quartz cuvettes at room temperature.

Nitrogen physisorption measurements were performed at $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ with an ASAP 2010, Micromeritics. Before the sorption measurements, the samples were outgassed under vacuum for at least 6h at $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ (for calcined MCM) or $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (for all functionalized MCM). The specific Brunauer–Emmet–Teller surface area (SBET) was determined using the BET equation in the range $0.05 \leq P/P_0 \leq 0.20$ and the total pore volume was obtained at $P/P_0 = 0.95$. Pore diameter was estimated using non-local density functional theory, NLDFIT, methods (Autosorb 1.55 software, Quantachrome Instrument) applying adsorption branch model (considering N_2 sorption at $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ in silica with cylindrical pore geometry).

Photophysical and photochemical studies of the nanoparticles doped with ClAIPc were performed to determine its triplet excited state and singlet oxygen generation. Lifetime was calculated from a kinetics analysis of the mono-exponential decay for transient species obtained at 355 nm. The spectrophotometer, used for time-resolved measurements, was an Edinburgh Analytical Instruments (Livingston, UK), model FL9000CD. The source of irradiation used was a pulsed Nd-YAG laser from Continuum (SURELITE I-10, Continuum, Santa Clara, California) adjusted for the third harmonic at (355 nm). The pulse length was 8 ns and the repetition rate was 10 Hz. The pulse energy was 15 mJ, as measured by a power meter (Field Master, Coherent, Santa Clara, California). The diameter of the beam incident on the sample was 6 mm which was held in a 1 cm cuvette. The decay kinetics were measured at a single wavelength using a monochromator M300 and a photomultiplier R928P from Benthon Instruments

(Livingston, UK). Transient decays were averaged using a digital oscilloscope (TDS 340A, Tektronix, Wilsonville, Oregon). In studies involving the detection of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), a phosphorescence emission signal at 1270 nm was identified using a germanium photodetector of North Coast Scientific Corporation, model 823. The software provided by Edinburgh Instruments was used to obtain and analyze the exponential decay curves, based on iterative algorithm Marquadt (analysis of nonlinear least squares). The concentrations of the nanoparticles solutions in phosphate buffer and reference solutions analyzed were adjusted based on the absorbance at 355 nm (wavelength excitation), fixed in 0.3, in order to avoid any internal filter effects. The measurements were performed under air-equilibrated conditions.

The singlet oxygen quantum yield was determined by comparative method expressed by the following equation:

$$\phi_{\Delta\text{sample}} = (I_{\text{sample}}/I_{\text{standard}}) \cdot (\tau_{\text{standard}}/\tau_{\text{sample}}) \cdot \phi_{\text{ref}} \quad (1)$$

where ϕ_{Δ} is the singlet oxygen quantum yield, I is the intensity of the phosphorescence emission and τ is the singlet oxygen lifetime. AlClPc in DMSO was adopted as the standard. The singlet oxygen quantum yield of reference ($\phi_{\Delta\text{ref}}$) is 0.29, as described by Idowu and Nyokong, 2007.²⁴ The experiments were done using a solution containing 10 μM of pheophorbide-a in ethanol as a standard for relative calculation ($\phi_{\Delta} = 0.59$).²⁵

A.4 RESULTS AND DISCUSSION

Monodisperse silica nanospheres were obtained with different particle sizes by varying the amount of TEOS added during the synthesis. TEM images (Figure A.1) show particles with homogeneous morphology and size. Silica spheres with an average diameter of 150 ± 23 nm (A), 181 ± 27 nm (B) and 401 ± 60 nm (C) were obtained by adding 305 μ L, 407 μ L and 610 μ L TEOS, respectively.

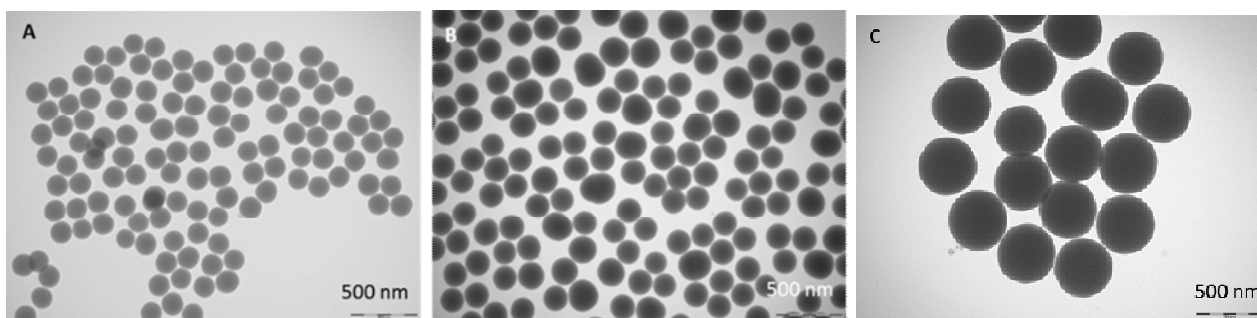


Figure A.1. TEM images of silica nanoparticles with different sizes.

Silica spheres with silver nanoparticles were prepared and characterized in terms of structural and optical properties. TEM images (Figure A.2) of silica spheres with silver nanoparticles, prepared with different proportions of $\text{AgNO}_3/\text{NaNO}_3$: 1:1 (left) and 1:2 (right) and treated at 500 $^{\circ}\text{C}$ for 3 hours, show silica spheres decorated with silver nanoparticles on its surface.

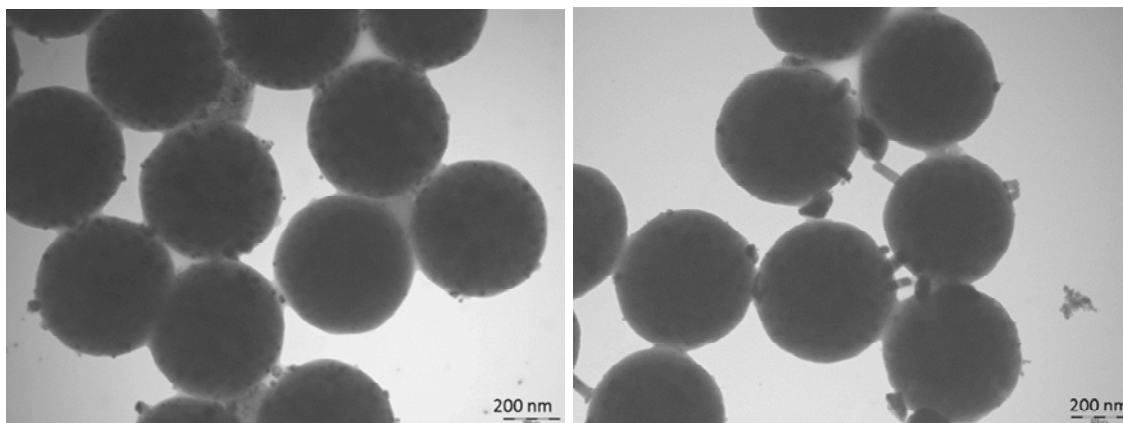


Figure A.2. TEM images of silica spheres with silver nanoparticles prepared with different proportions of $\text{AgNO}_3/\text{NaNO}_3$: 1:1 (left) and 1:2 (right).

SEM images of silica spheres (400 nm sized) with silver nanoparticles (Figure A.3) prepared with different proportion of $\text{AgNO}_3/\text{NaNO}_3$: 1:1 (A and B) and 1:2 (C and D) show similar size of Ag nanoparticles grown on the surface of silica spheres: 28.9 ± 15.5 nm and 32.5 ± 10.8 nm, respectively.

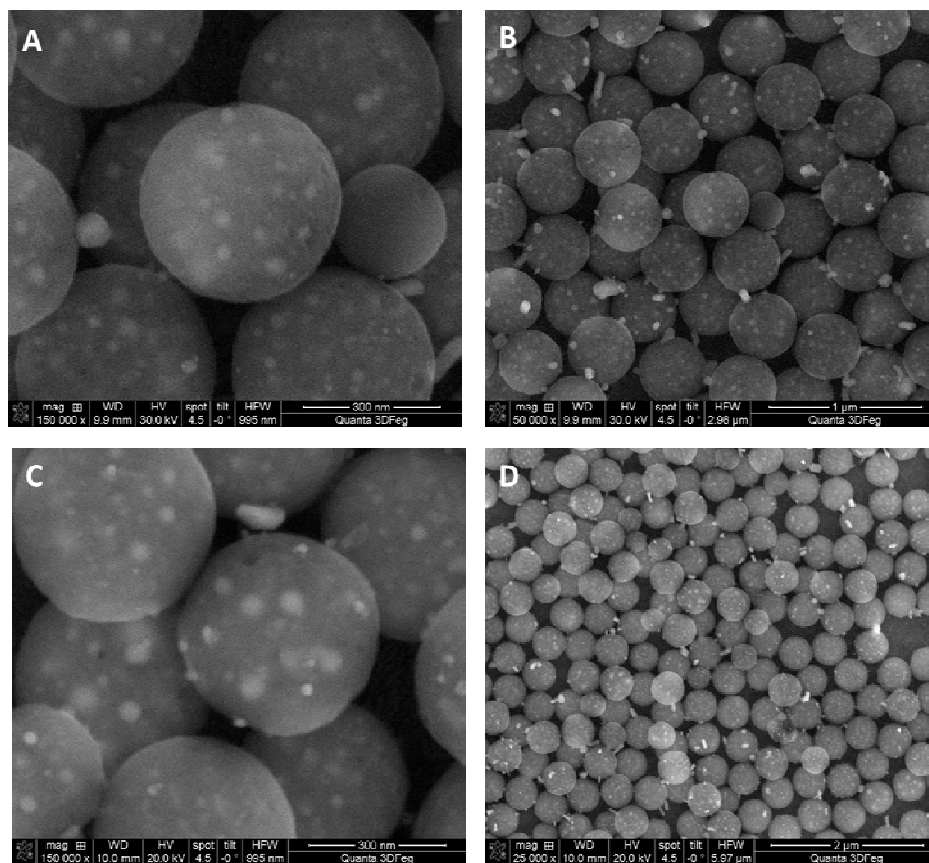


Figure A.3. SEM images of silica spheres with silver nanoparticles prepared with different proportions of $\text{AgNO}_3/\text{NaNO}_3$: 1:1 (A and B) and 1:2 (C and D).

Absorption spectra of silver nanoparticles in silica spheres for samples synthesized in salt bath with different proportions of $\text{AgNO}_3/\text{NaNO}_3$: 1:1 and 1:2 (w/w) and annealed for 3 hours (Figure A.4) reveal a band at around 415 nm that can be assigned to the silver plasmon resonance.

The synthesis of silver nanoparticles in silica spheres was made in two steps. After the first step (ion exchange) no plasmon band around 400 nm was observed for all samples, because at this point of synthesis, silica particles contain mainly silver ions and few clusters (with a diameter less than 1 nm). There is a threshold temperature (410 °C) to initiate the silver particle formation.¹⁷

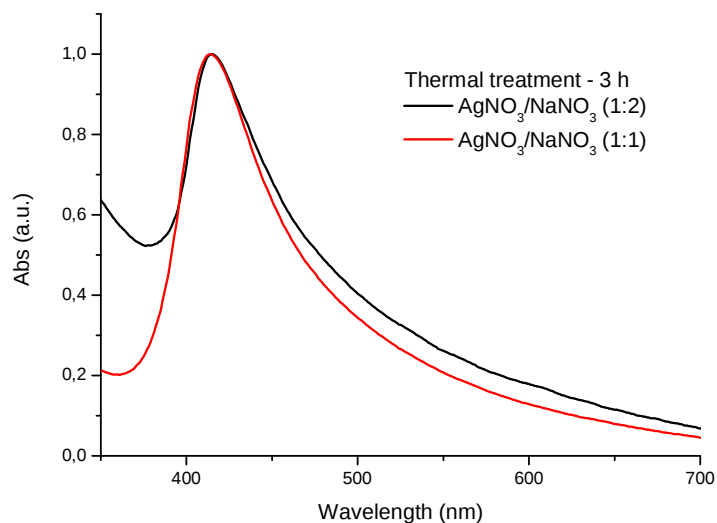


Figure A.4. Absorption spectra of silver nanoparticles in silica spheres for samples prepared with different ratio of $\text{AgNO}_3/\text{NaNO}_3$: 1:1 and 1:2 (w/w).

Absorption spectra of silver nanoparticles in silica spheres for samples annealed for different durations at 500 °C and ion-exchange performed with the ratio 1:2 $\text{AgNO}_3/\text{NaNO}_3$ are shown in Figure A.5.A. The silver plasmon band with a maximum at around 420 nm continuously increases with duration, which can be due to an increasing silver nanoparticle size or concentration. Following the same trend, the suspensions of nanoparticles in ethanol became darker with longer annealing (Figure A.5.B)

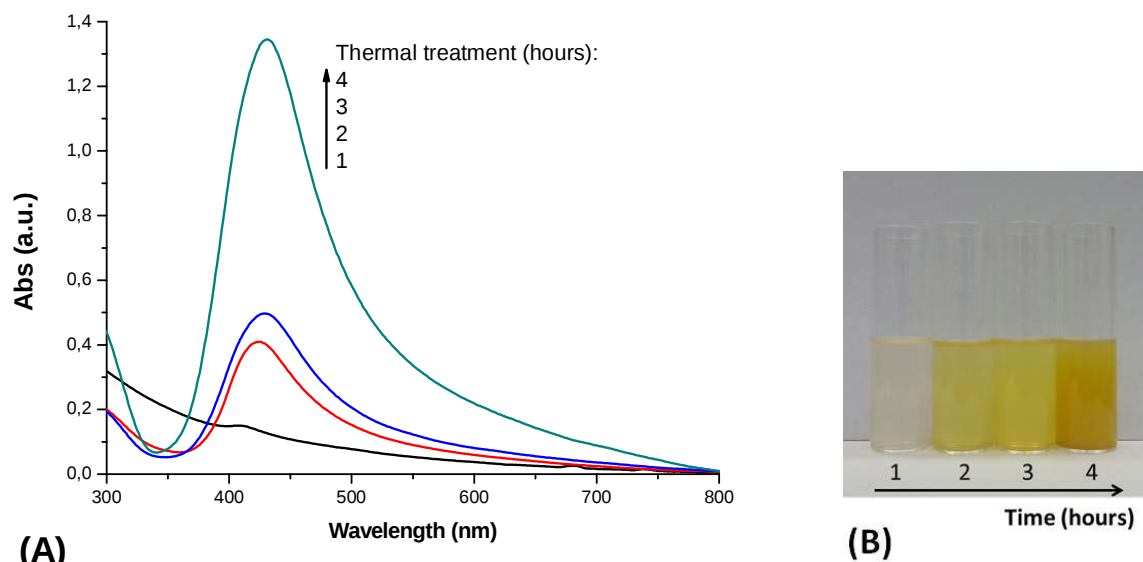


Figure A.5. Absorption spectra of silver nanoparticles in silica spheres for samples annealed for different durations (A), physical aspect of the nanoparticles redispersed in ethanol (B).

Porosity and surface area are important parameters to be studied, since one of the goals of this work is loading photosensitizer into the pores of silica. BET analysis by gas adsorption was performed on silica spheres with silver nanoparticles and a control sample of silica spheres without silver, both annealed at 500 °C for 3 hours. Surface area pore volume and size are shown in Table A.I. The BET surface area was very low for both samples (19.3 m².g⁻¹ and 10.9 m².g⁻¹ for SiO₂ + Ag and SiO₂ control sample, respectively). N₂ adsorption/desorption isotherms (Figure A.6) could be classified as a type-III isotherms according to the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) nomenclature.²⁶ This type of isotherm is obtained when adsorbate-adsorbate interaction is greater than the interaction between adsorbate-adsorbent surfaces.²⁷ The results suggests that the silica was a nanoporous material with very low surface area. Mesoporous silica is a better choice for loading photosensitizer, due to its higher surface area that allows a significantly higher amount of drug to be loaded.

Table A.I. Surface area, pore volume and size of silica spheres with and without silver nanoparticles.

Sample	Thermal treatment	Specific surface area (m ² .g ⁻¹)	Pore volume (cm ³ .g ⁻¹)	Mean pore diameter (nm)
SiO ₂	500°C / 3h	19.3	2.34 x 10 ⁻²	2.6
SiO ₂ + Ag	500°C / 3h	10.9	1.39 x 10 ⁻²	2.6

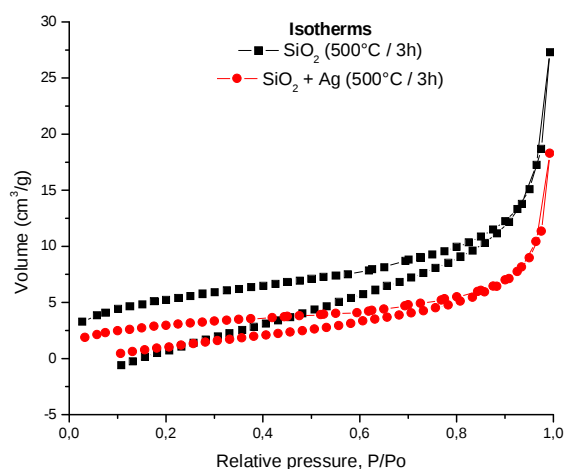


Figure A.6. N₂ adsorption/desorption isotherms of silica spheres with and without silver nanoparticles.

Silica spheres were coated with a mesoporous silica shell. Figure A.7 shows TEM images of core-shell sSiO₂@mSiO₂ nanoparticles with uniform mesoporous silica shell on the solid silica surface. Solid silica core size was 164 ± 12 nm and the total size of the particles (core + shell) was 344 ± 23 nm. The thickness of the mesoporous silica shell was about 90 nm.

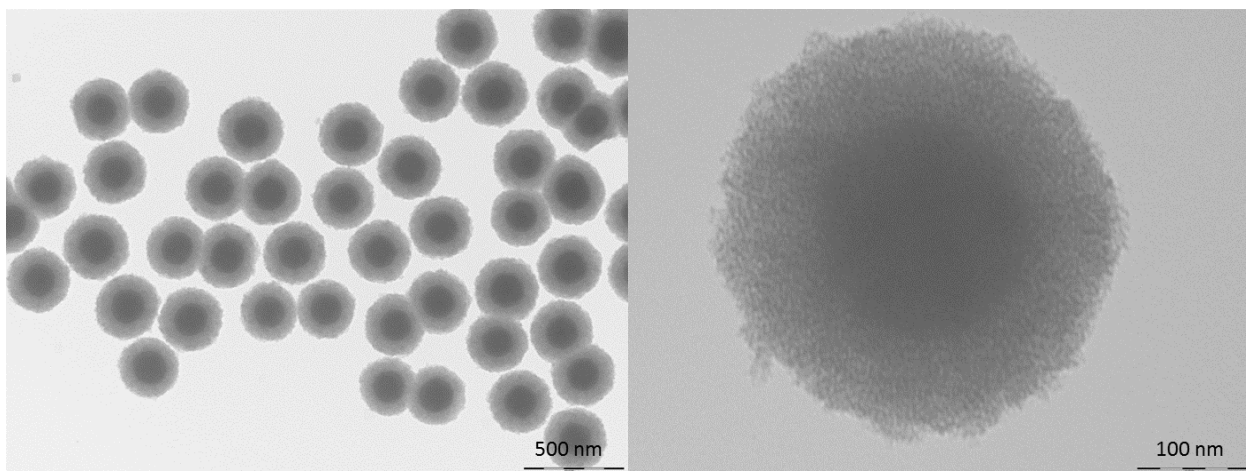


Figure A.7. TEM images of $\text{sSiO}_2@\text{mSiO}_2$ nanoparticles.

Silver nanoparticles in $\text{sSiO}_2@\text{mSiO}_2$ particles were synthesized. TEM image (Figure A.8) shows silver nanoparticles homogeneously distributed on core and shell with average diameter 19 ± 5 nm.

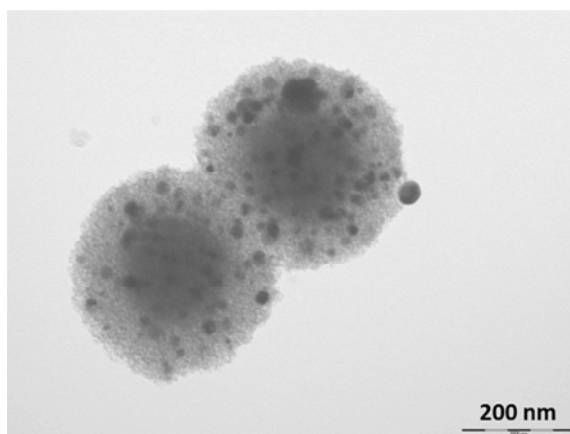


Figure A.8. TEM images of silver nanoparticles in $\text{sSiO}_2@\text{mSiO}_2$ particles.

Silver nanoparticles in $\text{sSiO}_2@\text{mSiO}_2$ particles were annealed at 500°C for different durations. The growth of silver nanoparticles and the conversion of the silica to a porous material by removing the organic part of C_{18}TMS are performed in a single thermal treatment. Absorption spectra and physical aspect of nanoparticles suspensions for different annealing durations are shown in Figure A.9. After the first 1-2 hours of

annealing, the suspensions are darker due to incomplete degradation of the organic part and all the spectra present higher absorbance, including the absorption band around 415 nm. After 3 hours, the suspension is clearer and the silver plasmon band is less intense. From 5 to 7 hours there is no change on intensity of the band around 415 nm, suggesting that silver nanoparticles growth is completed after 5 hours. Thermogravimetric analysis will be performed to investigate the degradation of C₁₈TMS as a function of time.

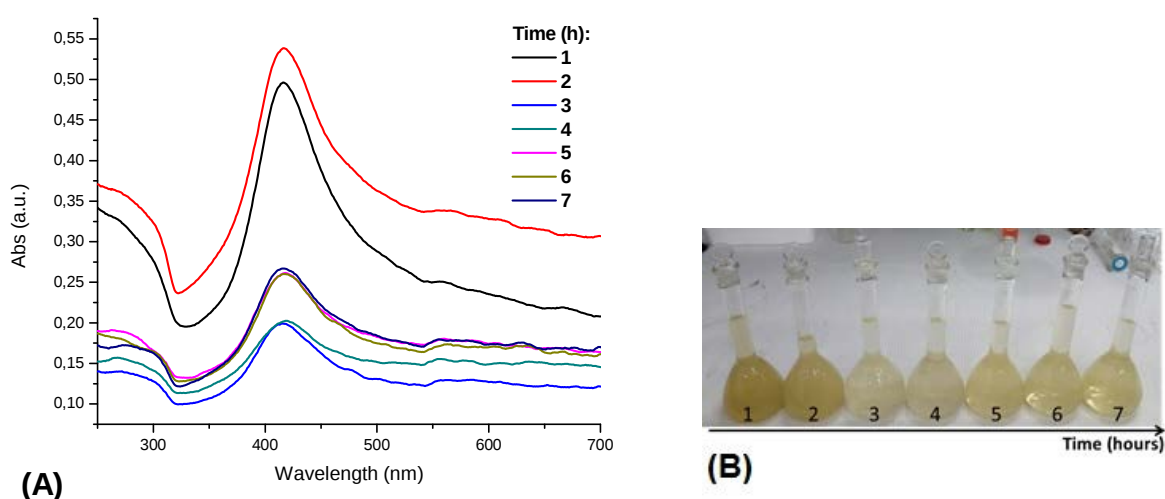


Figure A.9. Absorption spectra of silver nanoparticles in sSiO₂@mSiO₂ particles for samples annealed for different durations (A), physical aspect of the nanoparticles redispersed in ethanol (B).

Characterization of pore structures by BET analysis was performed for sSiO₂@mSiO₂ with and without silver nanoparticles. Surface area, pore volume and size are presented on Table A.II. Pore sizes of sSiO₂@mSiO₂ with silver nanoparticles was determined to be 6.1 nm, larger than that of sSiO₂@mSiO₂ nanoparticles without silver (4.7 nm for 3 and 7 hours of annealing). Smaller pores mean larger surface areas around them, so surface area and pore volume values are higher for the samples without silver. It is believed that the heat treatment in the molten salt bath needed for ion exchange caused modifications of the silica framework.

Nitrogen adsorption-desorption isotherms and pore size distributions of sSiO₂@mSiO₂ particles with and without silver nanoparticles are shown in Figure A.10.

A typical type-IV isotherm is observed, indicating the presence of well-defined mesopores.²⁶

The results obtained for $sSiO_2@mSiO_2$ nanoparticles without silver are similar for both samples (treated for 3 and 7 hours), which means that 3 hours are enough for pore formation, as Figure A.9.B also suggests. The sharp pore size distribution curves of the samples (Figure A.10.B) indicate the existence of well-defined mesopores in the shell. These results are coherent with similar work reported in the literature.²⁸

Table A.II. Surface area, pore volume and size of $sSiO_2@mSiO_2$ nanoparticles with and without silver nanoparticles.

Sample	Thermal treatment	Specific surface area ($m^2.g^{-1}$)	Pore volume ($cm^3.g^{-1}$)	Mean pore diameter (nm)
$sSiO_2@mSiO_2$	500°C / 3h	711	0.77	4.7
$sSiO_2@mSiO_2$	500°C / 7h	658	0.71	4.7
$sSiO_2@mSiO_2 + Ag$	500°C / 3h	68.5	0.10	6.1

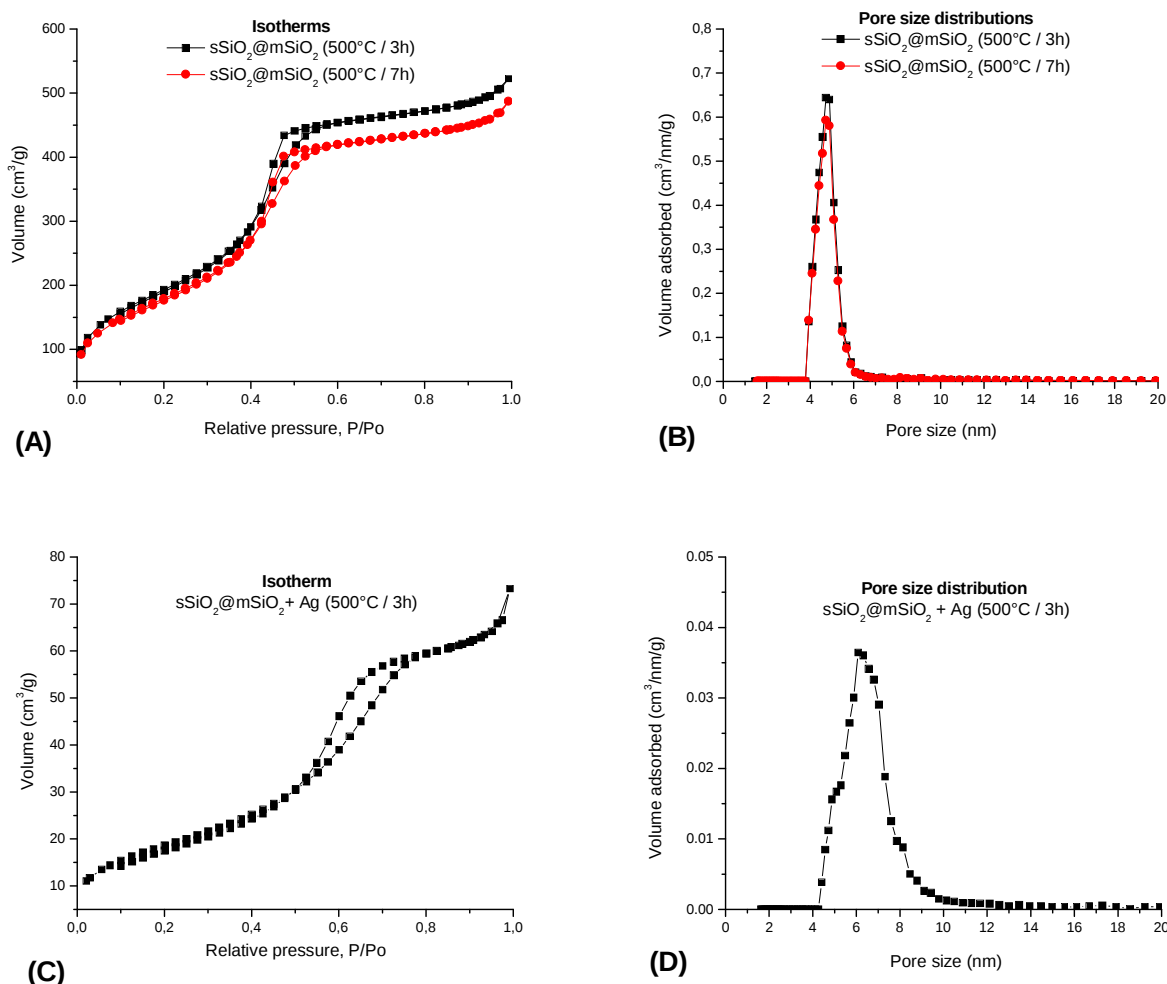


Figure A.10. Nitrogen adsorption-desorption isotherms and the corresponding pore size distribution curves for sSiO₂@mSiO₂ nanoparticles without silver treated for 3 and 7 hours (A and B), sSiO₂@mSiO₂ particles with silver nanoparticles (C and D).

Silica spheres coated with mesoporous silica shell were loaded with CIAIPc. After 24 hours of incorporation with CIAIPc in pyridine solution, the nanoparticles were centrifuged and the supernatant was collected for measurement of UV-visible absorption. The amount of CIAIPc loaded into the nanoparticles was calculated according to the standard curve (Figure A.11). Serial dilutions were made with known concentrations of CIAIPc and the UV-vis absorption spectra were obtained under the same conditions. The curve was plotted from the maximum intensity of absorbance at

676 nm, depending on the concentration of CIAIPc. The standard curve was obtained with high coefficient of determination ($R^2 = 0,99979$) with the following equation: $Abs = 0,37514 [CIAIPc, \mu g/mL] + 0,01477$. The UV-vis absorption spectra were determined from the range of 0.5 – 3.0 $\mu g/mL$.

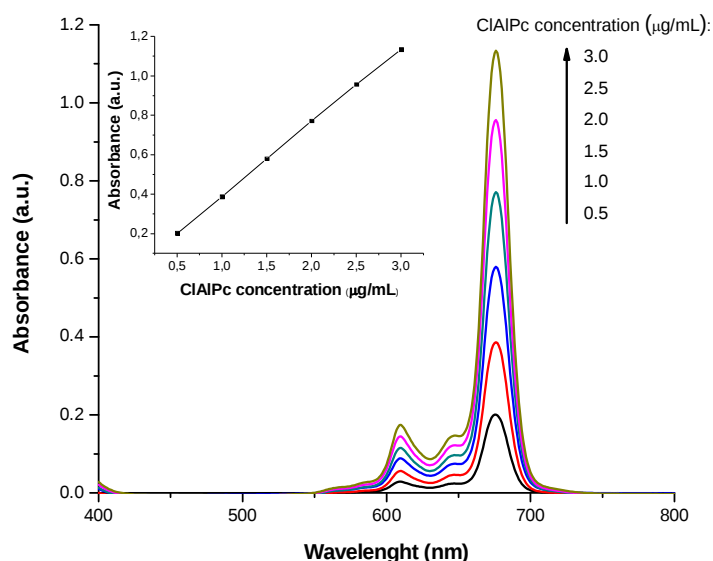


Figure A.11. UV-vis absorption spectra of standard CIAIPc solutions in pyridine with different CIAIPc concentrations (0.50–3.00 $\mu g/mL$). Inset: plot of CIAIPc concentration vs. absorbance.

The amount of CIAIPc adsorbed into the porous silica was 0.32 % and 0.47 % (w/w) for $sSiO_2@mSiO_2$ and $sSiO_2@mSiO_2 + Ag$, respectively. These results are significantly higher as compared to the work of Qian *et al.*, which loaded about 0.1 % of ZnPc into the mesoporous silica shell of $NaYF_4$ nanoparticles. Interestingly, the loading capacity is higher as surface area and pore volume are lower, as seen before for $sSiO_2@mSiO_2$ nanoparticles with silver (Table A.II). The larger pore diameters of $sSiO_2@mSiO_2 + Ag$ may be more appropriate for the access of molecules of CIAIPc to the internal surface.²⁹ Higher surface areas, produced by smaller pores, potentially allow greater adsorption.³⁰ On the other hand, very small pores may not allow some macromolecules to enter.³¹ The mesopore size of solid supports is the most important

factor influencing loading capacity.²⁹ The pore size requirements for load capacity must be investigated deeply for this system.

Photophysical and photochemical properties of $\text{sSiO}_2@\text{mSiO}_2$ and $\text{sSiO}_2@\text{mSiO}_2 + \text{Ag}$ incorporated with CIAIPc were determined for the transient triplet state of the photosensitizer and singlet oxygen, which is the major reactive specie responsible for the destruction of tumor cells. This key agent in PDT is formed from the reaction between the excited triplet state and molecular oxygen (that has a triplet ground state), by an energy transfer process. Therefore, high triplet excited state lifetime favors energy transference from drug to molecular oxygen and, consequently, singlet oxygen generation.³² Relevant factors considered in preliminary evaluation of any new potential formulation for PDT are the quantum yield of singlet oxygen production and photosensitizer triplet properties.

For PDT applications, it is important to study the photophysical behavior under nearly physiological conditions, thus the study was performed in aqueous medium (PBS pH 7.4). The CIAIPc is practically insoluble in water and PBS at room temperature.³³ Therefore, CIAIPc is not released from the pores when it is in aqueous media. Qian et al., 2009 demonstrated that zinc phthalocyanine loaded into the porous silica shell of nanoparticles is not released out of the silica while it continuously produce singlet oxygen.²⁸ Free CIAIPc was evaluated as standard in organic medium (DMSO), due to the aggregation of the photosensitizer in water.

Kinetics analysis of decay curves of the transient triplet state (Figure A.12) were used to calculate the lifetime values. Mono-exponential decay was observed for the samples, which indicates that the CIAIPc is distributed into one population with one triplet excited-state lifetime. Triplet lifetimes (τ_T), expressed as mean $\pm$ standard deviation are shown in Table A.III. Lifetime of $\text{sSiO}_2@\text{mSiO}_2 + \text{Ag}$ (44.2 ns) is greatly extended in respect to $\text{sSiO}_2@\text{mSiO}_2$ (29.7 ns). A long lifetime of the triplet excited-state is necessary to produce the toxic species efficiently.³³ Free CIAIPc presented characteristic lifetime.³⁴ Lifetimes found for heterogeneous media, in this case the CIAIPc encapsulated in the silica, are lower than homogeneous media (CIAIPc in DMSO). The environment influences on this property. Organic solvents favors longer lifetimes than aqueous media.³⁵

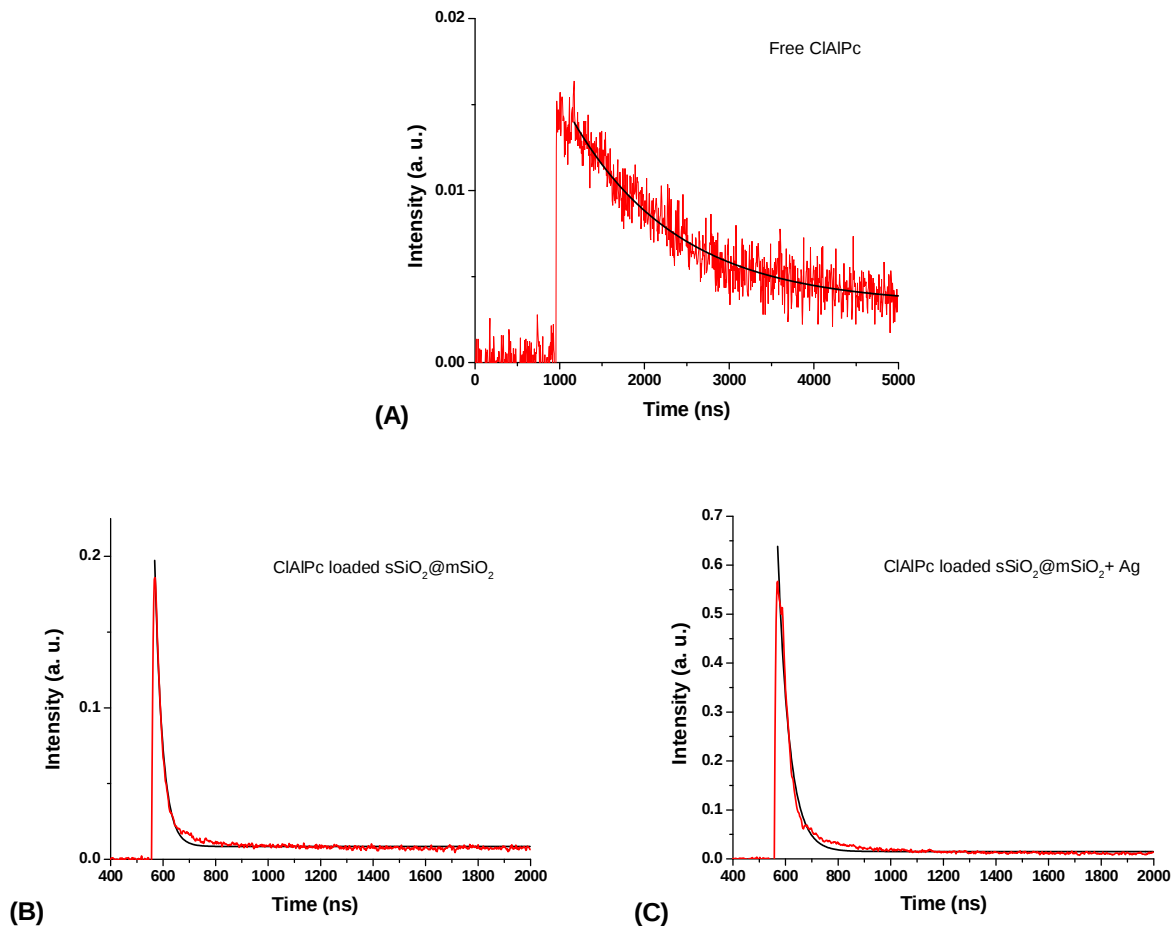


Figure A.12. Triplet transient decay curves and the exponential fit for free CIAIPc (A) and CIAIPc-loaded in nanoparticles: sSiO₂@mSiO₂ (B) and sSiO₂@mSiO₂ + Ag (C).

Table A.III. Triplet lifetimes (τ_T) for the samples.

Sample	τ_T (ns)
<i>Free CIAIPc</i>	1252.6 ± 51.9
<i>CIAIPc loaded sSiO₂@mSiO₂</i>	29.7 ± 0.1
<i>CIAIPc loaded sSiO₂@mSiO₂ + Ag</i>	44.2 ± 0.1

The singlet oxygen measurements were based on the direct determination of its characteristic phosphorescence at 1270 nm to detect the luminescence-decay kinetics. Pheophorbide-a in ethanol was used as reference of singlet oxygen production. This

compound is a derivative bacteriological hydrochloric, that is widely used as reference in this spectroscopic study, because it produces high yield of singlet oxygen and exhibits photophysical and photochemical stability. Furthermore, its Soret band is centered at the same position as those of phthalocyanine derivatives.³⁶

Singlet oxygen decay curves and the exponential fit are presented in Figure A.13. Singlet oxygen lifetimes (τ_{Δ}), expressed as mean $\pm$ standard deviation, and quantum yield of singlet oxygen production (ϕ_{Δ}) are shown in Table A.IV. The samples showed mono-exponential singlet oxygen decay curves, thus distributed into one unique population of characteristic lifetimes. The lifetime of singlet oxygen produced by CIAIPc loaded $\text{sSiO}_2@\text{mSiO}_2 + \text{Ag}$ is higher than the sample without silver and is very similar to pheophorbide-a, which is already known by producing high yield of this reactive specie. Moreover, the lifetime for $\text{sSiO}_2@\text{mSiO}_2 + \text{Ag}$ is higher than that found for free CIAIPc in organic solvent.

The singlet oxygen quantum yield was calculated based on the equation (1). The singlet oxygen quantum yield for free CIAIPc and for the formulations are similar, which indicates that the photosensitizer does not suffer degradation during encapsulation in mesoporous silica. The high yield of this cytotoxic species indicates the potential application of this mesoporous silica system in photodynamic therapy against cancer with possible enhancement of photodamage to tumor tissues.

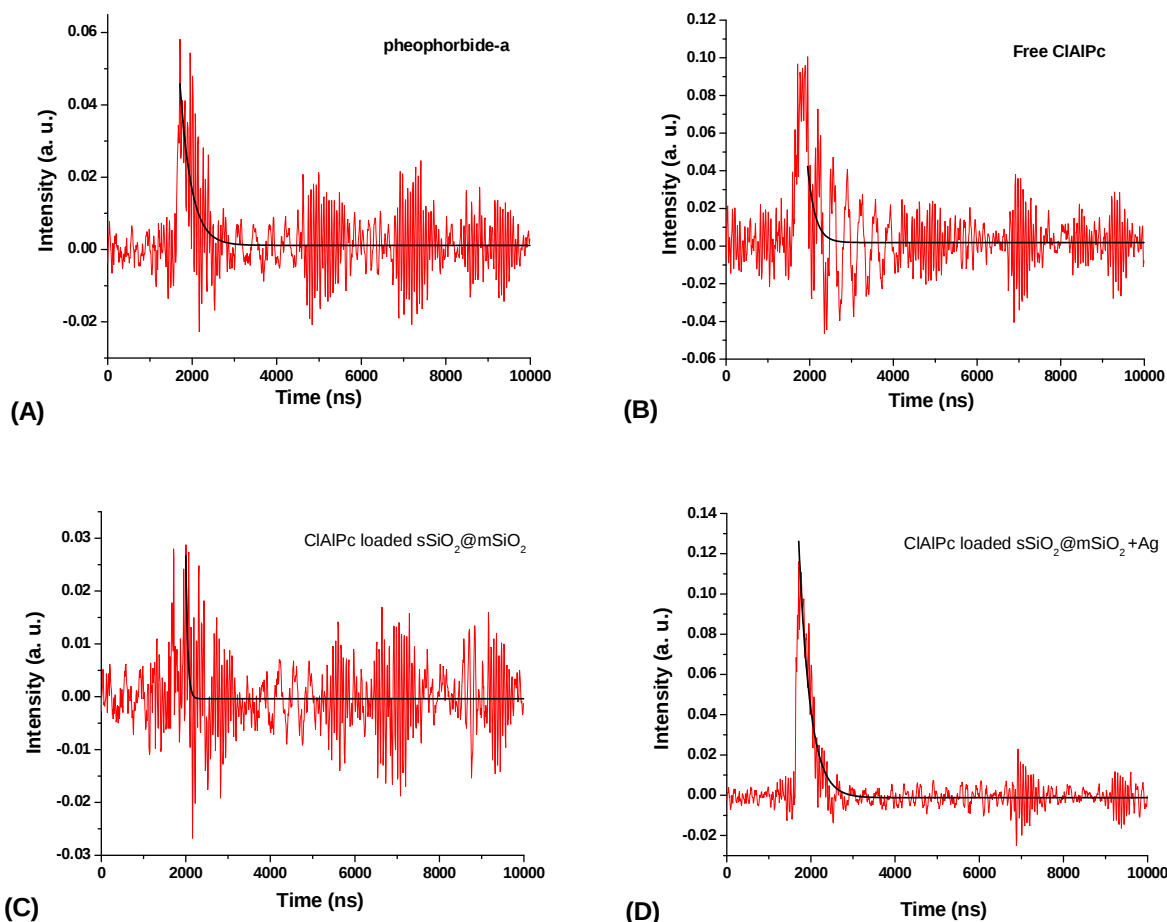


Figure A.13. Singlet oxygen decay curves and the exponential fit for reference pheophorbide-a (A), free CIAIPc (B) and CIAIPc-loaded in nanoparticles: $sSiO_2@mSiO_2$ (C) and $sSiO_2@mSiO_2 + Ag$ (D).

Table A.IV. Singlet oxygen lifetimes (τ_Δ) and quantum yield (ϕ_Δ) for the samples.

Sample	τ_Δ (ns)	ϕ_Δ
Free CIAIPc	179.1 ± 15.9	0.29*
CIAIPc loaded $sSiO_2@mSiO_2$	46.2 ± 5.9	0.32
CIAIPc loaded $sSiO_2@mSiO_2 + Ag$	270.7 ± 3.1	0.22
pheophorbide-a	269.3 ± 12.7	0.59**

*Idowu and Nyokong, 2007. ²⁴

**Roeder et al., 1996. ²⁵

The presence of silver in the nanoparticles has shown significant influence on the results. Higher intensities at decay curves and longer lifetimes of triplet state and singlet oxygen were observed as a consequence of the photosensitizer-silver interaction. Electron oscillations on the metal surface can cause effects on fluorophores in respect to the emission spectra and lifetimes.³⁷ Plasmon-enhanced effect can also induce an increase on the medium singlet oxygen production and improve the effectiveness of the therapy.¹⁶

The NaYF₄:Yb:Er nanoparticles were prepared with different molar fractions Y:Yb:Er (80:18:2 and 78:18:4) and heat treated at 300 °C for different durations (1 and 2 hours) and then coated with a silica shell. TEM images of NaYF₄:Yb:Er nanocrystals and corresponding silica coated particles (Figure A.14) demonstrates an increase in particle size when subjected to longer thermal treatment. The sample treated for 2 hours (Figure A.14.A) presents nanocrystals with different sizes (up to 57 nm) due to an incomplete formation of hexagonal nanocrystals, suggesting that more than 2 hours of thermal treatment are necessary. The respective nanoparticles coated with silica (Figure A.14.B) presented an average core size of 13 ± 3 nm and a total size (core + shell) of 35 ± 4 nm. The thickness of the silica shell was about 22 nm.

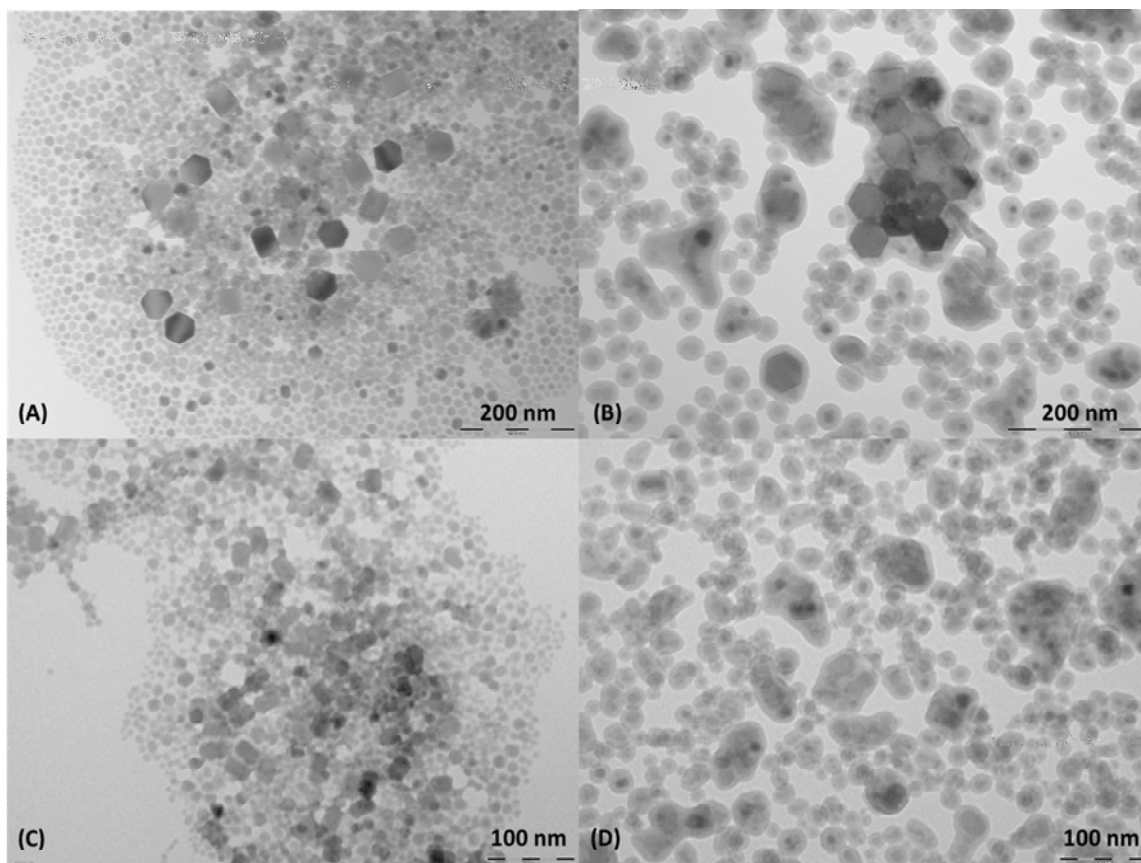


Figure A.14. TEM images of $\text{NaYF}_4:\text{Yb}:\text{Er}$ nanoparticles with molar fraction $\text{Y}:\text{Yb}:\text{Er}=78:18:4$ and thermal treatment for 2 hours (A) and with silica shell (B). $\text{Y}:\text{Yb}:\text{Er}=80:18:2$ treated for 1 hour (C) and silica coated (D).

Figure A.15 displays the upconversion emission spectra of the $\text{NaYF}_4:\text{Yb}:\text{Er}$ nanoparticles obtained under excitation at 980 nm with a laser power of 210 mW. Bands are observed at around 525, 550 and 660 nm, corresponding to the Er^{3+} transitions: $^2\text{H}_{11/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$, $^2\text{S}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$, and $^4\text{F}_{9/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ (Figure A.16). The intensity of luminescence is significantly higher for the sample subjected to longer thermal treatment and with a higher amount of Er^{3+} . As mentioned in the Introduction, Yb^{3+} is an efficient sensitizer ion for Er^{3+} upconversion emission. Visible light emitted could be seen clearly with the naked eye under relatively weak excitation at 980 nm (Figure A.16).

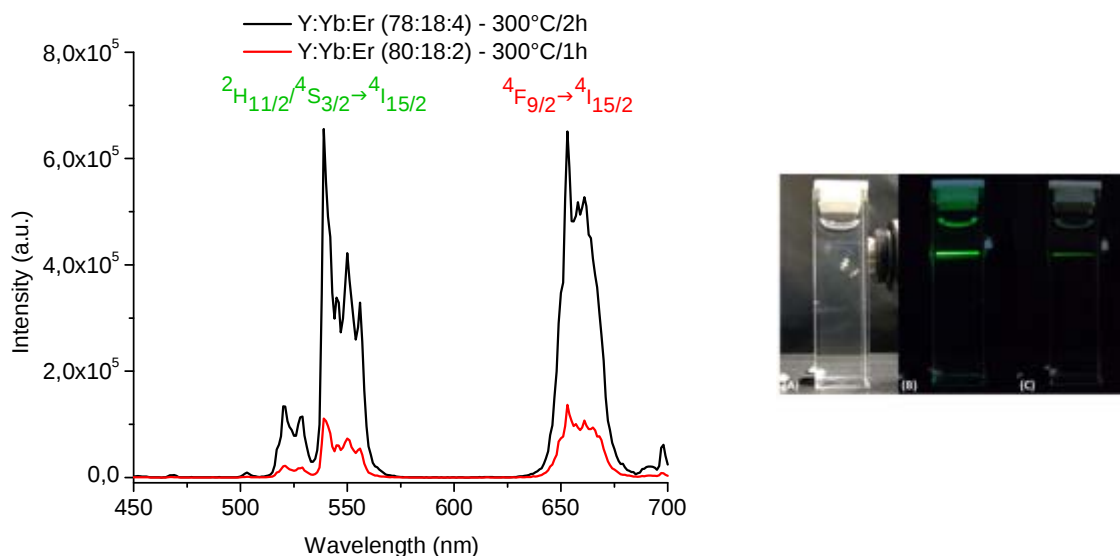


Figure A.15. Left: upconversion emission spectra of the NaYF₄:Yb:Er nanoparticles with different Y:Yb:Er molar fraction and duration of thermal treatment (left). Right: images of colloidal solutions in cyclohexane: without IR excitation (A) and Y:Yb:Er (78:18:4) - 300 °C/2h (B); and Y:Yb:Er (80:18:2) - 300 °C/1h (C) under exposure to 980 nm laser.

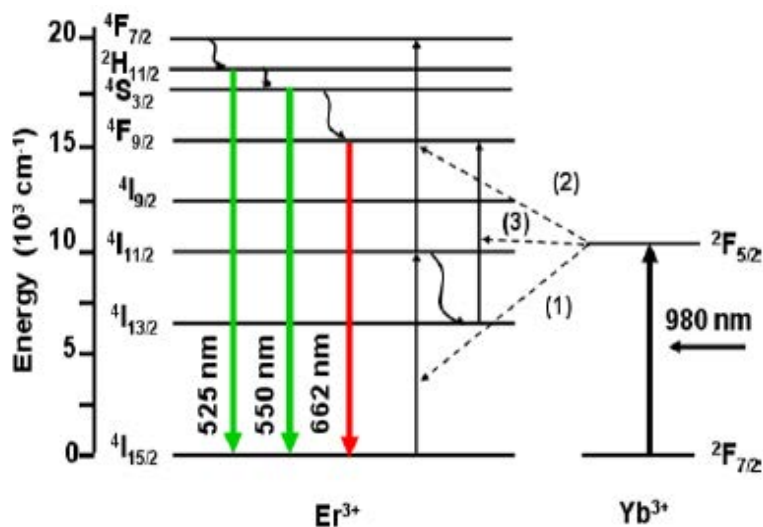


Figure A.16. Energy level diagram of Yb³⁺-Er³⁺ lanthanide ions and schematic representation for APTE or ETU process.³⁸

Figure A.17 shows the upconversion emission spectra of silica coated NaYF₄:Yb:Er nanoparticles excited at 980 nm. No fluorescence was observed at around

525 nm and 550 nm. Nanoparticles exhibited fluorescence emission only around 660 nm, which is the range of interest for application in photodynamic therapy, i.e., excitation wavelength of the photosensitizer chloroaluminum phthalocyanine (590 to 630 nm) as shown in its absorption spectrum on Figure A.18. The resulting emission at visible seen with naked eye under excitation at 980 nm (Figure A.17) is green for the sample doped with Y:Yb:Er (78:18:4) and treated at 300 °C for 1 hour and red for molar ratio Y:Yb:Er (80:18:2) and thermal treatment for 2 hours. The image of the colloidal solution without IR excitation shows that the silica coated nanoparticles were homogeneously dispersed in ethanol.

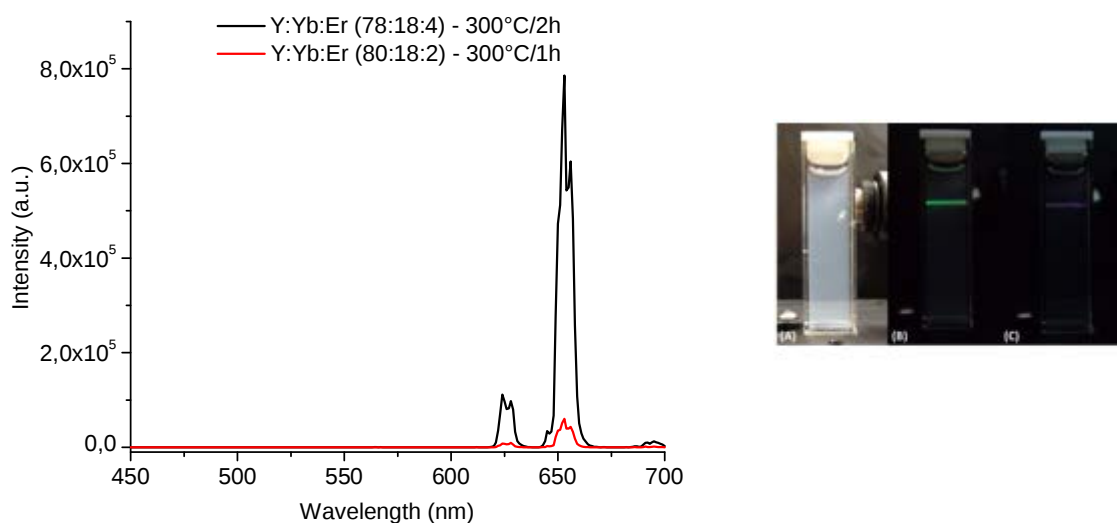


Figure A.17. Left: upconversion emission spectra of silica coated $\text{NaYF}_4\text{:Yb:Er}$ nanoparticles with different Y:Yb:Er molar fraction and duration of thermal treatment. Right: images of colloidal solutions in ethanol: without IR excitation (A) and Y:Yb:Er (78:18:4) - 300 °C/2h (B); and Y:Yb:Er (80:18:2) - 300 °C/1h (C) under exposure to 980 nm laser.

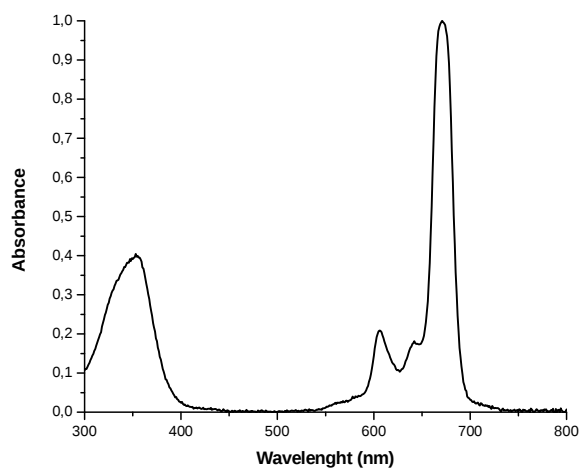


Figure A.18. Absorption spectrum of CIAIPc in ethanol solution.

The red absorption band (630–695 nm) of CIAIPc should allow the drug to absorb in the region where there is maximal tissue penetration (therapeutic window), and the peak of the fluorescence emission at around 660 nm for NaYF₄:Yb:Er nanoparticles, which should increase the efficiency of the cell damage and tumor response to the phototreatment.

A.5 CONCLUSIONS

In the present study, an elegant and easy synthesis of silver nanoparticles in silica spheres was developed. This method was applied to synthesize silver nanoparticles in solid silica core/mesoporous silica shell nanospheres. Silica material was prepared with a porosity suitable for loading with photosensitizer for application in photodynamic therapy. The potential application of these nanoparticles on photodynamic therapy was studied in terms of photophysical and photochemical properties. The silica nanostructure does not suppress both of the phenomena studied here: the population of triplet state and production of singlet oxygen. These parameters were affected by addition of Ag nanoparticles in silica structure. Silver ions present in silica enhanced the triplet excited-state and singlet oxygen lifetime due to surface plasmon resonance generated by the metal nanoparticles.

NaYF₄:Yb:Er nanoparticles demonstrated the ability to convert infrared energy into visible emission under NIR excitation, and this emission was coincident to the wavelength of excitation of the photosensitizer (CIAIPc) for application in PDT. This excitation wavelength is advantageous for application in biological systems, as it allows deeper penetration into tissues than the UV or visible radiation commonly used for luminescence excitation. Upconversion emission was also observed for silica coated NaYF₄:Yb:Er nanoparticles. Therefore, silica coated NaYF₄:Yb:Er nanoparticles may be homogeneously dispersed in ethanol or water, which is important for biological applications, and functional chemical groups present on the surface of silica shell may be useful in the future for conjugation of biomolecules.

The synthesis of NaYF₄:Yb:Er nanoparticles still needs to be optimized to obtain the formation of homogeneous of hexagonal nanocrystals. Then, mesoporous silica shell with silver nanoparticles will be formed on the upconversion nanoparticles' surface and, after loading CIAIPc, the system will be tested as a plasmon-enhanced sensitizer-active system useful for the treatment of neoplastic and non-neoplastic diseases susceptible to the photoactivation process.

REFERENCES

- 1 AUZEL, F. Upconversion and anti-stokes processes with f and d ions in solids. **Chem. Rev.**, v. 104, p. 139-173, 2004.
- 2 ZHANG, P.; STEELANT, W.; KUMAR, M.; SCHOLFIELD, M. Versatile photosensitizers for photodynamic therapy at infrared excitation. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 129, p. 4526-4527, 2007.
- 3 YUAN, P.; LEE, Y. H.; GNANASAMMANDHAN, M. K.; GUAN, Z.; ZHANG, Y.; XU, Q. H. Plasmon enhanced upconversion luminescence of NaYF₄:Yb,Er@SiO₂@Ag core-shell nanocomposites for cell imaging. **Nanoscale**, v. 4, p. 5132-5137, 2012.
- 4 BARRETO, J. A.; O'MALLEY, W.; KUBEIL, M.; GRAHAM, B.; STEPHAN, H.; SPICCIA, L. Nanomaterials: applications in cancer imaging and therapy. **Adv. Mater.**, v. 23, p. H18-H40, 2011.
- 5 DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 3, n. 5, p. 380-387, 2003.
- 6 WILSON, B. C. Photodynamic therapy for cancer: principles. **Can. J. Gastroenterol.**, v. 16, n. 6, p. 393-396, 2002.
- 7 VROUENRAETS, M. B.; VISSER, G. W.; SNOW, G. B.; VAN DONGEN, G. A. Basic principles, applications in oncology and improved selectivity of photodynamic therapy. **Anticancer Res.**, v. 23, p. 505-522, 2003.
- 8 HUIGNARD, A.; GACOIN, T.; BOILOT, J. P. Synthesis and luminescence properties of colloidal YVO₄:Eu phosphors. **Chem. Mater.**, v. 12, p. 1090-1094, 2000.
- 9 HUIGNARD, A.; BUISSETTE, V.; LAURENT, G.; GACOIN, T.; BOILOT, J. P. Synthesis and characterizations of YVO₄:Eu colloids. **Chem. Mater.**, v. 14, p. 2264-2269, 2002.
- 10 HUIGNARD, A.; BUISSETTE, V.; FRANVILLE, A. C.; GACOIN, T.; BOILOT, J-P. Emission processes in YVO₄:Eu nanoparticles. **J. Phys. Chem. B.**, v. 107, p. 6754-6759, 2003.
- 11 KRÄMER, K. W.; BINDER, D.; FREI, G.; GÜDEL, H. U.; HEHLEN, M. P.; LÜTHI, S. R. Hexagonal sodium yttrium fluoride based green and blue emitting upconversion phosphors. **Chem. Mater.**, v. 16, p. 1244-1251, 2004.
- 12 LAKOWICZ, J. R.; CHOWDHURY, M. H.; RAY, K.; ZHANG, J.; FU, Y.; BADUGU, R.; SABANAYAGAM, C. R.; NOWACZYK, K.; SZMACINSKI, H.; ASLAN, K.; GEDDES, C. D. Plasmon-controlled fluorescence: a new detection technology. **Proc. of SPIE**, v. 6099, p. 609909/1-609909/15, 2006.

-
- 13 TRIPP, R. A.; DLUHY, R. A.; ZHAO, Y. Novel nanostructures for SERS biosensing. **Nanotoday**, v. 3, n. 3/4, p. 31-37, 2008.
- 14 ZHANG, Y.; ASLAN, K.; PREVITE, M. J. R.; GEDDES, C. D. Metal-enhanced singlet oxygen generation: a consequence of plasmon enhanced triplet yields. **J. Fluoresc.**, v. 17, p. 345-349, 2007.
- 15 OO, M. K. K.; YANG, Y.; HU, Y.; GOMEZ, M.; DU, H.; WANG, H. Gold nanoparticle-enhanced and size-dependent generation of reactive oxygen species from protoporphyrin IX. **ACS Nano**, v. 6, n. 3, p. 1939-1947, 2012.
- 16 MELO, L. S. A. de; GOMES, A. S. L.; SASKA, S.; NIGOGHOSSIAN, K.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L.; ARAUJO, R. E. de. Singlet oxygen generation enhanced by silver-pectin nanoparticles. **J. Fluoresc.**, v. 22, n. 6, p. 1633-1638, 2012.
- 17 SIMO, A.; POLTE, J.; PFÄNDER, N.; VAINIO, U.; EMMERLING, F.; RADEMAN, K. Formation mechanism of silver nanoparticles stabilized in glassy matrices. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 134, p. 18824-18833, 2012.
- 18 CHEN, Y.; CHEN, H.; GUO, L.; HE, Q.; CHEN, F.; ZHOU, J.; FENG, J.; SHI, J. Hollow/rattle-type mesoporous nanostructures by a structural difference-based selective etching strategy. **ACS Nano**, v. 4, n. 1, p. 529-539, 2010.
- 19 CHEN, X. Core/shell structured silica spheres with controllable thickness of mesoporous shell and its adsorption, drug storage and release properties. **Colloids Surf. A**, v. 428, p. 79-85, 2013.
- 20 LEI, C.; CHEN, B.; LI, X.; QI, W.; LIU, J. Non-destructively shattered mesoporous silica for protein drug delivery. **Microporous Mesoporous Mater.**, v.175, p. 157-160, 2013.
- 21 BUCHEL, G.; UNGER, K. K.; MATSUMOTO, A.; TSUTSUMI, K. A novel pathway for synthesis of submicrometer-size solid core/mesoporous shell silica spheres. **Adv. Mater.**, v. 10, n.13, p. 1036-1038, 1998.
- 22 YOON, S. B.; SOHN, K.; KIM, J. Y.; SHIN, C. H.; YU, J. S.; HYEON, T. Fabrication of carbon capsules with hollow macroporous core/mesoporous shell structures. **Adv. Mater.**, v. 14, n. 1, p. 19-21, 2002.
- 23 STÖBER, W.; FINK, A.; BOHN, E. Controlled growth of monodispersed silica spheres in micro size range. **J. Colloid Interf. Sci.**, v. 26, p. 62-69, 1968.
- 24 IDOWU, M.; NYOKONG, T. Photophysical and photochemical properties of zinc and aluminum phthalocyanines in the presence of magnetic fluid. **J. Photochem. Photobiol. A**, v. 188, p. 200-206, 2007.

25 ROEDER, B.; HACKBARTH, S.; KORTH, O.; HERTER, R.; HANKE, T.; HOEHNE, W. Photophysical properties of pheophorbide a in different carrier-systems. In: RENBERG, B.; JORI, G.; MOAN, J. (Ed.). **Photochemotherapy**: photodynamic therapy and other modalities. Bellingham: SPIE - The International Society for Optical Engineering, 1996. v. 2625, p. 179-186.

26 SING, K. S. W.; EVERETT, D. H.; HAUL, R. A. W.; MOSCOU, L.; PIEROTTI, R. A.; ROUQUEROL, J.; SIEMIENIEWSKA, T. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity, IUPAC recommendations 1984. **Pure Appl. Chem.**, v. 57, n. 4, p. 603-619, 1985.

27 LOWELL, S.; SHIELDS, J. E. Adsorption isotherms. In: _____. **Powder surface area and porosity**. 2nd ed. London: Chapman and Hall, 1984. p. 11-13.

28 QIAN, H. S.; GUO, H. C.; HO, P. C. L.; MAHENDRAN, R.; ZHANG, Y. Mesoporous-silica-coated up-conversion fluorescent nanoparticles for photodynamic therapy. **Small**, v. 5, n. 20, p. 2285-2290, 2009.

29 DRISKO, G. L.; CAO, L.; KIMLING, M. C.; HARRISSON, S.; LUCA, V.; CARUSO, R. A. Pore size and volume effects on the incorporation of polymer into macro- and mesoporous zirconium titanium oxide membranes. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v. 1, n. 12, p. 2893-2901, 2009.

30 MISHAEL, Y. G.; DUBIN, P. L.; DE VRIES, R.; KAYITMAZER, A. B. Effect of pore size on adsorption of a polyelectrolyte to porous glass. **Langmuir**, v. 23, n. 5, p. 2510-2516, 2007.

31 WANG, Y.; ANGELATOS, A. S.; DUNSTAN, D. E.; CARUSO, F. Infiltration of macromolecules into nanoporous silica particles. **Macromolecules**, v. 40, n. 21, p. 7594-7600, 2007.

32 PAULA, C. S. de; TEDESCO, A. C.; PRIMO, F. L.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; MOSQUEIRA, V. C. F. Chloroaluminium phthalocyanine polymeric nanoparticles as photosensitisers: photophysical and physicochemical characterisation, release and phototoxicity *in vitro*. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 49, p. 371-381, 2013.

33 KLUSON, P.; DROBEK, M.; KALAJI, A.; ZARUBOVA, S.; KRYSA, J.; RAKUSAN, J. Singlet oxygen photogeneration efficiencies of a series of phthalocyanines in well-defined spectral regions. **J. Photochem. Photobiol. A Chem.**, v. 199, p. 267-273, 2008.

34 NUNES, S. M. T.; SGUILLA, F. S.; TEDESCO, A. C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, p. 273-284, 2004.

35 GRABNER, G.; RECHTHALER, K.; MAYER, B.; KÖHLER, G. Solvent influences on the photophysics of naphthalene: fluorescence and triplet state properties in aqueous solutions and in cyclodextrin complexes. **J. Phys. Chem. A**, v. 104, n. 7, p. 1365-1376.

36 KRASNOVSKY, A. A. Jr.; NEVEROV, K. V.; EGOROV, S. Y.; ROEDER, B.; LEVALD, T. Photophysical studies of pheophorbide a and pheophytin a: phosphorescence and photosensitized singlet oxygen luminescence. **J. Photochem. Photobiol. B Biol.**, v. 5, p. 245-254, 1990.

37 LAKOWICZ, J. R.; SHEN, Y.; D'AURIA, S.; MALICKA, J.; FANG, J.; GRYCZYNSKI, Z.; GRYCZYNSKI, I. Radiative decay engineering 2: effects of silver island films on fluorescence intensity, lifetimes, and resonance energy transfer. **Anal. Biochem.**, v. 301, p. 261-277, 2002.

38 KASSAB, L. R. P.; BOMFIM, F. A.; MARTINELLI, J. R.; WETTER, N. U.; JAKUTIS NETO, J.; ARAÚJO, C. B. de. Energy transfer and frequency upconversion in Yb³⁺-Er³⁺-doped PbO-GeO₂ glass containing silver nanoparticles. **Appl. Phys. B**, v. 94, p. 239-242, 2009.